

# **BOTELLÓN: CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL EN ADOLESCENTES, EFECTO HEPATOTÓXICO Y DIETA ANTIOXIDANTE**



**David Sánchez Ramos**



**Universidad de Sevilla**



**Facultad de Farmacia**





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Farmacia**

**Trabajo Fin de Grado**

**Grado en Farmacia**

**BOTELLÓN: CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL EN  
ADOLESCENTES, EFECTO HEPATOTÓXICO Y DIETA  
ANTIOXIDANTE**

**David Sánchez Ramos**

Sevilla, 3 de Julio de 2017

Departamento de Fisiología

Dra. Fátima Nogales Bueno

**Trabajo experimental**

*Agradecimiento al **Grupo de Investigación Ácido Fólico y Alcohol** (Dpto. de Fisiología, Universidad de Sevilla), por sostener los costes derivados de este trabajo experimental, así como a las investigadoras y doctorandas del Grupo, por la ayuda, orientación y cariño recibido a lo largo de estos 4 años como alumno interno.*

## **RESUMEN**

Cada fin de semana, una gran cantidad de adolescentes salen a la calle a divertirse con sus amigos, aprovechando esos días de descanso lectivo. Esta diversión se centra -en gran cantidad de los casos- en consumir grandes cantidades de alcohol en unas horas, hasta alcanzar aquella sensación general de bienestar y euforia que llamamos *estar borracho*.

El botellón entre los adolescentes, pese existir normativas y leyes que impidan el acceso de éstos a las bebidas alcohólicas, es una realidad. También lo son las agresiones que nuestro organismo, especialmente el hígado, sufre a causa del alcohol, como el estrés oxidativo. Es por ello, que existe una necesidad de tomar medidas al respecto.

En este trabajo se propone luchar contra el efecto oxidante que causa esta droga a través del aporte de una dieta rica en sustancias antioxidantes como son el Selenio y el ácido fólico.

Para conocer la implicación de estos antioxidantes, se llevó a cabo la alcoholización tipo botellón de varios grupos de ratas, algunos con dieta basal, y otros con dieta rica en selenio o ácido fólico, con el objetivo de visualizar las diferencias en la actividad del sistema endógeno antioxidante y la oxidación de los lípidos del hígado.

Para valorar la importancia de los resultados, se consideró imprescindible analizar el perfil de un grupo de estudiantes de secundaria respecto a su implicación en el botellón, y la importancia que tiene en su dieta los alimentos ricos en estos antioxidantes.

## **PALABRAS CLAVES**

Botellón, ácido fólico, selenio, estrés oxidativo, dieta antioxidante.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>1. BOTELLÓN EN LA ADOLESCENCIA: GENERALIDADES DEL PATRÓN DE CONSUMO.</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TOXICIDAD DEL ALCOHOL: EFECTO OXIDANTE.</b> .....	<b>3</b>
2.1. Sistemas oxidativos de metabolización del alcohol. ....	3
<b>3. EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y LA IMPORTANCIA DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LA DIETA.</b> .....	<b>4</b>
3.1. El sistema antioxidante, protector del organismo. ....	4
3.2. Sustancias antioxidantes en la dieta. ....	5
3.3. Selenio:.....	7
3.4. Ácido fólico:.....	8
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	<b>11</b>
<b>1. ENCUESTAS REALIZADAS A ESTUDIANTES.</b> .....	<b>11</b>
1.1. Procedimiento. ....	11
1.2. Muestra. ....	12
<b>2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DE LOS GRUPOS DE ANIMALES.</b> .....	<b>12</b>
2.1. Animales y condiciones experimentales. ....	13
2.2. Dieta utilizada.....	13
2.3. Métodos de alcoholización. ....	14
2.4. Estudio macroscópico. ....	14
<b>3. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE RATAS.</b> .....	<b>14</b>
<b>4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.</b> .....	<b>15</b>
4.1. Determinación de la concentración total de proteínas. ....	15
4.2. Determinación de la concentración en suero de ácido fólico y selenio. ....	15
4.3. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx).....	15
4.4. Determinación de la actividad de Superoxidodismutasa (SOD). ....	16
4.5. Determinación de la actividad de la Catalasa (CAT).....	16
4.6. Determinación de la oxidación lipídica (MDA).....	16
<b>5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</b> .....	<b>17</b>

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>1. ENCUESTAS SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL A ESTUDIANTES DE SECUNDARIA.....</b>	<b>18</b>
<b>2. HÁBITOS ALIMENTARIOS DE LOS ESTUDIANTES ENCUESTADOS: ALIMENTOS RICOS EN     ÁCIDO FÓLICO (FOLATOS) Y SELENIO. ....</b>	<b>21</b>
2.1. Consumo de alimentos ricos en fólico (Folatos). ....	21
2.2. Consumo de alimentos ricos en Selenio. ....	23
<b>3. ACTIVIDAD DE ENZIMAS IMPLICADAS EN EL SISTEMA ENDÓGENO ANTIOXIDANTE...24</b>	
3.1. Parámetros nutricionales. ....	24
3.2. Superoxido dismutasa (SOD).....	25
3.3. Catalasa. ....	26
3.4. Determinación de la actividad de Glutationperoxidasa (GPx). ....	27
3.5. Cuantificación del daño oxidativo producido en el hígado: Peroxidación lipídica..	28
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>33</b>

# I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA

## 1. BOTELLÓN EN LA ADOLESCENCIA: GENERALIDADES DEL PATRÓN DE CONSUMO.

Se considera **Botellón o Binge Drinking** a un patrón de consumo de grandes cantidades de alcohol concentrado en un corto periodo de tiempo (OMS, 2008). Concretamente, se trata de un consumo de 5 o más consumiciones en una única ocasión (Anderson y Baumberg, 2006).

El alcohol ha sido considerado por la Organización mundial de la salud como una de las drogas más peligrosas para la salud física, psíquica y social de las personas, por encima de sustancias tales como la cocaína o los derivados del cannabis. Ésta consideración de peligrosidad radica en su toxicidad, la cual está asociada a sus características farmacológicas, a las alteraciones sensoriales y motoras derivadas de su ingesta excesiva y a la enorme actividad adictiva que tiene (Pons, Berjano, 1999).

Según apunta Gutiérrez et al. (2012), en un artículo llamado “perfil de los jóvenes que practican botellón”, los inicios del botellón en España pueden situarse en la década de los ochenta cuando tiene lugar la *cultura de la litrona*, reuniéndose pequeños grupos de jóvenes en lugares públicos, como parques, para consumir alcohol.

Este modelo de consumo les permitiría ingerir alcohol en gran cantidad a bajo precio, respecto al consumo en el bar, y suponía un ritual de reunión ante diversos acontecimientos como por ejemplo conciertos. Es a partir de 1996 cuando el fenómeno pasa a cobrar resonancia y a generar preocupación en los medios de comunicación (Gutiérrez et al., 2012).

Las edades promedio de inicio en el botellón pueden situarse entre los **14.1-15.5 años** (Cortes et al., 2007).

Hay variedad de estudios en España sobre la participación de estos jóvenes en el botellón, basados en encuestas a los asistentes. El problema de estos estudios es la cuestionable representatividad de las muestras entrevistadas, ya que la asistencia a botellones está condicionada por determinados factores no tenidos en cuenta como exámenes o actividades de ocio, como por ejemplo la asistencia a conciertos. Tampoco se ha seguido un criterio objetivo y razonado sobre el número de entrevistadas o el intervalo temporal en el que se



analiza esta conducta. Por ello, los resultados obtenidos en estos estudios no son comparables con otros, y ofrecen una imagen distorsionada del botellón (Cortés et al., 2007)

Centrándonos en la **comunidad autónoma de Andalucía**, los datos oficiales más recientes indican que el **39% de la población joven (12-29 años)** refiere haber acudido al menos una vez en los últimos seis meses a un botellón. Los jóvenes con edades comprendidas entre los 16-20 años y los 21-24 años son los que más realizan botellón (Junta de Andalucía, 2015).

En cuanto al tipo de bebida que se consume parece ser diferente en función de la localidad analizada: en Extremadura suelen consumirse principalmente combinados de Whisky, Ginebra o Ron (84%) respecto a bebidas de menor graduación como cerveza (4%) (Baigorri et al., 2001, 2002), mientras que los madrileños ingieren en mayor porcentaje bebidas fermentadas (Navarrete, 2004).

Se estima que los jóvenes (15-16 años) del sur de Europa, entre ellos España, consumen un equivalente de al menos 40 gramos de alcohol en una sola ocasión (Anderson y Baumberg, 2006). Otros estudios han indicado que como promedio se consume durante el botellón unas 5,3 copas, solo apreciándose diferencias en función del sexo: la media de varones es 6,46 copas y la de mujeres 4,86 copas (Cortés et al., 2007), lo que correspondería a una media de 101,4 cc de alcohol (Junta de Andalucía, 2015).

Respecto a la frecuencia con la que se realiza el botellón, predomina claramente el fin de semana (Baigorri et al., 2001), siendo más frecuente en los meses de diciembre, marzo y abril así como durante el verano (Junio-Septiembre) (Cortés et al., 2007).

Teniendo en cuenta la situación laboral de los participantes en los botellones, el 76% no trabaja. Es por ello que el botellón puede ser una opción atractiva ya que en términos relativos **el botellón sale barato**. Según un grupo de jóvenes encuestados, un 47% gasta menos de 5 € en el botellón, lo cual se podría comparar con que el precio medio de una copa en la ciudad de Huelva es de 5€ (Marín et al., 2012). Beber en la calle resulta una opción muy económica.

El botellón es un tema actual y polémico que no solo constituye un problema de limpieza o ruido para los municipios, así como un grave perjuicio para la salud de los jóvenes a medio o largo plazo -especialmente en los adolescentes, quienes se encuentran en una importante etapa de desarrollo-. El problema va más allá, **el botellón puede causar la muerte**: la noche del **31 de Octubre de 2016 una joven de 12 años entró en coma etílico** tras participar en un botellón en el municipio de San Martín de la Vega (Madrid), muriendo horas más tarde (Álvarez, 2016).

Éste fue un suceso muy mediático en España, pero no es el único, ya que se estima que **al menos 5.000 menores fueron atendidos por intoxicación etílica en el año 2015** por los servicios de Urgencias españoles (Cebeiro y Rodríguez, 2016).

