



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Ácido Fólico como Antioxidante frente a los efectos del Binge Drinking sobre el corazón.



Óscar Ortiz Rendón



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Ácido Fólico como Antioxidante frente a los efectos del Binge Drinking sobre el corazón.

Óscar Ortiz Rendón

Sevilla a 20 Septiembre 2018

Departamento de Fisiología

Dra. Fátima Nogales Bueno

Trabajo experimental

RESUMEN

El alcohol, es uno de los grandes problemas de la sociedad moderna, en especial durante la adolescencia, ya que cada vez la edad con la que se comienza a beber es mas temprana, además de los cambios en los hábitos de consumo, ingiriendo grandes cantidades de alcohol en muy poco tiempo y aumentando la frecuencia a cada fin de semana. A este movimiento social se le denomina “binge drinking” o “botellón” y supone una alerta global, debido a que esta sustancia psicoactiva representa multitud de factores de riesgo para diversas patologías, como, por ejemplo, patología cardiovascular.

Este patrón de consumo, que a día de hoy se observa entre los adolescentes en mayor proporción, provoca la aparición de estrés oxidativo (EO), que ocasiona una saturación en los sistemas enzimáticos antioxidantes y aumenta las especies reactivas de oxígeno (EROs) en el organismo provocando daño celular a nivel de los diferentes tejidos y órganos. Así, se ha encontrado que el estrés oxidativo provocado como consecuencia del consumo de alcohol tipo “binge drinking”, afecta directamente a la funcionalidad del corazón ya que aumenta frecuencia cardíaca. Pero además, se ha demostrado, por primera vez en este estudio, que este consumo de alcohol aumenta los niveles de homocisteína en suero y con ello, el riesgo de enfermedad cardiovascular.

La suplementación con ácido fólico (vitamina B9) en la dieta de ratas adolescentes sometidas a consumo agudo de alcohol, evita los efectos adversos producidos por las EROs al ser una vitamina antioxidante. Por otra parte, el ácido fólico interviene en el ciclo de la metionina, aumentando los niveles de glutatión reducido, un antioxidante endógeno cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, y disminuyendo la homocisteína. Por todo ello, la suplementación con ácido fólico en la dieta podría resultar una terapia eficiente frente al “binge drinking” previniendo modificaciones adversas en el corazón y sistema cardiovascular.

PALABRAS CLAVES: Binge drinking, alcohol, ácido fólico, estrés oxidativo, homocisteína, cardiovascular.

ÍNDICE

1. Introducción.	6
1.1. Binge Drinking.	6
1.1.1. Generalidades.	6
1.1.2. Metabolismo del alcohol.	7
1.1.3. Balance oxidativo,binge drinking y enfermedad cardiovascular.	9
1.2. Ácido fólico.	12
1.2.1. Generalidades.	12
1.2.2. Ácido fólico y enfermedad cardiovascular.	13
2. Binge drinking y ácido fólico.	14
3. Objetivos.	15
4. Materiales y Métodos.	15
4.1. Animales de experimentación y condiciones.	15
4.1.1. Animales y condiciones de experimentación.	17
4.2. Dieta animales.	17
4.3. Método de alcoholización.	17
4.4. Determinación de parámetros nutricionales.	17
4.4.1. Estudio nutricional y de la ingesta de ácido fólico.	17
4.5. Estudio macroscópico.	18
4.6. Toma y procesamiento de las muestras de ratas.	18
4.6.1. Obtención y tratamiento de las muestras de suero.	18
4.6.2. Obtención y tratamiento de las muestras de corazón.	18
4.7. Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas.	18
4.7.1. Homogenización del tejido.	18
4.7.2. Concentración total de proteínas.	19
4.7.3. Actividad de la glutatión peroxidasa.	21
4.7.4. Actividad de la glutatión reductasa.	21
4.7.5. Actividad de la superóxido dismutasa.	23
4.7.6. Actividad de la catalasa.	24
4.7.7. Peroxidación lipídica.	24

4.8. Determinación de homocisteína en suero.	24
4.9. Determinación de la presión y frecuencia cardíaca.	25
5. Resultados y discusión.	25
5.1. Parámetros nutricionales.	26
5.2. Actividad enzimática antioxidante en corazón y suero.	28
5.3. Oxidación y daño molecular.	30
5.4. Evaluación del daño cardiovascular.	31
6. Conclusiones.	34
7. Bibliografía.	35

1. Introducción y antecedentes.

1.1. Binge drinking.

1.1.1. Generalidades.

El alcohol es una droga psicoactiva que en la actualidad está al alcance de todos los públicos, lo que implica un riesgo para la salud, originando problemas de adicción que derivan a su vez en alteraciones metabólicas, funcionales y psicológicas. El grado de afección por esta sustancia depende a su vez de factores tales como el sexo, la edad, el volumen ingerido, los hábitos de consumo, el marco socio-cultural en el que se ubique, la genética, etc. De acuerdo con la OMS (2018), el consumo excesivo de alcohol supone el 5,3% de todas las defunciones a nivel global, unos 3 millones de defunciones cada año, siendo además el factor causal que provoca más de 200 enfermedades y trastornos.

En la actualidad, son cada vez más jóvenes los que consumen alcohol en grandes cantidades, lo que implica un gran problema, ya que la adolescencia es un periodo de crecimiento y desarrollo, tanto físico, mental y social, siendo un claro predicho de una posible dependencia de alcohol en la edad adulta (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2019).

En España, la edad a la que se empieza a beber alcohol es a los 13 años. La mayoría de estos jóvenes buscan una integración social por medio de un movimiento que en las últimas décadas resuena con fuerza entre los adolescentes, el “binge drinking” o comúnmente llamado “el botellón”.

“Binge drinking” o “botellón” es como se denomina al movimiento social que consiste en beber alcohol intensivamente en periodos de tiempo cortos y frecuencia de repetición alta. 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 para el binge drinking (BD): consumo de 5 o más vasos de bebidas alcohólicas en un intervalo aproximado de dos 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, Consumo y Bienestar Social, 2019).

Según las últimas estadísticas del Ministerio de Sanidad, Servicio Sociales e Igualdad registradas por la Delegación de Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD) de 2018, el alcohol es la sustancia psicoactiva más extendida entre los estudiantes de Enseñanzas Secundaria de 14 a 18 años. El 76,9% ha consumido bebidas alcohólicas en alguna ocasión en su vida, y aproximadamente 2 de cada 3 jóvenes (67%) ha tomado alcohol en los últimos 30 días, observando que el 21,8% de los jóvenes ha experimentado una borrachera en este periodo y el 31,7% ha realizado BD. Con respecto las estadísticas del 2012, en los cuales el porcentaje de jóvenes consumidores de alcohol era de 81,2% en los últimos 12 meses y de un 74% en los últimos 30 días, se observa una tendencia decreciente en el consumo de esta sustancia psicoactiva, aunque en la actualidad la prevalencia sigue muy elevada (76.6% y 67%, respectivamente).

1.1.2. Metabolismo del alcohol.

El alcohol ingerido es absorbido en la mucosa gástrica por las células endoteliales y distribuido por el organismo. La mayor parte del alcohol (90%-80%) es metabolizado por la vía oxidativa del etanol y el resto puede ser metabolizado por vías no oxidativas, aunque también es eliminado a través de la orina, sudor o respiración (Carreras y Castellano, 2012). El órgano donde más cantidad de etanol es metabolizado es el hígado, aproximadamente un 90% (Cascales et al., 1997). En el hígado es metabolizado a través de dos enzimas que actúan conjuntamente, realizando dos reacciones consecutivas: primero actúa la Alcohol deshidrogenasa (ADH) transformando el etanol en acetaldehído y en segundo lugar actúa la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) dando como producto final un acetato (Hernández y cols., 2014).

En los hepatocitos coexisten tres sistemas enzimáticos (figura 1) que oxidan el etanol hasta acetaldehído: La vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH); el sistema microsomal oxidativo (SMOE) y la vía de la catalasa (Hernández et al., 2014).

En condiciones normales, la ADH es la vía de oxidación del alcohol mayoritaria, siendo entre el 80-90% el alcohol que se metaboliza. Se localiza en el citosol de los hepatocitos, secundariamente en estómago, intestino delgado, riñón y cerebro (Carreras y Castellano, 2012). La ADH transfiere un hidrógeno del sustrato al cofactor NAD⁺, produciendo NADH y acetaldehído.

El SMOE, dependiente del citocromo P-450, se encuentra en el retículo endoplasmático del hepatocito e interviene en la oxidación del alcohol cuando la vía de la ADH está saturada. Se ha relacionado que esta vía actúa en mayor grado en personas que tienen un consumo crónico, debido a que el alcohol induce la sobreexpresión génica de una isoenzima de la CYP-450, la CYP-2E1, que es capaz de oxidar usando NADPH y oxígeno molecular, aunque en el consumo agudo también se produce.

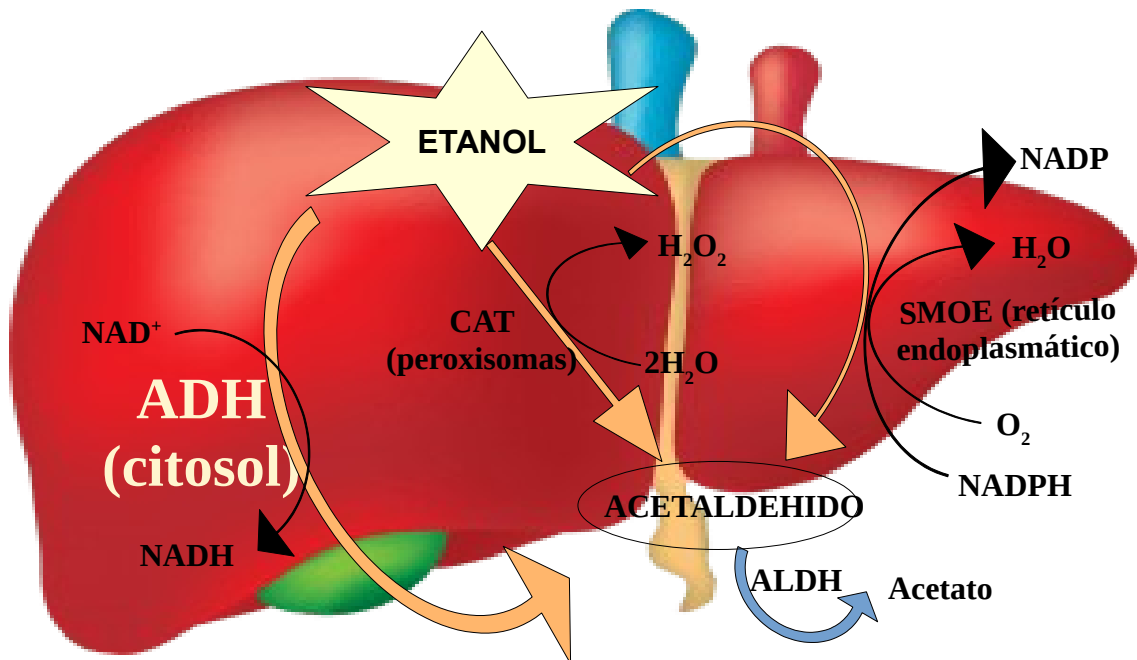


Figura 1. Imagen representativa de las vías de metabolización del alcohol en hígado, donde la vía principal es la ADH.

La sobreestimulación de esta vía provoca un exceso en especies reactivas de oxígeno (EROs): anión superóxido (O_2^-); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); radical hidroxilo (OH^\cdot), responsables del estrés oxidativo (EO) que produce el alcohol. Aproximadamente esta vía tiene un 10% de actividad en la metabolización del alcohol (Carreras y Castellano, 2012).

La vía de la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas del citosol del hepatocito, oxida el etanol usando H_2O_2 . En base a ello, su actividad se ve reducida a una situación de saturación de las otras vías, donde se genere una concentración de H_2O_2 mayor, por ello esta vía en condiciones normales no es relevante en el hígado, tan solo participa en un 2% (Hernández et al., 2014).

