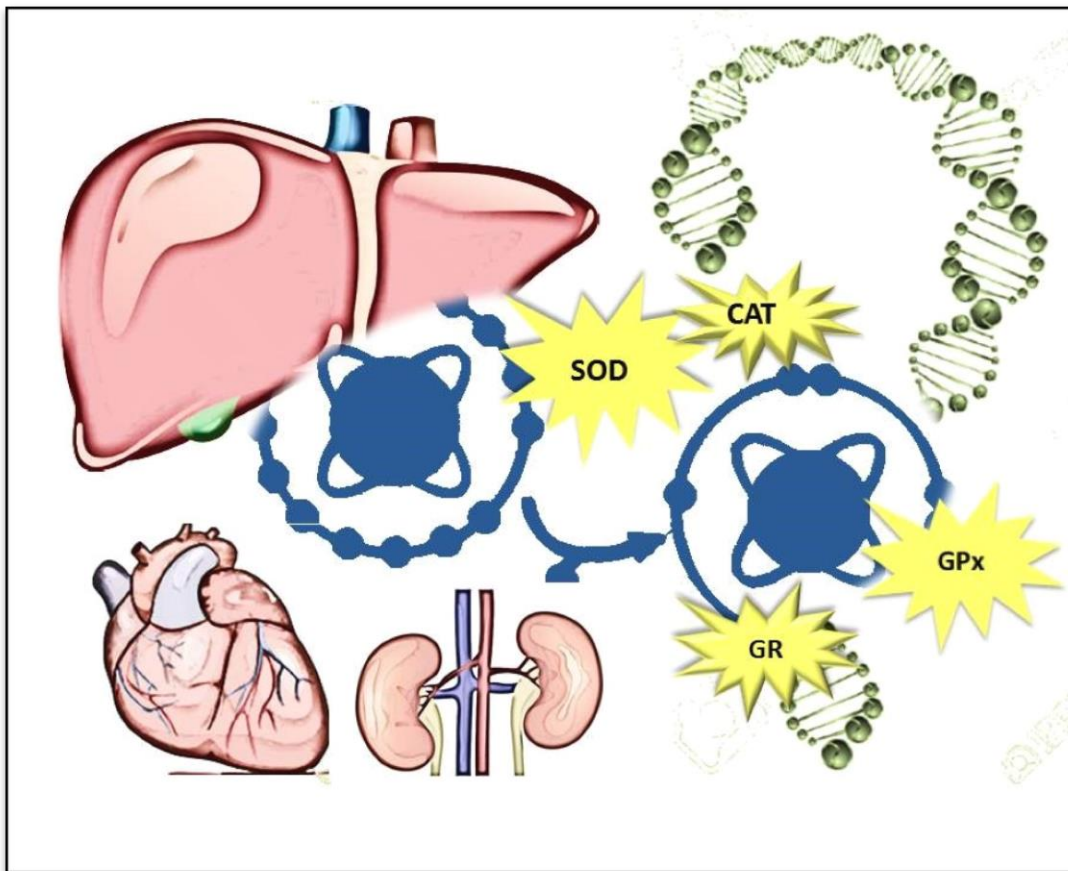




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Estudio comparativo del estrés oxidativo generado por el consumo de alcohol. El ácido fólico como terapia.



Laura Sánchez de la Campa Valero



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

Estudio comparativo del estrés oxidativo
generado por el consumo de alcohol.

El ácido fólico como terapia.

REALIZADO POR:

Laura Sánchez de la Campa Valero

DIRIGIDO POR:

María Luisa Ojeda Murillo

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
TRABAJO EXPERIMENTAL

Facultad de Farmacia, 8 de Junio de 2017

ÍNDICE

	Pág.
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1 Consumo crónico de alcohol.....	2
1.1.1 Impacto del consumo de alcohol en la sociedad.....	2
1.1.2 Metabolismo del alcohol.....	4
1.1.3 Alcohol y estrés oxidativo.....	6
1.2 Ácido Fólico.....	9
1.2.1 Generalidades.....	9
1.2.2 Ácido fólico y estrés oxidativo.....	10
1.3 Alcohol y ácido fólico.....	11
2. Objetivos	12
3. Material y métodos	12
4. Resultados y discusión	18
4.1 Resultados experimentales en hígado.....	18
4.2 Comparación del balance oxidativo en diferentes tejidos.....	25
5. Conclusión	30
6. Referencias bibliográficas	31

ABSTRACT

El consumo irresponsable de alcohol está relacionado con la aparición de más de 200 afecciones, entre las que destacan importantes enfermedades hepáticas, devenidas del estrés oxidativo que genera esta droga pro-oxidante al metabolizarse.

El objetivo principal es analizar **experimentalmente** los cambios producidos en el balance oxidativo y la función hepática tras el consumo crónico de etanol, y los posibles efectos beneficiosos de la suplementación con ácido fólico, nutriente antioxidante más afectado por el abuso de esta sustancia. Para ello, se emplearon 24 ratas macho raza Wistar, distribuidas en cuatro grupos: control, alcohol, control fólico y alcohol fólico. Las ratas expuestas a etanol, se sometieron durante dos meses a la ingesta de etanol al 30% v/v en agua de bebida. La dieta y la solución de etanol se proporcionaron *ad libitum*, y la suplementación con ácido fólico en dieta fue de 8 vs.2 ppm. Seguidamente, se determinó espectrofotométricamente la actividad de las cuatro enzimas antioxidantes endógenas, y la presencia de marcadores de oxidación molecular, junto con la ratio AST/ALT como indicador de la función hepática.

Segundo objetivo: establecer una comparativa, de los efectos pro-oxidantes del consumo crónico de alcohol y de la suplementación de ácido fólico en hígado, corazón y riñón, así como sus posibles implicaciones funcionales, ya que esta droga también tiene conocidos efectos cardiovasculares y renales.

Se ha demostrado experimentalmente que el etanol disminuye la actividad hepática de las enzimas antioxidantes, induce oxidación lipídica, hepatomegalia y disfunción hepática. En riñón, donde el alcohol se metaboliza de modo parecido, los efectos sobre el balance oxidativo son similares, sin embargo en corazón, el balance oxidativo difiere respecto a los anteriores tejidos. La suplementación con ácido fólico, efectúa un papel antioxidante y protector sobre los órganos estudiados, considerándose una buena alternativa para el tratamiento de los problemas de salud relacionados con el abuso de alcohol.

Palabras clave: balance oxidativo, alcoholismo crónico, ácido fólico, hepatotoxicidad, estudio comparativo tisular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Consumo crónico de alcohol

1.1.1 Impacto del consumo de alcohol en la sociedad

A día de hoy, el alcohol es la droga más extendida y consumida por la población española, junto con el tabaco. Su uso, aunque más estricto, data de tiempos inmemoriales y desde entonces ha sido aceptado por todos y formado parte de nuestras costumbres. El problema es que, actualmente, su ingesta se ha convertido en un marcado hábito para jóvenes y adultos (Informe EDADES, 2013).

Este hecho no deja de preocupar a las autoridades sanitarias, quienes advierten que el consumo abusivo de alcohol está relacionado con multitud de enfermedades y desórdenes metabólicos. En concreto, el consumo de alcohol es un factor causal de más de 200 enfermedades y trastornos: está asociado con el desarrollo de trastornos mentales y comportamentales, incluido el alcoholismo, importantes enfermedades como cirrosis hepática, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, así como traumatismos derivados de la violencia y los accidentes de tráfico. Recientemente, se han establecido relaciones causales entre el consumo nocivo y la incidencia de enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis y el VIH/sida. Todo ello sin contemplar además, las repercusiones del alcohol en la evolución de otros trastornos que padezca el individuo y en sus resultados (OMS, 2015). En cualquier caso, la causalidad entre el consumo excesivo de alcohol y el desarrollo de lesiones hepáticas es la más conocida y estudiada a lo largo de los años, ya que el alcohol, es considerado hoy día, uno de los motivos más frecuentes de carcinoma hepático, y el segundo de trasplante hepático en el mundo (Carreras y Castellanos, 2012). De hecho, se recoge bajo la denominación de “hepatopatía alcohólica” (HPA), al espectro de lesiones provocadas en el hígado por el etanol, y en ella se incluyen tres síndromes evolutivos: la esteatosis hepática alcohólica (EHA), la hepatitis alcohólica (HA) y la cirrosis hepática alcohólica (CHA); tres entidades anatomoclínicas de las que la EHA representa la fase inicial, mientras que la HA y la CHA constituyen etapas más graves de la misma enfermedad (Carreras y Castellano, 2012).

Según el informe 2016 del Plan Nacional sobre Drogas, en España, el alcohol sigue siendo la sustancia psicoactiva más consumida. Se estima que 1.600.000 personas de 15-64 años tienen un consumo de alcohol de riesgo, lo que representa el 5% de la población en este rango de edad. Y es que la prevalencia de consumo de bebidas alcohólicas en la población de 15-63 años ha alcanzado en el año 2013 un porcentaje del 93'1%, superior al 90'9% del año 2011. De esta población, el 45'7% ha bebido alcohol en días laborables en el último mes, y el 99'1% también en fines de semana. Las cifras mostradas son alarmantes, teniendo en cuenta que cada

vez son más conocidos los efectos adversos de esta práctica, y que además, se ha observado desde el año 2009, un leve descenso de la percepción de riesgo de consumo.

Pero más allá de las consecuencias sanitarias, el consumo nocivo de alcohol provoca pérdidas sociales y económicas importantes, tanto para las personas como para la sociedad en su conjunto. En las últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos en el ámbito de la ciencia de la salud para intentar evaluar el impacto del consumo de alcohol desde una perspectiva económica.

A continuación, se muestra una tabla que presenta los costes sanitarios directos (hospitalizaciones) asociados a la morbilidad total y parcialmente atribuible al alcohol en el Estado español en 2007, los costes indirectos de la mortalidad atribuible al alcohol, y los costes indirectos del absentismo laboral por hospitalización (Tabla 1).

Coste	Año	Número de casos hombres	Número de casos mujeres	Coste total en €
Morbilidad totalmente atribuible	2007	15.616 altas hospitalarias	3.414 altas hospitalarias	40.604.853,36
Morbilidad parcialmente atribuible APVP	2007	85.095 altas hospitalarias	61.050 altas hospitalarias	311.818.218
Baja laboral totalmente atribuible	2004	100.716 años	23.799 años	2.308.362.090
Baja laboral parcialmente atribuible	2007	169.902 días	40.627 días	12.072.075
TOTAL				2.760.090.194,36

Tabla 1. Coste directo e indirecto del consumo de alcohol en el Estado español, 2007. Cuadro extraído del artículo “Impacto social del consumo abusivo de alcohol en el Estado español. Consumo, coste y políticas”, publicado por la Rev Esp Salud Pública en 2011. Para calcular el coste indirecto de la mortalidad atribuible al alcohol se utilizaron los APVP o Años Potenciales de Vida Perdidos, en el año 2004, las fracciones etiológicas atribuibles al alcohol y el salario medio por sexos de cada comunidad autónoma publicado por el INEM.

Vemos, que sumando el coste total en el año 2007 se alcanza la cantidad de 2’7 millones de euros. Las cifras son impresionantes, aún más, teniendo en cuenta que este cálculo correspondería a una aproximación al coste mínimo, ya que hay costes que no se tuvieron en cuenta por falta de información (atención primaria, menor productividad laboral, etc.).

Pese a la importancia del problema, no contamos con estudios actuales en España que cuantifiquen el impacto económico del alcoholismo en el ámbito sanitario y social.

1.1.2 Metabolismo del alcohol

Tras su ingesta oral, el alcohol es absorbido por las células endoteliales de estómago e intestino hasta llegar a sangre, desde donde se distribuye por todo el organismo. Alrededor del 10% del alcohol absorbido es eliminado mediante la orina, el sudor o la respiración, mientras que el tanto por ciento restante es metabolizado por la vía oxidativa del metabolismo del etanol (Carreras y Castellano, 2012).

Aunque es cierto que el metabolismo oxidativo del etanol comienza en la mucosa gástrica, es en el hígado donde se metaboliza cerca del 90% (Cascales y cols., 1997). En éste órgano el etanol es oxidado en dos pasos consecutivos, que lo transforman primero a acetaldehído (AcH) y después en acetato (Hernández y cols., 2014).

En el hepatocito existen tres sistemas enzimáticos capaces de oxidar el etanol a AcH: el sistema de la vía alcohol-deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo (SMOE) y la vía de la catalasa (Hernández y cols., 2014).

