



Universidad de Sevilla

FACULTAD DE FARMACIA



**Ácido Fólico como antioxidante
renal frente al “Binge Drinking”
en la adolescencia**

MARÍA DEL CARMEN GALLEGO LÓPEZ



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



Ácido Fólico como antioxidante renal frente al “Binge Drinking” en la adolescencia

María del Carmen Gallego López

Sevilla, Julio de 2020

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Tutora: Dra. M^a Luisa Ojeda Murillo

Trabajo Fin de Grado Experimental

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio experimental del grupo PAIDI:
Implicación del Balance Oxidativo en la Salud: Alcoholismo y Síndrome Metabólico
(Departamento de Fisiología, Universidad de Sevilla)

RESUMEN

Se conoce como *Binge Drinking* (BD) al consumo episódico excesivo de alcohol en forma de atracón, y actualmente, se trata de un patrón de consumo más prevalente en adolescentes que en adultos, considerándose un problema de salud pública, ya que la adolescencia constituye una etapa especialmente vulnerable a los efectos neurotóxicos del alcohol, convirtiéndose el BD, en un factor de riesgo para múltiples patologías a corto y largo plazo.

El metabolismo del alcohol, en especial cuando se consume a altas dosis, favorece la aparición de estrés oxidativo en los tejidos donde se metaboliza, por ejemplo, los riñones. Cuando los componentes de las células de la nefrona se oxidan, se altera su funcionalidad.

El ácido fólico (AF) es una vitamina con carácter antioxidante disminuida en pacientes alcohólicos. Por consiguiente, el objetivo del presente estudio es analizar si la suplementación con AF en ratas adolescentes expuestas a BD, mejora el balance oxidativo renal, midiendo la actividad de las enzimas antioxidantes; y su funcionalidad respecto al balance hídrico-salino, evaluando los niveles de sodio y aldosterona en suero, y el aclaramiento de creatinina.

Los resultados obtenidos muestran que el consumo agudo de alcohol en forma de BD provoca un desbalance oxidativo en los riñones, siendo la glutatión peroxidasa (GPx) la enzima más afectada, disminuyendo drásticamente su actividad. Además, el BD compromete la función renal, disminuyendo la Tasa de Filtración Glomerular y produciendo hipernatremia, debido al aumento de los niveles de aldosterona en suero.

La suplementación con AF ha resultado ser eficaz, pues restablece el equilibrio oxidativo evitando la oxidación lipídica, y regula los niveles de aldosterona, mejorando el balance hídrico-salino.

En conclusión, la suplementación con AF podría ser una terapia beneficiosa en adolescentes que consumen alcohol en forma de BD, ya que contrarresta los daños que provoca esta droga en los riñones.

PALABRAS CLAVE: “Binge Drinking”, ratas adolescentes, estrés oxidativo, alteraciones renales, ácido fólico.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Binge Drinking.....	1
1.1.1	Generalidades	1
1.1.2	Metabolismo del alcohol.....	2
1.1.3	Balance oxidativo y Binge Drinking.....	5
1.1.4	Alteraciones renales y Binge Drinking	8
1.2	Ácido fólico.....	10
1.2.1	Generalidades	10
1.2.2	Balance oxidativo y ácido fólico	12
1.2.3	Alteraciones renales y ácido fólico	12
1.3	Binge Drinking y ácido fólico.....	13
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1	Animales de experimentación	15
3.1.1	Animales y condiciones experimentales	15
3.1.2	Dieta utilizada.....	16
3.1.3	Método de alcoholización	16
3.1.4	Estudio nutricional y de la ingesta de ácido fólico	16
3.1.5	Estudio macroscópico	16
3.2	Toma y procesamiento de las muestras de ratas.....	16
3.2.1	Obtención y tratamiento de las muestras de orina	16
3.2.2	Obtención y tratamiento de las muestras de suero	17
3.2.3	Obtención y tratamiento de los riñones	17
3.3	Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas en los riñones	17
3.3.1	Homogeneización del tejido.....	17
3.3.2	Concentración total de proteínas.....	17
3.3.3	Actividad de la glutatión peroxidasa.....	18
3.3.4	Actividad de la glutatión reductasa.....	19
3.3.5	Actividad de la superóxido dismutasa.....	20
3.3.6	Actividad de la catalasa.....	21
3.3.7	Peroxidación lipídica.....	21
3.3.8	Oxidación de proteínas.....	22
3.4	Determinaciones bioquímicas en suero y orina.....	23
3.4.1	Parámetros relacionados con la función renal	23
3.4.2	Determinación de los niveles de aldosterona en sangre	23
3.5	Cálculo de la función renal: aclaramiento de creatinina	24

3.6	Análisis estadístico	24
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	Control nutricional y morfológico	24
4.2	Balance oxidativo en los riñones	26
4.3	Valoración de la función renal	28
5	CONCLUSIONES	31
6	BIBLIOGRAFÍA	32

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Binge Drinking

1.1.1 Generalidades

El alcohol es una sustancia psicoactiva, depresora del Sistema Nervioso Central, que inhibe progresivamente las funciones cerebrales. Afecta a la capacidad de autocontrol, produciendo inicialmente euforia y desinhibición, por lo que puede confundirse con un estimulante. Se le atribuyen propiedades causantes de dependencia, y es una droga que se ha utilizado ampliamente en muchas culturas durante siglos.

El consumo nocivo de alcohol conlleva una pesada carga social y económica para las sociedades. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), cada año se producen 3 millones de muertes en el mundo debido al consumo nocivo de alcohol, lo que representa un 5,3% de todas las defunciones.

Hoy en día, el consumo episódico excesivo de alcohol en forma de atracón (*Binge Drinking* en anglosajón), es uno de los patrones de consumo de alcohol más prevalentes (Vargas et al., 2018).

El Instituto Nacional sobre el Abuso del Alcohol y el Alcoholismo (NIAAA) define *Binge Drinking* o *botellón* (BD) como una forma de consumo que provoca que la concentración de alcohol en sangre alcance el 0.8%, lo que es considerado como una dosis claramente aguda. Este nivel normalmente se adquiere después de que una mujer consuma cuatro o más bebidas alcohólicas o un hombre consuma cinco o más, en un tiempo aproximado de 2 horas (White et al., 2018).

El BD se trata de una actividad más común en adolescentes que en adultos. La adolescencia es una etapa en la que las personas son especialmente vulnerables a la influencia de su grupo de iguales, lo que podría conducir al desarrollo de comportamientos problemáticos, como beber alcohol, debido a la presión percibida. De hecho, el alcohol es la sustancia psicoactiva más utilizada por los estudiantes de secundaria. Su uso es especialmente peligroso porque en la adolescencia el cerebro es particularmente sensible a los efectos neurotóxicos del alcohol (Pérez et al., 2020).

Estudios realizados en adolescentes sugieren que el BD se asocia a deficiencias en el funcionamiento cognitivo relacionadas con el aprendizaje, memoria, velocidad psicomotora, atención, etc. Por otro lado, estudios realizados en roedores y primates no humanos, apuntan a que estas consecuencias cognitivas debidas al consumo de alcohol en la adolescencia, pueden persistir hasta la edad adulta (Lees et al., 2020). Recientemente se ha demostrado que el BD puede dañar otros órganos además del cerebro, incluidos el tracto intestinal, el hígado y el corazón (White et al., 2018).

La última encuesta realizada sobre el uso de drogas en enseñanzas secundarias en España (ESTUDES), refleja la prevalencia del BD en nuestro país. En 2018, el 32,3% de los alumnos de 14 a 18 años reconoció haber realizado este tipo de consumo en los últimos 30 días, lo que supone una similitud de la prevalencia con respecto a los datos registrados en 2014 y en 2016. Por otro lado, más de la mitad de los estudiantes que bebieron alcohol en el último mes realizaron BD en el mismo periodo (55,5%), dato superior al registrado en 2014 y en 2016, siendo muy similar al registrado en 2012 (56,8%).

El consumo de alcohol en los adolescentes es por tanto, una realidad ampliamente extendida, que es perjudicial para su salud y desarrollo psicosocial a corto y largo plazo.

1.1.2 Metabolismo del alcohol

Es interesante conocer el metabolismo del alcohol para entender las consecuencias tóxicas de su consumo.

El pequeño tamaño y la solubilidad acuosa de la molécula de etanol (C_2H_5OH) hace que, una vez que se ingiere, se absorba principal y rápidamente por difusión pasiva en la mucosa digestiva del estómago, intestino delgado y colon, y posteriormente, se distribuya libremente en el agua corporal y los diversos tejidos del organismo (Paquot, 2019).

La biotransformación fundamental del etanol se produce mediante un metabolismo enzimático oxidativo (Aragón et al., 2002). En condiciones normales, en el **hígado** se metaboliza el 80-90% del etanol, mientras que sólo una mínima parte se oxida en otros órganos, como el tubo gastrointestinal, los pulmones, el riñón y el cerebro (Hernández et al., 2014).

El etanol es oxidado por el hepatocito en dos pasos consecutivos: la conversión de etanol a acetaldehído y de este último a acetato (Figura 1). En el hepatocito existen tres vías metabólicas que oxidan al etanol a acetaldehído (Hernández et al., 2014):

- La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), situada en el citosol.
- El sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE), localizado en el retículo endoplasmático.
- La enzima catalasa (CAT), en los peroxisomas.

De estos tres sistemas enzimáticos, la vía predominante es la controlada por la **ADH**, porque se activa para concentraciones muy bajas de alcohol (1 mmol/l, que corresponde a la K_m de la enzima) (Paquot, 2019). Se trata de una enzima dependiente de NAD^+ . Durante la reacción, se transfiere el hidrógeno del sustrato (el etanol), al cofactor NAD^+ , transformándolo en NADH y produciendo acetaldehído. El hecho de que aumente el cociente $NADH:NAD^+$ tiene repercusiones en el estado redox del hepatocito, porque crece el flujo de electrones a través de la cadena

respiratoria mitocondrial, lo que se considera un factor determinante del daño hepático generado por este tóxico (Hernández et al., 2014).

La ADH al ser una enzima de baja Km, se satura fácilmente. Por ello, en situaciones de consumo agudo y elevado de alcohol, como el BD, los otros dos sistemas enzimáticos deben ser activados para que tenga lugar la eliminación hepática del etanol (Aragón et al., 2002).

El **SMOE** es un sistema complejo que comprende a una isoforma del citocromo P450 inducible por el etanol. Esta isoforma es el citocromo P450-2E1 (CYP4502E1), que utiliza NADPH y oxígeno molecular para oxidar el etanol en acetaldehído con producción de NADP⁺; por lo que, al igual que la ADH, contribuye a alterar el equilibrio redox en la célula. Su hiperestimulación produce directamente un exceso de radicales libres y el consiguiente estrés oxidativo (Carreras y Castellano, 2012).

En tercer lugar, la **CAT**, enzima dependiente de hierro, puede oxidar el etanol utilizando una molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En condiciones fisiológicas la oxidación del etanol por la catalasa no tiene un papel relevante en su eliminación; sin embargo, en el alcoholismo crónico parece tener un papel más destacado, principalmente en órganos extrahepáticos, como el sistema nervioso (Hernández et al., 2014).

El acetaldehído producido por estas tres vías metabólicas es oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (**ALDH**), que necesita NAD⁺ como cofactor. En el hígado existen dos isoenzimas, la ALDH-1 citosólica, y la ALDH-2 mitocondrial. El acetaldehído se metaboliza fundamentalmente en la mitocondria, pues la Km de la ALDH-2 es menor que la de la ALDH-1, y por tanto, tiene una mayor afinidad por el sustrato (Aragón et al., 2002).

Como resultado de la actividad de la ALDH, los niveles sistémicos de acetaldehído se mantienen bajos. El acetaldehído es un compuesto químicamente reactivo con una toxicidad significativa y, para las personas que expresan una forma inactiva de la ALDH-2, el consumo de etanol puede tener efectos secundarios que van desde sensaciones desagradables hasta enfermedades graves.

El acetato, el principal producto de la oxidación del etanol, tiene funciones tanto en metabolismo energético, como en la regulación del metabolismo (Wilson y Matschinsky, 2020).

La alteración del equilibrio redox en la célula, previamente mencionada, debida al metabolismo oxidativo del etanol, provoca un aumento del consumo de oxígeno en la cadena respiratoria. Esto, a su vez, tiene como consecuencia la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) o radicales libres, que afectan de manera importante a las macromoléculas y condicionan la aparición de estrés oxidativo (Hernández et al., 2014).