El acetaldehído, producido por estas vías, es metabolizado a acetato y se incorpora al ciclo de Krebs como Acetil-CoA. La responsable de esta reacción es la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH), de la que se conocen dos isoenzimas diferenciadas por su localización y su actividad: ALDH-1, se localiza en el citosol y actúa a concentraciones altas de acetato; ALDH-2, se localiza en las mitocondrias y actúa en condiciones normales fisiológicas (Carreras y Castellano, 2012). La ALDH necesita como cofactor NAD^+ , cuando existe una saturación de las vías oxidativas se producen alteraciones debidas al desbalance de la relación $NADH/NAD^+$, como son: Aumento de la síntesis de lípidos produciendo esteatosis hepáticas, menor actividad del ciclo de Krebs, aumento de ácido láctico, aumento de ácido úrico y desbalance energético.

Existe una vía no oxidativa, que tiene poca relevancia y es catalizada por la ácido graso etil ester sintetasa (FAEE). Esta vía da como producto final compuestos altamente tóxicos para diferentes tipos de células y tejidos (Hernández et al., 2014).

En corazón se encuentran las tres vías metabólicas oxidativa, al igual que en hígado, aunque presentan distinta distribución en este tejido (figura 2). Los niveles de catalasa y SMOE están aumentados siendo éstas las principales vías de metabolización, a diferencia del hígado donde la vía principal es la ADH. La ADH en corazón desempeña una actividad discreta respecto a las demás vías oxidativas, incluso en concentraciones elevadas de alcohol (Orellana et al., 1998). A elevadas concentraciones de este compuesto, los niveles de catalasa aumentan siendo esta la principal vía de metabolización en el corazón. A ello se suma que incrementa el número de peroxisomas en la célula, lo que implica un aumento en el tamaño del músculo del corazón, relacionado con la cardiomegalia encontrada.

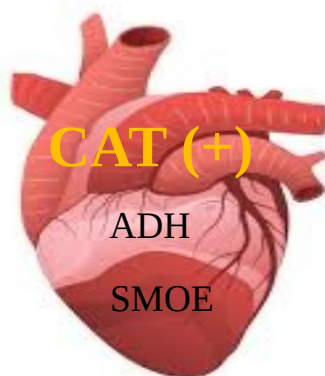


Figura 2. Sistemas enzimáticos oxidativos metabolizadores del alcohol en corazón, donde la vía principal, a diferencia de en el hígado, es la CAT.

Algunos autores determinan que el metabolismo del alcohol por medio del SMOE es responsable, en parte, de la patogénesis de las cardiopatías alcohólicas, incluyendo disfunción contráctil, generando EO e induciendo la apoptosis celular, posiblemente a través de la activación de las señales proapoptóticas JNK y ASK-1 (Zhang et al., 2013).

1.1.3. Balance oxidativo, binge drinking y enfermedad cardiovascular.

El balance oxidativo es un equilibrio entre los procedimientos que generan oxidación y los sistemas antioxidantes endógenos. Cuando este equilibrio se altera a favor de los primeros se produce EO y aparece una mayor producción de especies oxidantes, que no son neutralizados por medio de los sistemas antioxidantes endógenos del organismo, ya que éstos se encuentran disminuidos y no son capaces de tener una actividad efectiva frente a la acumulación de especies oxidantes o bien están inhibidos. Todo ello produce radicales libres que son moléculas inestables (Valko et al., 2004) altamente reactivas con multitud de biomoléculas (proteínas, lípidos, ADN)

ocasionando daño celular. Dentro de los radicales libres cabe destacar la importancia de las EROs, como el, anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) o algunos derivados no radicales, como, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En condiciones normales, las EROs son generados en el organismo en pequeñas concentraciones teniendo funciones fisiológicas, pero cuando existe un desequilibrio, aumentando con ello las concentraciones de estas moléculas, provocan lesiones a nivel celular y tisular.

Las enzimas antioxidantes endógenas son el primer y principal sistema de defensa del organismo frente al EO (figura 3). Su actividad se basa en la eliminación de los EROs, sobre todo el O_2^- y H_2O_2 , ya que a partir de ellos derivan las especies mas inestables, y por ello más reactivas y lesivas, como el radical OH^\cdot , el oxígeno singlete (1O_2) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$). Las enzimas que se incluye en este sistema son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Este sistema enzimático funciona como una cadena progresiva.

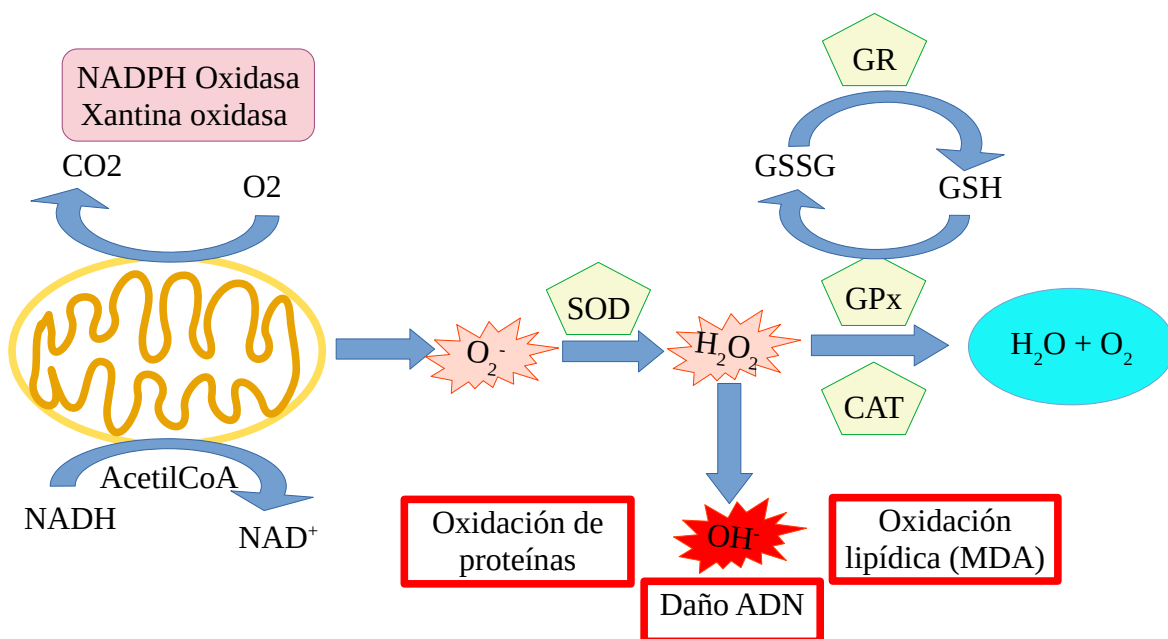


Figura 3. Mecanismo de acción de las enzimas antioxidantes endógenas.

Tras generarse el O_2^- en la mitocondria actúa la SOD, la cual produce H_2O_2 y libera oxígeno molecular (O_2), consecutivamente el H_2O_2 tiene dos vías: la principal es su transformación en H_2O y O_2 a través de las enzimas CAT y GPx/GR, la segunda es la transformación en OH^\cdot provocando oxidación de proteínas, lípidos y ADN.

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser exógenos o endógenos y constituyen la segunda defensa del organismo. Entre los antioxidantes endógenos se encuentran, proteínas plasmáticas, glutatión (GSH) siendo uno de los más importantes debido a que se encuentra en mayor concentración actuando tanto en reacciones enzimáticas, a través de la GPx, y no enzimáticas, también se ha mostrado que en el

consumo agudo de alcohol tipo BD, los niveles de GSH disminuyen (Ojeda et al., 2015). Dentro de los antioxidantes exógenos encontramos flavonoides, metales antioxidantes, como selenio, magnesio o zinc, vitaminas C, E, β -caroteno (precursor de la vitamina A) y ácido fólico, entre otros.

Como ya se ha comentado anteriormente, el consumo agudo de alcohol tipo BD genera una alta cantidad de EROs a través de la inducción del SMOE, la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte de electrones, generando EO que en **el corazón** se ha relacionado con el desarrollo de **cardiopatías alcohólicas** e hipertensión a través de diversos mecanismos (figura 4): cambios electrofisiológicos que producen arritmias; alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Ren y Wold, 2008), que modifica la membrana mitocondrial desestabilizandola y liberando citocromo c, induciendo la apoptosis; activación del sistema nervioso simpático (SNS) produciendo una aumento de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que aumentan la vasoconstricción, velocidad de conducción, frecuencia cardíaca, fuerza de contracción y excitabilidad, provocando un aumento del gasto cardíaco e hipertensión (Rupp et al., 1996).

Además el EO también activa el sistema renina angiotensina aldosterona (Piano et al., 2017), aumentando los niveles de angiotensina II, la cual produce vasoconstricción, remodelación cardiovascular, aumento de secreción de aldosterona, reteniendo sodio y líquido provocando un aumento de la hipertensión.

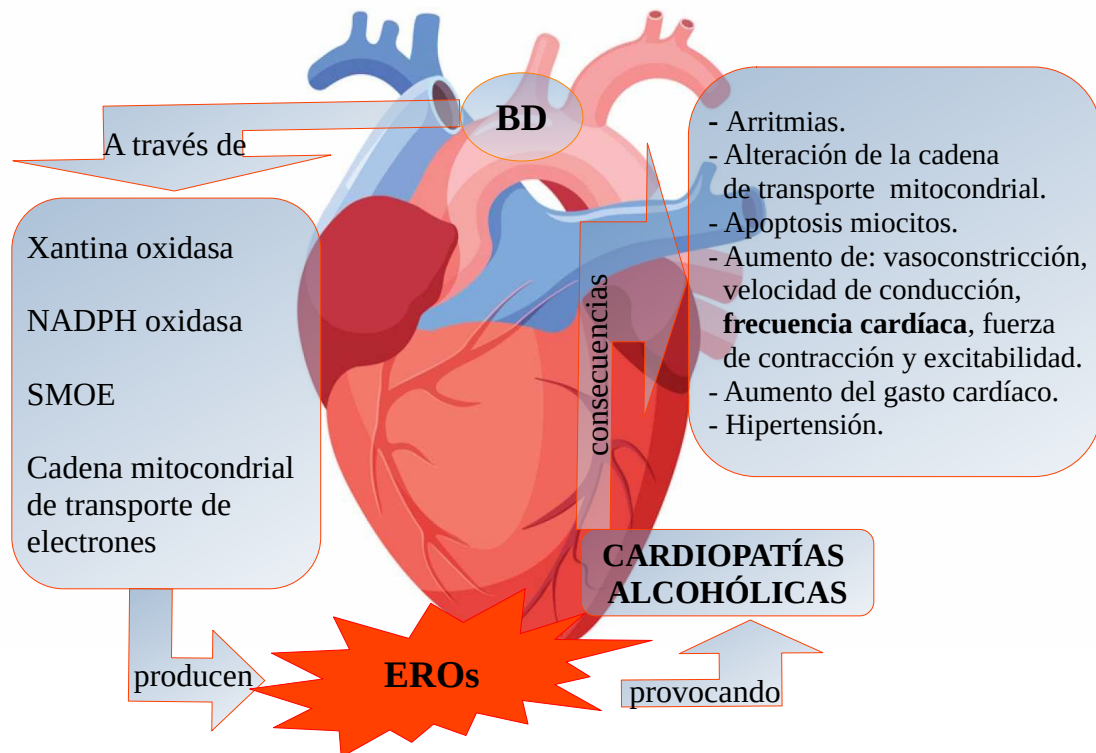


Figura 4. Principales vías formadoras de especies reactivas de oxígeno en corazón, además de las consecuencias provocadas en la cardiopatía alcohólica.

1.2. Ácido Fólico.

1.2.1. Generalidades.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del grupo B, también denominada como vitamina B9 o folina. El ácido fólico es un compuesto sintético, estable y activo tras su reducción utilizado en suplementación de dietas deficitarias de esta vitamina. En los alimentos encontramos un grupo de moléculas con estructura y actividad similar al ácido fólico, denominados folatos, que pueden presentarse naturales o como compuestos reducidos derivados del tetrahidrofolato (THF), por ejemplo, 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), 5-formil-tetrahidrofolato y 5,10-metilen-tetrahidrofolato, entre otros. Estructuralmente, el ácido fólico contiene un anillo de pteridina unido por puente metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico y este unido por enlace amida a un residuo de ácido glutámico (Varela y Alonso, 1999).

