

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA
E INVESTIGACIÓN CLÍNICA



TESIS DOCTORAL

**SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS FRENTE EL DAÑO
CARDIOVASCULAR PROVOCADO POR EL “BINGE
DRINKING”**

Paula Sobrino Calero

Directoras:

Dra. M^a Luisa Ojeda Murillo

Dra. Olimpia Carreras Sánchez

Sevilla, 2018



Dra. Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Sevilla y Dra. Dña. Olimpia Carreras Sánchez, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN: que la Tesis Doctoral con el título: “SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS FRENTE EL DAÑO CARDIOVASCULAR PROVOCADO POR EL “BINGE DRINKING”, presentada por la Gda. Paula Sobrino Calero, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente informe, en Sevilla a 6 de Julio de 2018.

Prof. Dra.

Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo

Prof. Dra.

Dña. Olimpia Carreras Sánchez

Doctorando

Dña. Paula Sobrino Calero

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Hasta la actualidad parte de la memoria de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones en **Revistas Científicas indexadas en el JCR**.

- **Sobrino P**, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Binge drinking affects kidney function, hydric balance, aldosterone levels and arterial pressure in adolescent rats: selenium as a possible hypotensor by improving oxidative balance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018. In press
- Ojeda ML, Carreras O, **Sobrino P**, Murillo ML, Nogales F. Biological implications of selenium in adolescent rat exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017b; 329: 165-172.
- Serrano A, Nogales F, **Sobrino P**, Murillo ML, Carreras O, Ojeda ML. Heart selenoproteins status of metabolic syndrome-exposed pups: A potential target for attenuating cardiac damage. *Mol. Nutr. Food Res*. 2016, 60, 2633–2641.

Además, durante la realización de esta memoria de Tesis Doctoral han sido enviadas varias comunicaciones a **congresos nacionales e internacionales** en forma de poster y publicados sus abstracts.

- **Sobrino P**, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Estado del selenio en la resistencia a la insulina y la programación metabólica. XII Congreso Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). NUTRIMAD, Madrid 2018.
- **Sobrino P**, Nogales F, Murillo ML, Ojeda ML, Carreras O. Selenio, ingesta y aprovechamiento energético durante la programación temprana. Un arma de doble filo. XII Congreso Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). NUTRIMAD, Madrid 2018.
- Ortiz-Rendón O, **Sobrino P**, Nogales F, Murillo ML, Carreras O, Ojeda ML. Binge drinking affects hydric balance and aldosterone levels increasing systolic blood pressure in adolescent rats. XXXIX Congreso de la Sociedad Española Ciencias Fisiológicas (SECF). Cádiz 2018.
- **Sobrino P**, Serrano A, Ojeda ML, Nogales F, Carreras O. “Binge drinking” affects the amount of selenium biologically active in the tissues.

Supplementation as therapy. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española Ciencias Fisiológicas (SECF). Zaragoza 2016.

- Serrano A, **Sobrinho P**, Ojeda ML, Nogales F, Carreras O. Metabolic syndrome: blood pressure during Pregnancy and lactation. Gestational parameters in offspring. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española Ciencias Fisiológicas (SECF). Zaragoza 2016.
- **Sobrinho P**, Ojeda ML, Nogales F, Rua RM, Serrano A, Murillo ML, Carreras O. La suplementación con selenio (Se) disminuye la oxidación en el corazón tras el “binge drinking”. Alimentación y nutrición en el embarazo y la lactancia. Nutrición clínica en medicina. FESNAD. Sevilla 2015.
- Serrano A, Nogales F, Ojeda ML, Muñoz P, **Sobrinho P**, Murillo ML, Carreras O. Programación metabólica: implicación del selenio en el síndrome metabólico a nivel cardíaco. Alimentación y nutrición en el embarazo y la lactancia. Nutrición clínica en medicina. FESNAD. Sevilla 2015.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	XIII
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1.1. Alcohol	5
2.1.2. Generalidades	5
2.1.3. “Binge drinking”	5
2.1.4. Metabolismo del alcohol	8
2.2. Metabolismo del alcohol en el corazón y riñón	15
2.3. Alcohol y sistema cardiovascular	18
2.3.1. Generalidades	18
2.3.2. Estrés oxidativo	19
2.3.3. Estrés oxidativo y “binge drinking”	25
2.3.4. “Binge drinking” y sistema cardiovascular	29
2.3.4.1. Cardiopatía alcohólica	30
2.3.4.1.1. Estrés oxidativo	31
2.3.4.1.2. Cambios electrofisiológicos	31
2.3.4.1.3. Apoptosis	32
2.3.4.1.4. Activación del sistema nerviosos autónomo	35
2.3.4.1.5. Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona ...	35
2.3.4.2. Hipertensión	35
2.3.4.2.1. Estrés oxidativo	37

2.3.4.2.2. Aumento de Ca ²⁺ intracelular	38
2.3.4.2.3. Resistencia a la insulina	38
2.3.4.2.4. Activación del sistema nervioso autónomo	39
2.3.4.2.5. Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona ...	40
2.3.4.2.6. Metabolismo lipídico	40
2.3.4.2.7. Hemostasis	41
2.3.4.2.8. Disminución de los niveles de óxido nítrico	42
2.3.4.3. Nefropatía alcohólica	42
2.3.4.3.1. Estrés oxidativo	43
2.3.4.3.2. Desequilibrios electrolíticos Na ⁺ y K ⁺	44
2.3.4.3.3. Deformación en ultraestructuras renales	45
2.3.4.3.4. Activación del sistema nervioso autónomo	46
2.3.4.3.5. Activación del sistema renina angiotensina aldosterona ..	46
2.4. Selenio y sistema cardiovascular	46
2.4.1. Selenio y Selenoproteínas	46
2.4.1.1. Glutación peroxidasas	49
2.4.1.1.1. Glutación peroxidasa 1	49
2.4.1.1.2. Glutación peroxidasa 3	49
2.4.1.1.3. Glutación peroxidasa 4	50
2.4.1.1.4. Selenoproteína P	51
2.4.2. Selenio y sistema cardiovascular	53
2.4.2.1. Selenio y corazón	54
2.4.2.2. Selenio y endotelio vascular	56
2.4.2.3. Selenio y riñón	58

