

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**“ESTUDIO DE DOS MODELOS DE ALCOHOLIZACIÓN EN RATAS
ADOLESCENTES SOBRE EL SELENIO Y LOS SISTEMAS DE DEFENSA
ANTIOXIDANTE. PROYECCIÓN A PACIENTES ALCOHÓLICOS
CRÓNICOS”**

TESIS DOCTORAL

RUI MANUEL GOMES DE FIGUEIREDO RUA

Directores:

**Olimpia Carreras Sánchez
María Luisa Ojeda Murillo
Fátima Nogales Bueno**

Sevilla, 2013



Dña. Olimpia Carreras Sánchez, Catedrática de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y Dña. Fátima Nogales Bueno, Profesora Contratada Doctor de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN: Que la Tesis Doctoral titulada: “ESTUDIO DE DOS MODELOS DE ALCOHOLIZACIÓN EN RATAS ADOLESCENTES SOBRE EL SELENIO Y LOS SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE. PROYECCIÓN A PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS” presentada por el Licenciado Rui Manuel Gomes de Figueiredo Rua, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste donde proceda, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente informe, en Sevilla con fecha 11 de Septiembre de 2013.

Fdo.: Olimpia Carreras Sánchez Fdo.: M^a Luisa Ojeda Murillo Fdo.: Fátima Nogales Bueno

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi afectuoso agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido para la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis tutoras:

A la Dra. Olimpia Carreras Sánchez, responsable de nuestro grupo, por sus consejos experimentados y confianza depositada en mí desde el primer momento. Gracias por todo lo que he aprendido y continúo aprendiendo.

A la Dra. María Luisa Ojeda Murillo por sus valiosas observaciones. Sus útiles puntualizaciones en la realización de esta Tesis han sido cruciales para el feliz desenlace de la misma.

A la Dra. Fátima Nogales Bueno por su inestimable ayuda y paciencia, y por las muchas horas que hemos compartido juntos. Sin su apoyo, su dedicación y sus conocimientos no hubiera sido posible llevar a buen puerto esta investigación.

Quiero agradecer también:

Al grupo de investigación del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, bajo la dirección de la Dra. María Inmaculada López Aliaga, por su prestigiosa colaboración, cálida acogida y recursos técnicos proporcionados. Mi gratitud especial al Dr. Javier Díaz Castro por su disponibilidad y mi admiración por su competencia demostrada en el laboratorio.

A los Departamentos de Medicina Interna y Digestiva de los Hospitales Universitarios Virgen de Valme y Virgen Macarena que ofrecieron las muestras sanguíneas y los datos clínicos de forma desinteresada.

A todos los miembros de nuestro Departamento por el buen trato recibido.

Por último, pero no menos importante, a mis padres y a mi hermano, mi eterna gratitud por su apoyo sin reservas.

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.”*

Fernando Pessoa

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
1. Alcohol: generalidades	3
2. Alcohol y balance oxidativo	4
2.1 Estrés oxidativo	4
2.1.1. Generalidades	4
2.1.2. Radicales libres y formación de especies reactivas de oxígeno	4
2.1.3. Daños celulares provocados por las especies reactivas de oxígeno (ERO) ..	7
2.1.3.1. Reacción de radicales libres con los lípidos	8
2.1.3.2. Reacción de radicales libres con las proteínas	10
2.1.3.3. Reacción de radicales libres con el DNA	10
2.1.4. Alcohol y estrés oxidativo	11
2.1.4.1. Mecanismos involucrados en el daño oxidativo provocado por el alcohol	14
2.1.4.1.1. Efectos metabólicos del exceso de NADH	14
2.1.4.1.2. Efectos ocasionados por el acetaldehído	15
2.1.4.1.3. Efectos generados por las especies reactivas de oxígeno	17
2.2. Sistemas de defensa antioxidante	18
2.2.1. Generalidades	18
2.2.2. Alcohol y sistemas de defensa antioxidante	23
2.3. Selenio y selenoproteínas	23
2.3.1. Generalidades	23
2.3.2. Selenoproteínas	25
2.3.2.1. Glutatión peroxidasa 1	25
2.3.2.2. Glutatión peroxidasa 4	26
2.3.2.3. Selenoproteína P	27
2.3.3. Alcohol y selenio	28
3. Alcohol y daño hepático	30
4. “Binge drinking”	37
4.1. Generalidades	37
4.2. Modelos de “binge drinking”	40

4.2.1. Modelos animales de “binge drinking” administrado por vía parental	41
4.2.1.1. Inyección intraperitoneal	42
4.2.1.2. Inyección intravenosa	42
4.2.1.3. Infusión intragástrica	42
4.2.2. Modelos animales de “binge drinking” administrado por vía oral	43
4.2.2.1. Gavage	43
4.2.2.2. Consumo nocturno	43
4.2.2.3. Modelo de 2 botellas (acceso intermitente de etanol)	44
4.3. “Binge drinking” y balance oxidativo	44
4.4. “Binge drinking” y daño hepático	46
5. Alcoholismo crónico	50
5.1. Generalidades	50
5.2. Alcoholismo crónico y balance oxidativo	54
5.3. Alcoholismo crónico y daño hepático	55
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Diseño experimental – animales	63
1.1. Animales y condiciones experimentales	64
1.1.1. Dieta utilizada	64
1.1.2. Métodos de alcoholización	64
1.1.3. Estudio nutricional	65
1.1.4. Estudio macroscópico	65
1.2. Toma y procesamiento de las muestras de ratas	66
1.2.1. Obtención y tratamiento de las muestras de sangre	66
1.2.2. Obtención y tratamiento de las muestras de hígado	66
1.2.3. Obtención y tratamiento de las muestras de orina	66
1.2.4. Obtención y tratamiento de las muestras de heces	66
1.2.5. Estudio de índices biológicos	67
1.2.6. Homogeneizaciones hepáticas	67
1.2.6.1. Homogeneización hepática para la determinación de la actividad	

de las enzimas antioxidantes	67
1.2.6.2. Homogeneización hepática para la determinación de la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas	68
1.2.6.3. Homogeneización hepática para la determinación de proteínas por inmunodetección “Western Blotting”	68
2. Población y diseño experimental – humanos	69
2.1. Toma de las muestras de sangre	71
2.2. Determinación de la concentración total de proteínas	71
2.3. Determinación de selenio	71
2.4. Determinaciones enzimáticas y de biomoléculas	71
3. Determinaciones analíticas	72
3.1. Determinación de la concentración total de proteínas	72
3.2. Determinación de alcohol en orina de ratas	73
3.3. Determinación de selenio en suero, hígado, heces y orina	74
3.4. Determinaciones enzimáticas y de biomoléculas	77
3.4.1. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa	77
3.4.2. Determinación de la actividad glutatión reductasa	78
3.4.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa	80
3.4.4. Determinación de la actividad catalasa	82
3.4.5. Determinación de la peroxidación lipídica	84
3.4.6. Determinación de la oxidación de proteínas	85
3.4.7. Determinación del daño en el DNA	87
3.5. Análisis de expresión de las proteínas GPx-1, GPx-4 y selenoproteína P ..	90
3.5.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS: SDS-PAGE	91
3.5.2. Transferencia de proteínas	95
3.5.3. Inmunodetección	96
3.5.4. Revelado	97
3.6. Parámetros bioquímicos de las ratas	98
4. Tratamiento estadístico	98
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
1. Animales	103
1.1. Control nutricional y homeostasis del selenio	103

1.1.1. Estudio del peso corporal	103
1.1.2. Estudio de la ingesta sólida	104
1.1.3. Estudio de la ingesta líquida	105
1.1.4. Estudio de la ingesta calórica	106
1.1.5. Estudio de la homeostasis del selenio	107
1.2. Determinación de alcohol en orina	108
1.3. Estudios en suero y sangre	109
1.3.1. Parámetros bioquímicos	109
1.3.2. Estudio del estrés oxidativo en suero	112
1.4. Estudio del estrés oxidativo en el hígado	119
1.4.1. Análisis macromorfológico del hígado	120
1.4.2. Balance antioxidante y marcadores del estrés oxidativo	121
1.4.3. Expresión de las selenoproteínas hepáticas	130
2. Humanos	134
2.1. Estudios en suero y en sangre	134
2.1.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos	134
2.1.2. Estrés oxidativo	136
 V. CONCLUSIONES	 147
 VI. BIBLIOGRAFÍA	 151

I-ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

I- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. ALCOHOL: GENERALIDADES

El consumo excesivo de alcohol y sus consecuencias sobre el organismo constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con la OMS, la ingesta excesiva de alcohol es una de las principales causas de mortalidad, estando asociada a más de 60 tipos de enfermedades. Este consumo presenta una etiología compleja, pudiendo ser el resultado de una combinación de factores genéticos, físicos, sociales y ambientales. En las últimas décadas ha ganado popularidad entre los adolescentes un nuevo fenómeno de consumo de alcohol, con tendencia a consolidarse, el llamado “botellón”, y sus consecuencias a nivel clínico necesitan más que nunca ser estudiadas en profundidad.

El abuso del consumo de alcohol afecta, prácticamente, a todos los órganos y, de manera especial, al hígado. Algunos de sus efectos son atribuidos a su propia acción directa o a sus metabolitos, mientras que otros parecen ser el resultado de las deficiencias nutricionales que aparecen, frecuentemente, en los alcohólicos. Así, el alcohol es una hepatotoxina relacionada con tres hepatopatías distintas: el hígado graso, la hepatitis alcohólica y la cirrosis alcohólica, la cual, eventualmente, puede progresar hasta el carcinoma hepatocelular.

El estrés oxidativo inducido por el alcohol desempeña un papel primordial en el daño hepático provocado por el alcohol. El metabolismo oxidativo del etanol induce la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que afecta a los sistemas de defensa antioxidante, provocando un desequilibrio en las células a favor de la oxidación. Tal hecho puede desencadenar una serie de daños en las biomoléculas, como los lípidos, las proteínas y el DNA y, eventualmente, originar la muerte de las células hepáticas. Además, el estrés oxidativo estimula la activación del sistema inmune con liberación de citoquinas con actividad proinflamatoria y fibrogénica, por parte de las células de Kupffer y de los hepatocitos, que favorecen el daño hepático.

Los datos más convincentes sobre el daño hepático provocado por el estrés oxidativo provienen de estudios con modelos animales, cuyo perfeccionamiento en el intento de mimetizar los comportamientos humanos y sus consecuencias debe ser una diana constante de los investigadores.

2. ALCOHOL Y BALANCE OXIDATIVO

2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1.1. Generalidades

El estrés oxidativo es una situación de desequilibrio entre la formación y la eliminación de moléculas prooxidantes, conocidas como radicales libres, en el organismo. Este estrés oxidativo aparece como consecuencia de una disminución de los antioxidantes endógenos o bien por un aumento en la producción de radicales libres. Aunque el estrés oxidativo ha sido, tradicionalmente, considerado un proceso estático de daño celular resultante del metabolismo aerobio, su repercusión clínica ha sido reconocida de forma gradual, siendo un componente fundamental de cualquier proceso patológico (Pérez de la Cruz y cols., 2008). Debido a este fenómeno, se inician una serie de reacciones sobre los distintos componentes del organismo (lípidos, proteínas, DNA) que promueven la aparición de graves desórdenes fisiológicos y el desarrollo de determinadas enfermedades.

Así, el estrés oxidativo ha sido asociado al cáncer, a enfermedades cardíacas y a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, y además está involucrado en el proceso de envejecimiento (Zachara y cols., 2006; Guerra-Araiza y cols., 2013)

2.1.2. Radicales libres y formación de especies reactivas de oxígeno

El término radical libre es con frecuencia utilizado para designar un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados, lo cual lo hace muy inestable y reactivo (Valko y cols., 2004). Los radicales libres se forman, esencialmente, en el interior de las

células, en el citoplasma o en las mitocondrias, y en la membrana celular (Bianchi y Antunes, 1999). Presentan, de manera general, una gran inestabilidad, tienen una vida media corta y reaccionan de forma rápida con diversos compuestos, pudiendo oxidar biomoléculas y provocar daño molecular y celular (Mairena, 1994; Jordão-Júnior y cols., 1998).

Dentro de los radicales libres, es significativa la acción del grupo de radicales que contienen oxígeno, siendo estos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Wu y Cederbaum, 2003) (Figura 1). Esta categoría incluye, no sólo, los radicales libres de oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\bullet), sino también algunos derivados no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1O_2^*$) (Andresen y cols., 2006; Battin y Brumaghim, 2009).

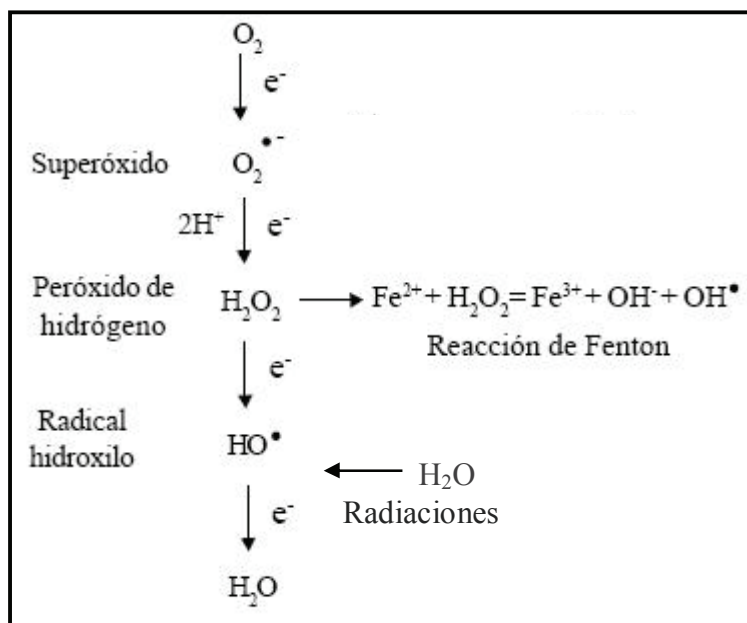
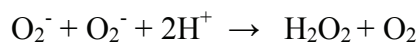


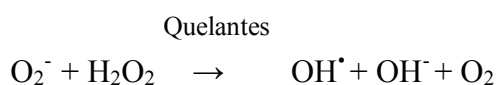
Figura 1. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO, normalmente, son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (Desikan y cols., 2005).

El **anión superóxido (O_2^-)** es el primer radical libre que se forma mediante la reducción secuencial del oxígeno. Este radical, es de toxicidad moderada y al contrario que la mayoría de los radicales libres, es inactivo. En medio acuoso, su reacción

principal es la dismutación, mediante la cual se genera una molécula de H₂O₂ y una molécula de O₂:



El O₂⁻ participa en determinados procesos químicos relevantes en el ambiente biológico. El principal es auxiliar en la producción del radical OH[•], por medio de la reducción de quelantes. Por esta vía, el OH[•] puede ser obtenido a través de la reacción de Haber-Weiss, representado por la ecuación:



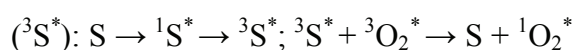
El O₂⁻ también reacciona con el radical OH[•] generando ¹O₂^{*} y con el óxido nítrico (NO[•]) produciendo peroxinitrito (ONOO⁻) (Freinbichler y cols., 2011).

El **peróxido de hidrógeno (H₂O₂)**, entre otros mecanismos, se produce *in vivo* por la ya mencionada dismutación del O₂⁻, gracias a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Las mitocondrias son una fuente importante de O₂⁻ y, como la presencia de este anión puede provocar efectos serios, contienen gran cantidad de SOD, que lo convierten en H₂O₂. Este hidroperóxido, a su vez, es parcialmente eliminado por enzimas antioxidantes, pero como su eliminación tiene baja eficiencia, una parte muy significativa es liberada en la célula, propagando el daño oxidativo. El H₂O₂ también puede ser encontrado en bebidas como el té y principalmente en el café y, rápidamente difunde por las células de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal (Barreiros y cols., 2006).

El **radical hidroxilo (OH[•])** se forma en el organismo, fundamentalmente, por dos mecanismos: mediante la llamada reacción de Fenton entre el H₂O₂ con metales de transición, como el hierro (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH[•] + OH⁻) o bien por la descomposición de las moléculas de agua por radiaciones ionizantes (Valko y cols., 2004). La incidencia de la radiación ultravioleta, radiación γ o los rayos X puede producir radical OH[•] en las células de la piel. Esta sustancia, sin carga neta, es una de las especies más reactivas del organismo, pues debido a su corta vida media es

difícilmente atrapada *in vivo* (Barreiros y cols., 2006). Su electrón desapareado puede reaccionar, de manera inespecífica, con casi cualquier tipo de molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de origen, siendo considerado, probablemente, como el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas (Barja de Quiroga, 1997).

El **oxígeno singlete** ($^1\text{O}_2^*$) es la causa o el intermediario de la toxicidad fotoinducida del O_2 en los organismos vivos. Reacciona con un gran número de moléculas biológicas, incluyendo lípidos de la membrana. Esta sustancia puede ser generada, entre otras reacciones, por transferencia de energía a partir de un sensibilizador en estado excitado ($^3\text{S}^*$) como las porfirinas, clorofila y riboflavina hacia el O_2 (Vasconcelos y cols., 2007)



2.1.3. Daños celulares provocados por las especies reactivas de oxígeno (ERO)

La producción de las ERO es parte integrante del metabolismo y muchas veces son de extrema utilidad como, por ejemplo, cuando es necesaria la activación del sistema inmunológico (los macrófagos usan el H_2O_2 para eliminar bacterias y otros agentes agresores) o su actuación en algunas vías de señalización celular. Además, las ERO están involucradas en la síntesis de sustancias biológicamente importantes como el óxido nítrico, que es de extremado valor en los procesos que llevan a la relajación de los vasos sanguíneos (Schneider y Oliveira, 2004).

Sin embargo, las ERO también pueden interactuar con macromoléculas celulares como los lípidos de membrana, las proteínas y el DNA, ocasionando un daño oxidativo irreversible y alterando las funciones vitales de la célula. Generalmente, los cambios ocasionados por las ERO son muy diversos, y dependerán del tipo de célula sobre la que actúan, el nivel de radicales libres generados y la duración de la exposición. Así, las ERO en dosis bajas promueven la proliferación celular, mientras que dosis intermedias pueden detener el crecimiento de forma total o permanente, produciendo envejecimiento. Finalmente, un alto número de especies oxidantes pueden dañar seriamente las estructuras celulares llevando incluso a la muerte celular a través de mecanismos de apoptosis o necrosis (Júnior y cols., 2001) (Figura 2).

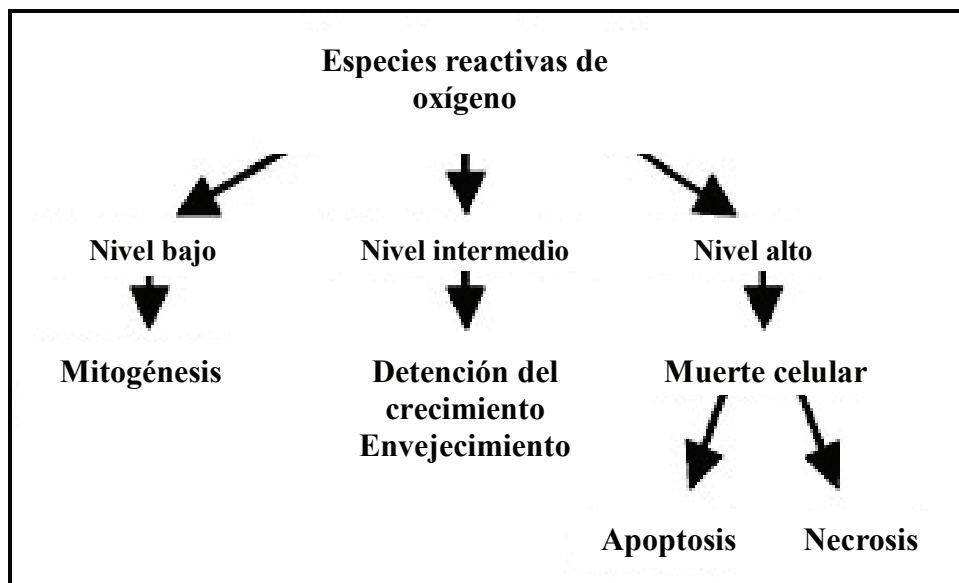


Figura 2. Daños celulares provocados en función de la cantidad de especies reactivas que se forman en las células (Martindale y Holbrook, 2002).

2.1.3.1. *Reacción de radicales libres con los lípidos*

La peroxidación lipídica es el daño oxidativo provocado por el ataque de una especie reactiva, generalmente el OH^\bullet , sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, aunque también, se produce peroxidación en otras estructuras supramoleculares, como son los fosfolípidos y los agregados de lipoproteínas.

El proceso de peroxidación lipídica, ocurre en tres etapas bien caracterizadas: iniciación, propagación y terminación (Figura 3).

La iniciación se basa en la extracción de un electrón a un átomo de carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el OH^\bullet . De este modo se forma un radical alquilo (L^\bullet) que se transforma en peroxilo (LOO^\bullet) por adición de O_2 y que en diversas reacciones, como su reducción a hidroperóxido lipídico (LOOH), puede llevar a la propagación de la peroxidación al generar otro radical alquilo (L^\bullet) en un ácido graso contiguo en la membrana. La propagación explica el carácter de reacción en cadena de la peroxidación lipídica, por medio de la cual una sola iniciación puede dañar un gran

número de moléculas. Por fin, este proceso termina mediante la reacción de radicales contiguos (por ejemplo de tipo alquilo), originando puentes cruzados (L-L), o mediante la fragmentación del ácido graso en un gran número de productos como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxinonanal o los alcanos (Porter y cols., 1995).

La cuantificación del MDA es el método más utilizado para evaluar la peroxidación lipídica (Chen y cols., 2011).

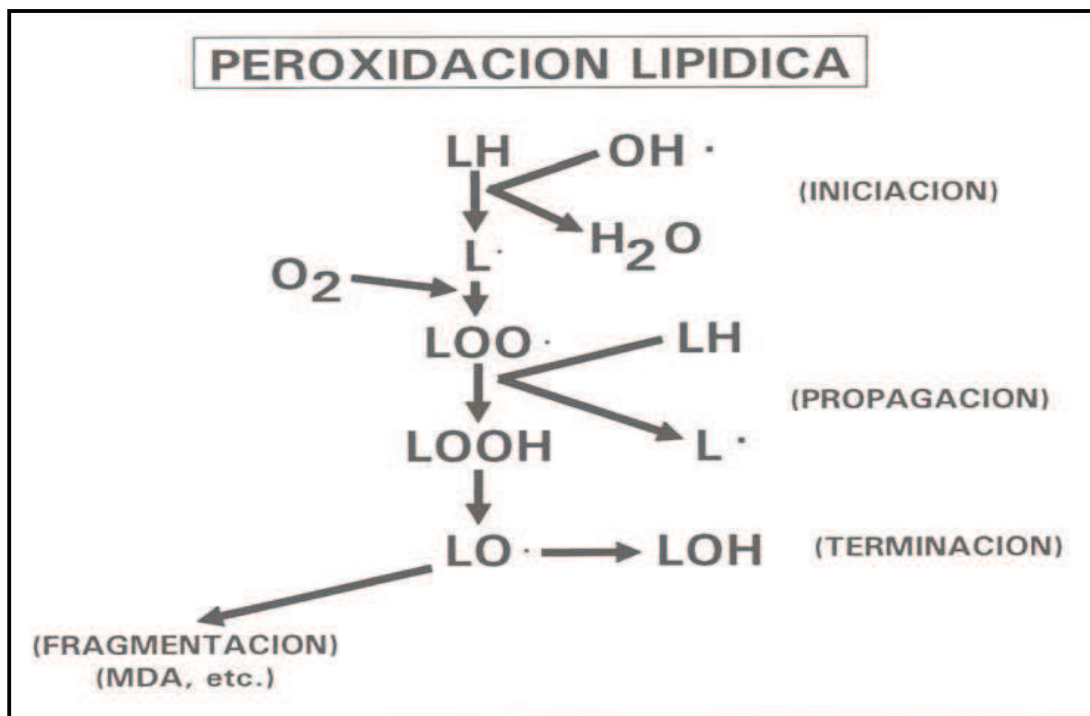


Figura 3. Las reacciones principales de la peroxidación lipídica: LH= lípido intacto; L· = radical lipídico alquilo; LOO· = radical lipídico peroxilo; LOOH= hidroperóxido lipídico; LO· = radical lipídico alcóxido; LOH= hidróxido lipídico (estable) (Barja de Quiroga, 1997).

Todo este proceso genera cambios en las propiedades físicas y químicas de las membranas, alterando el transporte activo y pasivo, provocando la rotura de las mismas, incluso la muerte celular (Barreiros y cols., 2006; Vasconcelos y cols., 2007). A su vez, la oxidación de lípidos en la sangre daña las paredes de las arterias y venas, facilitando la acumulación de estos lípidos y, por tanto, favoreciendo la aterosclerosis, pudiendo generar trombosis, infarto o accidentes cerebrovasculares (Barreiros y cols., 2006).

2.1.3.2. Reacción de radicales libres con las proteínas

El radical OH^\bullet , entre otros, reacciona con las proteínas y puede originar alteraciones en diversos residuos aminoacídicos. Forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, llevando a una pérdida de la función, o a un incremento de la susceptibilidad a enzimas proteolíticas (González-Torres, 2000). Estos cambios, eventualmente, pueden inducir inflamación en los tejidos y muerte celular (Goetz y Luch, 2008).

La oxidación de aminoácidos específicos como la arginina, la lisina y la prolina provoca la formación de derivados de tipo carbonilo (Yan y Forster, 2011). La determinación de la concentración de los grupos carbonilo es un buen indicador del nivel de oxidación proteica (Valko, 2007).

2.1.3.3. Reacción de radicales libres con el DNA

Las ERO son la principal fuente de daño al DNA. La lesión del DNA puede surgir por interacción directa de estos radicales con las bases del ácido nucleico o puede ser debida a los componentes producidos durante la oxidación lipídica (Seifried y cols., 2007). Se estima que la frecuencia del daño oxidativo al DNA, en células humanas, es de 10^4 lesiones/células/día (Klaunig y cols., 2010). Los radicales libres atacan el azúcar desoxirribosa y las bases purínicas (adenina y guanina) y pirimidínicas (timina, citosina y uracilo), y pueden llegar a provocar la rotura de la cadena de DNA. La permanente modificación del material genético, por este proceso, representa el primer paso para el desarrollo de oncogénesis y muerte celular (Vasconcelos y cols., 2007).

Varias ERO tienen la capacidad de formar bases oxidadas, siendo el radical OH^\bullet el más relacionado con esta situación. La reactividad de esta molécula es tal que su migración en la célula es limitada y por eso interacciona rápidamente con los constituyentes celulares, modificando las bases, provocando inestabilidad genómica y alterando la expresión de los genes (Klaunig y Kamendulis, 2004; Fruehauf y Meyskens Jr, 2007). Por otro lado, el H_2O_2 es menos reactivo, pero puede difundir más fácilmente que el OH^\bullet , participando en la formación de bases oxidadas a través de las reacciones de

Fenton y Haber-Weiss (Klaunig y cols., 2010). También las ERO provocan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, favoreciendo la aparición de procesos cancerígenos (Kundu y Surh, 2008).

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales o “*Ensayo Comet*” es un método ampliamente utilizado para monitorizar posibles daños producidos por agentes genotóxicos, como las ERO, en el DNA (Duthie y cols., 1996).

2.1.4. Alcohol y estrés oxidativo

La inducción del estrés oxidativo, provocado por la ingesta de alcohol, está relacionada con su propio metabolismo. La degradación metabólica del alcohol se produce esencialmente en el hígado (alrededor de un 90%) y en menor extensión en el estómago, siendo este último órgano especialmente relevante a dosis bajas de alcohol, por encargarse de su metabolización. Sólo una pequeña proporción del etanol ingerido (entre un 2-10%) escapa de la oxidación y es eliminado por los riñones y los pulmones (Lieber, 1997).

Existen tres vías mediante las cuales se produce el metabolismo del alcohol, que han sido asumidas como clásicas e implican enzimas como la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) y la catalasa (Figura 4). Cada una de estas vías lleva a la formación de numerosos radicales libres y al consiguiente desbalance del estado oxidativo (Zima y cols., 2001).

La actuación de la **alcohol deshidrogenasa (ADH)** es fundamental para el metabolismo del etanol. La mayor parte del etanol es oxidado por esta vía, dado que, en circunstancias fisiológicas normales, el SMOE metaboliza el 10% del alcohol en el hígado, y la catalasa sólo un 2% (Cederbaum y cols., 2009; Guo y Ren, 2010; Manzo-Avalos y Saavedra Molina, 2010). La ADH se encuentra predominantemente en el citosol hepático, aunque también se expresa en otros tejidos, entre ellos el estómago y el riñón, siendo la ADH gástrica responsable del primer paso metabólico del alcohol, actuando como una “barrera protectora” y modulando su paso a la circulación sistémica (Fortea y cols., 1999; Bode y Bode, 2003).

En las personas que consumen alcohol de forma esporádica o en dosis moderadas, la ADH hepática es la enzima encargada de llevar a cabo la oxidación de la mayor parte del etanol ingerido y convertirlo en acetaldehído (una molécula muy tóxica), con la consiguiente formación de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) a partir de la misma coenzima en su forma oxidada (NAD^+). El acetaldehído formado se transforma a su vez en acetato por medio de una enzima de la matriz mitocondrial, la acetaldehído-deshidrogenasa (ALDH) (Lieber, 2005). A pesar de su alta afinidad ($K_m = 0.2\text{-}2 \text{ mmol/L}$), la dotación enzimática de ADH es limitada, siendo efectiva cuando las concentraciones de alcohol en sangre no son elevadas (Comporti y cols., 2010; Manzo-Avalos y Saavedra-Molina, 2010). Además, si se producen cantidades excesivas de NADH, este no es reoxidado en proporción suficiente para reponer el NAD^+ , por lo que se altera la homeostasis redox NAD^+/NADH , lo que compromete la actividad de la ADH y provoca desequilibrios metabólicos (Cascales y cols., 1997; Otero y Cortés, 2008).

El **sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE)**, dependiente del citocromo P-450, también está involucrado en el metabolismo oxidativo del etanol. Este sistema presenta varias isoformas, las cuales poseen distintas capacidades de oxidar el etanol. La isoforma 2E1 (CYP2E1), ubicada en la membrana del retículo endoplasmático hepático, es inducida por un consumo crónico y agudo de alcohol y desempeña un papel importante metabolizando el alcohol a acetaldehído ante concentraciones elevadas (Das y Vasudevan, 2007; Lu y Cederbaum, 2008; Artun y cols., 2010). Parece existir una correlación entre el grado de inducción de esta isoforma y la producción de radicales libres como el anión O_2^- y el H_2O_2 (Dey y Cederbaum, 2006; Wu y cols., 2006). En presencia de metales de transición, como el hierro, las especies reactivas de oxígeno pueden ser convertidas además, en radicales OH^\bullet , ocasionando peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (Wu y cols., 2006). La elevada eficiencia en reducir el O_2 a O_2^- y H_2O_2 por el CYP2E1 lleva a que éste sea considerado uno de los factores clave que favorecen el estrés oxidativo producido por el consumo crónico y agudo de alcohol (Albano, 2006; Lu y Cederbaum, 2008). La inducción microsomal provocada por el consumo alcohólico crónico no sólo incrementa la oxidación del etanol, sino también aumenta el metabolismo de diversos sustratos microsomales, concretamente fármacos como la varfarina, el propranolol, el diazepam, la rifampicina, entre otros, lo que acarrea

una menor efectividad de estas moléculas en la dosis habitual. Por otro lado, el consumo agudo de alcohol inhibe el metabolismo hepático de los fármacos, por competencia en un proceso común con el citocromo P450 (Lieber, 1997).

El papel de la **catalasa (CAT)** en la oxidación del etanol parece tener menor importancia (Lieber, 1999). De ubicación en los peroxisomas celulares y especialmente en el hígado, requiere la producción de una cantidad significativa de H_2O_2 que puede ser generada mediante la oxidación de NADPH por acción de la NADPH oxidasa o por la oxidación de la hipoxantina por la xantina oxidasa (Lieber, 1997; Comporti y cols., 2010).

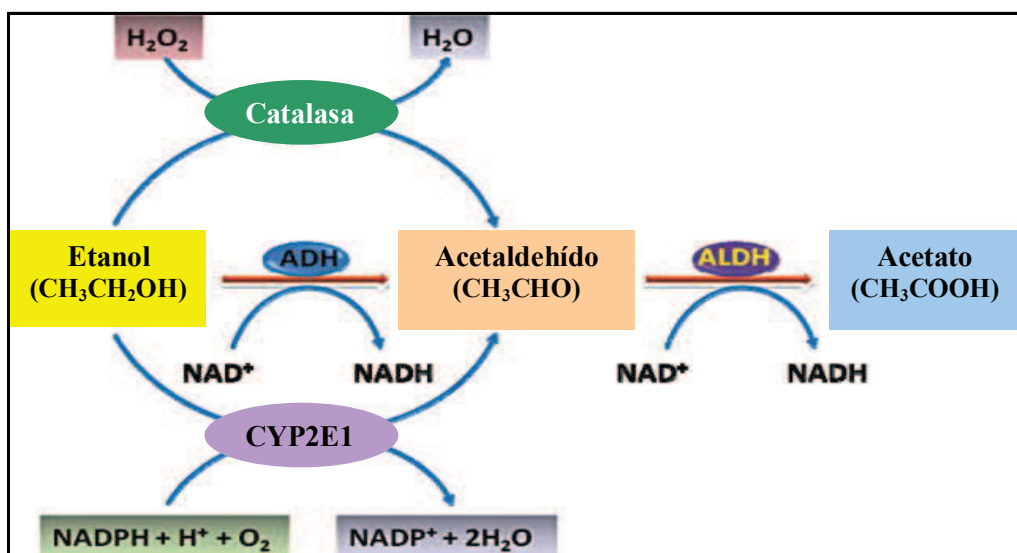


Figura 4. Vías del metabolismo oxidativo del etanol (Zhu y cols., 2012).

Pero además de las principales vías oxidativas, el etanol también se metaboliza, aunque en menor medida, por una vía no oxidativa mediante la cual se forman ésteres etílicos de ácidos grasos, que pueden estar involucrados en los daños tisulares provocados por el alcohol. Esta reacción es catalizada por la enzima ácido graso etil ester sintetasa (FAEE = fatty acid ethyl ester) y aparece en diversos órganos como corazón, páncreas, cerebro e hígado (Beckemeier y Bora, 1998; Quertemont, 2004).

2.1.4.1. Mecanismos involucrados en el daño oxidativo provocado por el alcohol

La acumulación de acetaldehído y de NADH (los dos principales productos resultantes del metabolismo oxidativo del alcohol) es responsable de la gran mayoría de los daños celulares que el alcohol genera, sea por la toxicidad intrínseca del acetaldehído, sea por el desequilibrio del estado redox que se produce al incrementar la ratio NADH/NAD⁺ o por las ERO generadas (Zhang y cols., 2004).

2.1.4.1.1. Efectos metabólicos del exceso de NADH

El incremento en la ratio NADH/NAD⁺ en el citosol y las mitocondrias de los hepatocitos influye sobre determinadas reacciones reversibles que tienen lugar en el hígado ocasionando alteraciones en el metabolismo hepático de los lípidos, carbohidratos y proteínas, entre otros. Así, como consecuencia de este desbalance se produce (Figura 5):

Hiperlactacidemia e Hiperuricemia: Niveles elevados de NADH, y por consiguiente la falta de NAD⁺, llevan a una síntesis anormal de ácido láctico a partir de piruvato. El aumento de ácido láctico produce una acidosis alcohólica y acarrea una reducción en la capacidad excretora de ácido úrico por el riñón, pudiendo causar gota (Lieber, 2003).

Hipoglucemia: El incremento del NADH ocasiona una reducción en la concentración de piruvato evitando su conversión a glucosa, lo cual a su vez, disminuye la reacción de la piruvato carboxilasa, inhibiendo la gluconeogénesis hepática (Zakhari y Li, 2007).

Hipertrigliceridemia: El aumento de NADH eleva la concentración de α -glicerofosfato, que promueve la acumulación de triglicéridos hepáticos por atrapamiento de ácidos grasos, contribuyendo a la formación de un hígado graso (esteatosis). Además, el exceso de NADH también disminuye la oxidación de ácidos grasos (Lieber, 1997).

Hipoxia: El metabolismo del alcohol favorece el consumo de oxígeno, originando un estado de hipoxia significativa en los hepatocitos perivenosos, situación que puede favorecer al desarrollo de la lesión hepática (Bunout, 1999; Zakhari y Li, 2007).

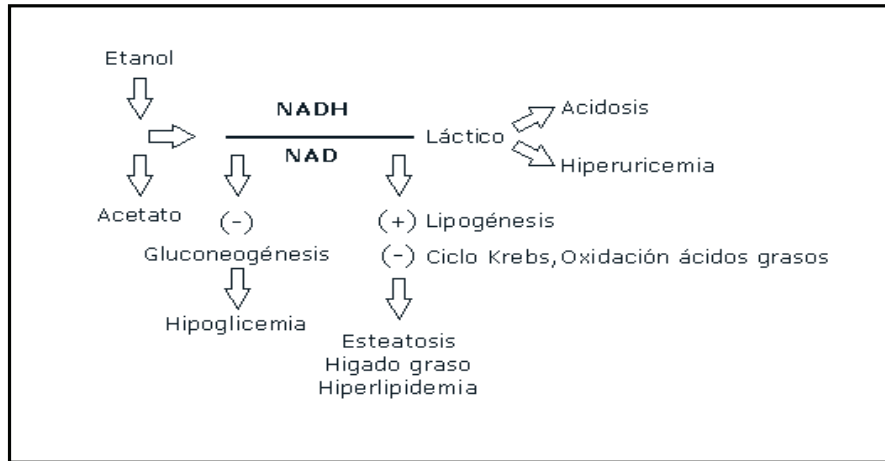


Figura 5. Consecuencias del desequilibrio $NADH/NAD^+$.

2.1.4.1.2. Efectos ocasionados por el acetaldehído

El acetaldehído es el principal producto metabólico de la oxidación del etanol. Su metabolización a acetato por la ALDH, a nivel mitocondrial, puede disminuir por efecto de la ingesta crónica de alcohol, situación esta que conjuntamente con la inducción del SMOE puede originar una acumulación excesiva de acetaldehído (Lieber, 2005). En consecuencia, el acetaldehído así formado desencadena diversos efectos nocivos a nivel celular:

- Disminuye los niveles de glutatión reducido (GSH), amplia los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno y promueve la peroxidación lipídica, originando daños en la integridad de las membranas celulares y mitocondriales (Manzo-Avalos y Saavedra Molina, 2010).
- Se une de manera covalente a las enzimas microsomales hepáticas como el CYP2E1, o a otras proteínas como la tubulina y el colágeno, induciendo la formación de aductos de proteínas, complejos que actúan como neoantígenos. Estos promueven la respuesta inmune y pueden provocar la muerte de los hepatocitos (Setshedi y cols., 2010).

Además, el enlace con la tubulina de los microtubulos lleva a una disminución de la secreción proteica, incrementando la retención de proteínas en el hígado, haciendo que los hepatocitos adquieran un aspecto redondeado de tamaño aumentado, concomitante a la acumulación de lípidos y agua (Ishii y cols., 1997).

- Genera aductos de DNA que pueden favorecer el proceso de carcinogénesis desencadenando errores de replicación y mutaciones puntuales. A su vez, el acetaldehído puede unirse directamente a proteínas relacionadas con la reparación y metilación del DNA y, de esta manera, interferir en los procesos que mantienen la estabilidad y la integridad del DNA genómico (Seth y cols., 2010).
- Estimula la síntesis de colágeno tipo I en las células estrelladas hepáticas, favoreciendo el desarrollo de la fibrosis hepática (Greenwel, 1999; Tuma y Casey, 2003).
- Perjudica la función de los factores de coagulación inactivándolos, incrementando el tiempo de coagulación (Brecher y cols., 2006). Además, parece contribuir en la macrocitosis que se verifica en pacientes con un consumo excesivo de alcohol, por la formación de aductos en la membrana de los eritrocitos (Koivisto y cols., 2006).
- Estimula la liberación de moléculas de señalización (histamina, epinefrina, norepinefrina y bradiquinina), incrementando los síntomas cardiovasculares que se verifican por reacción de sensibilidad alcohólica, tales como la vasodilatación y el enrojecimiento facial (Guo y Ren, 2010).
- Influye en la contractilidad miocárdica, al interferir en el proceso de excitación-contracción y al inhibir la liberación de Ca^{2+} por el sarcolema y el retículo endoplasmático, pudiendo contribuir, de este modo, al desarrollo de la cardiomiopatía alcohólica (Li y Ren, 2008).
- Se puede unir a la apolipoproteína B-100, un componente de las LDL oxidadas y generar aductos que fomentan la producción y la liberación en las células del endotelio

de citoquinas con actividad proinflamatoria y moléculas de adhesión, conocidos mediadores del proceso de aterosclerosis (Ström y cols., 2007; Redmond y cols., 2009).

2.1.4.1.3. Efectos generados por las especies reactivas de oxígeno

Como hemos comentado anteriormente el metabolismo oxidativo del etanol ocurre, predominantemente, en el hígado, verificándose un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células hepáticas, concretamente por acción de las mitocondrias, el CYP2E1, la NAD(P)H oxidasa (NOX) y por la oxido nítrico sintasa inducida (iNOS), con una consecuente depleción de los mecanismos de defensa antioxidante. Tal desbalance puede provocar una disfunción mitocondrial con una pérdida en la producción de energía e incluso, originar la muerte celular (Sato, 2007; Zhu y cols., 2012).

- Las ERO, como comentamos anteriormente, provocan daño en biomoléculas tales como lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos. La peroxidación lipídica de los componentes lipídicos de las membranas celulares lleva, a su vez, a la producción de más radicales libres, ampliando los daños celulares. Además, aminoácidos como la cisteína, la metionina y la histidina, son particularmente susceptibles a los ataques y la oxidación provocada por el radical OH^\bullet , elemento este que tiene una producción facilitada por la acumulación de hierro a nivel hepático debido al consumo del alcohol. Como resultado se producen cambios significativos a nivel de la estructura de las proteínas, que pueden dañar las células de forma irreversible (Purohit y cols., 2009; Ajakaiye y cols., 2011). Por otro lado, las ERO pueden lesionar el material genético por medio de diversos mecanismos, tales como oxidación y fragmentación de bases, rotura de las cadenas, sencilla y doble, del DNA y formación de puentes cruzados, lo que lleva a cambios en los procesos de transcripción y transducción, y a errores en la replicación celular (Rulten y cols., 2008; Zhu y cols., 2012).