Esta vitamina no se puede sintetizar de novo en el organismo, por lo que la única forma de obtenerla es a través de los alimentos. La absorción del ácido fólico en el intestino es del 85% aproximadamente, mientras que la biodisponibilidad de otros folatos se estima que es del 50% (Romano et al., 1995). Las fuentes alimenticias de ácido fólico son: hortalizas de hojas verdes, como por ejemplo, las espinacas, las coles, la lechuga, etc; algunas frutas, como melón, cítricos o plátanos; en legumbres tales como las judías y habas; en carne, sobre todo en hígado y riñones; los cereales integrales; en la leche y huevos, y en algunos frutos secos.

La importancia de esta vitamina radica como derivado del tetrahidrofolato (THF) actuando como **transportador intermediario de unidades de carbono**, las cuales son necesarias en numerosas reacciones metabólicas como la síntesis de ácidos nucleicos, produciendo purinas y pirimidinas, el metabolismo de los aminoácidos: metionina, glicina e histidina (Fowler, 2001), ya que intervienen en el ciclo de la metionina como transportador y en reacciones de oxidación y reducción de diferentes vías de regulación metabólica, (Ros, 1999) incrementando la formación del GSH a través del ciclo de la metionina. El GSH es un antioxidante endógeno de vital importancia en reducir los niveles de estrés oxidativos en las células del cuerpo, disminuyendo la oxidación a proteínas, lípidos y ADN. Por tanto el ácido fólico combate el agotamiento de GSH que produce el alcohol (Zhao et al., 2014).

La **actividad antioxidante** del ácido fólico, se basa en la capacidad de actuar como agente reductor al ceder protones (Abilés, 2007), quedando de esta forma oxidado y neutralizando los radicales libres presentes. Estudios recientes confirman que el ácido fólico actúa disminuyendo la actividad de la NADPH oxidasa, una enzima que genera O_2^- y produce un aumento en los niveles de EROs. Además, el ácido fólico interacciona con la óxido nítrico sintasa, disminuyendo los niveles de peroxinitritos pro-oxidantes (Sarna et al., 2012) los cuales reaccionan con las hemoproteínas que inactivan los complejos mitocondriales I y III de la cadena respiratoria, produciendo una acumulación de niveles de O_2^- , H_2O_2 y peroxinitritos lo que conlleva oxidación de proteínas y liberación de citocromo C al citoplasma, originando apoptosis celular (Corrales y Nova. 2012).

Además, el ácido fólico desempeña un papel antioxidante fundamental ya que alivia el agotamiento del GSH hepático, necesario para la activación de la enzima antioxidante GPx, a través del ciclo de la metionina.

1.2.2. Ácido fólico y enfermedad cardiovascular.

El ácido fólico previene la enfermedad cardiovascular por mecanismos diferentes relacionados con sus propiedades antioxidantes, antiapoptóticas y antiinflamatorias. A nivel vascular, el ácido fólico, a través de su forma reducida 5-MTHF, aporta un grupo de carbono a la homocisteína formando la metionina (Figura 5: ciclo de la metionina). De esta forma, cuando existe un déficit de ácido fólico se produce una acumulación de homocisteína en plasma, o hiperhomocisteinemia, lo cual está relacionado con la enfermedad cardiovascular y constituye un riesgo para la salud.

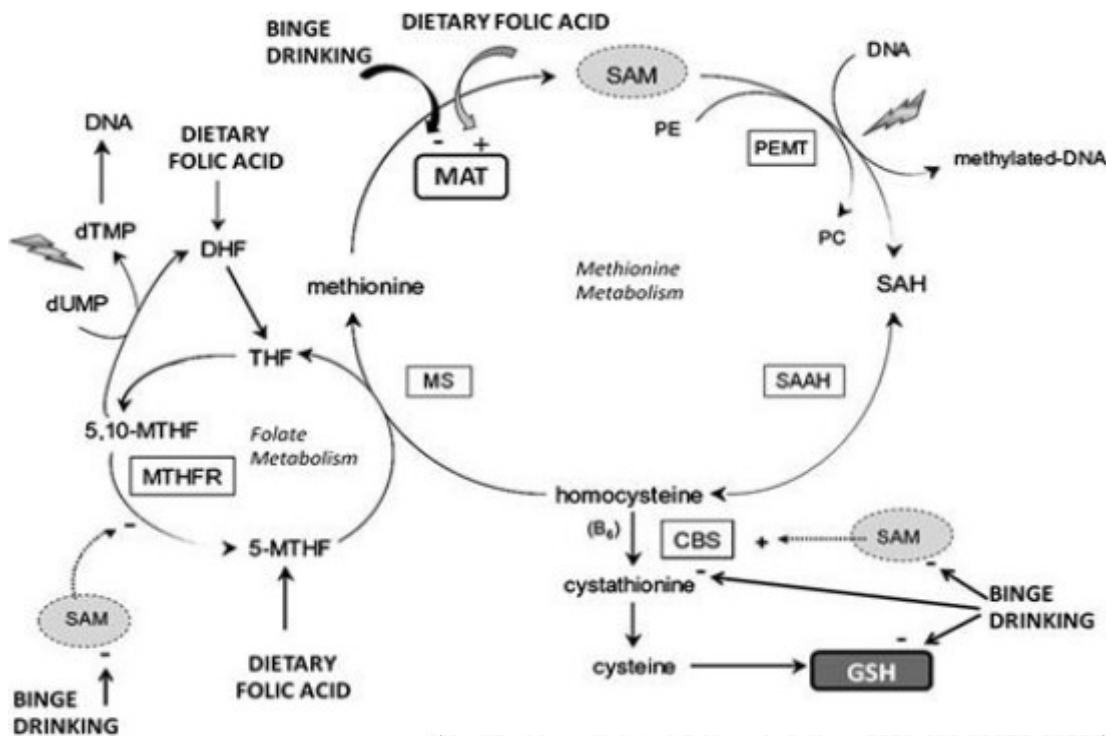


Figura 5. Esquema del papel del ácido fólico en el ciclo de la metionina, como se afecta por acción del "binge drinking" y eleva niveles de homocisteína en plasma. Esta imagen está tomada del artículo "The Benefits of Administering Folic Acid in Order to Combat the Oxidative Damage Caused by Binge Drinking in Adolescent Rats" (Ojeda y cols., 2016).

La homocisteína sufre una autooxidación por las EROs, que produce una lesión en las células endoteliales, causando aterosclerosis y la trombosis (Stein y McBride, 1998). La lesión vascular además disminuye la producción de óxido nítrico (NO) al inactivar a la óxido nítrico sintetasa, lo que produce una menor vasodilatación arterial en individuos con hiperhomocisteinemia (Moens A. et al, 2008).

La homocisteína además produce EROs ya que incrementa la actividad de la NADPH oxidasa (Djuric et al., 2018). El daño citotóxico originado por las EROs está relacionado a su vez con la oxidación de las LDL (lipoproteínas de alta densidad), disminución de la síntesis del ADN, disminución de factores de coagulación, aumento de agregación plaquetaria y de citoquinas proinflamatorias. Todos estos mecanismos están relacionados con la aterosclerosis así como otras complicaciones como el infarto de miocardio, ictus o aneurisma aórtico (Djuric et al., 2018; Welch y Loscalzo, 1998).

A nivel cardíaco, independientemente de los niveles de homocisteína, el ácido fólico tiene efectos cardioprotectores (Mutavdzin et al., 2019) ya que produce un aumento de la vasodilatación coronaria y una disminución de la presión arterial media en pacientes con enfermedad coronaria. Además, se ha visto, utilizando corazones perfundidos, que el ácido fólico incrementa el flujo sanguíneo cardíaco y disminuye la producción del anión superóxido (Djuric et al., 2007). Por otra parte, utilizando ratas diabéticas, (Wu et al., 2008) encontraron que el ácido fólico produce una disminución dosis-respuesta en la apoptosis de los cardiomiocitos al incrementar Bcl-2, una proteína antiapoptótica y reducir Bax y Fas (ambas proteínas proapoptóticas).

Así, por tanto, el ácido fólico tiene un importante papel en la enfermedad cardiovascular y el corazón porque disminuye el estrés oxidativo, previene la apoptosis y mejora la función endotelial reduciendo los niveles de homocisteína en plasma (Mutavdzin et al., 2019).

2. Binge drinking y ácido fólico.

El consumo excesivo y continuo de alcohol altera la homeostasis de los folatos como consecuencia de la malnutrición que lleva asociada este tipo de consumo así como la disminución en los niveles de folatos ingeridos (Lieber, 2003). Pero además, el alcohol daña las proteínas transportadoras de los folatos en diferentes membranas biológicas, como la del intestino, e hígado y aumenta su excreción urinaria al alterar la membrana de los túbulos renales (Villanueva et al., 2001).

Sin embargo, hasta la fecha hay pocas evidencias de como el BD afecta a los niveles de esta vitamina y mucho menos a nivel cardiovascular. En un estudio realizado por Ojeda et al., (2016) utilizando ratas adolescentes expuestas a un consumo de alcohol tipo BD se encontró que este patrón de consumo de alcohol no produjo disminución en la ingesta sólida ni de ácido fólico con respecto al grupo control (Ojeda et al., 2016). Además, puesto que no se producía malabsorción ya que el alcohol era administrado intraperitonealmente y no pasaba a nivel intestinal, los niveles de fólico encontrados en suero, también eran similares a los del grupo control. Sin embargo, está claramente demostrado, que el consumo agudo de alcohol incrementa la excreción urinaria de folatos, tanto in vivo como in vitro (Eisenga et al., 1989) por lo que los niveles de ácido fólico probablemente están disminuidos en otros tejidos. Hay que tener en cuenta que el modelo de BD repetido genera una gran cantidad de EROs lo que hace que se activen las enzimas antioxidantes, tales como la GPx, que necesita

el GSH. El ácido fólico es necesario para la síntesis de GSH a través del ciclo de la metionina. Esta vitamina es bastante importante a nivel hepático ya que, al ser el principal tejido que metaboliza el alcohol sufre un alto grado de oxidación, por lo que probablemente se está consumiendo una gran cantidad de GSH y por consiguiente, de ácido fólico. Esto mismo sucede con otros antioxidantes como el selenio que se encuentra deplecionado en los tejidos, entre ellos el corazón, de animales expuestos al BD (Ojeda et al., 2015; Ojeda et al., 2017).

De acuerdo a estos resultados, Ojeda et al., (2016) observaron que cuando se suplementa con ácido fólico tras el BD se producía un aumento significativo en la ingesta de esta vitamina así como en los niveles encontrados en plasma. Estos autores, por tanto, propusieron que la suplementación con fólico es una terapia eficiente frente al daño que produce el consumo de alcohol tipo BD ya que disminuye la oxidación de las biomoléculas, estabilizando la cadena de ADN y aumenta los niveles de GSH hepático. Sin embargo, no existen hasta la fecha estudios que relacionen el ácido fólico con el BD y el daño cardiovascular, a pesar de que es bien conocido que este consumo de alcohol genera hipertensión arterial por mecanismos oxidativos.

3. Objetivos.

Por ello, teniendo en cuenta que el ácido fólico tiene un papel importante en la prevención de la enfermedad cardiovascular, ya que entre otros mecanismos, presenta propiedades antioxidantes, y que este nutriente probablemente es deficiente en muchos tejidos, el objetivo de este trabajo es analizar el balance oxidativo que produce el consumo de alcohol tipo BD, tanto en suero como a nivel cardíaco, y valorar si una suplementación con ácido fólico podría ser una terapia eficiente frente al daño cardiovascular desarrollado por esta droga.

4. Materiales y métodos.

4.1. Animales de experimentación y condiciones.

4.1.1. Animales y condiciones de experimentación.

Para el diseño de este experimento se usaron ratas de la raza Winstar con 21 días de edad que procedían del Centro de Producción e investigación Animal de la Universidad de Sevilla. Las ratas fueron dispuestas en jaulas de plástico en el estabulario de la Facultad de Farmacia, en unas condiciones de temperatura (22°C) y de luz (ciclo de luz: 7:00 a.m.-19:00 p.m.) controladas.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en grupos a su 28 días de edad, separándolas en cuatro grupos de experimentación: grupo control (C), grupo alcohol (A), grupo control fólico (CF) y grupo alcohol fólico (AF).