## **2. TOXICIDAD DEL ALCOHOL: EFECTO OXIDANTE.**

El hígado es el órgano donde principalmente se metaboliza el alcohol, por lo que puede verse afectado por el consumo continuado, así como por el consumo agudo de esta droga (Nogales et al., 2014), pudiendo desarrollarse hepatitis alcohólica (afección tóxica de las células hepáticas), esteatosis hepática (acúmulo de grasa en las células hepáticas) y cirrosis hepática (alteración estructural del hígado que resulta irreversible). Se calcula que en más de la mitad de las muertes por cirrosis hepática, interviene el alcohol como factor desencadenante de la enfermedad, aunque no todos los consumidores abusivos de alcohol acaben padeciendo necesariamente este síndrome (Pon y Berjano, 1999).

### **2.1. Sistemas oxidativos de metabolización del alcohol.**

El alcohol en el organismo puede ser metabolizado por otros órganos, pero la mayor parte de este metabolismo se hace en el **hígado**, fundamentalmente por medio de **tres sistemas oxidativos** (Petersen et al., 1983).

- A. El Sistema Microsomal de Oxidación del Alcohol (SMOE):** contiene un grupo de enzimas conocidas como **citocromo P450** y su componente particular, denominado **CYP2E1**, que es inducido por el consumo crónico y agudo de alcohol (Lieber y DeCarli, 1968).

Algunos autores señalan que parece existir una correlación entre el grado de inducción de la **isoforma CYP2E1** y la producción de radicales libres como el **anión superóxido ( $O_2^-$ )** y el **peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )** (Dey y Cederbaum, 2006).

La elevada eficiencia en reducir el  $O_2$  a estos radicales lleva a que éste sea considerado **uno de los factores clave que favorecen el estrés oxidativo** producido por el consumo de alcohol (Lu y Cederbaum, 2008).

- B.** La enzima **Alcohol Deshidrogenasa (ADH)**, es la vía mayoritaria (Petersen et al., 1983). Esta enzima produce acetaldehído que también es un sustrato agresivo en su forma de reaccionar, ya que puede reaccionar con el GSH (glutati6n reducido) disminuyendo su concentraci6n. El acetaldehido se puede metabolizar, adem6s de por la aldehído deshidrogenasa, por una aldehído oxidasa de localizaci6n hep6tica, que libera **radicales  $O_2^-$**  en su acci6n catal6tica (Halliwell y Gutteridge, 1989).
- C.** La enzima **Catalasa**, cuya presencia en el organismo humano, especialmente en h6gado, podr6a parecer que desempeña una funci6n activa en el metabolismo del etanol. Se ubica en los peroxisomas celulares, y utiliza el  $H_2O_2$  generado en las reacciones catalizadas por enzimas unidas al metabolismo del acetaldehido. Adem6s, en presencia de este per6xido de hidrogeno, cataliza la oxidaci6n del etanol a acetaldehído (Sanchis et al., 1999).

Como se ha indicado, el consumo de altas dosis de alcohol produce la inducci6n del citocromo P450, de manera que durante el botell6n los sistemas anteriores presentan una alta actividad metab6lica, y como consecuencia se incrementa la ratio NADH/NAD<sup>+</sup> y aparecen radicales libres ocasionando efectos metab6licos como estr6s oxidativo (Lieber, 1997).

### **3. EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y LA IMPORTANCIA DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LA DIETA.**

#### **3.1. El sistema antioxidante, protector del organismo.**

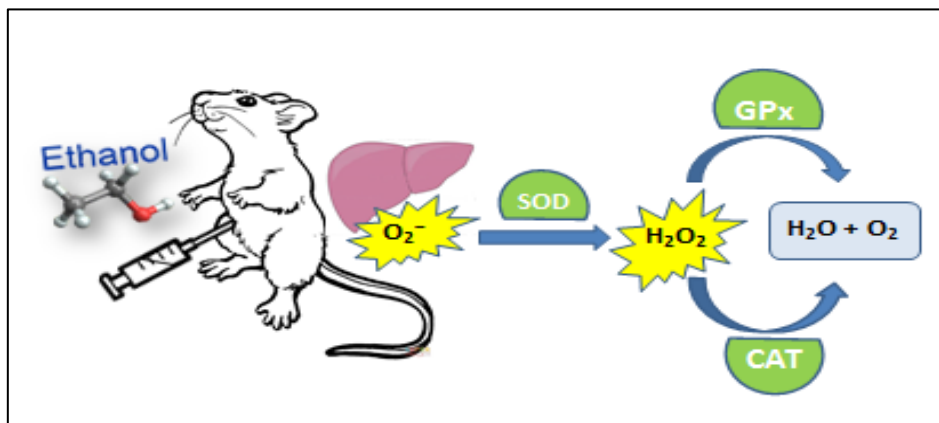
El exceso de radicales libres en el organismo se contrarresta por los sistemas de defensa antioxidante end6genos y ex6genos, evitando la situaci6n que se denomina como estr6s oxidativo (Vannucchi y cols., 1998).

- Entre los sistemas **antioxidantes end6genos** m6s importantes destacan el glutati6n (GSH) y el sistema enzim6tico formado por las cuatro enzimas antioxidantes: glutati6n

peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Peng et al., 2005).

El glutatión (**GSH**), es un tripeptido con un importante papel en la defensa de las células frente al estrés oxidativo, ya que es cofactor de varias enzimas -como la GPx-, y a que lleva a cabo otras funciones como el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, así como promover la eliminación del radical hidroxilo y del oxígeno singlete (Valko et al., 2007). Con este tripeptido está relacionado la **GR**, que se encuentra principalmente en el hígado, y es un regulador del ciclo metabólico del glutatión, ya que es el responsable de mantenerlo en su forma reducida (GSH) (Vasconcelos et al., 2007)

La **SOD** cataliza la **dismutación del anión  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$** , y la **GPx** junto a la **Catalasa** promueven la **reducción de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno**, como se muestra en la **Figura 1**.



**Figura 1. Producción de radicales libres de oxígeno a partir del etanol en las ratas y su detoxificación por enzimas antioxidantes.**

- Dentro de las **Defensas antioxidantes no enzimática** se encuentran algunas como la vitamina E, la vitamina C, el Selenio (Se) o el ácido fólico (AF), los cuales son ingeridos en la dieta.

### **3.2. Sustancias antioxidantes en la dieta.**

Éste trabajo se centra en la capacidad antioxidante -lo que anteriormente se ha denominado como Defensa antioxidante no enzimática- del ácido fólico y el Selenio.

Las cantidades diarias recomendadas (**CDR**) a **consumir de ácido fólico para un adulto es de 200  $\mu$ g** (Manual práctico de nutrición y dietoterapia, 2009), mientras que la **CDR de selenio solo es de 55  $\mu$ g** (Noss y Rady, 2008)

Los alimentos ricos en AF de forma natural son fundamentalmente hortalizas con hojas de color verde oscuro (como espinacas y el brócoli), las legumbres (como las judías pintas, las judías arriñonadas y los guisantes), el hígado y algunas frutas (especialmente los cítricos y los zumos).

Por otro lado, los alimentos ricos en Se son mariscos, carne roja, granos integrales, frutas y hortalizas (dependiendo de la composición de los suelos) (Noss y Rady, 2008).

En la **tabla 1** se muestran alimentos con elevada composición en Se y/o AF.

<b>Alimento</b>	<b>Acido fólico (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math> porción comestible)</b>	<b>Selenio (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math> porción comestible)</b>
<b>Garbanzos</b>	180	2
<b>Lentejas</b>	35	9,9
<b>Espinaca</b>	140	1
<b>Lechuga romana</b>	136	1
<b>Pan blanco</b>	0	28
<b>Pan integral</b>	22	35
<b>Arroz</b>	20	10

**Tabla 1. Tabla de composición de alimentos (Moreiras et al., 2007).**

### 3.3. Selenio:

El Se se encuentra ampliamente distribuido en nuestro organismo, y aunque los requerimientos son pequeños, desempeña importantes funciones (Vidal, 2009):

- Como parte integrante de selenoproteínas, lo contienen muchas enzimas, principalmente la GPx, una enzima que interviene en la eliminación de los radicales libres y previene a la célula del daño oxidativo.
- Forma parte de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de las hormonas tiroideas.
- Tiene funciones inmunológicas.

El Se es un oligoelemento esencial presente en más de 25 selenoproteínas, sintetizadas fundamentalmente en el hígado (Hoffmann et al., 2007). Varios estudios han demostrado que el consumo crónico de alcohol disminuye parcialmente los depósitos de selenio en animales (Park et al., 2009) y pacientes (Rua et al., 2014), afectando por tanto a la expresión de selenoproteínas (Jotty et al., 2013) y a sus propiedades antioxidantes (Rua et al., 2014).

Las selenoproteínas más importantes producidas en el hígado de roedores son la GPx 1, GPx 4 y la selenoproteína P. La relación de las enzimas Gpx con el estrés oxidativo hace que sea la selenoproteína más estudiada. Así mismo, ha sido considerada como una de las 4 enzimas antioxidantes que forman parte del sistema de defensa endógeno. (Brown y Arthur, 2001).

Como ya se nombró anteriormente, es conocido que **la GPx cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua o alcohol usando GSH como reductor**. Todas las GPx son capaces de añadir dos electrones para reducir peróxidos, formándose **Selenoles (Se-OH)**. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que estas enzimas llevan a cabo diferentes funciones, de forma que la GPx-1 citosólica actúa fundamentalmente como antioxidante y está relacionada con la resistencia a la insulina, mientras que la GPx-4 es la única GPx que puede reducir los hidroperóxidos en las lipoproteínas y complejos lipídicos (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

**Dependiendo de la suplementación en Se, la síntesis de estas proteínas estará alterada en diferente forma.** Son producidas de acuerdo con una cierta prioridad, lo cual significa que la producción de muchas de ellas cesa cuando la disponibilidad de Se es restringida (Brigelius-Flohé, 2006).

### 3.4. Ácido fólico:

El AF, también conocido como vitamina B9, es una coenzima necesaria para la formación de proteínas y hemoglobina.

El 90% de esta vitamina se encuentra en forma de folatos (forma reducida del ácido fólico) en los alimentos, mientras que el AF (forma oxidada) casi no se encuentra en los alimentos, siendo la forma utilizada en los complementos vitamínicos y alimentos enriquecidos.

La falta de folatos en la dieta puede llegar a desencadenar trastornos como anemia megaloblástica (elevado riesgo en embarazadas y alcohólicos), riesgo de enfermedad cardiovascular (tienen un papel importante en la regulación metabólica de la homocisteína, cuyos elevados valores en sangre puede tener un papel oxidativo en nuestro organismo) y defectos en el tubo neural (Vidal, 2009).