2.4.3. Selenio y consumo de alcohol: “binge drinking”	60
3. OBJETIVOS	67
4. MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1. Animales de experimentación	71
4.1.1. Animales y condiciones de experimentación	71
4.1.2. Dieta utilizada	72
4.1.3. Método de alcoholización	72
4.1.4. Determinación de parámetros nutricionales	73
4.1.4.1. Estudio nutricional y de la ingesta de selenio	73
4.1.4.2. Estudio macroscópico	73
4.2. Toma y procesamiento de las muestras de rata	74
4.2.1. Obtención y tratamiento de las muestras de orina y heces	74
4.2.2. Obtención y tratamiento de las muestras de suero	74
4.2.3. Obtención y tratamiento de los distintos órganos	74
4.3. Determinación analítica de selenio	74
4.4. Estudio de índices biológicos	75
4.5. Determinaciones en corazón y riñón	76
4.5.1. Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas	76
4.5.1.1. Homogenización tisular	76
4.5.1.2. Concentración total de proteínas	76
4.5.1.3. Actividad de la glutatión peroxidasa	77
4.5.1.4. Actividad de la glutatión reductasa	79
4.5.1.5. Actividad de la superóxido dismutasa	80
4.5.1.6. Actividad de la catalasa	81

4.5.1.7. Peroxidación lipídica	82
4.5.1.8. Oxidación de proteínas	83
4.5.2. Análisis de la expresión de proteínas cardíacas y renales	85
4.5.2.1. Homogenización tisular para wester blotting	85
4.5.2.2. Características generales de los anticuerpos	86
4.5.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con sds: sds-page	87
4.5.2.4. Transferencia de proteínas	89
4.5.2.5. Inmunodetección	90
4.5.2.6. Revelado.....	91
4.6. Determinación de parámetros en suero y orina	92
4.6.1. Determinaciones bioquímicas	92
4.6.1.1. Perfil bioquímico	92
4.6.1.2. Parámetros relacionados con la función renal	93
4.6.2. Determinación de los niveles de aldosterona	93
4.7. Determinación de la frecuencia cardíaca y presión arterial.....	94
4.8. Marcadores de la función renal	95
4.8.1. Cálculo de la función renal	95
4.8.1.1. Aclaramientos	95
4.8.1.2. Excreción fraccional de sodio	95
4.8.1.3. Gradiente transtubular de potasio	96
4.8.1.4. Osmolaridad	96
4.9. Determinación de los marcadores vasculares	96
4.10. Análisis estadístico	97
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101

5.1. Control nutricional, morfológico y metabólico	101
5.1.1. Control nutricional y morfológico	101
5.1.2. Parámetros bioquímicos	103
5.2. Homeostasis de se.....	106
5.3. Estudios en corazón.....	108
5.3.1. Balance oxidativo.....	108
5.3.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1, GPx-3, GPx-4 y Sel P en el corazón.....	111
5.3.3. Expresión de NF-κB p65 y caspasa 3 activada en el corazón	114
5.3.4. Funcionalidad cardíaca	116
5.4. Estudios vasculares	119
5.4.1. Balance oxidativo en suero	120
5.4.2. Marcadores vasculares	121
5.5. Estudios en el riñón	124
5.5.1. Balance oxidativo.....	124
5.5.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx1, GPx3, GPx4 y Sel P en el riñón.....	127
5.5.3. Expresión de NF-κB p65 y caspasa-3 activada en el riñón	130
5.5.4. Valoración de la función renal	133
6. CONCLUSIONES	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	151

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa	ECA: Enzima convertidora de angiotensina
Ad: Adrenalina	EEFA sintetasa: Ácido graso etil ester sintetasa
ADH: Alcohol deshidrogenasa	EEFA: Ésteres etílicos de los ácidos grasos
ADH: Hormona antidiurética	EFNa: Excreción fraccional de sodio
AG: Ácidos grasos.	eNOS: Óxido nítrico sintetasa
ALDH: Aldehído deshidrogenasa	EO: Estrés oxidativo
Aldo: Aldosterona	ERO: Especie reactiva de oxígeno
ALT: Alanina transaminasa	FASD: Trastornos del espectro alcohólico fetal
AMPk: Proteína quinasa adenosina monofosfato	FC: Frecuencia cardíaca
Ang I: Angiotensina I	GC: Grupos carbonilos
Ang II: Angiotensina	GPx: Glutación peroxidasa
AST: Aspartato transaminasa	GR: Glutación reductasa
BD: "Binge drinking"	GSH: Glutación
C.D.A: Absorción aparente de Se	GSSG: Glutación oxidado
CARD: Dominio de reclutamiento asociado a caspasas	GTTK: Gradiente transtubular de K ⁺
CAT: Catalasa	HDL: Lipoproteínas plasmáticas de alta densidad
CRH: Corticotropina	HHA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
CYP2E1: Citocromo P450 2E1	
DD: Dominio de muerte	
DED: Dominio efector de muerte	
DIO: Deionidasas	

HTA: Hipertensión	PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B
IL-6: Interleukina 6	RI: Resistencia a la insulina
IRS-1: Sustrato de receptor de insulina	RL: Radicales libres
K⁺: Potasio	Se: Selenio
LDL: Lipoproteínas plasmáticas de baja densidad	Sel P: Selenoproteína P
MDA: Malondialdehído	SIRTs: Sirtuinas
Na⁺: Sodio	SMOE: Sistema microsomal oxidativo del etanol
Nad: Noradrenalina	SNA: Sistema nervioso autónomo
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido	SNS: Sistema nervioso simpático
NADPH: Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido	SOD: Superóxido dismutasa
NF-κB: Factor nuclear kappa B	SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona
NO: Óxido nítrico	STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3
PAD: Presión arterial diastólica	TBARS: Ácido tiobarbitúrico
PAM: Presión arterial media	TFG: Tasa de filtración glomerular
PAS: Presión arterial sistólica	TNF-α: Factor de necrosis tumoral α
PPARα: Receptor de peroxisoma proliferador activado α	tPAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PPARγ: Receptor activado por proliferador de peroxisomas γ	TrxR: Tioredoxinas reductasas
PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa	UBE: Unidades de bebida estándar
	VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.3. Esquema del metabolismo del etanol	
Figura 2.1.4. Esquema comparativo de las tres vías oxidativas de metabolización en el hígado, corazón y riñón	
Figura 2.2.1. Manifestaciones clínicas y mecanismos fisiopatológicos que se presentan en el sistema cardiovascular según el patrón de consumo de alcohol	
Figura 2.2.2. Esquema de las cuatro enzimas antioxidantes endógenas	
Figura 2.2.2.1. Esquema de los mecanismos implicados en la génesis de la hipertensión tras el consumo agudo de alcohol	
Figura 2.2.3. Esquema de los efectos nocivos que provoca el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” sobre sistema cardiovascular y renal	
Figura 2.2.3.1. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” sobre el corazón.	
Figura 2.2.3.1.3.1. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis	
Figura 2.2.3.1.3.2. Esquema de la apoptosis en cardiomiocitos	
Figura 2.2.3.2. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” a nivel vascular	
Figura 2.2.3.3. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” a nivel renal	
Figura 2.3.2.1. Esquema de las principales selenoproteínas cardiacas	
Figura 2.3.2.2. Mecanismos del Se para prevenir la aterosclerosis	
Figura 2.3.3. Distribución de Se tisular y en suero en madres lactantes, crías recién nacidas y crías lactantes expuestas a un consumo crónico de alcohol y el efecto de la suplementación con Se	
Figura 4.1.1. Esquema del diseño experimental	
Figura 4.5.2.6. Resumen de la técnica de Western Blotting	
Figura 5.3.1.1. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B), GPx (C), GR (D) y niveles de GC (E) y MDA (F)	