A cada grupo se les planteó unas condiciones experimentales individuales:

- Grupo C: ratas alimentadas con pienso comercial y agua ad libitum, y tres días a la semana una inyección intraperitoneal de solución salina.
- Grupo A: ratas alimentadas con pienso comercial y agua ad libitum, y tres días a la semana una inyección intraperitoneal de etanol (3g/kg de peso de rata).
- Grupo CF: ratas alimentadas con pienso comercial suplementado con ácido fólico (8ppm) y agua ad libitum, y tres días a la semana una inyección intraperitoneal de solución salina.
- Grupo AF: ratas alimentadas con pienso comercial suplementado con ácido fólico (8 ppm) y agua ad libitum, y tres días a la semana una inyección intraperitoneal de etanol (3g/kg de peso de la rata).

Los tratamientos se realizaron de acuerdo a los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales aprobados previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla. Los animales permanecieron bajo estas condiciones hasta el momento del sacrificio para la obtención de las muestras. Las ratas permanecieron en ayunas durante 12 horas antes del sacrificio.

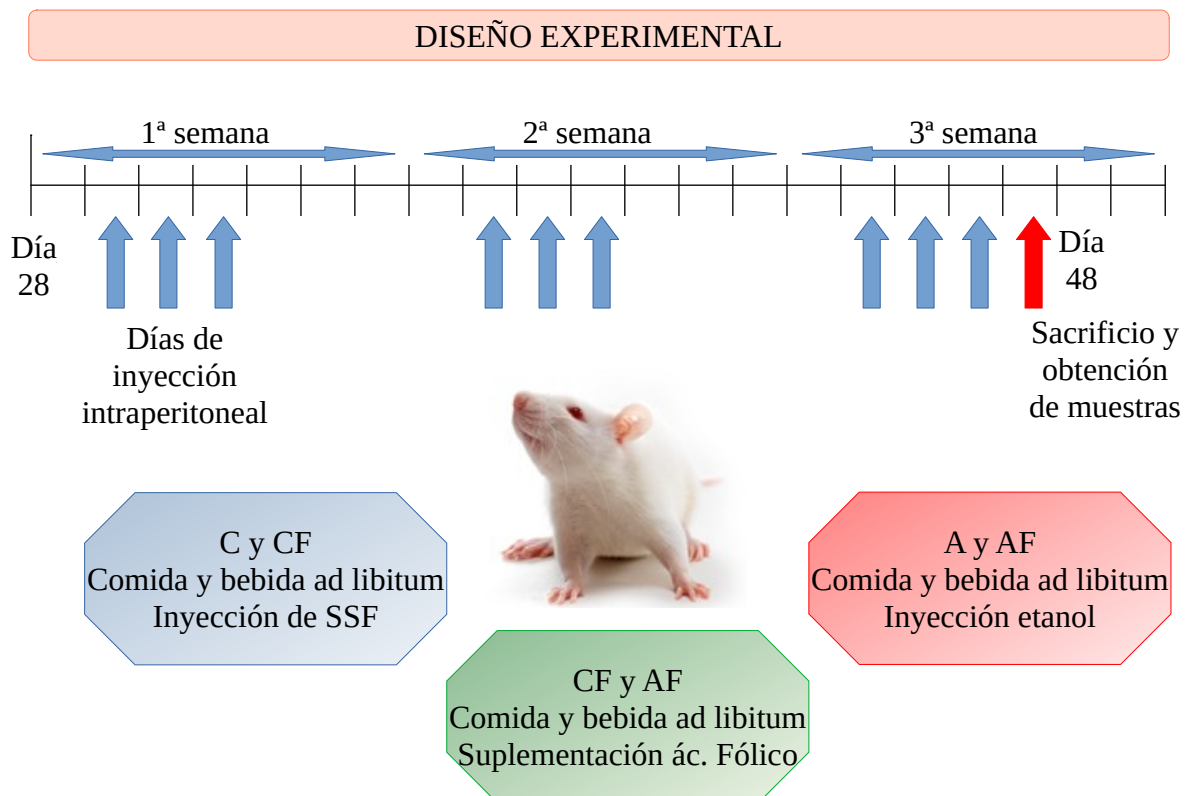


Figura 6. Esquema del diseño experimental. Grupos de ratas: C=control; A=alcohol; CF=control fólico; AF=grupo alcohol fólico. SSF= solución salina fisiológica.

4.2. Dieta animales.

La alimentación dotada a los animales de experimentación fue de pienso comercial básica semisintética (Harlan Laboratorios) que cubría todas las necesidades energéticas y nutricionales. La alimentación de los grupos suplementados (CF y AF) contenía, además, 8 ppm de ácido fólico en la comida.

4.3. Método de alcoholización.

Método de alcoholización que se realizó para los grupos alcohol (A y AF) tenía como base el modelo de alcoholización “binge drinking” basado en la administración por vía intraperitoneal, tres días consecutivos por semana, durante tres semanas, etanol (3g/kg de peso) en solución salina al 20%v/v (Callaci et al., 2010). A los animales del grupo control se le administró la misma cantidad de solución salina mediante inyección intraperitoneal durante el mismo periodo de tiempo.

4.4. Determinación de parámetros nutricionales.

4.4.1. Estudio nutricional y de la ingesta de ácido fólico.

Durante el periodo experimental de tres semanas se midió diariamente la ingesta líquida y sólida por diferencia de peso. En el caso del agua se midió, con anterioridad, el peso del biberón y se rellenó de agua y cada día se midió la diferencia de peso del contenido en agua con respecto al día anterior. En el caso de la comida se midió la cantidad de pienso que tenía y se comparaba con el día anterior. Se utilizó una balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1g de precisión).

La ingesta de ácido fólico ($\mu\text{g}/\text{día}$) se calculó a partir de los datos de la ingesta sólida. Las calorías diarias se calcularon a partir de los datos obtenidos de la ingesta sólida multiplicado por 3.96 Kcal del pienso ingerido.

4.5. Estudio macroscópicos.

Para controlar el desarrollo de los animales durante el proceso del tratamiento hasta el día de sacrificio, las ratas se pesaron diariamente utilizando la balanza analítica (COBOS D-2000-SX, de 0.1g de precisión).

Al término del periodo de experimentación, los animales antes del sacrificio se pesaron y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal, 0.5ml/100 g de peso, de uretano (SIGMA) al 28% p/v. Una vez anestesiadas, se determinó la circunferencia abdominal y torácica (Novelli et al., 2007) y se midió la longitud cráneo-caudal usando un pie de rey métrico de precisión 0.01mm.

4.6. Toma y procesamiento de las muestras de ratas.

4.6.1. Obtención y tratamiento de las muestras de suero.

Después de anestesiar a los animales de experimentación y realizar el estudio macroscópico, se extrajo la sangre mediante punción cardíaca a través del tórax, ésta se depositó en un tubo de ensayo y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Con una micropipeta se recogió el suero sobrenadante, se alicuotó en eppendorf y se almacenó en el congelador de -80°C hasta el momento posterior para la determinación de parámetros.

4.6.2. Obtención y tratamientos del corazón.

Luego de la toma de suero y hacer una laparotomía media, se comenzó extrajo el corazón, se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó en el congelador de -80°C hasta su posterior análisis.

4.7. Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas en corazón.

4.7.1. Homogenización del tejido.

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración total de proteínas, una parte del corazón congelado se pesó, troceó y suspendió en tampón de sacarosa en una proporción 1:4 p/v (Sacarosa (ROIG FARMA 250 mM); TRIS (SIGMA-ALDRICH) 15mM; DTT (SIGMA) 1mM; EDTA (SIGMA) 1Mm), usando para ello un homogenizador de tejidos con pistillo de teflón Pobel 245432, España). El pH del tampón se ajustó hasta 7 con una solución de HCl (PANREAC).

El homogenizado resultante se centrifugó a 3000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante, alicuotándolo en eppendorf que posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis.

4.7.2. Concentración total de proteínas.

Se determinaron las proteínas totales en suero y corazón, para poder expresar la actividad de enzimas antioxidantes como actividades específicas (U/mg de proteína).

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

Los reactivos que se empleados en el método son:

- Reactivo A: Na_2CO_3 2% p/v en NaOH 0.1M
- Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v)
- Reactivo C: Tartatro de sodio potasio 2.7p/v
- Reactivo D: 1.7ml de reactivo B y 1.7ml de reactivo C en 170 ml de reactivo A
- Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteau diluido en agua bidestilada en proporción 1:1 v/v
- Muestras diluidas con agua bidestilada:
 - *Suero 1/1000
 - *Homogenizado de tejido de corazón 1/750

Los reactivos D y E deben ser preparados en el mismo momento que se usen.

Procedimiento: La técnica consiste en desarrollar una curva patrón a partir de la cual, midiendo sus absorbancias se determina las concentraciones estándares de proteína en el medio, con lo que se puede calcular las concentraciones de proteínas de las muestras por medio de la medición de absorbancia de cada muestra.

Para la curva patrón 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: 0.1mg/mL; P2: 0.05mg/mL; P3 0.025mg/mL; P4: 0.0125 mg/mL.

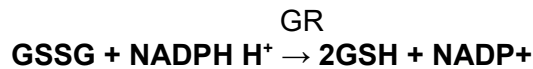
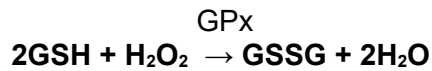
Posteriormente se mezclan los tubos de ensayo con 5 mL de reactivo D con 1 mL de muestra diluida (corazón 1/750 mL en agua bidestilada y suero 1/1000 en agua bidestilada), y se deja reposar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se adiciona 0.5 ml del reactivo E, se agita y se deja incubar durante unos 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se empezó a medir las absorbancias de la curva patrón y las muestras, por duplicado a 750 nm en un espectrofotómetro.

Cálculo: para conocer la concentración total de proteínas de las muestras se extrapola sus absorbancias a la recta de la curva patrón de concentraciones conocidas.

4.7.3. Actividad de la glutatión peroxidasa.

Fundamento: la enzima glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno en una reacción en que interviene la 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 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 son:

- Tampón fosfatopotásico (TPK).....250mM, pH= 7,4 a 4°C
- EDTA (SIGMA) en tampón TPK.....10mM
- AZIDA.....10 mM
- NADPH en bicarbonato al 0,75%p/v.....2 mM
- GR en tampón TPK.....10 U
- GSH.....10 mM
- H₂O₂.....2,5 mM
- Muestras diluidas: Suero 1/200 con agua bidestilada
- Tejido homogenizado del corazón 1/40 con agua bidestilada

Procedimiento: En una microcubeta de 1,5mL de volumen, se añaden 300 µL de TPK, 100 µL de EDTA, 100 µL de AZIDA, 100 µL de NADPH, 100 µL de GSH, 100 µL de GR y 100 µL de muestra diluida. Se deja incubar durante cinco minutos. La microcubeta del blanco contiene 200 µL de H₂O mientras que la microcubeta de la muestra contiene 100 µL de muestra y 100 µL de H₂O₂ que serán añadidos justo antes de comenzar la medida de absorbancia. A continuación se coloca un blanco y la muestra en el espectrofotómetro. Adicionamos los 100 µL de H₂O₂ a la vez que le damos a autocero y comenzar la medida. La medida se realiza durante 3 minutos a 340 nm . Se observa como esta absorbancia disminuye con el tiempo.

Cálculos: La actividad de la enzima GPx se calcula a través de la fórmula:

$$\text{mU/mg proteína} = [(\Delta\text{Abs}(\text{min}) * \text{Vf} * 10^3) / (\epsilon * \text{d} * \text{Vm} * \text{C})] * \text{D}$$

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

4.7.4. Actividad de la Glutación reductasa.

Fundamento: Dicha técnica se basa en el método espectrofotométrico descrito por (Worthing y Rosemeyer, 1974) ligeramente modificado, por el cual se mide la disminución de absorbancia a 340nm producida por la oxidación del NADPH.

