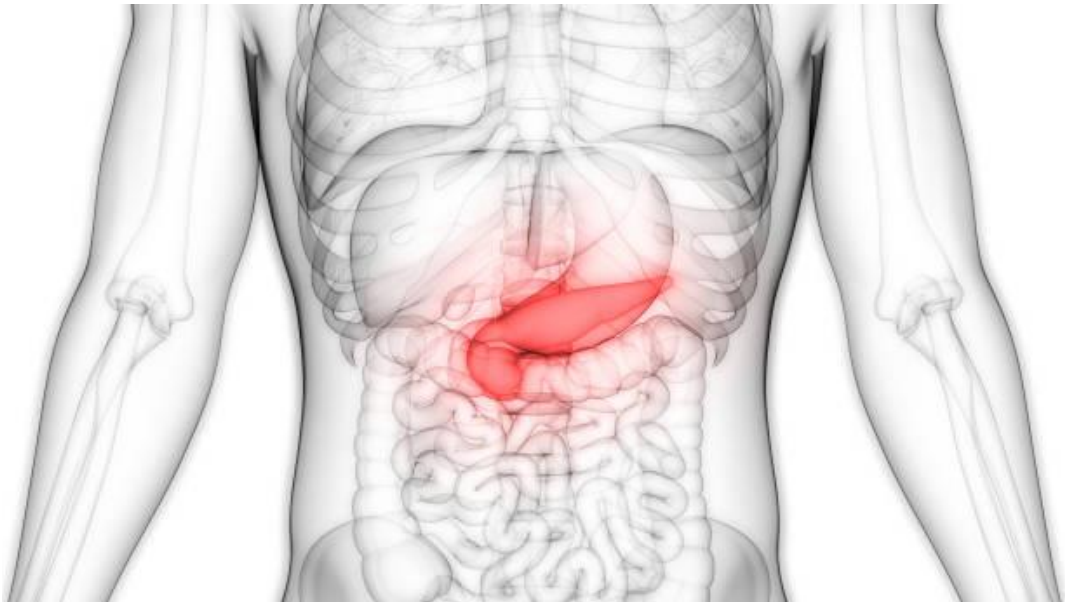


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



Selenio como antioxidante frente a la posible resistencia a la insulina generada por el atracón de alcohol durante la adolescencia



María Ramblado Valiente

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DOBLE GRADO FARMACIA Y ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TRABAJO FIN DE GRADO EXPERIMENTAL

Selenio como antioxidante frente a la posible resistencia a la insulina generada por el atracón de alcohol durante la adolescencia

AUTORA: María Ramblado Valiente

TUTORAS: Dra. D^a. M^a Luisa Ojeda Murillo y Dra. D^a. Fátima Nogales Bueno

DEPARTAMENTO: Fisiología

Sevilla – Junio 2022

RESUMEN

El “binge drinking” (BD) es el consumo de alcohol, en forma de atracón, más común entre los adolescentes, que se caracteriza por ser altamente prooxidante. El páncreas, especialmente su parte endocrina, es muy sensible al estrés oxidativo ya que presenta una baja proporción de enzimas antioxidantes. Este órgano está influenciado por el Selenio (Se), un oligoelemento con capacidad antioxidante que al formar parte de las selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa (GPx), protege a las células β de la oxidación. Así, este estudio valora el estado oxidativo del páncreas en ratas alcoholizadas expuestas al modelo de BD y analiza si una suplementación con Se puede funcionar como terapia antioxidante que mejore la funcionalidad del páncreas endocrino. Para ello, se utilizaron cuatro grupos de ratas adolescentes, con y sin ingesta de alcohol tipo BD y suplementadas, o no, con Se. Las ratas BD ingirieron más alimento sin aumentar de peso. Estas ratas tuvieron un desbalance de las enzimas antioxidantes que produjo oxidación lipídica, y una menor expresión de GPx1. Además, presentaron una mayor expresión de SIRT-1 y elevados niveles de adiposina lo que promovió mayor secreción de insulina, a pesar de la hiperglucemia encontrada. La suplementación con Se en las ratas BD aumentó la actividad y expresión GPx1 y la actividad catalasa, disminuyendo la oxidación lipídica. Esta suplementación disminuyó los niveles de las proteínas SIRT-1 y adiposina. Se puede concluir que, aunque el BD produce EO en el páncreas, éste no afecta a la secreción de insulina ya que a través del SIRT-1 y la adiposina, protege a las células β , así la RI observada no está relacionada con la síntesis de esta hormona. La suplementación con Se evita el EO en el páncreas, sin embargo, son necesarios más estudios que valoren su papel sobre la RI.

Palabras clave: binge drinking, estrés oxidativo, insulina, páncreas, selenio.

CONTENIDO

1	Introducción	4
1.1	Atracón de alcohol o “binge drinking” en la adolescencia.....	4
1.1.1	Generalidades	4
1.1.2	Estrés oxidativo y “binge drinking”	4
1.1.3	“Binge drinking” y metabolismo energético	6
1.2	Selenio	9
1.2.1	Generalidades.	9
1.2.2	Selenio en el balance energético	10
2	Objetivos	11
3	Metodología	11
3.1	Animales, diseño y condiciones experimentales	11
3.1.1	Dieta utilizada.....	13
3.1.2	Método de alcoholización tipo atracón “binge drinking”	13
3.1.3	Control nutricional	13
3.1.4	Toma de muestras.....	14
3.1.5	Determinación de parámetros bioquímicos en suero	14
3.2	Homogeneización Tisular	15
3.3	Análisis de la actividad antioxidante y la oxidación de biomoléculas.....	15
3.3.1	Determinación de la concentración total de proteínas	15
3.3.2	Superóxido Dismutasa (SOD)	15
3.3.3	Catalasa (CAT).....	15
3.3.4	Glutation Peroxidasa (GPx)	16
3.3.5	Oxidación de lípidos	16
3.4	Análisis de la expresión de proteínas.....	16
3.4.1	Western blot.....	16
3.5	Tratamiento estadístico	18
4	Resultados y Discusión	18
5	Conclusiones.....	26
6	Bibliografía	27

FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del alcohol.....	5
Figura 2: Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante	6
Figura 3: Rutas de metabolismo insulínico modificado de Ojeda et al. (2022)	8
Figura 4: Diseño experimental esquematizado.....	13
Figura 5: Actividad de las enzimas antioxidantes en el páncreas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Ratio de la actividad SOD/(CAT+GPx). Oxidación lipídica en páncreas en relación con el malondialdehído (MDA).....	20
Figura 6: Expresión de la enzima glutatión peroxidasa 1 (GPx1) y expresión de anticuerpo β -actina.....	22
Figura 7: Concentración de insulina (μ UI/mL), Glucosa (mg/dL), índice HOMA IR y Funcionalidad células β	23
Figura 8: Expresión proteína sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD ⁺ (SIRT-1) y anticuerpo β -actina.....	24
Figura 9: Concentración de adipocina adiposina en suero (pg/mL).	25

TABLAS

Tabla 1: Características de los anticuerpos empleados	17
Tabla 2: Significación estadística empleada.....	18
Tabla 3: Parámetros nutricionales, morfológicos..	19

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ATRACÓN DE ALCOHOL O “BINGE DRINKING” EN LA ADOLESCENCIA

1.1.1 Generalidades

El “binge drinking” (BD), más conocido en España como “botellón”, consiste en el consumo de alcohol en forma de atracón, en grandes cantidades de alcohol, en un periodo de tiempo concreto. Según el Instituto Nacional sobre el Abuso del Alcohol y el Alcoholismo (NIAAA) supone el consumo de más de cinco unidades de bebida en hombres y más de cuatro en mujeres en 2 h, se alcanza cuando los niveles de etanol en sangre son mayor o iguales a 0,08g/dL. A esa concentración se produce una intoxicación alcohólica (White et al. 2018; Valencia Martín et al. 2020).

El BD supuso un 5,3% de las muertes en 2018, y un 13,5% en edades de 20 a 39 años, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se trata, de manera preocupante, del modelo de consumo de alcohol que más frecuentan los adolescentes hoy día, igualmente mantenida durante la pandemia de COVID-19. El Proyecto de Encuesta Escolar Europea sobre Alcohol y Drogas (ESPAD) estima que uno de cada tres estudiantes (35%) consumió alcohol en forma de BD en los últimos 30 días. En comparación con un consumo crónico, el BD favorece la formación de mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) y llega en mayor medida a tejidos extrahepáticos, pudiendo dañar la salud del adolescente en el futuro (Ojeda et al. 2022).

El consumo agudo de alcohol provoca multitud de efectos negativos en la salud, sobre todo en adolescentes, ya que se encuentran en una etapa de desarrollo, en la que muchos órganos aún no están maduros. Pudiendo favorecer la aparición de cambios de conducta (mayor predisposición a la violencia, accidentes...), alteraciones neurocognitivas, intestinales, y daños en hígado y páncreas. Recientemente también se ha visto que puede ser un riesgo cardiovascular relacionado con enfermedades cardiometabólicas a largo plazo (Valencia Martín et al. 2020). Además, el contacto temprano con el alcohol puede generar dependencia y un aumento de su consumo (Ojeda et al. 2022).

1.1.2 Estrés oxidativo y “binge drinking”

El modelo de BD se caracteriza por ser especialmente prooxidante. El alcohol se metaboliza en el hígado principalmente por la vía oxidativa en la que participan las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH), al sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) en concreto el

citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y la catalasa (CAT). Las tres rutas producen el tóxico acetaldehído, que se metaboliza por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y se convierte en acetato que entra en la mitocondria y por fosforilación oxidativa da lugar a la formación de EROs (Figura 1). Tanto la ADH como ALDH reducen el NAD^+ a NADH , disminuyendo los niveles del primero y afectando así negativamente a la cadena transportadora de electrones. Al no funcionar correctamente, se produce un exceso de EROs en la mitocondria y se favorece el estrés oxidativo (EO) (Sobrino, 2018; Wilson y Matschinsky, 2020).