Esta vitamina es muy importante para la renovación celular, y teniendo las células del tracto gastrointestinal (GI) una rápida velocidad de renovación, las lesiones en las células del tracto GI producirán una **mala absorción del ácido fólico**, contribuyendo más aun al daño de estas células. Además, hay que tener en cuenta que el ácido fólico tiene una ruta de circulación enterohepática (Noss y Rady, 2008).

Los folatos se encuentran en gran número de alimentos, siendo las principales fuentes las verduras y hortalizas, pero sin embargo, tienen el inconveniente de que son muy sensibles al calor, pudiéndose perder aproximadamente el 50% del contenido tras la cocción.

Debido a su carácter hidrosoluble, el exceso de vitamina es eliminado por orina, no observándose ninguna toxicidad en su ingesta (Vidal, 2009).

Este nutriente tiene actividad antioxidante ya que se le atribuye, entre otras muchas funciones, la disminución de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, la cual aumenta la formación de radicales libres en el hígado (Sarna et al., 2012). Otros estudios afirman que interacciona con la enzima endotelial óxido nítrico sintasa (NOS) disminuyendo la formación de peroxinitritos prooxidantes (Stanger y Wonisch, 2012).

Son diversos los estudios que indican que el consumo de alcohol puede producir malabsorción de ciertos nutrientes, entre ellos el AF y Se, disminuyendo así la capacidad antioxidante del organismo, por lo que sería relevante valorar si una suplementación con alguno de estos

nutrientes podrían paliar los efectos negativos que produzca el consumo de alcohol tipo Botellón.



## II. OBJETIVOS

Ya que el consumo de alcohol tipo botellón está muy extendido entre los adolescentes y jóvenes de nuestra sociedad, y que la edad de inicio es cada vez menor, se ha querido analizar mediante encuestas a un grupo de estudiantes, para saber cómo es este tipo de consumo en la adolescencia así como valorar cual es la ingesta que realizan de alimentos ricos en sustancias antioxidantes, como son el ácido fólico y selenio.

Además, puesto que el alcohol es una droga oxidante que afecta principalmente a nivel hepático, se ha estudiado en ratas adolescentes el efecto que tiene este tipo de consumo de alcohol sobre este órgano y si una suplementación con ácido fólico o selenio podría paliar el daño hepático producido por el botellón.


### III. METODOLOGÍA

#### 1. ENCUESTAS REALIZADAS A ESTUDIANTES.

##### 1.1. Procedimiento.

Se tomó una muestra de alumnos de un Instituto Público de Educación Secundaria de Sevilla Capital (I.E.S Nervión), agrupados en dos grupos de edad, los cuales se encontraban cursando 3º y 4º de ESO, y los dos cursos de Bachillerato.

Éste instituto de educación secundaria está ubicado en el barrio de El Plantinal-El Juncal, perteneciente al Distrito Sur. A él asisten fundamentalmente alumnos que han realizado sus estudios de educación primaria en centros públicos de los barrios Cerro del Águila (Distrito Cerro-Amate), El Plantinal y El Tiro de Linea (ambos del Distrito Sur), por lo que se trata de una muestra variada respecto al lugar de residencia de los sujetos.

 Departamento de Psicología	Encuesta sobre hábitos de consumo de alcohol	Esta encuesta es anónima
<b>DATOS GENERALES</b>		
Sexo: <input type="checkbox"/> Hombre <input type="checkbox"/> Mujer		
Edad (años): <input type="checkbox"/> 11-13 <input type="checkbox"/> 14-16 <input type="checkbox"/> 17-20 <input type="checkbox"/> 21-22		
<b>¿Bebes alcohol de forma habitual?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		
<b>¿Haces botellón?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		
<b>¿Con qué frecuencia haces botellón?</b> <input type="checkbox"/> 1 al mes <input type="checkbox"/> 2 al mes <input type="checkbox"/> 3 al mes <input type="checkbox"/> 4 o más veces al mes		
<b>¿Con qué frecuencia comes alguno de estos alimentos?</b>		
- Espinacas, lechuga, y otras hortalizas de hojas verdes <input type="checkbox"/> Frecuentemente <input type="checkbox"/> poco frecuente <input type="checkbox"/> nunca		
- Garbanzos y lentejas <input type="checkbox"/> Frecuentemente <input type="checkbox"/> poco frecuente <input type="checkbox"/> nunca		
- Cereales y panes <input type="checkbox"/> Frecuentemente <input type="checkbox"/> poco frecuente <input type="checkbox"/> nunca		

Los cuestionarios se realizaron en el aula durante el curso académico 2016/2017, en el mes de Febrero, y durante horario lectivo, con el permiso del equipo directivo del Centro.

En el cuestionario se recogieron diferentes aspectos relacionados con el consumo de alcohol y en particular con la realización de botellón (consumo habitual de alcohol, consumo de alcohol tipo botellón y frecuencia de botellón), y aspectos relacionada con los hábitos alimentarios (frecuencia de inclusión en la dieta de alimentos ricos en AF o Se), además de información personal como son el Sexo y la Edad (Figura 2).

Figura 2. Modelo de encuesta que rellenaron los estudiantes.

## 1.2. Muestra.

En total se entrevistó a 139 alumnos, de los cuales el 48,92% eran varones y el 51,07% eran mujeres.

Respecto a la edad de los estudiantes, el 51,79% tenían entre 14 y 16 años, mientras que el 48,20% se encontraba entre los 17 y 20 años.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DE LOS GRUPOS DE ANIMALES.

Para la realización del trabajo se utilizaron animales de experimentación, concretamente ratas de la raza Wistar, distribuidos de manera aleatoria, en seis grupos (**Figura 3**):

- a) Grupo control **(C)**: alimentado *ad libitum* con dieta base (0,23 ppm Se y 4 ppm AF) y agua, y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- b) Grupo alcohol **(A)**: alimentado *ad libitum* con dieta base (0,23 ppm Se y 4 ppm AF) y agua, y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).
- c) Grupo control selenio **(CS)**: alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0,3 ppm Se), y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- d) Grupo alcohol selenio **(AS)**: alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0,3 ppm Se), y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).
- e) Grupo control fólico **(CF)**: alimentado *ad libitum* con dieta base suplementada con AF hasta una cantidad de 8 ppm y agua, y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- f) Grupo alcohol **(AF)**: alimentado *ad libitum* con dieta base suplementada con AF hasta 8 ppm y agua, y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).

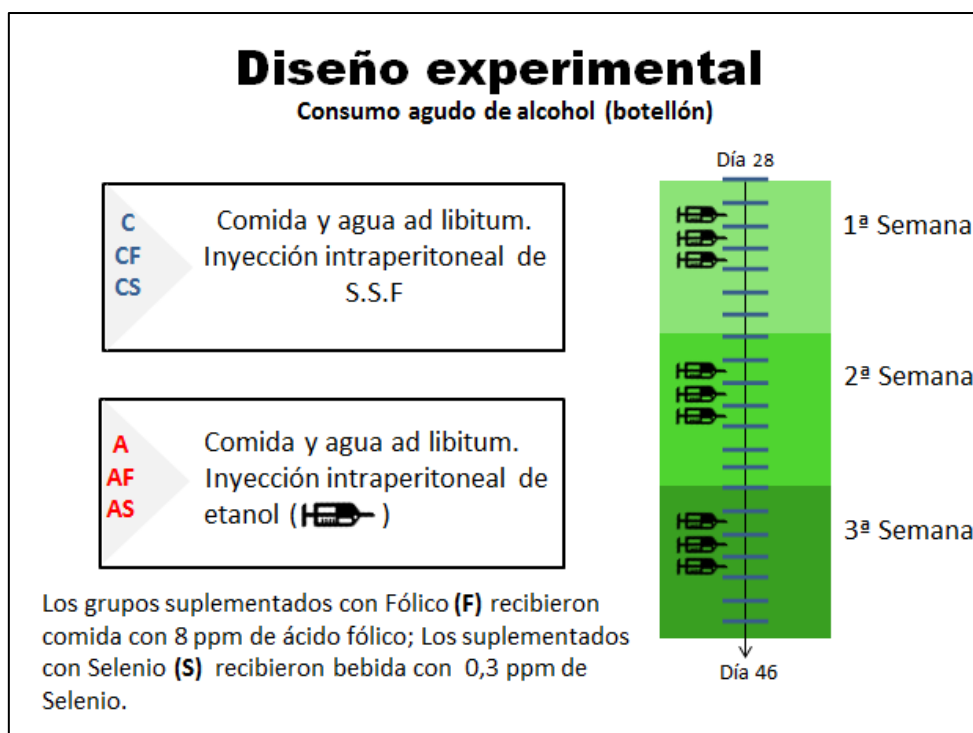


Figura 3. Condiciones experimentales y diseño de grupos.

## 2.1. Animales y condiciones experimentales.

Se utilizaron 36 ratas adolescentes (6 por grupo) Wistar macho, recibidas con 21 días de edad y manteniéndolas una primera semana de adaptación para posteriormente realizar la experimentación desde sus 28 a 46 días de edad. Estas ratas se alojaban en el animalario de la Facultad de Farmacia, bajo condiciones controladas de luz (ciclo de luz: 7:00 h mañana - 19:00 h tarde) y temperatura (22°C). Las ratas se dividieron por grupos y se les administró su respectivo tratamiento, durante 3 semanas, de acuerdo a los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales, aprobado previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla. Antes del sacrificio, las ratas permanecieron en período de ayuno durante 12 horas.

## 2.2. Dieta utilizada.

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética que contenía 0,23 ppm de Se y 4 ppm de AF, cubriendo todas las necesidades nutricionales y energéticas. Los grupos suplementados con Se recibieron 0,3 ppm de Se (en forma de selenito sódico) en el agua de bebida, y los grupos suplementados con ácido fólico recibieron un

suplemento en la comida de 4 ppm de fólico, alcanzándose una riqueza en total de 8 ppm de fólico en la comida.

### **2.3. Métodos de alcoholización.**

El método de alcoholización que se utilizó para los grupos Alcohol (A), Alcohol selenio (AS) y Alcohol fólico (AF) tuvo como base la administración por vía intraperitoneal, tres días por semana y durante tres semanas, de etanol (3 g/Kg/d) en solución salina al 20% (v/v) (Callaci et al., 2010). Por otra parte, a los grupos Control (C), Control selenio (CS) y control fólico (CF) se les inyectó un volumen equivalente de solución salina durante el mismo período de tiempo, como se indica en la **Figura 3**.