- Las ERO también pueden llevar a la activación del factor de transcripción nuclear (NFkB) y a toda su cascada de señalización, provocando un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de moléculas de adhesión, que juegan un papel importante en la iniciación y en la progresión de diversas enfermedades inflamatorias

crónicas, como la enfermedad alcohólica hepática (Das y Vasudevan, 2007; Ambade y Mandrekar, 2012).

- Otro aspecto importante es la capacidad que tienen las ERO de inducir la transformación de las células estrelladas hepáticas hasta miofibroblastos, desencadenando una excesiva producción y deposición de colágeno en la matriz extracelular, y provocar una remodelación de la matriz extracelular al modificar la expresión de las metaloproteinasas de la matriz, llevando, eventualmente, a una fibrosis hepática excesiva y cirrosis (Zhu, 2012).

2.2. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

2.2.1. Generalidades

El exceso de radicales libres, en el organismo, se contrarresta por los sistemas de defensa antioxidante. Por antioxidante se entiende cualquier sustancia que, presentando una baja concentración, en comparación a la del sustrato oxidable, regenera el sustrato o previene, de manera significativa, la oxidación del mismo. El término “sustrato oxidable” abarca diversas sustancias encontradas en los alimentos y en los tejidos vivos, incluyendo proteínas, lípidos, hidratos de carbono y DNA (Vannucchi y cols., 1998).

Para proteger al organismo de los efectos adversos de los radicales libres existen diversos sistemas de defensa antioxidante, endógenos y exógenos. Entre los endógenos más importantes destacan el glutatión (GSH) y el sistema enzimático formado por las cuatro enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Peng y cols., 2005) (Figura 6).

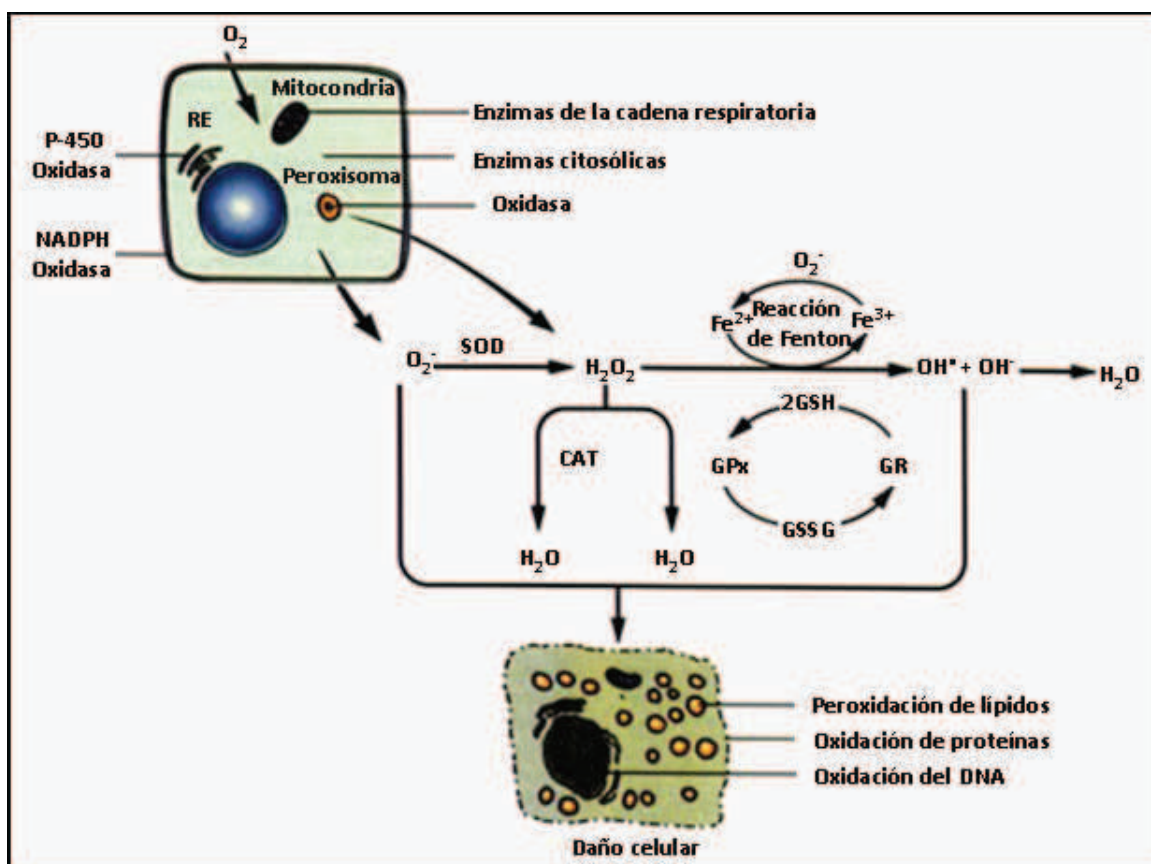


Figura 6. Formación de especies reactivas de oxígeno y sistemas de defensa antioxidante endógeno.

El **glutatión (GSH)** es un tripéptido que posee un papel importante en la biotransformación y en la eliminación de xenobióticos, y en la defensa de las células contra el estrés oxidativo (Huber y cols., 2008). La protección de las células es efectuada por diversas vías: el GSH es un cofactor de varias enzimas con propiedades detoxificantes, entre las cuales se destaca la enzima antioxidante GPx, participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, y promueve la eliminación del radical hidroxilo (OH^\bullet) y del oxígeno singlete ($^1O_2^*$) (Valko y cols., 2007).

La familia de las **glutatión peroxidasas (GPx)** es uno de los principales componentes del sistema de defensa antioxidante humano (Lu y Holmgren, 2009). Sus diferentes isoformas fueron las primeras proteínas humanas conocidas que incorporaron selenio en forma de selenocisteína dentro de su núcleo catalítico, por ello forman parte del grupo

de las selenoproteínas. Todas ellas se caracterizan por promover la reducción de H_2O_2 y peróxidos orgánicos a H_2O y O_2 , protegiendo, de esta manera, a las células del daño oxidativo (Papp y cols., 2007; Negro, 2008). En humanos, se conocen en profundidad cinco isoformas: GPx1, ubicada en el citosol de todas las células del cuerpo; GPx2, asociada al tracto gastrointestinal e hígado; GPx3 extracelular o plasmática, importante transportadora de selenio; GPx4, presente en las membranas celulares y recientemente relacionada con el factor de transcripción NFκB, y GPx6, específica del epitelio olfativo y del tejido embrionario (Papp y cols., 2007; Reeves y Hoffmann 2009).

La **glutación reductasa (GR)** es una flavoproteína dependiente del NADPH. Es responsable de mantener el glutati6n en su forma reducida y, controlar el estado redox del NADP en tejidos donde el glutati6n oxidado (GSSG) est1 disponible, teniendo como objetivo contribuir a la regulaci6n del ciclo metab6lico del glutati6n (Rover J6nior y cols., 2001; Vasconcelos y cols., 2007). Esta enzima se encuentra, principalmente, en el h6gado y en los eritrocitos, y tambi6n se expresa en niveles elevados en el epitelio pulmonar y en los 6rganos reproductores de ambos sexos (Fujii y cols., 2011). Dado que la GR es una holoenzima constituida por apoglutati6n reductasa (apoGR) y flav6n aden6n dinucle6tido (FAD) como grupo prost6tico, la falta o disminuci6n de la actividad de la GR puede ser provocada por dos mecanismos: (1) como consecuencia de mutaciones hereditarias, la enzima puede estar ausente o presentar una baja actividad catal6tica; (2) por una deficiencia de FAD debido a peque1as cantidades de riboflavina (vitamina B_{12}) en la dieta o por un fracaso en su conversi6n en FAD, que puede hacer que la apoGR sea inactiva. En este 6ltimo caso, que es lo m1s frecuente, la actividad de la GR puede ser repuesta por suplementaci6n de riboflavina o por adici6n *in vitro* de FAD. Mientras que la deficiencia hereditaria de GR es rara, la deficiencia de FAD es com6n en poblaciones con problemas de nutrici6n. Entre los s6ntomas cl6nicos de deficiencia destacan una reducci6n del tiempo de vida de los eritrocitos, la presencia de cataratas y favismo (Kamerbeek y cols., 2007).

La **super6xido dismutasa (SOD)** cataliza la dismutaci6n del O_2^- a H_2O_2 y O_2 . En humanos hay tres formas de SOD: Cu/Zn SOD en el citosol, Mn-SOD en la mitocondria y la extracelular SOD (EC-SOD) (Valko y cols., 2006).

La SOD citosólica es una proteína dimérica, con un peso molecular de cerca de 32 kDA, que presenta Cu y Zn en su centro activo, y se cree que desempeña un papel importante en la primera línea de defensa antioxidante, al actuar sobre el O_2^- (Matés y cols., 1999). Esta isoforma ha sido relacionada con el síndrome de Down, la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y el proceso de envejecimiento (Fukai y Ushio Fukai, 2011; Miriyala y cols., 2012).

La SOD mitocondrial es una proteína tetramérica, con un peso molecular de cerca de 96 kDA, presentando un átomo de manganeso en cada subunidad. Esta enzima es esencial para la vida como se comprobó tras utilizar ratones Mn-SOD knockout, los cuales presentaron una cardiomiopatía letal (Li y cols., 1995). De forma opuesta, se demostró que animales transgénicos con una sobreexpresión de Mn-SOD presentaban un reducción del 35% en la magnitud del infarto de miocardio, con respecto a animales en su estado natural. La sobreexpresión o la inducción de la actividad de esta isoforma reduce la peroxidación lipídica y protege los tejidos de la muerte celular (Muscoli y cols., 2003). Además de su papel en la dismutación del O_2^- , esta isoforma influye en la actividad de factores de transcripción tales como el HIF-1 α , el AP-1, el NF κ B y el p53, y afecta la estabilidad del DNA (Miriyaala y cols., 2012).

Se ha descrito otra SOD, la extracelular (EC-SOD) que posee una fuerte afinidad con la heparina y otros proteoglicanos. Se encuentra presente en líquidos extracelulares como el plasma, la linfa, el líquido cerebroespinal y el líquido sinovial (Afonso y cols., 2007). Es la única enzima que media la conversión de O_2^- a H_2O_2 en la matriz extracelular de los tejidos y parece influir en la respuesta inmune innata ante infecciones bacterianas (Break, 2012).

La **catalasa (CAT)** es una enzima que se encuentra en el orgánulo peroxisoma y a nivel tisular está presente, principalmente, en la sangre, medula ósea, riñones e hígado, siendo su función más significativa la descomposición del H_2O_2 a H_2O y O_2 , de manera que una molécula de catalasa puede eliminar cerca de 6 millones de moléculas de H_2O_2 por minuto (Ferreira y Matsubara, 1997; Valko y cols., 2006; Comporti y cols., 2010). Esta enzima posee una K_m y una V_{max} muy altas para el H_2O_2 , lo que la convierte en la más adecuada para eliminar el peróxido de hidrógeno a nivel celular cuando este se

encuentra presente en concentraciones elevadas (Barja de Quiroga, 1997). También puede catalizar la reducción de H_2O_2 reaccionando con donantes de electrones, tales como el etanol, el metanol, el ácido fórmico o fenoles, actuando como una peroxidasa (Matés y cols., 1999). Se ha verificado que la administración de catalasa exógena previene la oxidación del GSH mediada por el H_2O_2 en eritrocitos humanos normales e inhibe el daño oxidativo al DNA en el timo de carneros sometidos a un exceso de Fe^{3+} (Ferreira y Matsubara, 1997).

El sistema de defensa antioxidante humano contempla también los antioxidantes exógenos, aquellos no sintetizados por las células, que por tanto, provienen de la ingesta diaria de los mismos. Entre estos destacan algunas vitaminas, compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) y determinados metales.

- Las vitaminas C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol) y el β -caroteno (precursor de la vitamina A) son los antioxidantes exógenos más considerados. Son los únicos nutrientes naturales que atrapan directamente radicales libres y al ser componentes estructurales de las membranas celulares, contribuyen, de ésta forma, a su protección. Además, tienen un papel primordial ayudando a detener la cadena de reacciones de peroxidación lipídica y protegen el DNA del daño oxidativo (González- Torres y cols., 2000; Getoff, 2007).
- Entre los compuestos fenólicos, los más estudiados como antioxidantes son los flavonoides. Estos actúan inactivando los radicales libres en los compartimientos celulares hidrofílicos y lipofílicos. También poseen la capacidad de donar átomos de hidrógeno y, por lo tanto, inhiben las reacciones en cadena provocadas por los radicales libres (Hartman y Shankel, 1990; Arora y cols., 1998).
- Diversos metales como el selenio, el zinc, o el magnesio son fundamentales para mantener el balance oxidativo del organismo, en la medida en que además de ser constituyentes de determinadas enzimas antioxidantes, también presentan otras funciones antioxidantes. A título de ejemplo, el selenio, además de encontrarse en la célula como selenocisteína, integrando el centro activo de las GPxs, también está presente, en pequeñas cantidades, en las proteínas en forma de selenometionina,

sustituyendo a la metionina. La selenometionina cataliza la reducción del peroxinitrito, que es un potente oxidante, a expensas del glutatión (Klotz y cols., 2003; Steinbrenner y Sies, 2009).

2.2.2. Alcohol y sistemas de defensa antioxidante

El alcohol además de provocar un aumento de la producción de ERO, por su metabolismo, también influye sobre los sistemas de defensa antioxidante. Diversos estudios demuestran que el etanol, puede modificar la actividad enzimática de la GPx, la GR, la SOD y la CAT en órganos muy distintos como hígado, corazón, riñón, cerebro o pulmón y también en el plasma (Scott y cols., 2000; McDonough, 2003; Ojeda y cols., 2009 y 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos en estas investigaciones son muy heterogéneos, ya que los efectos del alcohol a nivel de los sistemas de defensa antioxidante cambian en función de factores como el sujeto estudiado, la dosis de etanol administrada, la vía de administración o la duración del tratamiento (McDonough, 2003). Además, también se han encontrado alteraciones en el contenido de antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, vitaminas y selenio, entre otros, tras el consumo de alcohol (Koch y cols., 2004; Ojeda y cols., 2009).

2.3. SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS

2.3.1. Generalidades

El selenio (Se) fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius y posteriormente, ha sido reconocido como un elemento esencial para todas las formas de vida, incluyendo los mamíferos (Lu y Holmgren, cols., 2009). Este papel esencial fue propuesto, en 1957, por Schwartz y Foltz, al descubrir que el selenio podría sustituir a la vitamina E como complemento dietético de ratas y pollos en la prevención del desarrollo de lesiones vasculares, musculares y/o hepáticas (Combs Jr, 2001).

La selenometionina y la selenocisteína son las principales formas orgánicas de Se encontradas en los alimentos de origen vegetal y animal, respectivamente. La ingesta de Se inorgánico, como selenato y selenito ocurre, principalmente, en forma de

suplementos, y en el agua, siendo útil también como fuente nutricional en animales (Lucia y cols., 2010; Rayman, 2012). De manera general, el Se es bien absorbido por el tracto gastrointestinal (cerca de 93%) (Lucia y cols., 2010). El contenido de Se en el cuerpo humano varía entre 10 y 20 mg, siendo inferior al 0.01% del peso corporal total (Forceville, 2001). Este nutriente es almacenado en los tejidos en concentraciones variables: el 30% del Se tisular se localiza en el hígado, el 15% en los riñones, un 30% en el músculo, un 10% en el plasma y el 15% restante se encuentra distribuido por otros órganos (Patrick, 2004).

Su biodisponibilidad depende de su absorción intestinal y de su conversión a una forma biológicamente activa, presentando las formas orgánicas del Se una mayor biodisponibilidad (Navarro-Alarcon y Cabrera Vique, 2008). Una vez ingerido, la transformación del Se a formas biológicamente activas tienen lugar mediante diferentes rutas metabólicas (Mercadal y cols., 2005). La selenometionina se incorpora al azar en lugar del aminoácido metionina, en distintas proteínas, y es transformada a selenocisteína mediante una transulfuración (Almondes y cols., 2010). La selenocisteína, al contrario de la selenometionina, no se almacena de esta forma, sino que es catabolizada directamente y, el Se resultante (selenuro) constituye otra reserva de Se. Las formas inorgánicas, como el selenato (Se^{+6}) y el selenito (Se^{+4}), al igual que la selenocisteína, son almacenadas en forma de selenuro (Se^{-2}), el cual se utiliza para la formación de selenofosfato, que es un precursor de la selenocisteína. Cuando las células necesitan las reservas de selenometionina, ésta se libera por proteólisis. Sin embargo, algunos autores preconizan que la cantidad de Se disponible en el organismo desde el reservorio de selenometionina está sujeta al metabolismo de la metionina, de manera independiente de la necesidad de Se del organismo (Mercadal y cols., 2005).

El Se es eliminado principalmente por excreción urinaria, sea en condiciones adecuadas de ingesta o en casos de suplementación, aunque también se produce una pérdida significativa por vía fecal, mientras que alrededor del 5% se elimina por vía cutánea y pulmonar (Castro, 2007; Lucia y cols., 2010).

2.3.2. Selenoproteínas

La selenocisteína es la responsable de la actividad biológica de 25 selenoproteínas, entre ellas las GPxs (Sánchez, 2009; Rayman, 2012). La localización principal y las funciones más importantes de las selenoproteínas más conocidas se encuentran resumidas en la Tabla 1. Precisamente, por formar parte de las diferentes selenoproteínas, se le han atribuido al selenio propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales (Negro, 2008). Se postula que el selenio modula el estrés oxidativo, principalmente, a través de las diferentes GPxs y por la selenoproteína P (la mayor selenoproteína presente en el plasma), fundamentalmente, reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno, lípidos y fosfolípidos hidroperóxidos (Rayman, 2000). Por esta razón, entre otras, la deficiencia de Se ha sido relacionada con diversas alteraciones como son el cáncer, la infertilidad, el deterioro de las funciones inmunes y tiroideas, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, e incluso en la enfermedad alcohólica (Johansson y cols., 1986; Papp y cols., 2007; Tinggi, 2008).

Las isoformas de GPx: GPx1 y GPx4, así como la selenoproteína P se encuentran entre las selenoproteínas más abundantes en el hígado (Hoffmann, 2007).

2.3.2.1. *Glutación peroxidasa 1*

La GPx1 fue la primera selenoproteína identificada. Se localiza en el citosol celular y se expresa de manera ubicua (Tapiero y cols., 2003). La GPx1 protege a las células de los fenómenos oxidativos generados por las especies reactivas de oxígeno. Para ello, cataliza la reducción del H₂O₂ y de algunos hidroperóxidos orgánicos, utilizando el GSH como reductor, transformándolos en agua y alcoholes. Durante este proceso el glutatión es oxidado, regresando, posteriormente, a su estado original por acción de la enzima GR, con el objetivo de mantener los niveles de GSH (Papp y cols., 2007).

La GPx1 es una de las selenoproteínas más sensibles a los cambios de Se en el organismo, presentando niveles drásticamente reducidos ante una disminución de este nanoelemento (Sunde y cols., 2009). La síntesis global de la proteína se reduce en

condiciones de estrés como forma de reserva de recursos celulares y su recuperación se produce de forma más rápida que otras selenoproteínas (Reeves y Hoffmann, 2009).

Se verificó que ratones knockout GPx1 presentaban un desarrollo normal, lo que sugería que la ausencia de esta selenoproteína, en el sistema de defensa antioxidante, podría ser compensada por otras proteínas. Por otra parte, se comprobó que estos ratones no sobrevivían ante situaciones generadoras de estrés oxidativo severas, independientemente de cualquier suplementación de Se, al contrario de ratones normales selenio suplementados. Tales hallazgos indican que la GPx1 no puede ser reemplazada por cualquier otra selenoproteína en la protección del estrés oxidativo generalizado y que esta presenta una función primaria antioxidante *in vivo* (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

2.3.2.2. Glutatión peroxidasa 4

La GPx4 es una enzima esencial para la vida como se comprobó al utilizar ratones knockout GPx4, que presentaron mortalidad embrionaria temprana (Liang y cols., 2009). Esta selenoproteína es la única glutatión peroxidasa, y probablemente la única enzima antioxidante, que reduce de manera directa los hidroperóxidos de fosfolípidos en las membranas y lipoproteínas (Brigelius-Flohé y Kipp, 2009). Debido a esta función biológica, la GPx4 se encuentra íntimamente asociada a la membrana celular.

Además, esta selenoproteína está involucrada en el metabolismo de lípidos tales como el ácido araquidónico y el ácido linoleico, disminuye la síntesis de leucotrienos, de la prostaglandina E, y del factor activador de plaquetas (mediadores que desempeñan un papel de relevo en la inflamación y en la aterogénesis), y favorece la actividad de leucocitos polimorfonucleares, pudiendo modular también por esta vía la respuesta inflamatoria e inmunológica (Hattori y cols., 2005; Guo y cols., 2008; Reeves y Hoffmann, 2009).

Por otro lado, la sobreexpresión de esta enzima disminuye la activación del NFκB en una diversidad de células sometidas a diferentes estímulos, lo que pone de manifiesto, aún más, su importancia como mediador en los procesos inflamatorios (Brigelius-Flohé

y Kipp, 2009). Además, por amortiguación de la vía de señalización del NF κ B, la GPx4 reduce la expresión de la metaloproteínasa 1 de la matriz, la cual se sobreexpresa durante los períodos de invasión y metástasis de diversos tumores (Ufer y Wang, 2011).

La GPx4 se expresa de manera elevada en los testículos de mamíferos, existiendo estudios que correlacionan la infertilidad masculina con una depleción de los niveles de GPx4 (Imai y cols., 2001; Foresta y cols., 2002). Estando también implicada en la maduración de los espermatozoides, y por ende, en la fertilidad masculina. Es el componente estructural principal de la cápsula espermática mitocondrial y juega un papel preponderante en la condensación de la cromatina espermática, al actuar como una peroxidasa tiol de proteínas (Conrad y cols., 2005).

2.3.2.3. Selenoproteína P

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

La selenoproteína P posee dos importantes propiedades: actúa como biomarcador de la cantidad de Se corporal, ya que es la proteína transportadora mayoritaria de Se en suero, y posee capacidad antioxidante. La selenoproteína P se sintetiza, principalmente, en el hígado y transporta el Se desde el hígado (principal reservorio de Se en el organismo) hacia otros órganos. Por esta razón, diversos hallazgos sugieren que la selenoproteína P es un buen indicador del estado nutricional de Se en el organismo (Ashton y cols., 2009; Rasmussen y cols., 2009; Hurst y cols., 2010). Además, la selenoproteína P funciona como un antioxidante extracelular asociado al endotelio vascular que inhibe la actividad de radicales libres como el peroxinitrito y reduce los fosfolípidos hidroperóxidos actuando en asociación con el GSH o la tiorredoxina (Andoh, 2005). En caso de enfermedad crítica se ha verificado una disminución de esta proteína, siendo este un fenómeno secundario a la regulación negativa desencadenada por mediadores inflamatorios tales como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), la

Interleuquina 1 β (IL-1 β) y el Interferón γ (IFN- γ) (Angstwurm y Gaertner, 2006; Geoghegan y cols., 2006).

Selenoproteínas	Localización	Funciones
GPx1	Hígado y eritrocitos	Antioxidante Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos orgánicos
GPx2	Aparato gastrointestinal	Actividad antiapoptótica Mantiene la integridad de la mucosa intestinal
GPx3	Plasma, intestino, riñón	Antioxidante en los fluidos extracelulares Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos orgánicos
GPx4	Testículos, cerebro e hígado	Cataliza la reducción de los hidroperóxidos de fosfolípidos Antiinflamatoria/ S.Inmune Esencial para la condensación de la cromatina de las espermátidas
Tiorredoxinas reductasas 1, 2 y 3	Todos los tejidos	Actividad redox Síntesis de DNA Controla la actividad de factores de transcripción, proliferación celular y apoptosis
Isoenzimas Deiodinasas 1, 2 y 3	Diversos tejidos	Regulan la síntesis y degradación de las hormonas tiroideas
Selenoproteína P	Hígado	Transporte y distribución de selenio por vía plasmática Antioxidante endotelial

Tabla 1. Selección de selenoproteínas mejor estudiadas.

2.3.3. Alcohol y selenio

Numerosos estudios demuestran que el consumo de alcohol influye sobre los niveles de selenio (agente antioxidante) en diversos órganos de animales y humanos. Así, en crías de ratas sometidas a un consumo crónico de alcohol, se verificó una disminución de los niveles de selenio en hígado, corazón y riñón (Ojeda y cols., 2010). Esta deficiencia también se había observado, anteriormente, en el hígado y las heces de

cerdos tratados con etanol (Sivaram y cols., 2003). A su vez, en humanos se ha encontrado una reducción significativa de los niveles de selenio en suero e hígado de pacientes alcohólicos con o sin enfermedad hepática (Thuluvath y Triger, 1992; Guarini y cols., 1998; Zachara y cols., 2001; González-Reimers y cols., 2009).

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la depleción de selenio como consecuencia del consumo de etanol: (1) una ingesta dietética insuficiente como resultado de una mala nutrición; (2) un déficit en su absorción intestinal, por alteración de la mucosa intestinal; (3) la producción de ERO por el metabolismo oxidativo del alcohol; (4) así como una disfunción hepática (Van Gossum y Nève, 1995; González-Reimers y cols., 2008; Sher, 2008; Ojeda y cols., 2009).

Generalmente, los individuos alcohólicos no suelen llevar una dieta equilibrada, pudiendo presentar alteraciones a nivel de absorción intestinal y aprovechamiento de nutrientes. Tal situación hace que estos pacientes, puedan padecer malnutrición primaria o secundaria (Moreno y Cortés, 2008). La malnutrición primaria se verifica cuando el consumo de alcohol reemplaza a otros nutrientes de la dieta, disminuyendo la ingesta sólida total (Lieber, 2003). Esto puede ser debido a que el alcohol es un nutriente rico en energía (1 g de alcohol equivale a 7.1 Kcals), con un valor superior a lo que aportan los hidratos de carbono y las proteínas, y que se estima, puede representar un 50% de la energía calórica ingerida diariamente por los alcohólicos (Maillot y cols., 2001; Lieber, 2005). A su vez, la malnutrición secundaria ocurre cuando, a pesar de ingerir alimentos de manera adecuada, el consumo excesivo de alcohol interfiere con su absorción intestinal, mermando, de este modo, la biodisponibilidad de los nutrientes pues modifica morfológica y bioquímicamente, la mucosa intestinal (Bode y Bode, 2003; Lieber, 2003; Foster y Marriott, 2006).

Además, otros investigadores consideran que el alcohol *per se* contribuye a la disminución de Se en el organismo, independientemente del estado nutricional del sujeto. Así, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en ratas sometidas a alcohol y en ratas que ingerían una dieta isocalórica, se verificó una redistribución diferente de los niveles de Se en suero e hígado, por lo que se pudo deducir que el consumo de alcohol crónico *per se*, y no sólo la malnutrición, altera la

distribución de este micronutriente (Ojeda y cols., 2009). A su vez, en un estudio llevado a cabo en pacientes con enfermedad hepática alcohólica, cuya dieta era rigurosamente controlada, no se encontró una asociación entre la ingesta de nutrientes y los niveles reducidos de Se (Bergheim y cols., 2003). Probablemente, uno de los mecanismos por los cuales el alcohol actúa sobre la homeostasis del Se, es por su metabolismo oxidativo, pues al generar ERO el organismo consume Se para sintetizar la enzima antioxidante GPx. Esto concuerda con lo encontrado por diversos autores, que observaron en pacientes alcohólicos una disminución de la actividad de la GPx en el suero (Peng y cols., 2005; Huang y cols., 2009). Además, se ha verificado una disminución de los niveles de Se en suero tras el consumo crónico de alcohol (González-Reimers y cols., 2009). Sin embargo, muy pocos trabajos han analizado ambos parámetros a la vez. En concreto, algunos autores, miden la actividad de la GPx en suero, eritrocitos o sangre total como marcadores del estado nutricional de Se en el organismo (Boosalis, 2008; Stefanowicz, 2013).

Otro mecanismo bien constatado y aceptado es que el alcohol deteriora la función hepática. La presencia de daño hepático empeoraría la síntesis de selenoproteínas, como la selenoproteína P -un importante transportador de Se desde el hígado hacia otros tejidos- lo que acarrearía un déficit de este elemento en el organismo. Además, la vía de transulfuración necesaria para que el Se, en forma de selenometionina, esté disponible para la síntesis de selenoproteínas, también podría verse afectada (Czuczejko y cols., 2003). Curiosamente, en estudios animales, llevados a cabo en ratas, se verificó que un déficit de este micronutriente generaba necrosis en los hepatocitos, de manera similar a lo observado en humanos con un consumo excesivo de alcohol (Simonoff y Simonoff, 1991; Navarro-Alarcón y cols., 2000).

3. ALCOHOL Y DAÑO HEPÁTICO

El alcohol es uno de los mayores responsables de la mortalidad por daño hepático en los Estados Unidos y en diversos países de Europa (Medici y Halsted, 2013). El espectro clínico de la enfermedad hepática alcohólica (EHA) abarca distintas categorías: hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis (Conde de la Rosa y cols., 2008). Se estima que el 90% de los grandes consumidores de alcohol (más de 60 g/día) presentan

evidencias de hígado graso, mientras que solo 10-35% desarrollan hepatitis alcohólica y 5-15% cirrosis (McCullough y cols., 2011). Eventualmente, la cirrosis puede llevar al desarrollo de carcinoma hepatocelular (De Minicis y Brenner, 2008).

El hígado graso o esteatosis hepática es la primera respuesta del hígado al abuso de alcohol y se caracteriza por la acumulación de grasa, en su mayoría triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol, en los hepatocitos. La exposición al alcohol, de forma directa o indirecta, regula el metabolismo de los lípidos, estimulando la lipogénesis e inhibiendo la oxidación de ácidos grasos (Gao y Bataller, 2011). Tal como hemos comentado anteriormente el incremento de la ratio NADH/NAD^+ , por el metabolismo oxidativo del etanol, contribuye a esta situación. Por otro lado, el alcohol promueve el metabolismo lipídico inhibiendo el receptor activado proliferador de peroxisoma (PPAR- α) y la adenosina monofosfato cinasa, y estimula la proteína 1 de unión al elemento regulador del esteroles (SREBP1). Simultáneamente, todas estas vías llevan a una remodelación en el metabolismo de las grasas a nivel hepático, que se traduce en un acúmulo excesivo de lípidos en los hepatocitos. La esteatosis hepática es reversible con la abstinencia. Los individuos que continúan con el consumo de alcohol, de manera excesiva, pueden presentar formas más graves de EHA, como hepatitis alcohólica y cirrosis (Suh y Jeong, 2011; Zhu y cols., 2012).

La hepatitis alcohólica se caracteriza, principalmente, por la inflamación y necrosis. Histológicamente hay presencia de esteatosis, necrosis, apoptosis, infiltración leucocitaria y fibrosis perisinusoidal-pericelular en los hepatocitos (Stewart y cols., 2001; Gao y Bataller, 2011). La desregulación de las respuestas inflamatorias, por los mecanismos ya referidos, parece contribuir a la necrosis hepática. Añadiendo a esto, que la acumulación de lípidos promueve la inflamación. La progresión de estos procesos nocivos puede, eventualmente, desencadenar una excesiva acumulación de colágeno en la matriz extracelular, generando cirrosis (Zhu y cols., 2012).

Diversos factores de riesgo contribuyen al desarrollo y a la progresión de la EHA. Aunque la cantidad, la duración y la frecuencia de consumo jueguen un papel importante, propiciando el daño hepático, no todos los individuos con un patrón exagerado de ingestión de alcohol desarrollan EHA o sus formas más graves (Tan y

cols., 2009). Actualmente, se sabe que factores como el sexo, la raza, la etnia, la herencia genética, los polimorfismos a nivel de genes, la malnutrición, la obesidad y la presencia de infecciones crónicas virales, entre otros, influyen en la génesis y en la progresión de la EHA (O`Shea y cols., 2010).

El daño hepático se produce a través de diversas vías interrelacionadas, entre las cuales se encuentra el metabolismo del etanol, que genera, principalmente, acetaldehído, un exceso de NADH y ERO, tal como comentamos en el apartado 2.1.4. También es conocido, que el etanol provoca cambios en la flora intestinal originando un incremento de microorganismos aerobios y anaerobios, y en especial de microorganismos Gram-negativos. Este hecho junto con la formación de acetaldehído – uno de los metabolitos del etanol – incrementan la permeabilidad intestinal (Ajakaiye y cols., 2011; Dhanda y cols., 2012). La endotoxina lipopolisacárido (LPS), presente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, en condiciones normales, penetra en la mucosa intestinal en cantidades pequeñas, y seguidamente, tras pasar a la circulación portal, es inactivada en el hígado (Szabo y Bala, 2010). Sin embargo, ante la ingesta crónica de alcohol se verifica un incremento en la translocación de la endotoxina que entra en la circulación portal unida a una proteína de unión de LPS (LBP). Este enlace permite que el LPS se una a los receptores de membrana CD14 y TLR4 presentes en las células de Kupffer (los macrófagos residentes en el hígado), activándolas (Lucey y cols., 2009; Mathurin y Lucey, 2012). La activación de las células de Kupffer lleva a la estimulación del factor de transcripción nuclear NFkB, que a su vez, desencadena la generación de citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleuquina 1, además de quimiocinas y ERO (Nagata y cols., 2007; Byun y Jeong, 2010). Esta situación induce necrosis y apoptosis en los hepatocitos produciendo daño hepático (Tilg y cols., 2011). Además, el LPS puede promover la activación de las células estrelladas hepáticas, favoreciendo el desarrollo de fibrosis, y de las células sinusoidales hepáticas que liberan mediadores inflamatorios que potencian el daño hepático (Bautista, 2000; Seth y cols., 2010) (Figura 7).

También el sistema inmune parece influir en el desarrollo del daño hepático. Como hemos mencionado anteriormente, el metabolismo del etanol puede formar aductos que ejercen el papel de neoantígenos. Estos activan la respuesta inmune adquirida,

desencadenando la producción de linfocitos T y B que se infiltran en el hígado y estimulan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (De Minicis y Brenner 2008; Gao y Bataller, 2011).

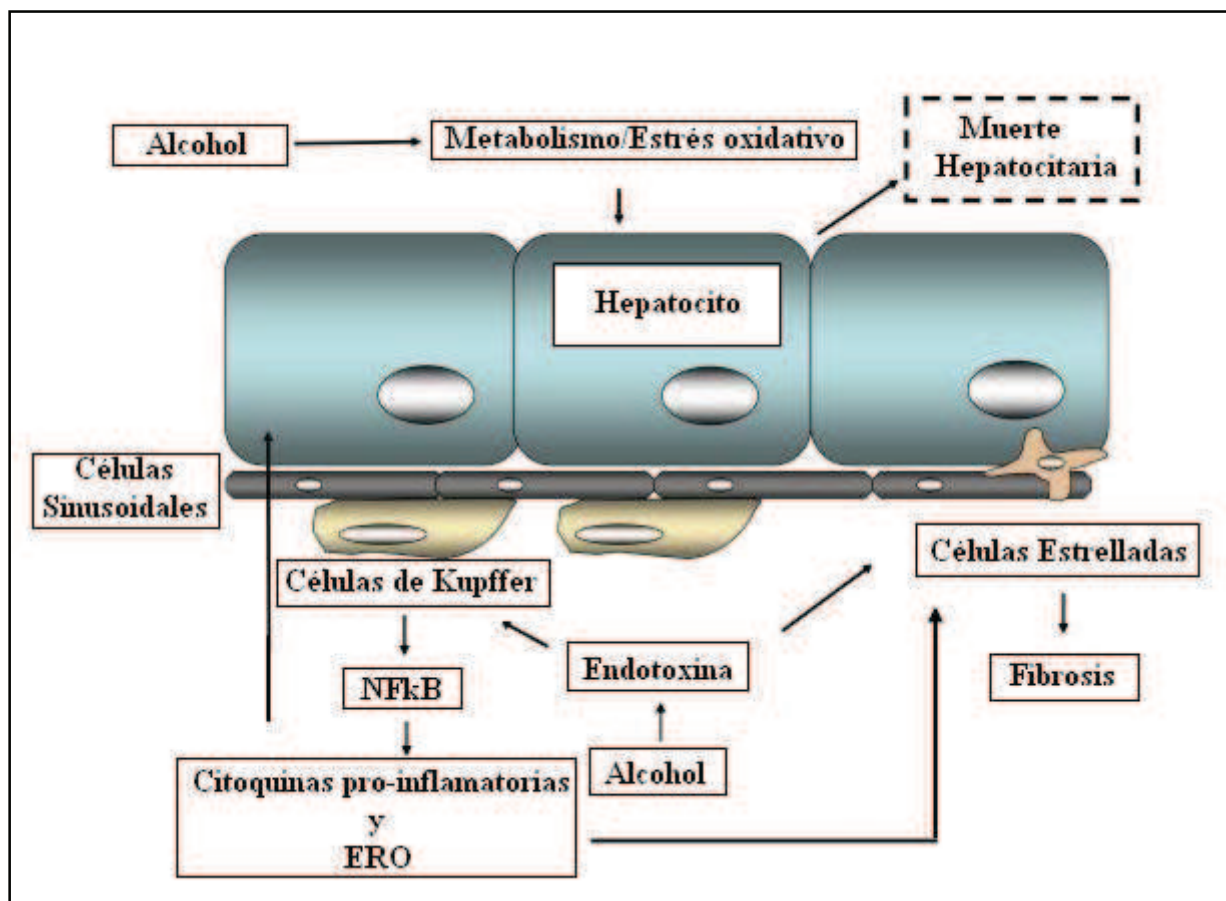


Figura 7. Papel del sistema inmune innato en el daño hepático asociado al alcohol (Mandrekar y Szabo, 2009).

Por otra parte, se sabe que el alcohol lleva a un almacenamiento exacerbado de hierro en el organismo. Este hecho es comprobado por los elevados índices de hierro sérico (saturación de transferrina, ferritina) y por la alta concentración de este elemento en el hígado de pacientes con EHA (Ji, 2012). Incluso, personas con un ligero o moderado consumo de alcohol exhiben un incremento del hierro almacenado (Ioannou y cols., 2004).

El hierro es esencial en diversos procesos biológicos, tales como la producción de eritrocitos, la síntesis de DNA y en la respiración celular. La mayoría del hierro en el organismo se une a la hemoglobina en los eritrocitos. El resto se incorpora a la mioglobina en el músculo, a enzimas tisulares imprescindibles para la producción de energía, y a la transferrina plasmática. El exceso de hierro almacenado se deposita en las células parenquimatosas hepáticas y en los macrófagos del retículo endotelial (Harrison-Findik, 2007).

Es conocido que un exceso de hierro *per se* induce estrés oxidativo y peroxidación lipídica (McCord, 2004). El hígado, como principal órgano de almacén, es obviamente afectado. Esta toxicidad pone de manifiesto, en parte, el papel del hierro como catalizador de reacciones como la de Fenton y de Haber-Weiss, entre otras, en las que se generan radicales libres (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005; Ramm y Ruddell, 2005). Por otro lado, el consumo de alcohol (agudo o crónico) lleva a una disminución de la expresión de hepcidina en el hígado. La hepcidina es un péptido sintetizado principalmente en el hígado, que desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo del hierro, inhibiendo su transporte intestinal y la liberación de hierro procedente de los macrófagos. Se postula que el alcohol al reducir la expresión de la hepcidina en el hígado y al incrementar la permeabilidad intestinal, va a influir negativamente en la homeostasis de este elemento, facilitando su absorción a nivel intestinal y favoreciendo, de este modo, el aumento excesivo de hierro a nivel hepático. Todo esto llevaría a la activación de las células de Kupffer y a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, culminando en daño hepático (Harrison-Findik, 2009).

El metabolismo anormal de la metionina también puede contribuir al desarrollo y a la progresión del daño hepático. Durante su ciclo metabólico, en el hígado, la metionina es transformada en S-adenosilmetionina (SAM). La SAM producida se utiliza a continuación para más de un 85% de las reacciones de transmetilación que ocurren en este órgano. Cuando la SAM cede un grupo metilo se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAH), que a su vez, se hidroliza a adenosina y homocisteína, en una reacción reversible catalizada por la adenosilhomocisteína hidrolasa. Posteriormente, la homocisteína es metabolizada, predominantemente, por dos vías: por remetilación y por transulfuración. La remetilación permite la recuperación de

metionina y puede ocurrir por medio de dos reacciones. Una de ellas es catalizada por la enzima metionina sintasa (MS) y requiere 5,10-metilenotetrahidrofolato (la forma biológicamente activa del ácido fólico) como fuente del grupo metilo, y vitamina B₁₂ como cofactor. La otra vía implica una reacción catalizada por la betaína–homocisteína metiltransferasa (BHMT), que utiliza como molécula donadora del grupo metilo la betaína, una sustancia resultante del catabolismo de la colina (Halsted y Medici, 2011; Kharbanda, 2013). Por otro lado, mediante la transulfuración, la homocisteína se transforma, en una primera fase, en cistationina, por acción de la enzima cistationina β-sintasa. Posteriormente, por medio de la enzima γ-cistationasa, la cistationina se convierte en el aminoácido cisteína. Estas dos reacciones requieren la vitamina B₆ como cofactor. Por fin, la cisteína es utilizada para la formación de moléculas como el glutatión (Finkelstein, 2007; Martinov y cols., 2010) (Figura 8).

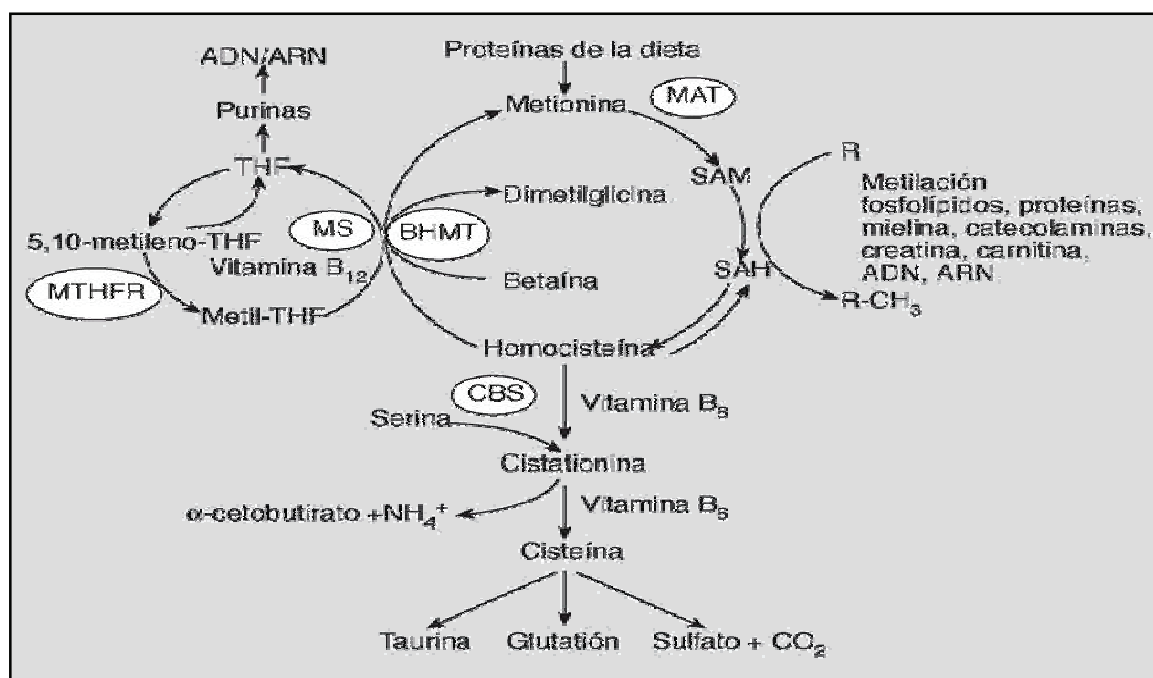


Figura 8. Ciclo de la metionina. MAT, metionina adenosiltransferasa; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; BHMT, betaína–homocisteína metiltransferasa; MS, metionina sintasa; MTHFR, metilenotetrahidrofolato reductasa; THF, tetrahidrofolato; CBS, cistationina β-sintasa.