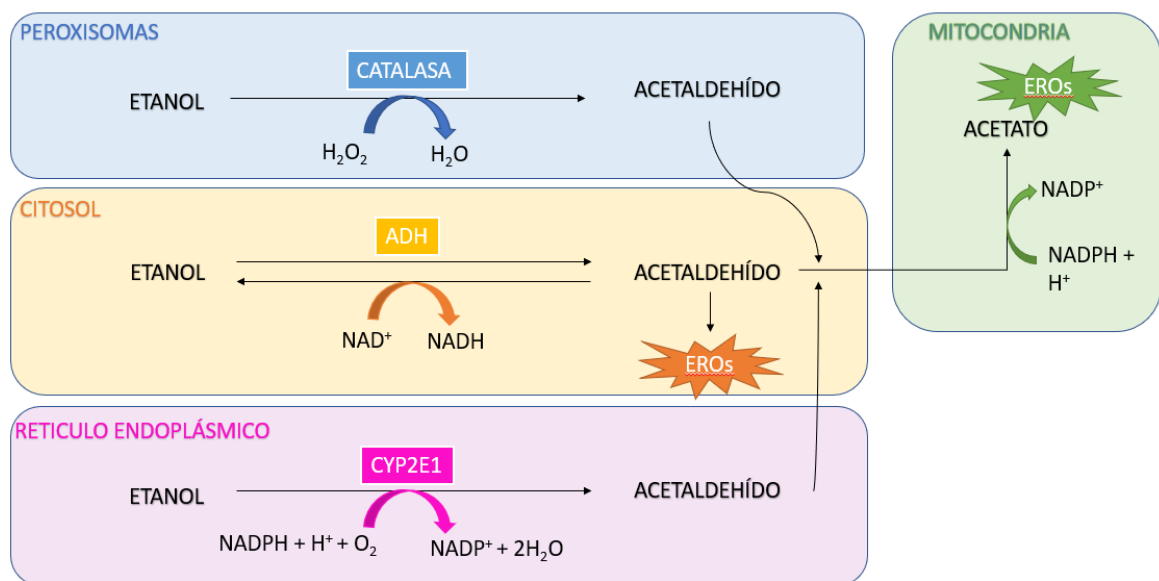


Figura 1: Metabolismo del alcohol.

Durante el BD, al ser una ingesta elevada y brusca en poco periodo de tiempo de alcohol, la ADH hepática se satura, teniendo que actuar en mayor medida la segunda ruta de metabolización del etanol, el SMOE dependiente de CYP2E1 (Sobrino, 2018), enzima que genera directamente elevadas cantidades de EROs (Albano et al., 1996; Lu y Cederbaum, 2008). Las elevadas concentraciones de alcohol que se alcanzan en sangre tras el BD hacen que llegue también a otros tejidos que también poseen enzimas metabólicas del alcohol, aunque en menor medida que el hígado, como son riñón, corazón y páncreas. El incremento de la actividad CYP2E1 se traduce en un aumento del EO, causado por un desequilibrio entre agentes prooxidantes, como las EROs, y los antioxidantes endógenos en favor de los primeros. Las EROs generadas pueden reaccionar y dañar macromoléculas celulares, alterando su función biológica. Este proceso de EO debido al consumo de etanol puede llevar a la muerte celular y del propio tejido (Hernández et al., 2014).

Los mecanismos antioxidantes enzimáticos que intervienen principalmente en el organismo para evitar el exceso de EROs son la enzima superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), que con reacciones en cadena transforman las EROs, como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot), entre otras, en agua (Newsholme et al. 2019) (figura 2). Se ha visto que tras una ingesta en forma de BD durante la adolescencia se altera la funcionalidad de estas enzimas antioxidantes endógenas en hígado (Ojeda et al. 2015), riñón (Sobrinó et al. 2019) y corazón (Ojeda et al. 2021), favoreciendo la aparición de EO.

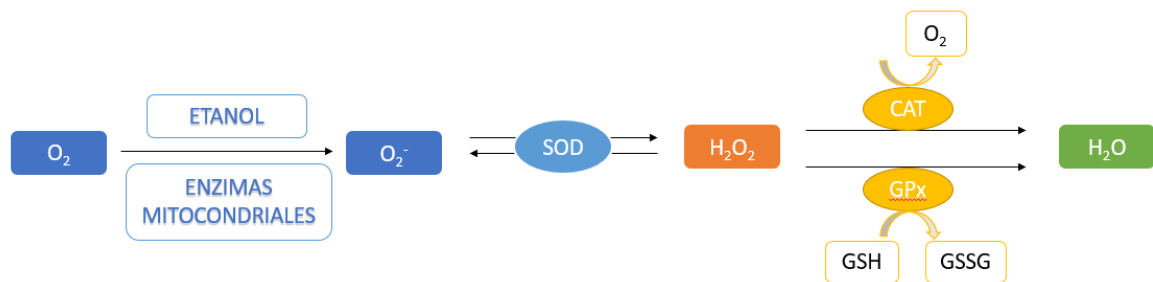


Figura 2: Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante

Es importante destacar que el EO está involucrado en el origen y evolución de distintas patologías, como son la diabetes, hipertensión, Alzheimer, Parkinson, y con la aparición de intolerancia a glucosa y resistencia a la insulina (RI) (Muñoz Del Valle et al., 2016).

Las EROs en niveles bajos, sobre todo el H_2O_2 , son necesarias para procesos como la biosíntesis, secreción y señalización adecuadas de insulina. Cuando sucede un desequilibrio entre su degradación y generación, haciendo que haya más cantidad de estas, aparece EO que resulta en disfunción mitocondrial y muerte celular (Steinbrenner et al. 2022).

1.1.3 “Binge drinking” y metabolismo energético

Anteriormente en otros estudios del grupo de trabajo Nogales et al. (2021) determinaron cómo afecta el BD al metabolismo hepático en ratas. Los resultados concluyen que en los grupos que recibieron alcohol existe oxidación hepática y afectación de las transaminasas, además de valores altos de triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre. Este trabajo demostró que el EO que genera el BD durante la adolescencia está relacionado con el desbalance energético hepático que conlleva a esteatosis, pues modula a dos importantes reguladores del balance energético celular: proteinquinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) y sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD^+ (SIRT-1). La activación de AMPK estimula los

procesos catabólicos que generan adenosin trifosfato (ATP) y disminuye los anabólicos que lo consumen, de manera que restaura los niveles energéticos cuando el estado energético celular está disminuido. El SIRT-1 protege del EO y de procesos inflamatorios y su sobreexpresión reduce la aparición de desorden metabólico y cardiovascular. Se ha visto recientemente que ambos producen efectos catabólicos similares en el metabolismo celular, y su desregulación está involucrada con la aparición de RI. Nogales et al. (2021) mostraron que la hiperglucemia que se produce en los grupos BD genera una disminución de la expresión del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) hepático, que conlleva a una menor sensibilidad del hígado a la insulina, elevando el riesgo de desarrollar RI y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Sin embargo, no se midieron los niveles de insulina.

La insulina es una hormona peptídica hipoglucemiante y altamente anabolizante secretada en las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans. El estímulo para que se libere insulina por las células β es el incremento de glucosa en sangre tras ingesta de alimentos. Tras ser liberada la insulina viaja por sangre hasta sus tejidos diana, que son hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Existen diferentes rutas de señalización entre la insulina y su receptor. El receptor de insulina es una tirosin quinasa formada por dos subunidades transmembrana α y β (Park et al. 2021). Al entrar en contacto con la insulina, sufre una serie de cambios conformacionales que dan la autofosforilación de sus residuos de tirosina y aumentan la actividad quinasa, produciendo la fosforilación de otros sustratos como son el IRS-1 e IRS-2 (Leibiger et al. 2008). Tras la cascada de señales, en cada tejido, se suceden distintas rutas a corto, medio y largo plazo para controlar los niveles de glucosa, de aminoácidos y de ácidos grasos en sangre. En el músculo esquelético, la insulina produce un aumento de la utilización de glucosa aumentando la cantidad de transportadores de glucosa e inhibiendo la gluconeogénesis. En el tejido adiposo, inhibe la lipólisis y aumenta la adipogénesis y los transportadores de glucosa. En el hígado, aumenta la glucogenogénesis y la lipogénesis, e inhibe la gluconeogénesis. También se ha descrito que la insulina tiene receptores en el páncreas que disminuyen la secreción de glucagón (Park et al. 2021).

Pero, además, el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo son capaces de liberar hepatoquinas, mioquinas y adipoquinas, respectivamente, en función de su estado energético, para regular la secreción de insulina (Park et al. 2015). Entre estas sustancias destaca la adipoquina adiposina, pues es la que afecta en mayor medida a las células β . La adiposina mantiene la homeostasis del tejido adiposo y aumenta la secreción de insulina de las células β en respuesta a la glucosa. La adiposina controla la vía alternativa del complemento y la generación del componente del complemento C3a. Se ha visto que C3a actúa directamente en

las células β para inducir la secreción de insulina, además de protegerlas de muerte celular, al reducir la activación de caspasa 3 y la expresión de marcadores de muerte celular en los islotes pancreáticos. También la adiposina protege a las células pancreáticas de la destrucción en la DM2 (Gómez-Banoy et al. 2019).