### **2.4. Estudio macroscópico.**

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

## **3. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE RATAS.**

Al final del periodo experimental, se procedió al sacrificio de los animales para la obtención de las muestras. Una vez anestesiado el animal con uretano al 28% p/v, se extrajo la sangre mediante punción cardiaca. Enseguida, se dejó retraer el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C. Simultáneamente a la obtención de la sangre y tras laparotomía media, se localizó el hígado y se procedió a su extracción, determinando su peso. El órgano se lavó con solución salina fisiológica fría. Posteriormente, se introdujo en N<sub>2</sub> líquido y se congeló a -80°C hasta el momento de realización de los análisis.

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

## **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

### **4.1. Determinación de la concentración total de proteínas.**

Para expresar la actividad de las enzimas (U/mg proteínas o mU/mg de proteínas) así como para poder cuantificar el MDA en moles/mg de proteínas, determinamos las proteínas totales en los homogeneizados de hígado.

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

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

### **4.2. Determinación de la concentración en suero de ácido fólico y selenio.**

#### **Niveles séricos de ácido fólico:**

Los niveles de ácido fólico en suero fueron medidos usando el método de electroluminiscencia en el sistema Elecsys-2010 (Roche Diagnostics, Alemania) usando el kit de la marca Roche.

#### **Niveles séricos de Selenio:**

Se determinó el selenio en suero utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito. La concentración se calculó mediante una recta de calibrado construida a partir de una solución estándar de Se.

### **4.3. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx).**

La enzima GPx cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en una reacción en que interviene el glutatión (GSH). La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Lawrence y Burk (Lawrence y Burk, 1976) ligeramente

modificado. En este método, el glutatión oxidado (GSSG) formado por la acción de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se acopla a la reacción que cataliza la glutatión reductasa (GR), midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH (Figura 4).

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

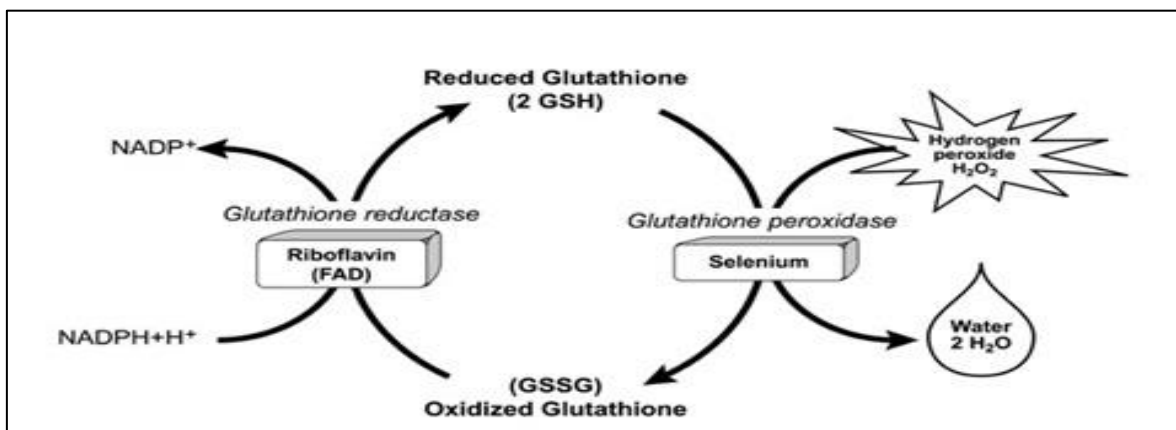


Figura 4. Reacciones mediadas por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa.

#### 4.4. Determinación de la actividad de Superoxido dismutasa (SOD).

La actividad de SOD fue determinada usando el método de Fridovich (Fridovich, 1985). Fue medida por inhibición de la reducción del anión superóxido por el citocromo C, producido por el sistema xantina/xantina oxidasa. Una unidad de actividad de SOD fue definida como la cantidad de enzima que inhibe la tasa de citocromo C reducido en un 50% bajo las presentes condiciones de medida. La actividad fue expresada en U/mg de proteína.

#### 4.5. Determinación de la actividad de la Catalasa (CAT).

La actividad de la CAT hepática fue determinada usando el método de Beers y Sizer (Beers y Sizer, 1952) por medición de la disminución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm. La actividad de la enzima fue expresada en U/mg de proteína.

#### 4.6. Determinación de la oxidación lipídica (MDA).

La peroxidación lipídica en las muestras de hígado fue medida por el método basado en la reacción entre malonildialdehído (MDA) y acidotiobarbiturico (TBA) (Draper y Hadley, 1990).

El MDA reacciona con TBA en condiciones ácidas para formar un complejo cromóforo rosa que tiene un máximo de absorbancia a 535 nm. El resultado fue expresado como moles de MDA/mg proteína.

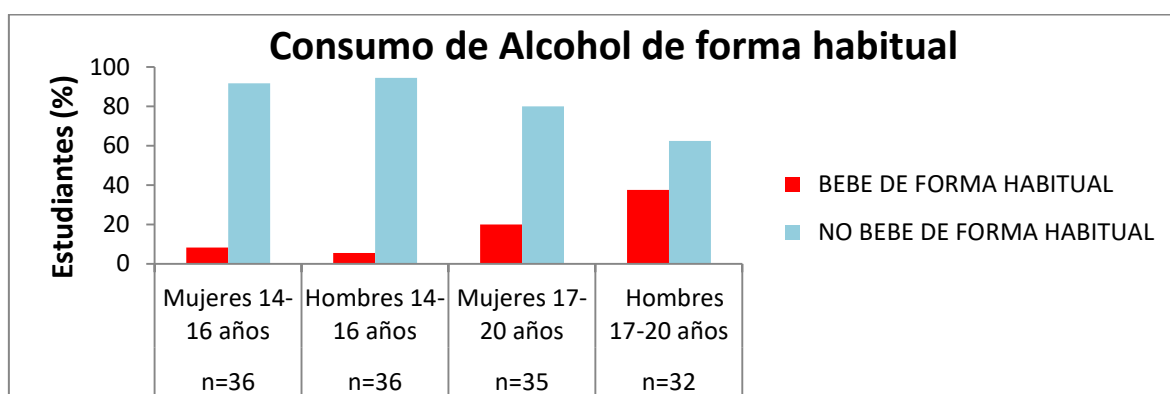
## **5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) obtenida de al menos 8 muestras ( $n=8$ ). Para comparar las distintas variables objeto de nuestro estudio, los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza ANOVA en el programa (GraphPad InStat 3).



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. ENCUESTAS SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL A ESTUDIANTES DE SECUNDARIA.

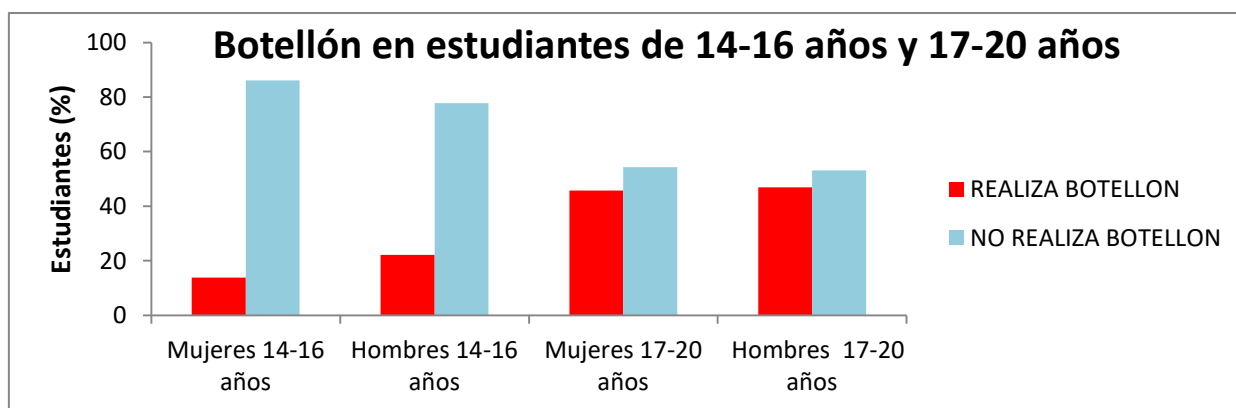


**Figura 5. Estudiantes que consumen habitualmente alcohol (en porcentaje de encuestados) por grupo de edad y sexo.**

Los estudiantes que manifiestan consumir alcohol de forma habitual durante la semana suponen un número muy reducido dentro del grupo de edad 14 a 16 años (el 8,33% de las mujeres encuestadas y el 5,55% de los varones encuestados) (Figura 5).

Sin embargo, se aprecia que el siguiente grupo de edad (17-20 años), posiblemente por la superación de la mayoría de edad, hay un aumento del número de individuos que consume alcohol de forma habitual durante la semana en ambos sexos (el **20% de las mujeres encuestadas y el 37,5% de los varones encuestados**) (Figura 5).

Resulta interesante comparar los datos de estudiantes que consumen alcohol de forma habitual durante la semana (Figura 5) con los estudiantes que suelen realizar botellón alguna vez (Figura 6), ya que se puede visualizar cómo los individuos, **pese no estar acostumbrados a consumir habitualmente alcohol, pasan a ser consumidores de alcohol en grandes cantidades por motivos de ocio, es decir, en forma de botellón.**

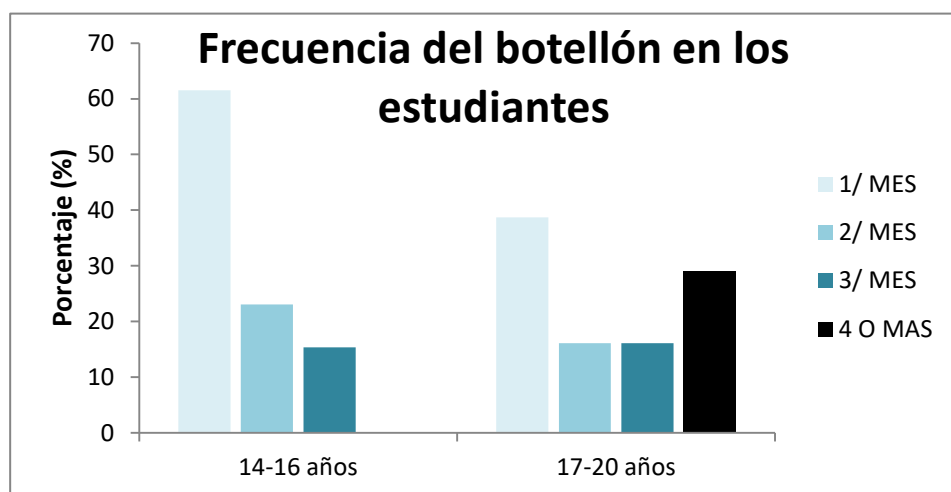


**Figura 6. Porcentajes de estudiantes que ha realizado, o no, Botellón alguna vez.**

Como vemos en la figura 6, entre los **estudiantes de 14 a 16 años el 13,9% de las mujeres hace botellón, mientras que en los varones la cifra se eleva hasta el 22,2%**. Recordemos que en este grupo de edad, en ambos sexos, menos 9% manifestaba consumir alcohol de forma habitual durante la semana (Figura 5), de manera que se multiplica por 4 la cifra de alumnos varones, y en más del doble de mujeres, de entre 14-16 años consumidores de alcohol, pero esta vez en forma de atracón.