La glutación reductasa (GR), dependiente de NADPH, cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH).

Los reactivos empleados en este método son:

- Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7.4 a 4°C) 0,066 M
- Solución de cloruro potásico (ACOFARMA) 2 M
- Solución EDTA (en TPK) (SIGMA) 10 mM
- Solución de NaHCO₃ (SIGMA) 0,1% p/v
- Solución glutación oxidado (GSSG) (SIGMA) 10 mM
- Solución NADPH (en NaHCO₃) (SIGMA) 1 mM

Procedimiento: En una microcubeta de 1,5 mL se añaden: 590 µL de tampón TPK, 100 µL de cloruro potásico, 100 µL de EDTA, 100 µL de GSSG, 100 µL de NADPH y se deja incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inició cuando se adicionaron 10 µL del homogenizado sin diluir al comienzo de la medición en el espectrofotómetro. Todas las muestras se midieron frente a un blanco, el cual contenía tampón TPK en vez de muestra, a 340 nm durante 3 minutos.

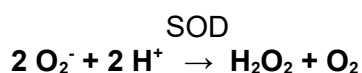
Cálculo: La actividad de la enzima GR se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$\text{mU/mg} = [(\Delta\text{Abs}(\text{min}) \cdot \text{Vf} \cdot 10^3) / (\epsilon \cdot \text{d} \cdot \text{Vm} \cdot \text{C})]$$

mU/mg proteína: nmol de GR por mg de proteína de la muestra; **Vf:** Volumen final en mL en la microcubeta; **ε :** coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es 6,22 mM⁻¹cm⁻¹; **ΔAbs(min):** incremento de absorbancia por minuto, valor absoluto; **d:** paso de la luz de la cubeta, 1 cm; **Vm:** Volumen de la muestra en mL en la cubeta; **C:** concentración de proteínas totales de la muestra en mg proteínas/mL.

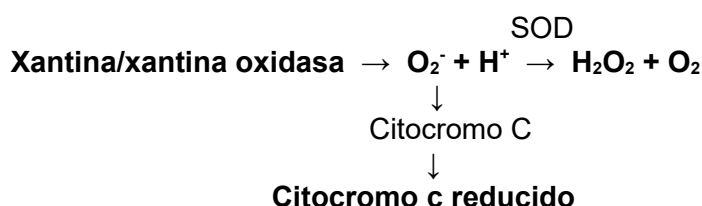
4.7.5. Actividad de la Superóxido Dismutasa.

Fundamento: La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno (O₂) a partir del radical superóxido.



La actividad de la SOD se mide a través del método descrito por (Fridovich, 1985) ligeramente modificado, en el que se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa para generar radicales superóxido (O_2^-).

En este ensayo se usa el citocromo C, que es reducido por el radical superóxido, al mismo tiempo esta reacción es inhibida por la superóxido dismutasa, que compite por los radicales superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Por ello, el grado de inhibición en la reacción de reducción del citocromo C es un indicador de la actividad de la SOD.



Para que la reacción siempre estuviera desplazada hacia la derecha se añadió catalasa, para que esta enzima formara agua al tomar el peróxido de hidrógeno formado por la SOD.

Los reactivos empleados en este método son:

- Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7,8 a 4°C) c/ DTPA.....0,066 M
- Solución xantina (SIGMA).....0,5 mM
- Solución xantina oxidasa (SIGMA).....25 U
- Solución citocromo c (SIGMA).....100 μ M
- Solución de cianuro sódico (NaCN) (PANREAC).....0,5 mM
- Solución de catalasa (SIGMA).....10 U

Procedimiento: En una microcubeta de 1,5mL se añade 490 μ L de TPK, 200 μ L de citocromo C, 200 μ L de xantina 100 μ L de NaCN, 100 μ L de catalasa, 10 μ L de muestra homogenizada de corazón. Para que la reacción de comienzo se ha de añadir 100 μ L de la xantina oxidasa para que se generen las especies de superóxido, por lo que es lo último en añadirse antes de medir a 550 nm en el espectrofotómetro, con lo que se observó un aumento de la absorbancia debido a la reducción del citocromo C.

Para medir la reducción del citocromo c en ausencia de SOD, se realizó una medida de referencia, la cual se preparó al igual que lo anteriormente descrito pero sin muestra, lo que produjo la reducción completa del citocromo C debida a los radicales superóxidos producidos por el sistema xantina/xantina oxidasa.

Se definió la unidad U de SOD como la cantidad de enzima que produce la inhibición de un 50% de la reducción del citocromo C. Cada muestra problema se midió frente a su blanco, que se preparó de la misma forma pero sin que la reacción llegara a producirse, al no añadir al blanco la xantina oxidasa.

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

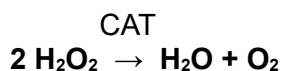
$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(\Delta\text{Abs}_{\text{muestra/minuto}}/\Delta\text{Abs}_{\text{referencia/min}}) \cdot 100]$$

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

ΔAbs : incremento de absorbancia; C : cantidad de proteína presente en la muestra en mg

4.7.6. Actividad de la catalasa.

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



Para la determinación de la actividad de la catalasa se llevó a cabo el método descrito por (Beers y Sizer 1952), por el que se midió espectrofotométricamente la disminución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el medio a 240nm.

Los reactivos empleados en este método son:

- Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7,4 a 4°C).....0,066M
- Solución peróxido de oxígeno (H_2O_2).....1/100 v/v
- Dilución de muestra homogenizada de corazón en agua bidestilada 1/120

Procedimiento: Se añadieron los siguientes elementos en una cubeta de cuarzo macro, 2 mL de Tampón fosfato potásico y 120 μL de la muestra homogenizada de corazón diluida. Antes de medir en el espectrofotómetro, se añadió 480 μL de peróxido de hidrógeno para que empezara la reacción, midiendo así como va desapareciendo el hidróxido de hidrógeno a 240 nm durante 3 minutos.

Cálculos: Para determinar la actividad de la catalasa en la muestra homogenizada de corazón, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{mU/ mg proteína total} = [(\Delta\text{Abs}(\text{min}) \cdot \text{Vf}) / (\epsilon \cdot \text{d} \cdot \text{Vm} \cdot \text{C})] \cdot \text{D}$$

mU/mg proteína: nmol de catalasa por mg de proteína de la muestra; **Vf:** Volumen final en mL en la microcubeta; ϵ : coeficiente de absorción para el H_2O_2 , cuyo valor es $0,0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; **$\Delta\text{Abs}(\text{min})$:** incremento de absorbancia por minuto, valor absoluto; **d:** paso de la luz de la cubeta, 1 cm; **Vm:** Volumen de la muestra en mL en la cubeta; **C:** concentración de proteínas totales de la muestra en mg proteínas/mL; **D:** factor de dilución de la muestra

4.7.7. Peroxidación lipídica.

Fundamento: Para la determinación de la peroxidación lipídica se llevó a cabo el método descrito por (Beers y Sizer, 1952), la cual provoca la reacción entre el malondialdehído (MDA) y el ácido tiobarbitúrico (TBA). Como producto final de la degradación de los lípidos se obtiene el MDA, que puede reaccionar con TBA a unas temperaturas altas y pH bajo. Por cada molécula de MDA hay una adición nucleofílica con dos moléculas de TBA, esto genera un pigmento rojo que se puede medir espectrofotométricamente a 535 nm.

Los reactivos empleados en este método son:

- Solución ácido tricloroacético (TCA).....20% p/v
- Solución ácido tiobarbitúrico (TBA).....0,67% p/v

Procedimiento: En primer lugar, se toman 150 μ L de la muestra homogenizada de corazón y se mezclan en tubo de eppendorf con una cantidad igual de ácido tricloroacético. Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm con una temperatura de 4°C para precipitar las proteínas. Se toma del sobrenadante resultante 150 μ L mezclándose, en un nuevo tubo eppendorf, con 150 μ L de ácido tiobarbitúrico y se deja incubaren al baño María durante 10 minutos a 100°C.

Una vez terminada la incubación, se trasladaron los tubos eppendorf a un recipiente con hielo para bajar la temperatura de los mismos. Posteriormente se midió en el espectrofotómetro frente a un blanco que se procesó de la misma forma a excepción de que contenía la agua bidestilada en lugar de la muestra.

Cálculos: Para la determinación de la concentración de MDA se usó la siguiente fórmula.

$$\text{Abs} = \varepsilon \cdot C \cdot d$$

Abs: Absorbancia de la muestra; **ε :** coeficiente de extinción molar para el MDA a 535 nm = $153 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; **C:** concentración de MDA en la muestra mol/ml; **d:** paso de la luz de la cubeta, 1cm.

4.8. Determinación de homocisteína en suero.

Los niveles de homocisteína se determinaron en suero de ratas mediante un analizador automático discreto multicanal (BAYER RA 1000).

4.9. Determinación de la presión y frecuencia cardíaca.

El día anterior al sacrificio se midió la frecuencia cardíaca de las ratas adolescentes sometidas a BD mediante el método indirecto de oclusión de la cola (Gómez-Amores et al., 2007). Las mediciones se realizaron usando un Medidor de presión 645 NIPREM (CIBERTEC, Barcelona, España). Las señales recogidas se

trataron con un soporte informático a través de un sistema de adquisición de datos acoplado al medidor de presión. Cada medición en cada animal se realizó 3-4 veces sucesivamente con el fin de calcular la media aritmética, que fue el valor utilizado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parámetros nutricionales.

En la tabla 1, se reflejan los datos obtenidos en los parámetros nutricionales y morfológicos medidos durante el experimento. En ellos se puede observar que no hubo cambios significativos en la ingesta de comida sólida ni en el incremento de peso corporal entre los grupos estudiados tras el consumo de alcohol tipo BD. El modelo de suplementación con ácido fólico elegido fue eficaz, mostrando los grupos suplementados una mayor concentración sérica de esta vitamina respecto a los grupos no suplementados.

Grupos de ratas	C: n=6	A: n=6	CF: n=6	AF: n=6
Incremento de peso corporal (g/día)	5.38 ± 0.19	5.03 ± 0.27	5.47 ± 0.20	5.07 ± 0.23
Ingesta sólida (g/día/rata)	13.1 ± 0.79	12.0 ± 0.67	13.4 ± 0.73	12.8 ± 0.56
Ingesta de fólico (g/día)	32.4 ± 2.23	30.3 ± 1.97 ^{fff}	131.3 ± 0.33	122.7 ± 5,28
Ácido fólico en suero (µg/L)	95,45 ± 2,41	102,7 ± 2,12	109,4 ± 4,35	120,1 ± 4,52
IOS corazón	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.01
Proteínas totales en corazón (mg/mL)	38,8 ± 3,1	39,7 ± 2,9	36,0 ± 2,67	38,3 ± 3,1

Tabla 1. parámetros nutricionales. Los resultados son expresados como la media ± SEM de 6 animales en cada grupo n= numero de animales ; C: grupo control; A: grupo alcohol; CF: grupo control fólico; AF: grupo alcohol fólico; IOS: índice organosomático. Significación estadística: AF vs A: ^{fff}p<0,001.

Los datos obtenidos en este caso demuestran que este modelo de consumo de alcohol, en las ratas adolescentes, no afecta la cantidad de alimento ingerido ya que debido a la vía de administración, mediante inyección intraperitoneal, el alcohol no pasa a través del sistema digestivo y por tanto, no altera la mucosa intestinal ni

produce malnutrición, lo que puede ocurrir en modelos experimentales de administración oral (Ojeda et al., 2016).

Con respecto a los parámetros morfológicos del corazón, se determinó el IOS (índice órgano-somático), con el que se pretende corregir las posibles fluctuaciones de los resultados debido al tamaño de las ratas con respecto al del corazón, así como la cantidad de proteínas totales presentes en este órgano. Los resultados del IOS cardíaco no mostraron diferencia significativa entre ellos. Estos datos están en consonancia con los niveles de proteínas cardíacas, los cuales tampoco mostraron cambios significativos tras el consumo de alcohol. En ambos casos, la suplementación no afectó a estos parámetros. Por tanto, en este estudio, el consumo agudo de alcohol no provoca cardiomegalia.