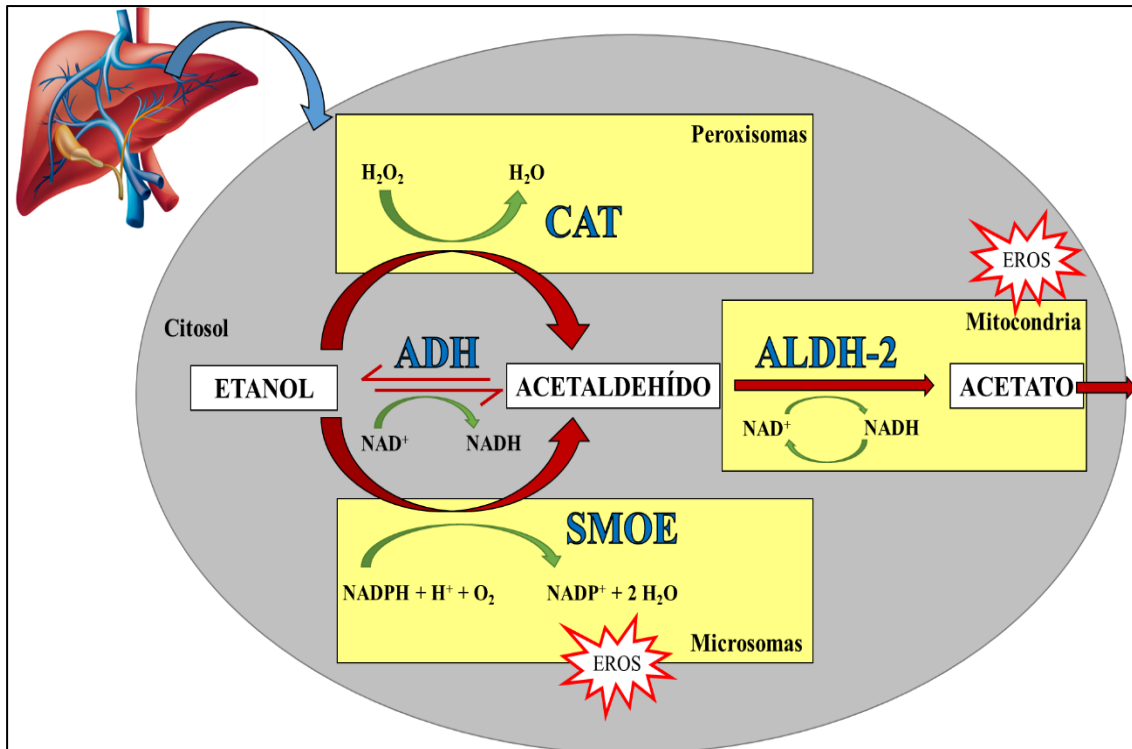


Figura 1. Esquema representativo del metabolismo oxidativo del alcohol en el hígado (Gallego López, 2020).

Además del metabolismo oxidativo del etanol, que es la vía preferente para su eliminación, se ha descrito una vía no oxidativa, menos importante, en la que el alcohol reacciona con ácidos grasos formando etil éster de ácidos grasos y fosfatidil etanol, que son compuestos sumamente tóxicos para diversos tipos celulares y tejidos (Hernández et al., 2014). Y aproximadamente el 1% de la eliminación del etanol está ligada a factores no metabólicos, mediante su incorporación a la orina, las heces, el sudor y el aire exhalado (Aragón et al., 2002).

En cuanto al metabolismo del alcohol en los **riñones**, se encuentra favorecido en el consumo de grandes cantidades de alcohol, cuando las enzimas hepáticas se han colapsado. Es llevado a cabo por las mismas enzimas que intervienen en el metabolismo oxidativo hepático; siendo igualmente la vía principal la ADH. En un experimento en el que se alimentó a ratas adultas durante 10 semanas con etanol al 20%, se observó un aumento en la actividad de la ADH y la CAT en el riñón (Das y Vasudevan, 2008). En relación al SMOE, el riñón expresa aproximadamente una décima parte del contenido de CYP2E1 del cuerpo, por lo que el riñón metaboliza el etanol circulante con la generación local de EROS (Goc et al., 2019).

Respecto a las vías no oxidativas, el tratamiento con etanol causó un aumento significativo en los niveles de ésteres etílicos de ácidos grasos, los cuales juegan un papel central en el daño orgánico inducido por el alcohol (Das y Vasudevan, 2008).

1.1.3 Balance oxidativo y Binge Drinking

Los **radicales libres** son átomos, moléculas o compuestos que contienen un electrón desapareado en su orbital exterior. Ese electrón le confiere gran inestabilidad y un alto poder oxidante o reductor, lo que los hace reaccionar de inmediato con otras moléculas o sustancias que estén cercanas para aparearse con ellas y lograr estabilidad (Hernández et al., 2014). Cabe destacar un tipo de radicales libres que son las **especies reactivas de oxígeno (EROS)**. Las EROS son moléculas pequeñas, altamente reactivas, que contienen oxígeno, y se generan naturalmente en pequeñas cantidades durante las reacciones metabólicas del cuerpo (Wu y Cederbaum, 2003). Dentro de las principales EROS se incluyen: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ión hipoclorito (OCl^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Para alcanzar un estado químico más estable, las EROS pueden robar un átomo de hidrógeno, ligarse químicamente a otra molécula, o actuar recíprocamente con otros radicales libres; es decir, intentan equilibrarse reaccionando con otros átomos o moléculas cercanas, alterando así las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.) y provocando daño celular, cuando existe exceso de EROS.

Debido a que las EROS o en inglés ROS se producen de forma natural durante los procesos metabólicos, las células han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante, que previenen su formación, o promueven la detoxificación. En condiciones normales, existe un equilibrio entre las EROS y los sistemas antioxidantes endógenos, que es lo que se conoce como **balance oxidativo** (Figura 2). Si este equilibrio se modifica a favor de las primeras y/o se debilitan los sistemas antioxidantes, se induce una situación conocida como **estrés oxidativo (EO)**, que puede ser de tal magnitud que termine por afectar a las funciones principales de la célula e inducir su muerte, ya sea por necrosis o por apoptosis (Hernández et al., 2014).

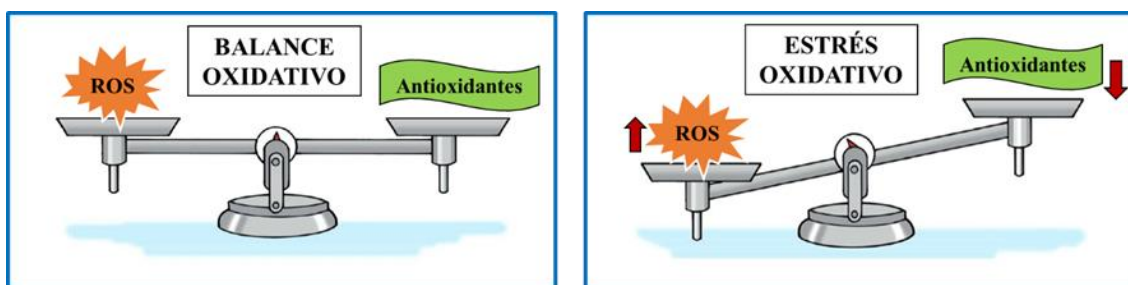


Figura 2. Descripción de balance oxidativo y estrés oxidativo (Gallego López, 2020).

El organismo cuenta con **dos tipos de mecanismos de defensa antioxidante**: los mecanismos enzimáticos y los no enzimáticos.

Los sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos son la principal defensa del organismo frente al daño oxidativo (Figura 3). Se incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Actúan en sincronización, en las fases iniciales de síntesis de EROS, inactivando sus moléculas precursoras: $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , evitando

así que interaccionen entre ellas o con otras moléculas, formándose radicales más reactivos como el anión peroxinitrito (ONOO^-) o el radical $\bullet\text{OH}$ (Sandoval et al., 2019).

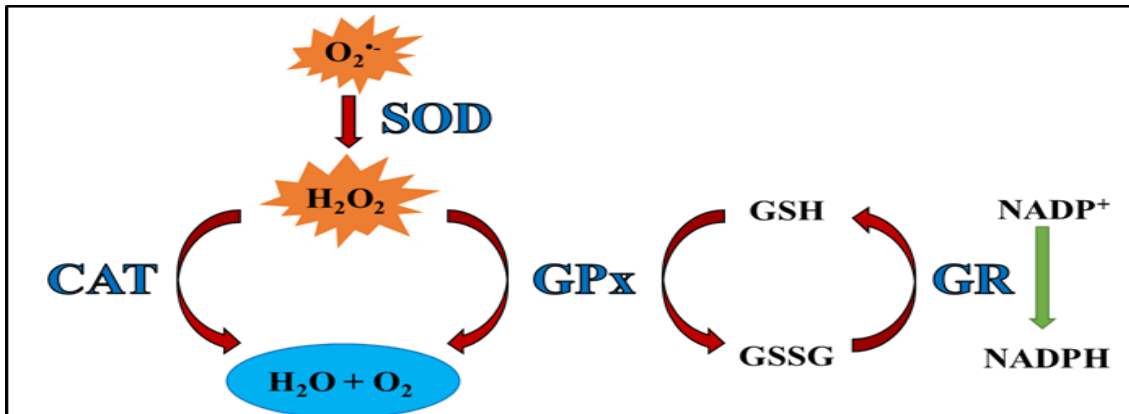


Figura 3. Esquema general de reducción del anión superóxido a través de los sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos (Gallego López, 2020).

La **SOD** se encarga de la dismutación de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . En los mamíferos hay varios tipos de SOD, que difieren con respecto a su ubicación en las células y los iones metálicos que requieren para su función. Por ejemplo, la Cu/Zn-SOD, localizada en el citosol; y la Mn-SOD que se encuentra en la mitocondria.

La CAT y el sistema antioxidante GPx/GR llevan a cabo la eliminación del H_2O_2 , producido en parte por la acción previa de la SOD. La **CAT** cataliza la dismutación y peroxidación de dos moléculas de H_2O_2 , produciendo oxígeno y agua. El **sistema GPx/GR** elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos, dando lugar también como la CAT a oxígeno y agua. Este par antioxidante utiliza como cofactores glutatión (GSH) y NADP^+ (Figura 3) (Wu y Cederbaum, 2003).

Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos pueden ser endógenos y exógenos. Los endógenos sintetizados por el propio organismo son: GSH, ácido úrico, proteínas plasmáticas, etc. El tripéptido **GSH** es probablemente el antioxidante más importante presente en las células, ya que además de participar en reacciones enzimáticas siendo el cofactor de la GPx; tiene la capacidad de interactuar directamente con ciertas EROS, como el radical hidroxilo, eliminándolas (Wu y Cederbaum, 2003).

Los antioxidantes exógenos no son sintetizados por las células, sino que los adquirimos a través de la dieta. Encontramos vitaminas, compuestos fenólicos y metales antioxidantes (como selenio, magnesio o zinc), entre otros. El mecanismo de acción de algunos, como las vitaminas C, E y los β -carotenos, consiste en ser “atrapadores” de EROS, es decir, interaccionan con ellas neutralizándolas o disminuyendo su reactividad (Hernández et al., 2014).

El consumo agudo de alcohol de tipo BD tiene repercusiones en el balance oxidativo de las células, ya que como se mencionó anteriormente, su metabolismo provoca EO y daño tisular,

mediados por radicales libres, causando alteraciones morfológicas y funcionales principalmente en el hígado, ya que es donde se desarrolla el 80-90% de su metabolismo. Aun así, este patrón de consumo, al alcanzar concentraciones agudas y elevadas de alcohol en sangre, hace que otros tejidos extrahepáticos que normalmente no metabolizan alcohol, lo hagan. Se ha visto así que también tiene como consecuencia alteraciones renales y cardiovasculares, debidas al aumento del EO (Sandoval et al., 2019).

Múltiples factores están involucrados en ocasionar el EO inducido por el alcohol en el hígado, entre ellos destacan (Wu y Cederbaum, 2003):

- Activación del SMOE, la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte de electrones, todos ellos generadores de EROS.
- Producción de acetaldehído durante su metabolismo, que provoca formación de aductos en proteínas con consumición del antioxidante GSH.
- Hipoxia celular, porque las alteraciones en el equilibrio redox afectan al consumo de oxígeno y la producción de adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria.
- Activación de los macrófagos hepáticos, conocidos como células de Kupffer, que además de producir EROS, también liberan citoquinas como TNF- α , que pueden contribuir al daño tisular.
- Efectos sobre los mecanismos antioxidantes. El alcohol altera la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas.

Como ya se ha mencionado, el BD provoca la llegada masiva de alcohol a sangre y sobreestimula al SMOE, generando gran cantidad de EROS. Además, se ha demostrado en ratas adolescentes expuestas a BD que los niveles de GSH disminuyen (Ojeda et al., 2016), así como la actividad de la enzima antioxidante GPx. Sin embargo, las actividades de CAT y SOD se encuentran aumentadas aunque existe oxidación hepática (Nogales et al., 2014). La disminución del GSH mitocondrial hace que este orgánulo sea más susceptible al daño oxidativo (Sandoval et al., 2019).