El sistema de la vía ADH es la principal vía de oxidación del alcohol (en condiciones normales metaboliza cerca del 80-90% del alcohol) y se localiza fundamentalmente en el citosol de los hepatocitos, y secundariamente en estómago, intestino delgado, riñón y cerebro (Carreras y Castellano, 2012). La actividad de la ADH se basa en transferir el hidrógeno del sustrato al cofactor NAD⁺, transformándolo en NADH y produciendo AcH.

El SMOE, localizado en el retículo endoplasmático, actúa principalmente cuando se encuentra saturada la capacidad de la ADH. Su actividad es pues, un mecanismo de adaptación en el alcoholismo crónico, que promueve la proliferación del retículo endoplasmático del hepatocito. Esto se debe a que en éste orgánulo se halla la isoforma del citocromo P450 inducible por el etanol, conocida como CYP2E1 y capaz de oxidar el etanol utilizando NADPH y oxígeno molecular. Su hiperestimulación produce un exceso de radicales libres [anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[·])] y el consiguiente estrés oxidativo. Se calcula que esta vía contribuye en un 10% en el metabolismo del alcohol (Carreras y Castellano, 2012).

La vía de la catalasa, localizada en los peroxisomas, oxida el etanol usando una molécula de H₂O₂. Aunque en condiciones fisiológicas, esta vía no tiene un papel relevante en la eliminación del alcohol, en el alcoholismo crónico, donde la concentración de H₂O₂ es mayor, tiene un papel más destacado (Hernández y cols., 2014).

El AcH producido por las tres vías metabólicas descritas, es metabolizado a acetato y se incorpora al ciclo de Krebs en forma de acetilcoenzima A. Dicha reacción es catalizada

fundamentalmente por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), de la cual se conocen dos isoenzimas: una se localiza en el citosol y se activa cuando la concentración de AcH es elevada (ALDH-1); la otra se encuentra en las mitocondrias y actúa en condiciones fisiológicas (ALDH-2) (Carreras y Castellano, 2012). Esta enzima necesita NAD^+ como cofactor, por lo que conlleva a la disminución de su concentración en mitocondrias. También existen otras enzimas capaces de metabolizar el AcH, como la xantina oxidasa (XO) y la aldehído oxidasa (AO), aunque su afinidad por el AcH es baja (Hernández y cols., 2014).

Además, y aunque es menos importante, se ha descrito una vía no oxidativa de etanol, catalizada por la ácido graso etil ester sintetasa (FAEE), y que implica la formación de etil éster de ácidos grasos y fosfatidil etanol, compuestos sumamente tóxicos para diversos tipos celulares y tejidos (Hernández y cols., 2014).

A continuación, se muestra una figura resumen de los diferentes procesos que sufre el alcohol durante su paso por el organismo (Figura 1).

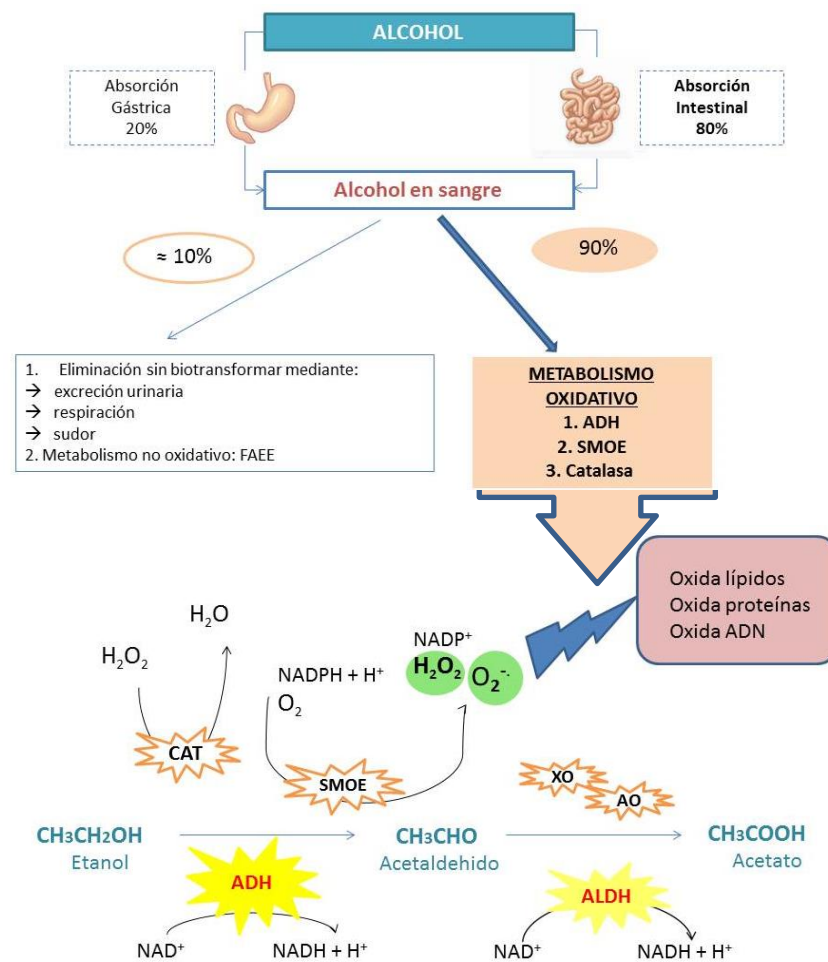


Figura 1. Metabolismo del alcohol. Imagen modificada de "Pathogenesis of alcoholic liver disease" (Sugimoto y Takei, 2017).

1.1.3 Alcohol y estrés oxidativo

Actualmente se acepta que el mecanismo por el cual el etanol produce daño hepático es multifactorial, y en él participan los efectos dañinos del alcohol y de su metabolismo junto con factores de susceptibilidad individual (Carreras y Castellano, 2012). Sin embargo, cada vez más autores lo achacan a su alta capacidad pro-oxidante para generar estrés oxidativo durante su metabolismo oxidativo (Galicia y Gutiérrez., 2014; Ceni y cols., 2014; Hernández y cols., 2014).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre especies químicas pro-oxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) y antioxidantes, modificado a favor de las primeras (Sugimoto y Takei, 2017). Estos radicales libres, son entes químicos muy inestables caracterizados por presentar un par electrónico desapareado, y que reaccionan con otros átomos o moléculas cercanos en busca de estabilidad, alterando así las biomoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) (Hernández y cols., 2014).

Por una parte, la cadena respiratoria mitocondrial, seguido de otras reacciones de oxidación-reducción catalizadas por las enzimas NADPH deshidrogenasa, XO y otras deshidrogenasas, actúan como fuente principal de especies reactivas de oxígeno (EROs) (debemos saber, que el término radical libre y ERO son utilizados a la par, sin embargo, el término ERO se refiere a aquellas moléculas químicas reactivas que son derivadas del oxígeno, y que incluyen al radical O_2^- , H_2O_2 y OH^{\cdot} , entre otros (Hernández y cols., 2014). Pero además, las EROs también pueden producirse en los hepatocitos por sustancias exógenas, como toxinas ambientales, xenobióticos, radiación, etc. (Conde de la Rosa y cols., 2008).

Frente a este hecho, y dado que el equilibrio oxidativo del organismo es fundamental para la regulación metabólica, nuestro organismo ha desarrollado a lo largo de los años, mecanismos celulares de protección antioxidante que previenen la formación de radicales libres o promueven su detoxificación. Los antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grandes grupos de moléculas: el primero y más importante, conformado por las enzimas antioxidantes; y el segundo, formado por antioxidantes de menor tamaño y peso molecular, entre los que se encuentran las vitaminas E y C, el glutatión reducido (GSH), los carotenos, los compuestos fenólicos, etc. (Hernández y cols., 2014).

Con respecto a las enzimas antioxidantes, podemos nombrar a la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Éstas actúan en sincronización para reducir o eliminar eficientemente a las EROs O_2^- y H_2O_2 para transformarlos en oxígeno y agua. Al mismo tiempo, impiden la interacción de éstos

con metales de transición, inhibiendo la formación (reacción de Fenton) del radical más reactivo, que es el radical OH^\cdot (Hernández y cols., 2014).

El mecanismo que sigue este sistema de defensa enzimático es el siguiente: la enzima SOD se encarga de la dismutación de radicales O_2^\cdot a H_2O_2 , los cuales, aunque son más estables, siguen teniendo una alta reactividad. Es entonces la CAT la que actúa produciendo la dismutación y peroxidación de dos moléculas de H_2O_2 para producir oxígeno y agua. Por su parte, la GPx actúa como mecanismo complementario a la CAT, puesto que se encarga de la degradación del H_2O_2 a concentraciones bajas, a la par que oxida su sustrato fisiológico, el GSH, a glutation oxidado (GSSG). Es la GR, la enzima encargada de devolver el GSSG a su forma reducida (Hernández y cols., 2014). Véase Figura 2.

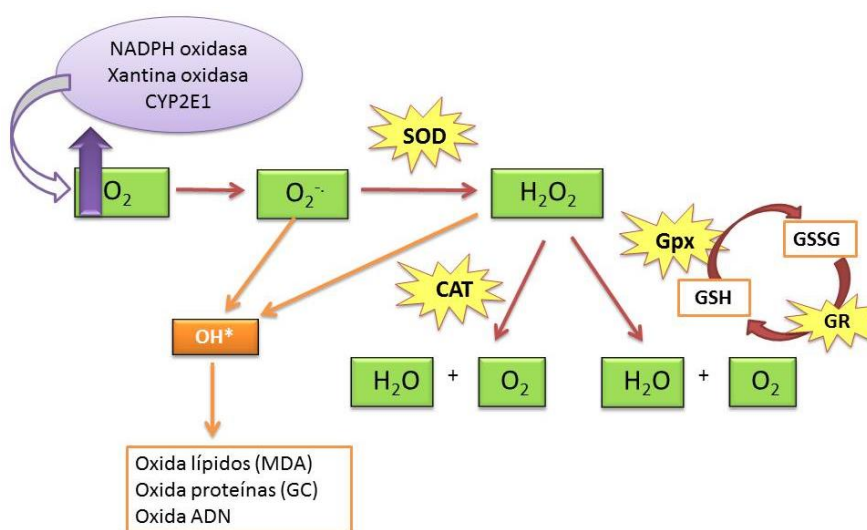


Figura 2. Reacciones enzimáticas acopladas al metabolismo del etanol para eliminar las EROs.

En los seres vivos, la concentración de EROs, es normalmente muy baja, y rara vez adquiere valores lo suficientemente altos como para poner en peligro la integridad molecular. Sin embargo, el consumo de etanol es un detonante muy importante para la generación de estrés oxidativo en el hepatocito, y ya sea a corto o largo plazo, puede desencadenar la muerte de la célula, el tejido y el organismo en general (Hernández y cols., 2014).

Los mecanismos implicados en la generación de EROs durante el metabolismo del etanol incluyen los siguientes: cadena mitocondrial de transporte electrónico, el SMOE, y la NADPH oxidasa, entre otros (Cascales y cols., 1997). Figura 3.

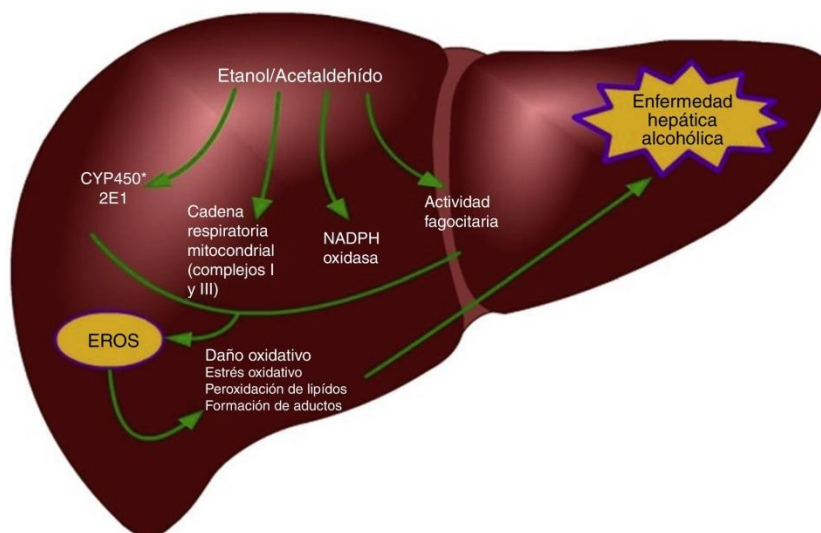


Figura 3. Principales fuentes generadoras de EROs producidas en el hígado durante el consumo de etanol. Imagen extraída del artículo “Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica”, Galicia y Gutiérrez, 2014.