5.2. Actividad enzimática antioxidante en corazón.

En la Figura 7 está representada gráficamente la actividad de las enzimas antioxidantes que actúan a nivel del corazón de las ratas adolescentes expuestas al consumo de alcohol tipo binge drinking y suplementadas, o no, con ácido fólico. Las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GR se encuentran significativamente aumentadas en el grupo A con respecto al grupo C ($p < 0.01$). Sin embargo la actividad de la GPx cardíaca está disminuida en el grupo A con respecto al control ($p < 0.05$). Curiosamente, este aumento en la actividad de enzimas antioxidantes a excepción de la GPx, también se ha encontrado en otros órganos (hígado y riñón) de ratas adolescentes expuestas a este mismo modelo experimental (Nogales et al., 2014; Sobrino et al., 2019). De lo que se concluye que la inyección intraperitoneal de alcohol de forma aguda activa significativamente a las enzimas antioxidantes de diversos tejidos, a excepción de la GPx, mostrando que el alcohol administrado en forma de binge drinking es un potente agente pro-oxidante general, pues en hígado y riñón se ha comprobado que incrementa el daño oxidativo causando mayor oxidación en el ADN, los lípidos y las proteínas (Nogales et al., 2014; Sobrino et al., 2019, Ojeda et al., 2016). Respecto a corazón, en el siguiente apartado (5.4) analizaremos si la estimulación de las enzimas antioxidantes es suficiente para evitar el estrés oxidativo o no.

La disminución de la GPx producida por el BD en el corazón probablemente se debe a una depleción del ácido fólico en este tejido, ya que como se ha mencionado en la introducción, esta vitamina es necesario para sintetizar el GSH, principal cofactor para la actuación de la GPx, mediante el ciclo de la metionina (Zhao et al., 2014). Esto mismo se ha observado con otros antioxidantes como el selenio, el cual está disminuido en distintos tejidos, entre ellos el corazón, de animales expuestos al BD (Ojeda et al., 2015; Ojeda et al., 2017).

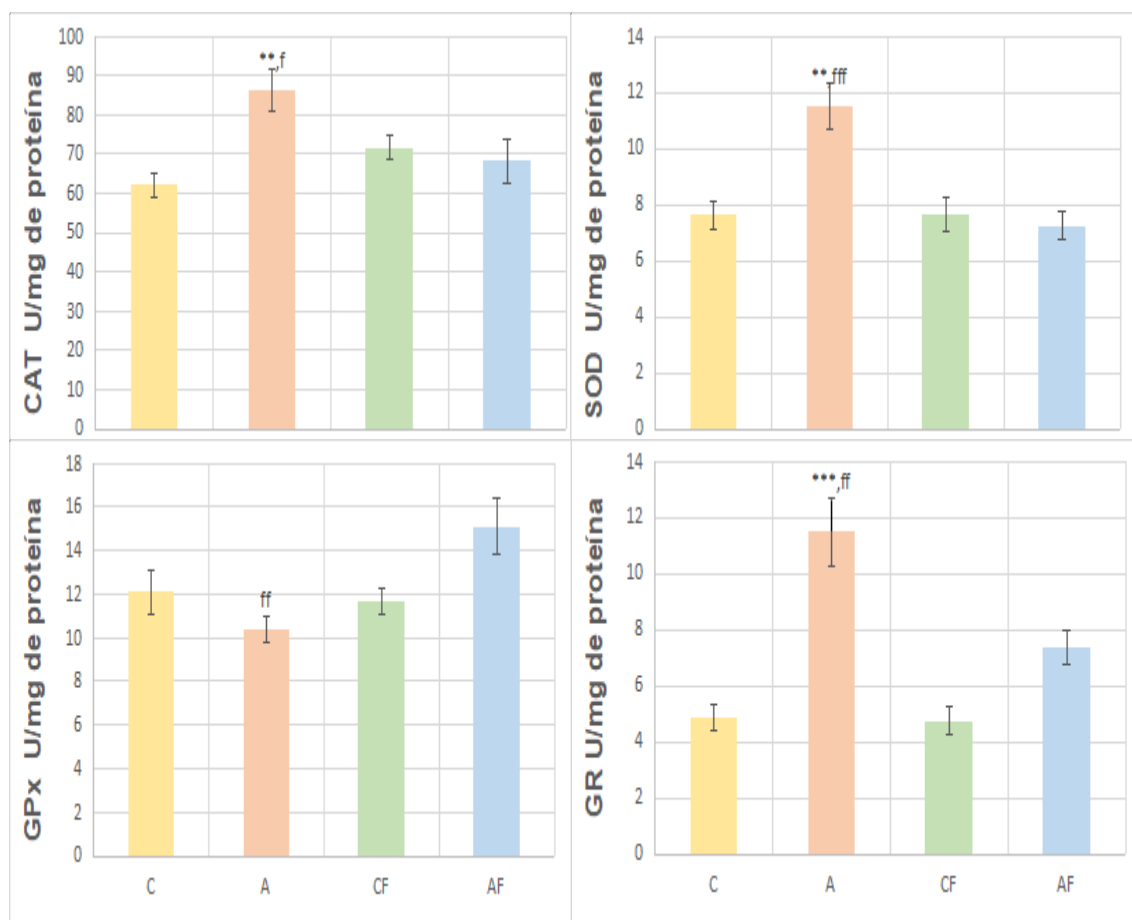


Figura 7. Actividad de las enzimas antioxidantes en corazón: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR). Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; CF, grupo control fólico; AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs. C: ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$; A vs AF: $p < 0.05$; A vs AF $^{\#}p < 0.01$; A vs AF $^{\#\#}p < 0.001$.

La suplementación al grupo A con el antioxidante ácido fólico es especialmente beneficiosa, pues aumenta los niveles de actividad de GPx y restablece los niveles de CAT, SOD y GR, igualándose prácticamente a los niveles del grupo C. Así, la suplementación utilizada parece que es eficaz y que puede evitar la oxidación de las principales biomoléculas cardíacas, aspecto que analizaremos en el apartado 5.4.

Esta acción beneficiosa del ácido fólico sobre el balance oxidativo se debe en parte a la depleción que produce esta vitamina sobre el anión superóxido en los cardiomiocitos, ya que disminuye la actividad de la enzima NADPH oxidasa; y en especial a la mayor actividad de la GPx puesto que la suplementación de ácido fólico utilizada aumenta los niveles del GSH reducido en el corazón, haciendo posible una mayor actuación de esta enzima frente a las EROs generadas por el BD.

Posteriormente, para confirmar la acción beneficiosa de las enzimas antioxidantes en la lucha contra los efectos pro-oxidantes del alcohol, se valoró también el acoplamiento enzimático entre la SOD (la primera enzima en actuar que elimina el anión O_2^- y lo transforma en H_2O_2) y las enzimas CAT y GPx, encargadas ambas de reducir los niveles de H_2O_2 procedente de la SOD. La figura 8 muestra que

las ratios CAT/SOD y GPx/SOD están disminuidas, aunque sólo lo está significativamente la GPx/SOD en el grupo A respecto al grupo C. El declive encontrado en la ratio GPx/SOD en el grupo A, indica un mal acoplamiento de estas enzimas, provocándose muy probablemente un aumento de la especie H_2O_2 en el corazón, que generará oxidación de biomoléculas en los cardiomiocitos (apartado 5.4).

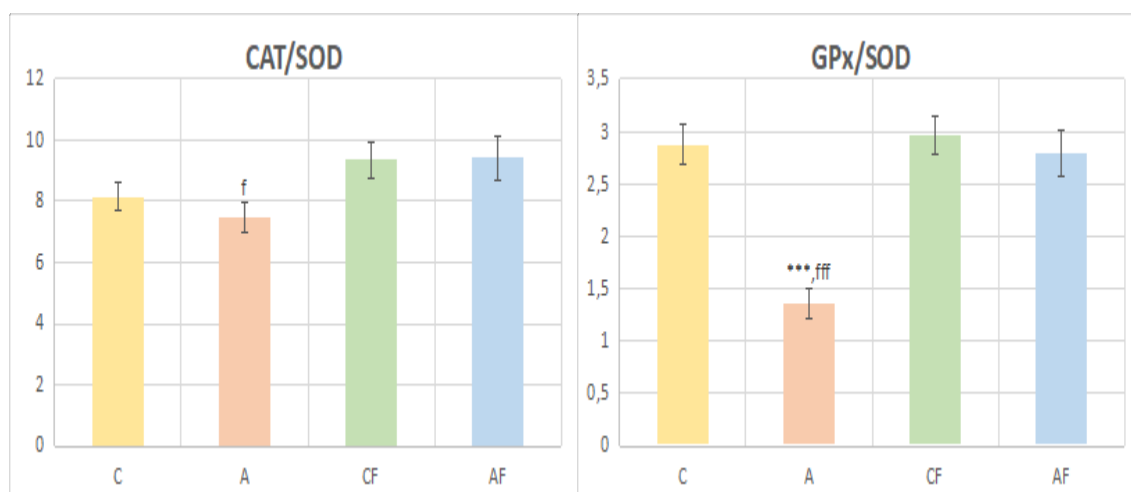


Figura 8. Ratio de la actividad de las enzimas antioxidantes en corazón: CAT/SOD y GPx/SOD. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control, A, grupo alcohol, CF, grupo control fólico, AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs C ^{***}p<0.001; A vs AF ^fp<0,05, ^{fff}p<0.001.

Por otro lado hay que tener en cuenta que la ratio CAT/SOD en el grupo A no está disminuida significativamente porque los niveles de CAT tras la exposición al binge drinking están especialmente elevados en corazón, ya que, como se comentó anteriormente, la CAT además de ser una enzima antioxidante, es una de las enzimas encargadas de metabolizar el alcohol, junto con la ADH y SMOE, y que esta enzima cobra mayor protagonismo en el corazón (Orellana et al., 1998). Por ello, los niveles altos de actividad de CAT se deben más a una sobreexpresión de esta enzima por la presencia de cantidades de alcohol elevadas en el organismo, que a una actuación frente al EO que genera esta droga.

La suplementación con fólico a las ratas expuestas a alcohol, por sus acciones antioxidantes, anteriormente comentadas, evita esta situación, estando acopladas eficazmente la actividad de la SOD con la de GPx y CAT. Por tanto el ácido fólico produce efectos beneficiosos sobre la actividad y acoplamiento de las enzimas antioxidantes.

5.3. Actividad enzimática antioxidante de GPx y GR en suero.

La figura 9 muestra la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR en suero de los cuatro grupos experimentales usados. Se han estudiado estas dos enzimas porque es bien conocida la relación íntima entre ellas, ya que la GR recicla al glutatión oxidado (GSSG) por la GPx a GSH, el cual es necesario para el correcto funcionamiento de la GPx a la hora de transformar el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Das y

Vasudevan, 2005). Pero además, porque se ha observado que la suplementación utilizada incrementa los niveles de fólico en suero y, como ya se ha comentado en la anteriormente, esta vitamina es necesaria para la síntesis del GSH. Así, los niveles de GPx están significativamente disminuidos y los de GR aumentados en el grupo A respecto al C, y la suplementación con fólico restauró esta situación. Estos datos son similares a los observados en el corazón.