Las EROS interaccionan con las macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN), como ya se ha recalado. El proceso que resulta del ataque a los lípidos de membrana se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación, y tiene como producto final al malondialdehído (MDA). La toxicidad del MDA se debe a su alta reactividad con las proteínas y el ADN, con el que forma productos modificados de las bases nitrogenadas como la pirimidopurinona, que es sumamente mutagénica y carcinogénica (Hernández et al., 2014). En el hígado de ratas adolescentes expuestas a BD, los niveles de MDA se hallan incrementados (Nogales et al., 2014). Además, en ratas adolescentes expuestas a BD, también se ha encontrado oxidación de lípidos y proteínas en sangre y del ADN linfocitario (Ojeda et al., 2016).

1.1.4 Alteraciones renales y Binge Drinking

Los **riñones** son órganos que desempeñan funciones de vital importancia para el organismo: excreción de sustancias, filtran la sangre, regulan el pH, la volemia y la osmolaridad. Producen hormonas que influyen en una serie de procesos fisiológicos, tales como la regulación de la presión arterial, la producción de glóbulos rojos y el metabolismo del calcio. También responden a la acción de las hormonas reguladoras producidas por el cerebro, las glándulas paratiroides del cuello y las glándulas suprarrenales ubicadas sobre los mismos riñones.

Debido al importante papel de estos órganos sobre el cuerpo, el deterioro de su función puede dar lugar a variedad de trastornos, desde modificaciones leves en el equilibrio hídrico-salino, hasta insuficiencia renal aguda y muerte. El alcohol es uno de los numerosos factores que pueden comprometer la función renal, ya sea de forma directa mediante su consumo agudo o crónico, o indirectamente, como consecuencia de la enfermedad hepática asociada al alcoholismo (Epstein, 2016).

Nos centraremos en los mecanismos directos provocados por el consumo agudo de alcohol que alteran la función renal, entre los cuales destacan (Figura 4): EO, deformación de las ultraestructuras renales, desequilibrios electrolíticos, estimulación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), y estimulación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS).

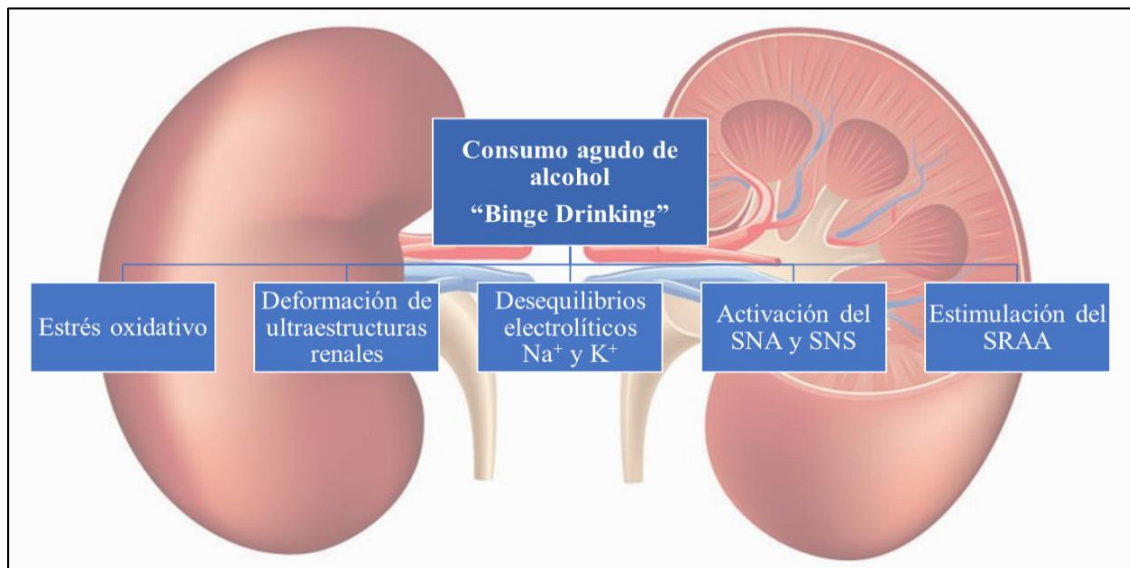


Figura 4. Mecanismos directos provocados por el consumo agudo de alcohol que alteran la función renal. (Modificado de Sobrino, 2018).

El **EO** se ha implicado en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades renales. Como se explicó en el apartado del metabolismo del alcohol, en situaciones de consumo elevado de alcohol como el **BD**, aumenta la concentración de alcohol en sangre, y éste llega a los riñones, donde se metaboliza con la generación local de **EROS**. Estos órganos son especialmente

vulnerables al daño causado por los radicales libres, probablemente debido a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que componen los lípidos renales. Las EROS están involucradas en el mecanismo patogénico de afecciones como la glomeruloesclerosis y la fibrosis tubulointersticial (Das y Vasudevan, 2008).

Otra forma en la que el alcohol afecta directamente a los riñones, es alterando su forma y estructura, como demuestran estudios realizados en animales. Se observó en animales alimentados con etanol, una disminución significativa de la función renal, edema intersticial e **hipertrofia renal**, caracterizada por una elevación en los niveles de agua, grasas y proteínas totales (Epstein, 2016). La administración de etanol durante una semana provocó hinchazón en los glomérulos y túbulos, proliferación de las células mesangiales y caída del hialino en las células epiteliales tubulares (Mukherjee et al., 2007).

Respecto al **desequilibrio electrolítico**, la capacidad del alcohol para alterar el volumen de orina, es decir, la diuresis, modifica el estado de hidratación del cuerpo y produce alteraciones en las concentraciones de electrolitos (Epstein, 2016). El consumo de alcohol está estrechamente relacionado con cambios en la composición de las membranas y la peroxidación lipídica de las células epiteliales de los túbulos renales de las nefronas. Además, interfiere con los transportadores tubulares allí localizados, concretamente, el consumo agudo de alcohol disminuye la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Das y Vasudevan, 2008). Ésta se trata de una enzima reguladora encargada de la salida de Na^+ desde el interior de la célula; por lo tanto, si disminuye la actividad de la bomba, aumenta la retención de Na^+ , lo cual está relacionado con el desarrollo de hipertensión arterial (HTA).

La función cardíaca y la renal están estrechamente relacionadas. El SRAA está formado por distintas hormonas y enzimas, secretadas por el riñón y la corteza adrenal, que actúan en la regulación del balance de Na^+ y K^+ , el mantenimiento del volumen del líquido extracelular y la regulación de la presión arterial a corto y largo plazo.

Los riñones secretan la enzima renina en respuesta a los estímulos que impliquen una reducción de la presión arterial, una vez liberada, se incorpora al torrente sanguíneo y actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, generando Angiotensina I. Esta última apenas es activa, por lo que es convertida en Angiotensina II (Ang II) mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La Ang II es una sustancia muy activa, que ejerce importantes acciones para incrementar la presión arterial. Entre ellas, en la corteza suprarrenal, la Ang II se une a sus receptores AT1 y estimula la secreción de Aldosterona (Aldo), hormona que regula la eliminación de Na^+ , K^+ y agua. De forma que, su secreción, aumenta la eliminación de K^+ y disminuye la de Na^+ y agua al incrementar su reabsorción tubular, es decir, promueve una mayor retención de sal y agua a nivel renal. Así, la concentración plasmática de K^+ disminuye, mientras que la de Na^+ no se modifica

sustancialmente, ya que se reabsorbe una cantidad proporcional de agua. En consecuencia, aumenta el volumen del líquido extracelular y la volemia, lo que induce un aumento del gasto cardiaco y de la resistencia vascular periférica y, finalmente, de los valores de la presión arterial (Sobrino, 2018).

El EO que se genera tras el consumo agudo de alcohol **activa el SNA y el SNS**, lo que a su vez **estimula el SRAA**, conduciendo a una vasoconstricción general y un aumento de la retención renal de Na^+ , debido a la subida de los niveles de Aldo en suero. Este efecto del etanol provoca un **aumento de la presión arterial**. La elevación de la presión sanguínea junto con los altos niveles de Na^+ en el túbulo renal, estimulan las células de la mácula densa, llevando a una vasoconstricción de la arteriola aferente, provocando que llegue menos cantidad de sangre al riñón y, en consecuencia, **disminuye la tasa de filtración glomerular** (TFG) (Ojeda et al., 2012).

En concreto, en un modelo de ratas adolescentes sometidas a BD se observó que el mecanismo por el cual este patrón de consumo afecta a la función renal está relacionado principalmente con la oxidación y la inflamación. Por un lado, incrementó la peroxidación lipídica, y por otro se redujo la expresión del factor de transcripción NF- κ B y aumentó la expresión de la caspasa-3. El BD también disminuyó el aclaramiento de creatinina (medida para valorar la TFG) y el aclaramiento relativo de Aldo; elevando por tanto, los niveles séricos de Aldo, la excreción fraccional de Na^+ (EFNa) y la excreción transtubular de K^+ (TTKG). Estos efectos condujeron a hipernatremia, flujo urinario bajo y presión sistólica alta (Sobrino et al., 2019).

En resumen, el BD desencadena desequilibrios iónicos y osmóticos renales, que contribuyen a aumentar la presión arterial sistólica.

1.2 Ácido fólico

1.2.1 Generalidades

El folato o vitamina B9 es un nutriente esencial ya que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para sintetizarlo de novo y, por lo tanto, dependen por completo de la ingestión de folatos preformados y / o suplementos de ácido fólico para satisfacer sus necesidades fisiológicas. Las fuentes dietéticas de folatos naturales incluyen vegetales de hoja verde, hongos, legumbres e hígado (Stanhewicz y Kenney, 2017). La estructura molecular de esta vitamina se basa en tres compuestos fundamentales: un anillo de pteridina, el ácido para-amino benzoico (PABA) y una terminación conformada por uno o varios residuos de glutamato. Se encuentra en forma reducida como tetrahidrofolato (THF) en el organismo humano y en los alimentos (Abilés, 2007). El término **ácido fólico** (AF) alude a la forma sintética de la vitamina, empleada para fortificación de alimentos y elaboración de suplementos. Es la forma más oxidada de la vitamina, carece de la presencia de átomos de hidrógeno y posee únicamente un glutamato terminal; estas características

confieren al AF mayor estabilidad químico-estructural por lo que posee una biodisponibilidad dos veces mayor, en comparación con el folato de la dieta (Herrera et al., 2016).

Los folatos son absorbidos principalmente en el intestino delgado a través del transportador de folato acoplado a protones (PCFT). A continuación, el transporte sanguíneo hasta los tejidos hepáticos y extrahepáticos se lleva a cabo mediante proteínas de unión al folato (FBP) y, en menor medida, por la albúmina y otras proteínas solubles. Los niveles normales de folatos en sangre se mantienen no solo mediante la ingesta dietética adecuada y la absorción intestinal, sino también por una reabsorción renal eficiente mediada principalmente por el receptor $FR\alpha$. Como los folatos son vitaminas solubles en agua de pequeño tamaño, se filtran libremente por el glomérulo. Bajo niveles normales de folato, se observa poca excreción renal y alta reabsorción sobre la membrana del borde en cepillo de las células del túbulo proximal (Samodelov et al., 2019).

La importancia de esta vitamina en el organismo se basa en que actúa como **cofactor** en diversos procesos fisiológicos gracias a su **capacidad de transferir restos monocarbonados**, pudiendo intervenir en dos grupos de reacciones: las de biosíntesis de nucleótidos (ADN y ARN), y las de metilación; las cuales emplean como cofactor la S- adenosilmetionina (SAM), y requieren, por tanto, un suministro constante de metionina (MET) (Abilés, 2007). El AF es esencial para este aporte, ya que como se muestra en la Figura 5, juega un papel importante en el metabolismo hepático de la metionina; el cual, a su vez, regula los niveles de homocisteína (Hcy), las defensas antioxidantes, el ensamblaje del ADN, la exportación de lípidos y todas las reacciones epigenéticas de metilación que contribuyen a la regulación de la expresión génica (Medici y Halsted, 2013).