Figura 5.3.1.2. Representación esquemática de los eventos ocurridos en los sistemas de defensa antioxidante en el corazón en respuesta al consumo agudo de alcohol y a la suplementación con Se

Figura 5.3.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1 (A), GPx-3 (B), GPx-4 (C) y Sel P (D). Wester blotting representativo de la expresión de estas selenoproteínas ...

Figura 5.5.3. Expresión de NF-κB p65 y caspasa 3 activada en el corazón. Wester blotting representativo de la expresión de estas proteínas

Figura 5.3.4. Presión arterial sistólica (A), diastólica (B) y media (C) y frecuencia cardíaca (D)

Figura 5.4.1.1. Actividad de GPx en suero

Figura 5.4.1.2. Niveles de los productos de la oxidación de las biomoléculas, GC y MDA en suero

Figura 5.4.2. Niveles de los marcadores vasculares Cav-1 (A), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (B), Factor de crecimiento tejido conectivo (CTGF) (C), inhibidor del activador del plasminógeno (tPAI-1) (D)

Figura 5.6.1.1. Actividad de SOD (A), CAT (B), GPx (C), GR (D), niveles de GC (E) y niveles de MDA (F) en el riñón

Figura 5.6.1.2. Representación esquemática de los eventos ocurridos en los sistemas de defensa antioxidante en el riñón en respuesta al consumo agudo de alcohol y al suplemento con Se

Figura 5.6.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1 (A), GPx-3 (B), GPx-4 (C) y Sel P (D). Western Blotting representativo de la expresión de estas selenoproteínas

Figura 5.6.3. Expresión de NF-κB p65 y caspasa-3 activada. Wester blotting representativo de la expresión de estas proteínas

Figura 5.6.4.1. Volumen de orina excretado (A), aclaramiento de creatinina (B), ratio albúmina/creatinina (C), Gradiente Transtubular de Potasio (GTTK) (D), Excreción Fraccional de Sodio (EFNa) (E) y niveles de aldosterona en suero (F)

Figura 5.6.4.2. Aclaramiento de aldosterona

Figura 5.6.4.3. Esquema de los mecanismos implicados en la génesis de la hipertensión tras el consumo agudo de alcohol

Figura 5.6.4.4. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en el corazón tras el BD y suplementación con Se

Figura 5.6.4.5. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en el riñón tras el BD y suplementación con Se

Figura 5.6.4.6. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en suero tras el BD y suplementación con Se

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.3.1. Clasificación de las principales selenoproteínas presentes en el organismo según sus funciones.....
Tabla 2.3.2.2. Funciones de las principales selenoproteínas que intervienen en la prevención de la aterosclerosis.....
Tabla 4.5.2.2. Características de los anticuerpos usados en la Inmunodetección
Tabla 4.5.2.3. Componentes empleados en los geles
Tabla 4.9. Significación utilizada
Tabla 5.1.1. Control nutricional y morfológico al final del periodo experimental
Tabla 5.1.2. Análisis bioquímicos de suero de las ratas
Tabla 5.2. Valores de la homeostasis de Selenio
Tabla 5.6.4. Valores de creatinina, Na ⁺ , K ⁺ , urea en suero y en orina y, albumina en orina y aclaramientos

RESUMEN

1. RESUMEN

Actualmente, el consumo de alcohol en forma de “binge drinking” en los adolescentes es un problema social puesto que la adolescencia constituye una etapa de desarrollo muy vulnerable. Además, este patrón de consumo de alcohol produce estrés oxidativo debido a que su metabolismo oxidativo genera grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, comprometiendo a las enzimas antioxidantes endógenas.

Este consumo agudo de alcohol afecta a la funcionalidad del sistema cardiovascular ya que existe una relación directa entre el BD y la aparición de arritmias e hipertensión, aunque los mecanismos que desencadenan estas patologías aún no se conocen con exactitud. Entre los mecanismos que cobran más peso están el estrés oxidativo generado y las alteraciones renales.

El selenio, un elemento esencial para la vida, disminuye sus niveles tras el “binge drinking” comprometiendo la actividad antioxidante puesto que actúa fisiológicamente a través de diferentes selenoproteínas con función antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx-1, GPx-3 y GPx-4) y la selenoproteína P.

Para analizar la implicación del BD sobre el sistema cardiovascular y renal y la efectividad de la terapia de suplementación con Se, tras el consumo agudo de alcohol en adolescentes, se analizaron los depósitos tisulares y séricos de Se, así como su absorción aparente y retención, y los parámetros metabólicos. También se midió la actividad antioxidante sérica, cardíaca y renal a través de las enzimas antioxidantes endógenas (CAT, SOD, GPx y GR) así como, la oxidación de lípidos y proteínas y, la expresión de GPx-1, GPx-3, GPx-4 y Sel P. Con el fin de valorar la funcionalidad de los órganos valorados, corazón y riñón, se ha determinado el balance inflamatorio y apoptótico mediante la expresión de NF-κB y caspasa-3, distintos marcadores vasculares y se ha medido la presión arterial y parámetros relacionados con la función renal.

Los resultados muestran que el “binge drinking” disminuye los niveles de Se séricos y tisulares, modifica algunos parámetros bioquímicos relacionados

con alteraciones hepáticas y metabólicas. El balance oxidativo esta disminuido en corazón y riñón, siendo la GPx la enzima más afectada por esta droga y, el balance inflamatorio y apoptótico está alterado en corazón y riñón por la menor expresión de GPx-4.