Diversos estudios indican que el consumo crónico de alcohol genera una hiperhomocisteinemia (Stickel y cols., 2000; Kopczyńska y cols., 2004; Blasco y cols., 2005; Barrero y cols., 2012). Las investigaciones indican que esto ocurre por actuación del alcohol en las vías de remetilación y transulfuración, dado que inhibe la enzima MS

y disminuye los niveles de ácido fólico, vitamina B₁₂ y vitamina B₆, elementos importantes del metabolismo descrito anteriormente (Kharbanda, 2009; Cylwik y Chrostek, 2011). Aunque la remetilación pueda ocurrir por medio de la betaina, el consumo prolongado de alcohol también parece afectar esta vía (Kharbanda, 2009). Estos factores conjugados llevan a la acumulación de homocisteína, que es tóxica. Esta sustancia induce la activación de mediadores inflamatorios, incrementa la producción intracelular del anión superóxido (provocando estrés oxidativo), reduce el nivel del óxido nítrico en las células y genera estrés excesivo en el retículo endoplasmático. Estos efectos generan muchos de los mecanismos por los cuales la homocisteína provoca daño celular, fundamentalmente a nivel hepático, tales como la acumulación de grasa, inflamación y apoptosis (Ji y Kaplowitz, 2004; Ji, 2012). Por otro lado, la disminución de la actividad de la enzima MS, por la ingesta de alcohol, parece afectar la metilación del DNA, dado que esta juega un papel importante en ese proceso. La hipometilación del DNA puede llevar a alteraciones en la expresión génica y en la estructura de la cromatina, que se traduce en daño al DNA con incremento del riesgo de ruptura de la cadena, lo que predispone las células a una degeneración maligna. Este fenómeno ha sido asociado al carcinoma hepatocelular (Mandrekar, 2011).

Estudios realizados en humanos sugieren que existe una correlación inversa entre las concentraciones séricas de homocisteína y Se (González y cols., 2004; Klapcinska y cols., 2005; Belanger y cols., 2006). Estos resultados parecen sugerir que el Se podría ser beneficioso en la reducción del daño hepático asociado a una hiperhomocisteinemia, sin embargo se necesitan más estudios sobre esta materia.

Estudios efectuados en ratas muestran que ante una deficiencia de Se, se verifica una disminución de la actividad y de la expresión de la BHMT, llevando a una reducción del metabolismo de la homocisteína por la vía de la remetilación (Uthus y cols., 2002). Por otro lado, también se verificó una disminución de la actividad de glutamato–cisteína ligasa (GCL), una enzima que lleva a la conversión de la cisteína en gama-glutamil cisteína, una molécula implicada en la biosíntesis del glutatión, culminando en un acúmulo de homocisteína (Uthus y cols., 2007).

4. “BINGE DRINKING”

4.1. GENERALIDADES

El “binge drinking” (término anglosajón) o “botellón” (como es conocido en España) es un término que se utiliza para caracterizar un comportamiento que consiste en consumir alcohol de forma intensiva y episódicamente. En los Estados Unidos, ha sido definido como el patrón de consumo de alcohol que eleva el nivel de su concentración en sangre a 80 mg/dL, lo que equivaldría, en ese país, a 5 o más bebidas para hombres y 4 o más bebidas para mujeres, consumidas en aproximadamente dos horas (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2004). Sin embargo, desde el ámbito de la investigación clínica esta definición todavía no ha sido consensuada, pues se cree que no mimetiza, de forma fidedigna, este tipo de comportamiento (Read y cols., 2008; Stolle y cols., 2009). En España, desde un punto de vista preventivo y encuadrado en un contexto de promoción de la salud pública, se ha sugerido la siguiente definición: consumo de 60 g, o más, de alcohol en varones (6 bebidas) y de 40 g, o más, en mujeres (4 bebidas), concentrado en una sesión de consumo (normalmente 4-6 horas), en la que se mantiene un determinado nivel de intoxicación (presencia de alcohol en la sangre no inferior a 0.8 g/L) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008). Aspectos como las diferencias entre países en los gramos de alcohol de las unidades de bebida estándar (UBE), la frecuencia de los episodios de consumo y la duración de los mismos dificultan el establecimiento de una definición internacional del término (Parada y cols., 2011).

En lo que concierne a la prevalencia de consumo de alcohol, ésta es mayor en los varones adolescentes y jóvenes adultos, aunque también se verifica un aumento, con respecto a las mujeres, en las demás franjas etarias. En España, la última encuesta realizada sobre alcohol y drogas en la población general (2011-2012), llevada a cabo por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD) publicada en 2013, por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad confirma esta tendencia. Se puede observar que los hombres presentan una mayor prevalencia siendo más significativa entre los 20 y los 24 años (Figura 9). En esta franja de edad, las mujeres también presentan la mayor tasa de consumo de alcohol.

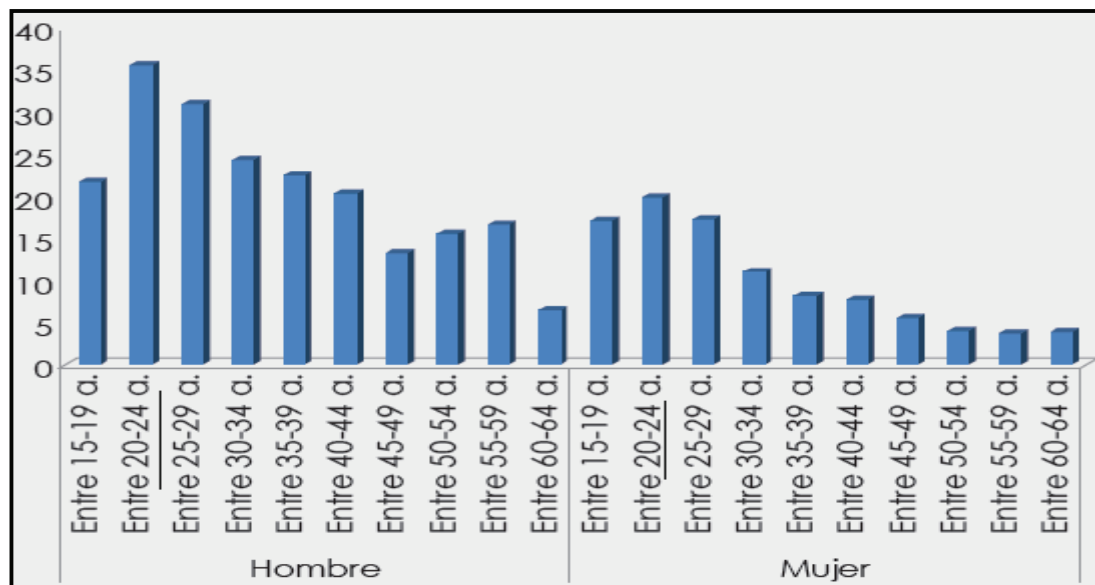


Figura 9. Prevalencia de “binge drinking” en los últimos 30 días, según grupo de edad y sexo (%) (2011-2012) (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013).

A nivel social, entre las consecuencias de este patrón de consumo de alcohol destacan las alteraciones en las relaciones personales, el rendimiento académico y laboral, intentos de suicidio y conductas peligrosas para la salud, así como prácticas sexuales de riesgo o conducir bajo los efectos del alcohol (O’Connell y Lawlor, 2005; Courtney y Polich, 2009; Karagülle y cols., 2010).

Clínicamente, el “binge drinking” provoca un debilitamiento de la actividad del SNC, debido a los efectos del alcohol sobre la síntesis, liberación y señalización de neurotransmisores, como la serotonina, el glutamato, el GABA y los endocannabinoides, y sobre sus respectivos receptores (Dolganuc y Szabo, 2009; Ward y cols., 2009). También se afectan parámetros neurocognitivos, como la memoria, el aprendizaje y la planificación de tareas complejas (Courtney y Polich, 2009). Por otro lado, el “binge drinking”, tan en boga durante la adolescencia, ha sido asociado con el desarrollo posterior de abuso y dependencia de alcohol en la edad adulta (Grant y cols., 2006; Sprow y Thiele, 2012).

En relación al sistema gastrointestinal, esta forma de abuso, también provoca alteraciones, siendo de especial relevancia los daños verificados a nivel hepático (ver apartado 4.4) y pancreático, y que pueden explicar, en parte, cambios detectados en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y lípidos (Ceccanti 2006; Dolganiuc y Szabo, 2009).

Aún en la vertiente clínica, varios estudios indican que la ingesta aguda de alcohol favorece el estado de hipertensión arterial y promueve la progresión de la aterosclerosis. La prolongación del intervalo Q-T y del P-R detectada en estos consumidores, facilita la aparición de arritmias ventriculares, siendo además, este tipo de consumo, un factor de riesgo para el desarrollo de accidentes cerebrovasculares y de infarto agudo de miocardio (O'Keefe y cols., 2007; van de Wiel y de Lange, 2008; Mathurin y Deltenre, 2009).

La literatura también refleja que este tipo de consumo se asocia con una disminución de la capacidad de respuesta del sistema inmune ante las infecciones, un incremento en la liberación de corticosteroides, y un retraso en los tiempos de cicatrización, lo que puede elevar la morbilidad y la mortalidad (Dolganiuc y Szabo, 2009; Radek y cols., 2009).

En la mujer esta conducta de ingesta alcohólica durante el embarazo puede desencadenar el síndrome alcohólico fetal, llevando al desarrollo de malformaciones congénitas y alteraciones neurocognitivas en el futuro recién nacido, aumentando el riesgo de muerte fetal (Strandberg-Larsen y cols., 2008; Ornoy y Ergaz, 2010; Mateja y cols., 2012) (Figura 10).

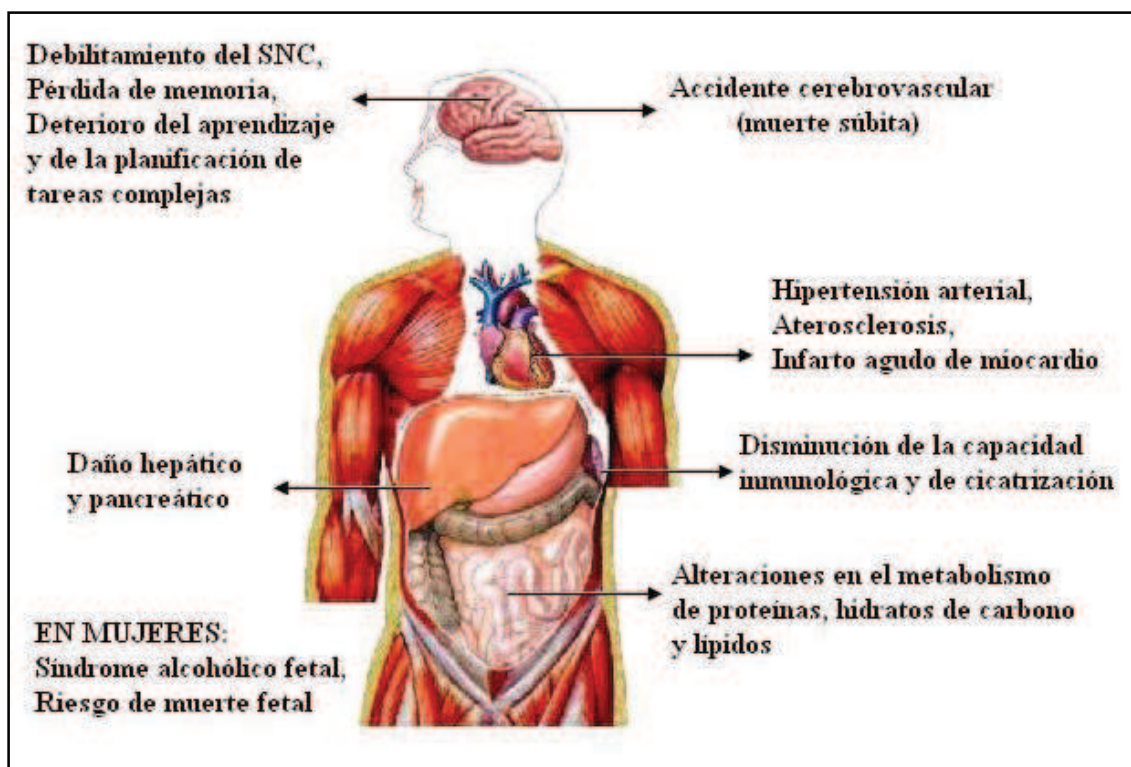


Figura 10. Posibles efectos provocados por el “binge drinking”.

4.2. MODELOS DE “BINGE DRINKING”

Normalmente se consideran dos tipos de modelos: humanos y animales.

Los pocos modelos humanos referidos en la literatura se basan en el consumo de bebidas alcohólicas que contienen etanol destilado o vino. Tales modelos se consideran fisiológicos, teniendo en cuenta el modo de administración, y logran niveles de alcohol en sangre significativos. En la mayoría se verifica un control riguroso de las cantidades de alcohol a utilizar, teniendo en consideración el peso corporal, la edad y género de los participantes, y de los grupos placebo y control utilizados en los diseños experimentales. Una parte considerable de estos estudios contempla como período de ingesta las dos horas de consumo referidas en la definición de “binge drinking” propuesta por el National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism de los Estados Unidos.

Uno de los principales inconvenientes en la utilización de estos modelos se halla en las cuestiones éticas que plantean, ya que no es aceptable que los seres humanos sean expuestos a períodos largos de ingesta de alcohol, aunque, a menudo, se verifiquen en la vida real y, fundamentalmente, entre los adolescentes (Dolganiuc y Szabo, 2009).

Por otro lado, los modelos animales involucrados en la investigación de los efectos del alcohol utilizan primates, cerdos, perros, ratones, ratas o conejos. Los modelos de roedores (ratas y ratones) son los más usados debido a diversos factores, entre los cuales se incluyen un fondo genético relativamente bien definido, la capacidad de generar resultados en un corto periodo de tiempo, la facilidad de manejo y transporte, y su bajo costo. Una de las principales limitaciones de estos modelos, es la dificultad de duplicar con rigor este tipo de comportamiento humano y todas las consecuencias que este patrón de consumo de alcohol produce (Ponnappa y Rubin, 2000; Dolganiuc y Szabo, 2009).

Los modelos animales de intoxicación aguda han sido desarrollados para mimetizar el fenómeno de “binge drinking” (Karinich y cols., 2008). Entre ellos, están los que imitan un solo episodio de “binge drinking” y los que representan episodios repetidos de “binge drinking” alternados con periodos de abstinencia. Este último ha sido el elegido en el diseño experimental de este trabajo, pues se asemeja más a los hábitos de consumo de los adolescentes españoles.

Los modelos de alcoholización más utilizados, en ratas y ratones, para reproducir el “binge drinking”, repetido o no, se pueden dividir en 2 grupos, de acuerdo con el tipo de administración: parental u oral.

4.2.1. Modelos animales de “binge drinking” administrado por vía parental

Entre los modelos que utilizan esta vía de administración, destacan:

4.2.1.1. Inyección intraperitoneal

En este modelo, el alcohol, generalmente al 20%, es administrado directamente con una jeringa en la zona intraperitoneal. Todos los animales, durante el tratamiento, tienen libre acceso a comida y agua. El grupo control recibe un volumen equivalente de agua o solución salina. El nivel máximo de alcohol en la sangre va a depender de la cantidad de alcohol inyectada, de la especie y de la edad de los animales utilizados. Es relativamente fácil de ejecutar y permite controlar con rigor la cantidad de alcohol administrada. El principal inconveniente de esta técnica es que no puede ser considerado un modelo fisiológico y además, induce estrés en los animales involucrados (Plackett y Kovacs, 2008; D'Souza El Guindy y cols., 2010).

4.2.1.2. Inyección intravenosa

Este método se basa en la administración de alcohol a través de una inyección intravenosa tipo bolus, seguida de una infusión continua a través de un catéter colocado normalmente en la vena yugular o femoral. Esta infusión permite la mantención de los niveles de alcohol en sangre, de manera constante, durante todo el periodo experimental. En este modelo, el grupo control recibe un volumen igual de solución salina. Todos los animales son alimentados *ad libitum* con comida y agua. Esta técnica comparte los inconvenientes del modelo descrito anteriormente y además, requiere la anestesia previa de los animales así como un estricto control de las condiciones de asepsia. En relación a los otros métodos, tiene como aspecto positivo la rapidez con la cual se obtiene el nivel máximo deseado de alcohol en sangre (D'Souza El Guindy y cols., 2010).

4.2.1.3. Infusión intragástrica

El etanol es administrado por medio de una cánula intragástrica implantada quirúrgicamente. Este procedimiento posibilita la obtención de niveles elevados de alcohol en la sangre y, el control total del etanol consumido. Entre las desventajas, este método exige la presencia de personal con experiencia quirúrgica durante la inserción

de la cánula y una monitorización. Además, es laborioso y no puede ser considerado fisiológico (French, 2001; Tsukamoto y cols., 2008).

4.2.2. Modelos animales de “binge drinking” administrado por vía oral

Entre los modelos que utilizan esta vía cabe resaltar:

4.2.2.1. *Gavage*

En este modelo, el alcohol es administrado directamente en el estómago, a través de una aguja curva de punta roma conectada a una jeringa o por medio de un tubo pediátrico de alimentación infantil. Este método mimetiza mejor el “binge drinking” que los descritos anteriormente, sin embargo no deja de ser una técnica invasiva, así, si no se ejecuta correctamente, puede provocar daños en el sistema gastrointestinal superior y probablemente, inducir mayor estrés que los anteriores (D’Souza El Guindy y cols., 2010; Brandon-Warner y cols., 2012).

4.2.2.2. *Consumo nocturno*

Es conocido que la mayoría de los roedores ingieren su comida y agua diaria durante la fase nocturna de su ciclo circadiano. Por otro parte, cuando el etanol es la única bebida disponible, su ingesta se produce, fundamentalmente, al inicio del periodo nocturno, de manera que la concentración de alcohol en la sangre sigue las variaciones circadianas. De acuerdo con estas premisas, el típico modelo de consumo nocturno de alcohol propone cambiar la botella de agua por otra que contenga etanol, generalmente al 20% (v/v), en las dos o tres primeras horas del ciclo nocturno y durante tres días. En el cuarto día, se realiza el mismo procedimiento, con la excepción que la botella de etanol permanece en la jaula durante cuatro horas. Este modelo de administración se considera aceptable para reproducir el “binge drinking” dado que permite la obtención de concentraciones significativas de alcohol en la sangre en un periodo relativamente corto. Además, no requiere ningún tipo de entrenamiento o exposición previa, ni adicción de edulcorantes.

La principal desventaja de esta técnica es que ninguna otra opción es ofrecida, de manera que los animales, que no están sujetos a una privación de fluidos significativa a nivel fisiológico, pueden optar por no beber durante la exposición al alcohol. De hecho, hay diversos genotipos que beben muy poco en estos ensayos y por ello es complicado alcanzar niveles de alcohol en sangre de 0.8 g/L (Crabbe y cols., 2011; Barkley-Levenson y Crabbe 2012; Sprow y Thiele 2012).

4.2.2.3. Modelo de 2 botellas (acceso intermitente de etanol)

Entre los diferentes modelos preclínicos de “binge drinking”, este es uno de los que permite obtener niveles elevados de alcohol en la sangre en un corto período de tiempo. Los animales tienen acceso a una botella con solución de etanol al 20% (v/v), durante 24 horas, en días alternos, y normalmente durante tres días por semana. A lo largo de toda la semana tienen acceso a agua que puede consumir *ad libitum*. Este modelo induce a la ingesta paulatina de grandes cantidades de etanol, imitando el fenómeno de dependencia que se ha asociado recientemente a este tipo de consumo, pero para ello, necesita largo tiempo de exposición, lo que puede suscitar dudas sobre si este es el modelo más adecuado para imitar el comportamiento humano del “binge drinking”. Por otra parte, como los animales tienen acceso permanente al consumo de agua, este modelo exige cepas específicas para que se alcancen los niveles de alcohol en sangre exigidos en la definición de “binge drinking” (Hwa y cols., 2011; Sprow y Thiele, 2012).

4.3. “BINGE DRINKING” Y BALANCE OXIDATIVO

El patrón de consumo tipo “binge drinking” interfiere en el equilibrio oxidativo, principalmente, como consecuencia del metabolismo del etanol (ver apartado 2.1.4.). En líneas generales, a nivel mitocondrial se produce un incremento en la formación de ERO y se verifica un déficit de GSH, lo que conduce a una disfunción en la mitocondria (Mathurin y Deltenre, 2009; Mansouri y cols., 2010). Además, hay que destacar alteraciones en la actividad de diferentes enzimas antioxidantes así como un incremento en la peroxidación lipídica.

A continuación se describen, sucintamente, la mayoría de los trabajos existentes en esta área, de acuerdo con la definición general de “binge drinking”, independientemente de la vía de administración adoptada, y en distintos tejidos:

1) Masini y cols. (1994) encontraron una disminución significativa en los niveles de GSH hepático en ratas adultas Wistar (200-250 g), a las cuales se les administró una única dosis de etanol al 20% (3.5 g/Kg) por vía intraperitoneal.

2) Altomare y cols. (1996) constataron una reducción significativa de los niveles de GSH y un incremento significativo de los niveles de MDA y grupos carbonilo en el páncreas de ratas adultas Sprague-Dawley (180-200 g), sometidas a una sola administración de etanol al 25% (4 g/Kg). En este procedimiento se utilizó la técnica de gavage.

3) Husain y Somani (1997) verificaron una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GR, y un aumento significativo de los niveles de MDA, en el hígado de ratas adultas Fisher 344, a las cuales, previamente, se había administrado una única dosis de 1.6 g/Kg de etanol al 20% por intubación orogástrica.

4) Schlorff y cols. (1999) observaron, tras la administración, en ratas adultas Fisher 344, de etanol a diversas dosis (2, 4 y 6 g/Kg), en una única sesión y por intubación orogástrica, alteraciones significativas en la actividad de la GR y de la SOD en plasma, así como un incremento en los niveles de MDA.

5) En 2002, Zhou y cols. encontraron una disminución de las ratios NAD^+/NADH y GSH/GSSG y un incremento de la actividad de la isoforma CYP2E1 y de los niveles del anión superóxido (O_2^-), junto con peroxidación lipídica y oxidación de proteínas, en el hígado de ratones adultos normales (9 semanas), a los cuales se administró tres dosis de etanol al 25% (5 g/Kg cada 12 horas) mediante gavage.

6) Kim y cols. (2008) encontraron un déficit en los niveles hepáticos de GSH y un aumento de MDA, en una investigación desarrollada en ratones adultos C57BL/6 que recibieron etanol al 50% (5 g/Kg cada 12 horas) por vía oral, en un total de tres dosis.

7) Artun y cols. (2010) utilizando ratas adultas Wistar sometidas a un tratamiento con tres dosis de etanol al 33% (5 g/Kg cada 12 horas), por vía oral, identificaron en el hígado, un incremento significativo de los niveles de MDA y una reducción significativa en los niveles de GSH, vitamina C y vitamina E, así como en la actividad de la enzima antioxidante GPx.

8) Más recientemente, en 2012, Kalaz y cols. utilizando ratas adultas Sprague-Dawley, a las cuales administraron tres dosis de etanol al 40% (5 g/Kg cada 12 horas), por gavage, comprobaron la existencia de alteraciones en la actividad de diversas enzimas antioxidantes, así como un aumento significativo de los niveles de MDA en el corazón.

4.4. “BINGE DRINKING” Y DAÑO HEPÁTICO

La repercusión del consumo crónico del alcohol sobre el hígado es bien conocida y ampliamente descrita por los investigadores. Sin embargo, los efectos nocivos del “binge drinking” a nivel hepático están siendo recientemente elucidados, existiendo estudios parciales sobre diferentes mecanismos implicados. Así, aunque el “binge drinking” está bien asociado a problemas sociales y de salud pública, todavía no se conocen bien las consecuencias que este patrón de consumo de alcohol puede desencadenar en el hígado. Por tanto, ya que el hígado es el principal órgano donde el alcohol es metabolizado y puesto que el fenómeno “binge drinking” parece estar muy difundido actualmente entre los jóvenes adultos de todo el mundo, sería de interés analizar en profundidad los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo del daño hepático (Waszkiewicz y cols., 2009).

En modelos animales una dosis aguda de etanol, es decir, un episodio aislado de “binge drinking”, provoca un aumento de la permeabilidad intestinal, llevando a un incremento de los niveles de la endotoxina lipopolisacárido en la circulación portal

(Mathurin y cols., 2000; Massey y Arteel, 2012). Además, el “binge drinking” genera un aumento de los niveles de óxido nítrico en suero, lo que juega un papel importante en la regulación de la presión en la vena porta, regulada en parte por la endotoxina (Oekonomaki y cols., 2004). Estos cambios que se verifican a nivel intestinal *per se* sensibilizan las células hepáticas frente a los efectos nocivos ocasionados por los productos resultantes del metabolismo oxidativo del etanol (Mathurin y Deltenre, 2009).

Como hemos mencionado anteriormente, el “binge drinking” lleva a una depleción del GSH mitocondrial, lo que además de incrementar el estrés oxidativo puede comprometer la función mitocondrial. A su vez, el estrés oxidativo resultante del “binge drinking” conduce a una degradación del DNA hepático mitocondrial (Mansouri y cols., 2001). También se ha podido demostrar que los modelos que reproducen este tipo de ingesta alcohólica desencadenan la inducción de la isoforma CYP2E1, provocan esteatosis microvesicular junto con necrosis en el hígado y originan un aumento de las transaminasas séricas (Artun y cols., 2010). Además, se postula que el “binge drinking” puede desencadenar apoptosis hepática a través del incremento de la expresión de Fas, un conocido receptor de muerte celular, y por el aumento de la liberación del citocromo *c* (Zhou y cols., 2001; Wang y Cederbaum, 2007). Estas moléculas ponen en marcha una cascada de enzimas específicas, llamadas caspasas, que conducen a la muerte celular (Conde de la Rosa y cols., 2008).

Por otra parte, es importante destacar que la susceptibilidad de las células hepáticas a este tipo de consumo difiere de acuerdo con el tipo de célula. Así, las células del endotelio sinusoidal parecen ser las primeras afectadas, antes incluso que las células parenquimatosas. El “binge drinking” hace vulnerables a las células del endotelio sinusoidal ya que activa la isoforma CYP2E1 y reduce el GSH. La toxicidad generada en estas células deteriora la microcirculación hepática, induciendo lesión isquémica en las células parenquimatosas (Zhong y cols., 1999; McCuskey y cols., 2005).

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

episodios (McCuskey y cols., 2005). Por otra parte, se ha constatado, que tras una sesión de “binge drinking”, las células de Kupffer presentan, inicialmente, tolerancia a la acción de la endotoxina lipopolisacárido, pero desarrollan posteriormente, una fuerte sensibilización debida, en parte, a un aumento de los receptores CD14 en las células de Kupffer (Enomoto y cols., 1998).

Por otro lado, ante una intoxicación aguda de etanol, se verifica un rápido incremento en la síntesis del DNA mitocondrial, contraria a la depleción que sigue a este tipo de conducta. Sin embargo, tras repetidos episodios de “binge drinking”, este mecanismo protector queda comprometido. Parece ser que el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica resultantes de la activación paulatina de la CYP2E1 contribuyen a ello, ya que el incremento gradual de los productos resultantes de la peroxidación lipídica impide la normal reparación del DNA mitocondrial, contribuyendo, de este modo, a un déficit significativo del DNA mitocondrial hepático (Cahill y cols., 2002; Demeilliers y cols., 2002).

El consumo de alcohol en la forma de “binge drinking” también puede provocar esteatosis por un aumento de la resistencia hepática a la insulina. Se postula que la proteína kinasa C-epsilon (PKC ϵ) es una molécula que inhibe la fosforilación del residuo tirosina en el sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2), y por lo tanto, afecta la señalización hepática de la insulina. Por otra parte, tras este tipo de ingesta alcohólica, se ha verificado un significativo incremento de ácidos grasos libres no esterificados. Esto, a su vez, conduce a un aumento de la producción de diacilglicerol (DAG), por medio de la vía del triacilglicerol. Los DAG formados activarían el PKC ϵ , lo cual exacerbaría la acumulación hepática de lípidos al inducir insulino-resistencia (Kaiser y cols., 2009).

El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es una proteína de fase aguda que, normalmente, se expresa en los adipocitos y en las células endoteliales, sin embargo, parece tener una fuerte presencia en casi todas las células como respuesta al estrés. El PAI-1 inhibe el activador tisular del plasminógeno (tPA) y la uroquinasa (uPA) (ambos activadores del plasminógeno), jugando de este modo un papel crucial en el metabolismo de la fibrina, al inhibir la fibrinólisis (Massey y Arteel, 2012; Shukla y

cols., 2013). La activación del PAI-1 detectada durante el “binge drinking” también puede ser considerada un mecanismo potencial de daño hepático. Así, estudios recientes sugieren que el PAI-1 puede contribuir al desarrollo de diversas fases de la enfermedad hepática alcohólica (esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis) ya que interfiere en la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad, favoreciendo el estado de esteatosis. Aunque el estado de esteatosis es reversible con la abstinencia, la acumulación de grasa hace que las células hepáticas sean más sensibles a otros estímulos nocivos, como es el caso de una endotoxemia significativa, propiciando un daño superior, denominado esteatohepatitis. El bloqueo de la fibrinólisis inducida por el PAI-1 y, la consecuente acumulación de fibrina, parece contribuir al desarrollo de la inflamación hepática que se verifica ante estos estímulos. Por otro lado, la influencia de PAI-1 en el estado de fibrosis, es todavía poco clara, dado que esta proteína parece desempeñar un doble papel en este proceso. Parece ser que esta proteína tiene además una función protectora que contribuye a la regeneración de las células hepáticas dañadas, probablemente, por inhibición de las colagenasas intersticiales durante las etapas tempranas de la fibrosis (Beier y Arteel, 2012).

En el ámbito epidemiológico hay datos que sugieren un incremento en la incidencia de cirrosis en países con una cultura de “binge drinking”. Como consecuencia, se ha detectado un aumento de la mortalidad por cirrosis en este tipo de países (Mathurin y Deltenre, 2009).

Finalmente, teniendo en cuenta que tras altas dosis de alcohol, la isoforma CYP2E1 (enzima especialmente oxidante) está inducida para metabolizar el alcohol a nivel hepático, y que existe una disminución de GSH y un aumento de MDA, sería interesante analizar el balance oxidativo y su relación con el daño hepático, especialmente durante la adolescencia.

5. ALCOHOLISMO CRÓNICO

5.1. GENERALIDADES

El término alcoholismo crónico se refiere a un consumo excesivo de alcohol durante un período prolongado de tiempo. Fue acuñado originalmente en 1849 por Magnus Huss y hasta la década de 1940 hacía referencia fundamentalmente a las consecuencias físicas de este tipo de consumo. Otro concepto más estricto es el alcoholismo considerado como una enfermedad, que está marcado por la pérdida de control sobre la bebida, causado por una alteración biológica preexistente y que tiene una evolución progresiva previsible. Más adelante, Jellinek y otros autores emplearon el término para designar el consumo de alcohol que provoca cualquier tipo de daño (físico, psicológico, individual o social). La imprecisión del término hizo que un Comité de Expertos de la OMS lo desaprobara en 1979, dando preferencia a una expresión más concreta, síndrome de dependencia del alcohol, que es uno de los muchos problemas relacionados con el alcohol. Este concepto abarca un “conjunto de manifestaciones fisiológicas, de conducta y cognitivas, y que típicamente incluyen un fuerte deseo de consumir, dificultad en controlar el uso (se consume más o durante más tiempo del deseado o existen intentos infructuosos de abandonar la sustancia), persistencia en el consumo a pesar de consecuencias negativas, reducción o abandono de actividades sociales, ocupacionales o recreativas para consumir o como consecuencia del consumo, aumento de la tolerancia, aparición de síntomas de abstinencia o consumo para evitar los síntomas”. Pese a su significado ambiguo, el término todavía se utiliza de forma generalizada con fines diagnósticos y descriptivos. Se estima que el consumo regular de más de 40 g en la mujer y más de 60 g en el hombre es perjudicial a la salud, pudiendo ocasionar daño físico y/o mental (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008).

Para el cribado de este grave problema sociosanitario disponemos de varios exámenes, desde cuestionarios, como el AUDIT, hasta la petición de marcadores biológicos de consumo de alcohol, como la determinación de marcadores clásicos como la gamma-glutamyl-transferasa (GGT), el volumen corpuscular medio (VCM), la aspartato-aminotransferasa (AST), la alanina-aminotransferasa (ALT), o la medida de otros más modernos como la transferrina deficiente en carbohidratos (TDC).

El AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) fue desarrollado por la OMS. Incluye 10 preguntas que cubren tres campos de interés: consumo de riesgo, problemas relacionados con el alcohol y dependencia alcohólica. Cada pregunta se puntúa de 0 a 4, y la suma final permite identificar, en función del punto de corte, tanto los consumos de riesgo como la dependencia alcohólica. Un punto de corte igual o superior a 8 nos remite a la presencia de un consumo de riesgo y para una probable dependencia del alcohol. El AUDIT ha sido estudiado en una gran diversidad de países y culturas, presentando una fiabilidad superior a otro tipo de cuestionarios específicos (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008).

La TDC es considerada como el marcador biológico más específico para detectar el consumo crónico de alcohol. Diversos estudios indican que la ingesta crónica de alcohol induce isoformas de TDC, disminuyendo la carga eléctrica negativa y elevándose como consecuencia el punto isoeléctrico, propiedades que son útiles para su detección por técnicas de separación. Estos cambios son consumo-dependientes, de forma que aumentos en el consumo de alcohol se acompañan de mayor número de isoformas deficitarias de ácido siálico y de menor carga eléctrica negativa. Un valor de TDC en suero, inferior a 21 U/L en hombres, generalmente, es considerado normal. El consumo de 50-80 g o más de alcohol diarios durante al menos una semana puede provocar elevaciones en los niveles séricos de TDC. Después de 2 a 4 semanas de abstinencia los valores séricos se normalizan (Soriano y cols., 2002; Golka y Wiese, 2004; Hock y cols., 2005).

La GGT es una enzima glicoproteica que se encuentra en las membranas celulares de numerosos tejidos. En el hígado se sitúa en las membranas del hepatocito y en los microsomas de las células, particularmente en las ubicadas en los conductillos biliares. La actividad sérica de esta enzima, al menos en una persona normal, es de origen hepática. Al contrario de lo que pasa con los consumidores de alcohol en la modalidad de “binge drinking”, la GGT se incrementa en los consumidores alcohólicos crónicos, pero este aumento también puede ser debido, a la presencia de enfermedades hepáticas no alcohólicas. La sensibilidad y la especificidad de la GGT es muy variable de acuerdo con los diversos estudios realizados, siendo ligeramente superior a la de otros marcadores como el VCM, con excepción del TDC. El uso combinado de la GGT y del

TDC se considera más eficaz que la utilización aislada de cada uno de los marcadores *per se* o que la combinación del TDC o del GGT con otros marcadores (Pascual y cols., 2002; Neumann y Spies, 2003; Hannuksela y cols., 2007).

La AST es una enzima mitocondrial que se encuentra predominantemente en el hígado, estando también presente en el músculo esquelético, corazón, páncreas, riñón, cerebro, pulmón y en los glóbulos rojos y blancos. La ALT es citosólica y se ubica mayoritariamente en el hígado. Aunque, elevaciones séricas de AST y ALT se verifican a menudo en pacientes con enfermedad hepática alcohólica, estas alteraciones, lo único que, meramente, reflejan es la presencia de daño hepático, aunque se cuestiona su fiabilidad como marcadores de consumo alcohólico crónico *per se* (Neumann y Spies, 2003; Tavakoli y cols., 2011).

El VCM es otro marcador de consumo crónico de alcohol, que se correlaciona con la cantidad y la frecuencia de la ingesta de alcohol. Una ingesta superior a 60 g por día de alcohol durante un mes lleva a un incremento de los niveles de VCM, siendo necesarios varios meses de abstinencia para que estos regresen a valores normales. Cuando el VCM está aumentado los glóbulos rojos son anormalmente grandes o macrocíticos, hecho que es frecuente en otras circunstancias de etiología no ética, como es el caso de las anemias, de las enfermedades hepáticas no alcohólicas o en presencia de patología tiroidea (Soriano y cols., 2002; Neumann y Spies, 2003).

Estos exámenes analizados en su globalidad constituyen una herramienta valiosa para la detección de este patrón de consumo de alcohol, que constituye, uno de los principales problemas de salud pública, con diversas implicaciones sociales, laborales, económicas y médicas.

Así, el consumo del alcohol de forma crónica se ha asociado al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, pero también a múltiples enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden hacer peligrar la vida de los sujetos con este tipo de comportamiento. Diversas investigaciones demuestran su relación con varias patologías, en diversos órganos y sistemas del organismo. Concretamente, hay que destacar sus efectos sobre el hígado (esteatosis, hepatitis alcohólica, cirrosis), el sistema

cardiovascular (miocardiopatía alcohólica), páncreas (pancreatitis aguda y crónica), sistema nervioso central (atrofia cerebral y cerebelosa, encefalopatías), nervios periféricos (polineuropatía alcohólica), sistema músculo-esquelético (osteoporosis, miopatía alcohólica) y sobre el feto (síndrome alcohólico fetal). También puede dar origen a enfermedades psicorgánicas (amnésia lacunar, demencia alcohólica), así como a trastornos psicóticos (alucinaciones, celotipia alcohólica) u otros desórdenes psiquiátricos como ansiedad y depresión (Gual, 2002; Conde de la Rosa y cols., 2008). Además, se estima que el consumo crónico del alcohol es responsable de alrededor del 3.6% de los cánceres detectados en todo el mundo, siendo un factor de riesgo importante para diversos tipos de cáncer (Seitz y Stickel, 2007) (Figura 11).



Figura 11. Efectos asociados al alcoholismo crónico.

Aunque el desarrollo de estas enfermedades depende de manera significativa de la cantidad de alcohol ingerida por los pacientes (dosis total de alcohol acumulada durante toda la vida del individuo), hay que realzar que otros factores como la predisposición genética, el sexo, la dieta y el medio ambiente, determinan la propensión de una persona para desarrollar una enfermedad relacionada con el alcohol (Gual, 2002; D'Souza El Guindy y cols., 2010).

5.2. ALCOHOLISMO CRÓNICO Y BALANCE OXIDATIVO

El consumo crónico de alcohol provoca un incremento de ERO y altera los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, induciendo daño oxidativo en biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA. Tal hecho es corroborado por diversos estudios realizados en animales y humanos, en varios órganos y sistemas del organismo.

En **animales** sometidos a diferentes métodos de alcoholización crónica se ha visto que el balance oxidativo puede variar de acuerdo con el tejido estudiado, la disponibilidad basal de otros antioxidantes, la ruta de administración del alcohol y la edad de los animales estudiados (Ojeda, 2012).

En **humanos**, los estudios de la actividad antioxidante en pacientes alcohólicos crónicos se ha realizado principalmente en muestras de suero y plasma, así ya en 1994, Lecomte y cols. identificaron una reducción significativa de los niveles de selenio, de vitamina C y vitamina E, en el plasma de pacientes alcohólicos crónicos. Además, constataron que se elevaba significativamente la actividad plasmática de SOD y de GPx, y se verificaba un incremento, de igual forma significativo, de los niveles de MDA en suero.

En una investigación llevada a cabo por Mutlu-Tükoglu y cols. (2000) se detectó un aumento significativo de los niveles de los grupos carbonilo de proteínas, en el suero de pacientes alcohólicos crónicos. En otro estudio, Peng y cols. (2005) observaron un incremento significativo de los niveles de MDA y una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD, en el suero de pacientes alcohólicos

crónicos. Más recientemente, en 2011, Chen y cols. encontraron un aumento significativo de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (un marcador de daño oxidativo al DNA) y de MDA en suero de pacientes alcohólicos crónicos.

Los resultados contradictorios encontrados en la literatura sobre la actividad de diversas enzimas antioxidantes, probablemente, pueden explicarse por las distintas características de las muestras utilizadas como: tamaño de la muestra, edad de los pacientes, cantidad de alcohol consumido, tiempo de dependencia o existencia de enfermedades hepáticas asociadas y, en caso afirmativo, por la severidad de las mismas.

5.3. ALCOHOLISMO CRÓNICO Y DAÑO HEPÁTICO

El alcoholismo crónico induce daño hepático por diversas vías. Entre estas destacan: el estrés oxidativo como resultado del metabolismo del alcohol, los cambios producidos a nivel inmunológico e inflamatorio, la depleción de GSH, el metabolismo anormal de la metionina y del hierro, y la malnutrición (Figura 12). Todos estos puntos fueron abordados extensamente en los apartados 2 y 3.