Las evidencias sugieren que el SMOE es la fuente más importante de EROs en hepatocitos en casos de intoxicación etílica crónica (Cascales y cols., 1997), debido por una parte a su propia actividad y por otra otra, a que tiene un especial alto índice en la actividad de la NADPH oxidasa, permitiendo de este modo la producción de grandes cantidades de radical O_2^- y H_2O_2 (Galicia y Gutiérrez, 2014). Dicho de otra forma, el contenido de CYP2E1 en microsomas hepáticos, que aumenta con el consumo crónico de etanol (Carreras y Castellano, 2012), está relacionado también con el aumento de la actividad NADPH oxidasa y la peroxidación lipídica (Galicia y Gutiérrez, 2014).

Además, el aumento del consumo de NADPH, cofactor empleado por el SMOE durante el metabolismo del alcohol, obstaculiza la síntesis de GSH, antioxidante endógeno, cuya regeneración por la GR requiere, asimismo, el uso de NADPH como cofactor. La disminución de la concentración de este antioxidante, va unida a la consecuente disminución de la actividad de la enzima antioxidante GPx (que a su vez utiliza el GSH como cofactor), lo que favorece la oxidación y producción de EROs.

Otro mecanismo implicado en el incremento de las EROs durante el consumo de alcohol, está vinculado a alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial. La oxidación del etanol aumenta la demanda de oxígeno por parte del hepatocito. Como producto directo de la oxidación del etanol a AcH, se genera un exceso de equivalentes reductores en el citosol (donde se encuentra la enzima ADH), los cuales no se pueden oxidar directamente en la mitocondria porque sus membranas son impermeables al NADH. Por esta razón, el proceso de reoxidación del NAD^+ , se lleva a cabo mediante los sistemas lanzadera-sustrato, cuya función es llevar las

especies reducidas desde el citosol a las mitocondrias, oxidarlos y finalmente transportarlos de vuelta al citosol. Este proceso, incrementa pues el consumo de oxígeno en las mitocondrias. Ello sumado a la oxidación del AcH a acetato por la ALDH que está en la mitocondria, estimula aún más el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria por el incremento de especies reducidas y la alteración del equilibrio redox (Hernández y cols., 2014). De este modo, el creciente gasto de oxígeno en la cadena respiratoria provoca la generación de EROs (Hernández y cols., 2014).

Análogamente, este estado de hipoxia en el hepatocito, causado por la elevación de NADH, provoca el cambio de la actividad de la xantina reductasa a XO. Ésta última cataliza la oxidación de la hipoxantina hasta ácido úrico, con la consiguiente formación de readicales O_2^- y H_2O_2 (Hernández y cols., 2014).

Todos estos mecanismos fruto del metabolismo del alcohol, y la generación de estrés oxidativo, son el motivo por el cual el consumo crónico de alcohol está relacionado con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades como la diabetes, carcinoma hepatocelular, esteatosis y fibrosis hepática. Este estado, puede detectarse a través de la medición de los productos de las reacciones oxidativas que tienen los radicales libres con las macromoléculas (peroxidación lipídica, oxidación del ADN, oxidación de proteínas, etc.), mediante la reducción de moléculas antioxidantes o por la modificación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

1.2 Ácido Fólico

1.2.1 Generalidades

El ácido fólico, también conocido como folina o vitamina B₉, es una vitamina hidrosoluble que gracias a su capacidad de transferir unidades de carbonos, interviene en numerosas e importantes reacciones metabólicas. Entre éstas destaca la síntesis de purinas y pirimidinas, y por tanto de ácidos nucleicos, y el metabolismo de aminoácidos como la metionina, la glicina y la histidina (Fowler, 2001).

Esta vitamina pertenece a un grupo de compuestos, denominados folatos, cuya actividad está relacionada. Todos los folatos tienen en común la misma estructura: un anillo de pteridina unido por un puente metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico que a su vez se une por un enlace amida a un residuo de ácido glutámico (Varela y Alonso, 1999).

Los humanos no somos capaces de sintetizar esta molécula de novo, siendo por tanto la única fuente la ingesta a través de la dieta. En los alimentos encontramos principalmente folatos naturales o reducidos, como por ejemplo derivados del tetrahidrofolato (THF), cuya biodisponibilidad se estima en un 50%. Así surge el ácido fólico como compuesto sintético,

usado en la suplementación y enriquecimiento de alimentos por su estabilidad y por llegar activo al intestino después de su reducción, y cuya biodisponibilidad es del 85%. En general, los folatos presentan una vida media de 100 días, posteriormente son eliminados del organismo a través de las vías fecal y urinaria, sin riesgo de daño por acumulación (Ros, 1999).

La ingesta adecuada de folatos es vital para la división celular y la homeostasis debido al papel esencial de las coenzimas folato en la síntesis de ácidos nucleicos, regeneración de la metionina, y en el transporte, oxidación y reducción de unidades de un carbono requeridas para el normal metabolismo y regulación (Wagner, 1995). Durante periodos de deficiencia de folatos, los cambios bioquímicos asociados a su actividad, permiten observar el comienzo de anomalías en el metabolismo del carbono que pueden resultar en un aumento del riesgo de ciertos tipos de enfermedades crónicas y desórdenes del desarrollo (Mason, 1995).

1.2.2 Ácido fólico y estrés oxidativo

Como ya se explicó anteriormente, un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por interacción y estabilización de especies reactivas o por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida (Hernández y cols., 2014).

La capacidad antioxidante del ácido fólico *per se*, descrita en multitud de trabajos, es debida a su capacidad para oxidarse cediendo protones, actuando por tanto como agente reductor (Abilés, 2007). De este modo, esta vitamina ejerce como un eficaz depurador de radicales libres.

Además, varios estudios recientes, han demostrado el mecanismo por el cual desempeña un importante efecto antioxidante. Al parecer, el ácido fólico disminuye la actividad de la enzima NADPH oxidasa (NADPHo), que libera superóxido y produce un aumento de la producción de EROs en riñón (Hwang y cols., 2011) e hígado (Sarna y cols., 2012); a la vez, también interacciona con el enzima óxido nítrico sintasa (NOS), reduciendo la formación de peroxinitrinas pro-oxidantes (Stanger y Wonisch, 2012). Pero quizás el mecanismo antioxidante más importante resida en el hecho de que alivia el agotamiento del GSH hepático a través del ciclo de la metionina, aumentando uno de los sistemas de defensa antioxidante endógeno más importante de nuestro organismo (Zhao y cols, 2014).

1.3 Alcohol y Ácido Fólico

La carencia de folatos se produce especialmente en ciertas poblaciones de riesgo, y bajo una serie de circunstancias especiales. La deficiencia de folatos es la deficiencia vitamínica más frecuente en los alcohólicos crónicos (Halsted, 1995), como consecuencia de varios mecanismos: la malnutrición que lleva asociada esta enfermedad y en tanto la disminución de la ingesta sólida de ácido fólico (Lieber, 2003), la disminución específica de la absorción de esta vitamina y la perturbación del metabolismo de los folatos por efecto del alcohol, que secuestra los folatos a nivel hepático (Medici y Halsted, 2013).

Estudios experimentales llevados a cabo en humanos y animales, afirman que la exposición a alcohol de forma continuada, altera la homeostasis de los folatos. Aparentemente, esto se debe a los daños producidos por el alcohol sobre las proteínas transportadoras de los folatos en el intestino, la captación hepática y la excreción urinaria de éstos por alteraciones ocasionadas en la membrana de los túbulos renales (Villanueva y cols, 2001).

Por una parte, el daño tisular inducido por el alcohol en los hepatocitos, compromete las funciones hepatobiliares, y en consecuencia, el metabolismo hepático del ácido fólico, pudiendo afectar al transporte de membrana, almacenamiento y/o excreción de éste. Así diversas investigaciones sugieren que el etanol aumenta la retención hepática de folatos, inhibiendo su flujo desde el hepatocito a la bilis y por tanto, disminuyendo la excreción biliar. Esto se traduce en un daño en la circulación enterohepática y su biodisponibilidad (Steinberg y cols., 1980; Blocker y Thenen, 1987; Fernández-Borrachero y cols., 1998).

Por otro lado, y posteriormente, se descubrió que el consumo crónico de etanol, afecta a los transportadores de folatos, disminuyendo la concentración de éstos en la membrana de diferentes tejidos, como la membrana del borde en cepillo del yeyuno, la membrana plasmática hepática y la membrana del borde del cepillo del riñón, explicándose así la malabsorción de esta vitamina (Villanueva y cols, 2001). Además, se ha visto que cuando existen altos niveles de AcH generado por el metabolismo del alcohol, éste interacciona con los tetrahidrofolatos, afectando a su concentración intestinal y sistémica (Homann y cols, 2000). De este modo, podemos concluir, que el alcohol afecta principal y específicamente al metabolismo de este nutriente.

Parece por tanto interesante, analizar la suplementación con fólico en ratas alcohólicas crónicas desde un punto de vista antioxidante, estudiando los posibles efectos que esta vitamina pudiera tener en las enzimas antioxidantes endógenas y en la oxidación lipídica en hígado.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar, experimentalmente, el balance oxidativo en el hígado de ratas adultas sometidas a un tratamiento crónico de alcohol. Para ello se determinará la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GPx y GR) que actúan a nivel del hígado, así como la presencia o ausencia de marcadores de peroxidación lipídica, posible reflejo del daño oxidativo que el consumo crónico de alcohol pudiera producir en este tejido. Además y dado que el déficit de ácido fólico, una sustancia con excelentes propiedades antioxidantes, es la deficiencia vitamínica más común en los bebedores asiduos, se evaluará la eficacia de la suplementación de esta vitamina como antioxidante hepático.

Por otra parte, y con el propósito de obtener un análisis completo de los efectos oxidativos del alcoholismo crónico en los principales órganos, teniendo en cuenta que cada tejido metaboliza el alcohol por la vía oxidativa de un modo diferente, se establece un segundo objetivo: realizar una comparativa, gracias a los datos aportados por otros estudios ya realizados por este grupo de investigación, de los efectos sobre el balance oxidativo del consumo crónico de alcohol y de la suplementación de ácido fólico en corazón, hígado y riñón, analizando sus posibles implicaciones funcionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para llevar a cabo el presente ensayo se emplearon 24 ratas macho de la raza Wistar. El diseño de este estudio experimental está de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington, DC, 1966), la cual fue aprobado por el Comité de Uso Animal para la Investigación en la Universidad de Sevilla, España (RD 1201/2005, de 10 de octubre de 2005).

Las ratas, provenientes del Centro de Producción y Experimentación Animal, Oficina de Investigación Científica de la Universidad de Sevilla, y con un peso de entre 250-300g, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 6 ratas cada uno, separadas y alojadas en jaulas de acero inoxidable, para recibir el tratamiento correspondiente a cada grupo. Durante este tiempo, las ratas se instalaron en el animalario de la Facultad de Farmacia, a una temperatura de entre 22 y 23 °C, con ventilación adecuada, y donde se mantiene un ciclo de 12h de luz y oscuridad.

El tratamiento aplicado consiste en: agua y dieta base para grupo control (C); etanol en agua de bebida y dieta base para grupo alcohol (A); etanol en agua de bebida, y dieta base suplementada con ácido fólico para grupo alcohol fólico (AF); agua y dieta base suplementada

con ácido fólico para grupo alcohol fólico (CF). El periodo experimental duró 8 semanas, y se dividió en dos fases de 4 semanas: Fase 1 o de inducción alcohólica, y Fase 2 o de alcoholismo crónico. La dieta, el agua y la solución de etanol, se proporcionan *ad libitum*.

Al final de esta etapa se realojaron de forma individual a las ratas en jaulas de metabolismo y se mantuvieron en ayunas durante 12 h.