El consumo agudo de alcohol compromete la funcionalidad cardíaca, aumentado la presión arterial y frecuencia cardíaca, y la funcionalidad renal disminuyendo la tasa de filtración glomerular y el aclaramiento de aldosterona, así como, produce disfunción endotelial al estar aumentado los marcadores vasculares Cav-1, VEGF, CTGF y tPAI-1.

La suplementación con Se utilizada mejora sustancialmente el balance oxidativo, inflamatorio y apoptótico. A nivel funcional, previene la hipertensión arterial provocada por el BD puesto que disminuye la frecuencia cardíaca y mejora el balance hídrico y salino.

En conclusión la suplementación de Se utilizada se podría considerarse como una terapia de gran eficiencia biológica en adolescentes que consumen alcohol tipo BD ya que previene las alteraciones cardiovasculares y renales que produce este tipo de consumo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICO

2.1. ALCOHOL

2.1.1. Generalidades

El alcohol, sustancia psicoactiva que crea dependencia, afecta a las personas y a las sociedades de diferentes maneras. Sus efectos están determinados por el volumen de alcohol consumido, el sexo, los hábitos de consumo y la calidad del alcohol. De acuerdo con la OMS (2018), la ingesta excesiva de alcohol es una de las principales causas de mortalidad, provocando 3,3 millones de muertes en el mundo al año lo que supone el 5,9% de todas las defunciones, y siendo el factor causal de más de 200 trastornos y enfermedades. Las consecuencias del consumo de alcohol presentan una etiología compleja, pudiendo ser el resultado de una combinación de factores genéticos, físicos, sociales y ambientales.

En España, el consumo de alcohol se ha asociado tradicionalmente a la población adulta y se ha caracterizado por la regularidad de su uso, y su vinculación a la dieta y a los acontecimientos sociales. Sin embargo, en las últimas décadas se han experimentado cambios muy importantes en las cantidades ingeridas, en los patrones y en el significado de su consumo (Sánchez-Pardo, 2001), ya que, ha ganado popularidad entre los adolescentes un nuevo patrón de consumo de alcohol, llamado “binge drinking” (BD) o “botellón” (Sánchez-Pardo, 2002).

2.1.2. “Binge drinking”

El “binge drinking” (termino anglosajón) o “botellón”, como es conocido en España, es un término que se utiliza para caracterizar un comportamiento que consiste en consumir alcohol de forma intensiva y episódicamente. En los Estados Unidos, ha sido definido como el patrón de consumo de alcohol que eleva el nivel de su concentración en sangre a 80 mg/dL, lo que equivaldría, en ese país, a 5 o más bebidas para hombres y 4 o más bebidas para mujeres, consumidas en aproximadamente dos horas (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2004). Actualmente, de hecho, el alcohol es la droga más usada y distribuida entre los jóvenes (Lisdahl y cols., 2013).

En España, desde un punto de vista preventivo y encuadrado en un contexto de promoción de la salud pública, se ha sugerido la siguiente definición para el BD: consumo de 60 g o más, de alcohol en varones (6 bebidas) y de 40 g o más, en mujeres (4 bebidas), concentrado en una sesión de consumo (normalmente en un periodo de 4-6 horas), en la que se mantiene un determinado nivel de intoxicación (presencia de alcohol en la sangre no inferior a 0.8 g/L) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008). Aspectos como las diferencias entre países en los gramos de alcohol de las unidades de bebida estándar (UBE), la frecuencia de los episodios de consumo y la duración de los mismos dificultan el establecimiento de una definición internacional del término (Parada y cols., 2011).

Respecto a la prevalencia de alcohol, en España, esta es ligeramente mayor en las chicas y, en términos de edad, los mayores incrementos de esta práctica se producen entre los 14 y 16 años. A los 17 años, la dimensión que adquiere el botellón entre chicos y chicas es semejante, encontrando que aproximadamente 7 de cada 10 jóvenes ha participado en uno en el último año. Sin embargo, cuando se centra el análisis en el grupo que tiene 18 años, se percibe que el botellón está ligeramente más extendido entre los chicos. En España, la última encuesta realizada sobre alcohol y drogas en la población general (2015-2016), llevada a cabo por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD) publicada en 2016, por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad afirma que en referencia a los últimos 30 días, aproximadamente 2 de cada 3 jóvenes (68,2%) ha bebido alcohol, observando que el 22,2% de los estudiantes ha sufrido una borrachera en este periodo y el 32,2% ha realizado BD, es decir, ha tomado 5 o más vasos de bebidas alcohólicas en un intervalo aproximado de más de 2 horas.

Según diversos autores el consumo abusivo de los jóvenes los fines de semana se ha convertido en un problema de salud pública que puede tener consecuencias a corto y largo plazo (Martinotti y cols., 2016; Johnston y cols., 2014; Timon y cols, 2012). Las consecuencias a corto plazo pueden ser coma etílico, accidentes de tráfico y comportamiento agresivo. Por otro lado, la principal consecuencia a largo plazo demostrada en numerosos estudios epidemiológicos (Ehlers y cols., 2010; Hicks y cols., 2010; Hingson y cols.,

2008) es la dependencia al alcohol en la edad adulta cuando se ha consumido alcohol durante la adolescencia.

En cualquier caso, el abuso agudo del consumo de alcohol afecta a todos los órganos, aunque los cambios más llamativos se produzcan a nivel del sistema nervioso central y del hígado, principal órgano metabolizador de esta droga que también se ve especialmente afectado. Recientemente, a corto plazo, se ha demostrado que hay apoptosis en los hepatocitos por la vía mitocondrial (Tian y cols., 2016). Además, Binder y cols. (2016) han encontrado, en el primer ensayo clínico que estudia el consumo agudo de alcohol y la función hepática, que un evento de BD puede dañar las células hepáticas ya que los niveles de aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) están aumentados, particularmente la ratio de transaminasas AST/ALT, la cual indica la existencia de daño hepático. En ratas, además de estar aumentada la ratio de transaminasas, también hay un aumento del estrés oxidativo (EO) (Ojeda y cols., 2016; Ojeda y cols., 2015; Nogales y cols., 2014). El EO es una situación de desequilibrio entre las moléculas oxidantes y reductoras en el organismo que daña a las biomoléculas y genera disfunción celular.

El BD también tiene efectos a largo plazo a nivel hepático, ya que el consumo agudo de alcohol de forma repetida parece estar relacionado con tres hepatopatías distintas: hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica, la cual, eventualmente, puede progresar hasta el carcinoma hepatocelular (Shubha y cols., 2018).