Entre los encuestados de **17 a 20 años** se aprecia un notable aumento del número de personas asistentes a botellón respecto al grupo de edad anterior: **el 45,7% de las mujeres y el 46,9 % de los varones hacen botellón alguna vez.**

De estos datos se puede extraer que **la asistencia a botellones se incrementa conforme aumenta la edad de estos jóvenes**, lo cual concuerda con otros estudios previos donde los menores de 18 años que asisten a un botellón solo representan el 21%, frente al 71% de los asistentes que eran jóvenes de 18 a 26 años (Gutierrez et al, 2012).



**Figura 7. Frecuencia con la que realizan botellón los estudiantes encuestados.**

De igual manera que con el número de estudiantes que hacen botellón, vemos grandes diferencias en la frecuencia con la que éste se realiza entre los dos grupos de edad (Figura 7).

En el grupo de **14-16 años**, **más de la mitad de los asistentes a botellón señala ir solo 1 vez al mes** (61,5 %), 2 veces al mes lo indican el 23,1% y como máximo solo asisten 3 veces al mes poco más del 15,4%.

En el grupo de asistentes al botellón de entre **17-20 años** cambia radicalmente el panorama: solo el 38,7% asiste 1 vez al mes, mientras que 2 o 3 veces al mes lo indican por igual el 16,1% de los estudiantes encuestados.

**Este grupo de edad, 17-20 años, indica en un elevado porcentaje (29%) asistir 4 o más veces al mes a un botellón**, no habiendo marcado esta situación ningún encuestado del grupo de edad menor (14-16 años).

## 2. HÁBITOS ALIMENTARIOS DE LOS ESTUDIANTES ENCUESTADOS: ALIMENTOS RICOS EN ÁCIDO FÓLICO (FOLATOS) Y SELENIO.

### 2.1. Consumo de alimentos ricos en fólico (Folatos).

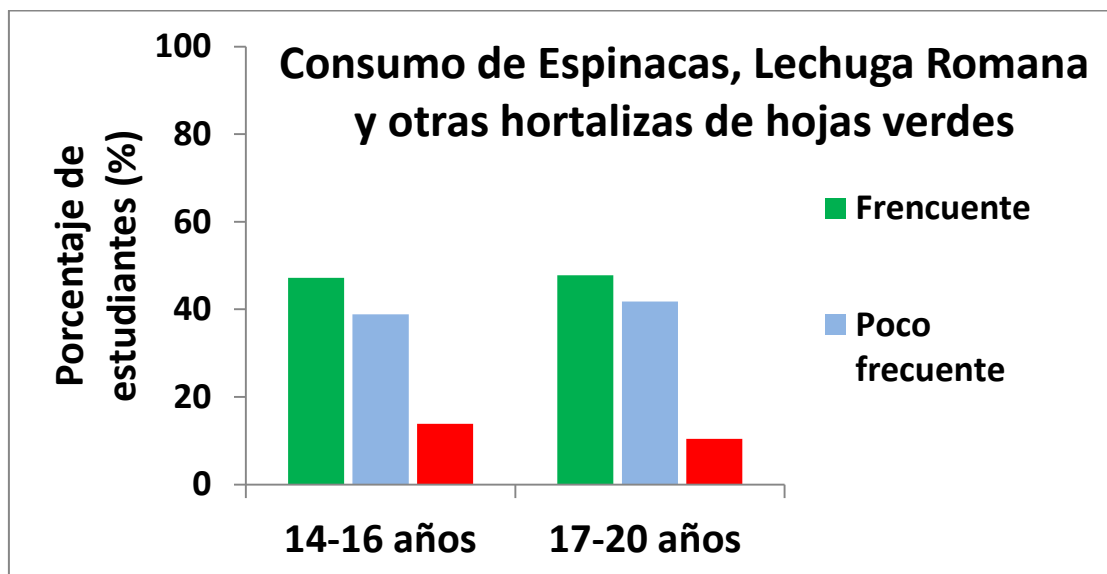


Figura 8. Frecuencia de consumo de un grupo de alimentos ricos en ácido fólico en la dieta de los estudiantes.

Un poco menos de la mitad de cada grupo indica consumir con frecuencia espinaacas, lechugas y hortalizas de hojas verdes (grupo 14-16 años=47,22%; grupo 17-20 años= 47,8%), mientras que alrededor del 53% de los estudiantes indica consumir estos alimentos con poca frecuencia o nunca (poco frecuente o nunca: grupo 14-16 años= 52,76%; grupo 17-20 años= 52,23%) (Figura 8).

Es conocido que este grupo de alimentos no es bien tolerado por los jóvenes, por lo que hay un gran número de individuos susceptibles a padecer bajos niveles de ácido fólico (vitamina B9), pudiéndose ver mermado su sistema antioxidante endógeno como veremos más adelante.

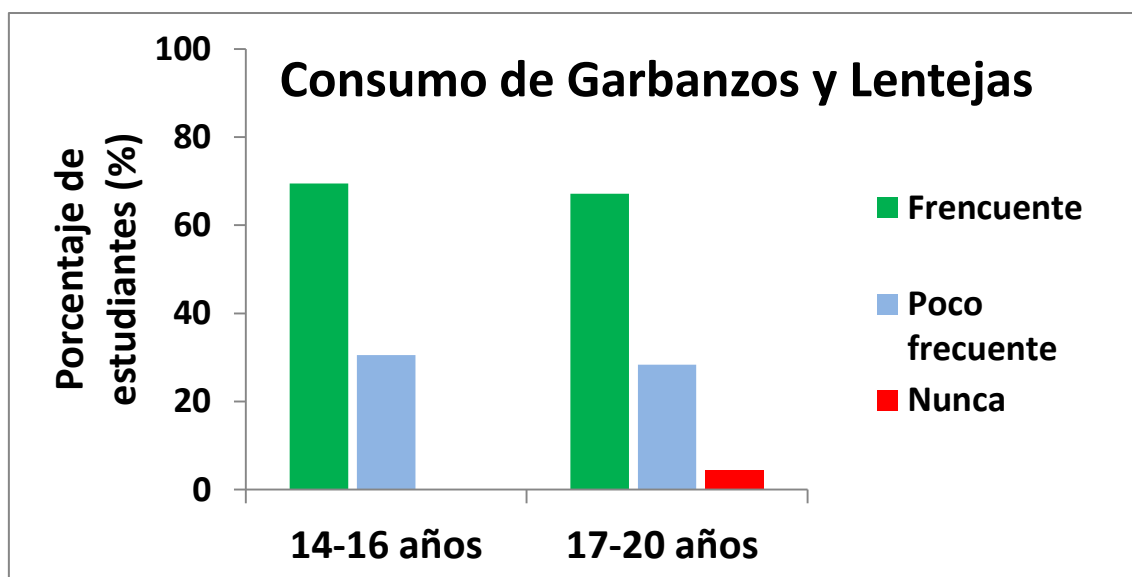


Figura 9. Frecuencia del consumo de un grupo de alimentos ricos ácido fólico en la dieta de los estudiantes.

A diferencia del grupo de alimentos anterior (figura 8), parece que de forma generalizada **hay un mayor consumo** por parte de estos jóvenes (consumo frecuente grupo 14-16 años: 69,4%; grupo 17-20 años: 67,25%) de **garbanzos y lentejas, alimentos que también son ricos en ácido fólico** (Figura 9).

En el grupo de edad de 14 a 16 años ningún individuo marcó no consumir nunca estos alimentos, mientras que un 4,5% de los estudiantes de 17-20 años si lo indicaron (Figura 9).

Este último dato puede relacionarse con algunos estudios que indican que **los hábitos alimentarios empeoran con la edad**, de tal forma que los jóvenes de 12 a 14 años tendrían unos patrones alimentarios más saludables que los mayores de entre 15-19 años (Riediger et al., 2007; Von Post-Skagegard et al., 2002), edad que precisamente coincide con el inicio del consumo de alcohol (14,1-15,5 años) (Cortes et al, 2007).

## 2.2. Consumo de alimentos ricos en Selenio.

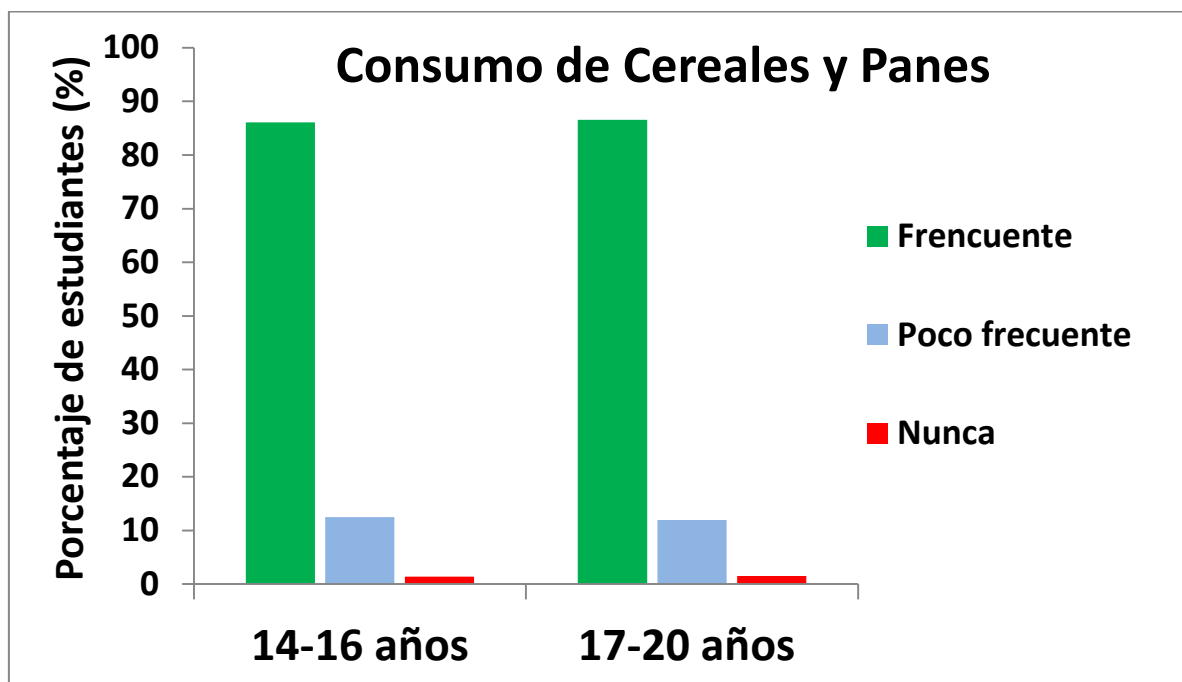


Figura 10. Frecuencia del consumo de un grupo de alimentos ricos en selenio en la dieta de los estudiantes.