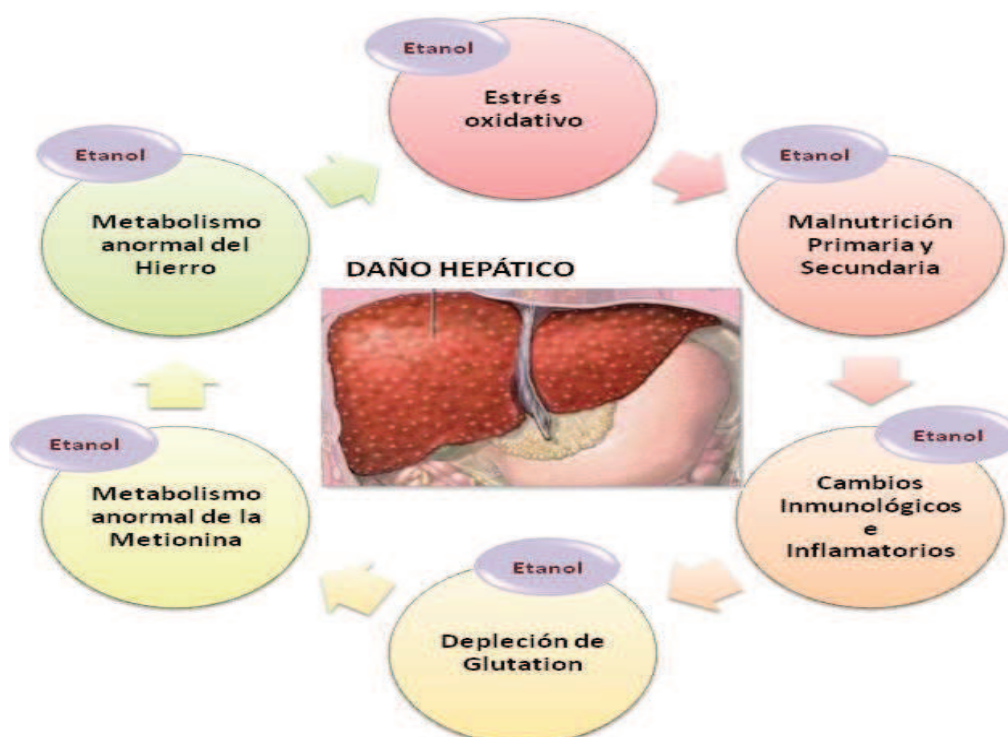


Figura 12. Principales mecanismos involucrados en el daño hepático asociado al consumo crónico de alcohol.

II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existe una gran parte de adolescentes y jóvenes adultos que consumen alcohol de manera excesiva en períodos discontinuos (patrón de consumo tipo botellón). A pesar de su interés sanitario y económico, los actuales modelos animales que reproducen esta administración, probablemente, no transmiten la información más exacta sobre las consecuencias de este consumo, pues en su mayoría son modelos poco fisiológicos basados en la administración de alcohol por vía intraperitoneal, que evitan el primer metabolismo del alcohol a nivel gástrico, y sus efectos sobre el sistema digestivo, además de generar estrés adicional.

Por otro lado, el Se, un nanoelemento potencialmente antioxidante, por formar parte del centro activo de la familia de las enzimas antioxidantes GPxs, se ha visto modificado tras el consumo crónico de alcohol, probablemente, por la acción pro-oxidante de esta droga y la malnutrición que genera.

Instigados por este contexto, suponemos que según la vía de administración del alcohol, en ratas, podríamos encontrar diferentes efectos sobre los niveles de Se y, por tanto, sobre los sistemas de defensa antioxidante en suero e hígado, aún cuando sea un consumo agudo y discontinuo. Además, puesto que el Se es un componente importante de las selenoproteínas hepáticas, probablemente encontremos alteraciones en la expresión de estas selenoproteínas, y por tanto en sus acciones biológicas.

Por otro lado, al tener difícil el acceso a muestras biológicas de adolescentes afectados por el “efecto botellón”, y habiendo obtenido muestras de pacientes alcohólicos crónicos, con y sin daño hepático, pensamos que los niveles séricos de Se y de GPx, así como el estado oxidativo en estos pacientes, podría servir como marcador de diagnóstico de este consumo, ya que en pacientes con daño hepático de etiología no alcohólica, también se ha encontrado una disminución de los niveles de Se en suero.

Los objetivos prioritarios en ratas son:

1) Desarrollar un nuevo modelo experimental de administración alcohólica, por vía oral, que pueda reproducir de forma más fisiológica el patrón de consumo tipo “botellón”, caracterizarlo y compararlo con el método existente de administración alcohólica por inyección intraperitoneal.

2) Analizar en ambos modelos, los efectos del consumo agudo y discontinuo de alcohol sobre:

- El balance oxidativo a través de las enzimas antioxidantes (GPx, GR, SOD y CAT) en suero y/o hígado;
- La oxidación de diferentes biomoléculas, como los lípidos, las proteínas y el DNA;
- La homeostasis/biodisponibilidad del Se en la expresión de selenoproteínas hepáticas.

Los objetivos prioritarios en humanos son:

1) Analizar los niveles de Se en pacientes alcohólicos crónicos con o sin daño hepático, con el fin de observar si este nanoelemento sirve como marcador diferenciador de ambas situaciones.

2) Relacionar los niveles de Se en suero con la actividad antioxidante estudiando las enzimas antioxidantes GPx, GR, SOD y la oxidación de lípidos y proteínas.

III- MATERIAL Y MÉTODOS

III- MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL - ANIMALES

Para la realización del trabajo los animales (ratas) se distribuyeron, de manera aleatoria, en cuatro grupos experimentales denominados grupo control oral (CO), grupo alcohol oral (AO), grupo control intraperitoneal (CIP) y grupo alcohol intraperitoneal (AIP). Las condiciones experimentales de cada grupo fueron:

- CO:** alimentado *ad libitum* con comida y agua;
- AO:** alimentado *ad libitum* con comida y agua o alcohol al 20% (v/v) en el agua de bebida, tres días en semana;
- CIP:** alimentado *ad libitum* con comida y agua y que recibirá, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina;
- AIP:** alimentado *ad libitum* con comida y agua y que recibirá, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).

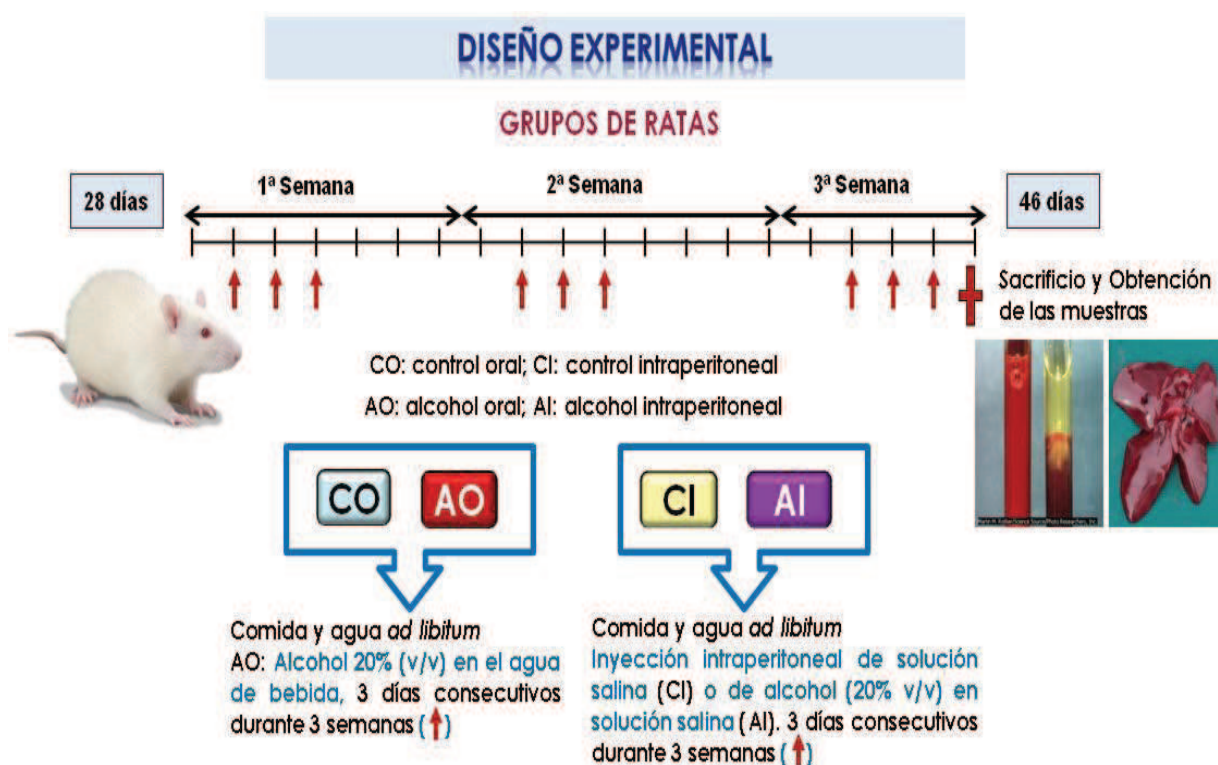


Figura 13. Condiciones experimentales y métodos de alcoholización.

1.1. Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron 60 ratas de la raza Wistar procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Una vez aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales a utilizar, las ratas, de 28 días, fueron distribuidas en varias jaulas de plástico, con libre acceso a la comida y a la bebida, teniendo en consideración su grupo de procedencia. Las jaulas se alojaron en una habitación del Animalario de la Facultad de Farmacia, aireada y termorregulada a 22-23°C, con fotoperiodos controlados de 12h (de 9:00 a.m. a 21:00 p.m.). Los animales estuvieron en estas condiciones durante el periodo que correspondía a su etapa adolescente (tres semanas) y hasta el momento en que fueron sacrificados. Antes del sacrificio, las ratas permanecieron en período de ayuno de 12 horas.

1.1.1. Dieta utilizada

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética (Harlan Laboratorios) que cubría todas las necesidades nutricionales y energéticas.

1.1.2. Métodos de alcoholización

El método de alcoholización que se utilizó para el grupo alcohol intraperitoneal (AIP) tuvo como base la administración por vía intraperitoneal, tres días por semana y durante tres semanas, de etanol (3 g/Kg) en solución salina al 20% (v/v) (Callaci y cols., 2010). Al grupo control intraperitoneal (CIP) se le inyectó solución salina, durante el mismo período de tiempo, en un volumen similar a las ratas del grupo AI. Por otro lado, al grupo alcohol oral (AO) se le administró etanol al 20% (v/v) en el agua de bebida *ad libitum*, tres días en semana y durante un período de tres semanas con la finalidad de simular un patrón de bebida tipo “binge drinking” más fisiológico durante la etapa adolescente (Figura 13).

1.1.3. Estudio nutricional

Diariamente y durante las tres semanas de tratamiento, se determinó la ingesta líquida (ml/día) y la ingesta sólida (g/día), por diferencia de volumen de líquido en los biberones y por diferencia entre el pienso colocado y el residuo sobrante utilizando una balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1 g de precisión).

La ingesta de selenio ($\mu\text{g}/\text{día}$) se calculó a partir de los datos de la ingesta sólida, teniendo en cuenta el selenio presente en la dieta (0.23 mg/Kg). Las calorías diarias aportadas por la dieta sólida y por la bebida de alcohol se calcularon a partir de los datos de ingesta sólida (3.96 Kcal/g pienso ingerido) y líquida (7.1 Kcal/g alcohol ingerido), utilizando las tablas de conversión de Veale y Myers (1968).

1.1.4. Estudio macroscópico

Para controlar el desarrollo de los animales, desde el comienzo del tratamiento hasta el día del sacrificio, las ratas se pesaron diariamente utilizando una balanza analítica (COBOS D-2000-SX de 0.1 g de precisión). Para evitar diferencias debidas al ritmo circadiano, el análisis se efectuó siempre por la mañana, entre las 9:00 – 10:00 a.m.

Una vez concluida la adolescencia, y por tanto, el periodo experimental, los animales se pesaron antes de ser sacrificados y, tras ser anestesiados como se explica en el apartado 1.2.1., se procedió a la extracción y pesado del hígado. Además se determinó el desarrollo proporcional del hígado con respecto al peso de cada animal según la formula del índice organosomático (IOS). En la Tabla 2 se representan las mediciones hechas a cada uno de los parámetros referenciados:

Parámetros	Indicador de Medida
Peso total corporal	g
Peso del órgano	g
Índice organosomático (IOS)	$(\text{Peso del órgano}/\text{Peso total}) \cdot 100$

Tabla 2. Parámetros morfológicos.

1.2. Toma y procesamiento de las muestras de ratas

1.2.1. Obtención y tratamiento de las muestras de sangre

Una vez anestesiado el animal con uretano al 28% p/v (0.5 ml/100 g peso), se extrajo la sangre mediante punción cardiaca. Enseguida, se dejó retraer el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C hasta ser utilizado para la determinación de los diversos parámetros.

1.2.2. Obtención y tratamiento de las muestras de hígado

Simultáneamente a la obtención de la sangre y tras laparotomía media, se localizó el hígado y se procedió a su extracción, determinando su peso. El órgano se lavó con solución salina fisiológica fría (NaCl 0.9% p/v, 4°C) hasta que alcanzó una coloración blanquecina. Posteriormente, se introdujo en N₂ líquido y se congeló a -80°C hasta el momento de realización de los análisis.

1.2.3. Obtención y tratamiento de las muestras de orina

La recolección de la orina se llevó a cabo colocando las ratas individualmente en jaulas de metabolismo, en ayuno y teniendo libre acceso a la bebida durante un periodo de 12 horas. Tras medir el volumen total, la orina se dividió en alícuotas y se conservó a -80°C hasta su utilización.

1.2.4. Obtención y tratamiento de las muestras de heces

La recolección de las heces se realizó con jaulas metabólicas con el mismo método utilizado para la obtención de orina. Las muestras de heces se pesaron y se sumergieron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C para su posterior tratamiento.

1.2.5. Estudio de índices biológicos

Para determinar la absorción y el balance de selenio aparente se emplearon los siguientes índices:

a) **Coefficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A):**

$$\text{C.D.A} = (\text{A/I}) \times 100$$

$$\text{A} = \text{I} - \text{F}$$

b) **Balance Aparente (B):**

$$\text{B} = \text{I} - (\text{F} + \text{U})$$

Las siglas usadas en estas fórmulas, son las indicadas por la FAO/OMS (1966):

A = Selenio absorbido.

I = Selenio ingerido.

F = Selenio en la excreción fecal.

U = Selenio en la excreción urinaria.

1.2.6. Homogeneizaciones hepáticas

1.2.6.1. Homogeneización hepática para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración total de proteínas, el hígado congelado se pesó, se troceó y se sumergió en proporción 1:4 p/v en el tampón de sacarosa detallado en la Tabla 3, utilizando un homogeneizador de tejidos con pistillo de teflón (Pobel 245432, España). El pH del tampón se ajustó con HCl (PANREAC) (pH = 7, a 4°C).

Posteriormente, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 3000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se separó con una micropipeta y se dividió en alícuotas que posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento de los análisis.

Reactivo	Concentración
Sacarosa (ROIG FARMA)	250 mM
TRIS (SIGMA-ALDRICH)	15 mM
DTT (SIGMA)	1 mM
EDTA (SIGMA)	1 mM

Tabla 3. Composición del tampón de sacarosa.

1.2.6.2. Homogeneización hepática para la determinación de la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas

El hígado se homogeneizó en una dilución 1:4 p/v en tampón fosfato potásico, cuya composición se registra en la Tabla 4, a pH = 7, a 4°C. Para ello, el órgano se procesó del mismo modo que en el caso anterior. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, separando el sobrenadante y centrifugándolo nuevamente a 15000 r.p.m. durante 15 minutos a la misma temperatura. El sobrenadante final se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta que se realizaron las determinaciones.

Reactivo	Concentración
K ₂ HPO ₄ (PANREAC)	10 mM
KH ₂ PO ₄ (PANREAC)	10 mM

Tabla 4. Composición del tampón fosfato potásico.

1.2.6.3. Homogeneización hepática para la determinación de proteínas por inmunodetección “Western Blotting”

El hígado se homogeneizó en tampón fosfato preparado con los reactivos que se detallan en la Tabla 5, en una dilución 1:10 p/v.

Reactivo	Concentración
K ₂ HPO ₄ (PANREAC)	50mM
KH ₂ PO ₄ (PANREAC)	50mM
EDTA (SIGMA)	0.01mM

Tabla 5. Composición del tampón fosfato.

Previamente, un inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, ROCHE) fue añadido al tampón fosfato en la proporción 1/10.

Por fin, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 2000 g. durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante final se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta llevar a cabo la determinación de proteínas totales y la inmunodetección de proteínas.

2. POBLACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL – HUMANOS

Se llevó a cabo un estudio transversal y comparativo entre pacientes alcohólicos con o sin enfermedad hepática, pacientes no alcohólicos con enfermedad hepática, así como, en un grupo de voluntarios que actuaron como control. Todos los pacientes estaban adscritos a los Departamentos de Medicina Interna o Digestiva de los Hospitales Universitarios Virgen de Valme y Virgen Macarena, en Sevilla. El grupo control estaba formado por personal sanitario clínicamente sano elegido aleatoriamente de acuerdo a la edad de los pacientes. Todos los participantes fueron hombres y presentaron una nutrición adecuada sin acceso a suplementos dietéticos o fármacos que alterasen el equilibrio oxidativo.

En este estudio, el diagnóstico, y por tanto, la asignación a los grupos se realizó de acuerdo a los análisis clínicos, bioquímicos y radiológicos, y al consumo activo de alcohol. La enfermedad hepática, que presentaban alguno de los pacientes, abarcaba desde una simple esteatosis hasta la cirrosis. Pacientes con otras patologías fueron excluidos.

Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes. La investigación se llevó a cabo, según las normas de la Declaración de Helsinki, tras aprobación del Comité de Ética de los Hospitales involucrados y de la Universidad de Sevilla.

Los grupos objeto de estudio fueron los siguientes:

- a) Pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático (n=44) (**A**): pacientes con un consumo activo de alcohol > 60 g/día, con niveles de transferrina deficiente en carbohidratos (TDC) ≥ 21 y AUDIT > 8 . La presencia de daño hepático, detectado por hallazgos clínicos, bioquímicos y de radiología, se consideró como factor de exclusión.
- b) Pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático (n=31) (**AH**): pacientes con un consumo activo de alcohol > 60 g/día, con niveles de transferrina deficiente en carbohidratos (TDC) ≥ 21 y AUDIT > 8 , y con evidencia de daño hepático detectado por análisis clínicos, bioquímicos y pruebas de radiología. En este grupo, 7 pacientes presentaban cirrosis, diagnosticada por biopsia. Se excluyeron aquellos pacientes que posean testes positivos para los anticuerpos de la hepatitis B o C.
- c) Pacientes con daño hepático no alcohólico (n=32) (**H**): pacientes con daño hepático comprobado por hallazgos clínicos, bioquímicos y de radiología. Este grupo incluía a 8 personas con cirrosis, siendo su diagnóstico corroborado por biopsia. El consumo de alcohol > 20 g/día se consideró como criterio de exclusión.
- d) Controles (n=50) (**C**): voluntarios sanos que bebían alcohol solo de forma esporádica y siempre por debajo de 20 g/día. Se incluyeron individuos sanos sin enfermedad física o psíquica conocida, seleccionados por medio de entrevista, examen físico y de acuerdo a los normales resultados obtenidos por exámenes de laboratorio rutinarios.

En todos los pacientes se midieron los siguientes parámetros bioquímicos: volumen corpuscular medio (VCM), aspartato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil-transferasa (GGT), transferrina deficiente en carbohidratos (TDC), glucosa, urea, sodio, potasio, creatinina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina,

colesterol y triglicéridos. Los valores encontrados estaban de acuerdo con la Guía Práctica del Comité de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (O`Shea, 2010).

2.1. Toma de las muestras de sangre

Se extrajo una muestra de sangre venosa mediante punción antecubital bajo condiciones asépticas. Las muestras fueron obtenidas entre las 8.00 y las 9.00 de la mañana, en ayunas. Todos los participantes, además, debían guardar un período de abstinencia de consumo de tabaco de por lo menos 12 horas. La sangre extraída se depositó en dos tubos, uno con anticoagulante, para determinar los parámetros hematológicos y otro sin él. Tras la formación del coágulo en el 2º tubo (30 min) se centrifugó la sangre y el suero obtenido se almacenó a -80°C.

2.2. Determinación de la concentración total de proteínas

Se llevó a cabo de acuerdo con el apartado 3.1., teniendo en consideración que el suero fue diluido a 1/4500.

2.3. Determinación de selenio

La determinación de Se en suero se efectuó de acuerdo con el apartado 3.3.

2.4. Determinaciones enzimáticas y de biomoléculas

La medición de la actividad GPx, GR, SOD y la determinación de la oxidación de lípidos y de proteínas se realizó en consonancia con los apartados 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.5., 3.4.6., teniendo en cuenta que para la determinación de la GPx se utilizó una dilución de suero 1/5 y para la GR y SOD se usó 40µl y 10µl de suero puro, respectivamente.

3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.1. Determinación de la concentración total de proteínas

Para expresar la actividad de las enzimas antioxidantes como actividades específicas (U/mg de proteína) así como para poder cuantificar las distintas proteínas por western blotting, determinamos las proteínas totales en el suero y en el homogeneizado de hígado.

Fundamento: La determinación de proteínas se lleva a cabo según el método descrito por Lowry (Lowry y cols. 1951). En este método se hacen reaccionar las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que origina un complejo coloreado. 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.

- a. Reactivo A: Na_2CO_3 2% (p/v) en NaOH 0.1 M.
- b. Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v).
- c. Reactivo C: Tartrato de sodio potasio 2.7% (p/v).
- d. Reactivo D: 1.5 ml de reactivo B y 1.5 ml de reactivo C en 150 ml de reactivo A.
- e. Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteu 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 a partir de la cual, conociendo las concentraciones de los estándares y midiendo sus absorbancias, podemos calcular las concentraciones de las muestras a través de su medida de absorbancia.

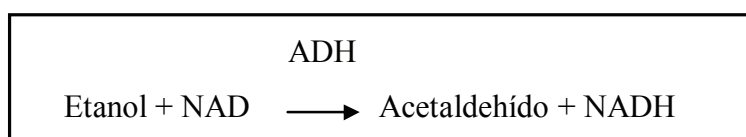
Para ello, se prepara una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 1 mg/ml, a partir de la cual se preparan cuatro soluciones estándares cuyas concentraciones son: P1: 0.1 mg/ml, P2: 0.05 mg/ml, P3: 0.025 mg/ml y P4: 0.0125 mg/ml.

A continuación, en tubos de ensayo se mezclan 5 ml de reactivo D con: 1 ml de suero en el caso de las muestras (diluido con agua bidestilada 1/1000, para las enzimas antioxidantes) o 1 ml de homogeneizado de hígado de ratas (diluido con agua bidestilada 1/500, para las enzimas antioxidantes y 1/300 para la determinación de la presencia de proteínas por western blotting), 1 ml de estándares en el caso de los patrones o 1 ml de agua bidestilada en el caso del blanco, y se dejan reposar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 0.5 ml de reactivo E a los tubos, se agitan y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a 750 nm.

Cálculos: La concentración de proteínas totales en las muestras se calcula utilizando la curva patrón de albúmina de concentraciones conocidas. Tanto las muestras como la curva se analizan por duplicado.

3.2. Determinación de alcohol en orina de ratas

Fundamento: La alcohol deshidrogenasa (ADH) cataliza la oxidación de alcohol a acetaldehído con reducción simultánea del nicotinamín adenín dinucleótido (NAD). El aumento de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de alcohol en la muestra.



Reactivos:

- Vial NAD-ADH (SIGMA).
- Tampón glicina 0.5M, pH 9 (SIGMA).

Procedimiento: Un día antes de la determinación, se colocan las ratas en jaulas metabólicas, en ayuno, y teniendo libre acceso a la bebida, para recoger la orina durante

un periodo de 24 horas en envases que previamente contenían 1 ml de tolueno, a fin de evitar la evaporación del alcohol.

En el día de la determinación se añadió 3 ml del reactivo NAD-ADH, resuspendido en tampón glicina 0.5M, pH 9, en cada uno de los tubos, y 0.01 ml de muestra o de agua bidestilada en el caso del blanco. La mezcla resultante se agitó cuidadosamente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se transfirieron las soluciones a las cubetas y se midió a 340 nm (A_{340}).

Cálculos: El valor de A_{340} lo multiplicamos por un factor “f”, con objetivo de obtener la concentración de alcohol (mg/dl), donde:

$$\text{Alcohol (mg/dl)} = A_{340} \times f$$

Siendo:

$$f = (\text{VTR} \times \text{Pm}) / (\epsilon_{\text{NADH}} \times \text{Vm} \times \text{L})$$

VTR: Volumen total de reacción.

Pm: Peso molecular del etanol.

ϵ_{NADH} : coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Vm: Volumen de muestra (ml).

L: Trayectoria del haz de luz en la cubeta (cm).

Posteriormente, se calculó la cantidad excretada en mg multiplicando la concentración de alcohol por el volumen de orina.

3.3. Determinación de selenio en suero, hígado, heces y orina

La determinación de selenio en suero se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER (Analyst 800) con cámara de grafito (Figura 14).



Figura 14. Espectrofotómetro PERKIN ELMER (Aanalyst 800).

Fundamento: El método se basa en el proceso de absorción atómica, en el que los átomos presentes en la muestra absorben energía luminosa a una longitud de onda específica para cada elemento, pasando a un estado excitado. Mediante el uso de lámparas de cátodo hueco especiales (EDL-PERKIN ELMER) es posible medir la cantidad de luz absorbida durante este proceso, que es proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra, lo que permite la determinación cuantitativa del elemento estudiado. La determinación de selenio por absorción atómica requiere el uso de modificadores de matriz, concretamente sales de paladio y magnesio, que hacen al analito más estable y evitan pérdidas por volatilización debido a las altas temperaturas a las que se somete al elemento en esta técnica.

Tratamiento de las muestras: Las muestras se descongelaron a la temperatura ambiente. El hígado y las heces se sometieron a una temperatura de 110°C durante 48 horas en una estufa (P SELECTA 210) para su desecación completa. El extracto seco obtenido se pesó y comenzó el proceso de digestión húmeda, en un baño de arena caliente (OVAN). Para ello se añadió ácido nítrico (HNO_3 -65%, PANREAC) (1ml / 0.1 g de tejido seco), dejándolo actuar durante cerca de 72 horas, a una temperatura de 120°C hasta conseguir que la tonalidad tornase de un color pardo hasta un amarillo. A continuación, se añadió ácido perclórico (HClO_4 -70%, PANREAC) (0.05 ml/ 0.1g de tejido seco) y se dejó enfriar. Por fin, se añadió ácido clorhídrico (HCl -6N, PANREAC) (0.5 ml/10 ml de muestra).

El suero se diluyó con ácido nítrico (0.2% v/v) (dilución 1/5), añadiendo, a continuación una alícuota de 20 µl de Triton X-100 (0.2% v/v), y la orina se utilizó en su estado puro.

Procedimiento: A partir de una solución estándar de selenio de 1000 mg/L se preparan siete soluciones patrones de distintas concentraciones, con las que se elabora una curva patrón. Las concentraciones se eligen de acuerdo con el rango lineal observado para el elemento y son las siguientes (µg/L): P1=10; P2=25; P3=50; P4=75; P5=100; P6=125; P7=150.

Antes de realizar la determinación, se le añadió a los estándares y a las muestras problema (suero, hígado, heces y orina) los modificadores de matriz de paladio y magnesio, de forma que los 20 µl de mezcla final que se inyectaron en el aparato contenían 5 µg de Pd y 3 µg de Mg. Posteriormente, se procedió a la lectura.

Reactivos:

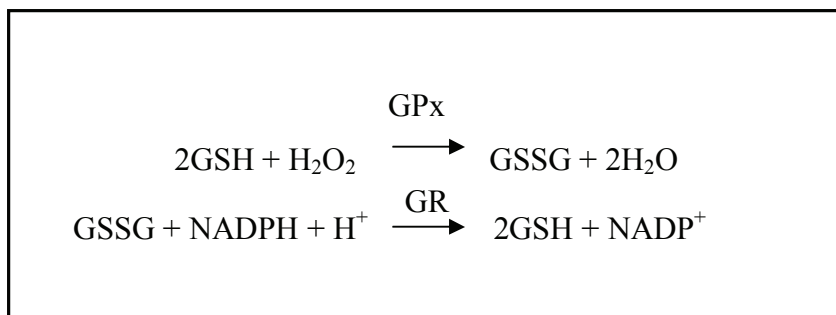
- a. Solución estándar de selenio.....1000 mg/L
- b. Solución Triton X-100.....0.2 % v/v
- c. Solución ácido nítrico (HNO₃).....0.2 % v/v
- d. Modificador de matriz de paladio (Pd(NO₃)₂).....10 g/L
- e. Modificador de matriz de magnesio (Mg(NO₃)₂).....10 g/L

Cálculos: La concentración de selenio en suero y orina se calculó utilizando los valores obtenidos en la recta de calibrado y multiplicando el suero por el factor de dilución 5. La cantidad de selenio en orina se determinó multiplicando la concentración obtenida por el volumen excretado en 24 horas. La concentración de selenio en hígado y heces se calculó teniendo en consideración los valores resultantes de la recta de calibrado y se expresaron en µg Se/g de tejido seco. La cantidad de selenio en heces se determinó de la misma manera que en la orina.

3.4. Determinaciones enzimáticas y de biomoléculas

3.4.1. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa

Fundamento: La enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno en una reacción en que interviene el glutatión. 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 glutatión peroxidasa (GPx) se acopla a la reacción que cataliza la glutatión reductasa (GR), midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH. Los reactivos empleados en este método se encuentran en la Tabla 6.



Reactivo	Concentración
Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7.4, a 4°C)	250 mM
Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA)	10 mM
Solución azida (NaN ₃) (SIGMA)	10 mM
Solución NADPH (en NaHCO ₃ al 0.75% p/v) (SIGMA)	2 mM
Solución GR (en tampón TPK) (SIGMA)	10 U
Solución peróxido de hidrógeno (FORET)	2.5 mM
Solución glutatión reducido (SIGMA)	10 mM

Tabla 6. Reactivos utilizados en la determinación de la GPx.

Procedimiento: En una microcubeta de 1.5 ml de capacidad, se añaden 300 μ l de TPK, 100 μ l de EDTA, 100 μ l de NaN_3 , 100 μ l de NADPH, 100 μ l de GSH, 100 μ l de GR y 100 μ l de suero diluido en agua bidestilada (dilución 1/10) en ratas o 100 μ l de homogeneizado de hígado de ratas (dilución 1/40). Después de incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se inicia la reacción con la adición de 100 μ l de H_2O_2 y se determina la actividad GPx siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Las muestras problema se midieron frente al blanco, que se trató de la misma manera y que contenían agua bidestilada (200 μ l) en lugar de peróxido hidrógeno, para evitar el comienzo de la reacción.

Cálculos: La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se calcula según la fórmula:

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

Donde:

mU = nmol/minuto.

$\Delta A(\text{min})$ = 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 diluido) en ml en la cubeta.

C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/ml).

D = dilución del homogeneizado.

3.4.2. Determinación de la actividad glutatión reductasa

Fundamento: La glutatión reductasa (GR) es una enzima dependiente de nicotinamín adenín fosfato reducido (NADPH), que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH).



La determinación de la actividad glutatión reductasa se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Worthington y Rosemeyer (1974) ligeramente modificado, donde se mide la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH. Los reactivos utilizados se pueden observar en la Tabla 7.

Reactivo	Concentración
Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7.4, a 4°C)	0.066 M
Solución cloruro potásico (ACOFARMA)	2 M
Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA)	10 mM
Solución glutatión oxidado GSSG (SIGMA)	10 mM
Solución NADPH (en NaHCO ₃ al 0.1% p/v) (SIGMA)	1 mM

Tabla 7. Reactivos utilizados en la determinación de la GR.

Procedimiento: Para la determinación en suero, se mezclaron en una microcubeta: 540 µl (en el caso de las muestras de ratas) o 560 µl (en el caso de las muestras humanas) de tampón fosfato, 100 µl de KCl, 100 µl de EDTA, 100 µl de GSSG y 100 µl de NADPH. Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició añadiendo 60 o 40 µl de suero puro, y se siguió la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Todas las muestras problema se midieron frente al blanco, que se procesó de la misma forma aunque contenía tampón TPK en lugar del suero.

Para la determinación en homogeneizado de hígado de ratas, se añadieron en una microcubeta: 590 µl de tampón fosfato, 100 µl de KCl, 100 µl de EDTA, 100 µl de GSSG y 100 µl de NADPH. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició adicionando 10 µl de homogeneizado puro, y se aguardó

la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Todas las muestras problema se midieron frente al blanco, que se preparó de la misma manera aunque contenía TPK en lugar del homogeneizado.

Cálculos: La actividad de la enzima glutatión reductasa se obtiene por medio del siguiente cálculo:

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

Donde:

mU = nmol/minuto.

$\Delta A(\text{min})$ = 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) en ml en la cubeta.

C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/ml).

3.4.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Fundamento: La enzima superóxido dismutasa (SOD) está encargada de la formación de H_2O_2 y O_2 a partir del radical superóxido.



La actividad SOD se ensaya siguiendo el método descrito por Fridovich (1985), parcialmente modificado, en el que se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa para

generar radicales superóxido (O_2^-). El radical superóxido es capaz de reducir el citocromo c. Esta reducción es inhibida por la enzima SOD, que compite por los radicales superóxidos y los “secuestra” llevando a cabo su dismutación. Por ello, según este método, el grado de inhibición en la reacción de reducción del citocromo c es un indicador de la actividad de la superóxido dismutasa. Los reactivos utilizados en este método se encuentran detallados en la Tabla 8.

Reactivo	Concentración
Tampón fosfato potásico (TPK) $K_2HPO_4 / KH_2 PO_4$ (pH = 7.8 a 4°C) c/DTPA	0.066 M
Solución xantina (SIGMA)	0.5 mM
Solución citocromo c (SIGMA)	100 μ M
Solución cianuro sódico (NaCN) (PANREAC)	0.5 mM
Solución catalasa (SIGMA)	10 U
Solución xantina oxidasa (SIGMA)	25 U

Tabla 8. Reactivos utilizados en la determinación de la SOD.

Procedimiento: En una microcubeta se depositaron todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, excepto la xantina oxidasa: 490 μ l de TPK, 200 μ l de xantina, 200 μ l de citocromo c, 100 μ l de NaCN, 100 μ l de catalasa y 10 μ l de muestra (suero/hígado). A continuación, se inició la reacción adicionando 10 μ l de xantina oxidasa, y se observó el aumento de absorbancia a 550 nm durante 3 minutos, 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 procesó 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. En las muestras, como se ha explicado anteriormente, la SOD compitió con el citocromo c por los radicales superóxido, de forma que hubo una inhibición de la reducción del mismo. 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.

Las muestras problema se midieron frente a su blanco de muestra, que se procesó de la misma forma pero la reacción no se inició con la adición de xantina oxidasa.

Cálculos: Los resultados se expresan en U/mg proteína y se calculan según las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibición} &= 100 - [(\Delta A_{\text{muestra/min}} \cdot 100) / \Delta A_{\text{referencia/min}}] \\ \text{U/mg proteína} &= \% \text{ inhibición} / (50 \cdot c) \end{aligned}$$

Donde:

ΔA = incremento de absorbancia.

c = mg de proteína presente en la muestra.

3.4.4. Determinación de la actividad catalasa

Fundamento: La catalasa (CAT) es una enzima altamente activa que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua.



Su determinación se llevó a cabo por el método descrito por Beers y Sizer (1952), en el cual la disminución de absorbancia debida a la desaparición de H_2O_2 es medida espectrofotométricamente a 240 nm. Los reactivos utilizados se encuentran en la Tabla 9.

Reactivo	Concentración
Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7.4 a 4°C)	0.066 M
Solución peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) (FORET)	1/100 v/v

Tabla 9. Componentes utilizados en la determinación de la CAT.

Procedimiento: En una cubeta macro de cuarzo con un paso de luz de 1cm, se añadió 2 ml de TPK y 120 µl de muestra (homogeneizado de hígado diluido en agua bidestilada 1/120). Posteriormente, se inició la reacción añadiendo 480 µl de H₂O₂ y se midió la disminución de absorbancia, debida a la reducción del peróxido de hidrógeno, a 240 nm durante 3 minutos. La medida se realizó frente al aire.

Cálculos: La actividad de la enzima presente en la muestra se calcula según la fórmula:

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

Donde:

U = µmol/minuto.

$\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto.

V_f = volumen final en ml en la cubeta.

ϵ = coeficiente de extinción molar de H₂O₂ ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

d = paso de luz de la cubeta, 1cm.

V_m = volumen de muestra en la cubeta en ml.

C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/ml).

D = dilución de homogeneizado.

3.4.5. Determinación de la peroxidación lipídica

Fundamento: Uno de los métodos más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica es la cuantificación de malondialdehído (MDA) por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA es un producto final de la degradación oxidativa de los lípidos que, 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.

Para la determinación del MDA seguimos el método descrito por Draper y Hadley (1990), en el cual se valora espectrofotométricamente a 535 nm el aducto de color rojo formado al reaccionar el MDA con el TBA. En la Tabla 10 se especifican los reactivos utilizados.

Reactivo	Concentración
Solución ácido tricloroacético (TCA) (MERCK)	20% p/v
Solución ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA)	0.67% p/v

Tabla 10. Reactivos utilizados en la determinación de la peroxidación lipídica.

Procedimiento: En el interior de tubos eppendorf con tapón de seguridad, una alícuota de 150 µl de suero o homogeneizado de hígado se mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 r.p.m. y 4°C para precipitar las proteínas. Del sobrenadante que resultó, se tomó una alícuota (150 µl) y se añadió una parte igual de TBA al 0.67%, incubando la mezcla en un baño de agua hirviendo (100°C) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se bajó la temperatura introduciendo los tubos en hielo y se midió la absorbancia de la muestra frente al blanco a 535nm. El blanco se procesó igual que una muestra pero contenía una alícuota de agua bidestilada en lugar de suero.

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 ($\epsilon = 153 \cdot 10^3$ 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.

3.4.6. Determinación de la oxidación de proteínas

Fundamento: La oxidación de proteínas provoca un aumento de los grupos carbonilos en éstas. 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 366 nm (Reznick y Packer, 1994). En la Tabla 11 se observan los reactivos utilizados.

Reactivo	Concentración
Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7.0 a 4°C)	10 mM
Solución dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA)	24% p/v
Solución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (en HCL) (ACOFARMA)	10 mM
Solución TCA (MERCK)	20% p/v
Solución de etanol/acetato de etilo	1/1 v/v
Solución guanidina en ácido fórmico (diluido en agua bidestilada 1/1 v/v)	6 M

Tabla 11. Reactivos utilizados en la determinación de la oxidación de proteínas.

Procedimiento: A partir del suero o del homogeneizado de hígado se preparó 300 μ l de muestra que contenían aproximadamente una concentración de 5 mg proteína/ml. Para ello, una alícuota de suero o homogeneizado (125 μ l) 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 minutos en baño de agua a 100°C y, posteriormente, se enfrió en hielo. A continuación, a los 300 μ l de muestra se le añadieron 300 μ l de DNPH y la mezcla se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora, agitando cada 15 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 300 μ l de TCA y se centrifugó la mezcla 3 minutos a 11000 g y 4°C. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó tres veces con 1 ml de la solución de etanol/acetato de etilo, centrifugando (3 minutos, 11000 g, 4°C) después de cada lavado y desechando el sobrenadante tras la centrifugación. Por último, el precipitado final que resultó se resuspendió en 600 μ l de guanidina 6 M y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 11000 g, 4°C durante 3 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante frente al blanco (solución de guanidina) a 366 nm.

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 ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

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.

3.4.7. Determinación del daño en el DNA

Fundamento: Estudio de la integridad en la expresión génica de células eucariotas a partir de la evaluación de la integridad en el DNA. Esta técnica es una herramienta muy utilizada en la comunidad científica para evaluar la genotoxicidad. También está siendo ampliamente utilizada para monitorizar posibles daños en el DNA en estudios epidemiológicos. Para la determinación del daño en el DNA se utilizó la variante de *Comet alcalino* (Duthie y cols., 1996).

Reactivos:

- a. Tris (SIGMA).
- b. NaCl (PANREAC).
- c. EDTA (PANREAC).
- d. NaOH (PANREAC).
- e. HCl (PROLABO).
- f. Triton-X (SIGMA).
- g. Histopaque (SIGMA).
- h. Agarosa LMP (INVITROGEN).
- i. Agarosa HMP (INVITROGEN).
- j. PBS 1X (10X) (GIBCO).
- k. DAPI (SIGMA).

Procedimiento:

1. Preparación de portas de cristal:

Se utilizaron portaobjetos de cristal biselados, donde se depositó una capa de agarosa HMP al 1% en H₂O bidestilada (500 mg agarosa/50 ml H₂O). Se homogeneizaron calentando en un microondas, y se trabajó rápidamente para que no se enfriase y solidificase. Se bañaron los portaobjetos en solución de agarosa, se retiró el exceso con una raqueta, y dejó secar en una estufa a 40°C, durante 24 horas.

2. Aislamiento de linfocitos:

Se prepararon 2 tandas de 2 eppendorfs por muestra con 950 μ l PBS 1X en la 1^a tanda y 900 μ l en la 2^a y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Mientras se manipularon las muestras se conservaron en un recipiente con hielo. Enseguida se tomaron 50 μ l de sangre periférica de la vena caudal y se completaron hasta 1 ml con PBS, en la primera tanda. En el fondo del eppendorf se depositaron 100 μ l de Histopaque y se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos a 4°C. Se obtuvo una fase rosa que se tomó con una pipeta de 100 μ l y se resuspendió en la 2^a tanda de eppendorfs de PBS 1X hasta 1ml, para eliminar el Histopaque que resultó tóxico para la célula. Por fin, se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos a 4°C, de forma que se obtuvieron los linfocitos aislados.

3. Embeber las células en agarosa:

Se depositaron 85 μ l de agarosa HMP al 1% en PBS (50 mg agarosa/5 ml PBS 1X) para que se pudiesen obtener 2 geles por porta y muestra. Se colocó un cubreobjetos en cada gel y se dejó en la nevera a 4°C durante 5 minutos para que solidificase esta capa de agarosa donde se depositaron las células. Se retiraron los cubres después de la solidificación. Los linfocitos previamente aislados, en el paso anterior, se resuspendieron en 85 μ l agarosa LMP al 1% en PBS 1X, a 37-38°C. Se depositaron 85 μ l, en cada gel, sobre la capa de agarosa HMP que se elaboró en el primer paso. Enseguida se llevó de nuevo a la nevera a 4°C durante 5 minutos para que solidificase y tras este periodo se retiraron los cubres.

4. Lisis (1hora mínimo):

Se preparó la solución de trabajo. Para eso añadimos 2.5 ml de Triton X a 250 ml de solución de lisis (4°C). Se colocaron los portaobjetos en una cestilla dentro de una cubeta con esta solución durante al menos 1 hora, con lo cual se consiguió que se desestructurasen las membranas plasmáticas, y así se quedase al descubierto el nucleóide con el material genético, donde se evaluó el posible daño.

5. Tratamiento alcalino:

La solución de electroforesis (solución alcalina) se colocó durante 40 min en la cubeta a 4°C, completando hasta 8 porta ordenados linealmente y equidistantes a las paredes de la cubeta y bien apoyados en la base. Es importante equilibrar la cubeta (2-3 portas en la base).