Por otro lado, cada vez más estudios afirman que el consumo agudo y puntual de alcohol daña al corazón y al riñón ya que este patrón de consumo ha sido relacionado con desórdenes cardiovasculares incluyendo cardiomiopatías, hipertensión arterial y enfermedad de la arteria coronaria (Piano y cols., 2017). Más aun, a nivel cardiovascular, el BD está asociado con un incremento de la presión sanguínea a largo plazo. Por lo tanto, los jóvenes expuestos a repetidos episodios de botellón presentan un alto riesgo de desarrollar pre-hipertensión arterial, hipertensión arterial e infarto de miocardio en la edad adulta y en la etapa de jóvenes adultos (de 18 a 30 años) (Piano y

cols., 2017). En esta línea, Wellman y cols., 2016 sugieren que el BD en jóvenes adultos favorece el riesgo de incrementar la presión arterial sistólica (PAS). Dado que la PAS es un fuerte predictor del riesgo cardiovascular futuro (Mourad, 2008), los aumentos observados en la presión sanguínea asociados con el BD pueden tener importantes consecuencias a largo plazo. Los mecanismos por los cuales el BD produce estas alteraciones cardiovasculares no están del todo claro, sin embargo, hay evidencias disponibles que sugieren que el BD induce EO y daño vascular, además de ser un factor proaterogénico.

En este contexto, diversos autores coinciden en que el EO inducido por el metabolismo del alcohol desempeña un papel primordial en el daño tisular provocado por el alcohol. Así, el metabolismo oxidativo del alcohol por vías oxidativas, vía principal, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres (RL), ambos sustancias oxidantes; además, esta droga afecta a los sistemas de defensa antioxidantes endógenos, provocando por todo ello un desequilibrio oxidativo a favor de la oxidación considerándose un agente pro-oxidante (Pérez de la Cruz y cols., 2008). Este hecho puede desencadenar una serie de daños irreparables en las biomoléculas: lípidos, proteínas y DNA que afectan al funcionamiento de las células y los órganos. En concreto el consumo agudo de alcohol es especialmente prooxidante, como veremos posteriormente al analizar el metabolismo del etanol.

2.1.3. Metabolismo del alcohol

El etanol se metaboliza en el organismo por vías metabólicas oxidativas, vía principal (90-98%), y vías no oxidativas, vía minoritaria. Mediante las vías metabólicas oxidativas el alcohol termina transformándose en acetaldehído y generando EROs (Zima y cols., 2001).

Vías Oxidativas:

Existen tres vías oxidativas mediante las cuales se produce el metabolismo del alcohol que implican tres enzimas: alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) por medio del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y la catalasa (CAT) (Lieber 2005; 1998; 1992).

La eliminación del alcohol por vías metabólicas no oxidativas se lleva a cabo por rutas metabólicas menores como esterificación de ácidos grasos, reacciones de conjugación y reacciones dependientes de radicales de oxígeno (Wurts y cols., 2000; Laposata, 1996; Cederbaum, 1987) y, una parte del alcohol se elimina directamente sin ser metabolizado por la orina, la respiración y el sudor (2-10%) (Sanchís y cols., 1999; Agarwal, 1988).

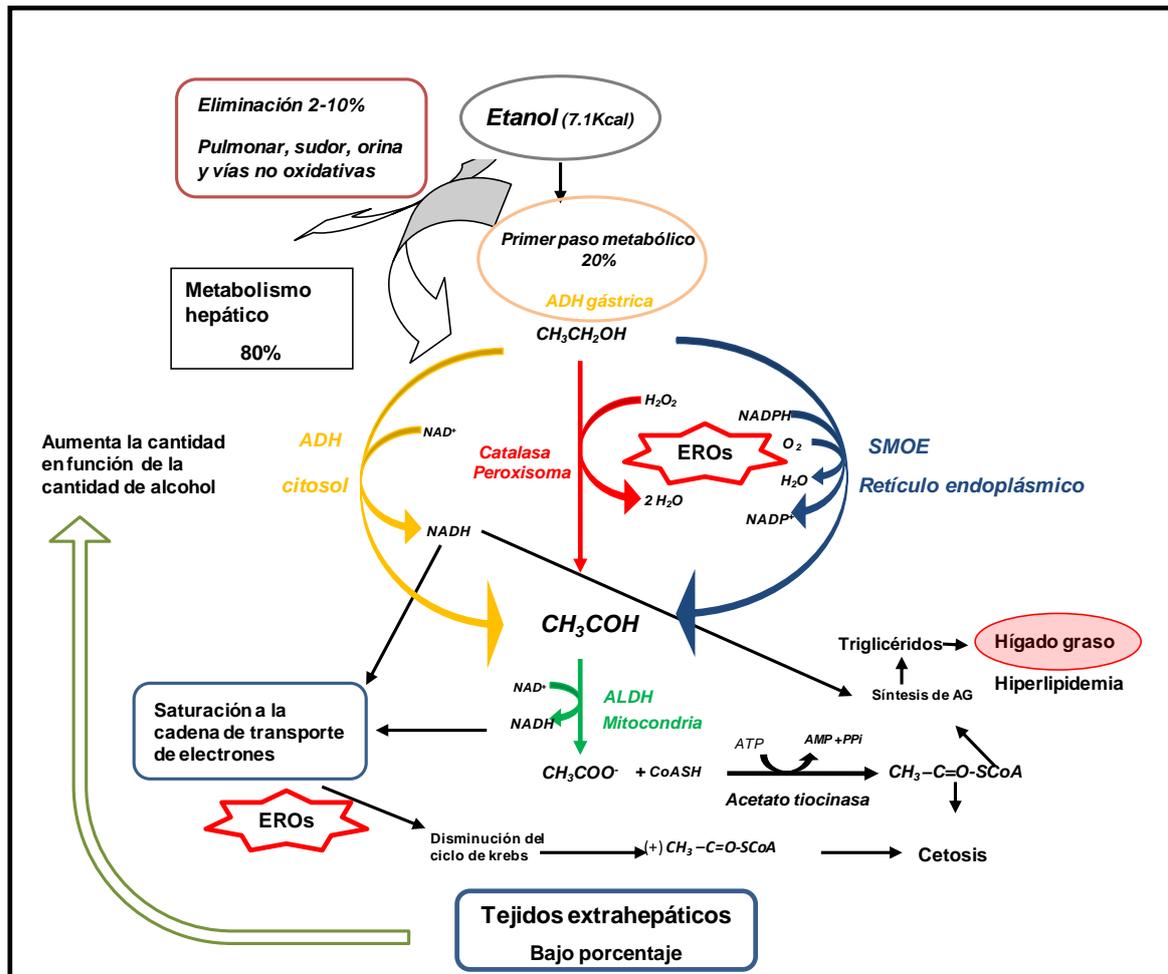
La vía metabólica oxidativa se produce principalmente en el hígado (80%), pero también hay otros tejidos con capacidad de metabolizar el alcohol por vías oxidativas como estómago, intestino y riñón (Lieber, 1997).