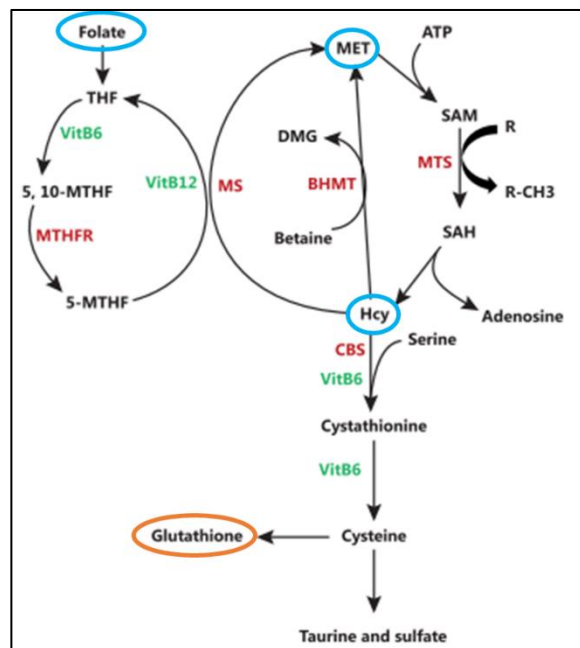


Figura 5. Metabolismo hepático de la metionina o ciclo de la metionina (Long y Nie, 2016).

Por lo tanto, la deficiencia de folato puede causar una división celular anormal debido a interferencias en la síntesis de ADN; asociándose con trastornos profundos que afectan, en particular, a tejidos altamente proliferantes, como la médula ósea y la mucosa gastrointestinal, así como el SNC en el desarrollo de los bebés (Samodelov et al., 2019). Por ello, la suplementación con AF ha sido recomendada para mujeres embarazadas desde 1991 (Adi et al., 2019).

1.2.2 Balance oxidativo y ácido fólico

Varios estudios muestran que las personas con bajos niveles de AF tienden a tener marcadores elevados de EO (Tucker, 2019). La actividad antioxidante del AF es debida a su capacidad para oxidarse cediendo protones, actuando por tanto como agente reductor, neutralizando los radicales libres presentes (Abilés, 2007). Además, el AF disminuye la actividad de la enzima NADPH oxidasa, la cual libera anión superóxido y aumenta la producción de EROS en el hígado y los riñones. Por otro lado, esta vitamina también interactúa con la enzima endotelial óxido nítrico sintasa (NOS), disminuyendo así la formación de peroxinitritos prooxidantes (Ojeda et al., 2016). Concretamente, el AF aumenta la biodisponibilidad del cofactor de NOS, la tetrahidrobiopterina (BH4) (Stanhewicz y Kenney, 2017).

Por último, cabe destacar que el AF alivia el agotamiento del antioxidante endógeno GSH gracias a su participación en el metabolismo hepático de la metionina (Figura 5), aumentando así sus propiedades antioxidantes. En este ciclo, la Hcy se transforma en GSH mediante la vía de transulfuración (Medici y Halsted, 2013).

1.2.3 Alteraciones renales y ácido fólico

El aminoácido Hcy es un intermediario del metabolismo de la metionina (Figura 5). La hiperhomocisteinemia (HHcy), elevación de los niveles plasmáticos de Hcy, puede ser el resultado de una deficiencia en las enzimas o cofactores vitamínicos, como el AF, necesarios para el metabolismo de la Hcy (Long y Nie, 2016). La Hcy se elimina mínimamente por los riñones, ya que en condiciones fisiológicas, solo la Hcy no unida a proteínas se somete a filtración glomerular y luego, en su mayor parte, se reabsorbe en los túbulos y se oxida a dióxido de carbono y sulfato en las células renales. Además, en los riñones, la Hcy está sobre todo transulfurada y la deficiencia de esta transulfuración renal contribuye a la elevación de la Hcy plasmática (Capelli et al., 2019).

La Hcy provoca EO, daña el endotelio y aumenta la trombogenicidad (Liakishev, 2006), por lo tanto, numerosos estudios sugieren que la HHcy puede ser un factor de riesgo modificable de la enfermedad cardiovascular (ECV), así como de la enfermedad renal crónica (ERC) (Figura 6) (Long y Nie, 2016). Se ha demostrado que los pacientes con ERC tienen niveles sanguíneos de Hcy más altos en comparación con la población general.

Se han descrito algunos efectos de la HHcy en el tejido renal. La Hcy puede actuar directamente sobre las células glomerulares induciendo esclerosis, y puede iniciar una lesión renal al reducir el nivel plasmático y tisular de adenosina. La disminución de la adenosina en plasma conduce a una mayor proliferación de las células del músculo liso vascular (VSMC, por sus siglas en inglés), acelerando el proceso esclerótico en arterias y glomérulos. En un modelo de rata con HHcy inducida por una dieta libre de folato, se produjo esclerosis glomerular, expansión mesangial,

disfunción de los podocitos y fibrosis, debido al aumento del EO local (Capelli et al., 2019). De nuevo, el EO es uno de los mecanismos causantes del daño renal; además, la Hcy puede ejercer su acción directa sobre los riñones mediante inflamación, estrés del retículo endoplasmático e hipometilación (Long y Nie, 2016).

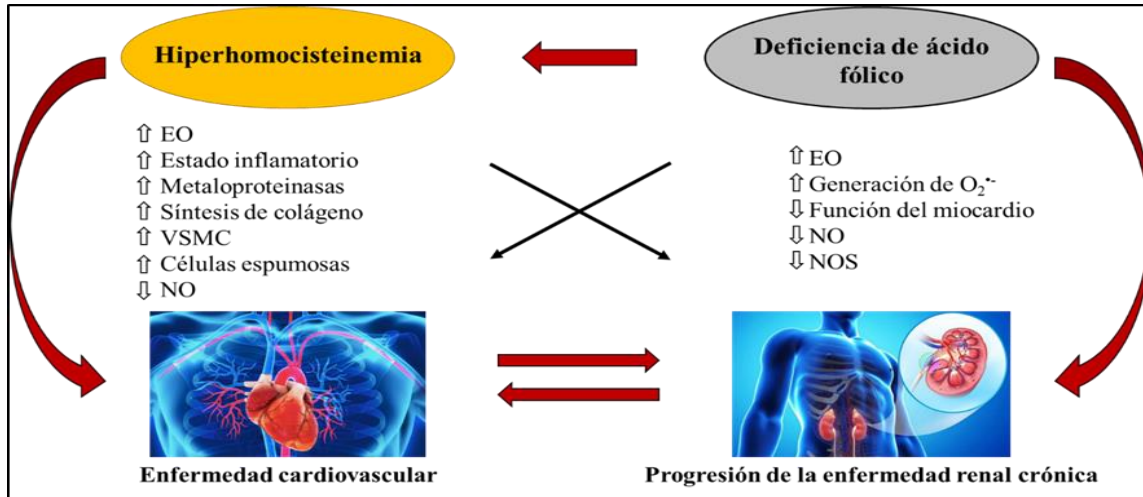


Figura 6. Relación entre la deficiencia de AF, la HHcy, la ECV y el daño renal. (Modificado de Capelli et al., 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que independientemente de los niveles de Hcy, la privación de folato mitocondrial puede contribuir al EO predominante en la ERC, al promover la disfunción de la citocromo C oxidasa, la despolarización de la membrana y la superproducción de radical superóxido (Bukhari et al., 2011). Y que el AF, gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas, mejora la función endotelial, limitando la generación de EO y aumentando la vida media del óxido nítrico (NO) (Capelli et al., 2019), mecanismos que se explicaron en el apartado anterior de “balance oxidativo y ácido fólico”.

En resumen, el AF es una vitamina con funciones de vital importancia en el organismo, y ayuda a mejorar la función renal, disminuyendo el EO y los niveles de Hcy.

1.3 Binge Drinking y ácido fólico

La deficiencia de AF es un hecho que a menudo se asocia con el alcoholismo crónico (Wani et al., 2011). Esto es debido a la disminución de la ingesta de folato en la dieta y la mala absorción intestinal, la reducción de su captación y almacenamiento en el hígado, y el aumento de la excreción de folato en la orina (Medici y Halsted, 2013). Como se ha visto anteriormente, el etanol puede provocar cambios estructurales en las membranas, afectando también a las proteínas transportadoras que en ellas se encuentran (Das y Vasudevan, 2008). Se ha demostrado que la regulación de la transcripción de los transportadores de folato, es el principal mecanismo molecular de la absorción deficiente de folato asociada al alcohol en el intestino, el colon y los riñones (Wani et al., 2011). Por otro lado, el consumo de alcohol afecta, en diferentes niveles, a las vías metabólicas de la metionina descritas en el apartado anterior (Medici y Halsted, 2013).

Por ello, el AF se ha utilizado como un suplemento terapéutico eficiente en pacientes alcohólicos crónicos. Esta estrategia terapéutica da como resultado una disminución en el perfil oxidativo de los pacientes; y en cuanto a los efectos sobre la función renal, a pesar de que el AF tiene propiedades antioxidantes, no restablece la TFG. Es posible que la actividad antioxidante alcanzada no sea suficiente para evitar la disfunción renal o que existan otros mecanismos, además del EO, que causen esta situación (Ojeda et al., 2012).

A pesar de que la deficiencia de AF es la carencia dietética más común entre los pacientes alcohólicos crónicos, hasta la fecha hay pocas evidencias de cómo afecta el BD a los niveles de esta vitamina, y mucho menos a nivel renal. Ojeda et al., (2016) realizaron un estudio en ratas adolescentes expuestas a BD sobre los efectos del AF frente al daño oxidativo. Confirmaron, por primera vez, que los niveles séricos de AF no se encontraban alterados después de la exposición aguda al alcohol por vía intraperitoneal (Ojeda et al., 2016), pero este hecho no implica que la homeostasis de los folatos sea correcta; pues se sabe que el BD reduce los niveles de SAM y GSH en diferentes tejidos, indicando que probablemente existe un déficit de AF tisular (Kim et al., 2008). Situaciones similares se dan con otros antioxidantes exógenos (como el selenio) en casos de BD, donde el antioxidante se acumula en plasma a expensas de estar deplecionado en tejidos (Ojeda et al., 2015).

Ojeda et al., (2016) también demostraron in vivo, que la suplementación con AF es una terapia económica y eficiente contra el daño oxidativo en los lípidos y la inestabilidad del ADN provocada por el consumo excesivo de alcohol durante la adolescencia. Además, esta suplementación aumenta los niveles de GSH en el hígado, el cual es de especial interés debido a su acción antioxidante y a su implicación en la estabilidad del ADN (Ojeda et al., 2016).

Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que relacionen la suplementación de AF con el BD y el daño renal, a pesar de que como se ha visto previamente, este patrón de consumo puede alterar la función renal mediante diferentes mecanismos.

2 OBJETIVOS

Se ha comprobado que los folatos están implicados en la regulación de la función renal por modular los niveles de Hcy y por su acción antioxidante; y que el consumo de alcohol en forma de BD probablemente altera su homeostasis, además de provocar alteraciones en los riñones al inducir EO. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es valorar si la suplementación con AF es una terapia eficiente para contrarrestar el daño oxidativo provocado por esta droga en dichos órganos. Para ello se estudiará el balance oxidativo y la funcionalidad renal (TFG y niveles séricos de Na^+ y Aldo) en ratas adolescentes expuestas a BD y suplementadas con AF.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

3.1.1 Animales y condiciones experimentales

Para la realización de este experimento se utilizaron 24 ratas macho adolescentes de la raza Wistar procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Los animales se recibieron con 21 días de edad y se alojaron en jaulas de plástico, con libre acceso a la comida y la bebida, que se ubicaron 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). El periodo de adolescencia comienza a los 28 días de edad, en este tiempo, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales con las siguientes condiciones:

- **Grupo control (C):** ratas alimentadas con pienso comercial y agua *ad libitum*, y tres días a la semana, recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **Grupo binge drinking (BD):** ratas alimentadas con pienso comercial y agua *ad libitum*, y tres días a la semana, recibieron una inyección intraperitoneal de etanol (3g/kg).
- **Grupo control fólico (CF):** ratas alimentadas con pienso comercial suplementado con AF (8ppm) y agua *ad libitum*, y tres días a la semana, recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **Grupo binge drinking fólico (BDF):** ratas alimentadas con pienso comercial suplementado con AF (8ppm) y agua *ad libitum*, y tres días a la semana, recibieron una inyección intraperitoneal de etanol (3g/kg).

Los tratamientos se realizaron de acuerdo a los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales aprobados previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla. Los animales permanecieron bajo estas condiciones hasta el momento de su sacrificio (3 semanas).