De nuevo, los datos por edades expresados en la figura 10 son muy similares: **aproximadamente el 86% de los estudiantes de ambos grupos afirma consumir frecuentemente en su dieta garbanzos y cereales**, que son alimentos ricos en Se (grupo 14 a 16 años= 86,11%; grupo 17 a 20 años= 86,56%).

Los estudiantes que afirman no consumir nunca garbanzos y cereales no llegan al 2% en ninguno de los grupos de edad (1,38% y 1,49% en los grupos de 14-16 años y 17-20 años, respectivamente). Algo superior, son los que consumen estos alimentos de forma poco frecuente (12,5% los de 14-16 años y 11,94% los de 17-20 años).

### **3. ACTIVIDAD DE ENZIMAS IMPLICADAS EN EL SISTEMA ENDÓGENO ANTIOXIDANTE.**

#### **3.1. Parámetros nutricionales.**

Tanto la Tabla 2 como la Tabla 3 muestran que aunque no hubo incremento de peso corporal ni una ingesta sólida significativa en ninguno de los grupos estudiados, las suplementaciones utilizadas aumentaron la ingesta del antioxidante estudiado. Este hecho se tradujo en una mayor concentración de AF o Se en el suero de estas ratas. Sin embargo, se observa una depleción del Se sérico en el grupo A (Tabla 3).

Por tanto, se puede sugerir que aunque este patrón de consumo de alcohol altera los niveles de estos antioxidantes, sobre todo en el caso del Se, los modelos de suplementación propuestos son eficientes al aumentan las reservas de estos antioxidantes en determinados tejidos y en el suero (Ojeda et al., 2010, 2016).

<b>Parámetros</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>CF</b>	<b>AF</b>
<b>Incremento de peso corporal (g/día)</b>	5.38 ± 0.19	5.03 ± 0.27	5.47 ± 0.20	5.07 ± 0.23
<b>Ingesta sólida (g/día/rata)</b>	13.1 ± 0.79	12.0 ± 0.67	13.4 ± 0.73	12.8 ± 0.56
<b>Ingesta de fólico (µg/día)</b>	32.4 ± 2.23	30.3 ± 1.97	131.3 ± 0.33 ddd	122.7 ± 5,28 +++
<b>Ácido fólico en suero (µg/L)</b>	95,45 ± 2,41	102,76 ± 2,12 **	109,45 ± 4,35 d	120,10 ± 4,52 ++

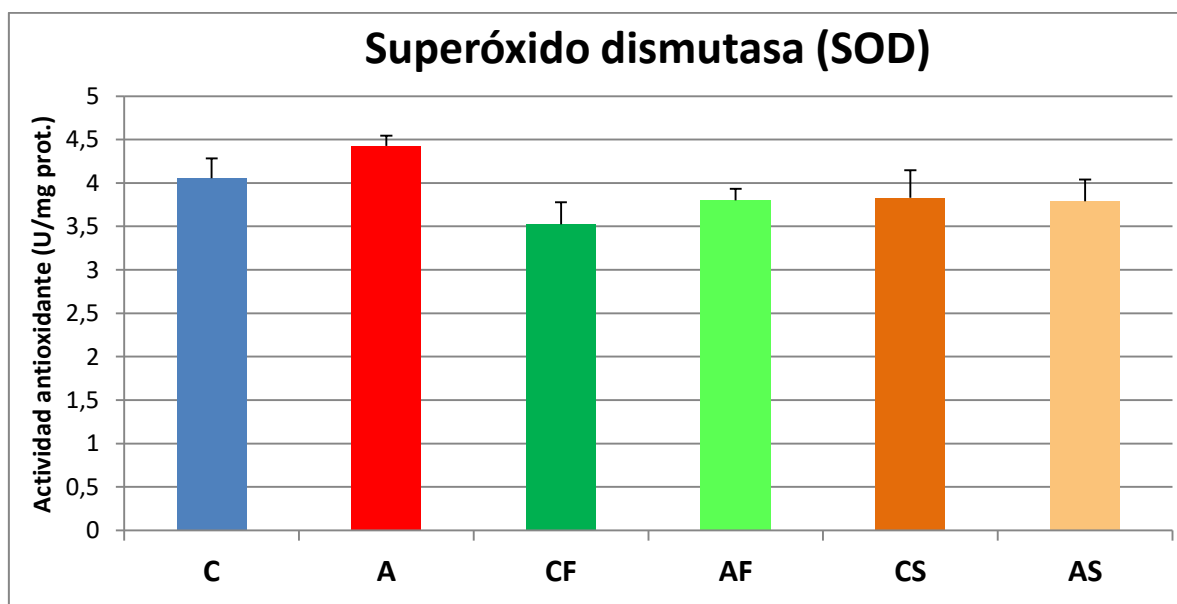
**Tabla 2. Parámetros nutricionales en ratas adolescentes expuestas, o no, al botellón, y suplementadas, o no, con ácido fólico.** Los resultados se expresan como la media ± ESM. C: grupo control, A: grupo alcohol, CF: grupo control fólico y AF: grupo alcohol fólico. Significación estadística: A vs C: \*\* p<0,01; CF vs C: <sup>d</sup> p<0,05, <sup>ddd</sup> p<0,001; AF vs A: ++ p<0,01, +++ p<0,001.

Parámetros	C	A	CS	AS
<b>Incremento de peso corporal (g/día)</b>	5.38 ± 0.19	5.03 ± 0.27	5.34 ± 0.25	5.17 ± 0.23
<b>Ingesta sólida (g/día/rata)</b>	13.1 ± 0.79	12.0 ± 0.67	13.6 ± 0.61	12.1 ± 0.61
<b>Ingesta de selenio (µg/día)</b>	3.01 ± 0.22	2.77 ± 0.16	5.4 ± 0.32 ccc	4.8 ± 0.27 aaa
<b>Selenio en suero (µg/L)</b>	205.35 ± 6.86	178.70 ± 5.70 **	335.32 ± 7.91 cc	235.26 ± 6.37 aaa, bbb

**Tabla 3. Parámetros nutricionales en ratas adolescentes expuestas, o no, al botellón, y suplementadas, o no, con selenio.** Los resultados se expresan como la media ± ESM. C: grupo control, A: grupo alcohol, CS: grupo control selenio y AS: grupo alcohol selenio. Significación estadística: A vs C: \*\* p<0,01; CS vs C: <sup>cc</sup>p<0,01, <sup>ccc</sup> p<0,001; AS vs A: <sup>aaa</sup> p<0,001; AS vs CS: <sup>bbb</sup> p<0,001.

### 3.2. Superóxido dismutasa (SOD).

Al determinar la actividad SOD no se ha observado cambios significativos en ratas adolescentes expuestas al botellón en comparación con el grupo control.



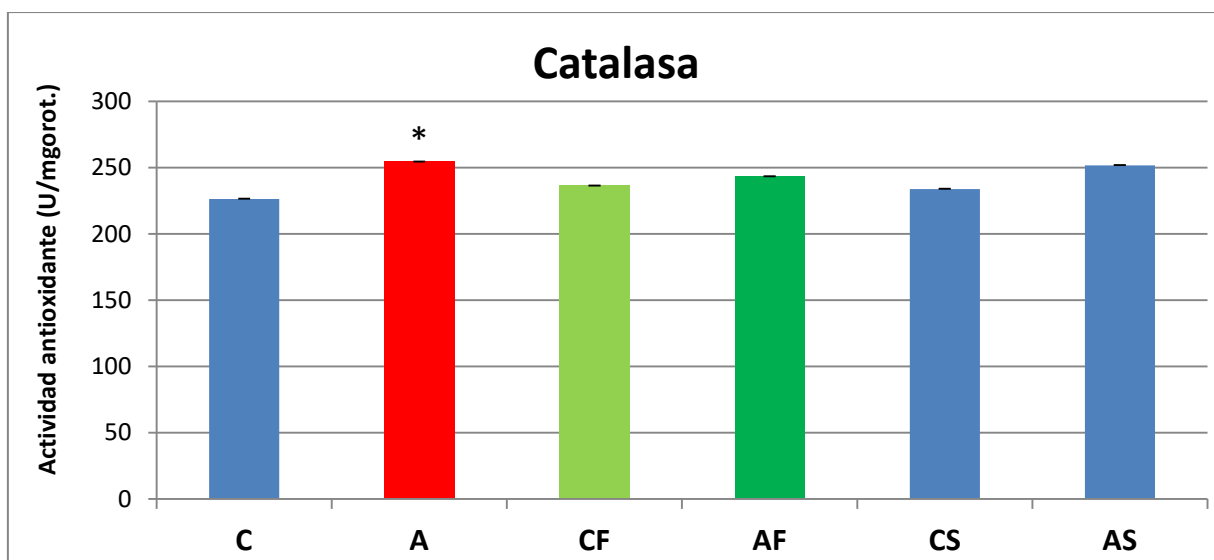
**Figura 11. Actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD) en hígado de rata.** Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: C: grupo control, A: grupo alcohol, CF: grupo control fólico y AF: grupo alcohol fólico, CS: grupo control selenio y AS: grupo alcohol selenio.