Dieta basal y tratamiento con etanol

La dieta fue preparada de acuerdo con el Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio (ILAR, 1979), cuya composición en g/kg de dieta es la siguiente: Caseína 200g, Sacarosa granulada 510g, Almidón de maíz 140g, Fibra (celulosa) 50g, Aceite de maíz 50g, Mezcla mineral AIN-76 35g, Mezcla de Vitaminas AIN-76 10g, Bitartrato de colina 2g y DL-metionina 3g. Tras mezclar los ingredientes, se homogeneizaron en una mezcladora de doble cono y se ofreció a los animales como pellets. El contenido de ácido fólico en la dieta, para los grupos suplementados (AF y CF) era de 8 ppm de ácido fólico por kg de pienso, mientras que el de los grupos no suplementados (A y C) era de 2 ppm de ácido fólico por kg de pienso.

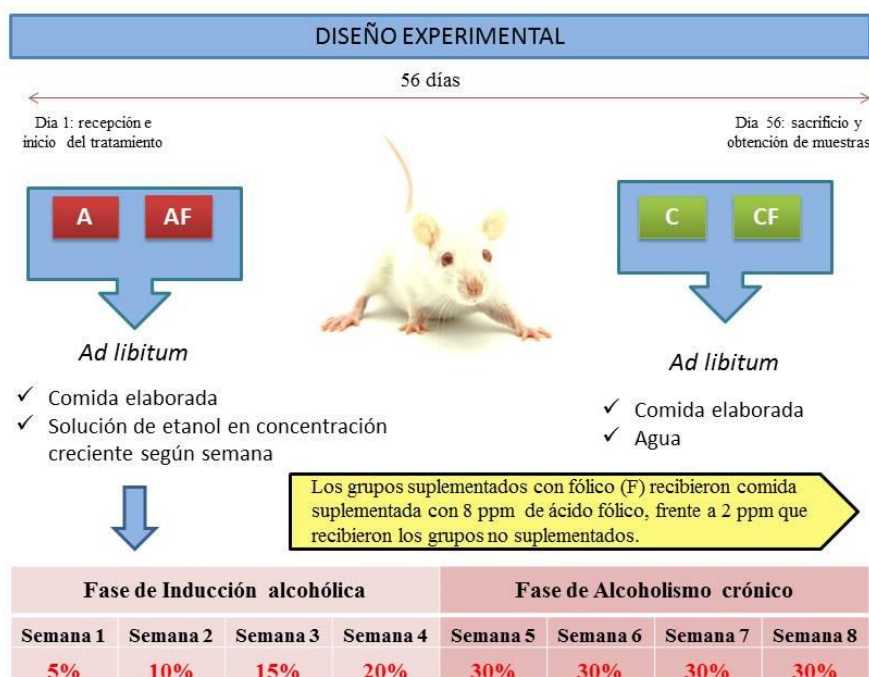


Figura 4. Tratamiento experimental aplicado.

Con respecto al tratamiento empleado con etanol, sigue las pautas ya utilizadas y dictadas por el grupo de investigación para el que se realiza el presente trabajo (Carreras y cols., 1992). Se mezclaron cantidades conocidas de alcohol con agua del grifo, aumentando de forma paulatina y creciente en el tiempo las concentraciones de alcohol en la bebida, y por tanto ingeridas por los animales del grupo (A y AF) (Figura 4). Así la primera semana, fase inicial, la concentración de alcohol en el agua de bebida era del 5% v/v, lo que aumentó en un 10%, 15%

y 20%, durante la segunda, tercera y cuarta semana respectivamente, hasta alcanzar la concentración de 30%, la cual se mantuvo durante un mes: fase de alcoholismo crónico. Los grupos control, bebieron agua durante las 8 semanas.

A lo largo de todo este tiempo, se midió la ingesta sólida y líquida de las ratas y se pesaron los animales utilizando balanzas analíticas precisas.

Control de la ingesta

La ingesta sólida de las ratas se calculó por diferencia de peso del alimento aportado a cada grupo cada 24 horas, y dividido entre el número de ratas presentes.

Para calcular la cantidad de etanol consumido al día por las ratas, se utilizó la “Tabla para determinar los valores de gramos de soluciones de etanol”, ideado por Veale y Myers (1968), y que varía en función del volumen ingerido y el porcentaje de alcohol.

Muestras

Al final del periodo experimental, se pesaron las ratas y se anestesiaron con una solución previamente elaborada de uretano intraperitoneal al 28% p/v (Sigma-Aldrich, St Louis, USA): 0,5 ml/100g de peso corporal. Tras la anestesia se dio muerte al animal por extracción de sangre de la cavidad cardíaca. La sangre se llevó a centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. para obtener el suero, que se almacenó inmediatamente a -80°C. Seguidamente y por laparotomía, se extrajo el hígado, se pesó y después se almacenó también a -80 °C para su conservación hasta el momento de los análisis. El peso del hígado se utilizó para determinar el índice organosomático (IOS), es decir, el desarrollo de este órgano con respecto al peso de cada animal, con el fin de corregir la posible influencia del tamaño del animal sobre el peso del tejido.

Determinación de la actividad enzimática antioxidante

Para medir la actividad de las enzimas antioxidantes así como la oxidación de lípidos en hígado, se procedió a la homogeneización de las muestras de tejido. Para ello se empleó por una parte, y como medio, un tampón de homogeneización compuesto por sacarosa 250 mM, TRIS/HCl 15 mM, DTT 1 mM y EDTA 1 mM, y por otra, un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón (Pobel 245432, España), acoplado a un motor con una velocidad de giro de 2500 rpm, siempre manteniendo la temperatura del órgano con ayuda de un baño de hielo. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C para eliminar posibles gránulos, y el sobrenadante se dividió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta el momento de las determinaciones.

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por técnicas colorimétricas, utilizando para ello un espectrofotómetro de UV-VIS modelo Hitachi U-2800A. La espectrofotometría UV-VIS es una de las herramientas más útiles en el análisis cuantitativo, elegida por su alta sensibilidad, selectividad, precisión y facilidad de manejo. La base de la aplicación de los métodos espectrofotométricos UV-VIS al análisis cuantitativo es la ley de Lambert Beer, que relaciona la absorbancia de la muestra con la concentración del analito según la ecuación:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c.$$

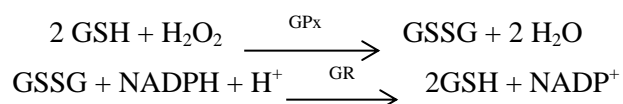
La primera determinación que se llevó a cabo fue la de proteínas totales, mediante el método de Lowry y cols. (1951). Éste es un método colorimétrico de valoración, basado en dos reacciones químicas: la primera es la unión de los iones de cobre a las proteínas de la muestra en condiciones alcalinas, los cuales forma un complejo con los enlaces peptídicos; la segunda es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, que da lugar a la formación de un compuesto coloreado, absorbible a 750 nm. Posteriormente, a través de una curva de calibrado realizada con albúmina de suero (BSA) como patrón, y por interpolación de los valores de absorbancia, se obtiene la concentración de proteínas de la muestra problema.

El procedimiento consiste en preparar una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 1mg/ml, a partir de la cual se elaboran cuatro soluciones estándares cuyas concentraciones son: P1: 0.1 mg/ml, P2: 0.05 mg/ml, P3: 0.025 mg/ml y P4: 0.0125 mg/ml. A continuación, en tubos de ensayo se mezclan 5 ml de reactivo D (formado por SO_4Cu , tartrato Na/K, NaOH y Na_2CO_3) con: 1 ml de homogeneizado de hígado de ratas (diluido con agua bidestilada 1/500, para las enzimas antioxidantes), 1 ml de estándares en el caso de los patrones o 1 ml de agua bidestilada en el caso del blanco, y se dejan reposar durante 15- 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 0.5 ml de reactivo E (formado por la mezcla de reactivo de Folin y agua) a los tubos, se agitan y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a 750 nm.

La actividad de la enzima SOD fue determinada a través del método de Fridovich (1985). Éste método de detección espectrofotométrica se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la reducción del citocromo C por el radical O_2^- en un medio de reacción que contiene xantina y XO como generadores de dicho radical. Así pues, el grado de inhibición de esta reacción es indicador de la actividad SOD, y se manifiesta mediante una disminución de la absorbancia a 550 nm comparable frente al blanco de la muestra (exento de XO). Los resultados se expresan como U/mg de proteína, siendo U, la unidad enzimática o cantidad de SOD requerida para producir una inhibición del 50% de la reducción del citocromo C. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente: en una microcubeta se depositaron todos los

reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, excepto la XO: 490 µl de TPK, 200 µl de xantina, 200 µl de citocromo C, 100 µl de NaCN, 100 µl de catalasa y 10 µl de muestra (homogeneizado hígado). A continuación, se inició la reacción adicionando 10µl de XO, y se observó el aumento de absorbancia a 550 nm durante 3 minutos, debido a la reducción del citocromo C. Para medir la reducción neta del citocromo C (es decir, aquella debida a la acción de los radicales O₂⁻ formados por el sistema xantina/XO en ausencia de SOD), se realizó una medida de referencia que se procesó de la misma forma pero no contenía muestra. Las muestras problema se midieron frente a su blanco de muestra, que se procesó de la misma forma pero la reacción no se inició con la adición de XO.

La actividad de la enzima GPx, se determinó según el método descrito por Lawrence y Burk (1976), que mide la disminución de la absorbancia (a 340 nm) que se produce como consecuencia de la oxidación del NADPH en presencia de un exceso de GR, según la siguiente reacción acoplada:



El NADPH es un cofactor, empleado por la enzima GR en su actividad para reponer el GSH que consume la GPx. Así pues, un índice alto de oxidación de NADPH indica alta actividad de GPx. Procedimiento: en una microcubeta de 1.5 ml de capacidad, se añaden 300 µl de TPK, 100 µl de EDTA, 100 µl de NaN₃, 100 µl de NADPH, 100 µl de GSH, 100 µl de GR y 100 µl de homogeneizado de hígado de ratas (dilución 1/40). Después de incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se inicia la reacción con la adición de 100 µl de H₂O₂ y se determina la actividad GPx siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Las muestras problema se midieron frente al blanco, que se trató de la misma manera y que contenían agua bidestilada (200 µl) en lugar de H₂O₂, para evitar el comienzo de la reacción. La actividad se expresó como mU/mg de proteína, donde 1 mU es igual al número de nanomoles de NADPH oxidado/min.

Por su parte, y como ya hemos explicado, la GR es una enzima dependiente de NADPH, que cataliza la reducción de GSSG a GSH. Para su determinación se siguió el método espectrofotométrico descrito por Worthington y Rosemeyer (1974) ligeramente modificado, donde se mide la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH. Para la determinación en homogeneizado de hígado de ratas, se añadieron en una microcubeta: 590 µl de tampón fosfato, 100 µl de KCl, 100 µl de EDTA, 100 µl de GSSG y 100 µl de NADPH. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició adicionando 10 µl de homogeneizado puro, y se aguardó la disminución de

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

La actividad de la CAT, se determinó mediante el método de Beers y Sizer (1952), basado en la utilización de H_2O_2 como sustrato y la medida espectrofotométrica de su desaparición. Así, una unidad de actividad (U/mg proteína) es igual a la cantidad de micromoles de H_2O_2 degrada/min. El procedimiento seguido fue: en una cubeta de cuarzo, se añadieron 2 ml de TPK y 120 μ l de muestra (homogeneizado de hígado diluido en agua bidestilada 1/120). Posteriormente, se inició la reacción añadiendo 480 μ l de H_2O_2 y se midió la disminución de absorbancia, debida a la reducción del peróxido de hidrógeno, a 240 nm durante 3 minutos. La medida se realizó frente al aire.

Por último, se determinó el grado de oxidación lipídica, cuantificando el malondialdehído (MDA), un producto generado por la degradación oxidativa de los lípidos. Su determinación se basa en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y ácido tricloroacético (TCA) para formar aductos cromógenos estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible a 535 nm (Draper y Hadley, 1990).

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

Transaminasas hepáticas

Al final de la octava semana de experimentación, y antes del sacrificio de los animales, se extrajeron muestras de sangre de cada uno de los animales con el fin de realizar una medición de los niveles séricos de transaminasas hepáticas: Alamina aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST). Para obtener el suero sanguíneo, se centrifugaron las muestras sanguíneas a 3000 rpm durante 5 minutos. La determinación se realizó con ayuda de un analizador automático Technicon RA-1000, de Bayer Diagnostics.

Una vez extraídos los datos, se calculó el ratio entre ambas enzimas: AST/ALT, cuya relación puede proporcionar más información sobre origen del daño tisular.