La RI es una condición patológica que afecta a los tejidos diana de la insulina que no responden a niveles normales de la misma. Normalmente debido a que la cascada de señalización que desencadena la insulina al unirse a su receptor queda inhibida en algunos de sus puntos (figura 3). Como resultado, las células β pancreáticas secretan más cantidad de insulina para tratar de compensarlo, aparece hiperinsulinemia unida a hiperglucemia. Tras este esfuerzo biosintético, las células β fallan hasta llegar a DM2, con las complicaciones que conlleva (Newsholme et al. 2019). La RI, sobre todo de músculo esquelético y tejido adiposo es factor principal para el desarrollo de esta patología (Steinbrenner et al. 2022). Como ya se comentó, el BD afecta la expresión del IRS-1 hepático y va acompañado con hiperglucemia. Además, el EO generado por el BD afecta al SIRT-1 y al AMPK que regulan la cascada de señalización de la insulina (Nogales et al., 2021)

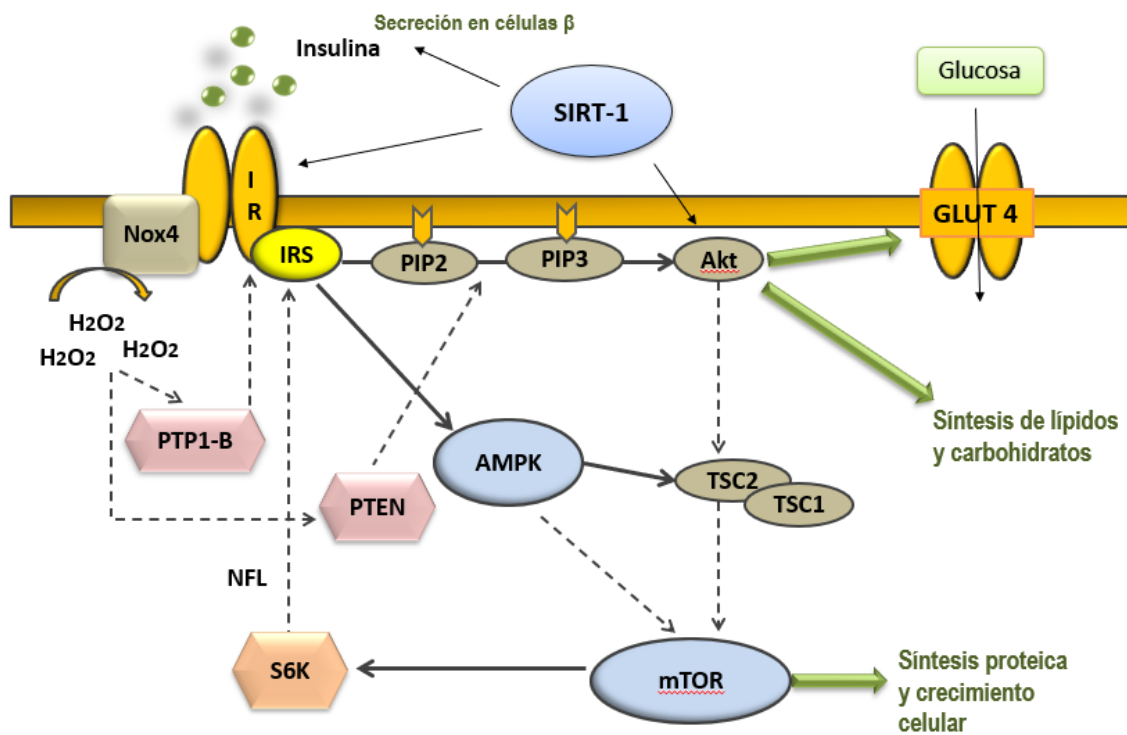


Figura 3: Rutas de metabolismo insulínico modificado de Ojeda et al. (2022)

Las células β son especialmente sensibles al EO, ya que la defensa antioxidante que presentan no es tan abundante como en otros tejidos. Es el caso de las enzimas SOD, CAT y GPx, cuya actividad es menor en las células β en comparación con otras, especialmente de las dos últimas (Eguchi et al. 2021). Al estar expuestas a un modelo de BD, altamente prooxidante, las células β pueden sufrir alteraciones y daños oxidativos. El alcohol, como se ha dicho, se metaboliza principalmente en el hígado, pero un consumo agudo y elevado del mismo hace que llegue a otros tejidos donde también se metaboliza, entre ellos el páncreas. De la metabolización del etanol surgen EROs perjudiciales para el tejido, y la preocupación es mayor cuando presenta menor cantidad de enzimas antioxidantes (Sun et al. 2018). El EO es una de las principales causas de pancreatitis inducida por la exposición a BD, produciendo daño oxidativo en lípidos y proteínas (Dong et al. 2016), aunque existen escasos estudios que confirmen el daño sobre las células β . Como se ha comentado, esta forma de consumo de alcohol aguda ha aumentado de manera peligrosa en todo el mundo, y sus efectos negativos sobre la salud hacen que sea una importante preocupación social. De ahí surge la necesidad de realizar una valoración del estado del páncreas de ratas adolescentes en situaciones de consumo de alcohol en forma de BD.

1.2 SELENIO

1.2.1 Generalidades.

El selenio (Se) es un elemento químico esencial que constituye una parte fundamental de las selenoproteínas en forma de selenocisteína (Steinbrenner et al. 2022). Se han identificado 25 genes que codifican selenoproteínas en el organismo (Labunskyy et al. 2014), incluyendo a la familia antioxidante de glutatión peroxidasa (GPx) (donde el Se se encuentra en los cuatro centros catalíticos de la enzima) y la tiorredoxina reductasa (TrxR). Por tanto, una de sus funciones principales es actuar como antioxidante, estando implicado en la protección contra el daño producido por los radicales libres. Al aumentar el EO, sus requerimientos tisulares aumentan igualmente (Monedero, 2014). Se ha visto que en pacientes alcohólicos se encuentran niveles bajos de Se sérico (Rua et al. 2014). En ratas adolescentes expuestas a BD se ha observado una depleción de Se y Selenoproteína P (SelenoP) en hígado (Ojeda et al., 2017), riñón (Sobrino et al., 2019) y corazón (Ojeda et al., 2021). A parte de efectos antioxidantes, el Se también presenta propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas, actuando por ejemplo frente a la pancreatitis y otras enfermedades (Millán, 2012).

La GPx es una de las cuatro enzimas del sistema antioxidante endógeno encargada de la reacción de reducción de H_2O_2 en agua y la oxidación de glutatión. De esta manera, protegen

al organismo de los daños del H₂O₂ en las membranas y otras estructuras celulares. Existen varias isoformas de GPx, siendo la GPx1 la que se encuentra en el citoplasma celular en mayor medida. La GPx2 se encuentra mayoritariamente expresada en tracto intestinal, encargada de proteger de la toxicidad de hidroperóxidos lipídicos de la dieta. La GPx3 es la única extracelular y se encuentra en el plasma. La GPx4 tiene como función la protección de las membranas celulares del daño oxidativo, por lo que se encuentra en citoplasma, núcleo y mitocondrias (Millán, 2012; Monedero, 2014).

La TrxR participa en la regulación de procesos celulares redox de las señales de citocinas, incluyendo la señalización y comunicación celular y el metabolismo y reparación del ADN (Muñoz, 2016). Existen dos isoenzimas, TrxR1 en citosol y TrxR2 mitocondrial y forman parte de la defensa antioxidante del organismo (Rundölf y Arnér, 2004; Mustacich y Powis, 2000)

La SelenoP es una glicoproteína extracelular que contiene la mayoría del selenio presente en el plasma, con más de doce residuos de selenocisteína. Su función es proteger al endotelio de oxidantes locales y el transporte del Se a los tejidos (Millán, 2012; Monedero, 2014). Esta SelenoP se ha considerado recientemente como una hepatoquina relacionada con la RI (Misu et al. 2010).

1.2.2 Selenio en el balance energético

En estudios anteriores, Ojeda et al. (2017) se ha comprobado que durante el consumo de alcohol en forma de BD se consumen los depósitos hepáticos de Se, y la expresión de las GPx1 y 4, apareciendo daño oxidativo en el hígado. Posteriormente, Nogales et al. (2021) comprobaron que la suplementación con Se evitaba esta situación. Esto sitúa a la suplementación con Se como una terapia eficaz para el EO generado en el hígado tras la exposición al BD. Al evitar el EO, la suplementación con Se también previno el desbalance energético provocado por la disminución de AMPK y SIRT-1 que favorece la aparición de RI y esteatosis hepática, incrementando la exposición hepática del IRS-1.

Por otro lado, se ha visto que el Se puede modificar la expresión de factores de transcripción y enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en tejidos, sobre todo en procesos de gluconeogénesis, lipogénesis, colesterol y biosíntesis de proteínas que se regulan en el hígado. En el músculo esquelético, aumenta el uso de ácidos grasos como combustible, disminuye la lipogénesis y aumenta la biosíntesis de proteínas. En el tejido adiposo, regula la inflamación y la RI (Steinbrenner et al. 2022).

Por otra parte, el Se ha demostrado jugar un papel esencial en la defensa antioxidante de las células β (Abdel-Hakeem et al. 2020). El páncreas, es un órgano que requiere especialmente

protección frente al EO. Basa su sistema antioxidante en enzimas como TrxR y GPx. Existen estudios que confirman que un déficit de Se puede dar lugar a EO en las células β y disminuir la secreción de insulina, debido al efecto protector que presentan las selenoenzimas GPx y TrxR (Steinbrenner et al. 2022). Al inhibir la función de GPx1 se ha visto que se producen efectos graves en la secreción de insulina y su sobreexpresión protege de la pérdida de células β , revirtiendo además la hipoinsulinemia e hiperglucemia (Harmon et al. 2009). Además, se ha asociado a un aumento del catabolismo de glucosa y glutamina, inhibición de síntesis de lípidos e inflamación (Tang et al. 2020). La inhibición de TrxR1 hizo a las células β más propensas a la muerte celular inducida por H_2O_2 (Stancill et al. 2019). Dicha inhibición provocó un aumento de la adipogénesis y un aumento de la respuesta a la insulina y lipogénesis en adipocitos (Peng et al. 2016).

Por todo ello, el efecto antioxidante de la suplementación con Se podría ser beneficioso para las células β pancreáticas de ratas adolescentes expuestas al prooxidante modelo de consumo de alcohol BD, pudiendo mejorar su perfil metabólico a corto y largo plazo.

2 OBJETIVOS

Valorar la existencia de EO en el páncreas de ratas alcoholizadas expuestas al modelo de BD y si guarda relación con la función de las células β y la RI. Además, se analizará la expresión pancreática de SIRT-1 y los niveles séricos de adiposina, pues ambas proteínas están relacionadas con la funcionalidad de las células β del páncreas.

Analizar el uso del antioxidante Se como una terapia que mejore la función pancreática y la RI en ratas alcoholizadas expuestas al modelo de BD.