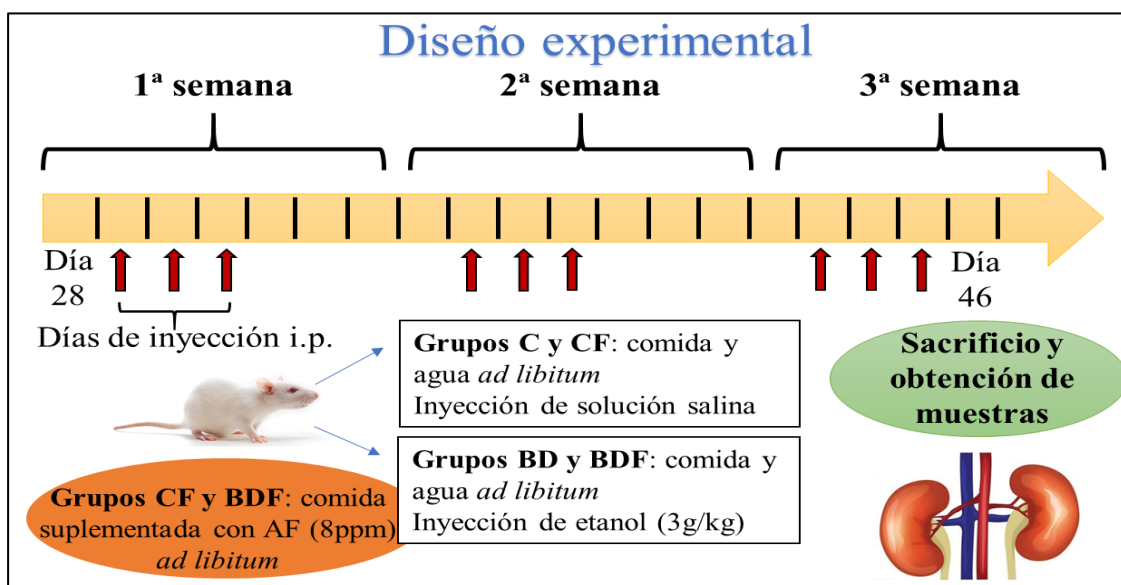


Figura 7. Esquema del diseño experimental (Gallego López, 2020).

3.1.2 Dieta utilizada

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética (Harlan Laboratorios) que cubría todas sus necesidades nutricionales y energéticas, con un contenido de AF de 2ppm. Además, los grupos CF y BDF, recibieron un suplemento de AF (8ppm) (ACOFARMA, Barcelona, Spain) en la comida, la cual se preparó moliendo el pienso básico para hacer galletas suplementadas (6mg/kg: 8ppm).

3.1.3 Método de alcoholización

Se usó el modelo de alcoholización “*Binge Drinking*” basado en la administración por vía i.p., tres días consecutivos por semana y durante tres semanas, de etanol (3g/kg de peso) en solución salina al 20% (v/v) (Callaci et al., 2010). A los grupos controles se les administró i.p. un volumen equivalente de solución salina durante el mismo período de tiempo.

3.1.4 Estudio nutricional y de la ingesta de ácido fólico

Durante el experimento se determinó diariamente la ingesta líquida (ml/día) y la ingesta sólida (g/día) de los animales. La primera se midió por diferencia de volumen de líquido en los biberones, y la segunda por diferencia entre el pienso colocado y el sobrante al día siguiente, utilizando para ello una balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1g de precisión).

La ingesta de AF ($\mu\text{g}/\text{día}$) se calculó a partir de los datos de la ingesta sólida, teniendo en cuenta que el pienso para los animales suplementados se preparó con una concentración de 8ppm de AF y la dieta base contiene 2ppm.

3.1.5 Estudio macroscópico

Para controlar su evolución durante el período experimental, las ratas se pesaron diariamente utilizando una balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1g de precisión), y siempre a la misma hora, entre las 9:00 – 10:00 a.m, para evitar diferencias debidas al ritmo circadiano. Finalmente, los animales se pesaron antes de ser sacrificados y se anestesiaron con uretano i.p. (SIGMA) al 28 % p/v a razón de 0,5 ml/100g de peso corporal.

3.2 Toma y procesamiento de las muestras de ratas

3.2.1 Obtención y tratamiento de las muestras de orina

La recolección de la orina se efectuó colocando a los animales individualmente en jaulas de metabolismo, en ayunas y teniendo libre acceso a la bebida durante un período de 12 horas previo al sacrificio. Tras medir el volumen total de orina, se dividió en alícuotas, que se conservaron a -80°C para su posterior tratamiento.

3.2.2 Obtención y tratamiento de las muestras de suero

Tras anestesiar a los animales y realizar el estudio macroscópico, se procedió a extraer la sangre mediante punción intracardiaca a través del tórax. Ésta se depositó en tubos de ensayo y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 min y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C para posteriores determinaciones.

3.2.3 Obtención y tratamiento de los riñones

Una vez extraída la sangre, se realizó una laparotomía media y se procedió a la extracción de los riñones, que se sumergieron en N_2 líquido y se conservaron a -80°C para su posterior análisis.

3.3 Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas en los riñones

3.3.1 Homogeneización del tejido

Según el ensayo que se vaya a realizar, el tejido se homogeneiza en un tampón u otro. Para la determinación de la concentración total de proteínas y la actividad de las enzimas antioxidantes, parte de los riñones congelados se pesaron, se trocearon y se homogeneizaron en proporción 1:4 p/v, en tampón de sacarosa, durante 60 s, utilizando un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón (Pobel 245432, España). A continuación, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 3000 r.p.m. y 4°C durante 20 min. El sobrenadante se separó en alícuotas, que se colocaron en eppendorf con la ayuda de una micropipeta, y se congelaron a -80°C hasta el momento de los análisis.

La composición del tampón de sacarosa es la siguiente: sacarosa (ROIG FARMA), 250mM; TRIS (SIGMA-ALDRICH), 15mM; DTT (SIGMA), 1mM; EDTA (SIGMA), 1mM. El pH se ajustó hasta 7,4 con HCl diluido (PANREAC).

Por otro lado, para la determinación de la concentración total de proteínas y la oxidación de biomoléculas (lípidos y proteínas), el tejido se homogeneizó en tampón fosfato potásico 10mM (pH 7), siguiendo el mismo procedimiento anterior.

3.3.2 Concentración total de proteínas

Para expresar la actividad de las enzimas antioxidantes como actividades específicas (U/mg de proteína), así como para poder cuantificar la oxidación de biomoléculas (nmoles GC/mg de proteína en el caso del análisis de grupos carbonilos; nmoles MDA/mg de proteínas para la peroxidación lipídica), se determinaron las proteínas totales en los dos tipos de homogeneizados de riñón.

Fundamento: la determinación de proteínas se llevó a cabo según el método descrito por (Lowry et al., 1951). En este método se hacen reaccionar las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que origina un complejo coloreado. El color se forma debido a la reacción del Cu^{2+} con las proteínas en medio alcalino, y por la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano

presentes en las proteínas. La intensidad del color depende de la cantidad de estos aminoácidos aromáticos.

Los reactivos empleados en este método son: Reactivo A: Na₂CO₃ 2% (p/v) en NaOH 0,1M, Reactivo B: CuSO₄·5H₂O 1% (p/v), Reactivo C: Tartrato de sodio potasio 2,7% p/v, Reactivo D: 1.5mL de reactivo B y 1.5mL de reactivo C en 150mL de reactivo A, Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteau diluido en agua bidestilada (1:1 v/v). Los reactivos D y E deben prepararse en el momento del uso.

Procedimiento: la técnica consiste en elaborar una curva patrón de albúmina a partir de la cual, conociendo las concentraciones y las absorbancias de los estándares, podemos calcular las concentraciones de proteínas de las muestras por medio de la medición de sus absorbancias.

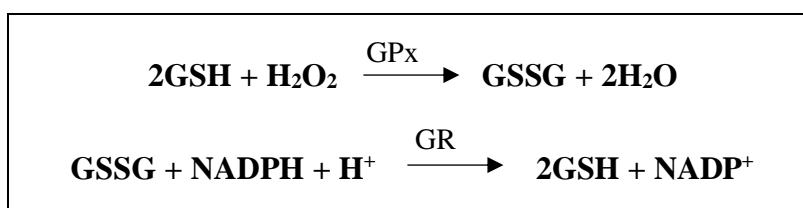
La curva patrón se prepara a partir de una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 1mg/ml, de la que salen cuatro soluciones estándares con las siguientes concentraciones: P1: 0,1mg/mL, P2: 0,05mg/mL, P3: 0,025mg/mL y P4: 0,0125mg/mL.

Posteriormente, se mezclan en tubos de ensayo 5ml de Reactivo D y 1ml de muestra diluida (homogeneizado de riñón diluido con agua bidestilada 1/500), 1ml de estándares en el caso de los patrones o 1ml de agua bidestilada en el caso del blanco; se agitan y se dejan reposar 15-20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 0,5ml de Reactivo E a todos los tubos, se agitan y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a una longitud de onda de 750nm.

Cálculos: la concentración total de proteínas en las muestras se calcula extrapolando sus absorbancias en la recta de la curva patrón de concentraciones conocidas. Tanto las muestras como la curva se analizan por duplicado.

3.3.3 Actividad de la glutatión peroxidasa

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



Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH 7,4 a 4°C), 250mM ; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10mM; Solución azida (NaN₃) (SIGMA), 10mM; Solución NADPH (en NaHCO₃ al 0,75% p/v) (SIGMA), 2mM; Solución GR (en tampón TPK) (SIGMA), 10U; Solución peróxido de hidrógeno (FORET), 2,5mM; y Solución glutatión reducido (SIGMA), 10mM.

Procedimiento: en una microcubeta de 1,5ml de capacidad, se añaden 300μL de TPK, 100μL de EDTA, 100μL de NaN₃, 100μL de NADPH, 100μL de GSH, 100μL de GR y 100μL de muestra diluida (homogeneizado de riñón diluido con agua bidestilada 1/20). Se deja incubar las muestras durante 5 min a temperatura ambiente, y a continuación, se inicia la reacción con la adición de 100μL de H₂O₂ y se determina la actividad de GPx siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 340nm durante 3 min. Las muestras problema se midieron frente al blanco, que se preparó de la misma manera, pero contenía 200μL de agua bidestilada en lugar de muestra, y no se le añadía peróxido de hidrógeno para evitar el comienzo de la reacción.

Cálculos: la actividad de la enzima GPx se obtiene por el siguiente cálculo:

$$\text{mU/mg proteína} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f \cdot 10^3 / \epsilon \cdot d \cdot V_m \cdot C] \cdot D$$

Donde: **mU/mg proteína:** nmol de GPx por mg de proteína de la muestra; **ΔA(min):** incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto; **Vf :** volumen final en ml en la microcubeta; **ε:** coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es 6,22 mM⁻¹cm⁻¹; **d:** paso de luz de la cubeta, 1 cm; **Vm:** volumen de muestra (homogeneizado diluido) en mL en la cubeta; **C:** concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL); **D:** factor de dilución de la muestra.

3.3.4 Actividad de la glutatión reductasa

Fundamento: la GR, enzima dependiente de NADPH, cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Su actividad se determinó según el método espectrofotométrico descrito por (Worthington y Rosemeyer, 1974) ligeramente modificado, donde se mide la disminución de absorbancia a 340nm debida a la oxidación del NADPH.

Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH 7,4 a 4°C), 0,066M; Solución cloruro potásico (ACOFARMA), 2M; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10mM; Solución glutatión oxidado GSSG (SIGMA), 10mM; y Solución NADPH (en NaHCO₃ al 0,1% p/v) (SIGMA), 1mM.

Procedimiento: se añaden en la microcubeta 590μL de tampón fosfato, 100μL de KCl, 100μL de EDTA, 100μL de GSSG y 100μL de NADPH. Tras 2 min de incubación a temperatura ambiente, se inició la reacción adicionando 10μL de homogeneizado puro, y se aguardó la disminución de absorbancia a 340nm durante 3 min. Las muestras se midieron frente al blanco, que se preparó de la misma manera pero contenía TPK en lugar de homogeneizado.

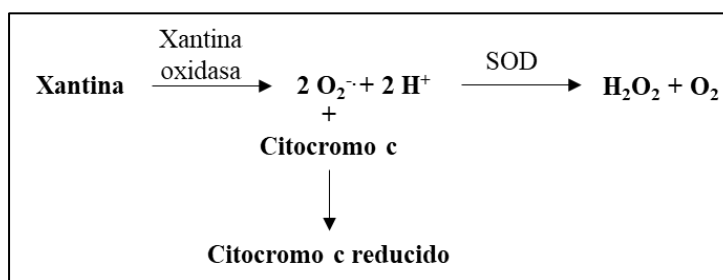
Cálculos: la actividad de la enzima GR se calcula según la fórmula:

$$\text{mU/mg} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f \cdot 10^3 / \epsilon \cdot d \cdot V_m \cdot C]$$

Donde: **mU/mg proteína:** nmol de GR por mg de proteína de la muestra; **$\Delta A(\text{min})$:** incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto; **V_f :** volumen final en ml en la microcubeta; **ϵ :** coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; **d :** paso de luz de la cubeta, 1 cm; **V_m :** volumen de muestra (homogeneizado puro) en mL en la cubeta; **C :** concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL).