En un estudio previo, donde se comparan dos modelos de consumo de alcohol tipo botellón (oral e intraperitoneal) en ratas adolescentes (Nogales et al., 2014), se observó que no había diferencia significativa en la actividad de la enzima SOD entre los grupos control y alcohol del modelo forzado, el cual ha sido utilizado también en este estudio. Esto puede ser debido a que las ratas del modelo forzado están expuestas a una inyección intraperitoneal de solución salina (grupo control) o de alcohol (grupo alcohol) durante tres días en semana y por tres semanas, incrementando también la actividad SOD en el grupo control. Sin embargo, el grupo control en este modelo no presentó oxidación en lípidos ni proteína, por lo que el balance oxidativo era compensado.

### 3.3. Catalasa.

Como se ha expuesto anteriormente, el  $H_2O_2$  formado por la SOD puede ser metabolizado por la CAT, o bien por la GPx, dando lugar a agua y oxígeno. Así, al determinar, en primer lugar, la actividad CAT (Figura 12) se aprecia un aumento significativo de su actividad en el hígado de ratas adolescentes expuestas al botellón (A: 254,31 U/mg proteínas;  $p < 0.05$ ) en comparación con las ratas controles (C: 226,20 U/mg proteínas).



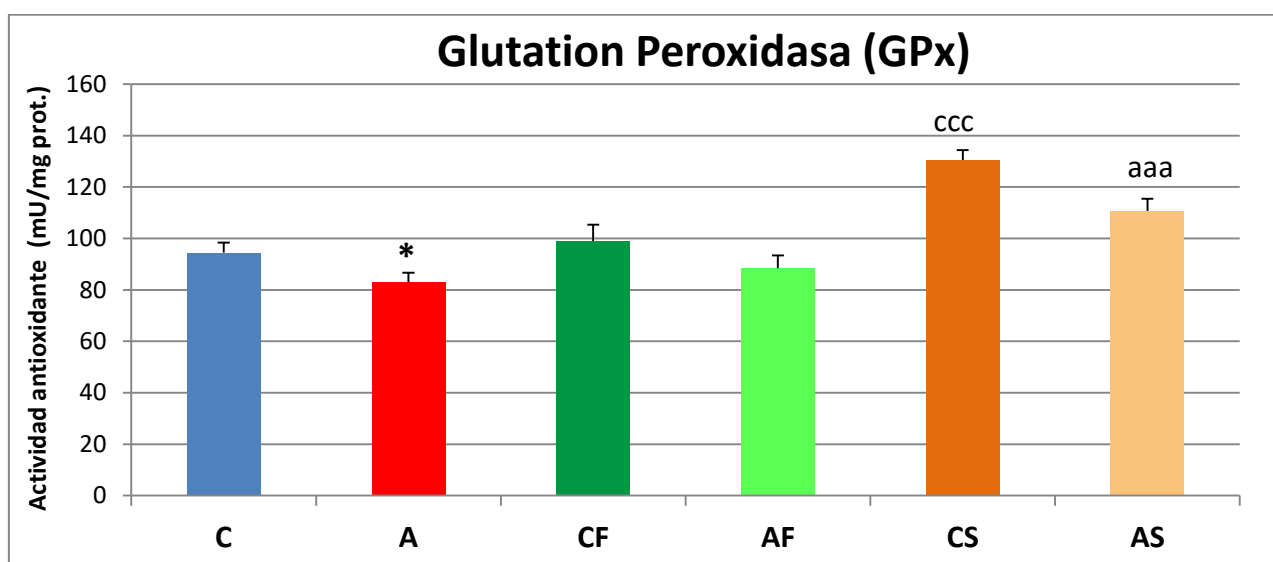
**Figura 12. Actividad de la enzima Catalasa.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. C: grupo control, A: grupo alcohol, CF: grupo control fólico y AF: grupo alcohol fólico, CS: grupo control selenio y AS: grupo alcohol selenio. Significación estadística: C vs A: \*  $p < 0.05$ .

En estudios previos ya se apuntó que tras un periodo de exposición al botellón, **la actividad de la enzima CAT aumentó significativamente debido a la presencia de una mayor situación de**

**estrés oxidativo** (Nogales et al., 2014). Además, la CAT es una enzima implicada en el metabolismo del alcohol, sobre todo cuando se consume a altas concentraciones, por lo que es lógico encontrar una mayor actividad de esta enzima en el grupo alcohol.

Con respecto a las ratas expuestas a botellón y con alimentación suplementada, **no se observaron datos significativos entre los grupos estudiados**, por lo que se puede deducir que **las suplementaciones estudiadas contrarrestan la sobreestimulación de esta enzima** tras la exposición al botellón, probablemente porque sea otra enzima u otro sistema antioxidante el que esté actuando como consecuencia de la ingesta de estas dietas.

### 3.4. Determinación de la actividad de Glutation peroxidasa (GPx).



**Figura 13. Actividad de la enzima Glutation peroxidasa (Gpx).** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. C: grupo control, A: grupo alcohol, CF: grupo control fólico y AF: grupo alcohol fólico, CS: grupo control selenio y AS: grupo alcohol selenio. Significación estadística: C vs A: \* $p < 0.05$ , C vs CS: ccc  $p < 0.001$ ; A vs AS: aaa  $p < 0.001$ .

La actividad de la GPx se vio disminuida significativamente en el grupo expuesto a botellón (A: 82,93 mU/mg proteínas) respecto al grupo control (C: 94,48 mU/mg proteínas) (Figura 13). Ello puede ser justificado por determinados estudios que indican que el consumo crónico de alcohol disminuye parcialmente los depósitos de selenio en animales (Park et al., 2009) y en pacientes humanos (Rua et al., 2014), produciendo una menor expresión de selenoproteínas como es la GPx (Jotty et al, 2013) y por ello, una menor actividad antioxidante. Probablemente esto mismo sucede en nuestro caso, ya que los niveles séricos de Se estaban disminuidos en el grupo A. Estudios previos indican que este descenso del Se sérico se produce principalmente

por el efecto del alcohol y no por una ingesta diferente de este nutriente en el grupo expuesto al botellón (Nogales et al., 2014). Estos mismos autores demuestran que la actividad de la GPx hepática así como los niveles de Se en este tejido disminuyen como consecuencia del consumo del alcohol.

Sin embargo, en **los grupos suplementados con Se** se observa un aumento extremadamente significativo en la actividad de la enzima GPx hepática respecto al grupo C (CS: 130,46 mU/mg proteínas:  $p < 0,001$ ) y al grupo A (AS 110,70 mU/mg proteínas:  $p < 0,001$ ).

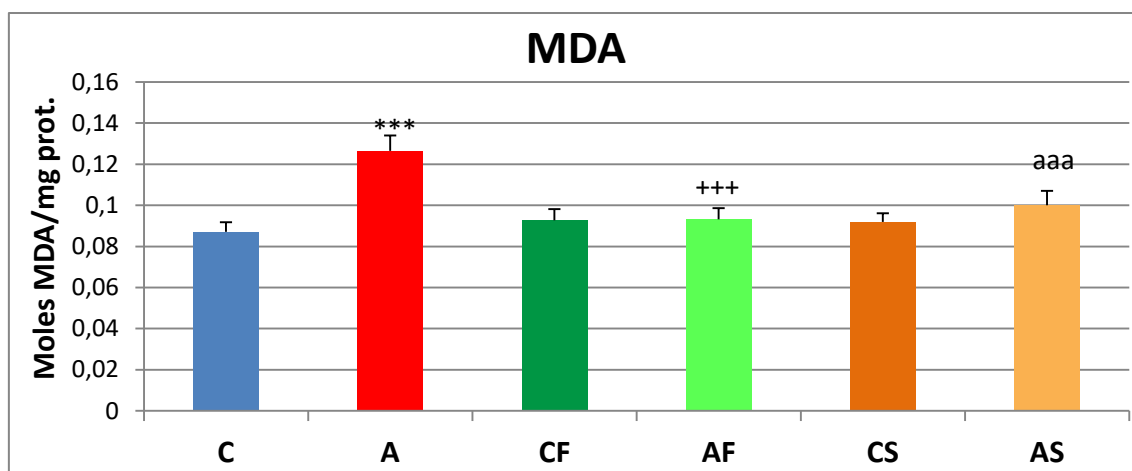
La suplementación con Se en la dieta supone una mayor disponibilidad de este nutriente en el organismo, el cual es un factor crucial para la biosíntesis de selenoproteínas, entre ellas la GPx (Flohé y Brigelius-Flohé, 2006). De esta manera, se consigue una mayor actividad GPx en los individuos sometidos a botellón y dieta suplementada en Se capaz de hacer frente a las ERO y evitar la oxidación que produce el metabolismo del alcohol.

Respecto a **la suplementación con ácido fólico**, parece que ello **no modificó la actividad de la enzima**.

### **3.5. Cuantificación del daño oxidativo producido en el hígado: Peroxidación lipídica.**

Como forma de cuantificar el estrés oxidativo al que ha sido sometido el hígado de los grupos experimentales se cuantificó la presencia de malonil-dialdehído (**MDA**), **un producto de degradación (oxidación) de los lípidos del hígado (Figura 14)**.

**Los individuos sometidos a botellón con dieta basal presentaron una elevada concentración hepática de MDA respecto al grupo control** (A: 0,127 mol MDA/mg de proteínas vs C: 0,087 mol MDA/mg de proteínas;  $p < 0,001$ ), lo que indica que el hígado de estos individuos ha estado expuestos a un gran daño oxidativo. Este aumento de la oxidación lipídica hepática en estas ratas ha sido comentado en otros estudios en los que se vincula a este patrón de consumo con el aumento de la expresión de NADPH oxidasa, enzima que contribuye a la formación de ERO (Nogales et al., 2014).



**Figura 14. Cuantificación de Malonil-dialdehído en hígado.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. C: grupo control, A: grupo alcohol, CF: grupo control fólico y AF: grupo alcohol fólico, CS: grupo control selenio y AS: grupo alcohol selenio. Significación estadística: C vs A: \*\*\*  $p < 0.001$ ; A vs AF: +++  $p < 0.001$ ; A vs As: +++  $p < 0.001$ .

**La suplementación con fólico en la dieta parece disminuir la oxidación de lípidos hepáticos,** obteniéndose unos valores menores muy significativos ( $p < 0.001$ ) en el grupo AF (0.093 mol MDA/mg de proteínas) respecto al grupo A.