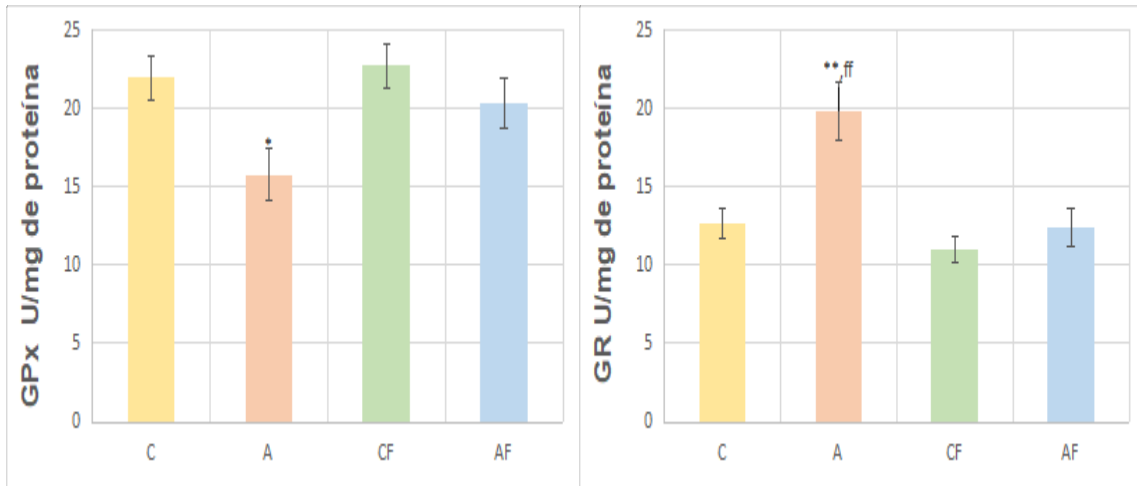


Figura 9. Actividad de las enzimas antioxidantes en suero: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR). Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; CF, grupo control fólico; AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs. C: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; A vs AF $p < 0,01$.

Para analizar el correcto funcionamiento de este par enzimático, se determinó la ratio GPx/GR, observándose una disminución en el grupo alcohol con respecto al resto de los grupos (figura 10). Esta disminución se debe, probablemente, a un agotamiento del GSH reducido en el organismo a pesar de que la enzima GR muestra un aumento en su actividad. En ratas adolescentes sometidas al mismo modelo experimental de alcoholización utilizado en este trabajo, los niveles de GSH hepáticos descienden ya que la ingesta de grandes cantidades de alcohol interactúa con la SAM (S-adenosil-metionina) inhibiéndola (Ojeda et al., 2016). Como consecuencia de esa inhibición, SAM no puede generar GSH de novo a partir de homocisteína, por lo que se produce dos efectos nocivos para el organismo: disminución de GSH, factor defensivo antioxidante, y en segundo lugar, un aumento de los niveles de homocisteína que aumenta el riesgo cardiovascular (Ojeda et al., 2016). El hígado es el órgano principal en la síntesis de GSH a través del ciclo de la metionina y juega un papel principal en la homeostasis de este antioxidante a nivel corporal (Lu SC 2013), por lo que la disminución de GSH hepática producida por el BD puede trasladarse al suero, explicando así la disminución observada en la GPx sérica en el grupo A. En el apartado 5.4 observaremos si este desacoplamiento puede estar relacionado con oxidación sérica lipídica.

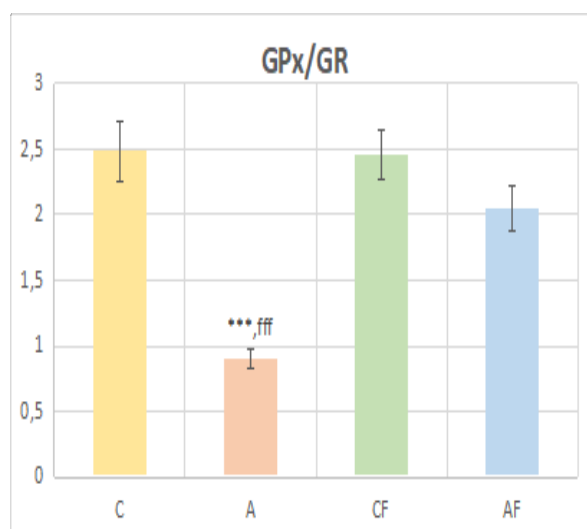


Figura 10. Ratio de la actividad de las enzimas antioxidantes en suero: Gpx/GR. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control, A, grupo alcohol, CF, grupo control fólico, AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs C *** p <0.001; A vs AF fff p <0.001.

La suplementación utilizada restaura la ratio GPx/GR prácticamente a niveles control, de lo que se deduce que la suplementación en la dieta con fólico produce efectos beneficiosos sobre la actividad y el acoplamiento de estas enzimas antioxidantes a nivel sérico, al aumentar los niveles de GSH hepático (Ojeda et al., 2016) y como consecuencia, probablemente los séricos.

5.4. Oxidación y daño molecular.

La oxidación lipídica es uno de los efectos nocivos más destacados en la ingesta de cantidades grandes de alcohol. Para determinar el grado de afección, analizamos los niveles de MDA presentes, observándose un incremento significativo en los grupos expuestos al BD, tanto en corazón como en suero, respecto al C y AF (Figura 11). Todo ello sugiere que en los grupos expuestos a alcohol el EO es mayor y el balance antioxidante enzimático no es funcional.

La oxidación tiene lugar preferentemente en los lípidos, y particularmente en los ácidos grasos polinsaturados, ya que estos son ricos en dobles enlaces que son los más susceptibles al ataque de las EROs. Estos dobles enlaces se abren y oxidan durante estas reacciones e interaccionan con nuevas sustancias formando parte de una reacción en cadena cíclica (Wu y Cederbaum, 2003). Esta oxidación produce MDA, biomolécula que induce daño proteico al reaccionar con las proteínas, con pérdida de su actividad, y además daña a nivel del núcleo porque interacciona con el ADN, modificando las bases nitrogenadas. En este contexto, (Ojeda et al., 2016) encontraron que este modelo de alcohol tipo BD producía oxidación también a nivel del ADN, alterando la estabilidad de esta biomolécula.

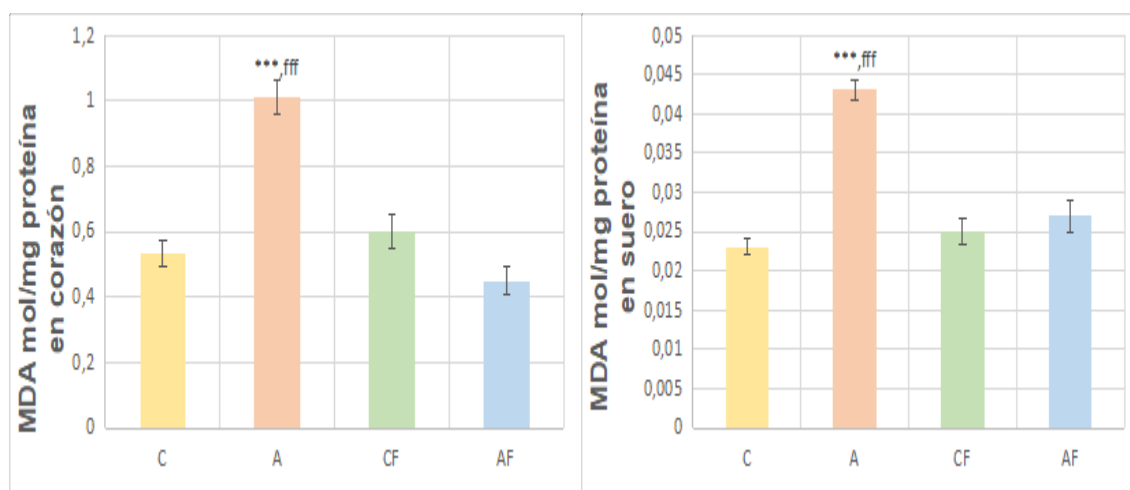


Figura 11. Oxidación lipídica en corazón y suero, relacionada con el malondialdehído (MDA). Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; CF, grupo control fólico; AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs. C: *** $p < 0.001$; A vs AF ^{fff} $p < 0.001$.

Analizando la figura 11 podemos contrastar que en los grupos AF de corazón y suero, disminuye la peroxidación lipídica frente a los grupos A, lo que nos lleva a sugerir que la suplementación con ácido fólico utilizada restaura los sistemas enzimáticos antioxidantes y establece un equilibrio entre el EO producido por la ingesta de alcohol y la detoxificación de las EROs generadas, declarando el beneficio de esta vitamina como agente defensivo antioxidante. El efecto protector del ácido fólico frente a la oxidación lipídica también ha sido descrito en algunos trabajos previos tanto in vitro como in vivo (Higashi-Okai et al., 2006; Cano et al., 2001). En estos estudios se sugiere que esta vitamina actúa como "scavenger" de las EROs.

5.5. Evaluación de daño cardiovascular.

Finalmente, con el objetivo de analizar si el consumo agudo de alcohol y el estrés oxidativo generado por éste a nivel cardiovascular en las ratas adolescentes, tiene transcendencia funcional, se analizaron los niveles de homocisteína en suero así como la frecuencia cardíaca.

Con respecto a los niveles séricos de homocisteína, la cual ha sido altamente relacionada con la enfermedad cardiovascular, se observó un incremento significativo en el grupo A frente al grupo C y al grupo suplementado (Figura 12). El EO provocado por el consumo de alcohol probablemente disminuye los niveles de fólico a nivel hepático, al consumirlo para generar GSH, lo que conlleva a un aumento de los niveles de homocisteína en plasma. La homocisteína, bien por autooxidación propia o bien por acción directa, causa aterosclerosis y trombosis, disminuye los niveles de NO y reduce la vasodilatación endotelial, lo que conlleva a la aparición de espasmos arteriales (Stein y McBride, 1998; Moens A. et al, 2008). Por todo lo anteriormente expuesto, se demuestra por primera vez que el consumo de alcohol tipo BD, en ratas adolescentes, aumenta los niveles de homocisteína en suero y por tanto, aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular.

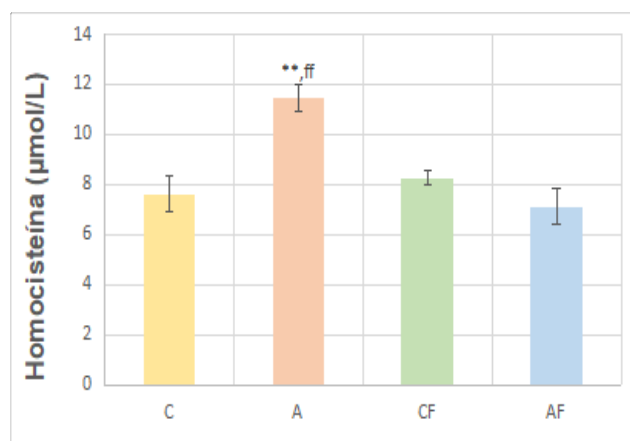


Figura 12. Representación de los niveles plasmáticos de homocisteína. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; CF, grupo control fólico; AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs. C: ** $p < 0.01$; A vs AF ^{ff} $p < 0.01$.

(Piano et al., 2017) detalla los efectos adversos del consumo excesivo de alcohol en el riesgo y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en humanos. Estos autores sugieren que el consumo de alcohol tipo BD se asocia con un mayor riesgo de presión arterial, hipertensión, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular en adultos de mediana edad y mayores. Además, ellos concluyen que el consumo excesivo de alcohol también puede tener efectos cardiovasculares adversos en adultos jóvenes (de 18 a 30 años). Los mecanismos por los que se producen estas alteraciones continúan sin esclarecer, aunque la evidencia disponible sugiere que el consumo excesivo de alcohol puede inducir EO y lesiones vasculares además de ser proaterogénico. Sin embargo, hasta la fecha, no existía bibliografía que determine los niveles de homocisteína tras el binge drinking.

Como se puede apreciar en la figura 10, los niveles de homocisteína en el grupo AF disminuyen, alcanzándose valores próximos al grupo control. De nuevo, la suplementación con ácido fólico es una terapia efectiva frente al daño cardiovascular. Es bien conocido que el ácido fólico disminuye los niveles de homocisteína a través del ciclo de la metionina. Uno de los mecanismos propuestos es mediante la regeneración de GSH a través de la transufuración de la homocisteína (Davis and Uthus, 2003). Resultados similares se han observado en ratas expuestas al alcohol pero de manera crónica (Barrero et al., 2012).

De la misma manera, se ha estudiado la frecuencia cardíaca de las ratas adolescentes sometidas a BD con el fin de determinar si existía daño en el corazón (Figura 13). Se puede observar que la frecuencia cardíaca en el grupo A presenta un aumento muy significativo con respecto al grupo C. Sin embargo, la suplementación con ácido fólico utilizada restaura este parámetro hasta valores controles, por lo que se puede sugerir que la suplementación utilizada contribuye a mejorar la funcionalidad cardíaca afectada tras el BD.