Numerosos estudios, han mostrado que la concentración de etanol en sangre puede ser apreciablemente menor cuando una misma dosis es administrada por vía oral en lugar de por vía intravenosa, indicando, por tanto, cierto metabolismo del etanol ingerido, antes de alcanzar la circulación periférica. Así, una vez ingerido, el etanol llega en primer lugar al tracto gastrointestinal, donde puede ser metabolizado antes de su llegada a la circulación general, lo que se conoce como metabolismo de primer paso del etanol, este valor puede representar hasta un 20% del metabolismo oxidativo y es llevado a cabo por la ADH gástrica (Frezza y cols., 1990). Una vez sometido parte del etanol ingerido al metabolismo de primer paso, el etanol no metabolizado se absorbe y pasa de sangre al hígado por la vía porta hepática donde tiene lugar la mayor parte de su metabolización oxidativa (Lieber, 1997). Además, otros tejidos corporales tales como el riñón o el corazón han demostrado su capacidad para metabolizar el etanol a acetaldehído cuando los niveles de alcohol en sangre son elevados.

La actuación de la alcohol deshidrogenasa (ADH) es fundamental para el metabolismo oxidativo del alcohol. La mayor parte del etanol es oxidado por esta vía, ya que, en circunstancias fisiológicas normales, la SMOE metaboliza el 10% del alcohol en el hígado, y la catalasa solo un 2% (Guo y Ren, 2010; Manzo-Avalos y Saavedra Molina, 2010; Cederbaum y cols., 2009). La ADH se encuentra predominantemente en el citosol hepático, aunque también se expresa en otros tejidos, entre ellos el estómago y el riñón, siendo la ADH gástrica responsable del primer paso metabólico del alcohol, actuando como

barrera protectora y modulando su paso a la circulación sistémica (Fortea y cols., 1999; Bode y Bode, 2003). La dotación enzimática de ADH es limitada, lo que explica que exista una capacidad fija para metabolizar el alcohol, que se calcula en unos 8-10 g/hora (120 mg/kg/hora, 10 ml/hora).

Figura 2.1.3. Esquema del metabolismo del etanol



$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$: etanol; CH_3COH : acetaldehído; CH_3COO^- : acetato, $\text{CH}_3\text{C=O-SCoA}$: acetil coenzima A; AG ácidos grasos.

La ADH, presenta un amplio polimorfismo en humanos, pero también en los roedores, es un sistema que implica varios genes y alelos que dan lugar a diferentes subtipos de isoenzimas que se han agrupado en tres clases (I, II, III) de acuerdo a sus propiedades funcionales y fisicoquímicas (Kitson y Weiner, 1996; Valle y Bazzone, 1983). Estas enzimas se encuentran constituidas por la combinación de 8 subunidades distintas α , β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 , γ_2 , π y x que son codificadas por cinco genes de ADH 1 a ADH 5 (Bosron y Li, 1987).

En las personas que consumen alcohol de forma esporádica o en dosis moderadas, la ADH hepática es la enzima encargada de llevar a cabo la oxidación de la mayor parte del etanol ingerido y convertirlo en acetaldehído, una molécula muy tóxica, con la consiguiente formación de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) a partir de la misma coenzima en su forma oxidada (NAD⁺). El exceso de NADH tiene consecuencia en la cadena transportadora de electrones, pues disminuyen los niveles de NAD⁺ disponibles para que esta funcione adecuadamente haciendo que produzca un exceso de radicales superóxidos y ERO altamente tóxicas favoreciendo el EO (Bailey y Cunningham, 2002). Además, el exceso de NADH promueve lesiones hepáticas mediante la disminución de la glucogénesis y la síntesis de ácidos grasos. En el citosol, el NADH es transportado dentro de la mitocondria y disminuye las necesidades de NADH procedente del ciclo de ácido cítrico y de la β -oxidación de los ácidos grasos, que en estado normal actúan como fuente de energía para el hígado.

También, el exceso de NADH aumenta la concentración de α -glicerofosfato, que favorece la acumulación de triglicéridos hepáticos por atrapamiento de ácidos grasos. Además, los equivalentes reductores pueden pasar de NADH a nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), los cuales pueden ser utilizados en la síntesis de ácidos grasos (Lieber y Pignon, 1989).

Las últimas investigaciones apuntan a esta disminución de NAD⁺ como una de las principales causas del daño provocado por el consumo de alcohol, y en especial, por el BD (French, 2016). Puesto que el NAD⁺ sirve como coenzima en muchas reacciones de oxidación-reducción, por ejemplo, en dos enzimas importantes del metabolismo del alcohol, la ADH y el aldehído deshidrogenasa (ALDH), y como cosustrato de otras enzimas como las sirtuinas (SIRTs), que participan en la desacetilación de numerosas proteínas hepáticas. Altos niveles de alcohol en el organismo, disminuyen los niveles de NAD⁺ puesto que son reducidos a NADH y, no están disponibles para actuar como coenzima en la desacetilación de moléculas debido a las SIRT desacetilasas (Verdin, 2015; Bardag-Gorce y cols., 2002). Hay funciones biológicas que pueden estar comprometidas debido a la inactividad de las SIRTs como consecuencia de los bajos niveles de NAD⁺, alterando la hiperacetilación de numerosas proteínas

acumuladas en el hígado, como por ejemplo, la proteína quinasa adenosina monofosfato (AMPK), el receptor activado por proliferador de peroxisoma α (PPAR α) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) con múltiples funciones como el incremento de la oxidación de ácidos grasos, gluconeogénesis y sensibilidad a la insulina (Haigis y Sinclair, 2010), así como, juega un papel importante en la apoptosis, en la reparación de DNA, inflamación y producción de energía (Purusholham y cols., 2012). Cabe destacar la disfunción mitocondrial que tiene lugar cuando disminuyen los niveles de NAD⁺ (Stipp, 2015).