Ya en otros estudios ha sido demostrado que la suplementación con ácido fólico en ratas expuestas a binge drinking es una terapia eficiente frente al daño oxidativo de lípidos y fundamentalmente sobre la inestabilidad del ADN producida por este patrón de consumo de alcohol (Ojeda et al., 2016). Parece ser que aunque no se observa actuación de este suplemento sobre la actividad de las enzimas del sistema antioxidante endógeno, el ácido fólico disminuye la actividad de la NADPH oxidasa (Sarna et al., 2012) e incrementa los niveles de GSH disminuidos como consecuencia de la exposición al binge drinking (Ojeda et al., 2016). Así, actuando como antioxidante, disminuyendo la actividad NADPH oxidasa o incrementando los niveles de GSH, **la suplementación con AF utilizada parece ser una buena terapia antioxidante** que evita la formación de las ERO y previene la oxidación de los lípidos hepáticos que se produce tras el botellón.

**Respecto al grupo expuesto al botellón y suplementado con selenio (AS),** también se aprecia una notable disminución de los niveles de MDA (AS: 0,1 mol MDA/mg de proteínas;  $p < 0,001$ ) respecto al grupo A.

Esta **dieta antioxidante rica en Se consiguió evitar la oxidación lipídica** producida por el alcohol, al **reforzar la actividad de la enzima GPx**. Como hemos comentado anteriormente, los grupos suplementados con este mineral alcanzan una alta concentración de Se en suero y

otros tejidos, entre ellos el hígado, de manera que aumenta la expresión de las selenoproteínas hepáticas, como la GPx y por tanto, presentan mayor actividad para hacer frente al daño oxidativo que produce el botellón (Ojeda et al., 2010, Jotty et al., 2013).

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede proponer, tanto la suplementación con Se como la suplementación con AF, como una terapia eficiente a proporcionar a los adolescentes que practican botellón al fin de evitar la oxidación lipídica y hacer frente a posibles complicaciones hepáticas que puedan aparecer como consecuencia de este patrón de consumo de alcohol.

## V. CONCLUSIONES

Como estudios anteriores ya apuntaban, se ha demostrado que el consumo de alcohol tipo botellón produce efectos negativos sobre el hígado, aumentando su estrés oxidativo y potenciando su peroxidación lipídica. Ello conlleva la necesidad de aumentar la respuesta antioxidante frente a los radicales libres que se generan: en respuesta a ello, la suplementación con Ácido fólico (AF) y selenio (Se) en la dieta ha conseguido aumentar los niveles séricos de estas sustancias, y ha resultado ser una terapia efectiva frente a los efectos del botellón en ratas adolescentes, consiguiéndose disminuir la peroxidación lipídica hepática en los grupos expuestos a botellón y dietas suplementadas en AF o Se.

Respecto al sistema antioxidante endógeno del organismo, se vieron diferentes alteraciones en la actividad de las enzimas hepáticas tras la suplementación de antioxidantes en la dieta, pudiéndose concluir que:

La enzima SOD hepática no mostró modificaciones significativas en su actividad tras la suplementación de antioxidantes. Sin embargo, la CAT en ratas expuestas a botellón presentó una mayor actividad a las control, como respuesta al aumento de especies de  $H_2O_2$  generadas en el metabolismo del alcohol. La suplementación con AF y Se no modificó la actividad de esta enzima en ratas expuestas al alcohol, tal vez porque en esta situación se favorecen otras vías de detoxificación.

Respecto a la GPx, se apreció una clara relación entre la disponibilidad de Se en el organismo por la suplementación y el aumento muy significativo de la actividad de dicha selenoproteína, aunque no se mostró variación de la actividad por la suplementación con AF.

Debido a la poca relación encontrada entre la suplementación de AF y la modificación de la actividad de las enzimas antioxidantes, se deberán realizar más estudios que expliquen otras vías antioxidantes alternativas que hayan permitido a la suplementación de AF evitar la oxidación lipídica en el hígado de las ratas expuestas a botellón, como puede ser su acción inhibitoria sobre la NADPH oxidasa.

Los resultados de estos estudios motivan a que estas suplementaciones en la dieta puedan ser una alternativa viable para paliar los efectos negativos de un patrón de consumo de alcohol muy extendido entre los adolescentes. Adolescentes los cuales mostraron, mediante encuestas, que han acudido en su mayoría a un botellón alguna vez, y que con el aumento de edad, cada vez lo realizan con más frecuencia.

La mayoría de ellos cumplen los requerimientos nutricionales, pero parte de ellos presentaron deficiencias, en su dieta, de alimentos ricos en ciertas sustancias antioxidantes, fundamentalmente ácido fólico, patrón alimentario que empeora con el aumento de edad.

Los resultados de este estudio muestran que la sociedad actual precisa de medidas para aumentar la ingesta de alimentos o suplementos ricos Se y AF en los adolescentes, ya que han sido eficaces en paliar el daño oxidativo en el hígado, y podrían evitar las posibles patologías que posteriormente puedan surgir por este patrón de consumo.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez S. Muere una niña de 12 años por un coma etílico durante un botellón en San Martín de la Vega [En línea]. El Mundo. 3 de noviembre de 2016. Disponible en: <http://www.elmundo.es/madrid/2016/11/03/581b54c422601dae488b456c.html>
- Anderson P, Baumberg B. Alcohol in Europe. London: Institute of Alcohol Studies; 2006.
- Baigorri A et al. Avance de la Investigación Sociológica [en línea]. Universidad de Extremadura 2002. Disponible en: <https://www.eweb.unex.es/eweb/sociolog/botellon%202.pdf>
- Baigorri A et al. El botellón en las ciudades de Badajoz, Cáceres, Mérida y Plasencia. Universidad de Extremadura y la Consejería de Cultura y Patrimonio de Extremadura. 2001.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 1952; 195(1): 133–140.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. Biochim Biophys Acta. 2013; 1830(5):3289–3303.
- Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. Biol Chem. 2006; 387(10-11): 1329–1335.
- Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health. Public Health Nutr. 2001; 4(2B): 593–599.
- 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): 332-346.
- Cebeiro Belaza M., Rodríguez Pontevedra S. Borrachos y en urgencias a los 13 años [En línea]. El País. 20 de noviembre de 2016. Disponible en: [http://politica.elpais.com/politica/2016/11/18/actualidad/1479478651\\_199453.html](http://politica.elpais.com/politica/2016/11/18/actualidad/1479478651_199453.html)
- Cortes T, Espejo B, Gimenez J. Características que definen el fenómeno del botellón en universitarios y adolescentes. Adicciones. 2007; 19(4): 357-372.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. Hepatology. 2006; 43(2 suppl 1): S63-74
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186: 421–31.



- Eulalia Vidal Garcia. Manual práctico de nutrición y dietoterapia. 1ª edición. Editorial Monsa-Prayma; 2009.
- Flohé L, Brigelius-Flohé R. Selenoproteins of the glutathione system, in Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2ªed. London: Kluwer Academic Publishers; 2006. pp 161–172.
- Fridovich, I. Cytochrome c. En: Greenwald R. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Michigan: CRC; 1985. p.213–215.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press; 1983.
- Hoffmann PR, Höge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC, Berry MJ. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. Nucleic Acids Res. 2007; 35(12):3963–3973.
- Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. Alcohol. 2013; 47(7): 545–552.
- Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. Alcohol. 2013; 47(7): 545–552.
- Junta de Andalucía. La población andaluza ante las drogas XIII [En línea]. Sevilla: 2015. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/publicacion/16/12/La%20poblaci%C3%B3n%20andaluza%20ante%20las%20drogas%20XIII.pdf>
- Lawrence R, Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Bioph Res Co. 1976; 71(4): 952-958.
- Lieber CS, DeCarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptative increase after ethanol feeding. Science. 1968; 162(3856): 917—918.
- Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta. 1997; 257(1): 59-84.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J biol chem. 1951; 193(1): 265-275.
- Marín I, Tirado R, Aguaded J, Hernando, A. Perfil de los jóvenes que practican el botellón. A tu Salud. 2012; No. 78: p.10-14.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. 11ª ed. Ediciones pirámide; 2007.

- Navarrete L. Juventud y drogas: 4 estudios sociológicos comparados. Madrid: Ilustre Colegio Nacional de Doctores y Licenciados en Ciencias Políticas y Sociología; 2004.
- 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.
- Noss Whitney E, Rady Rolfes S. Tratado general de la nutrición. 1ª ed. Barcelona: Paidotribo; 2011.
- 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): 3486-3491.
- Ojeda ML, Rua RM, Nogales F, Díaz-Castro J, Murillo ML, Carreras O. The Benefits of Administering Folic Acid in Order to Combat the Oxidative Damage Caused by Binge Drinking in Adolescent Rats. *Alcohol and Alcohol.* 2016; 51(3): 235-241.
- OMS: Organización Mundial de la Salud. Glosario de terminos de alcohol y drogas. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2008.
- Park T, Cho K, Park SH, Lee DH, Kim HW. Taurine normalizes blood levels and urinary loss of selenium, chromium, and manganese in rats chronically consuming alcohol. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 643:407–414.
- Peng FC, Tang SH, Huang MC, Chen CC, Kuo TL, Yin SJ. Oxidative status in patients with alcohol dependence: a clinica study in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(17-18): 1497-1509.
- Petersen DR, Erwin VG, Deitrich RA. Brain acetaldehyde metabolism during etanol consumption. *Res. Monographics.* 1983; 9: 93—9.
- Pons J, Berjano E. El consumo abusivo de alcohol en la adolescencia: un modelo explicativo desde la psicología social. Madrid: Plan nacional sobre Drogas; 1999.
- Riediger N, Shooshtari S, Moghadasian MH. The influence of sociodemographic factors on patterns of fruit and vegetable consumption in Canadian adolescents. *J Am Diet Assoc.* 2007; 107(9): 1511-8.
- Rua RM, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Romero-Gomez M, Funuyet J, Murillo ML, Carreras O. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol. *Life Sci.* 2014; 94(2): 158–163.

- Sanchis M, Cuevas J, Sanchis MA. Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones*. 1999; 11(2): 115-126.
- Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90(2): 155–65.
- Stanger O, Wonisch W. Enzymatic and non-enzymatic antioxidative effects of folic acid and its reduced derivatives. *Subcell Biochem*. 2012; 56:131–61.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, 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, Rhoes CJ, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*. 2006; 160: 1-40.
- Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordao-junior AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina Ribeirao Preto*. 1998; 31: 31-44.
- Von Post-Skagegard M, Samuelson G, Karlström B, Mohsen R, Berglund L, Bratteby LE. Changes in food habits in healthy Swedish adolescents during the transition from adolescence to adulthood. *Eur J Clin Nut*. 2002; 56(6): 532-538.
- Yongke Lu, Pengfei Gong, Arthur Cederbaum. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency. *Toxicology*. 2008; 252(1-3): 9–16.