3 METODOLOGÍA

3.1 ANIMALES, DISEÑO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

En este trabajo experimental se utilizaron $n = 20$ ratas de la raza Wistar de 28 días de edad (adolescentes). Los animales son proporcionados por el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

Toda la experimentación está aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla.

Los animales, de 21 días de edad, se alojaron en jaulas de plástico en el animalario de la Facultad de Farmacia durante siete días. Tenían libre acceso a comida y bebida y condiciones de luz (desde las 7:00 h hasta las 19:00 h) y de temperatura (22°C) controladas. Al inicio del proceso de adolescencia, 28 días de edad, los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales:

- **Grupo Control (C) (n = 5):** alimentado *ad libitum* con dieta base y agua. Recibió durante 3 días seguidos por semana, siendo en total 3 semanas, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **Grupo Binge Drinking (BD) (n = 5):** alimentado *ad libitum* con dieta base y agua. Recibió durante 3 días seguidos por semana, siendo en total 3 semanas, una inyección intraperitoneal de etanol (3g/Kg) en solución salina al 20% (v/v).
- **Grupo Control Selenio (CS) (n = 5):** alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0.35 ppm Se total en dieta). Recibió durante 3 días seguidos por semana, siendo en total 3 semanas, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **Grupo Binge Drinking Selenio (BDS) (n = 5):** alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0.35 ppm Se total en dieta). Recibió durante 3 días seguidos por semana, siendo en total 3 semanas, una inyección intraperitoneal de etanol (3g/Kg) en solución salina al 20% (v/v).

Durante 3 semanas, permanecieron en estas condiciones. Se sacrificaron en el final de la adolescencia, el día 46 de vida.

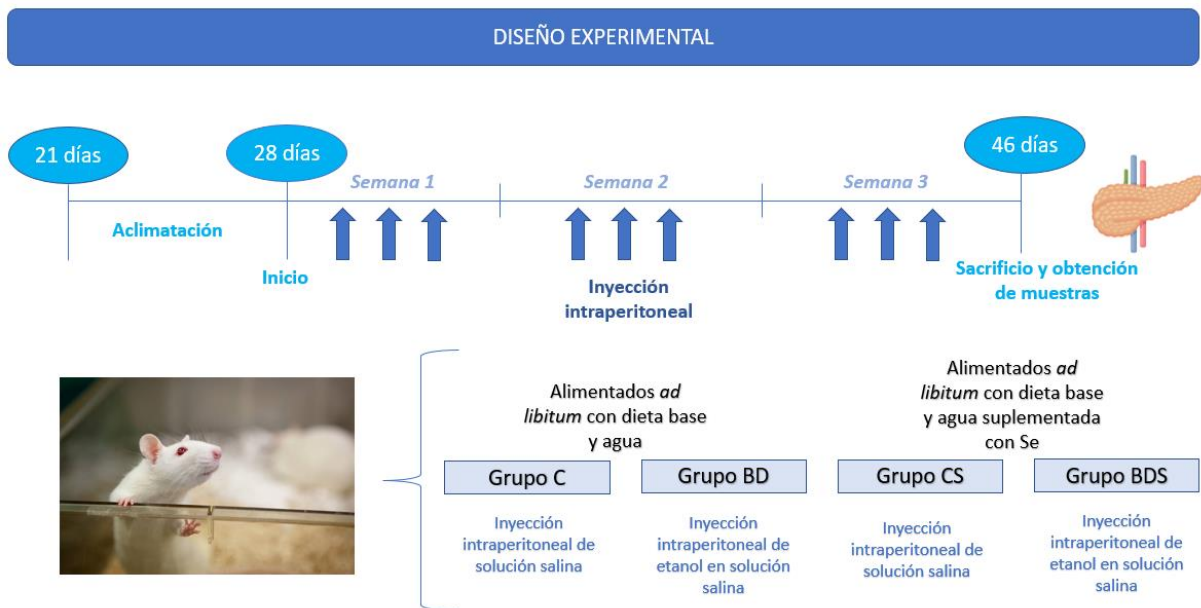


Figura 4: Diseño experimental esquematizado. Ratas: C: control, BD: Binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio

3.1.1 Dieta utilizada

La alimentación que recibieron los animales consistía en una dieta básica semisintética (LASQCdiet® Rod14-H, Alemania), que permitía tener sus necesidades nutricionales y energéticas cubiertas, conteniendo 0.2 ppm de Se. Por otro lado, los grupos suplementados recibieron 0.15 ppm de Se (en forma de selenito sódico) en el agua de bebida.

3.1.2 Método de alcoholización tipo atracón “binge drinking”

Las ratas de los grupos BD y BDS recibieron una inyección intraperitoneal, 3 días seguidos por semana y durante 3 semanas, de etanol (3g/Kg) en solución salina al 20% (v/v). De esta manera, se pretende simular el consumo de alcohol binge drinking (atracón) que realiza un adolescente durante el fin de semana (Callaci et al. 2009).

Por otra parte, a las ratas del grupo C y CS se les inyectó un volumen equivalente de solución salina durante el mismo periodo de tiempo.

3.1.3 Control nutricional

Durante el proceso, las ratas fueron monitorizadas diariamente a la misma hora (9:00-10:00 am) para evitar cambios debido a ritmos circadianos. Con una balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1g de precisión), se les midió el peso corporal y la ingesta sólida y líquida. La cantidad de comida y agua ingerida se calculó por diferencias entre una mañana y la siguiente.

Tras este tiempo, las ratas fueron sacrificadas en el día 46. Previamente, permanecieron en ayuno 12 h en las jaulas metabólicas.

3.1.4 Toma de muestras

Se procede a anestesiarse a los animales con uretano i.p. (SIGMA) al 28 % p/v a razón de 0,5 ml/100g de peso corporal. Tras esto, se extrae la sangre mediante punción intracardiaca a través del tórax. Se depositó en tubos de ensayo y se dejó retraer el coágulo durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se extrajo el suero, que se conservó a -80°C. A continuación, se extrajo el páncreas y se pesó para poder calcular su índice organosomático (IOS), y tras introducir en nitrógeno líquido, se conservó el tejido a -80°C.

$$IOS = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso total del animal}} \times 100$$

3.1.5 Determinación de parámetros bioquímicos en suero

Con un analizador automático discreto multicanal (Technicon RA-1000, Bayer Diagnostics), se determinó en las muestras de suero parámetros de glucosa e insulina. Con estos datos se calculó el modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina (HOMA IR):

$$HOMA\ IR = \frac{\text{Insulina} \left(\frac{mU}{L}\right) \times \text{Glucosa} \left(\frac{mg}{dL}\right)}{450}$$

Además, se utilizaron también para calcular la funcionalidad de las células β . Este valor se emplea para evaluar los niveles de glucosa y la capacidad del páncreas endocrino de segregar insulina.

$$\text{Células } \beta \text{ funcionales} = \frac{\text{Insulina} \left(\frac{mU}{L}\right) \times 360}{\text{Glucosa} \left(\frac{mg}{dL}\right) \times 63}$$

La concentración sérica de la adipocina adiposina se determinó mediante ELISA, utilizando el kit Rat Complement D (CFD) ELISA Kit (MyBioSource) siguiendo las instrucciones técnicas.

3.2 HOMOGENEIZACIÓN TISULAR

Los páncreas se homogeneizaron con un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón (Pobel 245432, España), en proporción 1:10 p/v con tampón fosfato 50 mM (K_2HPO_4 (PANREAC) 50mM; KH_2PO_4 (PANREAC) 50mM; y EDTA (SIGMA) 0,01mM), al que previamente se le añadió inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, ROCHE). Los homogeneizados se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante final se dividió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis.

3.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LA OXIDACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

3.3.1 Determinación de la concentración total de proteínas

La determinación se realiza mediante métodos espectrofotométricos UV-VIS. El espectrofotómetro (Hitachi U-2800A) relaciona la absorbancia de la muestra con la concentración del analito según la Ley de Lambert-Beer ($A = \varepsilon \times d \times c$). Se llevó a cabo según el método descrito por Lowry et al., (1951) en el cual se hacen reaccionar las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que origina un complejo coloreado, cuya absorbancia se mide frente al blanco en espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. La concentración total de proteínas en las muestras se calcula extrapolando sus absorbancias en la curva patrón de concentraciones conocidas, elaborada a partir de una solución madre de albúmina bovina.

3.3.2 Superóxido Dismutasa (SOD)

Mediante el método de Fridovich, (1985) modificado, se determina la actividad enzimática de SOD. La SOD es capaz de inhibir la reducción del citocromo c inducida por el sistema xantina - xantina oxidasa. La reducción del citocromo c al adicionar xantina oxidasa causa un aumento de absorbancia que es medido a 550 nm durante 3 min. Los resultados de la actividad de la SOD se expresan como U/mg de proteína. Siendo una unidad enzimática la cantidad de SOD necesaria para inhibir un 50% de la reducción del citocromo c.

3.3.3 Catalasa (CAT)

La actividad de la CAT se determinó con el ensayo de Beers y Sizer, (1952) utilizando H_2O_2 como sustrato. Con el espectrofotómetro a 240 nm se midió la desaparición del H_2O_2 durante 3 min. La actividad enzimática de la CAT se expresa como U/mg de proteína, donde una unidad de actividad es igual a la cantidad de μ moles de H_2O_2 degradados/min.

3.3.4 Glutation Peroxidasa (GPx)

Se determina la actividad de la enzima GPx. Esta enzima cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del H₂O₂ utilizando GSH. Se empleó el método descrito por Lawrence y Burk, (1976) modificado. La enzima GPx forma glutatión oxidado (GSSG) que se acopla a la reacción que cataliza la enzima GR, midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de NADPH durante 3 min. La actividad específica se expresa como mU/mg de proteína, donde 1 mU es igual al número de nanomoles de NADPH oxidados/min.