6. Electroforesis:

A 4°C se ajustó el programa a 45V a 300 mA durante 30 minutos.

7. Neutralización:

Se efectuaron 3 lavados de 5 minutos con tampón de neutralización conservado a 4°C, frenando así el ataque básico. Se añadieron la solución a la cubeta y se introdujo la cestilla. Por fin, se escurrió bien al acabar el último lavado.

8. Tinción fluorescente:

Se tiñó cada gel con 20 µl de una solución fluorescente DAPI (5µg/ml), 4,6 – diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro, y se observó la preparación en un microscopio de fluorescencia Leica DMLS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

9. Cuantificación:

Se contabilizaron 100 *comets* por cada gel, encuadrándolos dentro de cada una de las 5 clases de *Comet* posibles (0 para ausencia de daño y 4 para un daño máximo) (Figura 15). Una mayor cantidad de fragmentos de DNA en la cola indicaba un mayor daño en esta biomolécula. Todavía, para un análisis más fiable se utilizó una cámara Hitachi empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK), que nos permitió usar los siguientes parámetros para la cuantificación del daño en el DNA: el porcentaje de fluorescencia en la cola del comet (representando la fracción de DNA en la misma), porcentaje de DNA en la cabeza (representando la fracción del material genético en la misma) y el *Olive Tail Moment* (que se define como

el producto de la longitud de la cola del *comet* y la fracción de DNA en la misma, OTM = [Media de la cola-Media de la cabeza] x % de DNA en cola /100).

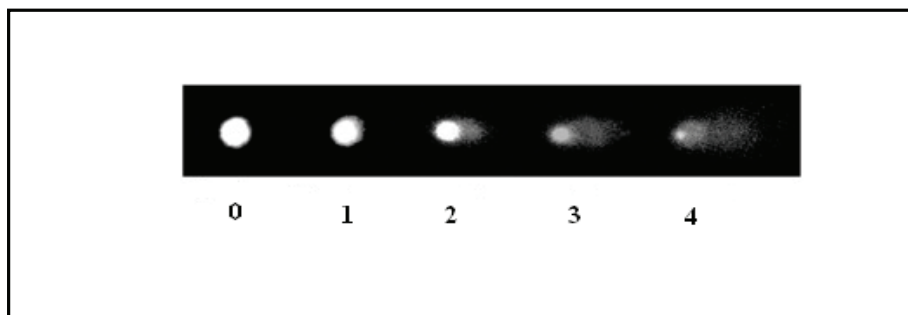


Figura 15. Tipos de Comet.

3.5. Análisis de expresión de las proteínas GPx-1, GPx-4 y selenoproteína P

Los niveles de expresión de la GPx-1, GPx-4 y selenoproteína P (SelP) fueron determinados por medio de la técnica de inmunodetección de proteínas o Western Blotting por el método de Laemmli (1970), que se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, además de proporcionar información acerca del tamaño de la proteína de interés mediante la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se hallan accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma. En la Tabla 12 se encuentran las características de los anticuerpos y las diluciones usadas en cada determinación:

Anticuerpo	Clasificación y peso molecular	Dilución	Variante	Referencia comercial
GPx 1	Primario (23 kDa)	1:10000	IgG policlonal en conejo	(SC-30147) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
GPx 4	Primario (21 kDa)	1:5000	IgG policlonal en conejo	(SC-50497) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
SelP	Primario (57 kDa)	1:20000	IgG policlonal en conejo	(SC-30162) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti-rabbit IgG	Secundario	GPx1- 1:5000 GPx4- 1:10000 Sel P- 1:20000	Anti-IgG en conejo	(SC-2030) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti-β-Actina (Mouse IgG1)	Primario (42 kDa)	1:20000	IgG1 monoclonal en ratón	(A5441) SIGMA
Anti-Mouse IgG1	Secundario	1:8000	Anti-IgG1 monoclonal en ratón	(A9044) SIGMA

Tabla 12. Características generales de los anticuerpos usados en la inmunodetección.

3.5.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS: SDS-PAGE

Fundamento: La separación de las proteínas teniendo en consideración su masa molecular se efectuó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se obtienen, de manera general, por la polimerización de moléculas de acrilamida y N, N'-metilén-bisacrilamida, disueltas en un tampón adecuado. Para eso, requieren la acción de un polimerizador, que suele ser el persulfato amónico (APS). Al disolverse en agua, origina radicales libres, que a su vez inducen la formación de diversos radicales libres en la acrilamida, favoreciendo de esta manera su polimerización. La gelificación se consigue mediante la formación de enlaces cruzados

en la presencia de la bisacrilamida. Así, se obtiene una malla de cadenas de poliacrilamida. A este proceso de polimerización también se añade tetrametilén diamina (TEMED), que es un estabilizador de los radicales libres. La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es función de su carga y de su forma, y esta última depende del plegamiento de la proteína. Los detergentes son moléculas anfipáticas, o sea con zonas apolares y con zonas cargadas, y pueden desnaturalizar las proteínas (romper el plegamiento) al asociarse con las zonas hidrofóbicas de éstas, haciendo que todas las proteínas presenten la misma forma y también una densidad de carga muy similar. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que se une fuertemente a las proteínas, desnaturalizándolas e induciéndolas a adoptar una forma cilíndrica. Es conocido que el SDS se une en una proporción de aproximadamente 1,4 g de SDS por 1 g de proteína, lo que proporciona una relación carga/masa muy uniforme para la mayor parte de las proteínas que se le unen. El tratamiento simultáneo con un agente reductor de puentes disulfuro, como el 2-mercaptoetanol, asegura al experimentador que la proteína está completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, garantizando que corre de manera uniforme. Para controlar visualmente el avance de la proteína en la electroforesis y evitar que sobrepase el extremo del gel, se emplea un colorante como el azul de bromofenol.

Procedimiento: (1) Previamente a la carga de las muestras, en un tubo de eppendorf de 1.5 ml se pipeteó el volumen necesario de muestra para la cantidad de proteína que queríamos cargar (100 µg) y se llevó hasta el volumen deseado con tampón de carga, con el objetivo de pipetear el mismo volumen y la misma cantidad para todas las muestras. A continuación, las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas.

(2) Enseguida, se prepararon los geles: separador y concentrador. La separación se verificó en el gel separador, donde la migración es condicionada por la carga y el tamaño molecular de las partículas. Para la GPx-1 y GPx-4 se utilizó un gel separador que contenía un 12% de acrilamida. En relación a la selenoproteína P se usó un gel de separación cuya composición poseía un 8% de acrilamida. En el concentrador, las muestras se concentraron en una zona muy estrecha, permitiendo que las proteínas se alineasen. Los componentes empleados en los geles se encuentran descritos en las Tablas 13, 14 y 15.

Reactivo	Cantidades empleadas en gel 12%
Agua bidestilada	3.3 ml
Acrilamida-bisacrilamida 30% (BIO-RAD)	4 ml
Tris (SIGMA) 1.5 M a pH 8.8	2.5 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	100 μ l
Persulfato amónico (APS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	100 μ l
TEMED (BIO-RAD)	5 μ l

Tabla 13. Componentes del gel separador para la GPx1 y GPX-4.

Reactivo	Cantidades empleadas en gel 8%
Agua bidestilada	4.6 ml
Acrilamida-bisacrilamida 30% (BIO-RAD)	2.7 ml
Tris (SIGMA) 1.5 M a pH 8.8	2.5 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	100 μ l
Persulfato amónico (APS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	100 μ l
TEMED (BIO-RAD)	6 μ l

Tabla 14. Componentes del gel separador para la selenoproteína P.

Reactivo	Cantidades
Agua bidestilada	5.5 ml
Acrilamida-bisacrilamida 30% (BIO-RAD)	1.3 ml
Tris (SIGMA) 1.5 M a pH 8.8	1 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	80 μ l
Persulfato amónico (APS) (SIGMA) al 10% (p/v) en agua destilada	80 μ l
TEMED (BIO-RAD)	8 μ l

Tabla 15. Reactivos utilizados para el gel concentrador.

La composición del tampón de carga y del tampón de electroforesis se puede observar en las Tablas 16 y 17.

Reactivo	Concentración
Tris (SIGMA) a pH 6.8	1M
Glicerol (PANREAC)	0.1% (p/v)
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA)	10% (p/v)
Azul de Bromofenol (SIGMA)	2% (v/v)
2-mercaptoetanol (BIO-RAD)	5% (v/v)

Tabla 16. Componentes del tampón de carga.

Reactivo	Concentración
Tris (SIGMA)	250 mM
Glicina (SIGMA)	1.92 M
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA)	1% (p/v)

Tabla 17. Componentes del tampón de electroforesis.

Una vez preparado el gel separador, se vertió entre los dos vidrios de un equipo de BIO-RAD LABORATORIES para Western Blotting. Para que la superficie del gel quedase plana y se evitase la entrada de oxígeno atmosférico, se añadió agua bidestilada entre los vidrios. Cuando el gel polimerizó (aproximadamente en 25-30 minutos), se eliminó el agua bidestilada, se vertió el gel concentrador y se introdujo un peine evitando la formación de burbujas. Este último se retiró con cuidado tras la polimerización del gel (después de 30 minutos). Enseguida, se montó el equipo de electroforesis y se llenó la cubeta con tampón de electroforesis diluido (1/10) en agua bidestilada. Se cargaron las muestras en los pocillos, así como el marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker 26612- THERMO SCIENTIFIC) con ayuda de una pipeta y se conectó la cubeta a una fuente de voltaje. Se aplicó una intensidad de 150 V con un regulador de voltaje (PowerPac™ Basic – BIO-RAD), hasta que el frente de las muestras alcanzó el extremo final del gel.

3.5.2. Transferencia de proteínas

Fundamento: Esta técnica permite que las proteínas separadas por electroforesis sean accesibles a la detección por anticuerpos, dado que las proteínas se quedan fuertemente adheridas a la superficie de una membrana, generalmente de nitrocelulosa. En la Tabla 18 se pueden encontrar los reactivos del tampón de transferencia.

Reactivo	Concentración
Tris (SIGMA)	20 mM
Glicina (SIGMA)	192 mM
Metanol (PANREAC)	20% (v/v)

Tabla 18. Componentes del tampón de transferencia.

Procedimiento: Se recortó un rectángulo de membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) y dos de papel de Whatman, ambos ligeramente mayores que el gel, y se sumergieron en tampón de transferencia, en simultáneo con dos almohadillas de esponja. Se realizó el montaje de transferencia en un cassette adecuado para el efecto, siguiendo el orden: tapa negra, almohadilla de esponja, papel de Whatman, gel, membrana, papel de Whatman, almohadilla de esponja y tapa transparente. Al mismo tiempo se aplicó presión para

evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana. Este cassette se colocó en la cubeta de transferencia, conjuntamente con una barra magnética y una bolsa de hielo y se llenó la cubeta con tampón de transferencia hasta el nivel indicado. Por fin, se conectó a una fuente de voltaje y se aplicó una intensidad de 100 V durante una hora.

3.5.3. Inmunodetección

Fundamento: La inmunodetección puede ser indirecta o directa. La inmunodetección indirecta se basa en un procedimiento en el cual se emplea un anticuerpo específico para localizar la proteína que quiere estudiarse (anticuerpo primario) y un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se ha obtenido el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario posee alguna marca capaz de producir una señal detectable. Este es el método más comúnmente empleado y también lo que se utilizó en nuestro estudio. La composición de los reactivos utilizados se encuentra en la Tabla 19.

Reactivo	Concentración
Solución TBST: Tris (SIGMA) NaCl (ACOFARMA) Tween 20 (SIGMA)	 10 mM 100 mM 0.1% (v/v)
Solución de bloqueo y de dilución de anticuerpos (BIO-RAD)	3% (p/v) disuelta en TBST
Solución de Ponceau S en 5% de ácido acético (SIGMA)	0.1% (p/v)

Tabla 19. Reactivos utilizados en la inmunodetección.

Procedimiento: Una vez efectuada la transferencia se comprobó la eficacia de la misma. Para eso, en un recipiente plástico, se tiñó la membrana con el colorante de Ponceau, durante breves instantes, y seguidamente se lavó cuidadosamente con agua bidestilada. Tras este paso, se introdujo la membrana en una solución de bloqueo, de forma que quedase completamente cubierta y se dejó incubando a temperatura

ambiente, durante una hora en agitación orbital a 50 r.p.m. (aparato Orbit 1000-LABNET).

Finalizado el bloqueo de la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario específico, diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C en el agitador orbital (ver diluciones en la tabla 19). Terminada la incubación, se realizaron ocho lavados con TBST de tres minutos cada uno. El anticuerpo secundario se preparó de la misma forma que el primario con las diluciones específicas detalladas en la tabla. Este se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se hacen los mismos lavados efectuados con el anticuerpo primario.

3.5.4. Revelado

Fundamento: En nuestro experimento se utilizó el proceso de quimioluminiscencia. Este se basa en la emisión de energía en forma de luz a partir de una sustancia, como consecuencia de una reacción química. Para este efecto es común la utilización de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano, actuando esta como catalizadora de la reacción. Los materiales empleados en esta fase se hallan descritos en la Tabla 20.

Materiales
Cassette de exposición
Películas de alta sensibilidad (KODAK)
Revelador y Fijador (KODAK)
Detector de quimioluminiscencia (ADVANSTA - WesternBright™ Quantum)

Tabla 20. Materiales usados durante el revelado.

Procedimiento: En una habitación oscura, la membrana se incubó durante dos minutos con el líquido detector de quimioluminiscencia. Seguidamente se retiró el exceso de detector y se colocó la membrana en el interior del cassette y se expuso frente a la película fotográfica, durante breves minutos. Por fin, se introdujo la película en recipientes que contenían la solución reveladora, el agua y la solución fijadora y se dejó secar a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se analizaron por densitometría

y se cuantificaron en términos de densidad óptica, siendo expresados como porcentaje de unidades relativas tomando como 100% los datos del grupo CO. Para este fin, se utilizó el programa analítico PCBAS 2.08e.

El anticuerpo de la β -actina se utilizó como control de expresión de cada una de las proteínas investigadas.

3.6. Parámetros bioquímicos de las ratas

El estudio bioquímico se realizó en las ratas, una vez finalizado el período de tratamiento, tras un período de ayuno de 12 horas. La extracción de la sangre y la obtención del suero, se realizó de acuerdo con el procedimiento citado anteriormente en el apartado 1.2.1. Los análisis se efectuaron en un analizador automático discreto multicanal (BAYER RA 1000). Los parámetros medidos fueron los siguientes: fosfatasa alcalina, colesterol, creatinina, glucosa, aspartato-aminotransferasa (AST), alanino-aminotransferasa (ALT), bilirrubina total, triglicéridos y urea.

4. TRATAMIENTO 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 obtuvieron a partir de al menos 8 datos. Para comparar las distintas variables objeto de nuestro estudio en los diferentes grupos experimentales, los datos se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad InStat 3. Se utilizó el test “t” de Student para determinar las diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos para los grupos estudiados, considerándose diferencias estadísticamente significativas 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
CO vs AO	●	●●	●●●
AO vs AIP	■	■■	■■■
CO vs CIP	□	□□	□□□
CIP vs AIP	○	○○	○○○

La simbología utilizada para describir las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales en humanos fue la siguiente:

Grupos	p<0.05	p<0.01	p<0.001
C vs A	a	aa	aaa
C vs H	b	bb	bbb
C vs AH	c	cc	ccc
A vs H	●	●●	●●●
A vs AH	▲	▲▲	▲▲▲
H vs AH	■	■■	■■■

IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

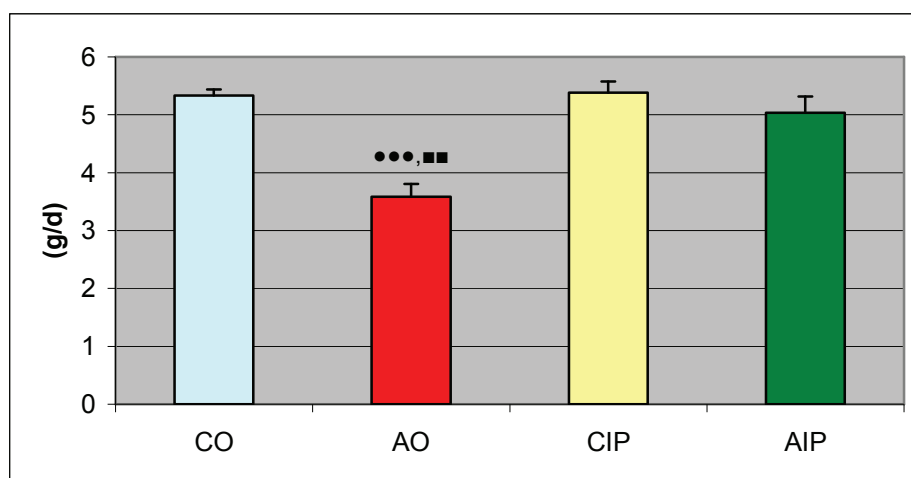
1. ANIMALES

1.1. Control nutricional y homeostasis del selenio

Mencionamos en el apartado 2.3.3., que el alcohol es una fuente sustancial de energía que representa hasta el 50% de la ingesta calórica diaria de un individuo alcohólico, y que el consumo excesivo de alcohol conlleva a una alimentación poco equilibrada, dado que puede reemplazar a otros nutrientes de la dieta, desencadenando malnutrición primaria. Además, también referimos que este patrón de consumo interfiere con la digestión, la absorción, el metabolismo y la biodisponibilidad de diversos nutrientes causando malnutrición secundaria (Maillot y cols., 2001; Lieber, 2005; Foster y Marriot, 2006). Sin embargo, hay poca información disponible sobre las implicaciones del “binge drinking” en el estado nutricional y la homeostasis de selenio.

1.1.1. Estudio del peso corporal

Al seleccionar o desarrollar un modelo animal de consumo de alcohol es importante conocer el estado nutricional de los animales implicados, ya que este puede acentuar, o reducir, muchos de los efectos adversos que provoca el alcohol (D’Souza y cols., 2010). Así, en este estudio, se verificó una ganancia de peso corporal en todos los grupos estudiados (Figura 16), ya que, como es conocido, la adolescencia es un periodo de desarrollo corporal que requiere un alto consumo de agua y nutrientes y exhibe un crecimiento acelerado (Spear, 2000). Sin embargo, en las ratas del grupo AO se produjo, de manera significativa, un menor incremento de peso corporal en comparación con el grupo CO ($p < 0.001$) y con el grupo AIP ($p < 0.01$). Tal situación concuerda con una menor ingesta sólida en el grupo AO, debido a la vía de administración utilizada y al acceso “ad libitum” de esta droga durante los tres días de tratamiento, a diferencia de lo ocurrido en el grupo AIP, donde la ingesta sólida no fue alterada (Figura 17).

Figura 16. Incremento de peso durante todo el período experimental (g/d)

Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: *** $p < 0.001$; AO vs AIP: ** $p < 0.01$.

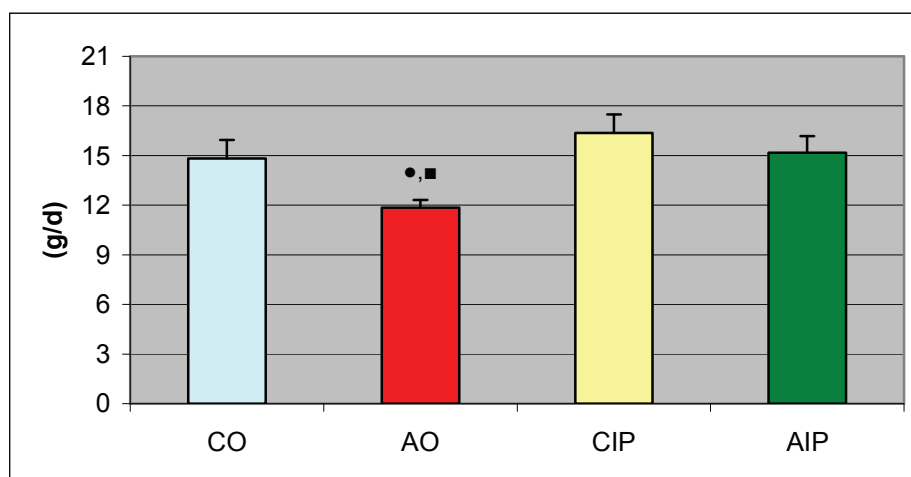
1.1.2. Estudio de la ingesta sólida

Al estudiar la ingesta sólida durante el periodo experimental, el grupo AO presentó una ingesta significativamente menor en comparación a los grupos CO y AIP (Figura 17). Durante los periodos de tratamiento se encontró que los modelos de ingesta aguda de alcohol utilizados producían una alteración en la función motora lo que disminuyó el número de veces que los animales accedían al comedero. Así, en el modelo oral de consumo de alcohol tipo “binge drinking”, se afectó la función motora y el apetito de las ratas, mientras que en el modelo intraperitoneal de “binge drinking” solo se modificó la función motora durante unas 6 horas tras la inyección.

White y cols. (2002) demostraron que el consumo agudo de alcohol (2 o 3 g/Kg) altera la función motora en las ratas adolescentes, prácticamente desde el inicio del tratamiento, dificultando seriamente el acceso a la comida. Por otra parte, cuando el consumo de alcohol es superior al 16% del total de la energía ingerida en la dieta, hay una disminución en el porcentaje de energía derivada de las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono, y la calidad nutricional de la dieta disminuye junto con el peso corporal (Hillers y Massey, 1985). Esto ocurre en el grupo AO, donde el porcentaje de

calorías consumidas en forma de alcohol supone alrededor del 22% de la energía total, probablemente como consecuencia del patrón de consumo de alcohol que realizaban estas ratas durante 24 horas al día y tres días, consecutivos, por semana. Este hecho no se produjo en las ratas adolescentes del grupo AIP, debido a que la cantidad de alcohol que recibieron, por la inyección intraperitoneal, fue menor, y no afectó a la ingesta.

Figura 17. Ingesta sólida durante todo el período experimental (g/d)



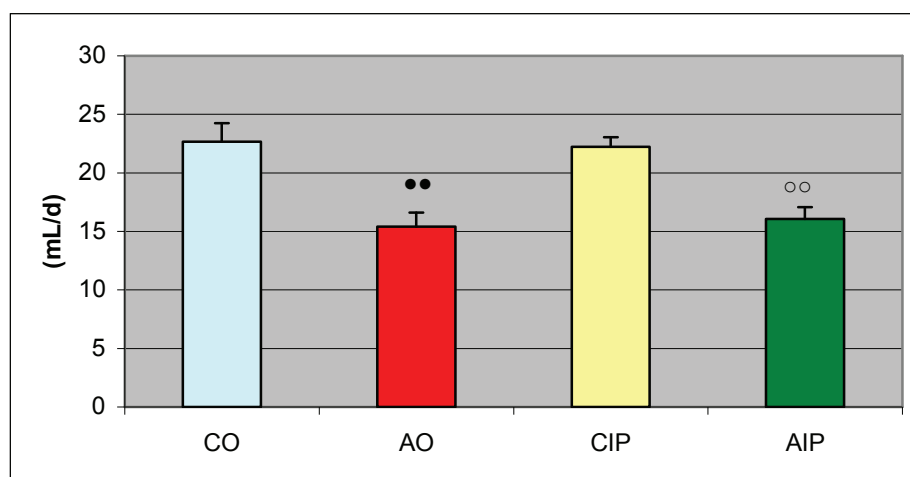
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$; AO vs AIP: ■ $p < 0.05$.

1.1.3. Estudio de la ingesta líquida

La ingesta líquida durante el período experimental fue significativamente inferior ($p < 0.01$) en el grupo AO y AIP en comparación con sus respectivos controles (CO y CIP) (Figura 18). Diversos estudios han descrito, utilizando ratas alcohol-preferentes (P) o que consumen grandes cantidades de alcohol que el etanol puede disminuir la ingesta de agua (Bell y cols., 2006; Gonçalves de Orange y cols., 2009). Parece ser que la vía de administración o la concentración de alcohol utilizada, pueden ejercer efectos adversos en la función adrenal, la cual está involucrada fisiológicamente en el consumo de agua y en su absorción por el riñón (Rivier, 1996). En este estudio, el consumo de alcohol en forma de “binge drinking” produjo una menor ingesta líquida a lo largo del periodo experimental, cuantitativamente similar en ambos grupos, aunque no

cualitativamente. Así, las ratas adolescentes que seguían el modelo oral de “binge drinking” ingerían alrededor de 10 mL/d de alcohol al 20% (v/v) durante los días de tratamiento, con un patrón de consumo diferente a lo largo del día, teniendo una ingesta máxima de 2.7 a 3.5 mL durante la primera hora del ciclo nocturno, momento en el que se alcanzaron 0.08 mg/dL de alcohol en la sangre. Sin embargo, en los periodos de descanso, estas ratas ingerían la misma cantidad de agua que las del grupo CO, principalmente, debido a que el efecto aversivo del etanol, en el agua, desaparecía. Por otra parte, en el modelo intraperitoneal utilizado, se inyectaron 3 g/Kg/d de alcohol (20% v/v) durante los días de tratamiento, alcanzando alrededor de 0.2 mg/dL de alcohol en sangre. Como consecuencia de ello, las ratas del grupo AIP ingirieron menos agua durante todo el periodo experimental.

Figura 18. Ingesta líquida durante todo el período experimental (mL/d)



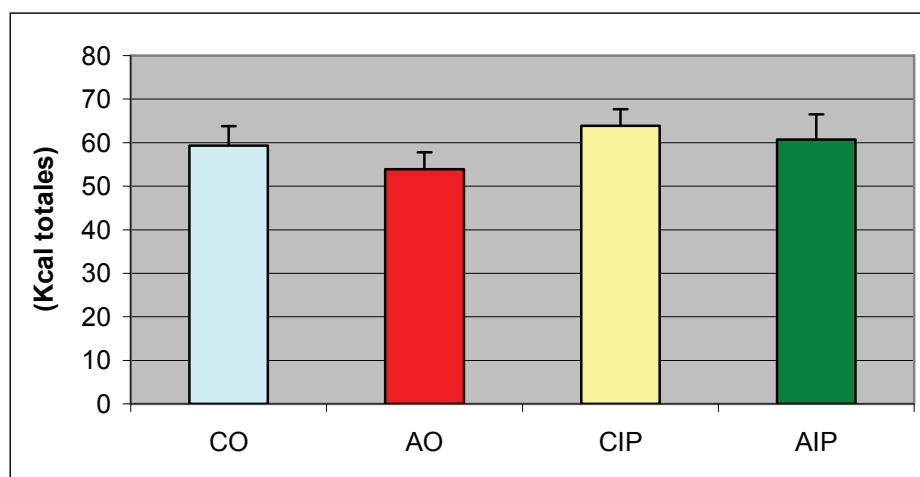
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: •• $p < 0.01$; CIP vs AIP: °° $p < 0.01$.

1.1.4. Estudio de la ingesta calórica

Como se observa en la Figura 19, la ingesta calórica no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados, a pesar de que la ingesta sólida fue significativamente inferior en el grupo AO en relación a los grupos CO y AIP. Esto podría ser debido a que en el grupo AO, el aporte calórico resultante provenía del sumatorio de las calorías que proporcionaban la ingesta sólida y las que aportaban el alcohol ingerido por vía oral. Así, a pesar de que el modelo oral de “binge drinking”

propuesto disminuyó el aporte energético proveniente de la dieta sólida, las calorías aportadas por el consumo de alcohol, durante los días de tratamiento (alrededor de 10.8 Kcal/rata/d), equilibraron el balance energético.

Figura 19. Ingesta calórica durante todo el período experimental (Kcal totales)



Los resultados se expresan como la media \pm ESM.

1.1.5. Estudio de la homeostasis del selenio

La ingesta de Se en el grupo AO fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la observada en los grupos CO y AIP, lo que parece estar en consonancia con la menor ingesta sólida encontrada por parte de este grupo, como se refleja en la Figura 17. Con respecto a la absorción aparente de Se (CDA), esta fue similar en todos los grupos estudiados, por lo que no estaría influenciada ni por el consumo de alcohol ni por la cantidad de Se ingerida a través de la dieta. Sin embargo, se observó una menor retención (balance aparente) de este micronutriente en el grupo AO con respecto al resto de los grupos, lo que está de acuerdo con su menor ingesta. La excreción de Se, en las heces y en la orina de los grupos AO y AIP, mostró una reducción significativa con respecto a sus respectivos controles. Estos hallazgos pueden indicar un posible intento homeostático del organismo para retener el Se frente al consumo agudo de alcohol. Cabe destacar que cuando la ingesta de Se es baja, como ocurre en el grupo AO, las cantidades eliminadas por orina y heces presentan una magnitud similar, aunque la excreción urinaria sea la principal vía de eliminación de este elemento (Daniels, 1996;

Pedrosa y cols., 2012). Por último, los valores significativamente disminuidos de Se en orina, en el grupo AO ($p < 0.001$), con respecto al grupo AIP, podrían explicarse, posiblemente, por una mayor depleción de este nutriente en el organismo de las ratas expuestas al modelo oral de “binge drinking”.

Tabla 21. Valores indicativos de la homeostasis del Selenio

Parámetros	CO (n=8)	AO (n=8)	CIP (n=8)	AIP (n=8)
Se ingerido (µg/día)	3.40 ± 0.2	2.72 ± 0.1 •, ■	3.76 ± 0.2	3.49 ± 0.2
C.D.A. (%)	96 ± 6.3	97 ± 7.0	97 ± 6.2	98 ± 6.9
Balance aparente de Se (µg/día)	2.90 ± 0.11	2.55 ± 0.09 ••, ■	3.2 ± 0.13	3.22 ± 0.23
Se en heces (ng/día)	121 ± 7	81 ± 6 ••	112 ± 7	81 ± 5 °
Se en orina (ng/día)	380 ± 15	80 ± 7 •••, ■■■	440 ± 24	180 ± 10 °°°

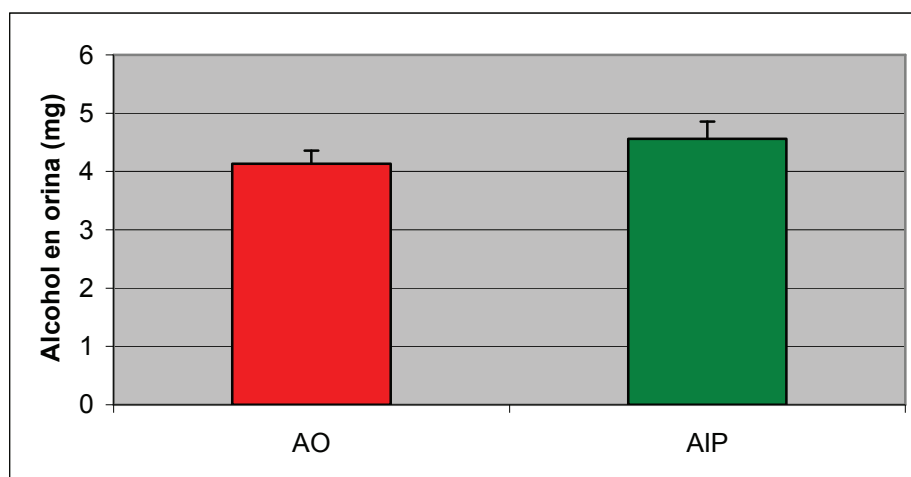
Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$, •• $p < 0.01$, ••• $p < 0.001$; AO vs AIP: ■ $p < 0.05$, ■■■ $p < 0.001$; CIP vs AIP: ° $p < 0.05$, °°° $p < 0.001$. C.D.A.- coeficiente de digestibilidad aparente.

1.2. Determinación de alcohol en orina

La excreción de alcohol a través de la orina es un proceso de primer orden, que implica que la cantidad de alcohol aclarada de la sangre es directamente proporcional a su concentración en sangre (Jones, 1990). En este contexto, determinamos la cantidad de alcohol presente en la orina de las ratas adolescentes expuestas a “binge drinking” de manera oral o mediante inyección intraperitoneal. Como se observa en la Figura 20, la cantidad de alcohol presente en la orina, acumulada en las últimas 24 horas de tratamiento, no mostró diferencia significativa entre los grupos AO y AIP. Posiblemente, el grupo AIP excreta la mayor cantidad de alcohol, en pocas horas, tras el tratamiento, en función de la concentración de alcohol que presenta en la sangre. Sin embargo, en el grupo AO el aclaramiento de esta sustancia tuvo lugar durante todo el día, en función de la ingesta líquida de las ratas, y una vez que experimentaba el primer paso de metabolización en el estómago. De esta manera, la cantidad de alcohol

excretada por ambos grupos se equiparó, por lo que se podría suponer, teniendo en cuenta los valores similares de creatinina encontrados en el suero (Tabla 22), que al final del tratamiento, ambos grupos tuvieron cantidades muy similares de alcohol en su sangre.

Figura 20. Cantidad de alcohol excretado en orina (mg) durante 24 h después del último tratamiento



Los resultados se expresan como la media \pm ESM.

1.3. Estudios en suero y sangre

1.3.1. Parámetros bioquímicos

La exposición al alcohol en las ratas que seguían el modelo de consumo tipo “binge drinking” oral y/o intraperitoneal, produjo cambios en su perfil bioquímico. Así, como se muestra en la Tabla 22, determinados parámetros bioquímicos como la glucosa, los triglicéridos, las enzimas aspartato-aminotransferasa (AST) y alanino-aminotransferasa (ALT) y la bilirrubina total se encontraron aumentados significativamente en los grupos AO y AIP, en relación a los grupos CO y CIP, respectivamente.

Tabla 22. Análisis bioquímicos de las ratas

	CO (n=8)	AO (n=8)	CIP (n=8)	AIP (n=8)
Fosfatasa alcalina (U/L)	536 ± 30.5	587 ± 49.9	533 ± 52.5	590 ± 45.4
Colesterol (mg/dL)	95 ± 8.6	96 ± 7.7	90 ± 3.1	96 ± 4.7
Creatinina (mg/dL)	0.27 ± 0.007	0.27 ± 0.006	0.29 ± 0.011	0.30 ± 0.025
Glucosa (mg/dL)	146 ± 7.0	172 ± 8.0 •	156 ± 9.1	189 ± 7.5 ◦
AST (U/L)	127 ± 5.4	198 ± 8.9 •••	120 ± 3.9	208 ± 15.5 ◦◦◦
ALT (U/L)	42 ± 2.7	52 ± 1.5 ••	38 ± 0.9	51 ± 2.4 ◦◦◦
Bilirrubina total (mg/dL)	0.52 ± 0.039	0.64 ± 0.032 •	0.56 ± 0.034	0.69 ± 0.041 ◦
Triglicéridos (mg/dL)	70 ± 3.0	80 ± 3.4 •	66 ± 1.7	91 ± 6.0 ◦◦
Urea (mg/dL)	53 ± 2.4	53 ± 1.7	53 ± 4.6	53 ± 3.6

Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CO vs AO: • p< 0.05, •• p< 0.01, ••• p< 0.001; CIP vs AIP: ◦ p< 0.05, ◦◦ p< 0.01, ◦◦◦ p< 0.001.

En un estudio llevado a cabo por Lee (2012) se encontró una correlación entre el consumo de alcohol en la forma de “binge drinking” y los niveles de glucosa y triglicéridos, en hombres y en mujeres coreanas. Este autor detectó que una mayor frecuencia de este patrón de consumo se asociaba a una mayor prevalencia de síndrome metabólico en ambos sexos. Recientemente, Lindtner y cols. (2013) han desarrollado un estudio para determinar los efectos del “binge drinking” sobre la homeostasis de la glucosa y la actividad de la insulina, administrando, diariamente, durante tres días consecutivos, 3 g/Kg de etanol por vía intraperitoneal, en ratas Sprague-Dawley. Estos investigadores observaron que las ratas presentaban un incremento de los niveles de glucosa en sangre y una mayor expresión de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), proteína inhibidora en la vía de señalización de la insulina, por lo que concluían que el “binge drinking” disminuye la tolerancia a la glucosa e induce resistencia sistémica a la insulina, incrementado el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Incluso, cuando las concentraciones de alcohol en la sangre de estas ratas eran prácticamente indetectables ambos fenómenos se mantenían. Así, teniendo en cuenta estos datos, se podía sugerir que el aumento de glucosa encontrado en los grupos AO y AIP, en nuestro estudio, podía ser el resultado de un desequilibrio homeostático en la glucosa y de un

aumento en la resistencia a la insulina. Cabe destacar que previamente a la selección de la vía de administración a utilizar, Lindtner y cols. (2013) comprobaron que no existían diferencias en los estudios de la homeostasis de la glucosa y la actividad de la insulina cuando el etanol era administrado por vía oral gavage o intraperitoneal, por lo que adoptaron la última forma de administración por comodidad técnica. Curiosamente, en nuestra investigación tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa entre los grupos AO y AIP. Por otro lado, es conocido que la ingesta de alcohol puede promover un aumento en la síntesis y acumulación de triglicéridos hepáticos, bien a través de la PKCε activada o bien, por la inhibición del PPAR-α y la estimulación de la SREBP1 (Kaiser y cols., 2009; Suh y Jeong, 2011). Una vez acumulados en el hígado, los triglicéridos son transportados a la sangre a través de la apolipoproteína B, que se ensambla a ellos, favoreciendo su secreción y por tanto, su aumento en la sangre.

El análisis de las concentraciones séricas de las enzimas aminotransferasas puede ser una herramienta valiosa como índice de la lesión hepatocelular. En los grupos AO y AIP se observó un incremento significativo de la AST y de la ALT en comparación a los valores controles, lo que parece indicar que el patrón de consumo alcohólico tipo “binge drinking”, independientemente de la vía de administración, puede afectar la integridad hepática. En este contexto, Artun y cols. (2010) utilizando ratas adultas Wistar sometidas a un tratamiento con tres dosis de alcohol al 33% (5 g/Kg cada 12 horas), por vía oral, observaron un incremento significativo en la actividad sérica de la AST y de la ALT. Paralelamente, estos investigadores detectaron la presencia de esteatosis en el hígado de estos animales. En 2012, Kalaz y cols. utilizando ratas Sprague-Dawley, a las cuales administraron tres dosis de etanol al 40% (5 g/Kg cada 12 horas), por gavage, identificaron un aumento de AST al final del tratamiento. Además, Leung y cols. (2012) detectaron resultados similares, en ratones normales, sometidos a un tratamiento con dos dosis de etanol (6 g/Kg cada 12 horas) utilizando la misma vía de administración.

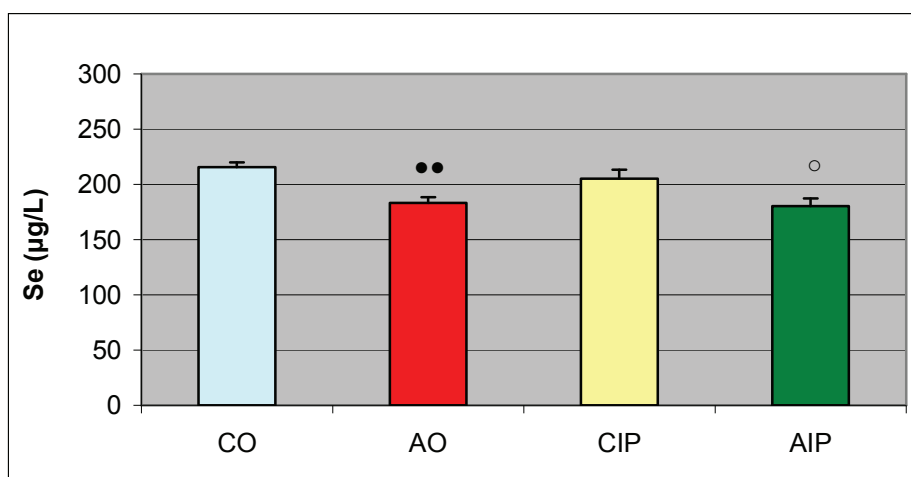
La bilirrubina es un producto resultante del catabolismo de la hemoglobina, la cual es captada por el hígado y conjugada, siendo, posteriormente, excretada en la bilis. Un incremento de bilirrubina puede indicar un trastorno hepático o extrahepático. Numerosos estudios indican que el consumo crónico o agudo de alcohol lleva a una

elevación de los niveles de bilirrubina en la sangre (Vendemiale y Lieber, 1984, Lu y cols., 2007). Nuestros resultados concuerdan con estas investigaciones, no existiendo diferencias significativas según la vía de administración.

1.3.2. Estudio del estrés oxidativo en suero

Como se mencionó en los antecedentes, el consumo de alcohol en forma de “binge drinking”, en animales adultos, influye sobre el equilibrio oxidativo, alterando los mecanismos de defensa antioxidante endógenos (Schlorff y cols., 1999). Por otra parte, ha sido establecido que el consumo crónico de alcohol además de influir sobre las enzimas antioxidantes, altera los niveles de Se, un elemento con marcadas propiedades antioxidantes, en animales y humanos (González-Reimers y cols., 2009; Ojeda y cols., 2009). Sin embargo, hay pocos estudios sobre el efecto que el consumo de alcohol tipo “binge drinking” durante la adolescencia produce en el balance oxidativo y menos aún, sobre los niveles de Se. Por todo esto pretendemos determinar los niveles de Se, la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, así como distintos biomarcadores del estrés oxidativo en el suero, con el fin de conocer, de forma general, el estado oxidativo de las ratas adolescentes objeto de este estudio.

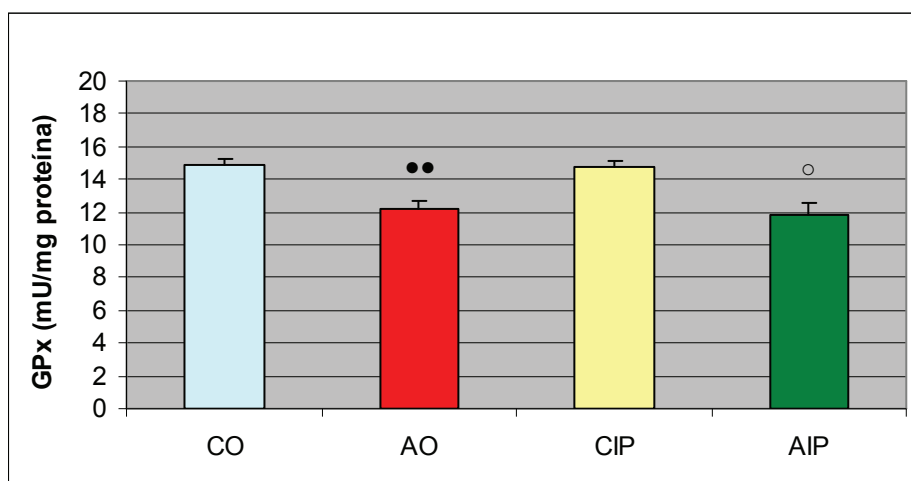
Figura 21. Niveles de selenio ($\mu\text{g/L}$) en el suero



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: ** $p < 0.01$; CIP vs AIP: ° $p < 0.05$.