Tratamiento estadístico

Los resultados han sido expresados como la media \pm SEM, donde n es el número de muestras analizadas. Con el fin de comparar los diferentes variables estudiadas en las diferentes grupos, los datos se analizaron mediante el análisis unidireccional de prueba de varianza (one-way ANOVA) seguida por las pruebas de Tukey-Kramer Software estadístico GraphPad InStat 3. Los valores que se han considerado significativamente estadísticos son de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados experimentales en hígado

Parámetros nutricionales

En la Tabla 2, se muestra el resultado de los parámetros nutricionales medidos durante este ensayo. Se ha observado que la ingesta sólida disminuye de forma significativa en los grupos expuestos a alcohol ($p < 0.001$). Con respecto al consumo de ácido fólico, podemos apreciar, como el consumo de alcohol disminuye notablemente la ingesta de esta vitamina ($p < 0.05$), mientras que los grupos suplementados ingieren más ($p < 0.001$). Al mismo tiempo, se observa que el peso de las ratas alcohólicas tras finalizar la experimentación, es menor que el de sus respectivas controles ($p < 0.001$).

Para corregir la posible influencia del tamaño del animal sobre el peso de los órganos se calculó también el IOS o índice órgano somático del hígado. Los resultados reflejan un aumento del IOS en hígado del grupo A respecto al C ($p < 0.05$), lo que sugiere cierta hepatomegalia, no observada en el grupo AF, a pesar de que ambos grupos ingieren cantidades similares de alcohol. Tras analizar las proteínas totales en hígado, no se obtienen cambios significativos, aunque sí se aprecia una cierta tendencia a la disminución en el grupo A con respecto al grupo C.

	C: n=6	A: n=6	CF: n=6	AF: n=6
Consumo de ácido fólico ($\mu\text{g/rata/día}$)	40.5 \pm 1.8	22.8 \pm 2.5*, ^{aaa}	181.6 \pm 3.3 ^{ccc}	103.2 \pm 3.4 ⁺⁺⁺
Ingesta sólida (g/rata/día)	21.14 \pm 2.5	13.56 \pm 2.5 ^{***}	22.26 \pm 3.2	12.73 \pm 2.2 ⁺⁺⁺
Ingesta líquida etanol (g/rata/día)		3.53 \pm 0.3		3.89 \pm 0.3
Peso corporal (g)	426.6 \pm 9.3	328.7 \pm 9.6 ^{***}	435.4 \pm 9.7	328.5 \pm 9.8 ⁺⁺⁺
IOS hígado	3.21 \pm 0.11	3.75 \pm 0.14*	3.45 \pm 0.16	3.28 \pm 0.09
Proteínas totales en hígado (mg/ml)	35.36 \pm 1.2	30.77 \pm 1.74	25.33 \pm 1.00	31.24 \pm 1.89

Tabla 2. Parámetros nutricionales.

Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. n= número de animales; C, grupo control; A, grupo alcohol; AF, grupo alcohol fólico; CF, grupo control fólico; IOS, índice organosomático. Significancia estadística: A vs. C: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$; AF vs A: ^{aaa} $p < 0.001$; AF vs. CF ⁺⁺⁺ $p < 0.001$; C vs. CF: ^{ccc} $p < 0.001$

Estos datos están dentro de lo esperado, ya que está demostrado que el alcoholismo crónico lleva a un estado de malnutrición, ya sea porque reduce la ingestión habitual de nutrientes esenciales o porque el alcohol impide la adecuada absorción, distribución y metabolismo de los distintos principios inmediatos, vitaminas y minerales (Moreno y Cortés, 2008). Cuando tiene lugar un consumo alcohólico tan importante como en este caso (supone el 30% de las kcal totales de la dieta), esta sustancia actúa reemplazando las kcal de otros nutrientes de la dieta, lo que lleva al individuo a disminuir la ingesta total y al aporte de hidratos de carbono, proteínas y grasas (malnutrición primaria). Es por ello que se dice que el alcohol aporta kcal vacías.

Otro de los efectos nocivos del abuso de etanol, se manifiesta sobre el metabolismo proteico y de diferentes vitaminas. Nuestros resultados muestran un déficit de vitamina o ácido fólico en los grupos alcohol, la cual se sabe que junto con el de vitamina A, es la deficiencia vitamínica más común en los alcohólicos crónicos (Halsted, 1995). Este hecho es consecuencia de la malnutrición primaria, además de los daños producidos por el alcohol sobre las proteínas transportadoras de los folatos en el intestino, la disminución de la captación hepática de folatos y la excreción urinaria de éstos por alteraciones ocasionadas en la membrana de los túbulos renales (Villanueva y cols, 2001).

A lo descrito anteriormente, se suma el escaso valor biológico del alcohol; la energía derivada de su metabolismo no es útil para producir o mantener la masa corporal (se pierde durante el propio metabolismo del alcohol en el SMOE) de modo, que supone una pérdida de peso adicional a la ya producida por la disminución de la ingesta. (Moreno y Cortés, 2008).

Junto al estado de malnutrición hallado en este estudio, encontramos un agrandamiento del tamaño del hígado en el grupo A. La hepatomegalia es un signo de hepatopatía alcohólica, muy común en el diagnóstico físico de la enfermedad hepática alcohólica. De hecho, la hepatomegalia se detecta en el 75% de las hepatitis alcohólicas y en muchos casos de fibrosis hepática (Carreras y Castellano, 2012). Por tanto, es una situación clínica a tener en cuenta, y que concuerda con la hipótesis de la alteración tisular y funcional producida por el estrés oxidativo originado tras el consumo crónico de alcohol. Al mismo tiempo apoya la eficacia antioxidante del ácido fólico, ya que en los grupos suplementados no se observó hepatomegalia.

Actividad enzimática antioxidante

En la Figura 5, podemos observar de forma gráfica la actividad de las distintas enzimas antioxidantes que actúan a nivel del hígado. En ella vemos como la actividad de la SOD, es similar en todos los grupos. Respecto a las enzimas CAT y GPx, muestran un comportamiento semejante: existe una disminución significativa en la actividad del grupo A, con respecto a los

grupos C ($p < 0.01$) y AF ($p < 0.05$); además, el grupo CF muestra un notable incremento de su actividad con respecto al grupo AF ($p < 0.01$). Siguiendo la misma lógica y pauta anterior, la actividad de la GR se encuentra reducida en el grupo A con respecto al grupo C y AF ($p < 0.05$); sin embargo, el grupo CF está aumentado en comparación con el grupo C ($p < 0.01$).

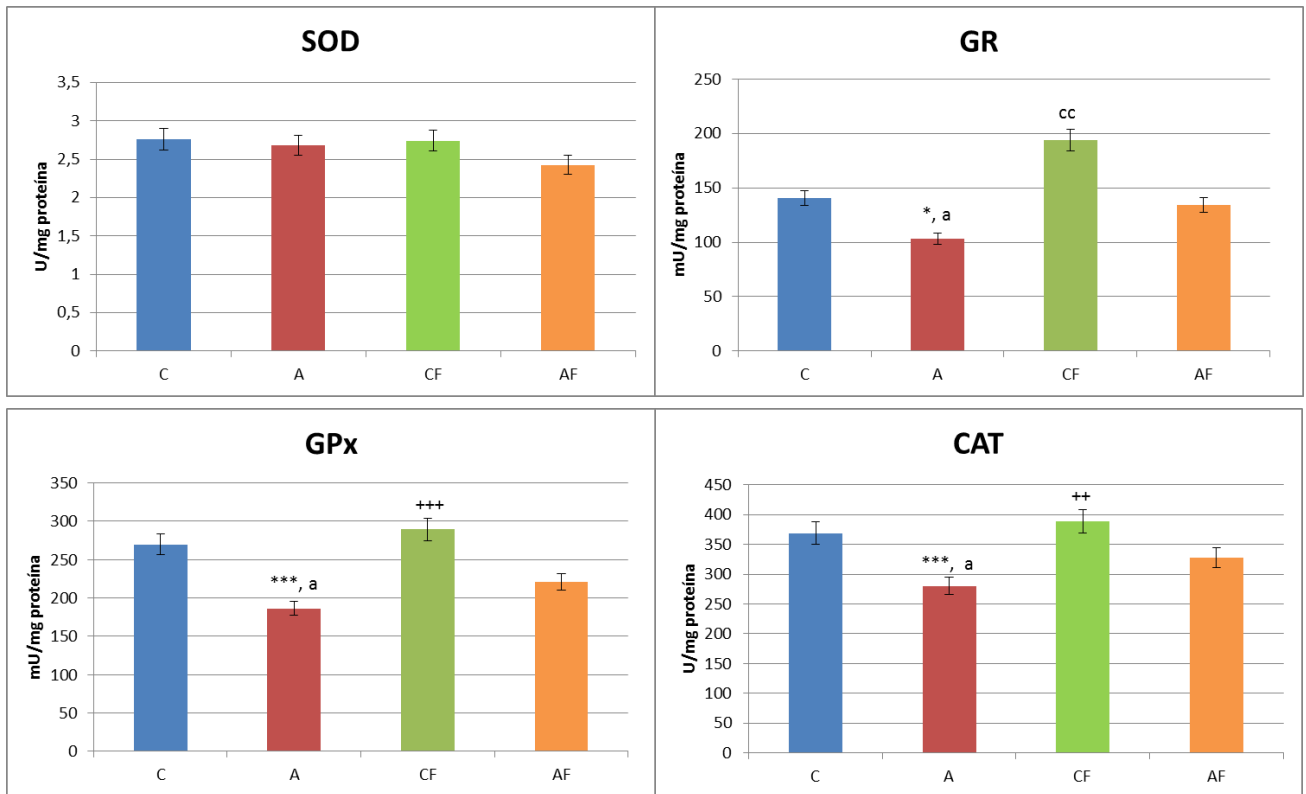


Figura 5. Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR). Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; AF, grupo alcohol fólico; CF, grupo control fólico. Significancia estadística: A vs. C: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$; AF vs. A: ^a $p < 0.05$; AF vs. CF ⁺⁺⁺ $p < 0.001$, ⁺⁺ $p < 0.01$; C vs. CF: ^{cc} $p < 0.01$

Examinando la actividad de estas enzimas a través de los ratios CAT/SOD y GPx/SOD, apreciamos en ambos casos, una disminución significativa en el grupo A con respecto al grupo C y AF ($p < 0.05$). Véase Figura 6.

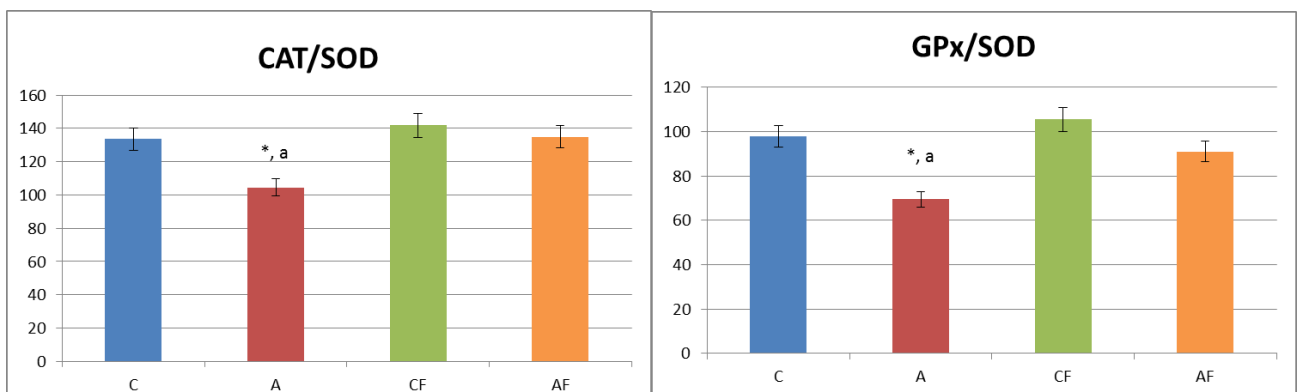


Figura 6. Ratio de la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT/SOD y GPx/SOD. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; AF, grupo alcohol fólico; CF, grupo control fólico. Significancia estadística: A vs. C: * $p < 0.05$; AF vs. A: ^a $p < 0.05$.