Por otro lado, el acetaldehído es una molécula de 10 a 30 veces más tóxica que el etanol, además de ser mutagénica y teratogénica. La toxicidad del acetaldehído, se debe, en parte, a su capacidad de formar aductos con diversas moléculas, principalmente con proteínas (Rintala y cols., 2000) resultando en la producción de anticuerpos, inactivación de diversas moléculas con actividad biológica e inhibición de la reparación del DNA. Además, puede afectar a la síntesis y secreción de proteínas (Lieber, 1985), promover la peroxidación lipídica a través de su unión al glutatión reducido (Salaspuro, 1985) e inducir alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias, reduciendo su capacidad respiratoria (Lieber, 1995).

El acetaldehído formado se transforma a su vez en acetato por medio de la enzima ALDH que se produce prácticamente en su totalidad en el hígado (Zakhari, 2006; Lieber, 2005). Existen múltiples formas moleculares de la ALDH en el hígado humano y de rata, pero solo ALDH1 y ALDH2 parecen estar involucradas en la oxidación del acetaldehído. ALDH1 presenta una alta K_m (30 μ M) y está presente en la fracción citosólica de la célula. ALDH2 o ALDH de baja K_m (3 μ M), localizada en la fracción mitocondrial, es la principal responsable de la oxidación del acetaldehído en el hígado.

La ALDH también consume NAD⁺ generando NADH tras metabolizar el acetaldehído a acetato, por ello, los niveles hepáticos de NAD⁺ siguen disminuyendo, comprometiendo múltiples funciones biológicas como se ha comentado anteriormente, y aumentando los de NADH con los consiguientes daños en la cadena de transporte de electrones, favoreciendo la formación de EROs y la síntesis de ácidos grasos.

El sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE), dependiente del citocromo P-450, constituye la segunda vía de oxidación del etanol. Este sistema presenta varias isoformas, las cuales poseen distintas capacidades de oxidar el etanol. La isoforma CYP2E1, ubicada en el retículo endoplasmático hepático, es inducida por un consumo crónico y agudo de alcohol y desempeña un papel importante metabolizando el alcohol a acetaldehído ante concentraciones elevadas (Artun y cols., 2010; Lu y Cederbaum, 2008; Das y Vasudevan, 2007;). Por eso, este sistema juega un papel importante en el BD, donde el nivel de alcohol aumenta de forma brusca. Cuando esto ocurre la ADH se satura y la SMOE se activa especialmente generando mayor cantidad de EROs. Esta es una de las causas por las que los efectos del consumo agudo de alcohol difiere del consumo crónico. Existe una correlación entre el grado de inducción de esta isoforma y la producción de radicales libres como el anión O_2^- y el H_2O_2 , especialmente dañinos (Dey y Cederbaum, 2006; Wu y cols., 2006). La elevada eficiencia en reducir el O_2 a O_2^- y H_2O_2 por el CYP2E1 lleva a que éste sea considerado uno de los factores clave que favorecen el EO producido por el consumo crónico y especialmente agudo de alcohol (Lu y Cederbaum, 2008; Albano, 2006).

El aumento de actividad de la SMOE conlleva al consumo de mayor cantidad de NADPH ya que es un cofactor necesario para su funcionamiento. Este aumento de consumo tiene consecuencias, pues es necesario para la síntesis de glutatión (GSH) generado por la enzima glutatión reductasa (GR).

La catalasa (CAT), es una enzima antioxidante que participa tan solo un 2%, en la oxidación del etanol, al menos en el hígado (Lieber, 1999). Se ubica en los peroxisomas celulares y especialmente en el hígado, requiere la producción de una cantidad significativa de H_2O_2 que puede ser generada mediante la oxidación de NADPH por acción de la NADPH oxidasa o por la oxidación de la hipoxantina por la xantina oxidasa (Comporti y cols., 2010; Lieber, 1997). Por todo ello, esta enzima es conocida como una de las cuatro enzimas endógenas antioxidantes que tiene nuestro organismo pues transforma H_2O_2 en agua y oxígeno.

La eliminación oxidativa extrahepática del etanol (aproximadamente el 10%) se realiza principalmente a través de la oxidación catalizada por la ADH, representada por las formas ADH1 y ADH4, que se distribuyen en varios tejidos extrahepáticos. Aunque es cuantitativamente poco importante, implica un nivel activo de oxidación de etanol en distintas células y tejidos del organismo. Los tejidos más implicados son sobre todo el pulmón (Yang y cols., 2002), cerebro (Galter y cols., 2003), estómago y riñón (Buhler y von Wartburg, 1982), esófago (Yin y cols., 1993), recto (Koivisto y Salaspuro, 1996), páncreas (Jelski y cols., 2011), intestino delgado y colon (Pronko y cols., 2002), glándula salival (Waskiewicz y cols., 2014), próstata (Gomez y cols., 2007), tiroide, suprarrenal, tejido adiposo, piel, pecho y vesícula biliar (Saleem y cols., 1984) en los cuales se ha detectado las formas ADH1 y/o ADH4.

Vías no Oxidativas:

Como ya se comentó, además de las principales vías oxidativas, existen otros mecanismos para metabolizar el etanol que son las vías metabólicas no oxidativas: reacciones de conjugación, esterificación de los ácidos grasos y reacciones dependientes de radicales de oxígeno.

En las reacciones de conjugación con ácido glucurónico o con sulfato, el etanol puede ser metabolizado formando etilglucuronido o etilsulfato, actualmente usados como marcadores del consumo alcohólico, porque puede persistir y se puede detectar por largo tiempo después de que el alcohol se haya eliminado completamente del organismo (Wurst y cols., 2000).

Otras de las vías no oxidativas es aquella por la que se forman los ésteres etílicos de los ácidos grasos (EEFA) en los órganos dañados más frecuentemente por el alcohol: hígado y tejidos extrahepáticos, principalmente en el páncreas y tejido adiposo y, en menor medida, el cerebro y corazón (Quertemont, 2004; Beckemeir y Bora, 1998; Zimatkin y Deitrich, 1995). Los EEFA son metabolitos del etanol formados por la esterificación de este con los ácidos grasos por la enzima ácido graso etil éster sintetasa (EEFA sintetasa) presente en alta concentración en estos tejidos. Los efectos fisiológicos de la formación de ésteres etílicos consisten en la afectación de la capacidad oxidativa de la mitocondria, aunque también se ha descrito su capacidad para

desordenar las membranas celulares. Estos metabolitos parecen tener una especial relevancia para el daño tisular cerebral originado por el consumo crónico de cantidades abundantes de alcohol (Aragon y cols., 2002; Laposata, 1996).