3.3.5 Oxidación de lípidos

Mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) se evalúa la peroxidación lipídica. El MDA es el producto final de la degradación oxidativa de los lípidos. Mediante una reacción colorimétrica (Draper y Hadley, 1990), se determina a 535 nm el complejo rosa fluorescente formado tras la reacción entre el MDA, en condiciones de pH ácido y temperatura elevada, y el ácido tiobarbitúrico (TBA). Los resultados se expresan como mol/mg de proteína.

3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

3.4.1 Western blot

La expresión de las proteínas pancreáticas GPx1 y SIRT-1 en los homogeneizados de páncreas de ratas adolescentes, se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot (inmunodetección de proteínas), por el método de Laemmli, (1970). Se emplea para identificar y localizar proteínas en función de su tamaño y en base a su capacidad para unirse a anticuerpos (Ac) específicos. Se utiliza el sistema Transblot, BIO-RAD CA, USA.

Las muestras que se utilizaron contenían 100 µg de proteínas. Se prepararon en proporción 1:1 con tampón de muestra (Sample Buffer, Laemmli 2X Concentrate SIGMA) y un 5% de 2-mercaptoetanol (BIO-RAD). A continuación, se incubaron a 95°C durante 5 minutos, para así desnaturalizar las proteínas. Las proteínas se separaron según su masa molecular por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (siendo el gel separador de 9%).

Las muestras y el marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker 24084, iNtRON Biotechnology) se cargaron en los pocillos en la cubeta con tampón de electroforesis diluido 1:10 en agua bidestilada. Esta se conectó a una fuente de voltaje, se aplicó una intensidad de 150 V con un regulador de voltaje (PowerPac™ Basic, BIO-RAD) durante 1 h.

A continuación, se da la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, MA, USA). Se conecta el sistema de transferencia a una fuente de voltaje con una intensidad de 100 V durante 2 h y 30 min. Se comprueba la transferencia recubriendo la membrana con un colorante “Ponceau” durante unos segundos para observar las bandas correctamente transferidas. Se elimina este colorante con agua destilada y tampón TBS (TRIS (SIGMA) 50 mM; NaCl (SIGMA) 150 mM; HCl (PANREAC), pH= 7,5).

Se incubaron las membranas 1 h en leche de bloqueo (Skim milk powder for blotting 42590.01, SERVA) al 5% con TBS para bloquear uniones inespecíficas. Pasado ese tiempo, se incubaron las membranas durante 48 h a 4°C con diluciones de Ac primarios específicos (tabla 1). Tras esto, se realizaron 5 lavados de 4 minutos cada uno con TBS-T (TBS con el detergente 0,1% (v/v) Tween 20). Tras ello, se vuelve a incubar a temperatura ambiente durante 1 h, esta vez con las diluciones del Ac secundario. Se realizan de nuevo los 5 lavados de 4 minutos con TBS-T.

Tabla 1: Características de los anticuerpos empleados

ANTICUERPO	Clasificación y peso molecular	Dilución	Variante	Referencia comercial
GPx1	Primario (23 kDa)	1:1.000	IgG policlonal en conejo	GPx.1/2 (H-151): sc-30147
SIRT1	Primario (120 kDa)	1:500	IgG monoclonal en conejo	Cell Signaling Technology: 9475
β-actina	Primario	1:20.000	IgG monoclonal en ratón	A5441 SIGMA
Anti-rabbit IgG	Secundario	GPx1: 1:1.250 SIRT1: 1:1.500	Anti-IgG en conejo	BIO-RAD: 170-6515
Anti-mouse IgG	Secundario	1:10.000	Anti-IgG en ratón	BIO-RAD: 170-6516

A continuación, se emplea el analizador de imagen Amersham Imager 600 (GE Healthcare) para la inmunodetección de las membranas. Para ello, se les añadió el reactivo ECL (GE Healthcare and Lumigen INC Buckinghamshire, UK) que emite quimioluminiscencia.

La cuantificación de las proteínas se realizó midiendo la densidad óptica de las bandas con un programa informático que analiza densitometría (Image J). Los resultados se expresaron como

el porcentaje de unidades arbitrarias relativas, tomando como base los valores de los controles, definidos como 100%.

Para el control de la expresión de las proteínas estudiadas se empleó el anticuerpo de la β -actina.

3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se expresan como “media \pm error estándar de la media (SEM)” de 5 muestras por grupo (n = 5). Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza ANOVA en el programa GraphPad InStat 3, y para determinar las diferencias significativas entre los valores obtenidos se utilizó el test de Tukey-Kramer. Las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos se consideran en valores de $p < 0.05$ y para expresarla se emplea la siguiente simbología:

Tabla 2: Significación estadística empleada

Grupos	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
C vs BD	*	**	***
C vs CS	c	cc	ccc
BD vs BDS	a	aa	aaa
CS vs BDS	•	••	•••

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 3 muestra los parámetros nutricionales y morfológicos más relevantes al final del tratamiento. El consumo de alcohol provocó una disminución del peso corporal, a pesar de que la ingesta sólida no se vio afectada, por ello parece que el BD favorece procesos catabólicos. Sin embargo, a nivel del páncreas aparece una mayor concentración de proteínas a pesar de que el peso relativo de este órgano no se ve afectado. A nivel clínico es conocido que el consumo de alcohol a menudo va acompañado de la aparición de pancreatitis (Apte et al. 1998). Las células acinares metabolizan el alcohol de igual modo que los hepatocitos, generando EO, necrosis y fibrosis en el páncreas exocrino, además de una activación prematura de las enzimas digestivas. El alcohol incrementa la concentración de proteínas en el jugo pancreático y la concentración de litostatina y GP2 que favorecen la formación de tapones proteicos que complican aún más esta situación (Tenner y Freedman, 1998). Por todo

ello es preocupante haber encontrado una alta concentración de proteínas tras el BD en ratas adolescentes. Además, se sabe que la insuficiencia pancreática exocrina se correlaciona con la endocrina (Boreham y Ammori, 2003).

La suplementación con Se en estos animales no afectó a ninguno de estos parámetros, aunque la ingesta de Se en los grupos suplementados fue significativamente mayor que en los no suplementados, especialmente en el grupo CS. Este último grupo presentó la mayor ingesta sólida que no se tradujo en un mayor peso corporal.

Tabla 3: Parámetros nutricionales, morfológicos. Resultados expresados como "media \pm SEM". Significación estadística: C vs BD: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; C vs CS: c $p < 0,05$, ccc $p < 0,001$; BD vs BDS: aaa $p < 0,001$; CS vs BDS: • $p < 0,05$, ••• $p < 0,001$.

Parámetros nutricionales	C	BD	CS	BDS
Incremento del peso corporal (g/d)	5.9 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2 **	5.8 \pm 0.2 •	4.7 \pm 0.3
Ingesta sólida (g/d)	15.2 \pm 0.4	14.6 \pm 0.1	16.8 \pm 0.1 c, •	15.2 \pm 0.4
Ingesta líquida (ml/d)	22.1 \pm 0.7	24.1 \pm 0.5	23.6 \pm 0.7	23.8 \pm 0.6
Ingesta total de Se (μg/d)	3.1 \pm 0.07	2.9 \pm 0.08 aaa	6.8 \pm 0.1 ccc, •	6.5 \pm 0.06
IOS Páncreas	0.79 \pm 0.03	0.85 \pm 0.06	0.89 \pm 0.03	0.85 \pm 0.03
Proteínas pancreáticas	15.9 \pm 1.5	28.4 \pm 2.6 ***	16.1 \pm 1.4 •••	28.5 \pm 1.1

La figura 5 muestra el balance oxidativo en el páncreas analizando la actividad de las principales enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT y GPx) y el nivel de oxidación de lípidos (MDA). Estas enzimas, como se ha comentado, forman parte de una serie de reacciones por las que se eliminan las EROs, como las que surgen de la metabolización de alcohol. Por tanto, su actividad está relacionada con el posible desbalance oxidativo que aparece tras el BD.