En esta investigación se encontró una disminución significativa de los niveles de Se en el suero de los grupos que consumen alcohol, frente a sus respectivos controles (Figura 21). La explicación podría residir en el propio metabolismo del alcohol, ya que genera una serie de productos tóxicos que, en el hígado, interfieren con la síntesis de diferentes selenoproteínas, tales como la selenoproteína P, principal transportador del Se en el plasma, así como de otras proteínas transportadoras de Se como la albúmina (Gao y cols., 2004). Además, se ha demostrado que el consumo agudo y crónico de alcohol por vía oral altera la mucosa intestinal, produciendo una menor absorción de los nutrientes (Bode y Bode, 2003). En nuestro caso podría suceder en las ratas del grupo AO, que además, ingieren menos cantidad de este micronutriente, encontrándose mayor diferencia con su respectivo control que en la vía intraperitoneal.

Figura 22. Actividad de la GPx (mU/mg proteína) en el suero

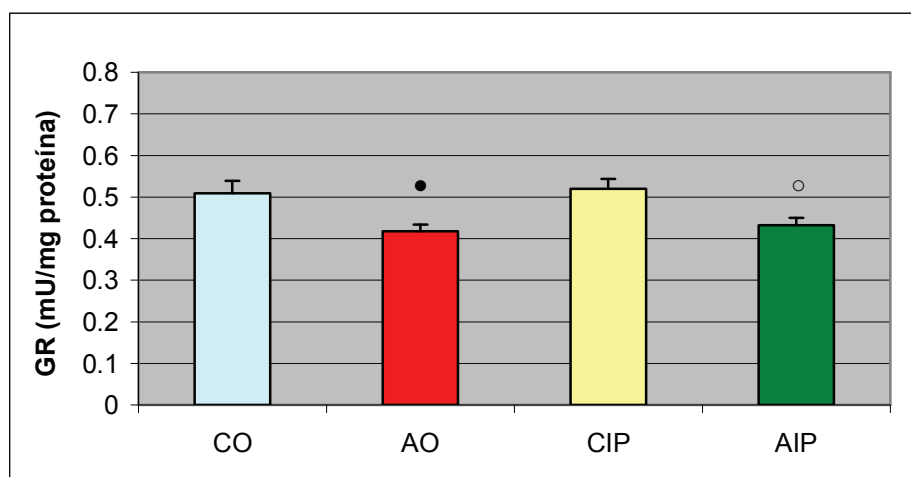


Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; CIP vs AIP: \circ $p < 0.05$.

Al estudiar la actividad de la enzima antioxidante GPx en suero, se encontró que ésta mostraba una actividad reducida en los grupos expuestos al alcohol, con respecto a los grupos controles (Figura 22). Este hallazgo podría explicarse por la disminución detectada en los niveles de Se en el suero de estas ratas, dado que el Se forma parte del sitio activo de esta enzima (Negro, 2008). Se ha establecido que la principal isoforma de la familia de la GPx presente en el plasma es la GPx3, la cual, tras su formación en los túbulos renales, es liberada al plasma y constituye, junto con la SeP, el 97% de todo el Se plasmático (Olson y cols., 2010). Queda así patente, mediante esta investigación, que

existe una relación directa entre los niveles de Se en el suero y la actividad de la GPx sérica ya que en los dos grupos, sometidos al consumo de alcohol, ambos parámetros disminuyeron en igual medida. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que proponen la actividad de la GPx3 como un biomarcador del estado del Se en suero (Ballihaut y cols., 2011; Combs GF Jr y cols., 2011 y 2013).

Figura 23. Actividad de la GR (mU/mg proteína) en el suero



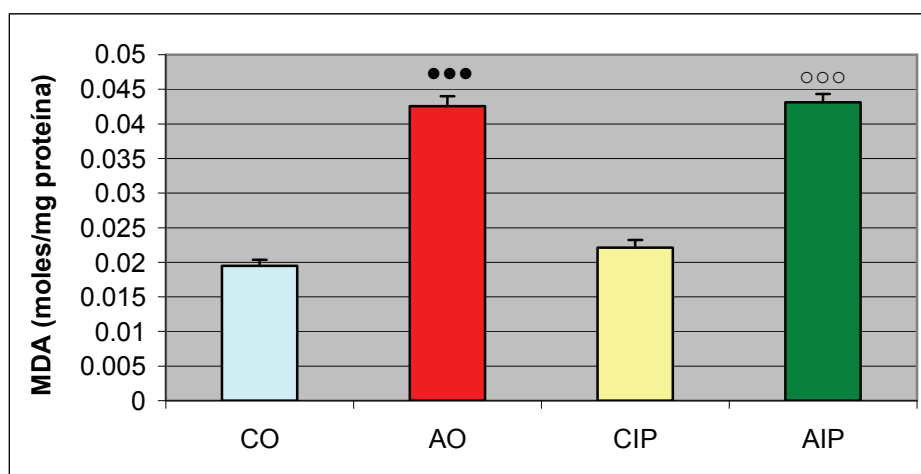
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$; CIP vs AIP: ◦ $p < 0.05$.

La actividad de la enzima GPx depende de la acción de la GR. Así, se determinó la actividad de esta enzima, que como muestra la Figura 23, presentó una disminución significativa en los grupos que consumen alcohol, con respecto a sus controles. Se sabe que la GPx y la GR son dos enzimas íntimamente relacionadas, ya que la GR regenera el GSH reducido consumido por la GPx (Das y Vasudevan, 2005). Si hay una menor actividad de la GPx habrá, en parte, menos GSH que regenerar y por tanto, la actividad de la GR puede estar disminuida. Por otro lado, para llevar a cabo su acción, la GR requiere la presencia de un equivalente reductor en forma de NADPH (Cascales y cols., 1997). Por el metabolismo oxidativo del alcohol, a través de la vía oxidativa del sistema microsomal (SMOE), se consume NADPH, lo cual también podría explicar la reducción detectada en la actividad de la GR.

Ya que este tipo de consumo de alcohol en forma de “binge drinking” disminuyó la actividad de las enzimas GPx y GR séricas, se procedió a determinar el estado oxidativo

de los lípidos, las proteínas y el DNA en los grupos objeto de nuestro estudio. Así, al estudiar la peroxidación lipídica presente en las muestras, se detectó un crecimiento extremadamente significativo en los niveles de MDA de los grupos expuestos al alcohol, en comparación con sus respectivos controles (Figura 24). Schlorff y cols. (1999) encontraron que la administración de una única dosis de etanol (4 g/Kg), por intubación orogástrica, también producía un incremento significativo en los niveles de MDA en el plasma de ratas adultas Fisher 344. Parece ser que, aunque el alcohol se metaboliza principalmente por la enzima alcohol deshidrogenasa, la vía alternativa del SMOE, y más específicamente la isoforma CYP2E1, que desempeña un papel importante en el metabolismo frente a elevadas cantidades de alcohol, podía estar inducida, de manera significativa, en modelos que reproducen la ingesta alcohólica tipo “binge drinking” (Zhou y cols., 2002; Kim y cols., 2008). Esta enzima desencadena un incremento en la formación de radicales libres como el anión O_2^- y el H_2O_2 , que podrían ser convertidos en radicales OH^\bullet , promoviendo el inicio de la peroxidación lipídica (Wu y cols., 2006). Por otra parte, la disminución en la actividad de la GPx, y la depleción de Se en suero, observada en estas ratas, también podían contribuir a la mayor oxidación encontrada, ya que ambos parámetros están involucrados en la reducción de los peróxidos que dañan los ácidos grasos poliinsaturados, y por tanto, frenarían el inicio de la peroxidación lipídica.

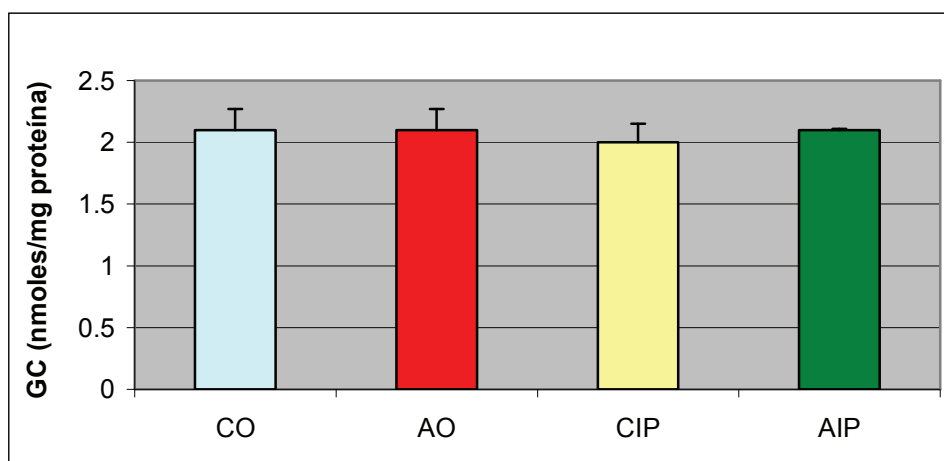
Figura 24. Niveles de MDA (moles/mg proteína) en el suero



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: *** p < 0.001; CIP vs AIP: ooo p < 0.001.

Al contrario de lo que ocurre en los lípidos, cuando se estudió la oxidación en las proteínas del suero no se observaron diferencias significativas entre los grupos con alcohol y sus respectivos controles (Figura 25). Este hecho, probablemente, sea debido a la mayor preferencia a la oxidación que presentan los triglicéridos, con múltiples dobles enlaces, entre los cuales se encuentran grupos metileno (-CH₂-) particularmente reactivos, siendo, por tanto, fácilmente dañados por los radicales libres. Un único radical hidroxilo (OH[•]) puede promover la peroxidación de muchos ácidos grasos poliinsaturados, originando una cadena destructiva que se perpetua a si misma (Wu y Cederbaum, 2003; Valko y cols., 2004). Además, como se observa en la Tabla 22, los grupos expuestos al alcohol presentaron mayor concentración de triglicéridos en suero.

Figura 25. Niveles de grupos carbonilo (nmoles/mg proteína) en el suero



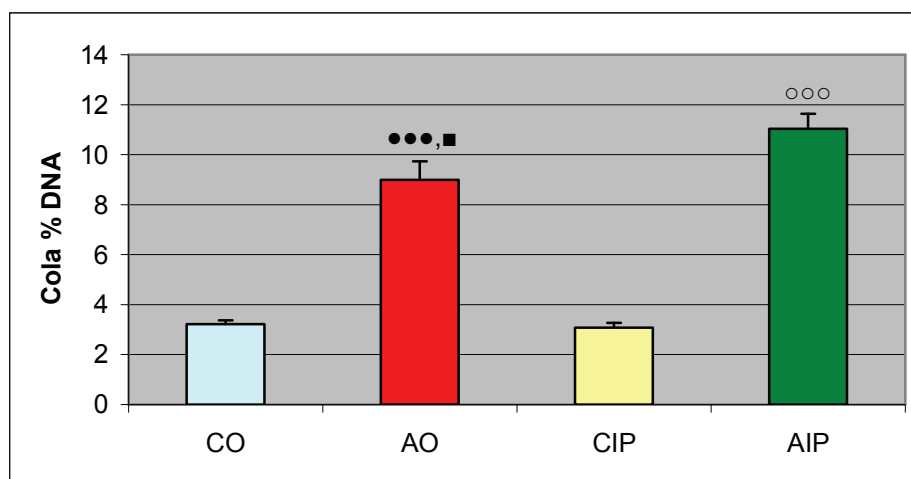
Los resultados se expresan como la media ± ESM.

Finalmente, se determinó el daño oxidativo que presentaba el DNA como consecuencia de los distintos modelos de consumo de alcohol, utilizando para ello los linfocitos periféricos extraídos de la sangre, ya que estos son células eucariotas con propiedades idénticas a otras células somáticas. Así, los efectos que el etanol provoca en el DNA de los linfocitos podrían reflejar y representar, en cierta medida, los efectos del etanol sobre el organismo.

Por otro parte, ya que los linfocitos periféricos son las células somáticas más accesibles, pueden considerarse como un modelo bastante conveniente para investigar la genotoxicidad del etanol (Arva y Andersson, 1999; Yan y cols., 2011). Para ello se utilizó la técnica de Comet alcalino, mediante la cual se evalúa la pérdida de integridad del DNA, producida, en este caso, como consecuencia de la genotoxicidad provocada por las ERO en las células (Duthie y cols., 1996).

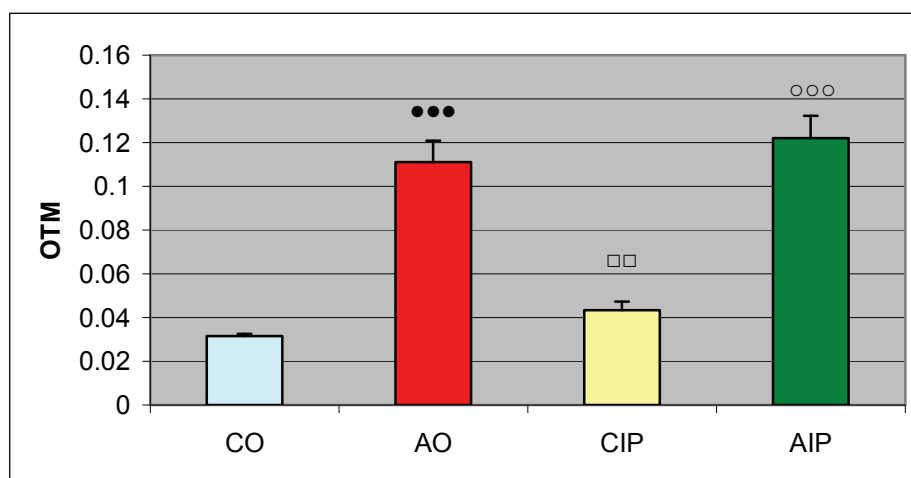
Como se puede observar en la Figura 26, el porcentaje de DNA en la cola se encontraba extremadamente aumentado en los grupos expuestos al alcohol, con respecto a sus grupos controles. Además, se constató que dicho porcentaje era inferior en el grupo AO en comparación al grupo AIP. En la Figura 27, el Olive Tail Moment también estuvo extremadamente aumentado en los grupos con alcohol, en relación a sus controles. Además, se observó un incremento significativo de este parámetro en el grupo CIP en comparación con el grupo CO.

Figura 26. Porcentaje de fluorescencia en cola (representando el porcentaje de DNA en cola) en linfocitos de sangre periférica



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: *** p<0.001; AO vs AIP: ■ p<0.05; CIP vs AIP: ooo p<0.001.

Figura 27. Olive Tail Moment



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: ••• $p < 0.001$; CO vs CIP: □□ $p < 0.01$; CIP vs AIP: ○○○ $p < 0.001$.

Los parámetros representados en estas dos figuras ponen de manifiesto que la ingesta de alcohol, en forma de “binge drinking”, altera la estabilidad del material genético, provocando daño en el DNA y por tanto, aumenta la frecuencia de rotura en la doble hélice, lo que hace que incremente el porcentaje de DNA en la cola.

Además, estos resultados nos permiten deducir que la administración de alcohol por la vía intraperitoneal genera un mayor daño sobre el DNA que la ingesta de alcohol por vía oral. Por otro lado, aunque no se verificaron cambios significativos en la estabilidad del material genético en las ratas de los grupos controles, la vía intraperitoneal produjo una mayor fragmentación en la doble hélice del DNA, como se demuestra tras la determinación del Olive Tail Moment en los grupos CO y CIP. En base a estos datos, se puede establecer que la inyección intraperitoneal, de solución salina en el grupo CIP, no provocó cambios en la estabilidad del material genético, sin embargo, esta vía de administración fue más dañina ya que el escaso porcentaje de DNA que apareció en la cola estaba más fragmentado que en el grupo CO, posiblemente debido al estrés que la manipulación y el pinchazo provocaban en las ratas.

El mecanismo por el cual el alcohol (agudo o crónico) genera genotoxicidad todavía no es bien conocido. Sin embargo, se postula que el metabolismo oxidativo del etanol, con la generación de ERO, y de forma especial, mediante el radical OH^{\bullet} , desempeña un

papel primordial en este fenómeno (Phillips y Jenkinson, 2001; Stickel y cols., 2002). Este radical puede provocar la rotura de la cadena de DNA y modificar las bases nitrogenadas. Así, el alcohol reacciona con la guanina, produciendo hidroxilación en el C-8, generando el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Chen y cols., 2011). Esta molécula, 8-OHdG, es considerada un biomarcador del daño oxidativo al DNA y presenta un potencial mutagénico (Halliwell, 2000; Mayne, 2003).

Guo y cols. (2008), utilizando ratones Swiss, a los cuales administraron una única dosis de etanol al 20% (2.5 o 5 g/Kg) por vía intraperitoneal, comprobaron, que ambas dosis, provocaban un daño oxidativo en el DNA de los leucocitos periféricos, así como un incremento en los niveles de 8-OHdG y de ERO. Recientemente, en 2011, Yan y cols. encontraron, en linfocitos periféricos humanos, un aumento significativo en el daño al DNA después de un tratamiento *in vitro* con etanol. En este estudio se utilizaron concentraciones de etanol desde 50 a 100 mM, consideradas similares a las concentraciones que se verifican en la sangre en un “binge drinking”. Paralelamente, estos autores observaron un incremento en los niveles de 8-OHdG y un aumento en la generación de ERO, incluso del radical OH[•]. Además, estos investigadores pusieron de manifiesto que el etanol, en este tipo de administración, podía ser metabolizado en los linfocitos periféricos humanos, a través de las vías ADH y ALDH, y no por medio de la isoforma CYP2E1. En ambos estudios, los investigadores asocian directamente el daño al DNA al estrés oxidativo inducido por el alcohol.

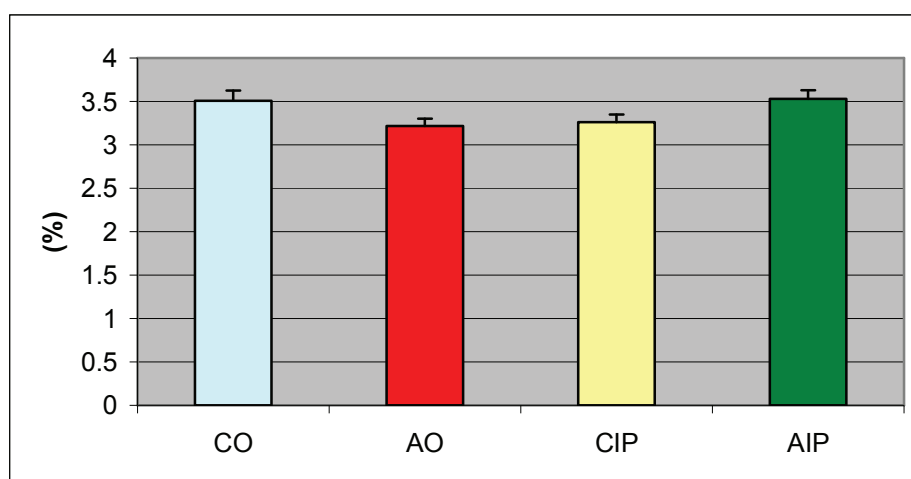
1.4. Estudio del estrés oxidativo en el hígado

La ingesta aguda así como la ingesta crónica de alcohol pueden producir daño hepático, fundamentalmente, a través de su metabolismo oxidativo, ya que alrededor del 90% del alcohol ingerido es metabolizado por este órgano (Masalkar y Abhang, 2005). Sin embargo, hasta la fecha, hay pocos estudios que relacionen el consumo de alcohol tipo “binge drinking” con el balance oxidativo, en el hígado de ratas adolescentes, y menos aún que comparen si existen diferencias en la capacidad antioxidante, según la vía de administración de alcohol utilizada.

1.4.1. Análisis macromorfológico del hígado

Como se observa en la Figura 28, no existieron diferencias significativas en el índice organosomático del hígado entre los diferentes grupos estudiados. Estos resultados concuerdan con la investigación desarrollada por Carmiel-Haggai y cols. (2003), que utilizando ratas Fa/? Zucker, a las cuales habían administrado etanol al 35% (4 g/Kg cada 12h) durante tres días por vía gavage, encontraron que no se producían diferencias significativas en el índice organosomático de este órgano en comparación al grupo control que recibió solución salina por la misma vía.

Figura 28. Índice organosomático. Hígado (%)



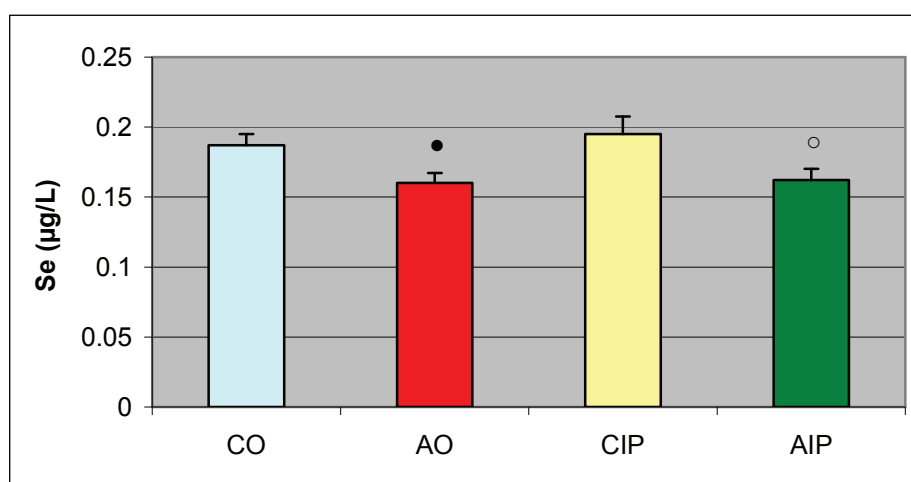
Los resultados se expresan como la media \pm ESM.

La administración crónica de alcohol produce resultados muy diferentes al modelo empleado en este trabajo al generar hepatomegalia e incrementar el índice organosomático del hígado (Okuno F y cols., 1991; Saravanan y Nalini, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el consumo de alcohol tipo “binge drinking” no afecta a la masa hepática y que, probablemente, sea necesario un mayor tiempo de tratamiento con alcohol para que se verifiquen cambios en este parámetro.

1.4.2. Balance antioxidante y marcadores del estrés oxidativo

Al estudiar los niveles de Se hepáticos se pudo observar que existía una disminución significativa ($p < 0.05$) en los grupos expuestos al alcohol en comparación a sus respectivos controles (Figura 29). Houze y cols. (1991) identificaron también una disminución similar de los niveles de Se en el hígado de ratas Sprague-Dawley, a las cuales administraron una dosis de etanol (50 mmol/Kg) por vía intraperitoneal.

Figura 29. Niveles de selenio ($\mu\text{g/L}$) en el hígado

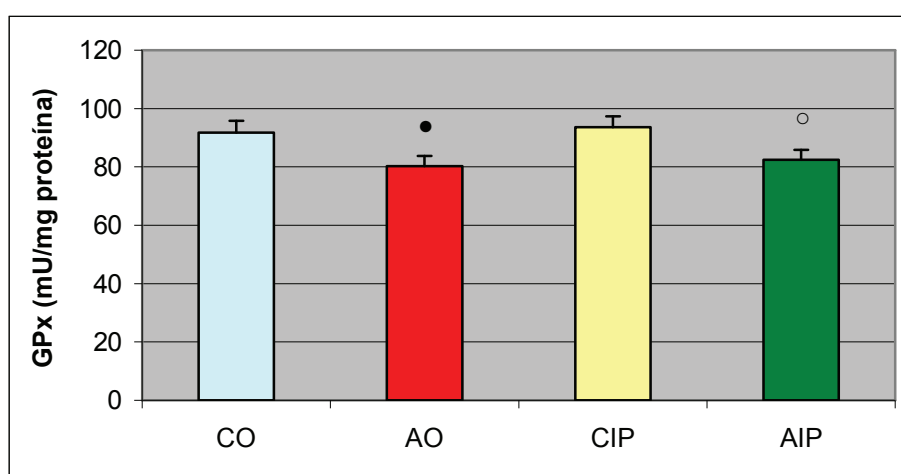


Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: \bullet $p < 0.05$; CIP vs AIP: \circ $p < 0.05$.

La depleción de Se encontrada en el hígado de estos animales podría producirse, en parte, como consecuencia del metabolismo oxidativo del etanol, ya que como se mencionó anteriormente, los productos tóxicos formados, como los radicales libres y las ERO, podrían interferir en el propio metabolismo del Se alterando la formación de las distintas selenoproteínas hepáticas, proteínas mediante las cuales el Se se almacena en el hígado. Por otro lado, a pesar de la disminución en la ingesta de nutrientes y, por tanto, de Se que se verificó en el grupo AO, no existieron diferencias significativas con respecto al grupo AI. Por tanto, parece que los depósitos de Se hepático se alteran, principalmente, por efecto directo de la exposición al alcohol más que por el déficit nutricional que acarrea su consumo oral, así en ambos modelos existen cantidades similares de Se para sintetizar las selenoproteínas.

A continuación, al estudiar la capacidad antioxidante de las distintas enzimas hepáticas se pudo observar una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad de la principal selenoproteína hepática con función antioxidante, la GPx, en los grupos expuestos al alcohol con respecto a sus controles (Figura 30). Estos resultados están en consonancia con Artun y cols. (2010), quienes utilizando ratas adultas Wistar sometidas a un tratamiento con tres dosis de alcohol al 33% (5 g/Kg cada 12 horas), por vía oral, observaron una disminución significativa en la actividad hepática de la GPx.

Figura 30. Actividad de la GPx (mU/mg proteína) en el hígado



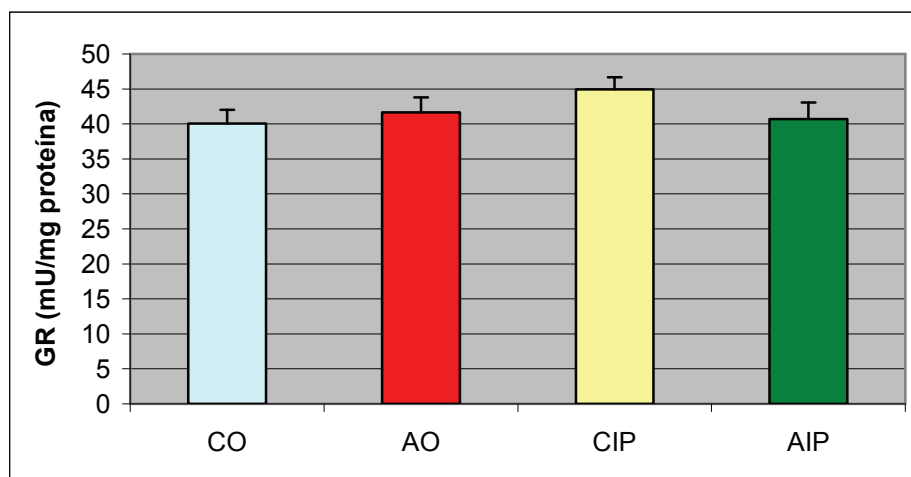
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: \bullet $p < 0.05$; CIP vs AIP: \circ $p < 0.05$.

La reducción de esta actividad antioxidante está en consonancia con los niveles de Se encontrados en el hígado, algo esperable, pues el Se, en forma de selenocisteína, forma parte del núcleo activo de esta enzima. Así, las diferentes vías de administración de alcohol utilizadas parecen alterar por igual la actividad de esta enzima.

Respecto a la actividad de la GR, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados (Figura 31). Probablemente, en el hígado esta enzima no está alterada por este tipo de consumo de alcohol, ya que, como se mencionó en el apartado anterior, la GR se encarga de reciclar el GSSG oxidado por acción de la GPx, disminuida en estos grupos, por lo que no sería necesaria una sobreactivación de la GR.

A diferencia de lo que sucede en suero, donde la GPx y la GR están disminuidas, la actividad constante de la GR podría deberse a unos niveles superiores de NADPH en el hígado respecto al suero, puesto que en este tejido la acción oxidativa directa del alcohol requiere de este cofactor.

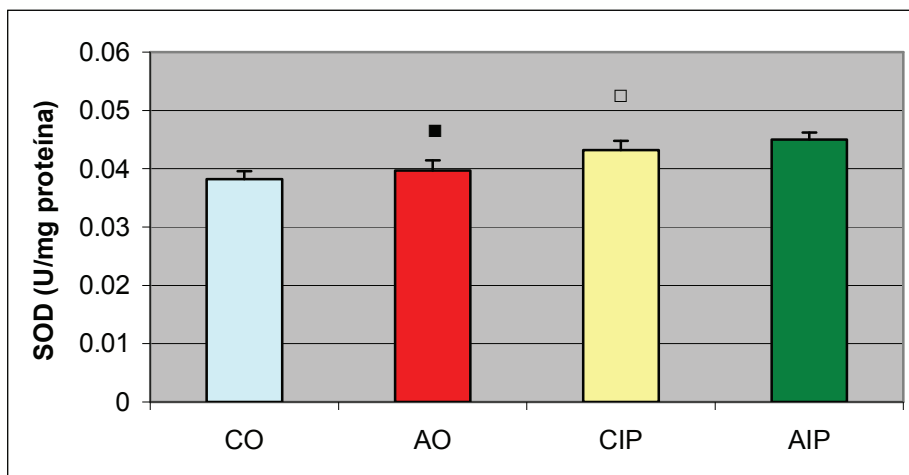
Figura 31. Actividad de la GR (mU/mg proteína) en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM.

También se determinó la actividad de la enzima SOD, considerada la primera línea de defensa antioxidante contra los radicales libres (Shah y cols., 2013). Como se muestra en la Figura 32, la actividad de esta enzima aumentó significativamente en los grupos CIP y AIP en comparación a los grupos del modelo oral, no encontrándose ninguna diferencia como consecuencia de la exposición al alcohol en el grupo AIP. Estos resultados sugieren que la vía de administración intraperitoneal estimula la actuación de la SOD como un mecanismo de defensa compensatorio frente al estrés oxidativo provocado por la inyección, ya que, como se mencionó en los antecedentes, la técnica de administración intraperitoneal, *per se*, puede ser una fuente de estrés (D'Souza El Guindy y cols., 2010). Sin embargo, el consumo de alcohol tipo “binge drinking” no altera el funcionamiento de esta enzima.

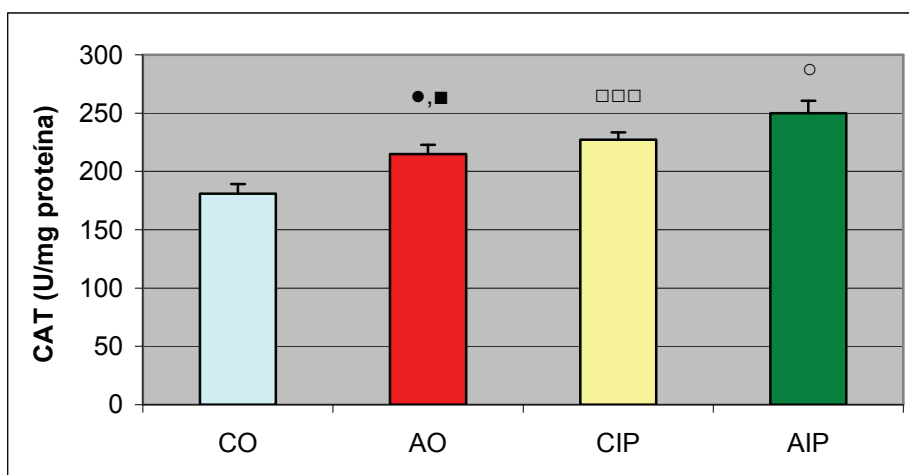
Figura 32. Actividad de la SOD (U/mg proteína) en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs CIP: \square $p < 0.05$; AO vs AIP: \blacksquare $p < 0.05$.

Bajo estas condiciones experimentales, se determinó la actividad de la CAT. Como se observa en la Figura 33, se verificó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de esta enzima en los AO y AIP en comparación con sus controles. También se constató que la actividad de la CAT era significativamente mayor en el grupo CIP y AIP que en los respectivos grupos del modelo oral (CO vs CIP: $p < 0.001$; AO vs AIP: $p < 0.05$).

Figura 33. Actividad de la CAT (U/mg proteína) en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: \bullet, \blacksquare $p < 0.05$; CO vs CIP: $\square\square$ $p < 0.001$; AO vs AIP: \blacksquare $p < 0.05$; CIP vs AIP: \circ $p < 0.05$.

La enzima CAT lleva a cabo la reducción de H_2O_2 hasta H_2O y O_2 , pero también participa en el metabolismo oxidativo del alcohol, aunque tiene un papel muy leve durante un consumo moderado. Sin embargo, ante concentraciones elevadas de alcohol se produce la inducción de esta enzima, interviniendo de manera más relevante en el metabolismo de esta droga (Scott y cols., 2000). El incremento observado en la actividad de la CAT de los grupos AO y AIP puede ser, por tanto, consecuencia de la inducción producida por el consumo elevado de alcohol en forma de “binge drinking”, y además, de la presencia de H_2O_2 , pues como se mencionó anteriormente, la inducción de CYP2E1, a dosis elevadas de alcohol, conlleva a la formación de una mayor cantidad de H_2O_2 .

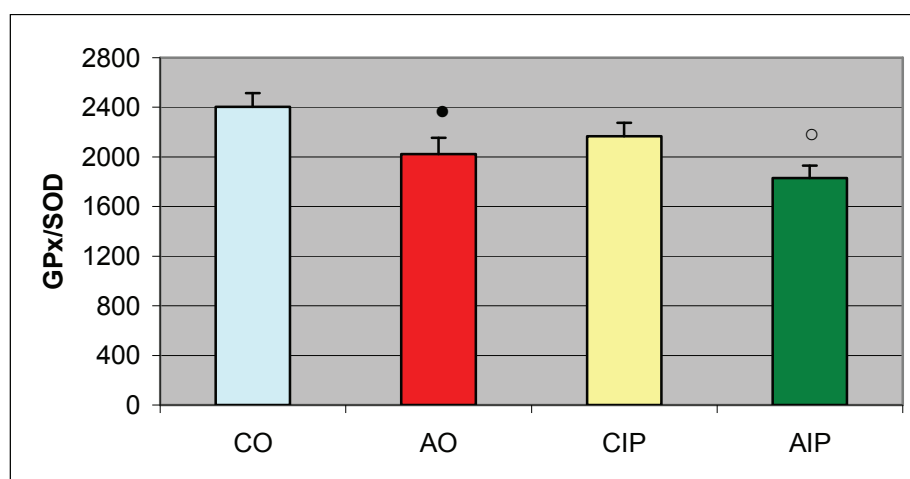
El H_2O_2 necesario para la actuación de la CAT puede proceder, además de la activación de la enzima SOD y del CYP2E1, de muy diversas fuentes, entre las cuales se incluyen la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, así como, por la oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas (Bradford, 2007; Comporti y cols., 2010). En estudios preliminares, realizados en este laboratorio, se ha observado un aumento de NADPH oxidasa en los grupos CIP y AIP, que recibían solución salina y alcohol por vía intraperitoneal. Por tanto, el exceso de H_2O_2 generado por esta enzima, junto al generado por la SOD (también incrementada en los grupos de tratamiento intraperitoneal), podrían explicar la mayor actividad encontrada en los grupos sometidos a la inyección intraperitoneal en comparación con sus respectivos grupos en el modelo oral.

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, se podría sugerir que la vía de administración utilizada para simular el consumo de alcohol tipo “binge drinking” juega un papel muy importante en la activación de las enzimas SOD y CAT, incluso en ausencia de alcohol. Así, se ha demostrado que la inyección intraperitoneal provoca un estrés (oxidativo) en estos animales que exige una sobreactivación de la CAT y SOD para mantener el equilibrio redox en el interior de las células hepáticas. La mayor actividad encontrada para la SOD y para la CAT en el grupo CIP en comparación al grupo CO, corrobora este argumento.

Posteriormente, se calcularon las ratios GPx/SOD y CAT/SOD con el fin de conocer la capacidad defensiva del hígado para hacer frente al estrés oxidativo provocado por el H₂O₂ y el alcohol (Kartvelishvili y cols., 2004). Como se puede observar, en la Figura 34, la relación GPx/SOD está disminuida significativamente ($p < 0.05$) en los grupos sometidos al consumo agudo de alcohol en comparación a sus controles. Estos resultados nos permiten sugerir que la enzima GPx no está actuando de forma adecuada, por lo que es incapaz de descomponer eficazmente el H₂O₂ originado por la exposición al alcohol. Por tanto, es probable, que como consecuencia de la alteración producida en la capacidad antioxidante de esta enzima se esté promoviendo la oxidación en las biomoléculas hepáticas.

Este hecho es debido, en parte, a la depleción hepática de Se encontrada en estos animales, pero también a la alta dosis de alcohol a la que están expuestos, que induce a la isoforma CYP2E1, generando mayor cantidad de ERO (Zhou y cols., 2002; Cederbaum, 2006). Entre estas se incluyen el H₂O₂, sustrato de la GPx, pero que a altas concentraciones satura a la enzima (Barja de Quiroga, 1997; Góth, 2006; Huang y cols., 2009).

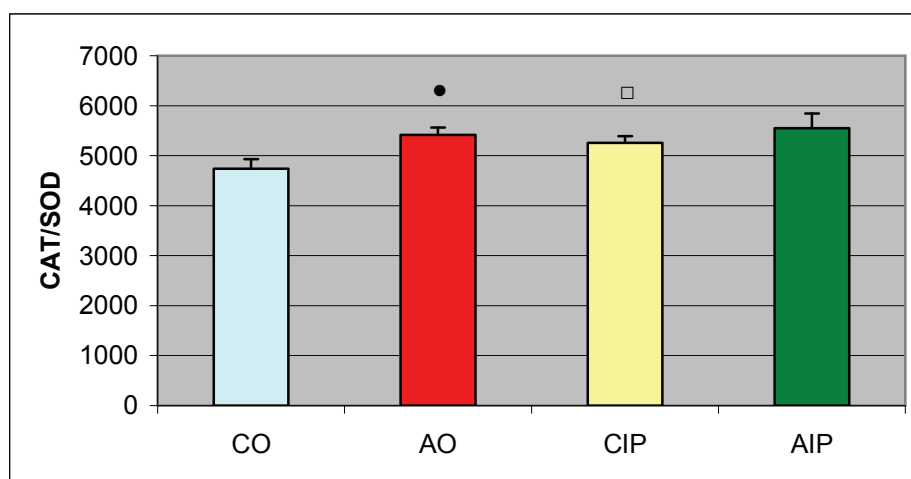
Figura 34. Ratio GPx/SOD en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$; CIP vs AIP: ° $p < 0.05$.

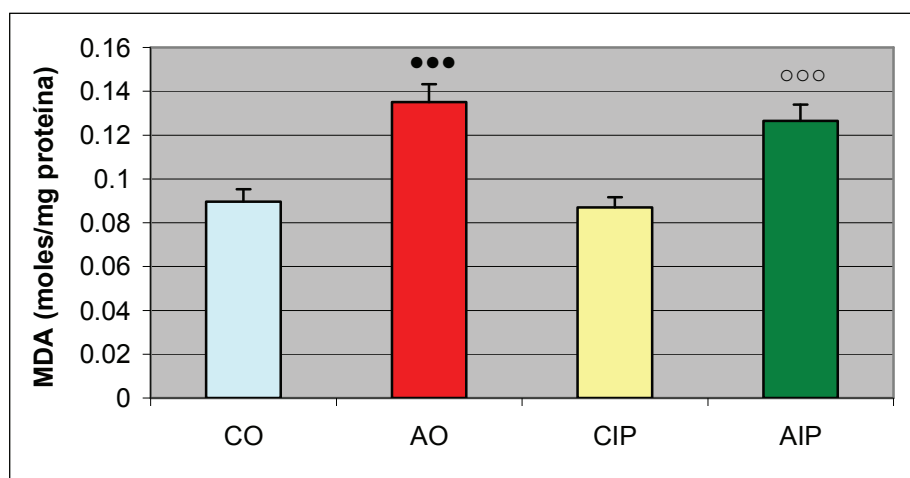
Al calcular el cociente CAT/SOD en el hígado de los diferentes grupos (Figura 35) observamos un menor valor en el grupo CO con respecto al resto de los grupos, indicando que tanto la exposición al alcohol (CO vs AO: $p < 0.05$) como la vía de administración intraperitoneal (CO vs CIP: $p < 0.05$) ponen en marcha el sistema antioxidante CAT/SOD con el fin de descomponer el H_2O_2 formado y hacer frente al estrés oxidativo originado por el consumo de alcohol tipo “binge drinking” y por la inyección intraperitoneal, aunque no en todos los casos fue conseguido, como veremos al analizar la oxidación que presentan los lípidos y las proteínas hepáticas.

Figura 35. Ratio CAT/SOD en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$; CO vs CIP: □ $p < 0.05$.

Al determinar el estado oxidativo que presentaban las células hepáticas se pudo observar que los niveles del marcador de la peroxidación lipídica (MDA) estaban significativamente aumentados ($p < 0.001$) en los grupos expuestos al alcohol en comparación a sus respectivos controles (Figura 36), no existiendo diferencias significativas entre los grupos controles.

Figura 36. Niveles de MDA (moles/mg proteína) en el hígado

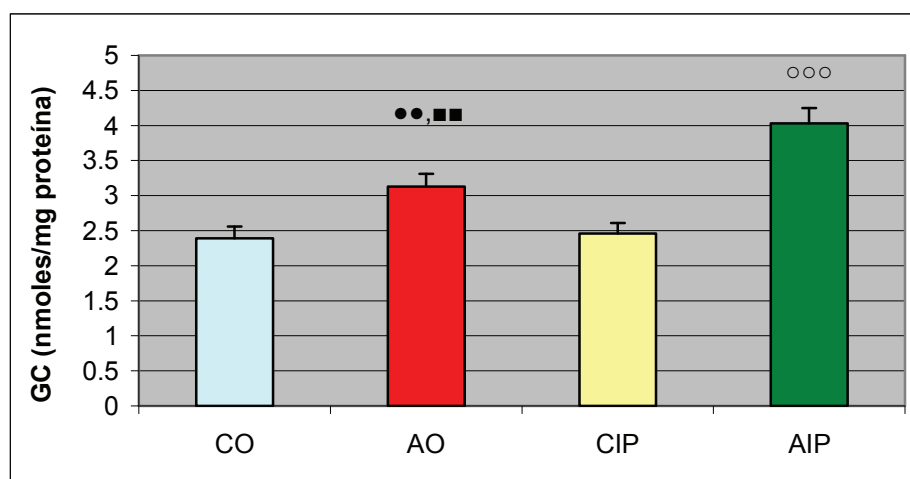
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: *** $p < 0.001$; CIP vs AIP: ooo $p < 0.001$.