3.3.5 Actividad de la superóxido dismutasa

Fundamento: la enzima SOD se encarga de la dismutación de radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 . Su actividad se ensayó siguiendo el método descrito por (Fridovich, 1985) ligeramente modificado, en el que se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa para generar radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). El radical superóxido es capaz de reducir el citocromo c y esta reducción es inhibida por la enzima SOD, que compete por los radicales superóxidos y los “secuestra” llevando a cabo su dismutación. Por lo tanto, el grado de inhibición de esta reacción es indicador de la actividad de SOD.



Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,8 a 4°C) c/DTPA, 0,066M; Solución xantina (SIGMA), 0,5mM; Solución citocromo c (SIGMA), $100\mu\text{M}$; Solución cianuro sódico (NaCN) (PANREAC), 0,5mM; Solución catalasa (SIGMA), 10U; y Solución xantina oxidasa (SIGMA), 25U. La catalasa se añade para que la reacción siempre esté desplazada hacia la derecha, ya que esta enzima forma agua a partir del peróxido de hidrógeno.

Procedimiento: en una microcubeta se depositaron $490\mu\text{L}$ de TPK, $200\mu\text{L}$ de xantina, $200\mu\text{L}$ de citocromo c, $100\mu\text{L}$ de NaCN, $100\mu\text{L}$ de catalasa y $10\mu\text{L}$ de muestra (homogeneizado puro). La reacción comenzó cuando se adicionaron $10\mu\text{L}$ de xantina oxidasa, y entonces, se observó el aumento de absorbancia a 550nm durante 3 min, debido a la reducción del citocromo c.

Para medir la reducción neta del citocromo c, es decir, en ausencia de SOD, se realizó una medida de referencia que se preparó de la misma forma pero no contenía muestra, de forma que se produjo la reducción del citocromo c debida a la acción de los radicales superóxidos formados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Se definió una unidad (U) de SOD como la cantidad de enzima que produce la inhibición de un 50% de la reducción del citocromo C. Cada muestra problema se

midió frente a su blanco, que se procesó de la misma forma pero sin que la reacción llegara a producirse, al no añadir al blanco la xantina oxidasa.

Cálculos: la actividad de la SOD se expresa en U/mg proteína y se calcula según las siguientes expresiones:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(\Delta A_{\text{muestra}}/\text{min} \cdot 100) / \Delta A_{\text{referencia}}/\text{min}]$$

$$\text{U/mg proteína} = \% \text{ inhibición} / (50 \cdot c)$$

Donde: ΔA : incremento de absorbancia y c : mg de proteína presente en la muestra.

3.3.6 Actividad de la catalasa

Fundamento: la CAT cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua. $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. La determinación de su actividad se llevó a cabo mediante el método descrito por (Beers y Sizer, 1952), en el cual se mide espectrofotométricamente a 240nm la disminución de la absorbancia debida a la desaparición del H_2O_2 .

Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH 7,4 a 4°C), 0,066M; y Solución peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (FORET), 1/100 v/v.

Procedimiento: en una cubeta de cuarzo se añadieron 2mL de TPK y 120 μ L de muestra (homogeneizado de riñón diluido en agua bidestilada 1/120). La reacción se inició al añadir 480 μ L de H_2O_2 , y entonces se midió la disminución de absorbancia debida a la reducción del peróxido de hidrógeno, a 240nm durante 3 min. La medida se realizó frente al aire.

Cálculos: la actividad de la enzima CAT se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{mU/mg proteína} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f / \epsilon \cdot d \cdot V_m \cdot C] \cdot D$$

Donde: **mU/mg proteína:** nmol de catalasa por mg de proteína de la muestra; $\Delta A(\text{min})$: incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto; **Vf:** volumen final en mL en la cubeta; ϵ : coeficiente de extinción molar de H_2O_2 (ϵ : 0.0394 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), **d:** paso de luz de la cubeta, 1 cm; **Vm:** volumen de muestra en la cubeta en ml, **C:** concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/ml); **D:** factor de dilución de la muestra.

3.3.7 Peroxidación lipídica

Fundamento: habitualmente, para evaluar la peroxidación lipídica se lleva a cabo la cuantificación de malondialdehído (MDA), producto final de la degradación oxidativa de los lípidos. Para ello, se utilizó el método descrito por (Beers y Sizer, 1952), en el cual se valora espectrofotométricamente a 535nm el aducto de color rojo formado al reaccionar el MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Se trata por tanto de un método colorimétrico. El MDA, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participa fácilmente en una reacción de adición

nucleófila con el TBA, generando un pigmento rojo fluorescente (compuesto por una molécula de MDA y dos de TBA) que puede ser determinado por espectrofotometría.

Los reactivos empleados en este método son: Solución ácido tricloroacético (TCA) (MERCK), 20% p/v; y Solución ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA) al 0,67% p/v.

Procedimiento: en tubos eppendorf se mezclaron 100µl de muestra (homogeneizados de riñón puros) y 600µl de TCA, y se centrifugó durante 10 min a 14000 r.p.m y 4°C para precipitar las proteínas. A continuación, se cogieron 600µl de sobrenadante y se introdujeron en tubos con tapón de seguridad junto con 500µl de TBA. La mezcla se incubó al baño María durante 10-15 min a 100°C. Pasado este tiempo, se pusieron los tubos en un recipiente con hielo para bajar la temperatura de los mismos, y acto seguido, se midió la absorbancia de la muestra frente al blanco a 535nm. El blanco se preparó al igual que las muestras, pero con agua bidestilada en lugar de homogeneizado.

Cálculos: la concentración de MDA presente en las muestras se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: **A:** absorbancia de la muestra; **ε:** coeficiente de extinción molar para el MDA a 535 nm (ϵ : 153.10³ ml/mol.cm); **C:** concentración de MDA en la muestra (mol/ml), **d:** paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en moles de MDA formados/mg proteína en los 10 minutos de incubación.

3.3.8 Oxidación de proteínas

Fundamento: se utilizó el método descrito por (Reznick y Packer, 1994). La oxidación de proteínas provoca un aumento de los grupos carbonilos en su estructura. La 2,4-dinitrofenilhidrazina se une a estos grupos para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, un complejo coloreado que absorbe a una longitud de onda de 366nm.

Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH 7,0 a 4°C), 10mM; Solución dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 24% p/v; Solución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (en HCL) (ACOFARMA), 10mM; Solución TCA (MERCK), 20% p/v; Solución de etanol/acetato de etilo, 1/1 v/v; y Solución guanidina en ácido fórmico (diluido en agua bidestilada 1/1 v/v), 6M.

Procedimiento: se prepararon 300µl de muestra que contenían aproximadamente una concentración de 5mg proteína/ml. Para ello, una alícuota de 60µl de homogeneizado de riñón, se mezcló con un volumen igual de SDS al 24% para solubilizar las proteínas, y se completó con TPK hasta alcanzar el volumen final deseado.

La muestra se incubó durante 3 min al baño María a 100°C y, posteriormente, se enfrió en hielo. A continuación, se le añadieron 300µL de DNPH y la mezcla se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h, agitando cada 15 min. Pasado este tiempo, se añadieron 300µL de TCA y se centrifugó 3 min a 11000 r.p.m y 4°C. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó tres veces con 1ml de la solución de etanol/acetato de etilo, centrifugando (3 min, 11000 r.p.m, 4°C) después de cada lavado y desecharlo el sobrenadante tras la centrifugación. Por último, el precipitado final se resuspendió en 600µl de guanidina 6M y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 11000 r.p.m, 4°C durante 3 min y se midió la absorbancia del sobrenadante frente al blanco (solución de guanidina) a 366nm.

Cálculos: la concentración de los grupos carbonilos presente en la muestra se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: **A**: absorbancia de la muestra; **ε**: coeficiente de extinción molar para la 2,4-dinitrofenilhidrazona (ϵ : 21000 M⁻¹cm⁻¹); **C**: concentración de grupos carbonilos en la muestra (mol/L); **d**: paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en nmoles de grupos carbonilos formados/mg proteína.

3.4 Determinaciones bioquímicas en suero y orina

3.4.1 Parámetros relacionados con la función renal

Los niveles de **creatinina** en suero y en orina, y de **Na⁺** en suero, se determinaron en el Hospital Universitario Virgen de Valme mediante pruebas de bioquímica clínica rutinarias, en el módulo Cobas 6000 (Roche Diagnostics GmbH), según las especificaciones del fabricante y utilizando reactivos patentados. El instrumento se calibró con el material estándar de referencia patentado y se verificó con el uso de controles de calidad propios.

3.4.2 Determinación de los niveles de aldosterona en sangre

Los niveles de Aldo en suero se determinaron mediante ELISA, en el laboratorio experimental del grupo PAIDI: Implicación del Balance Oxidativo en la Salud: Alcoholismo y Síndrome Metabólico; utilizando el Kit Inmunoensayo de la Enzima Aldosterona Enzo Life Sciences. Se realizó con los reactivos suministrados por el fabricante y según sus especificaciones. La Aldo se determina mediante la unión del anticuerpo presente en la pared de los pocillos a los anticuerpos primarios que se le añaden a través de las soluciones comerciales que se van adicionando durante el ensayo. Finalmente, su concentración se calcula por interpolación en la recta de calibrado, a partir de los datos de densidad óptica (DO) obtenidos.

3.5 Cálculo de la función renal: aclaramiento de creatinina

El cálculo del aclaramiento de creatinina permite una evaluación global de la cantidad de sangre que se ha filtrado en 24 h a nivel de los riñones, por lo tanto es un marcador de la función renal. Se determina usando la siguiente expresión:

$$CL = V_o \cdot C_o / (C_s \cdot 1440)$$

Donde: **CL**: aclaramiento de creatinina (ml/min); **V_o**: volumen de orina recogido en 24 horas (ml); **C_o**: concentración de creatinina en orina (mg/dl); **C_s**: concentración de creatinina en suero (mg/dl).

3.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (ESM), siendo “n” el número de muestras utilizadas. Las medias mostradas se obtienen a partir de 6 datos (n = 6). Para comparar las distintas variables objeto de nuestro estudio en los diferentes grupos experimentales, 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 significativa valores de $p < 0,05$. Para expresar las diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos experimentales en ratas se utilizó la siguiente simbología:

Grupos	p < 0.05	p < 0.01	p < 0.001
C vs BD	*	**	***
C vs CF	c	cc	ccc
BD vs BDF	a	aa	aaa
BDF vs CF	+	++	+++

Tabla 1. Simbología para expresar las diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Control nutricional y morfológico

En la Tabla 2 se observa que la ingesta sólida fue similar en los cuatro grupos experimentales, no encontrándose diferencias significativas en el incremento de peso tras el consumo de alcohol de tipo BD. Por otro lado, la ingesta de AF en los grupos C y BD fue significativamente menor que la de los grupos CF y BDF, confirmándose que el método de suplementación elegido fue eficaz. Los animales del grupo BD ingirieron similar cantidad de AF que las C.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Ojeda et al., (2016), demostrándose que el consumo excesivo de alcohol vía i.p. en ratas adolescentes, no afecta a la cantidad de alimentos ingeridos (incluido el AF), previniéndose en principio la desnutrición que se genera por el consumo crónico de etanol (Ojeda et al., 2016). Se podría pensar que esto es así ya que vía i.p.,

el alcohol no pasa a través del sistema digestivo y no puede alterar la mucosa intestinal. Se necesitarían más estudios para saber si el BD afecta a la absorción de nutrientes. Además, estos resultados son diferentes cuando el alcohol se administra mediante un modelo oral no forzado, encontrándose la ingesta sólida y el incremento de peso significativamente menores en ratas adolescentes expuestas a BD de manera oral (Nogales et al., 2014).

Parámetros	C	BD	CF	BDF
Incremento peso corporal (g/día)	5,72 ± 0,17	5,29 ± 0,14	5,80 ± 0,21	5,20 ± 0,53
Ingesta sólida (g/día)	14,29 ± 1,31	13,84 ± 1,09	14,35 ± 1,85	13,95 ± 1,04
Ingesta de fólico (µg/día)	2,86 ± 0,26	2,77 ± 0,22 aaa	11,48 ± 1,48 ccc	11,09 ± 0,87
Ingesta líquida (ml/día)	26,41 ± 1,45	23,3 ± 0,71 * aa	26,07 ± 1,70	29,89 ± 2,11
Diuresis (ml/día) Flujo urinario	37,3 ± 0,7	23,5 ± 1,2 *** aaa	37,6 ± 1,8 ++	46,8 ± 2,7
IOS Riñón (Peso Relativo Riñón %)	0,813 ± 0,035	0,778 ± 0,051	0,832 ± 0,089	0,826 ± 0,037
Proteínas renales totales (mg/ml)	27,58 ± 1,96	27,21 ± 2,66	28,41 ± 2,14	28,88 ± 1,58

Tabla 2. Parámetros nutricionales y morfológicos al final del período experimental. Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: C vs BD: * p<0,05, *** p<0,001; BD vs BDF: aa p<0,01, aaa p<0,001; C vs CF: ccc p<0,001; BDF vs CF: ++ p<0,01.