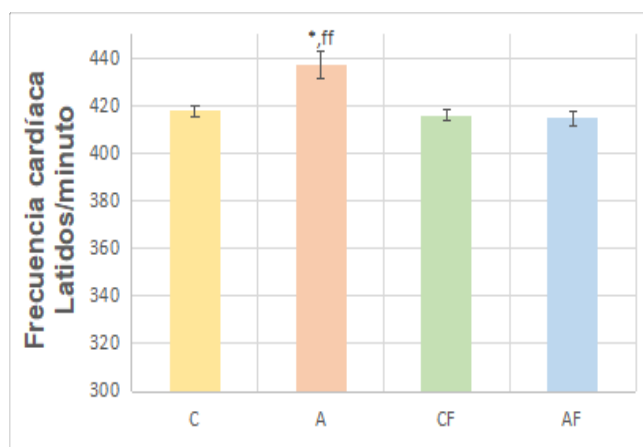


Figura 13. Frecuencia cardíaca. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; CF, grupo control fólico; AF, grupo alcohol fólico. Significancia estadística: A vs. C: * $p < 0.05$; A vs AF ^{ff} $p < 0.01$.

Estudios diversos han mostrado que existe una asociación entre el consumo de alcohol y el aumento de la frecuencia cardíaca, incluso tras el BD y que estos bebedores presentan un mayor riesgo cardiovascular (Ryu et al., 2014; Sengul et al., 2011; Rossinen et al., 1999). Se ha demostrado que el alcohol, consumido de forma aguda, provoca debilidad en la contracción del corazón (Danziger et al., 2014; Guarnieri y Lakatta, 1990) y disminuye el volumen sistólico, provocando irregularidades en la frecuencia cardíaca que podría producir arritmias como mecanismo compensatorio. Las aurículas se ven forzadas a bruscos espasmos descoordinados con los ventrículos, lo que se conoce como fibrilación auricular, pudiendo llegar (en casos más graves) a producir una muerte súbita cardíaca. Una de las causas principales pueden ser las alteraciones en la repolarización miocárdica y en la prolongación de la duración del potencial de acción, provocado por disminución de los niveles de potasio que son de gran importancia (Zhang et al., 2017).

La suplementación con ácido fólico disminuye la frecuencia cardíaca mejorando el funcionamiento del corazón. Como se ha podido determinar, la suplementación utilizada restablece la actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes alterados frente al EO sufrido por el BD, y disminuye la oxidación lipídica en el corazón, por lo que evita las alteraciones cardíacas producidas por este consumo de alcohol en las ratas adolescentes. Además, disminuye los niveles de homocisteína, mejora la actividad del par enzimático GPx/GR y aumenta los niveles de fólico en suero. Todo ello repercute en una mejor protección frente al EO y por tanto, una menor oxidación de los lípidos y demás biomoléculas, demostrando que la suplementación con ácido fólico es una terapia eficiente frente al daño y la enfermedad cardiovascular.

6. Conclusiones.

El consumo de alcohol tipo binge drinking no afecta a la cantidad de alimento ni el ácido fólico ingeridos por las ratas adolescentes así como a sus parámetros morfológicos, ya que debido a la vía de administración, mediante inyección intraperitoneal, el alcohol no pasa a través del sistema digestivo y por tanto, no altera la mucosa intestinal ni produce malnutrición. La suplementación con ácido fólico utilizada incrementó significativamente la ingesta de esta vitamina y aumentó su concentración en el suero de las ratas suplementadas.

Los efectos del consumo de alcohol tipo binge drinking destacan por alterar la actividad de las enzimas antioxidantes cardíacas, pero sobre todo por disminuir la actividad de la GPx, ya que probablemente produce una disminución de ácido fólico en el corazón y por consiguiente, de GSH, el principal cofactor de esta enzima. Sin embargo, la suplementación en la dieta con fólico restaura la actividad de esta enzima al aumentar el GSH en corazón.

En el suero de las ratas expuestas al binge drinking, la actividad de la enzima GPx disminuye, probablemente debido a un agotamiento del GSH, como sucede en el corazón, a pesar de que la enzima GR presenta una alta actividad para regenerarlo. La suplementación utilizada aumenta la actividad de la enzima GPx tras el binge drinking debido a la elevada concentración de fólico en suero.

El consumo de alcohol tipo binge drinking durante la adolescencia produce daño oxidativo a nivel cardiovascular y afecta a la funcionalidad del corazón ya que incrementa los niveles de homocisteína en suero así como la frecuencia cardíaca. La suplementación utilizada restauraba ambos parámetros.

La suplementación con esta vitamina es eficaz para mejorar la actividad de la GPx en corazón y suero y hacer frente al desbalance oxidativo producido por el alcohol, mejorando la funcionalidad cardíaca y el daño cardiovascular.

7. Bibliografía.

- Abilés JS. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico [en línea]. HeraUgrEs: 2007 [consultado en mayo 2019]. Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/16710794.pdf>
- Barrero MJ, Ojeda ML, Díaz-Castro J, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. The action of folic acid upon aldosterone clearance: a possible hypotensor in alcoholic rats. *Life Sci.* 2012; 90: 337-42.
- Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195(1): 133-40.
- Cano MJ, Ayala A, Murillo ML, Carreras O. Prospective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free Radic Res* 2001;34(1):1-8.
- Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Roper P. Long-term modulations in the vertebral transcriptome of adolescent-stage rats exposed to binge alcohol. *Alcohol Alcohol.* 2010; 45:332-46.
- Carreras MP, Castellano G. Hígado y alcohol. *Problemas Comunes en la Práctica Clínica - Gastroenterología y Hepatología.* 2012; 799-814.
- Cascales M, Robles-Chillida EM, Cascales C, Santos-Ruiz MA. Intoxicación etílica y estrés oxidativo. *Real Acad Nac Farm.* 1997; 4: 267-86.
- Corrales LC., Nova M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. 2012; 10: 135-250.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol induced effects on kidney. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23(1):4-9.
- Davis, C. D., & Uthus, E. O. . Dietary Folate and Selenium Affect Dimethylhydrazine-Induced Aberrant Crypt Formation, Global DNA Methylation and One-Carbon Metabolism in Rats. *The Journal of Nutrition.* 2003; 133(9), 2907–2914.
- Djuric, D., Jakovljevic, V., Zivkovic, V., & Srejavic, I.. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2018; 96(10), 991–1003.
- Eisenga B, Collins T, McMartin K. Effects of Acute Ethanol on Urinary Excretion of 5-Methyltetrahydrofolic Acid and Folate Derivatives in the Rat. *The journal of nutrition.* 1989; 119: 1498-1505.
- Fowler B. The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int.* 2001; 59 (79): 221-229.
- Fridovich I. Cytochrome C. In: Greenwald RA, ed. *Handbookk of methods for oxygen radical research.* Boca Ratos, FL: CRC Press 1985; 213-5.

- Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jimenez L, Jos A, Camean AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007; 18:533-40.
- Guarnieri T, Lakatta EG. Mechanism of myocardial contractile depression by clinical concentrations of ethanol: A study in ferret papillary muscles. *J Clin Invest*. 1990; 85(5):1462-1467.
- Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Mondragón-Terán P, Ramírez García S, Núñez-Ramos NR. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Med Interna Mex*. 2014; 30(3):295-308.
- Higashi-okai, K., Nagino, H., Yamada, K., & Okai, Y. . Antioxidant and Prooxidant Activities of B Group Vitamins in Lipid Peroxidation. *Journal of UOEH*. 2006; 28(4), 359-368.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71(4):952-8.
- Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003; 27:220-31.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.
- Lu, S. C. . Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013; 1830(5), 3143-3153.
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - Portal Plan Nacional sobre Drogas - Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (n.d.). Retrieved Marzo 14, 2019, from: <http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>
- Moens A, Takimoto E, Tocchetti C, Chakir K, Bedja D. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. 2008; 117: 2626-36.
- Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M. The Effects of Folic Acid Administration on Cardiac Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers in Diabetic Rats. 2019; 2019: 1-14.
- Nogales F, Rua RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem. Res. Toxicol*. 2014; 27:1926-1933.
- Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007; 41(1): 111-9.

- Orellana M, Valdés E, Fernández J, Rodrigo R. Effects of chronic ethanol consumption on extramitochondrial fatty acid oxidation and ethanol metabolism by rat kidney. *Gen. Pharmac.* 1998; 30 (5): 719-723.
- Ojeda ML, Rúa RM, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Binge drinking during adolescence disrupts se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015; 39: 818–826.
- Ojeda ML, Rúa RM, Nogales F, Díaz-Castro J, Murillo ML, Carreras O. The benefits of administering folic acid in order to combat the oxidative damage caused by binge drinking in adolescent rats. *Alcohol Alcohol.* 2016; 51 (3): 235-41.
- Ojeda ML, Carreras O, Sobrino P, Murillo ML, Nogales F. Biological implications of selenium in adolescent rat exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2017; 329: 165-172.
- Piano MR, Mazzuco A, Kang M, Phillips SA. Cardiovascular consequences of binge drinking: an integrative review with implications for advocacy, policy, and research. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017; 487-496.
- Ren J, Wold LE. Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008; 2(6): 497-506.
- Romano, P. S., Waitzman, N. J., Scheffler, R. M., & Pi, R. D. (n.d.). *Folic Acid Fortification of Grain: An Economic Analysis.* 1995; 85: 5.
- Ros, G. Folatos: del alimento a la funcionalidad y la salud óptima [en línea]. V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética, 1999. [Consultado en mayo 2019]. Disponible en : https://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Ros.pdf
- Rossinen, J., Sinisalo, J., Nieminen, M. S., Vittasalo, M., & Partanen, J.. Effects of acute alcohol infusion on duration and dispersion of QT interval in male patients with coronary artery disease and in healthy controls. *Clinical Cardiology.* 1999; 22(9), 591–594.
- Rupp H, Brilla CG, Maisch B. Hypertension and alcohol: central and peripheral mechanisms. *Herz.* 1996; 21: 258-264.
- Ryu, M., Gombojav, B., Nam, C. M., Lee, Y., & Han, K. . Modifying effects of resting heart rate on the association of binge drinking with all-cause and cardiovascular mortality in older Korean men: the Kangwha Cohort Study. *Journal of Epidemiology.* 2014 24(4), 274–280.
- Sarna LK, Wu N, Wang P, et al. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90:155–65.

- Sengul C, Cevik C, Ozveren O, Sunbul A, Oduncu V, Akgun T, et al. Acute alcohol consumption is associated with increased interatrial electromechanical delay in healthy men. *Cardiol J*. 2011;18:682–6.
- Sobrino, P., Ojeda, M. L., Nogales, F., Murillo, M. L., & Carreras, O.. Binge drinking affects kidney function, osmotic balance, aldosterone levels, and arterial pressure in adolescent rats: the potential hypotensive effect of selenium mediated by improvements in oxidative balance. *Hypertension Research*. 2019 1–12.
- Stein J, McBride P. Hyperhomocysteinemia and Atherosclerotic Vascular Disease. 1998; 158: 1301.
- Varela G, Alonso E. *Ácido Fólico y salud*. Madrid: Fundación Española de Nutrición; 1999;17(2):1–38.
- 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.
- Villanueva JA, Devlin AM, Halsted CH. Reduced folate carrier: tissue distribution and effects of chronic ethanol intake in the micropig. *Alcohol CLin Exp*. 2001; 25: 415-420.
- Welch G, Loscalzo J. Homocysteine and Atherothrombosis. 1998; 338:1042-1050.
- 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, Cederbaum A, Lu Y. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury.2009; 83: 519-548.
- Zhang Q, Chen L, Guo K, Zheng L, Liu B, Yu W, Guo C, Liu Z, Chen Y, Tang Z. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and oxidative capacity in mice. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 154: 255-261.
- Zhang Z, Li S, Jiang H, Liu B, Lv Z, Guo C, Zhang H. Effects of selenium on apoptosis and abnormal amino acid metabolism induced by excess fatty acid in isolated rat hepatocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017; 61(9).
- Zhao M, Chen YH, Chen X, et al. Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice. *Toxicol Letters*.2014; 224:201– 8.