Estos ratios, indican el acoplamiento entre la primera enzima antioxidante en actuar, la SOD, que genera H_2O_2 a partir del anión O_2^- , y las enzimas antioxidantes CAT y GPx, encargadas de transformar este H_2O_2 en H_2O . La disminución de su valor en el grupo A, apunta a una acumulación del radical libre H_2O_2 en el organismo, hecho que no se observa aparentemente tras la suplementación con fólico. Por tanto, se aprecian efectos beneficiosos de la suplementación exógena con ácido fólico sobre la actividad y acoplamiento de las enzimas antioxidantes endógenas.

Como ya hemos dicho, el estrés oxidativo, aparece como fruto del desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación o neutralización por parte del sistema antioxidante endógeno. En este estudio comprobamos cómo el consumo crónico de alcohol disminuye la actividad de dos enzimas antioxidantes como son la CAT y la GPx, favoreciendo el aumento de la concentración de H_2O_2 . Tanto el H_2O_2 como el O_2^- pueden interactuar con iones de metales de transición dando lugar, por una serie de reacciones (reacción de Fenton) al radical OH^\cdot , aún más reactivo, y capaz de reaccionar específicamente con el ADN, lípidos y proteínas, y generando el consecuente daño celular.

Por otro lado, se sabe que la concentración de GSH disminuye tras el consumo de alcohol crónico (Kim y cols., 2008). La explicación remonta al hecho de que el estrés oxidativo generado, inactiva la metionina adenosiltransferasa (MAT), que convierte la metionina en S-adenosilmetionina (SAM) (Mato y cols., 1997), molécula que regula la síntesis de GSH por la regulación positiva de cistatina β sintasa y la vía metabólica de la transulfuración de la homocisteína (Halsted y cols., 2002).

Además y como ya hemos visto, el GSH consumido por la GPx durante el metabolismo del H_2O_2 , es repuesto posteriormente por la actividad de la GR, que en este estudio también se ve disminuida. De este modo, el GSH pasaría a encontrarse casi exclusivamente en su forma oxidada (GSSG), forma inactiva, dificultando la acción antioxidante de la GPx. Así el déficit de GSH contribuye especialmente a la alteración de la función mitocondrial por incrementar su sensibilidad a la toxicidad inducida por distintos oxidantes (Conde de la Rosa y cols., 2008).

La causa principal de la toxicidad de estas EROs, es que desencadena la activación de muchos tipos de células hepáticas implicadas en la inmunidad celular. Así activa a las células estrelladas hepáticas (HSC), células dendríticas (DC), y las células de Kupffer (KCs), capaces de producir mediadores inmunes, citoquinas y quimiocinas entre los que se encuentran la IL-6, y TNF- α . Ambos son citoquinas proinflamatorias que inducen la apoptosis celular y en consecuencia producen lesión tisular y fibrosis (Zhanpeng y cols., 2016), favoreciendo la evolución de la hepatopatía alcohólica. Esto mismo, podría explicar la hepatomegalia encontrada.

Asimismo, la razón en parte, por la cual la actividad de la GPx no se encuentra disminuida en los grupos suplementados con fólico, podría residir en el hecho de que esta vitamina incrementa la actividad de la GR durante el consumo de alcohol, favoreciendo la síntesis de GSH. Este efecto es debido por un lado, como ya se comentó, a que el ácido fólico participa en el ciclo de la metionina, que en última instancia favorece la síntesis de GSH (Liu y cols, 2011); y por otro lado a las propiedades antioxidantes que presenta esta vitamina, como *scavenger* o captador de EROs, facilitando la acción de las enzimas antioxidantes (Joshi y cols., 2001).

Por tanto, podemos afirmar que el metabolismo hepatocitario oxidativo del alcohol provoca, probablemente, un aumento de la concentración de H₂O₂, así como una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes fisiológicas, favoreciendo la aparición de estrés oxidativo. También parece ser, que el aporte de ácido fólico, mejora notablemente el balance antioxidante hepático, ya que en tres de las cuatro enzimas antioxidantes estudiadas, la actividad se ve aumentada gracias a la suplementación de esta vitamina.

Oxidación y daño molecular

Con el fin de evaluar si esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes está relacionada con un aumento del estrés oxidativo, nos dispusimos a medir la oxidación de biomoléculas, en concreto del grado de oxidación lipídica en los hepatocitos. Lo observado fue un incremento de la concentración de MDA en el grupo A (Figura 7), lo que se traduce en un aumento de la peroxidación lipídica en el grupo A con respecto al grupo C ($p < 0.01$) y AF ($p < 0.05$).

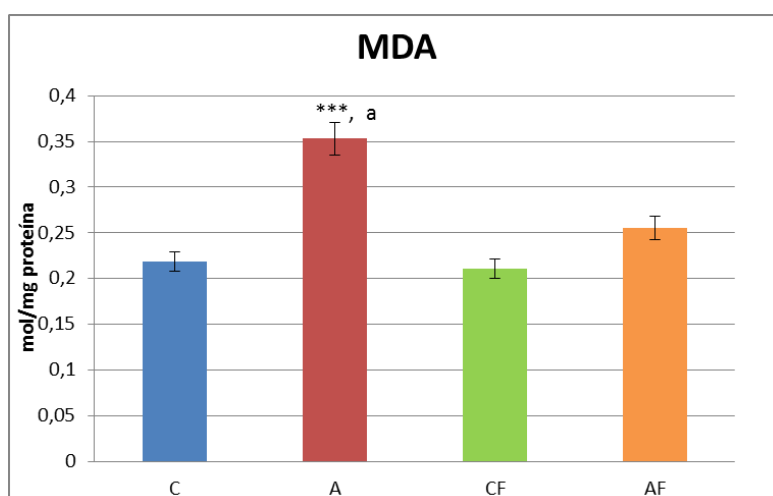


Figura 7. Oxidación lipídica en hígado, relacionada con la concentración de malondialdehído (MDA). Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; AF, grupo alcohol fólico; CF, grupo control fólico. Significancia estadística: A vs. C: *** $p < 0.001$; AF vs A: ^a $p < 0.05$.

La peroxidación lipídica es uno de los daños más representativos de los efectos citotóxicos producidos por el alcohol, así como la respuesta más temprana del hígado al abuso de esta sustancia (Ceni y cols., 2014).

Los ácidos grasos presentes en las membranas biológicas presentan una estructura muy vulnerable frente a la oxidación (Hernández y cols., 2014); eso sumado al hecho de que los lípidos poliinsaturados son esenciales para el completo soporte del sistema de la célula, hace que la alteración que provoca el daño oxidativo inducido por el alcohol sobre sus propiedades estructurales, pueda tener terribles consecuencias para la función celular. Estas alteraciones estructurales a las que nos referimos, van desde la destrucción de las membranas biológicas hasta la inhibición de las enzimas mitocondriales y β -oxidantes peroxisomales (Sugimoto y Takei, 2017).

El resultado inmediato, es la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos. Según Ceni y cols. (2014), la causa de la acumulación de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado durante el consumo de alcohol, está relacionada con las vías de regulación de síntesis lipídica, oxidación y exportación de lipoproteínas de muy baja densidad, que dependen en parte del estrés oxidativo sufrido en este tejido.

En primer lugar, el etanol reduce la tasa de β -oxidación y estimula la absorción de ácidos grasos en hígado. Por otro lado, el metabolismo del etanol por la ADH provoca tanto el aumento del consumo de NAD^+ , como la generación de su equivalente reducido, incrementándose también la relación NADH/NAD^+ mitocondrial; así, muchas de las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos (que son piridina dependientes) se ven inhibidas por el NADH, y por tanto, la capacidad hepática para oxidar ácidos grasos se ve reducida. Incluso, se ha descubierto que existen unos receptores, pertenecientes a la superfamilia de los receptores nucleares de factores de transcripción de esteroides/ retinoides, y conocidos como receptores activados por proliferadores de peroxisoma ($\text{PPAR}\alpha$), que regulan la transcripción de genes implicados en la esterificación y exportación de ácidos grasos y su oxidación en las mitocondrias, peroxisomas y microsomas. El metabolismo del alcohol, interfiere con su actividad transcripcional en hepatocitos, inhibiendo su acción y en consecuencia, produciendo acumulación lipídica (Ceni y cols, 2014). Esto también nos lleva a pensar, que el aumento en el tamaño del hígado encontrado en nuestros animales, podría deberse incluso en parte, a la esteatosis hepática desarrollada.

Otro de los efectos que tiene la peroxidación lipídica en nuestro organismo, aparte del hígado graso, y que se pone de manifiesto en nuestro estudio, es la generación de MDA. Un

producto cuya toxicidad se basa en la alta reactividad con las proteínas y con el ADN, donde forma productos modificados de las bases nitrogenadas (Hernández y cols, 2014). Así puede alterar proteínas esenciales, lo que conlleva a la pérdida de función de estas proteínas y la homeostasis celular (Galicia y Gutiérrez, 2014).

Fisiológicamente y a la larga, todo esto se traduce en la aparición y evolución de la hepatopatía alcohólica, en cuyos comienzos aparece hepatomegalia y esteatosis (Ceni y cols., 2014). De hecho, según Rua (2013), ya que los altos niveles de MDA se correlacionan únicamente con el daño hepático inducido por alcohol, se podría utilizar la determinación de los niveles de MDA como un factor discriminador frente a otras enfermedades hepáticas no alcohólicas. Además, Masalkar y Abhang en 2005, comprobaron que las concentraciones de MDA en suero aumentaban de forma significativa, en función de la severidad de la enfermedad hepática alcohólica.

Podemos declarar pues, que la disminución de las defensas antioxidantes conduce a un estado hepático de estrés oxidativo que se hace patente a través del aumento del nivel de oxidación lipídica hallada en los grupos alcohólicos. Además también se ha observado de nuevo, el efecto protector del ácido fólico, puesto que en los grupos suplementados disminuyen significativamente los indicadores de oxidación molecular estudiados, junto con la actividad de las enzimas antioxidantes, y la hepatomegalia.

Transaminasas: valoración y significancia clínica

Para acabar con el trabajo de experimentación, y con el fin de determinar si los cambios acontecidos en el perfil antioxidante afectan al funcionamiento hepático, medimos las transaminasas hepáticas AST y ALT, para posteriormente valorar su ratio.

Estas enzimas, también llamadas aminotransferasas, son un grupo de enzimas cuya función consiste en catalizar la transferencia reversible de los grupos amino de un aminoácido u otro metabolito, a otro. Debido a que su función es imprescindible para el metabolismo celular, su concentración es especialmente notable en aquellos órganos donde el metabolismo proteico es más activo, como en hígado. La elevación sérica de transaminasas, se correlaciona con el vertido a sangre del contenido enzimático de los hepatocitos y por tanto de la destrucción de hepatocitos y lesión tisular (García y Zurita, 2010). En definitiva, el nivel sérico de transaminasas y su relación, es un marcador específico en el diagnóstico de hepatopatía alcohólica.

La diferenciación entre un caso de hepatopatía no alcohólica de un caso de enfermedad hepática alcohólica es a menudo difícil, ya que la historia clínica puede ser falsa en muchas ocasiones, y el examen físico y pruebas de laboratorio, inespecíficos. Así pues, en ausencia de

una causa definida de esteatosis o una historia de abuso de alcohol, la distinción entre la esteatohepatitis no alcohólica y la enfermedad hepática alcohólica se complica. Según Sorbi y cols. (1999), elevaciones leves de los niveles de aminotransferasas con una proporción de AST/ALT baja, apoyan fuertemente el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica. Ésta podría estar causada por trastornos metabólicos, procedimientos quirúrgicos, fármacos y factores diversos, pero no relacionada con el abuso del alcohol. Por otro lado, un estudio ha demostrado que una proporción de AST/ALT elevada, sugiere enfermedad hepática alcohólica avanzada (Nyblom y cols., 2004; Correia y cols., 1981; Salaspuro, 1987).

Nuestros resultados muestran, efectivamente, un aumento significativo en la ratio AST/ALT del grupo A con respecto al grupo C ($p < 0.05$) (Figura 8). Además, la proporción entre AST/ALT del grupo A, está de acuerdo con los estudios citados anteriormente, que atribuyen un valor de AST/ALT > 1.5 a los casos de hepatopatía por abuso de alcohol.