El índice órgano-somático (IOS) de los riñones se calculó para corregir las posibles fluctuaciones en el peso de dichos órganos debidas al peso de los animales. El IOS, así como la concentración de proteínas en los riñones, fue similar en los cuatro grupos. Por lo tanto, el consumo de alcohol tipo BD y la suplementación con AF utilizada en este estudio, no afectan al desarrollo macroscópico de estos órganos. Según lo informado por Dinu et al., (2006) este efecto ocurre con el tratamiento prolongado con etanol (aproximadamente 30 semanas) (Dinu et al., 2006).

Desde el punto de vista del balance hídrico, los animales del grupo BD bebieron menor cantidad de agua que las C, y presentaron además, un menor flujo urinario; siendo el efecto antidiurético más significativo. Las ratas del grupo BDF bebieron significativamente mayor cantidad de agua y mostraron mayor diuresis. Así, podría existir cierto efecto antidiurético tras el consumo de alcohol, que podría estar relacionado, no solo con una menor ingesta de agua, sino también con una menor TFG o tener origen hormonal (Epstein, 2016), lo cual comprobaremos posteriormente en el apartado de “valoración de la función renal”.

4.2 Balance oxidativo en los riñones

Como ya se mencionó, diversos estudios demuestran que la ingesta aguda y crónica de alcohol alteran el equilibrio entre los procesos oxidantes y antioxidantes, aumentando así el EO en diferentes tejidos (Aragón et al., 2002; Wu y Cederbaum, 2003; Hernández et al., 2014; Ojeda et al., 2012; Sandoval et al., 2019).

En este experimento, la actividad de las enzimas antioxidantes en los riñones muestran (Figura 8), que el consumo excesivo de alcohol tipo BD aumenta significativamente la actividad de la SOD y CAT respecto al grupo C ($p < 0,05$). Por el contrario, en la actividad de la GR no se observan cambios significativos respecto al grupo control y la actividad de la GPx disminuye muy significativamente ($p < 0,001$), lo que conlleva a peroxidación lipídica (expresada como niveles de MDA) y oxidación de las proteínas renales (expresada por los niveles de grupos carbonilos, GC).

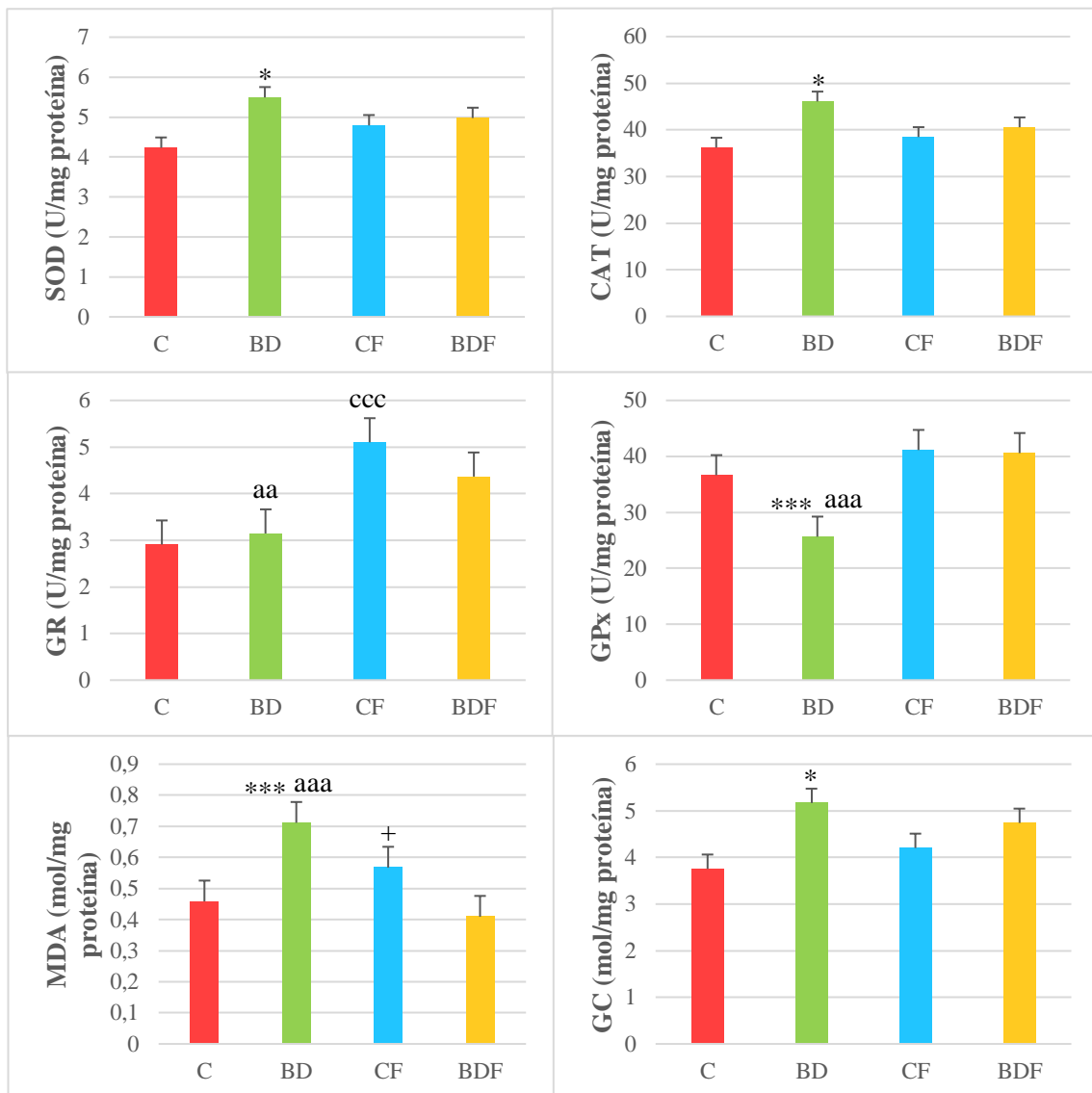


Figura 8. Actividad de las enzimas antioxidantes en los riñones (SOD, CAT, GR, GPx) y oxidación de biomoléculas (lípidos y proteínas), medidas por los niveles de MDA y GC respectivamente. Los

resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: C vs BD: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; BD vs BDF: aa $p < 0,01$, aaa $p < 0,001$; C vs CF: ccc $p < 0,001$; BDF vs CF: + $p < 0,05$.

La suplementación con AF a ratas expuestas a BD resultó ser beneficiosa, aumentando de forma significativa los niveles de GPx y GR; y disminuyendo eficazmente la oxidación lipídica, no así la proteica.

Respecto a la alteración de las enzimas antioxidantes, se han encontrado resultados similares en otros órganos (hígado y corazón) de ratas adolescentes sometidas a este mismo modelo experimental (Nogales et al., 2014) (Sobrinho, 2018). Tras la exposición repetida a BD, al aumentar la actividad de la SOD, hay un incremento de la generación de hidroperóxidos causados por su acción, y este exceso de EROS se intenta neutralizar por el aumento de la actividad de la CAT. Debido a que el alcohol se administra de forma aguda y en exceso, hay que tener en cuenta que la CAT no solo es responsable de la defensa antioxidante catalizando la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 , sino también del metabolismo oxidativo del etanol, al encontrarse éste en concentraciones más altas (Das y Vasudevan, 2008); siendo lógico que la actividad de la CAT aumente en los animales expuestos a BD.

Por otro lado, la menor actividad de GPx encontrada en estos animales podría deberse a que la enzima se encuentra saturada al aumentar la cantidad de su sustrato (H_2O_2) y a una disminución de los niveles de GSH (cofactor de la GPx), que se sabe están disminuidos tras el consumo de alcohol (Kim et al., 2008). La suplementación con AF mejora la actividad de esta enzima en parte, porque es una vitamina necesaria para la síntesis GSH a través del ciclo de la metionina (Medici y Halsted, 2013). En trabajos previos en ratas adolescentes expuestas a BD se encontraron niveles hepáticos de GSH deplecionados, que se incrementaron tras la suplementación con AF disminuyendo el EO en dicho tejido (Ojeda et al., 2016). La disminución de GPx podría explicar que los niveles de GR apenas se encuentren alterados en el grupo BD respecto al C, ya que esta enzima se encarga de reciclar el GSSG oxidado por GPx a GSH (Wu y Cederbaum, 2003), por lo tanto, si hay una menor actividad de la GPx habrá, en parte, menos GSSG oxidado que regenerar a GSH y hace falta menor actividad de la GR. La suplementación con AF incrementa la actividad de la GR lo que concuerda con el aumento en la producción de GSH que promueve esta vitamina.

Dicho esto, los resultados obtenidos sugieren que el balance oxidativo en los riñones de ratas expuestas a BD no ha sido eficaz, generándose EO con la consiguiente oxidación de biomoléculas. Se observa que el aumento de los niveles de MDA es más significativo ($p < 0,001$) que el incremento de los GC respecto al grupo control. Esto podría estar relacionado con el hecho de que, como son ricos en dobles enlaces, los ácidos grasos poliinsaturados que componen los lípidos renales, son más susceptibles al ataque de EROS. Estos dobles enlaces pueden abrirse y oxidarse fácilmente en reacciones químicas e interactuar con otras sustancias, formando parte de una

reacción en cadena cíclica debida a la administración de etanol (Wu y Cederbaum, 2003). Como se vio en la introducción, la toxicidad del MDA se debe a su alta reactividad con las proteínas y el ADN, con el que forma productos modificados de las bases nitrogenadas (Hernández et al., 2014). Así, (Ojeda et al., 2016) y (Nogales et al., 2014) además de encontrar oxidación de lípidos y proteínas en ratas adolescentes sometidas a BD, también observaron daño en el ADN linfocitario.

Como se ha mencionado anteriormente, la suplementación con AF utilizada parece ser beneficiosa pues restableció el balance oxidativo en los riñones evitando así la oxidación lipídica. Al actuar como antioxidante y/o aumentar la síntesis de GSH, la suplementación con AF previene los efectos nocivos del alcohol (Ojeda et al., 2016). Su efecto antioxidante en los riñones se debe a la capacidad del AF para neutralizar los radicales libres presentes actuando como agente reductor (Abilés, 2007), y a su interacción con las enzimas NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa (NOS), disminuyendo la formación de EROS (Ojeda et al., 2016). Además, como ya se comentó, al intervenir en el ciclo de la metionina, aumenta los niveles de GSH (Medici y Halsted, 2013), incrementando así la actividad de la GPx, haciendo posible una mayor actuación de esta enzima frente a las EROS generadas por el BD.

Estos resultados muestran que la homeostasis de los folatos es especialmente importante para luchar contra el EO generado tras la exposición al BD en los riñones de ratas adolescentes.

4.3 Valoración de la función renal

Para conocer la funcionalidad de los riñones tras el consumo agudo de alcohol tipo BD se determinaron las concentraciones de Aldo y Na⁺ en suero, y de creatinina en suero y en orina (Tabla 3); para poder calcular posteriormente el aclaramiento de creatinina (CL de creatinina) y así conocer la TFG.

		C	BD	CF	BDF
SUERO	Na ⁺ (mmol/l)	132 ± 0,5	137,8 ± 0,58 *** a	133,4 ± 0,5	135,5 ± 0,5
	Aldosterona (pg/dl)	472 ± 45	1279 ± 79 *** a	643 ± 21 +++	1042 ± 59
	Creatinina (mg/dl)	0,486 ± 0,01	0,53 ± 0,015	0,49 ± 0,04	0,53 ± 0,04
ORINA	Creatinina (mg/dl)	14,4 ± 0,55	22,52 ± 1,5 *** aaa	14,4 ± 0,7 ++	8,5 ± 0,4

Tabla 3. Parámetros relacionados con la función renal: Aldo y Na⁺ en suero, y creatinina en suero y en orina. Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: C vs BD: *** p<0,001; BD vs BDF: a p<0,05, aaa p<0,001; BDF vs CF: ++ p<0,01, +++ p<0,001.