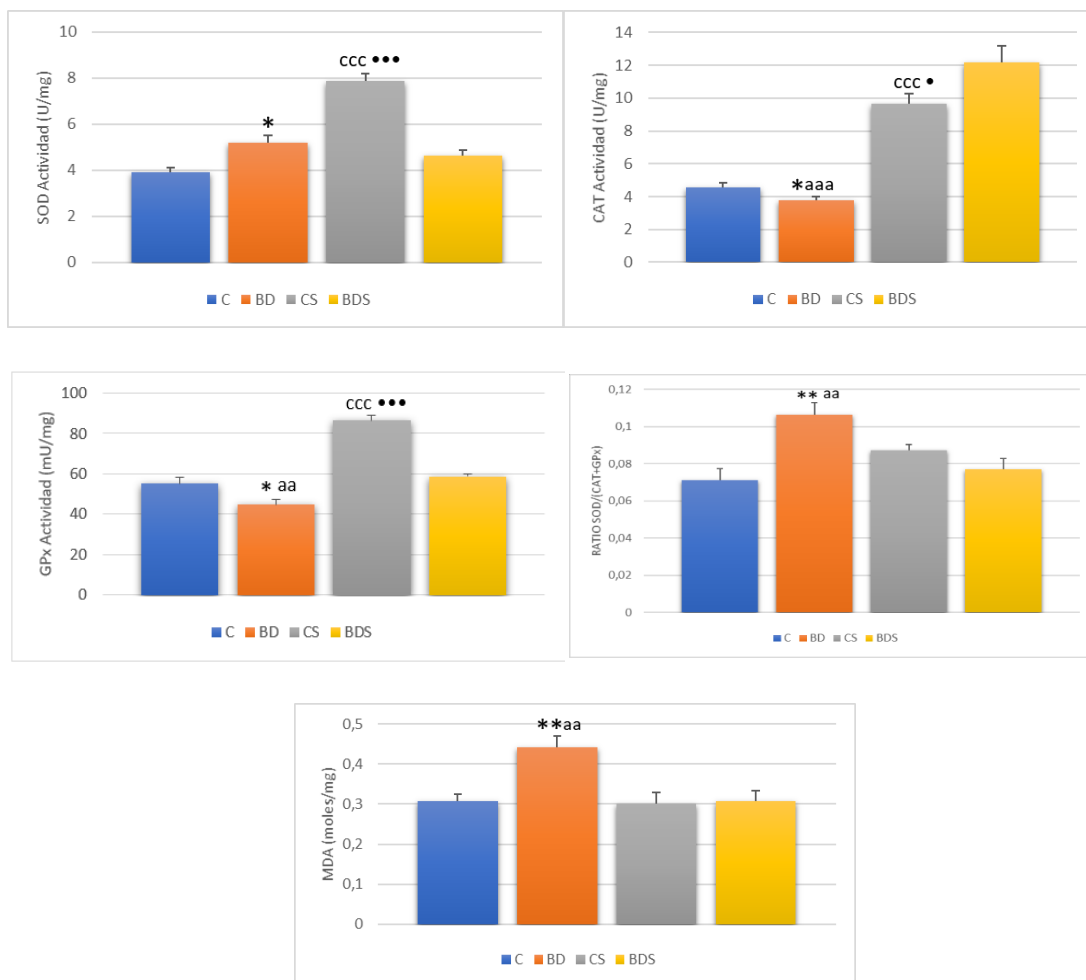


Figura 5: Actividad de las enzimas antioxidantes en el páncreas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Ratio de la actividad SOD/(CAT+GPx). Oxidación lipídica en páncreas en relación con el malondialdehído (MDA). Resultados expresados como la media \pm SEM de 5 animales de cada grupo. Grupos: C: control, BD: binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio. Significación estadística: C vs BD: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; C vs CS: ccc $p < 0,001$; BD vs BDS: aa $p < 0,01$, aaa $p < 0,001$; CS vs BDS: • $p < 0,05$, ••• $p < 0,001$.

El BD afectó a la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas, provocando un aumento de la SOD, y una disminución de la CAT y GPx. Estas últimas son las responsables de eliminar el H_2O_2 generada por la SOD, por ello la ratio SOD/(CAT+GPx) está aumentada. Este hecho implica que dichas enzimas son insuficientes para eliminar el H_2O_2 generada por la SOD, y por tanto, que las EROs se están acumulando. De hecho, al valorar la oxidación de lípidos en el páncreas a través de los niveles de MDA, se observa un aumento muy significativo indicando que existe peroxidación lipídica. Hay que recordar, que estas tres enzimas en páncreas están en menor proporción que en otros tejidos, siendo así el páncreas muy susceptible al daño provocado por las EROs. En comparación con el hígado, el páncreas presenta la mitad de SOD y menos de un 5% de GPx y CAT (Grankvist et al. 1981; Lenzen et al. 1996). De hecho, se sabe

que el consumo agudo de alcohol altera el estado oxidativo celular, siendo éste un mecanismo principal en la génesis del daño pancreático (Wilson et al. 2003).

Tras la suplementación de Se, las ratas expuestas a BD presentan una menor actividad SOD, y un aumento de las actividades de CAT y GPx, especialmente de la primera. Hecho curioso pues el Se es cofactor necesario para el sitio catalítico de GPx. El aumento de ambas enzimas hace que la ratio SOD/(CAT+GPx) tenga valores similares a los controles, transformando el H₂O₂ en agua y disminuyendo por tanto las EROS. Los valores de MDA confirman con su disminución que la suplementación ha evitado el EO en páncreas. El mayor incremento de la actividad CAT encontrado, puede estar relacionado, con que dicha enzima, en el páncreas, es la que principalmente actúa para eliminar el H₂O₂. En general, su actividad en situaciones de EO pancreático suele estar muy aumentada. Por otro lado, se ha demostrado que un aumento de las tres enzimas y su acción combinada es más eficaz en la protección de las células β del páncreas frente al EO, especialmente de CAT (Tiedge et al., 1998).

Curiosamente las ratas CS presentan un aumento muy significativo de la actividad de todas las enzimas antioxidantes estudiadas en el páncreas. Sin embargo, la ratio SOD/(CAT+GPx) presenta valores similares a las ratas controles indicando que la actividad de dichas hormonas está totalmente compensada en la lucha frente a las EROs. De hecho, los niveles de MDA no se afectaron.

La figura 6 muestra la expresión pancreática de la GPx1 en los cuatro grupos experimentales, que concuerda con los resultados obtenidos de su actividad, disminuida tras el consumo de alcohol y aumentada tras la suplementación de Se, especialmente en el grupo CS. La GPx1 es una enzima selenodependiente, por ello está aumentada en los grupos CS y BDS. La menor expresión de GPx1 presente en el grupo BD puede deberse a una depleción de los niveles de Se en páncreas, de hecho se sabe que el BD durante la adolescencia específicamente disminuye significativamente los depósitos de Se en suero y en la mayoría de los tejidos analizados (Ojeda et al., 2015; Sobrino et al., 2019; Ojeda et al., 2021).

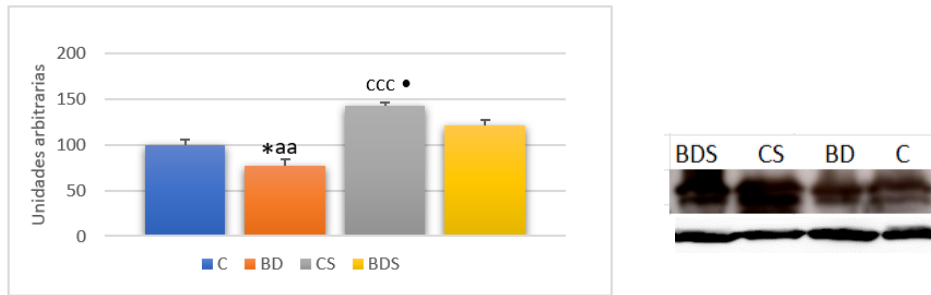


Figura 6: Expresión de la enzima glutatión peroxidasa 1 (GPx1) y expresión de anticuerpo β -actina. Resultados expresados como la media \pm SEM de 5 animales de cada grupo. Grupos: C: control, BD: binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio. Significación estadística: C vs BD: * $p < 0,05$; C vs CS: ccc $p < 0,001$; BD vs BDS: aa $p < 0,01$; CS vs BDS: • $p < 0,05$.

Es llamativo el hecho de que en las ratas expuestas a BD suplementadas con Se la expresión y actividad GPx esté tan poco incrementada. Se ha comprobado que otras selenoenzimas como TrxR, tioredoxina y peroxirredoxina presentan mayor actividad en el páncreas endocrino que la GPx. Por ello, es posible que el Se suplementado se derive hacia la expresión de dichas enzimas en vez de a la GPx1 frente a la lucha contra el EO generado por el BD en el páncreas (Kalinina et al., 2008; Stancill y Corbett, 2021). Sería interesante tenerlas en cuenta para estudios posteriores.

Las células β del páncreas son especialmente sensibles al EO, siendo una de las causas de su mal funcionamiento (Eguchi et al. 2021). Para ver si este EO pancreático afecta a dichas células, se valoró la funcionalidad del páncreas endocrino, midiendo la concentración de insulina y glucosa en suero para así calcular el índice HOMA IR, además de la medida de funcionalidad de las células β (figura 7).

A nivel endocrino, el BD provoca un aumento significativo de la secreción de insulina, sin afectar a la funcionalidad de las células β . Sin embargo, los niveles de glucosa permanecen elevados en sangre, lo que denota que dicha hormona no está trabajando de manera correcta, probablemente porque existe RI, más que un problema en su secreción. De hecho, los altos valores del HOMA IR confirman esta idea, y coincide con la pérdida de peso encontrada en los animales expuestos al BD donde la principal hormona anabolizante (insulina) no está actuando correctamente. Existen estudios que confirman que el BD altera la producción de insulina causando RI, inhibiendo el transporte de glucosa y disminuyendo la exposición a la misma, haciendo que sea necesario un aumento en la secreción de insulina (Shelmet et al. 1988). La suplementación con Se a dichos animales disminuyó ligeramente esta hormona, aunque no de

manera significativa. Sin embargo, sigue existiendo hiperglucemia y no varía el índice HOMA IR.

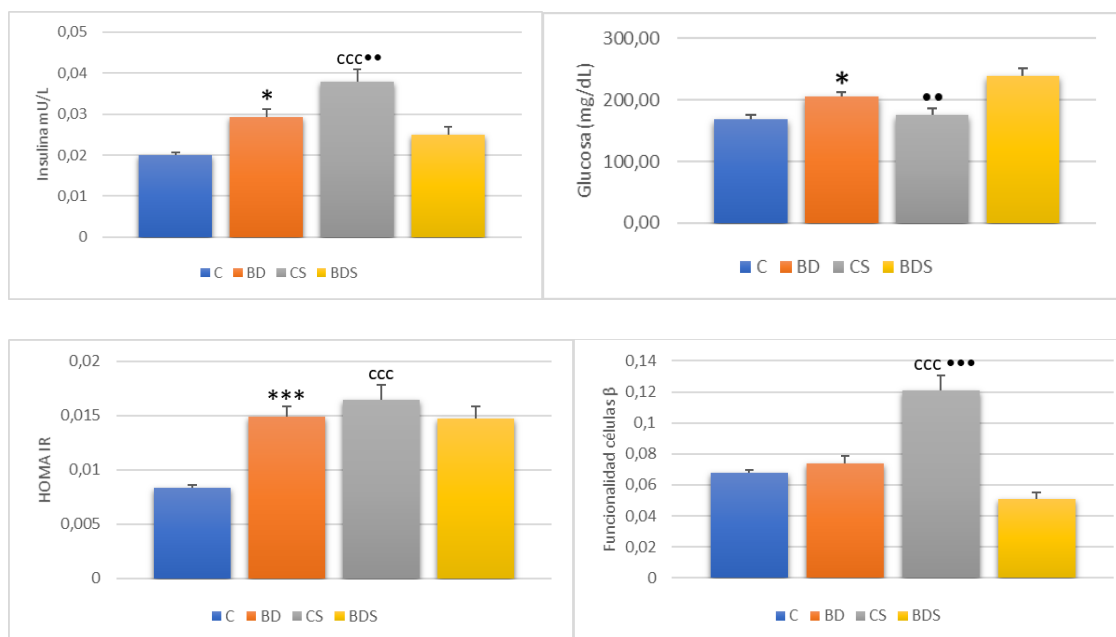


Figura 7: Concentración de insulina ($\mu\text{U/mL}$), Glucosa (mg/dL), índice HOMA IR y Funcionalidad células β . Resultados expresados como la media \pm SEM de 5 animales de cada grupo. Grupos: C: control, BD: binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio. Significación estadística: C vs BD: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; C vs CS: ccc $p < 0,001$; CS vs BDS: ●● $p < 0,01$, ●●● $p < 0,001$.