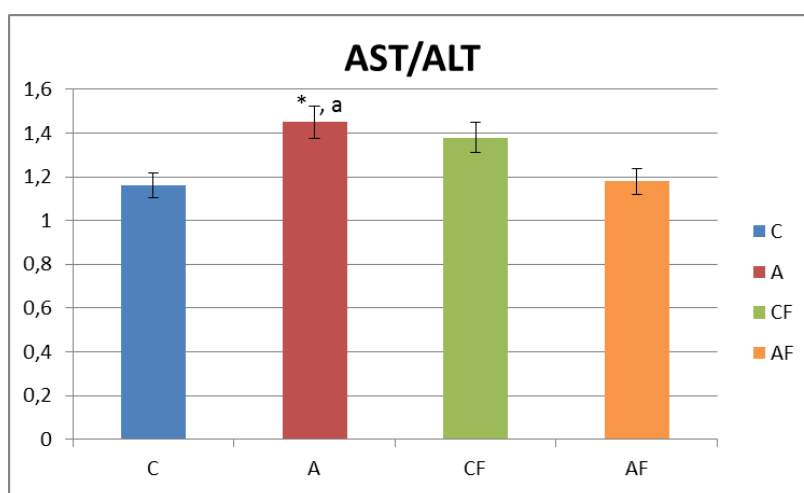


Figura 8. Relación de la actividad de las transaminasas hepáticas. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de 6 animales en cada grupo. Grupos: C, grupo control; A, grupo alcohol; AF, grupo alcohol fólico; CF, grupo control fólico. Significancia estadística: A vs. C: * $p < 0.05$; A vs. AF: ^a $p < 0.05$.

Curiosamente, también se observa una disminución del cociente AST/ALT, tras la suplementación con fólico, demostrando una vez más, que ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo que sufren los hepatocitos.

4.2 Comparación del balance oxidativo tras consumo de alcohol en diferentes tejidos

Una vez concluida la experimentación en hígado, quisimos establecer con las mismas condiciones experimentales y protocolo de alcoholización, gracias a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, el comportamiento de la defensa antioxidante en distintos tejidos, así como las posibles alteraciones funcionales encontradas. Observamos como

realmente, las enzimas antioxidantes forman un sistema complejo, que varía en función de cada órgano y sus propiedades, lo que está a su vez relacionado con el metabolismo oxidativo del alcohol, el cual es diferente en cada tejido. Esto demuestra una relación directa entre el metabolismo oxidativo del alcohol a través de la ADH, SMOE, CAT y ALDH y el daño oxidativo generado por esta droga, que parece ser el mecanismo principal de los efectos perjudiciales que genera. A continuación se muestra una descripción detallada de los resultados recogidos en cada órgano, acompañado de una figura ilustrativa.

El hígado, como ya se ha descrito, es el órgano donde tiene lugar de forma principal (en más de un 90%) el metabolismo del alcohol (Cascales y cols., 1997). En este tejido, el etanol es oxidado en dos pasos consecutivos hasta AcH y acetato (Hernández y cols., 2014). Las enzimas que llevan a cabo este proceso, ADH y SMOE mayoritariamente (ya que a estos niveles de consumo, la ADH se satura y comienza a actuar el SMOE) y CAT, generan por distintos mecanismos la alteración del balance oxidativo (Carreras y Castellano, 2012). Por su parte, la ADH genera un aumento de la demanda en el consumo de NAD^+ , lo que altera el ciclo normal de la cadena respiratoria mitocondrial con la consiguiente producción de EROs; al mismo tiempo origina AcH, una sustancia tóxica *per se* (Hernández y cols., 2014). La actividad de la SMOE, genera también EROs y una disminución de la concentración de GSH, que recordamos era un antioxidante endógeno de bajo peso molecular (Lu y Cederbaum, 2008; Ojeda y cols., 2016). La CAT, aunque en hígado tiene un papel menos destacado, es igualmente productora de AcH (Hernández y cols., 2014).

Pero además del hecho de que el metabolismo del alcohol sea altamente pro-oxidante, nuestros estudios demuestran que el consumo crónico de alcohol disminuye la actividad enzimática antioxidante de la CAT, la GPx y la GR. Esto provoca una situación de desequilibrio oxidativo aún más acentuada, cuyas consecuencias observadas son: hepatomegalia, aumento de la oxidación lipídica y disfunción hepática.

En cuanto a la suplementación de ácido fólico, se ha visto que resulta altamente eficaz en la protección del hígado frente al daño oxidativo causado por el alcohol, puesto que restablece la actividad de tres de las cuatro enzimas antioxidantes estudiadas, disminuye significativamente los indicadores de oxidación lipídica y reduce el cociente AST/ALT, evitando la hepatomegalia (Figura 9).

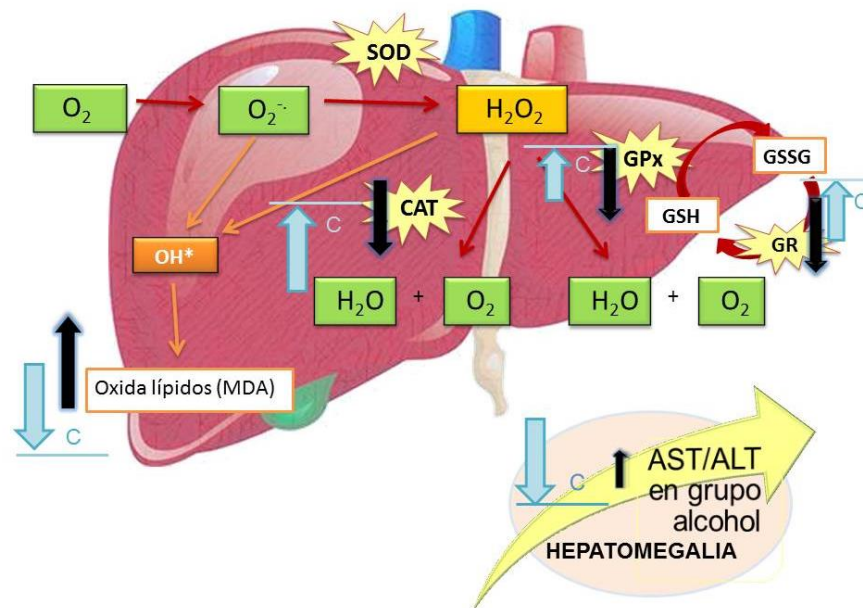


Figura 9. Efecto del consumo crónico de alcohol y suplementación con fósforo sobre el sistema de defensa antioxidante del organismo en hígado. Las flechas negras representan los efectos producidos por el alcohol, mientras que las flechas azules representan los cambios que produce la suplementación con fósforo sobre este mismo sistema. La C que figura al lado de las flechas azules significa valor control.

En riñón, el metabolismo del alcohol se produce en mucho menor grado que en el hígado ($\ll 10\%$ frente al 90%); así, la concentración de ADH, como la de SMOE y CAT en condiciones basales, es casi insignificante (Das y Vasudeman, 2008). Sin embargo, los estudios acerca de la influencia del consumo crónico de alcohol en las enzimas que metabolizan el alcohol por vía oxidativa a nivel renal, muestran un importante incremento en la actividad de la ADH, que llega hasta a duplicarse frente al consumo de alcohol de forma proporcional a los niveles de éste en sangre, con el consiguiente aumento de la concentración de AcH en éste órgano (Orellana y cols., 1998). Es éste hecho, el aumento de la concentración de AcH y su oxidación, el que más contribuye probablemente, al daño oxidativo y a los efectos nefrotóxicos producidos por el alcohol (Das, 2008). Otro hecho observado, es la disminución en la actividad de la enzima CAT, sin alterarse la GPx ni la SOD (Ojeda y cols., 2012), lo que podría deberse según Das y Vasudeman (2008), a la pérdida de NADPH (necesario para que actúe la NADPH oxidasa en conjunto con la CAT), a la generación de O_2^- a partir del H_2O_2 , al aumento de la peroxidación lipídica, o a la combinación de todos.

Con respecto a los daños derivados de todas estas alteraciones, se observa, un aumento de la peroxidación lipídica, así como una lesión renal notoria tras el descenso en el aclaramiento de creatinina: se sabe que la acumulación de LDL en el glomérulo activa la apoptosis celular y provoca el descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG). A su vez, esto conlleva la aparición de hipertensión arterial (HTA), que es un factor de riesgo de daño renal y cardíaco, ya que las funciones de ambos órganos están interrelacionadas (Ojeda y cols., 2012).

En este caso, la suplementación con ácido fólico, no sólo restablece la actividad de la CAT a nivel control, sino que además aumenta la actividad de la GR, algo positivo porque incrementa la concentración de GSH, que en este órgano es baja. También se observa disminución de la peroxidación lipídica, aunque no se consigue restaurar la TFG (Ojeda y cols., 2012) (Figura 10).

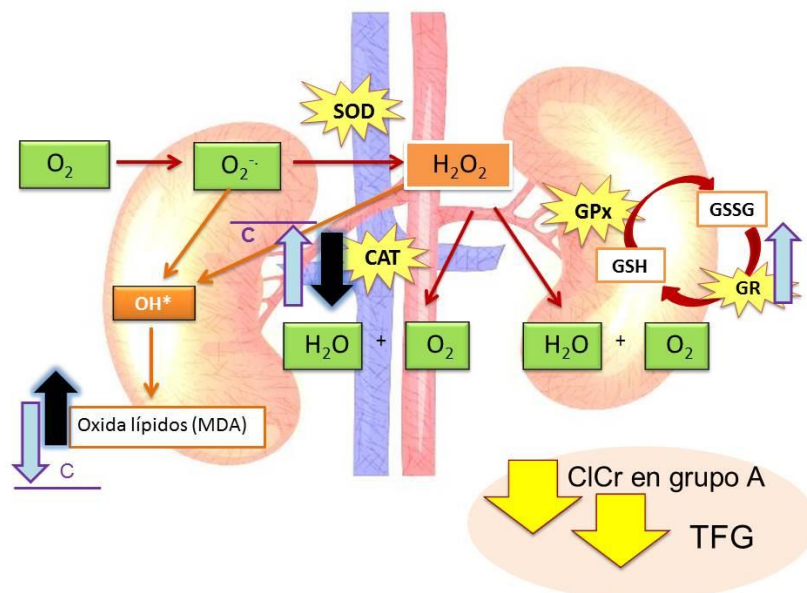


Figura 10. Efecto del consumo crónico de alcohol y suplementación con fólico sobre el sistema de defensa antioxidante del organismo en riñón. Las flechas negras representan los efectos producidos por el alcohol, mientras que las flechas azules representan los cambios que produce la suplementación con fólico sobre este mismo sistema. La C que figura al lado de las flechas azules significa valor control. Los datos empleados para realizar esta ilustración han sido extraídos del artículo de Ojeda y cols., 2012.

En corazón, de nuevo a diferencia de en hígado, se describe una baja presencia de ADH (menor incluso que en el riñón), y se desconoce la existencia del SMOE (Fahimi y cols, 1979). Por consiguiente, se espera que los productos de este metabolismo sean distintos a los descritos anteriormente.

Se ha demostrado, que tras el consumo crónico de alcohol se produce un aumento del tamaño y número de peroxisomas (Fahimi y cols., 1979; Pachenko y cols., 1987), lugar donde se localiza la enzima CAT. Este hecho se ha relacionado, con el crecimiento del órgano en cuestión (cardiomegalia) y con el incremento en la actividad de la CAT (Fahimi y cols., 1979; Pachenko y cols., 1989), enzima que se encarga no sólo de reducir el H_2O_2 , sino que también participa, como se ha mencionado, en el metabolismo oxidativo del alcohol. Todo ello, sumado al hecho de que no aumenta la concentración de ADH (a pesar de que aumentan los niveles de alcohol en sangre y siendo la concentración en este órgano escasa), demuestra el importante papel que adquiere la CAT en el metabolismo del etanol a nivel cardíaco (Fahimi y cols., 1979; Antonenkov y Pachenko, 1986; Pachenko y cols., 1987), que aunque también genera AcH,

disminuye los niveles de H_2O_2 y en tanto, protege frente al daño oxidativo; lo cierto, es que se ha hallado un menor índice de peroxidación lipídica en el corazón de las ratas alcohólicas que siguen nuestro protocolo de alcoholización. No obstante, en estas ratas se observa un aumento en la presión arterial, a la vez que una cardiomiopatía causada por la modificación en la expresión de proteínas, y una disfunción cardíaca progresiva relacionada con la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Ojeda y cols., 2012). Por todas estas razones se considera el consumo crónico de alcohol un factor de riesgo cardiovascular.