Se observan diferencias significativas en la concentración de Na^+ en suero, que está aumentada respecto al grupo control ($p < 0,001$); la suplementación con AF disminuye este valor ($p < 0,05$). Por lo tanto, la exposición a BD en ratas adolescentes produce hipernatremia, resultados que coinciden con los de (Sobrino et al., 2019). De estos resultados podemos concluir que el BD durante la adolescencia genera un desbalance hídrico-salino importante, probablemente acompañado de un desajuste endocrino. El comportamiento de los iones Na^+ y K^+ está regulado de manera principal por la hormona Aldo, la cual depende especialmente del SRAA. El EO que se genera tras el consumo agudo de alcohol activa al SNS, lo que a su vez estimula el SRAA, conduciendo a una vasoconstricción general y un aumento de la retención renal de Na^+ , generando cierta acción antidiurética debido a la subida de los niveles de Aldo en suero (Sobrino, 2018). Esto se confirma con los resultados del presente estudio, donde los niveles séricos de Aldo se encuentran aumentados significativamente en el grupo BD respecto a los controles, y la suplementación con AF los disminuye aunque parcialmente, siendo mayores que en el grupo CF. El etanol disminuye la actividad de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ debido a la peroxidación lipídica y a los altos niveles de Aldo, incrementando así la reabsorción de Na^+ (Das y Vasudevan, 2008). Esto explicaría la mejora provocada por la suplementación de AF, que debido a su acción antioxidante, disminuye la peroxidación lipídica, los niveles de Aldo y la concentración de Na^+ en sangre.

Respecto a la creatinina, los niveles en suero no se encuentran alterados, y en orina se observa un incremento significativo en el grupo BD respecto al C, disminuyéndose significativamente dichos valores gracias al suplemento de AF. No obstante, la concentración de sustancias en orina no es un buen parámetro para determinar lo sucedido, pues depende en gran medida de la diuresis de cada grupo experimental. Por ello, se ha calculado el CL de creatinina (Figura 9) para así poder valorar la filtración renal.

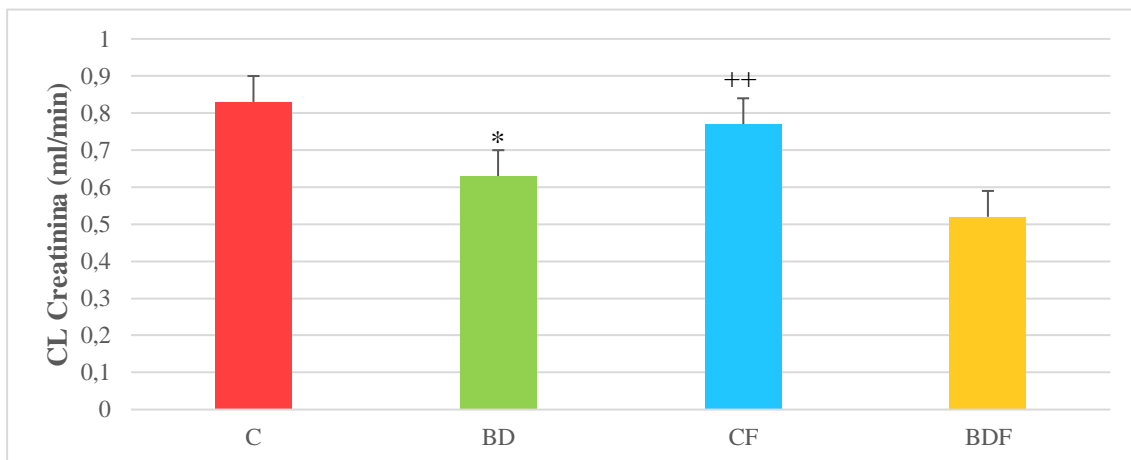


Figura 9. Valores del aclaramiento de creatinina (ml/min) en los cuatro grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: C vs BD: * $p < 0,05$; BDF vs CF: ++ $p < 0,01$.

Después de la exposición a BD se observa una disminución significativa de la TFG respecto al control ($p < 0,05$). Además, tras la suplementación de AF, este parámetro indicativo de la función renal sigue disminuido, lo que indica que el BD afecta a la filtración renal; pero no parece que la oxidación esté implicada en este mecanismo, ya que el AF no contrarresta el daño. Resultados similares fueron encontrados por (Ojeda et al., 2012) que estudiaron los efectos antioxidantes del AF en el alcoholismo crónico; y por (Sobrino, 2018) que utilizó como antioxidante el selenio, en ratas adolescentes sometidas a BD.

Parece ser que el EO generado por el consumo agudo de alcohol en los riñones, afecta mayoritariamente a las células epiteliales del túbulo distal y no a los podocitos glomerulares donde ocurre la filtración. De esta forma, la reducción de la TFG se relaciona principalmente con un proceso de infiltración de neutrófilos que provocan activación de la mieloperoxidasa y dañan a las células, más que con el EO directamente (Latchoumycandane et al., 2015).

Por consiguiente, la terapia con AF mejora el balance hídrico-salino disminuyendo los niveles séricos de Aldo y aumentando la ingesta líquida, disminuyendo en parte la hipernatremia generada por el BD; pero no actúa sobre la TFG.

5 CONCLUSIONES

El consumo repetido de alcohol vía i.p. en forma de BD en ratas adolescentes no afecta a la cantidad de alimentos ni de AF ingeridos, sin encontrarse alterados sus pesos corporales.

El método de suplementación con AF elegido en este estudio fue eficaz, ya que en los grupos suplementados la ingesta de esta vitamina fue significativamente mayor.

El BD no altera el desarrollo macroscópico de los órganos objetivo del presente estudio, los riñones, ya que no se encontraron cambios significativos en su peso relativo ni en las proteínas totales.

Durante la adolescencia, el modelo de alcoholización utilizado altera el balance oxidativo de los riñones produciendo oxidación de lípidos y proteínas, siendo la GPx la única enzima antioxidante que disminuyó su actividad, probablemente, porque habría una disminución de GSH en el tejido, el principal cofactor de esta enzima. A nivel funcional, este patrón de consumo, provoca la disminución de la ingesta líquida y la diuresis; de la TFG; y la aparición de hipernatremia, relacionado con altos niveles séricos de Aldo.

La suplementación con AF ha resultado ser una terapia eficiente para contrarrestar los daños que provoca esta forma de consumo de alcohol en los riñones, pues restablece el balance oxidativo aumentando la actividad GPx, probablemente al aumentar los niveles de GSH, y evita la oxidación lipídica. Además, aumenta la ingesta líquida y reduce parcialmente la hipernatremia encontrada al disminuir la Aldo, mejorando el balance hídrico-salino. Sin embargo, no mejora la TFG ya que los glomérulos son muy resistentes a la oxidación, y no parece que el EO sea la causa principal de su mal funcionamiento.

6 BIBLIOGRAFÍA

Abilés JS. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico [en línea]. HeraUgrEs: 2007 [consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/16710794.pdf>

Adi AC, Christanto C, Rachmawati H, Adlia A. Vitamin E-based Folic Acid Nanoemulsion: Formulation and Physical Evaluation for Oral Administration. *Pharm Nanotechnol.* 2019; 7: 304-13.

Aragón C, Miquel M, Correa M, Sanchis-Segura C. Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones.* 2002; 14: 23-42.

Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195(1): 133-40.

Bukhari FJ, Moradi H, Gollapudi P, Ju Kim H, Vaziri ND, Said HM. Effect of chronic kidney disease on the expression of thiamin and folic acid transporters. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 2137-44.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Roper P. Long-term modulations in the vertebral transcriptome of adolescent-stage rats exposed to binge alcohol. *Alcohol Alcohol.* 2010; 45: 332-46.

Capelli I, Cianciolo G, Gasperoni L, Zappulo F, Tondolo F, Cappuccilli M, et al. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, why not? *Nutrients.* 2019; 11.

Carreras MP, Castellano G. Hígado y alcohol. *Problemas Comunes en la Práctica Clínica - Gastroenterología y Hepatología.* 2012; 799-814.

Das SK, Vasudevan DM. Alcohol induced effects on kidney. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23: 4-9.

Dinu D, Nechifor MT, Movileanu L. Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 19: 386-95.

Epstein M. Alcohol's Impact on Kidney Function. *Alcohol Heal Res.* 2016; 21: 93-6.

Fridovich I. Cytochrome C. In: Greenwald RA, ed. *Handbookk of methods for oxygen radical research.* Boca Ratos, FL: CRC Press. 1985; 213-5.

Goc Z, Kapusta E, Formicki G, Martiniaková M, Omelka R. Effect of taurine on ethanol-induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Chin J Physiol.* 2019; 62: 148-56

Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Mondragón-Terán P, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito

producido por el metabolismo del etanol. *Med Interna Mex.* 2014; 30: 295-308.

Herrera Mejía J, Muñoz AM, Parra S. BE. Determinants of folate nutritional status and the role of the genetic variation of C677T methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme. *Rev Chil Nutr.* 2016; 43: 336-45.

Kim SJ, Jung YS, Kwon DY, Kim YC. Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 368: 893-8.

Latchoumycandane C, Nagy LE, McIntyre TM. Myeloperoxidase formation of PAF receptor ligands induces PAF receptor-dependent kidney injury during ethanol consumption. *Free Radic Biol Med.* 2015; 86: 179-90.

Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71(4): 952-8.

Lees B, Meredith LR, Kirkland AE, Bryant BE, Squeglia LM. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 2020; 192: 172906.

Liakishev AA. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *Kardiologija.* 2006; 46: 70.

Long Y, Nie J. Homocysteine in Renal Injury. *Kidney Dis.* 2016; 2: 80-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.

Medici V, Halsted CH. Folate, alcohol, and liver disease. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57: 596-606.

Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Encuesta sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES) 1994-2018. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). [en línea]. [Consultado en Marzo 2020]. Disponible en: <http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>

Mukherjee S, Das SK, Vasudevan DM. Effects of Ethanol Consumption on Different Organs-A Brief Overview. *Asian Journal of Biochemistry.* 2007; 2: 386-394.

Nogales F, Rúa RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem Res Toxicol.* 2014; 27: 1926-33.

Ojeda ML, Barrero MJ, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: Folic acid supplementation. *Alcohol Alcohol.* 2012; 47: 404-12.

Ojeda ML, Rua RM, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Binge drinking during adolescence disrupts Se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015; 39(5): 818-26.

Ojeda ML, Rua RM, Nogales F, Díaz-Castro J, Murillo ML, Carreras O. The benefits of administering folic acid in order to combat the oxidative damage caused by binge drinking in adolescent rats. *Alcohol Alcohol*. 2016; 51: 235-41.

Organización Mundial de la Salud. Informe mundial de situación sobre alcohol y salud 2018. Informe de un grupo científico de la OMS. Ginebra: OMS; 2018.

Paquot N. Le Métabolisme de l'alcool. *Rev Med Liege*. 2019; 74(5-6): 265-267.

Pérez-Fuentes M del C, Molero Jurado M del M, Gázquez Linares JJ, Martos Martínez Á, Mercader Rubio I, Saracosti M. Individual Variables Involved in Perceived Pressure for Adolescent Drinking. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17: 2012.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 357-63.

Samodelov SL, Gai Z, Kullak-Ublick GA, Visentin M. Renal reabsorption of folates: Pharmacological and toxicological snapshots. *Nutrients*. 2019; 11.

Sandoval C, Vásquez B, Souza-Mello V, Adeli K, Mandarim-de-Lacerda C, Del Sol M. Morphoquantitative effects of oral β -carotene supplementation on liver of C57BL/6 mice exposed to ethanol consumption. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019; 12: 1713-22.

Sobrino P, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Binge drinking affects kidney function, osmotic balance, aldosterone levels, and arterial pressure in adolescent rats: the potential hypotensive effect of selenium mediated by improvements in oxidative balance. *Hypertens Res*. 2019; 42: 1495-506.

Sobrio P. Selenio y selenoproteínas frente al daño cardiovascular provocado por el "Binge Drinking". 2018 [en línea]. [Consultado en Abril 2020]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11441/81019>

Stanhewicz AE, Kenney WL. Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. *Nutr Rev*. 2017; 75: 61-70.

Tucker LA. Serum and Dietary Folate and Vitamin B12 Levels Account for Differences in Cellular Aging: Evidence Based on Telomere Findings in 5581 U.S. Adults. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019.

Vargas Martínez AM, Trapero-Bertran M, Gil-García E, Lima-Serrano M. Impacto del Consumo

episódico excesivo de alcohol en la adolescencia. *Adicciones*. 2018; 30: 152-4.

Wani NA, Nada R, Kaur J. Biochemical and molecular mechanisms of folate transport in rat pancreas; interference with ethanol ingestion. *PLoS One*. 2011; 6.

White AM, Tapert S, Shukla SD. Binge Drinking. *Alcohol Res*. 2018; 39: 1-3.

Wilson DF, Matschinsky FM. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Med Hypotheses*. 2020; 140.

Worthington DJ, Rosemeyer MA. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem*. 1974; 48(1): 167-77.

Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*. 2003; 27: 277-84.