La suplementación de Se usada en ratas controles provocó una hiperestimulación de las células β del páncreas que sintetizaron gran cantidad de insulina en sangre. Aunque el valor numérico del HOMA IR es elevado en estos animales, no existe hiperglucemia, por lo que la hormona está ejerciendo su acción correctamente. Además, se ha visto que la suplementación con Se no está relacionado con el desarrollo de DM2 (Steinbrenner 2013; Cardoso et al. 2021). En dichos animales, existe una sobreexpresión de GPx y CAT (figuras 4 y 5), estas pueden producir una desregulación del gen PDX1 y de la proteína UCP2, así como la activación de Akt, favoreciendo la supervivencia de las células β y la secreción de insulina (Mcclung et al. 2004; Li et al. 2006; Wang et al. 2008).

Por otro lado, se midió la expresión de la proteína SIRT-1 en el páncreas (figura 8). En este tejido, SIRT-1 está involucrada en la prevención de procesos inflamatorios y oxidativos, siendo esencial en la formación y mantenimiento de las células β pancreáticas (Singh y Ubaid, 2020; R. H. Wang et al., 2013). SIRT-1 aumenta la masa celular del páncreas endocrino (Prud'Homme et al. 2014) y participa en la secreción de insulina regulando UPC2 (Bordone et al. 2006). En las ratas sometidas a BD existe un aumento de expresión de SIRT-1 de manera significativa, esta

acción podría estar previniendo los efectos del EO sobre dichas células y manteniendo su secreción de insulina. La suplementación con Se disminuyó la expresión de esta proteína.

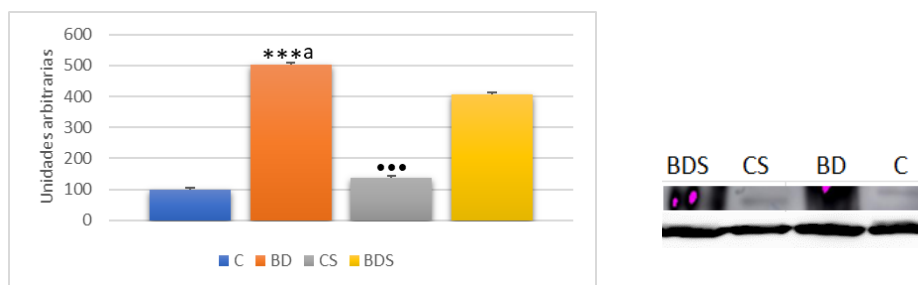


Figura 8: Expresión proteína sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD⁺ (SIRT-1) y anticuerpo β -actina. Resultados expresados como la media \pm SEM de 5 animales de cada grupo. Grupos: C: control, BD: binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio. Significación estadística: C vs BD: *** $p < 0,001$; BD vs BDS: a $p < 0,05$; CS vs BDS: ●●● $p < 0,001$.

La adiposina (figura 9), es una adipoquina involucrada en la homeostasis del tejido adiposo, controla la generación del componente C3a del complemento y participa en la secreción de insulina en las células β pancreáticas. La adiposina no es un simple secretagogo de insulina, sino que evita la desdiferenciación y muerte celular de los islotes pancreáticos al inhibir a la fosfatasa DUSP26, consiguiendo mejorar la glucemia y proteger a las células β (Gómez-Banoy et al. 2019). Tras el consumo de alcohol, en el suero de estos animales se obtuvieron resultados elevados de adiposina, que concuerdan con los altos valores de insulina encontrados y la no disminución de las células β a pesar del EO que aparece en el páncreas. Además, las ratas BD presentan elevados niveles de glucemia, pudiendo ser el mecanismo por el que la adiposina esté elevada, pues una de sus funciones es la estimulación de las células β (Wang et al. 2019). Así tras el BD, los niveles de adiposina séricos están elevados y la expresión pancreática de SIRT-1, ambas proteínas favorecen la protección de las células β y la síntesis de insulina. Estudios recientes confirman que el SIRT1 está involucrado en funciones metabólicas y mecanismos enzimáticos en el tejido adiposo, participando en la regulación de la expresión de proteínas como adiponectina, por lo que es posible que guarde relación con la adiposina (Abdeselem et al. 2016; Majeed et al. 2021). El hecho de que ambas estén aumentadas en las ratas BD puede sugerir que estén estimuladas entre sí, podría ser una interesante línea de investigación para futuros estudios.

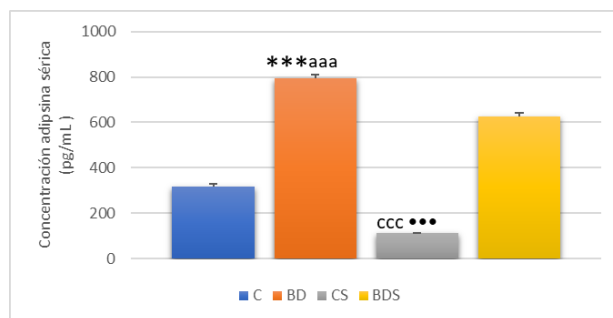


Figura 9: Concentración de adiponina sérica en suero (pg/mL). Resultados expresados como la media \pm SEM de 5 animales de cada grupo. Grupos: C: control, BD: binge drinking, CS: control selenio, BDS: binge drinking selenio. Significación estadística: C vs BD: *** $p < 0,001$; C vs CS: ccc $p < 0,001$; BD vs BDS: aaa $p < 0,001$; CS vs BDS: *** $p < 0,001$.

Concordando con lo anteriormente discutido, la suplementación con Se a las ratas BD disminuyó la expresión de adiponina, así como la de SIRT-1, además de provocar una disminución significativa de la peroxidación lipídica en páncreas, que podría estar aminorando la necesidad de mayores niveles de SIRT-1 y adiponina. Sin embargo, la secreción de insulina apenas se alteró y sigue apareciendo hiperglucemia.

Las ratas del grupo CS presentaron unos valores de adiponina significativamente menores que el grupo control. Sin embargo, presentaron la mayor funcionalidad de células β , demostrando que el Se por sí mismo favorece la integridad de las células β del páncreas a través de la acción de diversas selenoproteínas, y la secreción de insulina, sin afectar a los niveles de glucosa en sangre.

Queda así demostrado que la exposición al BD durante la adolescencia genera EO en el páncreas estando afectadas las principales enzimas antioxidantes. En el páncreas endocrino, la funcionalidad se mantiene a pesar del EO, posiblemente por la protección celular que ofrece la adiponina y la actuación de SIRT-1, que estimula la producción de insulina. El incremento del HOMA IR que se relaciona con la aparición de RI, no depende de la síntesis de insulina por las células β , sino de los receptores de insulina IRS-1 de los tejidos periféricos cuya expresión esta disminuida tras el BD, por ejemplo, en hígado (Nogales et al., 2021).

Por otro lado, según los resultados obtenidos, la suplementación con Se utilizada no mejora el perfil insulínico con respecto al BD. El Se disminuye el EO pancreático gracias al aumento de la actividad GPx y CAT, y genera un menor aumento de las proteínas protectoras adiponina y SIRT-1, sin embargo, las células β están igualmente funcionales y no presentan dificultades en la secreción de insulina, aunque no mejora los niveles de glucosa en sangre. Aunque los efectos de la suplementación de Se sobre la secreción pancreática de insulina no parecen beneficiosos,

si lo son respecto a su acción, pues en estudios anteriores en dichos animales se demostró que esta suplementación mejora la señalización de insulina en los tejidos diana y el perfil hepático (Ojeda et al. 2015), renal (Sobrino et al. 2019) y cardiovascular (Ojeda et al. 2021).

5 CONCLUSIONES

El consumo de alcohol en forma de binge drinking durante la adolescencia genera EO en el páncreas no vinculante con la secreción de insulina.

Este consumo genera RI relacionada con la acción de esta hormona en sus tejidos diana, pero no con su secreción.

El BD durante la adolescencia provoca un incremento en la expresión de SIRT-1 pancreático y de los niveles de adiposina en sangre, que podrían estar vinculados, con efectos protectores sobre las células β .

La suplementación de Se utilizada en ratas adolescentes expuestas a BD es un potente antioxidante pancreático que aumenta la actividad de CAT y GPx, y seguramente de otras selenoproteínas.

Dicha suplementación disminuye la expresión de SIRT-1 y los niveles de adiposina en sangre, sin embargo, la secreción de insulina apenas varía. Parece que el efecto del EO sobre las células β puede ser contrarrestado por el SIRT-1 y/o la adiposina. Esta nueva relación entre adiposina y SIRT-1 pancreático podría considerarse el mayor hallazgo no esperado de este TFG.