La peroxidación lipídica en el hígado asociada a este tipo de consumo de alcohol, ha sido descrita en numerosos estudios, siempre en animales adultos (Husain y Somani, 1997; Zhou y cols., 2002; Kim y cols., 2008; Artun y cols., 2010; Yang y cols., 2012). Debido al proceso metabólico del alcohol, y a la activación de la isoforma CYP2E1, se produce, en el hígado, acetaldehído y una gran cantidad de ERO que inician la peroxidación lipídica. Por otro lado, la depleción de sustancias con propiedades antioxidantes, como el Se, que forma parte de la enzima GPx, también parece contribuir en este proceso oxidativo, disminuyendo la actividad de esta enzima (Soudani y cols., 2011). Así, independientemente de la vía utilizada para la administración de alcohol, se produce la misma cantidad de oxidación lipídica en ambos modelos, no afectando, en este caso, las distintas actividades de CAT y SOD, encontradas en los grupos expuestos al alcohol. Respecto a los controles, el aumento de la SOD y CAT, provocado por la inyección intraperitoneal, quedó compensado no existiendo oxidación lipídica en las ratas CIP.

En la Figura 37 se puede observar que los grupos carbonilo, indicadores del grado de oxidación de las proteínas, estaban significativamente aumentados en el grupo AO ($p < 0.01$) y AIP ($p < 0.001$) en comparación con sus respectivos controles. Además, se verificó que estos grupos carbonilo eran significativamente inferiores en el grupo AO

que en el AIP ($p < 0.01$). Trabajos previos han revelado resultados similares siempre en ratas adultas. Así, Vendemiale y cols. (1998) detectaron un incremento significativo de los grupos carbonilo en el hígado, mediante una investigación desarrollada en ratas Sprague-Dawley adultas, que recibieron una única dosis de etanol al 25% (4 g/Kg) por gavage. Posteriormente, Zhou y cols., (2002) identificaron un aumento del mismo parámetro en el hígado de ratones adultos normales (9 semanas), los cuales habían sido sometidos a tres dosis de etanol al 25% (5 g/Kg cada 12 horas), también mediante la técnica de gavage.

Figura 37. Niveles de grupos carbonilo (nmoles/mg proteína) en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: •• $p < 0.01$; AO vs AIP: ■ $p < 0.01$; CIP vs AIP: °°° $p < 0.001$.

En nuestra investigación, queda patente que el consumo agudo de alcohol provoca un desequilibrio antioxidante que contribuye a la oxidación de las proteínas de los grupos AO y AIP. Es conocido que las proteínas son una diana importante del ataque oxidativo, dado que las ERO pueden oxidar los residuos aminoacídicos, romper enlaces peptídicos, aumentar la fragmentación y la susceptibilidad a la degradación proteolítica (González-Torres y cols., 2000; Bailey y cols., 2001). Además, estas modificaciones pueden ser, potencialmente, mucho más importantes que el daño oxidativo generado en los lípidos, ya que afectan a una amplia variedad de funciones celulares como los mecanismos de transducción de señales y la actuación de receptores, transportadores y sistemas enzimáticos (Kapaki y cols., 2007).

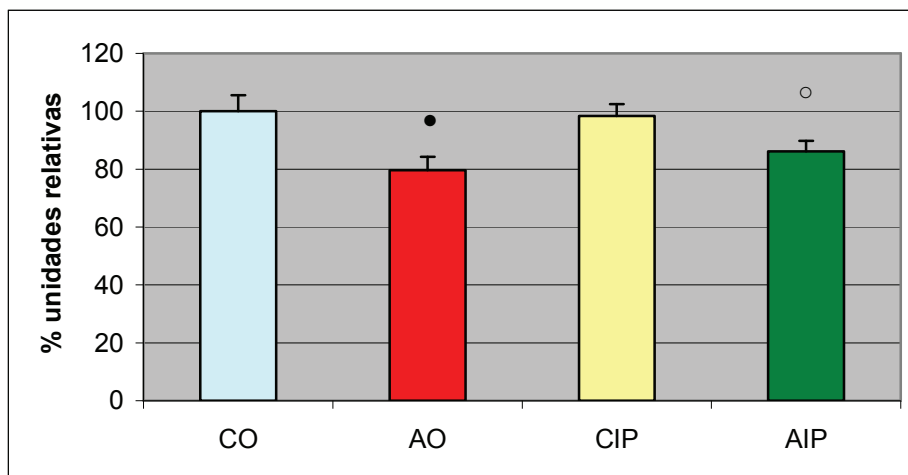
Finalmente, la mayor oxidación proteica observada en el grupo AIP en comparación al grupo AO demuestra que el aumento de la ratio CAT/SOD no ha sido suficientemente eficaz en estas ratas para luchar frente al estrés generado por los altos niveles de OH[•] y la inyección intraperitoneal, poniendo en evidencia que la vía de administración intraperitoneal es más dañina, desde el punto de vista oxidativo, que la vía oral.

1.4.3. Expresión de las selenoproteínas hepáticas

El hígado no solo está involucrado en el metabolismo oxidativo del alcohol sino que además, es el principal órgano donde se produce la incorporación del Se, en forma de selenocisteína, a las distintas selenoproteínas, como los miembros de la familia GPx y la Selp (Burk y Hill, 2009). La expresión y síntesis de estas selenoproteínas es transcripcionalmente dependiente del estado de Se, de manera que se produce una competición por este nutriente cuando comienza a ser limitante. Por ello, se estudió como el consumo de alcohol tipo “binge drinking” al deplecionar los niveles de Se hepático, puede afectar la expresión hepática de estas selenoproteínas con funciones antioxidantes.

Tal como se puede ver en la Figura 38, la expresión de la GPx1 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en los grupos expuestos a un consumo agudo de alcohol en comparación a sus controles del mismo modo que disminuyó la actividad GPx hepática y los niveles de Se hepático. Ante estos resultados, podemos sugerir que la disminución de la actividad GPx hepática está directamente relacionada con los niveles de Se y la expresión de GPx1. De hecho, la GPx1 es una de las selenoproteínas más sensibles a los cambios en el Se hepático, presentando una rápida disminución en su actividad enzimática y en sus niveles de expresión en animales con deficiencia en este nutriente (Steinbrenner y Sies, 2009). En base a estos datos, se podría concluir que la exposición al alcohol en forma de “binge drinking”, tanto por el modelo oral como por el intraperitoneal, disminuye la concentración de Se, y por tanto, reduce la expresión de la enzima GPx1 así como su actividad enzimática.

Figura 38. Niveles de expresión de GPx1 en el hígado



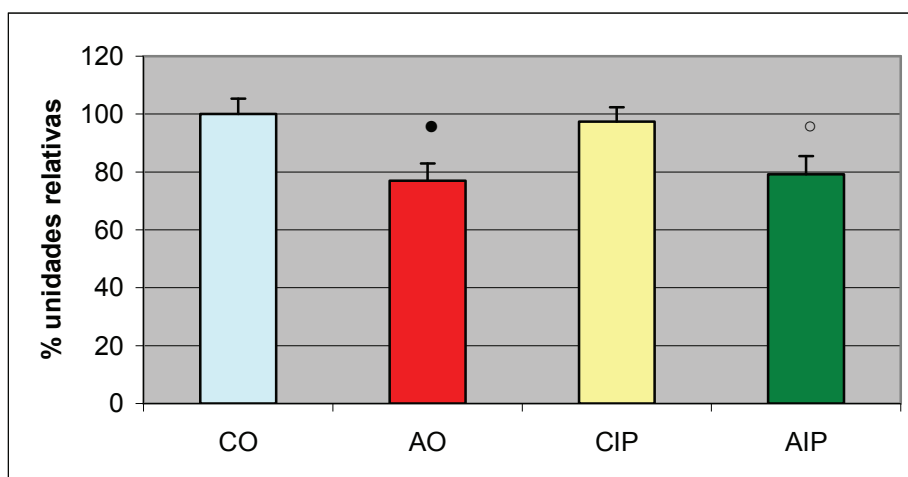
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • p<0.05; CIP vs AIP: ° p<0.05.

Como muestra la Figura 39, la expresión de la selenoproteína GPx4 también estuvo disminuida en los grupos expuestos al alcohol de manera significativa ($p<0.05$) con respecto a sus controles. En este caso, la reducción observada también fue proporcional a la depleción de Se encontrada por la exposición al alcohol, si bien la expresión de esta selenoproteína en adultos no suele alterarse por un déficit moderado de Se (Sunde y cols., 2005), en la adolescencia parece hacerlo.

Esta proteína es una enzima antioxidante que reduce los hidroperóxidos de las membranas lipídicas y las lipoproteínas debido a sus características específicas, como su pequeño tamaño, la superficie hidrofóbica y su alta afinidad por los hidroperóxidos lipídicos (Brigelius-Flohé, 1999). La importancia de esta enzimas está demostrada en embriones y animales neonatos, puesto que es esencial para su supervivencia (Imai y cols., 2003; Yant y cols., 2003). Recientemente, también se ha comprobado que la GPx4 es fundamental para la supervivencia del animal adulto, ya que es esencial para la integridad de las mitocondrias y para la supervivencia de las neuronas (Yoo y cols., 2012). Por ello, la disminución en la expresión de la GPx4 observada en los grupos expuestos a “binge drinking” podría comprometer la función mitocondrial, favorecer la apoptosis en las células del hígado y por tanto, promover el daño hepático.

Por otro lado, es conocido que la GPx4 afecta el desarrollo neuronal, regulando la diferenciación y el crecimiento de las neuronas y de sus dendritas, así como el estrés oxidativo y la neurotoxicidad (Savaskan y cols., 2007). Sin embargo, ha sido ampliamente estudiado que el abuso de alcohol durante la adolescencia altera el desarrollo cerebral y el rendimiento neurocognitivo (Skala y Walter, 2013). Así, se podría sugerir que uno de los mecanismos mediante los cuales se producen estas alteraciones a nivel neuronal, tras el consumo de alcohol tipo “binge drinking”, sea por la menor expresión de la selenoenzima GPx4. Así, se podría proponer el estudio de la expresión de la GPx4 cerebral en estos modelos experimentales para futuros trabajos en nuestro grupo de investigación.

Figura 39. Niveles de expresión de GPx4 en el hígado



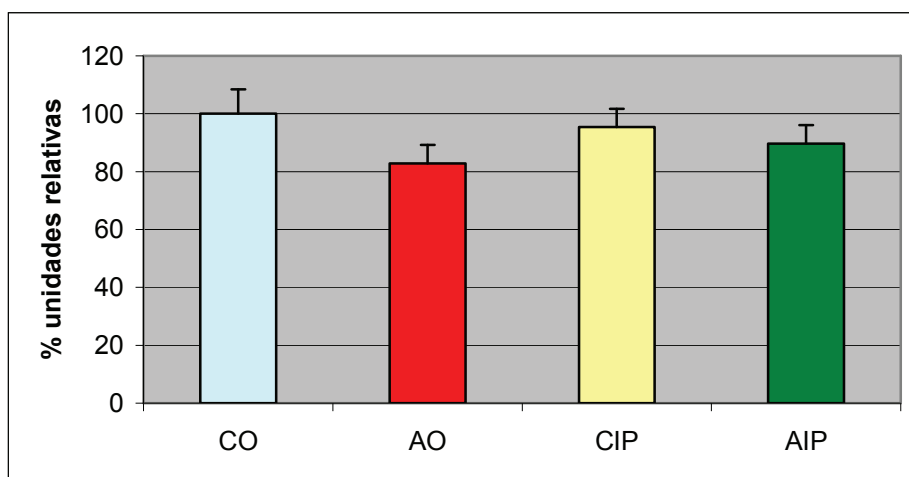
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CO vs AO: • $p < 0.05$; CIP vs AIP: ◦ $p < 0.05$.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión hepática de la selenoproteína P entre los cuatro grupos experimentales (Figura 40). Es conocido que esta proteína se ve afectada en menor medida por el estado del Se que el resto de las selenoproteínas. Por tanto, nuestros resultados en ratas adolescentes, concuerdan con la bibliografía consultada (Tapiero y cols., 2003).

Entre las funciones de esta selenoproteína destacan la de ser la principal proteína transportadora del Se en suero (entre un 60-70%), y además, la de presentar actividad

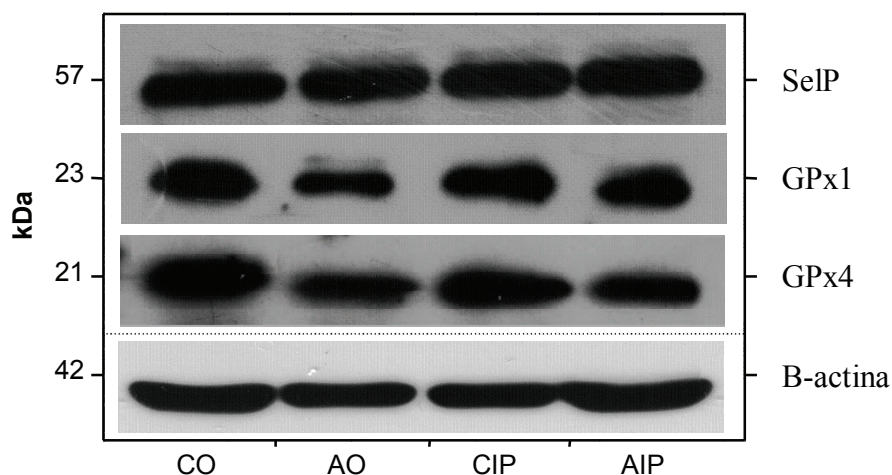
antioxidante endotelial (Castro, 2007). Sin embargo, al observar los niveles de Se en el suero de los animales expuestos al alcohol, aparecía una disminución de este nutriente, lo cual, como comentamos anteriormente, se debe a la reducción de la otra proteína transportadora de Se en suero, la GPx3, que también mostró una menor actividad en el suero de estos grupos.

Figura 40. Niveles de expresión de SelP en el hígado



Los resultados se expresan como la media \pm ESM.

Figura 41. Western blotting representativo de la expresión de selenoproteínas



En resumen, como observamos en la Figura 41, el consumo de alcohol tipo “binge drinking” durante la adolescencia, disminuye la expresión de la GPx1 y GPx4

independientemente de la vía de administración utilizada, coincidiendo con la depleción hepática de Se encontrada en los animales.

2. HUMANOS

2.1. Estudios en suero y en sangre

En humanos se realizaron estudios en suero y sangre de pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático (A), pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático (AH), y en pacientes con daño hepático de origen no alcohólico (H), y no en suero e hígado de pacientes alcohólicos expuestos a “binge drinking”, pues la posibilidad de obtener dichas muestras era extremadamente complicada. Sin embargo, teniendo en cuenta que estudios previos han detectado menor Se en suero de pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático y en pacientes con daño hepático de origen no alcohólico, nos propusimos estudiar simultáneamente los grupos A, H y AH, para ver si existían diferencias en sus niveles de Se, en la actividad de la selenoproteína antioxidante GPx y en el balance oxidativo. Concretando así, si la disminución de Se y sus repercusiones sobre el perfil oxidativo se deben al consumo de alcohol, al daño hepático producido o a ambas situaciones.

2.1.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos

Con el fin de caracterizar los distintos grupos de estudio y conocer el estado funcional del hígado se determinaron los parámetros bioquímicos que se recogen en la Tabla 23, alguno de ellos marcadores del daño hepático y otros del consumo de alcohol.

Los valores del volumen corpuscular medio (VCM), de las enzimas hepáticas, y de la bilirrubina encontrados, corroboran la clasificación de los cuatro grupos utilizados en este estudio. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía utilizada para el diagnóstico de estos pacientes, como se comentó en el apartado 2 de Material y Métodos.

Tabla 23. Análisis bioquímicos

	C (n=50)	A (n=44)	H (n=32)	AH (n=31)
Edad (años)	48 [38-71]	49 [35-73]	53 [33-76]	55 [36-70]
VCM (fL)	85.07±1.8 [80-97]	91.07±1.2 ^{aa} [78.5-99.8]	91.26±2.2 ^{b,■} [83.6-98.5]	99.71±2.9 ^{ccc,▲▲} [89.6-108]
AST (U/L)	14±1.2 [5-37]	29±1.9 ^{aaa,●●●} [17-52]	79±3.9 ^{bbb} [66-90]	88±4.3 ^{ccc,▲▲▲} [78-99]
ALT (U/L)	17.5±1.2 [5-41]	23.8±1.3 ^{aaa,●●●} [15-37]	76.8±2.1 ^{bbb,■■■} [47-116]	57.1±2.0 ^{ccc,▲▲▲} [46-73]
GGT (U/L)	22.4±1.6 [10-66]	86.8±5.0 ^{aaa,●●●} [35-139]	351.6±9.8 ^{bbb} [276-460]	379.5±9.9 ^{ccc,▲▲▲} [293-441]
Glucosa (mg/dL)	90.1±6.3 [76-110]	92.8±3.2 [82-106]	91.2±4.5 [81-109]	87.5±5.3 [80-108]
Urea (mg/dL)	21.2±1.6 [10-50]	31.1±1.830 ^{aaa} [12-52]	35.6±2.960 ^{bbb} [27-45]	28±2.550 ^c [21-35]
Sodio (mEq/L)	140.1±2.2 [135-145]	139.7±0.8 [131-145]	139.1±2.0 [132-143]	143.5±1.0 [137-152]
Potasio (mEq/L)	4.31±0.09 [3.5-5]	4.15±0.08 [3.5-5]	4.24±0.1 [3.9-4.5]	4.15±0.1 [3.9-4.5]
Creatinina (mg/dL)	0.86±0.06 [0.6-1.3]	0.83±0.04 [0.5-1.53]	0.87±0.07 [0.69-1.15]	0.91±0.07 [0.77-1.19]
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.61±0.05 [0.2-1]	1.33±0.08 ^{aaa} [0.62-2.11]	1.20±0.08 ^{bbb} [0.91-1.31]	1.43±0.13 ^{ccc} [0.98-1.68]
ALP (U/L)	70.1±5.6 [40-129]	89.3±7.4 ^{a,●●●} [48-141]	181.6±16.4 ^{bbb,■■} [153-232]	117.3±8.3 ^{ccc,▲} [98-142]
Colesterol (mg/dL)	140.2±10.9 [80-220]	154.4±7.5 ^a [84-229]	181.4±14.7 ^b [153-230]	176.2±14.2 ^c [147-227]
Triglicéridos (mg/dL)	86.8±6.5 [50-150]	117.3±11.1 ^a [56-264]	114.2±13.5 ^b [57-161]	111.6±6.4 ^c [95-130]

Los resultados se expresan como la media ± ESM y se muestran dentro de un rango. VCM: volumen corpuscular medio, AST: aspartato-aminotransferasa, ALT: alanina- aminotransferasa, GGT: gamma-glutamyl-transpeptidasa, ALP: fosfatasa alcalina. Grupos: C: control, A: pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático, H: pacientes con daño hepático no alcohólico, AH: pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático. Significación estadística: C vs A: ^a p<0.05, ^{aa} p<0.01, ^{aaa} p<0.001; C vs H: ^b p<0.05, ^{bbb} p<0.001; C vs AH: ^c p<0.05, ^{ccc} p<0.001; A vs H: ^{●●●} p<0.001; A vs AH: [▲] p<0.05, ^{▲▲} p<0.01, ^{▲▲▲} p<0.001; H vs AH: [■] p<0.05, ^{■■} p<0.01, ^{■■■} p<0.001.

Además, se determinó el perfil hematológico de cada uno de los pacientes y de los individuos del grupo control (Tabla 24). Al analizar los parámetros hematológicos, se encontró que tanto el número de hematíes como los niveles de hemoglobina eran superiores en los individuos controles frente a los grupos problemas. Sin embargo, los leucocitos estuvieron aumentados en los grupos afectados por la enfermedad hepática (H y AH) frente al grupo C (p<0.05), mientras que las plaquetas disminuyeron en estos dos grupos así como en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático (A). Este último grupo fue el que presentó el valor de hematocrito más bajo de todos los

estudiados. Nuestros resultados están de acuerdo con Das y cols. (2011) que encontraron datos similares al comparar el perfil hematológico que presentaban pacientes con enfermedad hepática no alcohólica y pacientes con daño hepático alcohólico. Estos autores proponían el examen hematológico, sobre todo el recuento de plaquetas, como una herramienta útil para identificar a los pacientes alcohólicos con daño hepático, pues estas células disminuyen drásticamente en estos individuos.

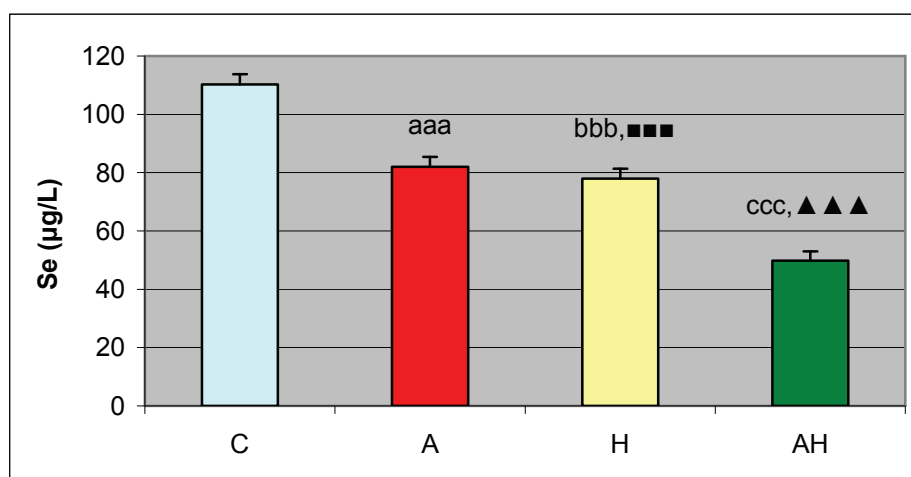
Tabla 24. Análisis hematológicos.

	C (n=50)	A (n=44)	H (n=32)	AH (n=31)
Leucocitos (K/ μ L)	5.8 \pm 0.3 [4.6-10.2]	6.3 \pm 0.4 [4.4-10.10]	7.6 \pm 0.7 ^b [5.75-9.45]	7.0 \pm 0.5 ^c [5.8-8.9]
Hematíes (M/ μ L)	5.3 \pm 0.3 [4.04-6.13]	4.2 \pm 0.2 ^{aa} [2.24-5.47]	4.1 \pm 0.2 ^b [3.63-5.08]	3.8 \pm 0.2 ^{cc} [2.86-4.32]
Hemoglobina (g/dL)	15.3 \pm 0.6 [12.2-18.1]	12.5 \pm 0.5 ^{aa} [7.2-16.4]	13.2 \pm 0.4 ^b [12.1-14.5]	13.3 \pm 0.4 ^c [10.7-15.5]
Hematocrito (%)	44.2 \pm 3.1 [37.7-53.7]	36.9 \pm 1.6 ^a [21.3-47.4]	38.9 \pm 1.7 [35.1-44.9]	39.3 \pm 2.7 [31.4-46.8]
Plaquetas (K/ μ L)	312.3 \pm 21.5 [142-424]	188.7 \pm 15.3 ^{aaa} [70-350]	204.5 \pm 9.6 ^{bbb,■■■} [180-245]	123.7 \pm 9.1 ^{ccc,▲▲} [88-148]

Los resultados se expresan como la media \pm ESM, analizados por t-Student y como un rango. Grupos: C: control, A: pacientes alcohólicos crónicos sin daño hepático, H: pacientes con daño hepático no alcohólico, AH: pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático. Significación estadística: C vs A: ^a p<0.05, ^{aa} p<0.01, ^{aaa} p<0.001; C vs H: ^b p<0.05, ^{bbb} p<0.001; C vs AH: ^c p<0.05, ^{ccc} p<0.001; A vs AH: ^{▲▲} p<0.01; H vs AH: ^{■■■} p<0.001.

2.1.2. Estrés oxidativo

En la Figura 42 se observa una disminución significativa (p<0.001) de los niveles de Se en el suero de los pacientes alcohólicos crónicos (A) y en los pacientes con daño hepático no alcohólico (H). Esta reducción también tuvo lugar en los pacientes del grupo AH, siendo la disminución aún mayor que en los otros grupos (p<0.001).

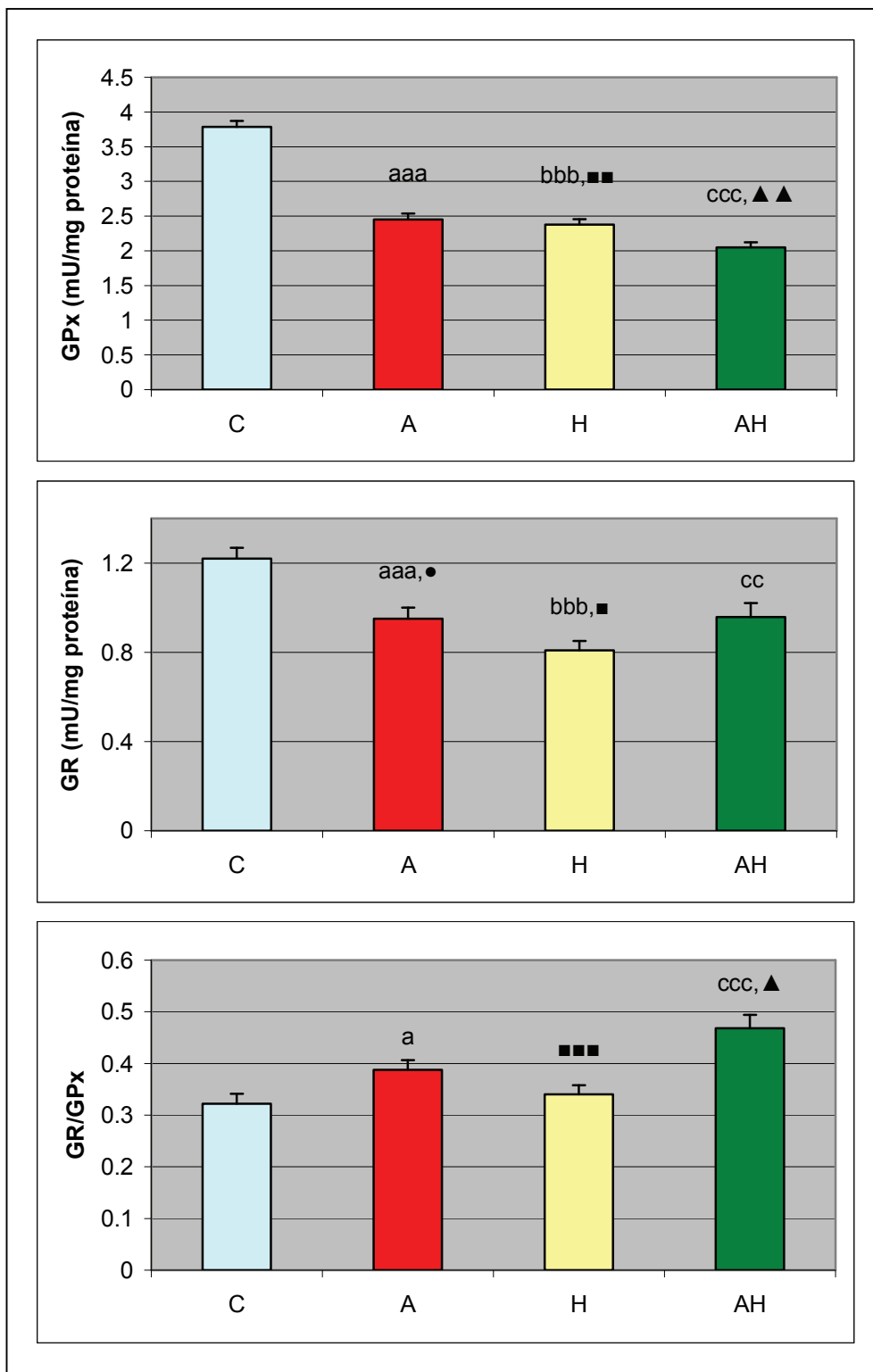
Figura 42. Niveles de selenio ($\mu\text{g/L}$) en el suero

Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: C vs A: ^{aaa} $p < 0.001$; C vs H: ^{bbb} $p < 0.001$; C vs AH: ^{ccc} $p < 0.001$; A vs AH: ^{▲▲▲} $p < 0.001$; H vs AH: ^{■■■} $p < 0.001$.

Otros investigadores también han encontrado un descenso significativo de los niveles de Se en el suero de pacientes alcohólicos y en pacientes afectados por la enfermedad hepática (Thuluvath y Triger, 1992; Guarini y cols., 1998; González-Reimers y cols., 2008). En este estudio, además queda de manifiesto, al medir simultáneamente los grupos A, H y AH, que en el grupo AH debido, en parte, al abuso crónico del alcohol, pero además, a la enfermedad hepática, existe una mayor disminución de Se sérico; pues ambas situaciones están asociadas a una reducción de los niveles de Se, como se comentó ampliamente en el apartado 2.3.3. de los Antecedentes.

En base a los datos obtenidos en esta investigación, y al hecho de que probablemente, el daño hepático empeora la síntesis de las selenoproteínas, como la selenoproteína P (un importante transportador de Se) y de otras proteínas que contienen Se, como la albumina (Czuczejko y cols., 2003; Burk y Hill, 2005); se podía sugerir que tanto el consumo crónico de alcohol como la enfermedad hepática contribuyen a disminuir los niveles de Se, provocando un descenso muy evidente en el grupo de pacientes alcohólicos con daño hepático (AH), por lo que se podría proponer el déficit de Se, encontrado en el suero, como un potencial marcador de la enfermedad hepática alcohólica.

Figura 43. Actividad de la GPx y de la GR en suero y su ratio GR/GPx



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística:
 C vs A: ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$; C vs H: ^{bbb} $p < 0.001$; C vs AH: ^{cc} $p < 0.01$, ^{ccc} $p < 0.001$;
 A vs H: [•] $p < 0.05$; A vs AH: [▲] $p < 0.05$, ^{▲▲} $p < 0.01$; H vs AH: [■] $p < 0.05$, ^{■■} $p < 0.01$, ^{■■■} $p < 0.001$.

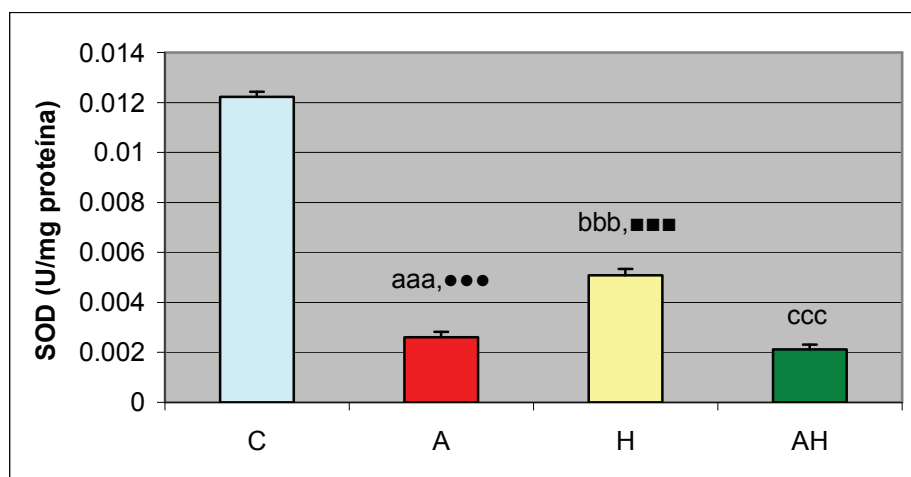
Como se observa en la Figura 43, la actividad de la GPx estuvo significativamente reducida en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos (C vs A $p < 0.001$) y en el grupo de pacientes con daño hepático no alcohólico (C vs H $p < 0.001$), siendo aún menor en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático alcohólico (AH), con una diferencia significativa ($p < 0.01$) en relación a los grupos A y H. Por otro lado, el grupo H presentó la menor actividad para la enzima GR, la cual también disminuyó en los grupos A y AH. Cuando se analizó la relación GR/GPx, no se encontraron diferencias significativas entre los grupo C y H. No obstante, los grupos de pacientes alcohólicos (A y AH) tenían valores aumentados en comparación al grupo C (C vs A: $p < 0.05$, y C vs AH: $p < 0.001$), siendo mayor en el grupo AH.

Las alteraciones encontradas en la actividad de la GPx están en consonancia con los niveles de Se observados en cada uno de los grupos estudiados, manifestando que existe una relación entre el estado de Se y la actividad de esta enzima antioxidante, de manera que fue el grupo AH el que presentó el menor poder antioxidante. Paralelamente, la actividad de la enzima GR también disminuyó en los grupos A, AH y H, probablemente, como consecuencia de su asociación con la GPx. Como ya se ha comentado, la reducción en la actividad de la GPx provoca una menor necesidad de GSH, lo que conlleva a una menor actividad en la GR.

En este apartado también se estudió la ratio GR/GPx con objeto de evaluar la capacidad compensatoria necesaria para mantener el equilibrio redox y hacer frente al estrés oxidativo provocado como consecuencia de las alteraciones en estas enzimas. Al analizar este parámetro detectamos que los grupos de pacientes alcohólicos (A y AH), y de forma especial, los pacientes alcohólicos con daño hepático (AH), combatían el estrés oxidativo puesto que tenían una ratio mayor a la presentada en el grupo C. Sin embargo, este mecanismo de compensación no parecía ser eficiente ya que, como veremos más adelante, estos grupos presentaron una elevada oxidación en los lípidos y las proteínas del suero. Por el contrario, el grupo con daño hepático no alcohólico (H), que presentó una reducción en la actividad de ambas enzimas, tuvo una ratio GR/GPx similar a la del grupo C, por lo que se podía sugerir que ambas enzimas estaban equilibradas y, por tanto, el desequilibrio oxidativo en este grupo no era tan acentuado como en los grupos A y AH.

De acuerdo con la Figura 44, la actividad de la enzima SOD estuvo significativamente disminuida en todos los grupos experimentales, con respecto al grupo control ($p < 0.001$). La reducción de la actividad de la SOD en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos (A) y en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático (AH) también fue significativa en comparación al grupo de pacientes con daño hepático no alcohólico ($p < 0.001$). Estos datos concuerdan con Nalini y cols. (1999), quienes encontraron una disminución en la actividad de la SOD en pacientes con cirrosis alcohólica con respecto a un grupo de pacientes cirróticos con etiología no alcohólica. Posteriormente, Peng y cols. (2005) y Huang y cols. (2009), observaron que en alcohólicos crónicos, sin evidencia clínica de cirrosis, la actividad de la SOD estaba significativamente disminuida en el suero con respecto al grupo control. Estos datos, junto con la ratio GR/GPx equilibrada, indican que el balance oxidativo en pacientes con daño hepático no alcohólico difiere significativamente del encontrado en los grupos que consumen alcohol (A y AH), de manera que el perfil antioxidante podría ser utilizado para comprender la enfermedad hepática no alcohólica, al actuar como marcador para el diagnóstico de esta patología.

Figura 44. Actividad de la SOD (U/mg proteína) en el suero



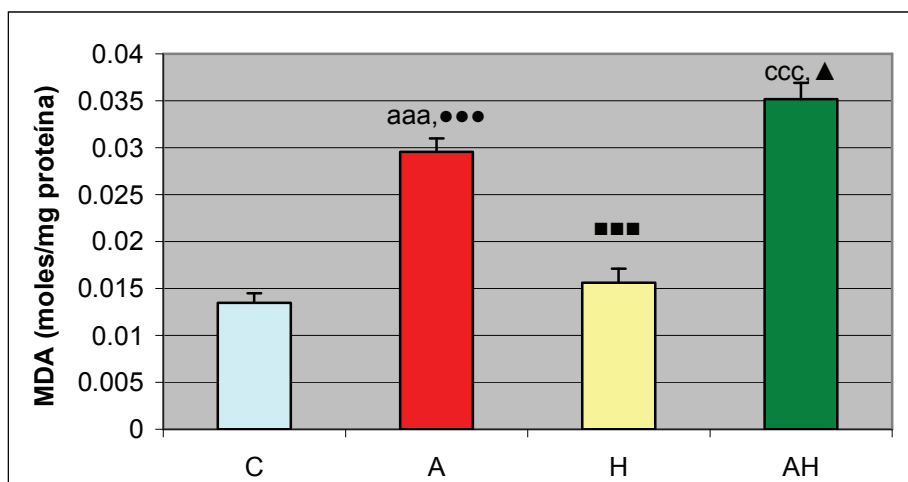
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística:
 C vs A: ^{aaa} $p < 0.001$; C vs H: ^{bbb} $p < 0.001$; C vs AH: ^{ccc} $p < 0.001$; A vs H: ^{●●●} $p < 0.001$;
 H vs AH: ^{■■■} $p < 0.001$.

A pesar de la controversia sobre la actividad de las distintas enzimas antioxidantes en pacientes con enfermedad alcohólica hepática en la literatura consultada, nuestros resultados están en consonancia con la reciente revisión de Zhu y cols. (2012), quienes

observaron una disminución en la actividad de la GPx y de la SOD de pacientes con diferentes tipos de enfermedad hepática. También Zhu y cols. (2012), en su trabajo, describen que el consumo crónico de alcohol desencadenó una reducción de las defensas antioxidantes en el hígado y en la sangre.

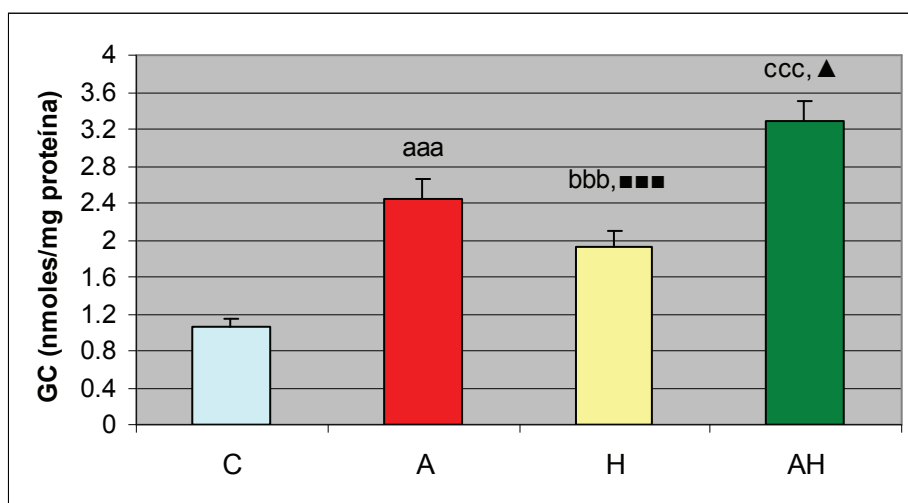
Los niveles de MDA (marcador de la peroxidación lipídica) se encontraron significativamente aumentados en los grupos A y AH en relación al grupo de los pacientes con daño hepático no alcohólico (H) ($p < 0.001$), y este incremento fue incluso mayor en el grupo AH que en el grupo A ($p < 0.05$) (Figura 45).

Figura 45. Niveles de MDA (moles/mg proteína) en el suero



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: C vs A: ^{aaa} $p < 0.001$; C vs AH: ^{ccc} $p < 0.001$; A vs H: ^{●●●} $p < 0.001$; A vs AH: [▲] $p < 0.05$; H vs AH: ^{■■■} $p < 0.001$.

Posteriormente, al estudiar el grado de oxidación en las proteínas se detectó que, en todos los grupos experimentales, los niveles de los grupos carbonilo eran más elevados que en el grupo C ($p < 0.001$) y superiores en los grupos de pacientes alcohólicos (A y AH), siendo mayores en el grupo AH que en el grupo A ($p < 0.05$) (Figura 46).

Figura 46. Niveles de grupos carbonilo (nmoles/mg proteína) en el suero

Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: C vs A: ^{aaa} $p < 0.001$; C vs H: ^{bbb} $p < 0.001$; C vs AH: ^{ccc} $p < 0.001$; A vs AH: ▲ $p < 0.05$; H vs AH: ■■■ $p < 0.001$.

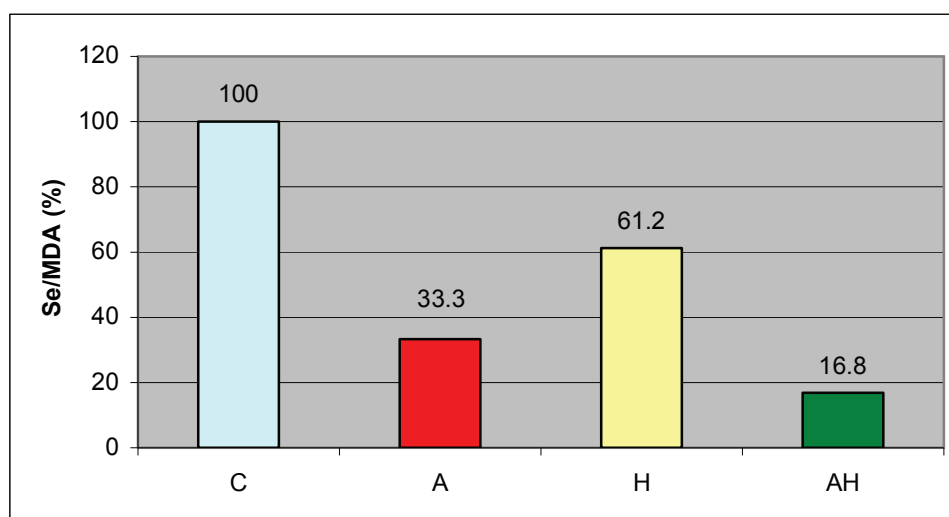
Nuestros resultados coinciden con otros investigadores que estudiaron la oxidación de estas biomoléculas en circunstancias similares. Así, Mutlu-Türkoglu y cols. (2000) observaron un incremento de los niveles de MDA y de grupos carbonilo en pacientes alcohólicos crónicos. A su vez, Loguercio y Federico, en 2003, encontraron un aumento de estos parámetros en pacientes alcohólicos crónicos con cirrosis.

En este estudio hay que destacar que los niveles de MDA únicamente estuvieron elevados en los grupos de pacientes alcohólicos (A y AH), por lo que podemos deducir que el alcohol es una droga con una alta capacidad oxidativa que provoca la oxidación de los lípidos. Estos resultados concuerdan con los estudios llevados a cabo por Tuma (2002) y Zhu y cols. (2012), que defienden que el alcohol provoca daño aumentando la oxidación de los lípidos. Por todo ello, según esta memoria, se podría proponer a la determinación del MDA como una herramienta para identificar la enfermedad alcohólica. Además, el consumo crónico de alcohol induce, en el hígado, a la isoforma CYP2E1, que aumenta unas 15-20 veces, incrementando el estrés oxidativo y activando el sistema inmune, lo que repercute en un aumento de los niveles de MDA (O'Shea y cols., 2010; Zhu y cols., 2012). Este hecho, junto con la formación de aductos de

proteínas producidos por el acetaldehído durante el metabolismo oxidativo del alcohol, favorece la muerte de los hepatocitos (Tuma, 2002) y por tanto, provoca daño hepático. Por otra parte, ya que los niveles de MDA se correlacionan con el daño hepático inducido por el alcohol, se podría utilizar esta determinación como un factor discriminador frente a otras enfermedades hepáticas no alcohólicas. Masalkar y Abhang, en 2005, comprobaron que las concentraciones de MDA en suero aumentaban de forma significativa, en función a la severidad de la enfermedad hepática alcohólica.