Asimismo, los efectos del ácido fólico en éste órgano se manifiestan en la actividad de la CAT, que no esté aumentada tras el consumo de alcohol, y en los niveles de peroxidación lipídica, que se mantienen a niveles controles. Además, en estos animales, no se observa cardiomegalia ni incremento de la presión arterial (Ojeda y cols., 2012). La suplementación con este antioxidante, parece disminuir la necesidad del corazón de aumentar la actividad de la enzima que cataliza el metabolismo del alcohol (CAT), probablemente porque por algún mecanismo, para nosotros desconocido hasta ahora, y seguramente relacionado con la mejora en la metabolización del alcohol por otros tejidos o su acción como *scavenger*, disminuya la necesidad de metabolizar el etanol en este órgano.

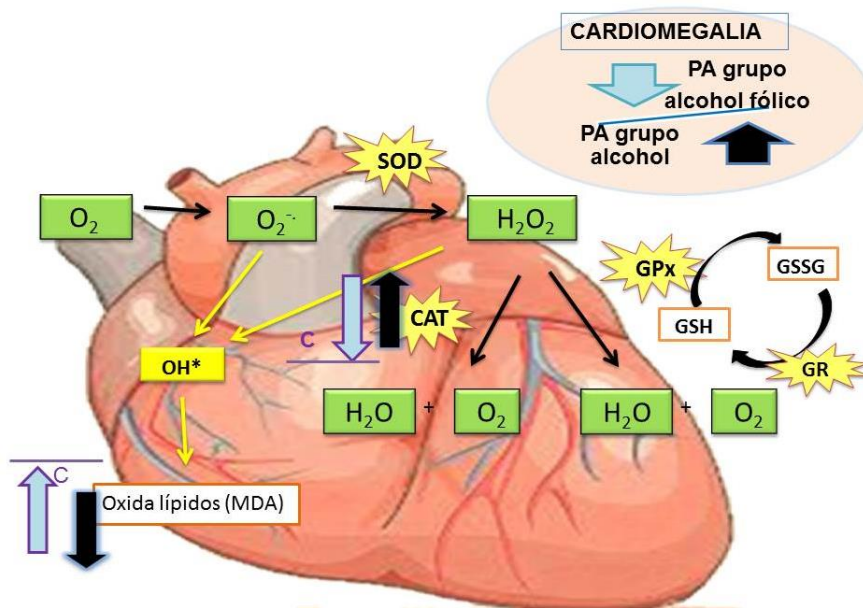


Figura 11. Efecto del consumo crónico de alcohol y suplementación con fólico sobre el sistema de defensa antioxidante del organismo en corazón. Las flechas negras representan los efectos producidos por el alcohol, mientras que las flechas azules representan los cambios que produce la suplementación con fólico sobre este mismo sistema. La C que figura al lado de las flechas azules significa valor control. Los datos empleados para realizar esta ilustración han sido extraídos del artículo de Ojeda y cols., 2012.

5. Conclusión

El consumo crónico de alcohol desempeña un importante papel en el desarrollo de numerosas patologías, sobre todo a nivel hepático, principal órgano metabolizador del etanol. En el presente estudio, se ha demostrado que el consumo crónico de esta droga, genera estrés oxidativo en los hepatocitos, tanto por su propio metabolismo oxidativo, como por la disminución que produce en la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos. A su vez, también se ha puesto de manifiesto cómo dicho estrés oxidativo afecta a la función celular normal, puesto que se ha observado un aumento en la aparición de marcadores de oxidación lipídica, disfunción hepática, patente tras el análisis de los niveles de aminotransferasas, así como hepatomegalia.

Por otra parte, analizando estudios similares publicados sobre el efecto del consumo crónico de alcohol en la función cardíaca y renal, obtenemos la conclusión de que el mecanismo de protección antioxidante contra este patrón de consumo, presenta peculiaridades según el tipo de órgano, en parte debido a las particularidades de los tejidos al metabolizar el alcohol por vía oxidativa. Lo advertido en estos tejidos es principalmente una alteración en la actividad de la enzima CAT, además de en la relación de la actividad GPx/GR en hígado. En el caso del hígado y riñón, donde el alcohol se metaboliza principalmente por la ADH, la consecuencia es un desbalance oxidativo, así como un aumento de la peroxidación lipídica, que por distintos mecanismos causa importantes daños en el funcionamiento de ambos. En el corazón, donde el alcohol es metabolizado por la enzima CAT, no se aprecia oxidación de lípidos, pero sí daño cardiovascular.

Sobre la suplementación con ácido fólico, vitamina altamente afectada por el consumo de alcohol y con propiedades altamente antioxidantes, se ha descubierto que restaura los valores de la actividad enzimática normal en hígado y riñón, generando un efecto antioxidante y protector sobre estos órganos. En corazón, el ácido fólico evita el aumento de la actividad de la única enzima metabolizadora del alcohol, probablemente porque reduce, favorablemente, la cantidad de alcohol que llega hasta este órgano; este hecho se afianza tras observar la disminución que tiene lugar en los valores de presión arterial de ratas alcohólicas, y que recordamos, era un factor predisponente de riesgo cardiovascular.

Por todo ello, opinamos que es una buena alternativa, hablando en términos económicos y de eficacia, para el tratamiento a personas con problemas de salud relacionadas con la adicción al alcohol, sobre todo a largo plazo. Aun así, se estima necesario, la realización de ensayos clínicos controlados en humanos que refuercen este trabajo y permita desarrollar un tratamiento farmacológico efectivo.

6. Referencias bibliográficas

- Abilés JS. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico [en línea]. HeraUgrEs: 2007 [consultado en marzo 2017]. Disponible en <http://hera.ugr.es/tesisugr/16710794.pdf>.
- Antonenkov VD, Panchenko LF. Activation of peroxisomal acyl-CoA-oxidase and of lipid peroxidation in the rat myocardium during long-term ethanol intake. *Biull Eksp Biol Med.* 1987; 102:550-2.
- Beers RF, Sizer IW. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 1:133-40.
- Blocker DE, Thenen SW. Intestinal absorption, liver uptake and excretion of H-folic acid in acid deficient, alcohol consuming nonhuman primates. *Am J Clin Nutr.* 1987; 29: 334-336.
- Carreras MP, Castellano G. Hígado y alcohol. *Problemas Comunes en la Práctica Clínica - Gastroenterología y Hepatología.* 2012; 799-814.
- Carreras O, Vázquez AL, Rubio JM et al. Effect of chronic ethanol on D-galactose absorption by the rat whole intestinal surface. *Alcohol.* 1992; 9:83-6.
- Cascales M, Robles-Chillida EM, Cascales C, Santos-Ruiz MA. Intoxicación etílica y estrés oxidativo. *Real Acad Nac Farm.* 1997; 4: 267-86.
- Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(47):17756-72.
- Conde De La Rosa L, Moshage H, Nieto N. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2008; 100(3):156-63.
- Correia JP, Alves PS, Camilo EA. SGOT-SGPT ratios. *Digestive Diseases and Sciences.* 1981; 26: 248.
- Das SK, Varadhan S, Dhanya L, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of chronic ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23(4):341-4.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol induced effects on kidney. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23(1):4-9.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-31.
- Fahimi HD, Kino M, Hicks L, Thorp KA, Abelman WH. Increased myocardial catalase in rats fed ethanol. *Am J Physiol.* 1979; 96: 373-386.
- Fernández- Borrachero y cols., 1995.
- Fowler B. The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int.* 2001; 59 (79): 221-229.
- Fridovich I. Cytochrome c. En Greenwald RA (ed). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Boca Raton, Fla: CRC Press. 1985: 213-5.
- Galicia-Moreno M, Gutiérrez-Reyes G. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Rev Gastroenterol México* [en línea]. 2014; 79(2):135-44. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0375090614000329>

- García Martín M, Zurita Molina A. Transaminasas: Valoración y significación clínica [en línea]. Hosp Univ Virgen Macarena: 1998. [Consultado en marzo 2017]. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
- Halsted CH. Alcohol and folate interactions: clinical implications. En Bailey LB (ed). Folate in Health and Disease. New York: Marcel Dekker. 1995.
- Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, et al. Metabolic interactions of alcohol and folate. J Nutr. 2002; 132(8): 2367S–72S.
- Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Mondragón-Terán P, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. Med Interna Mex. 2014; 30(3):295–308.
- Homman N, Tillonen J, Salaspuro M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. Int J Cancer. 2000;86 (2):163-173.
- Hwang SY, Siow YL, Au-Yeung KK, et al. Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2011; 300:189-98.
- Institute for Laboratory Animal Research. Control of diets in laboratory animal experimentation. Nutr Abstr Rev. 1979; 49:413-9.
- Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behaviour of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radic Biol Med. 2001; 30 (12): 1390-1399.
- Kim SJ, Jung YS, Kwon do Y, et al. Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 368:893-8.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun. 1976; 71:952-8
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 1:265-75.
- Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. Alcohol Res Health. 2003; 27:220-31.
- Liu J, Chen D, Yu B, et al. Effect of maternal folic acid supplementation on hepatic one-carbon unit associated gene expressions in newborn piglets. Mol Biol Rep. 2001; 38:3849-56.
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. Free Rad Biol Med. 2008; 44: 723-38.
- Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. Clin Chim Acta. 2005; 355(1-2): 61-5.
- Mason, J. Folate status: effects on carcinogenesis. En: Bailey L.B. eds. Folate in Health and Disease 1995: 361-378. Marcel. Dekker New York, NY.
- Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, et al. (1997) S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. Pharmacol Ther. 1997; 73:265-80.
- Medici V, Halsted CH. Folate, alcohol, and liver disease. Mol Nutr Food Res. 2013; 57:596-606.

- Moreno Otero R, Cortés JR. Nutrición y alcoholismo crónico. *Nutr Hosp.* 2008; 23(2):3-7.
- Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol Alcohol.* 2004; 39(4):336–9.
- Ojeda ML, Barrero MJ, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: Folic acid supplementation. *Alcohol Alcohol.* 2012; 47(4):404–12.
- Ojeda ML, 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.
- 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
- Organización Mundial de la Salud. Alcohol [en línea]. Nota descriptiva n° 349: 2015. [Consultado en febrero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/>
- Panchenko LF, Pirozhkov SV, Popova SV et al. Effect of ethanol and the catalase inhibitor aminotriazole on lipid peroxidation in the rat myocardium. *Biull Eksp Biol Med.* 1987; 103:407-10
- Plan Nacional Sobre Drogas. Informe EDADES 2013: Encuesta sobre alcohol y drogas en España. 2015; 23–4, 37–9.
- Ros, G. Folatos: del alimento a la funcionalidad y la salud óptima [en línea]. V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética, 1999. [Consultado en abril 2017]. Disponible en: http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Ros.pdf
- Rúa RM, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Romero-Gómez M, Funuyet J, et al. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol [en línea]. *Life Sci*, 2014. [Consultado en mayo 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.008>.
- Salaspuro M. Use of enzymes for the diagnosis of alcohol related organ damage. *Enzyme.* 1987. 37: 87-107.
- 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.
- Sendino R, Álvares E, Brime B, Llorens N, Ruiz A, Sánchez E. Informe 2016: Alcohol, Tabaco y Drogas ilegales en España [en línea]. *Obs Español la Drog y las Toxicom Minist Sanid y Serv Soc.* 2016. [Consultado en marzo 2017]. Disponible en: http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/2016_INFORME_OEDT.pdf <http://crm.org.mx/PDF/INFORMES/INFORME2014.pdf>
- Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: Potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94(4):1018-22.

- Stanger O, Wonisch W. Enzymatic and non-enzymatic antioxidative effects of folic acid and its reduced derivatives. *Subcell Biochem.* 2012; 56:131-61.
- Steingberg SE, Campbell C, Hillman RS. The toxic effects of alcohol on folate metabolism. *Clin Toxicol.* 1980; 17: 407-411.
- Sugimoto K, Takei Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatol Res.* 2017; 47(1):70–9.
- Veale WL, Myers RD. (1968) Tables for determining grams and caloric values of ethanol solutions. *Purdue Neuropsychol.* 1968; 1.
- Varela G, Alonso E. *Ácido Fólico y salud.* Madrid: Fundación Española de Nutrición; 1999;17(2):1–38.
- 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.
- Wagner, C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. Bailey L.B. eds. *Folate in Health and Disease* 1995:23-42 Marcel Dekker New York, NY.
- Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L, Li W. Oxidative stress and liver cancer: Etiology and therapeutic targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016.
- Worthington DJ, Rosemeyer MH. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem.* 1974; 48:167–77.
- 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.