Aunque los efectos de la suplementación de Se sobre la secreción pancreática de insulina no parecen beneficiosos, si lo son respecto a su acción, pues mejora la señalización de insulina en sus tejidos diana y el perfil hepático, cardiovascular y renal de los adolescentes expuestos a BD.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hakeem EA, Abdel-Hamid HA, Abdel Hafez SMN. The possible protective effect of Nano-Selenium on the endocrine and exocrine pancreatic functions in a rat model of acute pancreatitis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020 Jul 1;60.
- Abdesselem H, Madani A, Hani A, Al-Noubi M, Goswami N, ben Hamidane H, et al. SIRT1 limits adipocyte hyperplasia through c-Myc inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Jan 29;291(5):2119–35.
- Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-sundberg M, French SW. Role of Cytochrome P4502E1-Dependent Formation of Hydroxyethyl Free Radical in the Development of Liver Damage in Rats Intragastrically Fed With Ethanol radicals are formed during ethanol oxidation and that bind to microsomal proteins 13 and that these adducts have immunologic properties leading to the production. 1996.
- Apte M v, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, Mccaughan GW, Korsten MA, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Vol. 43, *Gut*. 1998.
- Beers RF, Sizer IW. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR MEASURING THE BREAKDOWN OF HYDROGEN PEROXIDE BY CATALASE*. 1952.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biology*. 2006;4(2):210–20.
- Boreham B, Ammori BJ. A prospective evaluation of pancreatic exocrine function in patients with acute pancreatitis: Correlation with extent of necrosis and pancreatic endocrine insufficiency. *Pancreatology*. 2003;3(4):303–8.
- Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcified Tissue International*. 2009 Jun;84(6):474–84.
- Cardoso BR, Braat S, Graham RM. Selenium Status Is Associated With Insulin Resistance Markers in Adults: Findings From the 2013 to 2018 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Frontiers in Nutrition*. 2021 Jun 28;8.
- Dong Z, Shang H, Chen YQ, Pan LL, Bhatia M, Sun J. Sulforaphane Protects Pancreatic Acinar Cell Injury by Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3 Inflammatory Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016.
- Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. Vol. 488. 1990.
- Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–18.
- Fridovich I. Cytochrome C. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. 1st ed. 1985.

- Gómez-Banoy N, Guseh JS, Li G, Rubio-Navarro A, Chen T, Poirier BA, et al. Adipsin preserves beta cells in diabetic mice and associates with protection from type 2 diabetes in humans. *Nature Medicine*. 2019 Nov 1;25(11):1739–47.
- Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Vol. 199, Biochem. J.* 1981.
- Harmon JS, Bogdani M, Parazzoli SD, Mak SSM, Oseid EA, Berghmans M, et al. β -cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db Mice. *Endocrinology*. 2009 Nov;150(11):4855–62.
- Hernández Rodríguez S, Gutiérrez Salinas J, García Ortiz L, Mondragón Terán P, Ramírez García S, Núñez Ramos NR. *296 Medicina Interna de México*. 2014.
- Kalinina E v., Chernov NN, Saprin AN. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(13):1493–510.
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Vol. 94, Physiological Reviews. American Physiological Society; 2014.* p. 739–77.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
- Lawrence RA, Burk RF. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN SELENIUM-DEFICIENT RAT LIVER'. *Vol. 71.* 1976.
- Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin signaling in the pancreatic β -cell. *Vol. 28, Annual Review of Nutrition*. 2008. p. 233–51.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Brief Communication LOW ANTIOXIDANT ENZYME GENE EXPRESSION IN PANCREATIC ISLETS COMPARED WITH VARIOUS OTHER MOUSE TISSUES. *Vol. 20, Biology & Medicine*. 1996.
- Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: Reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic β -cells. *Diabetes*. 2006;55(6):1592–604.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT*. 1951.
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and Oxidative Liver Injury by Alcohol.
- Majeed Y, Halabi N, Madani AY, Engelke R, Bhagwat AM, Abdesselem H, et al. SIRT1 promotes lipid metabolism and mitochondrial biogenesis in adipocytes and coordinates adipogenesis by targeting key enzymatic pathways. *Scientific Reports*. 2021 Dec 1;11(1).
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, et al. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase [Internet]. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0308096101
- Millán Adame E. Biomarcadores de estatus de selenio en paciente crítico con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica : seguimiento durante 7 días de estancia en la unidad de cuidados intensivos. Editorial de la Universidad de Granada; 2012.

- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2010 Nov 3;12(5):483–95.
- Monedero Prieto MJ. Efectos del selenio sobre las alteraciones hepáticas inducidas por el alcohol y malnutrición proteica. Servicio de Publicaciones, Universidad de La Laguna; 2014.
- Muñoz Del Valle P. Implicación del Selenio en la programación del Síndrome Metabólico. 2016.
- Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. Vol. 346, *Biochem. J*. 2000.
- Newsholme P, Keane KN, Carlessi R, Cruzat V. Oxidative stress pathways in pancreatic-cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. REVIEW *Metabolism, Oxidative Stress and Cell Signaling Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2019;317:420–33. Available from: www.ajpcell.org
- Nogales F, Cebadero O, Romero-Herrera I, Rua RM, Carreras O, Ojeda ML. Selenite supplementation modulates the hepatic metabolic sensors AMPK and SIRT1 in binge drinking exposed adolescent rats by avoiding oxidative stress. *Food and Function*. 2021 Apr 7;12(7):3022–32.
- Ojeda ML, Carreras O, Sobrino P, Murillo ML, Nogales F. Biological implications of selenium in adolescent rats exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017 Aug 15;329:165–72.
- Ojeda ML, Nogales F, Gallego-López M del C, Carreras O. Binge drinking during the adolescence period causes oxidative damage-induced cardiometabolic disorders: A possible ameliorative approach with selenium supplementation. *Life Sciences*. 2022 Jul;301:120618.
- Ojeda ML, Rua RM, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Binge drinking during adolescence disrupts se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2015 May 1;39(5):818–26.
- Ojeda ML, Sobrino P, Rua RM, Gallego-López M, Nogales F, Carreras O. Selenium, a dietary-antioxidant with cardioprotective effects, prevents the impairments in heart rate and systolic blood pressure in adolescent rats exposed to binge drinking treatment. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2021;47(6):680–93.
- Park SE, Park CY, Sweeney G. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. Vol. 52, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 180–90.
- Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of insulin secretion and insulin resistance in human. Vol. 45, *Diabetes and Metabolism Journal*. Korean Diabetes Association; 2021. p. 641–54.
- Peng X, Giménez-Cassina A, Petrus P, Conrad M, Rydén M, Arnér ESJ. Thioredoxin reductase 1 suppresses adipocyte differentiation and insulin responsiveness. *Scientific Reports*. 2016 Jun 27;6.
- Prud'Homme GJ, Glinka Y, Udovyk O, Hasilo C, Paraskevas S, Wang Q. GABA protects pancreatic beta cells against apoptosis by increasing SIRT1 expression and activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014 Sep 26;452(3):649–54.

- Rua RM, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Romero-Gómez M, Funuyet J, et al. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol. *Life Sciences*. 2014 Jan 17;94(2):158–63.
- Rundöf AK, Arnér ESJ. Regulation of the Mammalian Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 in Relation to Cellular Phenotype, Growth, and Signaling Events. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004;6(1):41–52.
- Shelmet JJ, Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE, Boden G. Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1988;81(4).
- Singh V, Ubaid S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. Vol. 43, *Inflammation*. Springer; 2020. p. 1589–98.
- Sobrino Calero P. Selenio y Selenoproteínas frente al daño cardiovascular provocado por el “Binge Drinking.” 2018.
- Sobrino P, Ojeda ML, Nogales F, 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(10):1495–506.
- Stancill JS, Broniowska KA, Oleson BJ, Naatz A, Corbett JA. Pancreatic β -cells detoxify H₂O₂ through the peroxiredoxin/ thioredoxin antioxidant system. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Mar 29;294(13):4843–53.
- Stancill JS, Corbett JA. The Role of Thioredoxin/Peroxiredoxin in the β -Cell Defense Against Oxidative Damage. Vol. 12, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
- Steinbrenner H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. Vol. 65, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2013. p. 1538–47.
- Steinbrenner H, Duntas LH, Rayman MP. The role of selenium in type-2 diabetes mellitus and its metabolic comorbidities. *Redox Biology*. 2022 Apr;50:102236.
- Sun J, Fu J, Zhong Y, Li L, Chen C, Wang X, et al. NRF2 mitigates acute alcohol-induced hepatic and pancreatic injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2018 Nov 1;121:495–503.
- Tang C, Li S, Zhang K, Li J, Han Y, Zhan T, et al. Selenium deficiency-induced redox imbalance leads to metabolic reprogramming and inflammation in the liver. *Redox Biology*. 2020 Sep 1;36.
- Tenner S, Freedman SD. Chronic Ethanol Administration Selectively Impairs Endocytosis in the Rat Exocrine Pancreas. *Pancreas*. 1998 Aug;17(2):127–33.
- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Complementary Action of Antioxidant Enzymes in the Protection of Bioengineered Insulin-Producing RINm5F Cells Against the Toxicity of Reactive Oxygen Species [Internet]. Vol. 47, 1578 *DIABETES*. 1998. Available from: <http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/47/10/1578/362802/9753295.pdf>
- Valencia Martín JL, Galán I, Segura García L, Camaralles Guillem F, Suárez Cardona M, Brime Beteta B, et al. EPISODIOS DE CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL “BINGE DRINKING”:

RETOS EN SU DEFINICIÓN E IMPACTO EN SALUD COLABORACIÓN ESPECIAL [Internet].
Vol. 94, Rev Esp Salud Pública. 2020. Available from: www.mscbs.es/resp

Wang JS, Lee WJ, Lee I te, Lin SY, Lee WL, Liang KW, et al. Association between serum adipsin levels and insulin resistance in subjects with various degrees of glucose intolerance. *J Endocr Soc.* 2019;3(2):403–10.

Wang RH, Xu X, Kim HS, Xiao Z, Deng CX. SIRT1 deacetylates FOXA2 and is critical for Pdx1 transcription and β -cell formation. *International Journal of Biological Sciences.* 2013 Sep 21;9(9):934–46.

Wang XD, Vatamaniuk MZ, Wang SK, Roneker CA, Simmons RA, Lei XG. Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by overproduction of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. *Diabetologia.* 2008 Aug;51(8):1515–24.

White AM, Tapert S, Shukla SD. Binge Drinking: Predictors, Patterns, and Consequences [Internet]. 2018. Available from: <http://monitoringthefuture.org/pubs/occpapers/mtf-occ83.pdf>.

Wilson DF, Matschinsky FM. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Medical Hypotheses.* 2020 Jul 1;140.

Wilson JS, MD, M.V., Apte P. Role_of_Alcohol_Metabolism_in_Alcoholic.7. *Pancreas.* 2003;27(4):311–5.