En base a esta información, y de acuerdo con los niveles de MDA, que estuvieron particularmente elevados en los grupos de pacientes alcohólicos (A y AH), mientras que los niveles de Se fueron especialmente reducidos en el grupo AH, se calculó la ratio Se/MDA. Así, en comparación al grupo C, la relación Se/MDA disminuyó alrededor del 40% en el grupo de los pacientes con daño hepático no alcohólico (H), un 67% en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos (A) y un 83% en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático alcohólico (AH) (Figura 47). De acuerdo con estos resultados, se podía concluir que la determinación de la ratio Se/MDA podría ser utilizada como herramienta para diferenciar la etiología del daño alcohólico hepático frente a otras hepatopatías, y de la evolución de los pacientes alcohólicos crónicos hacia una complicación hepática.

Figura 47. Ratio Se/MDA en el suero



Los resultados se expresan como la media \pm ESM en %.

Así, los distintos marcadores oxidativos, expuestos a lo largo de esta sección, podrían ser utilizados con fines diagnósticos. Al mismo tiempo, que, podrían servir como diana para distintos agentes terapéuticos, como el Se. La suplementación con Se podría ser beneficiosa en la prevención de enfermedades hepáticas y/o en la progresión de enfermedades alcohólicas, puesto que podría restablecer la actividad de enzimas antioxidantes en suero como la GPx. Así en estudios con animales de experimentación, se ha observado que dicho aporte extra de Se actúa sobre el suero y el hígado, incrementando la actividad y la expresión de la GPx-1, protegiendo de la oxidación a distintas biomoléculas, al mismo tiempo que restablece los niveles de Se deplecionados en el organismo de ratas expuestas a un consumo crónico de alcohol (Ojeda y cols., 2009; Jotty y cols., 2013). De hecho, varios estudios realizados en animales y, recientemente, en humanos, han desarrollado distintas dietas suplementadas con Se u otros antioxidantes con el fin de mejorar la cirrosis hepática (Zhang y cols., 1996; Zhang y cols., 2007; Kazi y cols., 2012). Sería interesante plantear en un futuro un estudio de suplementación con Se simultáneo sobre los grupos de pacientes con los que hemos trabajado.

V-CONCLUSIONES

V- CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

El consumo de alcohol, en forma de “binge drinking”, por vía oral, disminuye la ingesta sólida, y por ende de Se, provocando un menor incremento de peso y un menor balance aparente de este nutriente. Sin embargo, en ambos modelos de “binge drinking” (oral/intraperitoneal), se detecta una menor ingesta líquida y de los niveles de Se en suero, así como cambios en el perfil bioquímico, relacionados con posibles daños hepáticos y pancreáticos, atribuibles a los efectos del alcohol administrados de esta forma.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

El patrón de administración de alcohol, tipo “binge drinking”, independientemente de la vía de administración utilizada, influye sobre el equilibrio oxidativo durante la adolescencia, provocando una depleción significativa de los niveles de Se y de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, induciendo, además, oxidación de lípidos y del DNA en suero. Cuando el alcohol se administra por vía intraperitoneal se desencadena un mayor daño sobre la estabilidad del DNA.

CONCLUSIÓN TERCERA:

El consumo de alcohol, tipo “binge drinking”, provoca un desequilibrio oxidativo en el hígado durante la adolescencia, independientemente de la vía de administración utilizada, disminuyendo, los niveles de Se hepático, la expresión de las selenoproteínas GPx1 y GPx4, y la actividad de la GPx. Tal hallazgo parece resultar, principalmente, del efecto directo de la exposición al alcohol. Por otro lado, la sobreactivación de las enzimas SOD y CAT, tras la inyección intraperitoneal, indica que esta técnica de administración, *per se*, es generadora de estrés oxidativo. También queda patente, en nuestra investigación, que el desequilibrio antioxidante, provocado por el consumo

agudo de alcohol, contribuye a la oxidación de lípidos y proteínas, siendo la vía de administración intraperitoneal más nociva, a este nivel, que la vía oral.

CONCLUSIÓN CUARTA:

En humanos, queda de manifiesto que los pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático presentan un desequilibrio oxidativo más acentuado que los pacientes alcohólicos sin daño hepático o afectados con daño hepático no alcohólico. Cabe destacar que, en suero, los pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático revelan una depleción de Se muy evidente en comparación a los otros grupos, que se refleja en una menor actividad de la GPx en este mismo grupo. Así, pensamos que el déficit de Se es una característica distintiva que puede convertirse en un marcador de la enfermedad hepática alcohólica, complementando las herramientas de diagnóstico existentes. También hay que destacar un incremento significativo de los niveles de MDA de pacientes alcohólicos, siendo mayor en el grupo de pacientes alcohólicos crónicos con daño hepático. Así, la ratio Se/MDA parece ser una herramienta eficaz para diferenciar el daño hepático provocado por el alcohol frente a otras hepatopatías, y para seguir una eventual evolución hacia una complicación hepática.

VI-BIBLIOGRAFÍA

VI- BIBLIOGRAFÍA

A

- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007; 74(4): 324-9.
- Ajakaiye M, Jacob A, Wu R, Nicastro JM, Coppa GF, Wang P. Alcohol and hepatocyte-Kupffer cell interaction (review). *Mol Med Rep*. 2011; 4(4): 597-602.
- Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc*. 2006; 65(3): 278-90.
- Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondó PH. The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; (4):484-8.
- Altomare E, Grattagliano I, Vendemiale G, Palmieri V, Palasciano G. Acute ethanol administration induces oxidative changes in rat pancreatic tissue. *Gut*. 1996; 38: 742-46.
- Ambade A, Mandrekar P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol*. 2012.
- Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, Sasaki M, Takahashi K, Fujiyama Y. Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2005; 21(5): 574-9.
- Andresen M, Regueira T, Leighton F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev Méd Chile*. 2006; 134: 649-56.
- Angstwurm MW, Gaertner R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006; 9(3): 233-8.
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(9): 1355-63.
- Artun BC, Küskü-Kiraz Z, Güllüoğlu M, Cevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29(8): 659-65.

- Arva E, Andersson B. Kinetics of cytokine release and expression of lymphocyte cell-surface activation markers after in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Immunol.* 1999; 49(3): 237-43.
- Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(6): S2025-S2039.

B

- Bailey SM, Patel VB, Young TA, Asayama K, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25(5): 726-33.
- Ballihaut G, Kilpatrick LE, Davis WC. Detection, identification, and quantification of selenoproteins in a candidate human plasma standard reference material. *Anal Chem.* 2011; 83(22): 8667-74.
- Barja de Quiroga G. Radicales libres y antioxidantes. En: Cascales M. *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 1997.
- Barkley-Levenson AM, Crabbe JC. Bridging Animal and Human Models: Translating From (and to) Animal Genetics. *Alcohol Res.* 2012; 34(3): 325-35.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006; 29(1): 113-23.
- Barrero MJ, Ojeda ML, Díaz Castro J, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. The effects of ethanol upon hydric balance and arterial pressure in rats: folic acid as a possible hypotensor. *Life Sci.* 2012; 90(9-10): 337-42.
- Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 55: 1-23.
- Bautista AP. Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15(4): 349-56.

- Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(11): 2487-94.
- 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.
- Beier JI, Arteel GE. Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237(1):1-9.
- Bélanger MC, Dewailly E, Berthiaume L, Noël M, Bergeron J, Mirault ME, Julien P. Dietary contaminants and oxidative stress in Inuit of Nunavik. *Metabolism.* 2006; 55(8): 989-95.
- Bell RL, Rodd ZA, Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ. The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. *Addict Biol.* 2006; 11(3-4): 270-88.
- Bergheim I, Parlesak A, Dierks C, Bode JC, Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57: 431-8.
- Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12 (2): 123-130.
- Blasco C, Caballería J, Deulofeu R, Lligoña A, Parés A, Lluís JM, Gual A, Rodés J. Prevalence and mechanisms of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29(6): 1044-8.
- Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17(4): 575-92.
- Boosalis MG. The role of selenium in chronic disease. *Nutr Clin Pract.* 2008; 23(2): 152-60.
- Bradford BU. Role of peroxisomes in the swift increase in alcohol metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22 Suppl 1: S28-S30.
- Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, McKillop IH. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol.* 2012; 46(8): 715-25.
- Break TJ, Jun S, Indramohan M, Carr KD, Sieve AN, Dory L, Berg RE. Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection. *J Immunol.* 2012; 188(7): 3342-50.

- Brecher AS, Moon AR, Gray KD. The effect of acetaldehyde-glycosaminoglycan mixtures upon Factor IXa and Factor IX-Deficient Plasma. *Alcohol*. 2006; 39(2): 97-104.
- Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(11): 1555-68.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(5): 3289-303.
- Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10): 951-65.
- Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition*. 1999; 15(7-8): 583-9.
- Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25: 215-35.
- Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(11): 1441-7.
- Byun JS, Jeong WI. Involvement of hepatic innate immunity in alcoholic liver disease. *Immune Netw*. 2010; 10(6): 181-7.

C

- Cahill A, Cunningham CC, Adachi M, Ishii H, Bailey SM, Fromenty B, Davies A. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002; 26(6): 907-15.
- 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(4): 332-46.
- Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. Binge ethanol exposure increases liver injury in obese rats. *Gastroenterology*. 2003; 125(6): 1818-33.
- Cascales M, Robles-Chillida EM, Cascales C, Santos-Ruiz MA. Intoxicación etílica y estrés oxidativo. *Real Acad Nac Farm*. 1997; 4: 267-86.
- Castro WM. Selenio en pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutr Hosp*. 2007; 22: 295–306.

- Ceccanti M, Attili A, Balducci G, Attilia F, Giacomelli S, Rotondo C, Sasso GF, Xirouchakis E, Attilia ML. Acute alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(9): 833-41.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol;* 2009; 83(6): 519- 48.
- Cederbaum AI. CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med.* 2006; 73(4): 657-72.
- Chen CH, Pan CH, Chen CC, Huang MC. Increased oxidative DNA damage in patients with alcohol dependence and its correlation with alcohol withdrawal severity. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011; 35(2): 338-44.
- Combs GF Jr, Trumbo PR, McKinley MC, Milner J, Studenski S, Kimura T, Watkins SM, Raiten DJ. Biomarkers in nutrition: new frontiers in research and application. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1278: 1-10.
- Combs GF Jr, Watts JC, Jackson MI, Johnson LK, Zeng H, Scheett AJ, Uthus EO, Schomburg L, Hoeg A, Hoefig CS, Davis CD, Milner JA. Determinants of selenium status in healthy adults. *Nutr J.* 2011; 10:75.
- Combs GF Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr.* 2001; 85(5): 517-47.
- Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A, Vecchio D, Arezzini B. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* 2010; 5(2): 101-9.
- Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008; 100(3): 156-63.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(17): 7637–44.
- Courtney KE, Polich J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychol Bull.* 2009; 135(1): 142-56.
- Crabbe JC, Harris RA, Koob GF. Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1216: 24-40.
- Cylwik B, Chrostek L.[Disturbances of folic acid and homocysteine metabolism in alcohol abuse]. *Pol Merkur Lekarski.* 2011; 30(178): 295-9.

- Czuczejko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50: 1147-54.

D

- Daniels LA. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 1996; 54(3): 185-99.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 2007; 81(3): 177-87.
- Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM, Balakrishnan V. Comparison of haematological parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Singapore Med J.* 2011; 52(3): 175-81.
- Das SK, Vasudevan DM. Monitoring oxidative stress in patients with non-alcoholic and alcoholic liver diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2005; 20(2): 24-8.
- De Minicis S, Brenner DA. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23 Suppl 1: S98-S103.
- Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, Lettéron P, Degott C, Feldmann G, Pessayre D, Fromenty B. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology.* 2002; 123(4): 1278-90.
- Desikan R, Hancock J, Neill S. Reactive oxygen species as signaling molecules. pp. 169-191. En: N. Smirnoff (ed.). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants.* Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 2005; 302 p.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006; 43(2): S63-S74.
- Dhanda AD, Lee RW, Collins PL, McCune CA. Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(39): 5504-13.
- Dolganiuc A, Szabo G. In vitro and in vivo models of acute alcohol exposure. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(10):1168-77.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-31.

- D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, De Witte P, Spies C, Littleton JM, de Villiers WJ, Lott AJ, Plackett TP, Lanzke N, Meadows GG. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010; 34(9): 1489-511.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 1996; 56(6): 1291-5.

E

- Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, Thurman RG. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology.* 1998; 115(2): 443-51.

F

- FAO/OMS. Necesidades en proteínas. Reunión sobre la Nutrición, nº37. Roma, 1966.
- Ferreira ALA, Matsubara, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras.* 1997; 43(1): 61-8.
- Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45(12): 1694-9.
- Forceville X. Selenium and the "free" electron. Selenium--a trace to be followed in septic or inflammatory ICU patients? *Intensive Care Med.* 2001; 27(1): 16-8.
- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod.* 2002; 67(3) :967-71.
- Fortea MS, Cuevas JB, Sanchis MA. Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones.* 1999; 11 (2): 115-26.
- Foster R & Marriott H. Alcohol consumption in the new millennium – weighing up the risks and benefits for our health. *Nutrition Bulletin.* 2006; 31: 286–331.

- Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Varešlija D, Tipton KF, Della Corte L. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(12): 2067-79.
- French SW. Intra-gastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci.* 2001; 8(1): 20-7.
- Fridovich I. Cytochrome c. En: *CRC Handbook of methods for oxygen radical research.* Greenwald RA (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida. 213-15. 1985.
- Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3): 789-94.
- Fujii J, Ito JI, Zhang X, Kurahashi T. Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 49(2): 70-8.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(6):1583-606.

G

- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011; 141(5):1572-85.
- Gao Y, Liu Y, Deng G, Wang Z. Distribution of selenium-containing proteins in human serum. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 100(2): 105-15.
- Geoghegan M, McAuley D, Eaton S, Powell-Tuck J. Selenium in critical illness. *Curr Opin Crit Care.* 2006; 12(2):136-41.
- Getoff N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. *Radiat. Phys. Chem.* 2007; 76: 1577–1586.
- Goetz ME, Luch A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 2008; 266(1): 73-83.
- Golka K, Wiese A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)--a biomarker for long-term alcohol consumption. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2004; 7(4): 319-37.
- Gonçalves de Orange L, Bion FM, Rolim de Lima C. Effects of different concentrations of sugarcane alcohol on food intake and nutritional status of male and female periadolescent rats. *Alcohol.* 2009; 43(2): 137-46.

- González S, Huerta JM, Alvarez-Uría J, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C. Serum selenium is associated with plasma homocysteine concentrations in elderly humans. *J Nutr.* 2004; 134(7): 1736-40.
- González-Reimers E, Galindo-Martín L, Santolaria-Fernández F, Sánchez-Pérez MJ, Alvisa-Negrín J, García-Valdecasas-Campelo E, González-Pérez JM, Martín-González MC. Prognostic value of serum selenium levels in alcoholics. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 125: 22-29.
- González-Reimers E, Martín-González MC, Alemán-Valls MR, de la Vega-Prieto MJ, Galindo-Martín L, Abreu-González P, Santolaria-Fernández F. Relative and combined effects of chronic alcohol consumption and HCV infection on serum zinc, copper, and selenium. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 132(1-3): 75-84.
- González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 2000; 25 (1): 3-9.
- Góth L. [The hydrogen peroxide paradox]. *Orv Hetil.* 2006;147(19): 887-93.
- Grant JD, Scherrer JF, Lynskey MT, Lyons MJ, Eisen SA, Tsuang MT, True WR, Bucholz KK. Adolescent alcohol use is a risk factor for adult alcohol and drug dependence: evidence from a twin design. *Psychol Med.* 2006; 36(1): 109-18.
- Greenwel P. Acetaldehyde-mediated collagen regulation in hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23(5): 930-3.
- Gual A. Monografía Alcohol. Adicciones. 2002; 14:supl.1.
- Guarini P, Stanzial AM, Oliviero O, Casaril M, Galvani S, Pantalena M, Corrocher R. Erythrocyte membrane lipids and serum selenium in post-viral and alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta* 1998; 270: 139-150.
- Guerra-Araiza C, Alvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazan R, Salgado-Ceballos H. Effect of Natural Exogenous Antioxidants on Aging and on Neurodegenerative Diseases. *Free Radic Res.* 2013; 47(6-7): 451-62.
- Guo L, Yang JY, Wu CF. Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(3): 222-7.
- Guo R, Ren J. Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7(4): 1285-301.

- Guo Z, Ran Q, Roberts LJ 2nd, Zhou L, Richardson A, Sharan C, Wu D, Yang H. Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(3): 343-52.

H

- Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(5): 1082-7.
- Halsted CH, Medici V. Vitamin dependent methionine metabolism and alcoholic liver disease. *Adv Nutr.* 2011; 2(5): 421-7.
- Halsted CH. Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr.* 2002; 132 (8 Suppl): S2367-S2372.
- Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AE, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45(8): 953-61.
- Harrison-Findik DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol.* 2009; 15(10):1186-93.
- Harrison-Findik DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(37): 4925-30.
- Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen.* 1990; 15(3): 145-82.
- Hattori H, Imai H, Hanamoto A, Furuhashi K, Nakagawa Y. Up-regulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat casein-induced polymorphonuclear neutrophils. *Biochem J.* 2005; 389(Pt 2): 279-87.
- Hillers VN, Massey LK. Interrelationships of moderate and high alcohol consumption with diet and health status. *Am J Clin Nutr.* 1985; 41(2): 356-62.
- Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunert VP, Wuertemberger M, Schiemann U, Horster S, Limmer C, Stecker G, Soyka M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction.* 2005; 100(10): 1477-86.
- Hoffmann PR. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007; 55(5): 289-97.

- Houze P, Rouach H, Gentil M, Orfanelli MT, Nordmann R. Effect of allopurinol on the hepatic and cerebellar iron, selenium, zinc and copper status following acute ethanol administration to rats. *Free Radic Res Commun.* 1991; 12-13 Pt 2: 663-8.
- Huang MC, Chen CH, Peng FC, Tang SH, Chen CC. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. *J Formos Med Assoc.* 2009; 108(7): 560-9.
- Huber PC, Almeida WP, Fátima A. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim Nova.* 2008; 31(5): 1170-9.
- Hurst R, Armah CN, Dainty JR, Hart DJ, Teucher B, Goldson AJ, Broadley MR, Motley AK, Fairweather-Tait SJ. Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(4): 923-31.
- Husain K, Somani SM. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Pathophysiology.* 1997; 69-74.
- Hwa LS, Chu A, Levinson SA, Kayyali TM, DeBold JF, Miczek KA. Persistent escalation of alcohol drinking in C57BL/6J mice with intermittent access to 20% ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011; 35(11): 1938-47.

I

- Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(2): 278-86.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 2001; 64(2): 674–83.
- Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology.* 2004; 126(5): 1293-301.

- Ishii H, Kurose I, Kato S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997; 12(9-10): S272-S282.

J

- Januel C, El Hentati FZ, Carreras M, Arthur JR, Calzada C, Lagarde M, Véricel E. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761(10):1228-34.
- Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(12): 1699-708.
- Ji C. Mechanisms of alcohol induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochem Res Int.* 2012; 2012: 216450.
- Johansson U, Johnsson F, Joelsson B, Berglund M, Akesson B. Selenium status in patients with liver cirrhosis and alcoholism. *Br J Nutr.* 1986; 55: 227–33.
- Jones AW. Excretion of alcohol in urine and diuresis in healthy men in relation to their age, the dose administered and the time after drinking. *Forensic Sci Int.* 1990; 45(3): 217-24.
- Jordão-Júnior AA, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto.* 1998; 31: 434-49.
- Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoproteins regulation in rats pups exposed to alcohol. *Alcohol.* 2013; In press.
- Júnior LR, Höer NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova.* 2001; 24(1): 112-19.

K

- Kaiser JP, Beier JI, Zhang J, David Hoetker J, von Montfort C, Guo L, Zheng Y, Monia BP, Bhatnagar A, Arteel GE. PKCepsilon plays a causal role in acute ethanol-induced steatosis. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 482(1-2): 104-11.
- Kalaz EB, Evran B, Develi S, Erata GÖ, Uysal M, Koçak-Toker N. Effect of binge ethanol treatment on prooxidant-antioxidant balance in rat heart tissue. *Pathophysiology*. 2012; 19(1): 49-53.
- Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, Lincke C, Dolman KM, Becker K, Schirmer RH, Gromer S, Roos D. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*. 2007; 109(8): 3560-6.
- Kapaki E, Liappas I, Lyras L, Paraskevas GP, Mamali I, Theotoka I, Bourboulis N, Liosis I, Petropoulou O, Soldatos K. Oxidative damage to plasma proteins in patients with chronic alcohol dependence: the effect of smoking. *In Vivo*. 2007; 21(3): 523-8.
- Karagülle D, Donath C, Grassel E, Bleich S, Hillemacher T. [Binge drinking in adolescents and young adults]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2010; 78(4): 196-202.
- Karinch AM, Martin JH, Vary TC. Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(1): E3-9.
- Kartvelishvili T, Abuladze M, Asatiani N, Akhvlediani J, Asanishvili L, Holman HY, Sapojnikova N. Antioxidant capacity of cultured mammalian cells estimated by ESR method. *ScientificWorldJournal*. 2004; 4: 490-9.
- Kazi TG, Kolachi NF, Afridi HI, Kazi NG, Sirajuddin, Naeemullah, Arain SS. Effects of mineral supplementation on liver cirrhotic/cancer male patients. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 150(1-3): 81-90.
- Kharbanda KK. Alcoholic liver disease and methionine metabolism. *Semin Liver Dis*. 2009; 29(2):155-65.
- Kharbanda KK. Methionine metabolic pathway in alcoholic liver injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16(1): 89-95.
- Kim SJ, Jung YS, Kwon do Y, 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(4): 893-8.

- Kłapcińska B, Poprzecki S, Danch A, Sobczak A, Kempa K. Selenium levels in blood of upper Silesian population: evidence of suboptimal selenium status in a significant percentage of the population. *Biol Trace Elem Res.* 2005 Winter; 108(1-3): 1-15.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar, BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010; 38(1): 96-109.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-67.
- Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr.* 2003; 133(5 Suppl 1): S1448-S1451.
- Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* 2004; 25(1-2): 191-8.
- Koivisto H, Hietala J, Anttila P, Parkkila S, Niemelä O. Long-term ethanol consumption and macrocytosis: diagnostic and pathogenic implications. *J Lab Clin Med.* 2006; 147(4): 191-6.
- Kopczyńska E, Ziółkowski M, Jendryczka-Maćkiewicz E, Odrowaz-Sypniewska G, Opozda K, Tyrakowski T. [The concentrations of homocysteine, folic acid and vitamin B12 in alcohol dependent male patients]. *Psychiatr Pol.* 2004; 38(5): 947-56.
- Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 2008; 659(1-2): 15-30.

L

- 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. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71(4): 952-8.
- Lecomte E, Herbeth B, Pirollet P, Chancerelle Y, Arnaud J, Musse N, Paille F, Siest G, Artur Y. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Clin Nutr.* 1994; (2): 255-61.

- Lee K. Gender-specific relationships between alcohol drinking patterns and metabolic syndrome: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008. *Public Health Nutr.* 2012; 15(10): 1917-24.
- Leung TM, Lu Y, Yan W, Morón-Concepción JA, Ward SC, Ge X, Conde de la Rosa L, Nieto N. Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2012; 55(5): 1596-609.
- Li SY, Ren J. Cardiac overexpression of alcohol dehydrogenase exacerbates chronic ethanol ingestion-induced myocardial dysfunction and hypertrophy: role of insulin signaling and ER stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44(6): 992-1001.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995; 11(4): 376-81.
- Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J Biol Chem.* 2009; 284(45): 30836-44.
- Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta.* 1997; 257(1): 59-84.
- Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis.* 2005; 9(1):1-35.
- Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) – a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23(6): 991-1007.
- Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2005; 50: 7-20.
- Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003; 27(3): 220-31.
- Lindtner C, Scherer T, Zielinski E, Filatova N, Fasshauer M, Tonks NK, Puchowicz M, Buettner C. Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action. *Sci Transl Med.* 2013; 5(170): 170.
- Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(1): 1-10.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.

- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem*. 2009; 284 (2): 723-27.
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(5): 723-38.
- Lu ZM, Tao WY, Zou XL, Fu HZ, Ao ZH. Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110(1): 160-4.
- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 2009; 360(26): 2758-69.
- Lucia CMD, Esteves de Oliveira FC, Oliveira DS, Abranches MV, Santos de Sales N, Bruonoro NS. Selênio: mais que um nutriente essencial, um nutriente funcional. *Rev Bras Nutr Clin*. 2010; 25(1): 57-65.

M

- Mairena JRE. Radicales libres, alcoholismo y daño hepático. *Rev Méd Hond*. 1994; 62 (2): 76-82.
- Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol*. 2009; 50(6): 1258-66.
- Mandrekar P. Epigenetic regulation in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(20): 2456-64.
- Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298(2): 737-43.
- Mansouri A, Tarhuni A, Larosche I, Reyl-Desmars F, Demeilliers C, Degoul F, Nahon P, Sutton A, Moreau R, Fromenty B, Pessayre D. MnSOD overexpression prevents liver mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge but worsens this effect after prolonged alcohol consumption in mice. *Dig Dis*. 2010; 28(6): 756-75.
- Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(12): 4281-304.
- Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002; 192(1): 1-15.

- Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataulakhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804(1): 89-96.
- Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta*. 2005; 355(1-2): 61-5.
- Masini A, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Trenti T. Lipid hydroperoxide induced mitochondrial dysfunction following acute ethanol intoxication in rats. The critical role for mitochondrial reduced glutathione. *Biochem Pharmacol*. 1994; 47(2): 217-24.
- Massey VL, Arteel GE. Acute alcohol-induced liver injury. *Front Physiol*. 2012; 3: 193.
- Mateja WA, Nelson DB, Kroelinger CD, Ruzek S, Segal J. The association between maternal alcohol use and smoking in early pregnancy and congenital cardiac defects. *J Womens Health (Larchmt)*. 2012; 21(1): 26-34.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32(8): 595-603.
- Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology*. 2000; 32(5): 1008-17.
- Mathurin P, Lucey MR. Management of alcoholic hepatitis. *J Hepatol*. 2012; 56 Suppl 1:S39-S45.
- Mathurin P, Deltenre P. Effect of binge drinking on the liver: an alarming public health issue? *Gut*. 2009; 58(5): 613-7.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*. 2003; 133 Suppl 3: S933-S940.
- McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *J Nutr*. 2004; 134(11): S3171-S3172.
- McCullough AJ, O'Shea RS, Dasarathy S. Diagnosis and management of alcoholic liver disease. *J Dig Dis*. 2011; 12(4): 257-62.
- McCuskey RS, Bethea NW, Wong J, McCuskey MK, Abril ER, Wang X, Ito Y, DeLeve LD. Ethanol bingeing exacerbates sinusoidal endothelial and parenchymal injury elicited by acetaminophen. *J Hepatol*. 2005; 42(3): 371-7.

- McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*. 2003; 189(1-2): 89-97.
- Medici V, Halsted CH. Folate, alcohol, and liver disease. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(4): 596-606.
- Medici V, Peerson JM, Stabler SP, French SW, Gregory JF 3rd, Virata MC, Albanese A, Bowlus CL, Devaraj S, Panacek EA, Rahim N, Richards JR, Rossaro L, Halsted CH. Impaired homocysteine transsulfuration is an indicator of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2010; 53(3): 551-7.
- Mercadal GC, Santamaria MT, Piquet RD, Gimeno AM. Importancia del selenio en la práctica clínica. *Quim Clínica*. 2005; 24(3): 141-48.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Glosario de términos de alcohol y drogas. 2008.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Prevención de los problemas derivados del alcohol: Primera Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España. 2008.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en Población General en España Edades 2011-2012. 2013.
- Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, Batinic-Haberle I. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(5): 794-814.
- Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier JL, Thiemermann C, Wang ZQ, Salvemini D. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol*. 2003; 140(3): 445-60.
- Mutlu-Türkoğlu U, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Mirsal H, Beyazyürek M, Uysal M. Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J Lab Clin Med*. 2000; 136(4): 287-91.

N

- Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci*. 2007; 32(5): 453-68.
- Nalini G, Hariprasad C, Narayanan VA. Oxidative stress in alcoholic liver disease. *Indian J Med Res*. 1999; 110: 200-3.

- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. NIAAA Newsletter. 2004; 3: 3.
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*. 2008; 400(1-3): 115-41.
- Navarro-Alarcón M, López-Martínez MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ*. 2000; 249(1-3): 347-71.
- Negro R. Selenium and thyroid autoimmunity. *Biologics*. 2008; 2(2): 265-73.
- Neumann T, Spies C. Use of biomarkers for alcohol use disorders in clinical practice. *Addiction*. 2003; 98 Suppl 2: 81-91.

O

- O'Connell H, Lawlor BA. Recent alcohol intake and suicidality--a neuropsychological perspective. *Ir J Med Sci*. 2005; 174(4): 51-4.
- Oekonomaki E, Notas G, Mouzas IA, Valatas V, Skordilis P, Xidakis C, Kouroumalis EA. Binge drinking and nitric oxide metabolites in chronic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2004; 39(2): 106-9.
- 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(4):404-12.
- Ojeda ML, Jotty K, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid intake improves the detrimental effects of ethanol on pups' selenium balance. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(12): 3486-91.
- Ojeda ML, Nogales F, Jotty K, Barrero MJ, Murillo ML, Carreras O. Dietary selenium plus folic acid as an antioxidant therapy for ethanol-exposed pups. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009; 86(6): 490-5.
- Ojeda ML, Vázquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Int J Environ Res Public Health*. 2009; 6(8): 2139-49.
- Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid-supplemented diets ameliorate renal oxidation in ethanol-exposed pups. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012; 36(11): 1863-72.

- Ojeda ML, Nogales F, Vázquez B, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44(3): 272-7.
- O'Keefe JH, Bybee KA, Lavie CJ. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(11): 1009-14.
- Okuno F, Arai M, Sujita K, Eto S, Ishii H. Alterations in hepatic delta-aminolevulinic acid synthetase and heme oxygenase activities after chronic ethanol consumption in rats. *Alcohol*. 1991; 8(6): 449-51.
- Olson GE, Whitin JC, Hill KE, Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, Deal J, Cohen HJ, Burk RF. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298(5): F1244-53.
- Ornoy A, Ergaz Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(2): 364-79.
- O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010; 51(1): 307-28.
- Otero RM, Cortés JR. Nutrición y alcoholismo crónico. *Nutr Hosp*. 2008; (supl.2): 3-7.

P

- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 202(2): 199-211.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(7): 775-806.
- Parada M, Corral M, Caamaño-Isorna F, Mota N, Crego A, Rodríguez Holguín S, Cadaveira F. Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking). *Adicciones*. 2011; 23(1): 53-63.

- Pascual F, Cortés MT, Sastre J. Utilización de la Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT) en el diagnóstico y seguimiento de la dependencia alcohólica. *Adicciones*. 2002; 14(1): 47-55.
- Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev*. 2004; 9(3): 239-58.
- Pedrosa LF, Motley AK, Stevenson TD, Hill KE, Burk RF. Fecal selenium excretion is regulated by dietary selenium intake. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 149(3): 377-81.
- Peng FC, Tang SH, Huang MC, Chen CC, Kuo TL, Yin SJ. Oxidative status in patients with alcohol dependence: a clinical study in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68(17-18): 1497-1509.
- Pérez de la Cruz A, Abilés J, Castaño Pérez J. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. *Nutrición Clínica en Medicina* 2008; 2(2): 45-64.
- Phillips BJ, Jenkinson P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis*. 2001; 16(2): 91-101.
- Plackett TP, Kovacs EJ. Acute models of ethanol exposure to mice. *Methods Mol Biol*. 2008; 447: 3-9.
- Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health*. 2000; 24(2): 93-104.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. 1995; 30(4): 277-90.
- Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33(2): 191-205.

Q

- Quertemont E. Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(6): 570-81.

R

- Radek KA, Ranzer MJ, Dipietro LA. Brewing complications: the effect of acute ethanol exposure on wound healing. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(5): 1125-34.

- Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(4):433-49.
- Rasmussen LB, Hollenbach B, Laurberg P, Carlé A, Hög A, Jørgensen T, Vejbjerg P, Ovesen L, Schomburg L. Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes - 8-year followup. *J Trace Elem Med Biol.* 2009; 23(4): 265-71.
- Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet.* 2012; 379(9822): 1256-68.
- Rayman MP. Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(11): 1533-40.
- Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000; 356: 233-41.
- Read JP, Beattie M, Chamberlain R, Merrill JE. Beyond the "Binge" threshold: heavy drinking patterns and their association with alcohol involvement indices in college students. *Addict Behav.* 2008; 33(2): 225-34.
- Redmond EM, Morrow D, Kundimi S, Miller-Graziano CL, Cullen JP. Acetaldehyde stimulates monocyte adhesion in a P-selectin- and TNFalpha-dependent manner. *Atherosclerosis.* 2009; 204(2): 372-80.
- Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(15): 2457-78.
- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357-63.
- Rivier C. Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20(2): 240-54.
- Rulten SL, Hodder E, Ripley TL, Stephens DN, Mayne LV. Alcohol induces DNA damage and the Fanconi anemia D2 protein implicating FANCD2 in the DNA damage response pathways in brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008; 32(7): 1186-96.

S

- Sánchez A. Selenio y tiroides. *Glánd Tir Paratir.* 2009; 18: 40-5.
- Saravanan N, Nalini N. Antioxidant effect of *Hemidesmus indicus* on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *J Med Food.* 2007; 10(4): 675-82.
- Sato N. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22 Suppl 1: S1-S6.

- Savaskan NE, Ufer C, Kühn H, Borchert A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem*. 2007; 388(10): 1007-17.
- Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose-and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*. 1999; 17(2): 97-105.
- Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004; 10(4): 308-13.
- Schrauzer GN. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20(1): 1-4.
- Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology*. 2000; 7(1): 25-32.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007; 18(9): 567-79.
- Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(8): 599-612.
- Seth D, D'Souza El-Guindy NB, Apte M, Mari M, Dooley S, Neuman M, Haber PS, Kundu GC, Darwanto A, de Villiers WJ, Vonlaufen A, Xu Z, Phillips P, Yang S, Goldstein D, Pirola RM, Wilson JS, Moles A, Fernández A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Meyer C, Meindl-Beinker NM. Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34(1): 4-18.
- Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(3):178-85.
- Shah D, Sah S, Nath SK. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2013; 12(7): 741-51.
- Sher L. The link between alcohol abuse and suicide: possible role of selenium deficiency. *Med Hypotheses*. 2008; 70(4): 899.
- Shukla SD, Pruett SB, Szabo G, Arteel GE. Binge ethanol and liver: new molecular developments. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013 ; 37(4) : 550-7.
- Simonoff M, Simonoff G. Le selenium et la vie. En: Simonoff M, Simonoff G (eds.). Masson. Paris. 1991.

- Sivaram AG, Suresh MV, Indira M. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003; 134(3): 397-401.
- Skala K, Walter H. Adolescence and Alcohol: a review of the literature. *Neuropsychiatr*. 2013; 10.
- Soriano A, Bandrés F, Gómez-Gallego F. Actualización en marcadores biológicos del etilismo. *Medicina del Trabajo*. 2002; 11: 73-84.
- Soudani N, Ben Amara I, Sefi M, Boudawara T, Zeghal N. Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2011; 63(6):541-8.
- Spear L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health*. 2000; 24(2): 115-23.
- Sprow GM, Thiele TE. The neurobiology of binge-like ethanol drinking: evidence from rodent models. *Physiol Behav*. 2012; 106(3): 325-31.
- Stefanowicz FA, Talwar D, O'Reilly DS, Dickinson N, Atkinson J, Hursthouse AS, Rankin J, Duncan A. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. *Clin Nutr*. 2013;. pii: S0261-5614.
- Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(11): 1478-85.
- Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med*. 2001; 7(9): 408-13.
- Stickel F, Choi SW, Kim YI, Bagley PJ, Seitz HK, Russell RM, Selhub J, Mason JB. Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000; 24(3): 259-64.
- Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, Seitz HK. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*. 2002; 51(1): 132-9.
- Stolle M, Sack PM, Thomasius R. Binge drinking in childhood and adolescence: epidemiology, consequences, and interventions. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(19): 323-8.
- Strandberg-Larsen K, Nielsen NR, Grønbaek M, Andersen PK, Olsen J, Andersen AM. Binge drinking in pregnancy and risk of fetal death. *Obstet Gynecol*. 2008; 111(3): 602-9.

- Ström A, Fredrikson GN, Schioppa A, Ljungcrantz I, Söderberg I, Jansson B, Carlsson R, Hultgårdh-Nilsson A, Nilsson J. Inhibition of injury-induced arterial remodelling and carotid atherosclerosis by recombinant human antibodies against aldehyde-modified apoB-100. *Atherosclerosis*. 2007; 190(2): 298-305.
- Suh YG, Jeong WI. Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(20): 2543-51.
- Sunde RA, Evenson JK, Thompson KM, Sachdev SW. Dietary selenium requirements based on glutathione peroxidase-1 activity and mRNA levels and other Se-dependent parameters are not increased by pregnancy and lactation in rats. *J Nutr*. 2005; 135(9): 2144-50.
- Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK. Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci Rep*. 2009; 29(5): 329-38.
- Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(11): 1321-9.

T

- Tan HH, Virmani S, Martin P. Controversies in the management of alcoholic liver disease. *Mt Sinai J Med*. 2009; 76(5): 484-98.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(3-4): 134-44.
- Tavakoli HR, Hull M, Michael Okasinski L. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence. *Innov Clin Neurosci*. 2011; 8(3): 26-33.
- Thuluvath PJ, Triger DR. Selenium in chronic liver disease. *J Hepatol* 1992; 14: 176-82.
- Tilg H, Moschen AR, Kaneider NC. Pathways of liver injury in alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2011; 55(5): 1159-61.
- Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med* 2008; 13: 102-8.
- Tsukamoto H, Mkrtchyan H, Dynnyk A. Intra-gastric ethanol infusion model in rodents. *Methods Mol Biol*. 2008; 447: 33-48.

- Tuma DJ, Casey CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(4): 285-90.
- Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32(4): 303-8.

U

- Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 12.
- Uthus EO, Ross SA. Dietary selenium affects homocysteine metabolism differently in Fisher-344 rats and CD-1 mice. *J Nutr*. 2007; 137(5): 1132-6.
- Uthus EO, Yokoi K, Davis CD. Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. *J Nutr*. 2002; 132(6):1122-8.

V

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004; 266(1-2): 37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39 (1): 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160: 1-40.
- van de Wiel A, de Lange DW. Cardiovascular risk is more related to drinking pattern than to the type of alcoholic drinks. *Neth J Med*. 2008; 66(11): 467-73.
- Van Gossum A, Nève J. Low selenium status in alcoholic cirrhosis is correlated with aminopyrine breath test. Preliminary effects of selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res*. 1995; 47: 201-7.
- Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordão-Junior AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina Ribeirão Preto*. 1998; 31: 31-44.

- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura, JBF, Manfredi V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007; 30(5): 1323-38.
- Veale WL, Myers RD. Tables for determining grams and caloric values of ethanol solutions. *Prudue Neurophysiology Series*. 1968; 1: 1-4.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Signorile A, Altomare E. Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate. *J Hepatol*. 1998; 28(1): 46-53.
- Vendemiale G, Lieber CS. Acute and chronic effects of ethanol on biliary secretion of bilirubin and bile acids. *Subst Alcohol Actions Misuse*. 1984-1985; 5(6): 307-17.

W

- Wang X, Cederbaum AI. Acute ethanol pretreatment increases FAS-mediated liver injury in mice: role of oxidative stress and CYP2E1-dependent and -independent pathways. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(7): 971-84.
- Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44(2):128-35.
- Waszkiewicz N, Szajda SD, Zalewska A, Konarzewska B, Szulc A, Kepka A, Zwierz K. Binge drinking-induced liver injury. *Hepatology*. 2009; 50(5): 1676.
- White AM, Truesdale MC, Bae JG, Ahmad S, Wilson WA, Best PJ, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73(3): 673-7.
- 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(4): 277-84.
- Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: S26-S29.

- Wu H, Cai P, Clemens DL, Jerrells TR, Ansari GA, Kaphalia BS. Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: role of nonoxidative metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 216(2): 238-47.

Y

- Yan LJ, Forster MJ. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(17-18): 1308-15.
- Yan Y, Yang JY, Mou YH, Wang LH, Zhang H, Wu CF. Possible metabolic pathways of ethanol responsible for oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011; 35(1): 1-9.
- Yang L, Wu D, Wang X, Cederbaum AI. Cytochrome P4502E1, oxidative stress, JNK, and autophagy in acute alcohol-induced fatty liver. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(5): 1170-80.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(4): 496-502.
- Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, Richardson A, Ran Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(9): 1820-7.

Z

- Zachara BA, Gromadzińska J, Wasowicz W, Zbróg Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53(4): 663-77.
- Zachara BA, Pawluk H, Bloch-Boguslawska E, Sliwka KM, Korenkiewicz J, Skok Z, Ryć K. Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland. *Arch Environ Health.* 2001; 56(5): 461-6.

- Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*. 2007; 46(6): 2032-9.
- Zhang J, Wang H, Yu H. Thioacetamide-induced cirrhosis in selenium-adequate mice displays rapid and persistent abnormality of hepatic selenoenzymes which are mute to selenium supplementation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 224(1): 81-8.
- Zhang M, Song G, Minuk GY. Effects of hepatic stimulator substance, herbal medicine, selenium/vitamin E, and ciprofloxacin on cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*. 1996; 110(4): 1150-5.
- Zhang X, Li SY, Brown RA, Ren J. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress. *Alcohol*. 2004; 32(3): 175-86.
- Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Schemmer P, Chou SC, Raleigh JA, Mason RP, Lemasters JJ, Thurman RG. Binge drinking disturbs hepatic microcirculation after transplantation: prevention with free radical scavengers. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 290(2): 611-20.
- Zhou Z, Sun X, Kang YJ. Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Am J Pathol*. 2001; 159(1): 329-38.
- Zhou Z, Sun X, James Kang Y. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227(3): 214-22.
- Zhu H, Jia Z, Misra H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *J Dig Dis*. 2012; 13(3): 133-42.
- Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res*. 2012; 42(8):741-9.
- Zima T, Fialová L, Mestek O, Janebová M, Crkovská J, Malbohan I, Stípek S, Mikulíková L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*. 2001; 8(1): 59-70.