La tercera de las vías no oxidativas son las reacciones dependientes de radicales libres ya que el etanol es un agente eliminador de radicales de oxígeno y se puede oxidar a acetaldehído al reaccionar ante especies con radicales del tipo hidroxilo o ferrilo. Estos radicales no tienen importancia metabólica por su toxicidad pero con estas reacciones es posible generar radicales de etanol, como el radical 1-hidroxietilo (Cederbaum, 1987).

2.1.4. Metabolismo del alcohol en el corazón y en el riñón

El consumo agudo de alcohol afecta ampliamente al organismo, en especial al hígado, ya que como se ha comentado anteriormente, es el principal órgano metabolizador del etanol pero también el corazón y el riñón son órganos metabolizadores de etanol, pues parte del alcohol ingerido no metabolizado pasa a sangre y de allí a estos tejidos. Estos dos órganos presentan diferentes expresiones y actividades de las tres enzimas encargadas del metabolismo oxidativo del alcohol, haciendo que tengan sus peculiaridades a la hora de metabolizar el alcohol por vías oxidativas y generar EO.

En el riñón, el metabolismo del etanol tiene lugar por las tres vías metabólicas oxidativas, ADH, SMOE y CAT, al igual que en el hígado (Figura 2.1.4). De estas tres vías oxidativas, la principal es la enzima ADH ya que el riñón constituye el tejido extrahepático que presenta mayor cantidad de esta enzima, del orden de ocho veces más cantidad de esta enzima que en el corazón y diez veces más que en el páncreas. Las otras dos vías también metabolizan el etanol ingerido, pero, en menor medida respecto a la ADH (Das y Vasudevan, 2008).

Estudios previos determinan que, cuando las ratas son tratadas con alcohol al 20% durante 10 semanas se produce un incremento en las actividades de ADH y catalasa en el riñón (Orellana y cols., 1998). En el caso

de la enzima ADH el aumento es prácticamente el doble al valor control y en el de la catalasa es el triple.

La isoforma de la ADH presente en este órgano es muy similar o idéntica a la ADH-1 del hígado (Qulali y cols., 1991).

Por otro lado, la presencia de SMOE en el riñón no se ha medido expresamente pero se conoce que aumenta proporcionalmente tras el consumo de alcohol así como en el hígado (Teschke y cols., 1981), por lo tanto, también aumenta la producción de acetaldehído y EROs por esta vía cuando la concentración de alcohol que llega al riñón es elevada, como podría ser el caso del BD.

Este aumento de la metabolización renal de etanol debido a los altos niveles de alcohol ingerido, provoca un aumento de los niveles de acetaldehído y NADH. Este exceso de NADH es reducido por el incremento de la actividad de las enzimas malato deshidrogenasa y aspartato transaminasa, aunque, tras un consumo elevado de alcohol, el riñón no es capaz de reducir el exceso de NADH ya que las enzimas que lo reducen no aumentan más su actividad, por lo tanto, este exceso aumenta el EO ya que como se ha comentado anteriormente el exceso de NADH tiene consecuencia en la cadena transportadora de electrones produciendo un exceso de radicales superóxidos (Nechifor y Dinu, 2011). Para el BD no hay estudios que establezcan que ocurre lo mismo pero se puede afirmar que quizás el mecanismo de acción es similar ya que los niveles de alcohol son muy elevados.

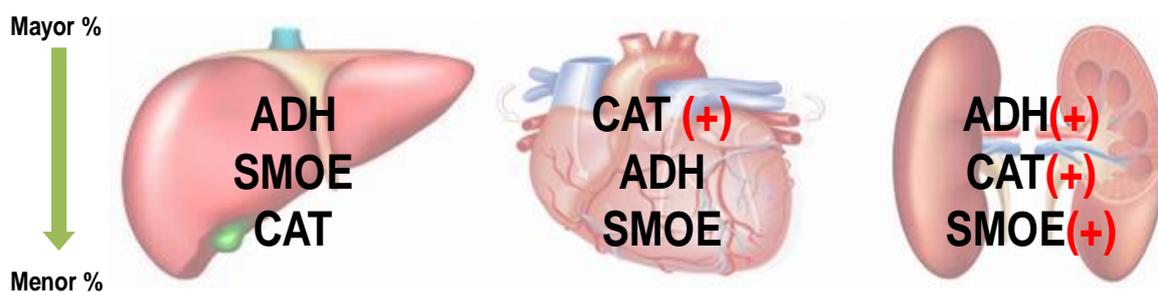
En consonancia con lo anterior, se ha demostrado que el consumo de alcohol también induce el aumento de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, ya que el consumo de alcohol durante largos periodos de tiempo aumenta de tres a cuatro veces el CYP2E1 en los microsomas y peroxisomas del riñón. Por lo tanto, el CYP2E1 es bastante inducible por el consumo de alcohol en el riñón. Este hecho explica la tolerancia que presenta el organismo al alcohol (Orellana y cols., 1998).

Respecto a las vías no oxidativas, una evidencia creciente sugiere que los EEFA juega un papel importante en el daño producido por el consumo de

alcohol. El consumo de alcohol causa un incremento significativo de los niveles de EEFA, principalmente en el cerebro y corazón pero también en el riñón e hígado. Este incremento puede estar asociado con el aumento de la actividad de la EEFA sintetasa (Beckemeier y Bora, 1998; Quertemont, 2004).

En el corazón, al igual que el hígado y riñón (Figura 2.1.4), la metabolización del alcohol tiene lugar por las tres vías metabólicas oxidativas aunque estas actúan de forma distinta a los otros dos tejidos, ya que los niveles de ADH son bajos, la presencia de SMOE y los niveles de CAT están aumentados respecto a otros órganos (Orellana y cols., 1998; Fahimi y cols., 1979; Hicks y Fahimi, 1977; Herzog y Fahimi, 1976), jugando un papel más importante en el metabolismo oxidativo del alcohol, en el corazón, que la enzima ADH (Panchenko y cols., 1987; Antonenkov y Panchenko, 1986; Fahimi y cols., 1979).

Figura 2.1.4. Esquema comparativo de las tres vías oxidativas de metabolización en el hígado, corazón y riñón.



La figura indica la importancia de cada una de estas vías en los distintos tejidos según la cantidad de alcohol que metabolizan y cuál de estas vías se induce específicamente tras el consumo abusivo de alcohol BD (+).

Se ha comprobado que tras el consumo de grandes cantidades de alcohol, la actividad de la enzima ADH en el corazón, aunque está presente, no se modifica, constituyendo una de las diferencias más significativa respecto al riñón e hígado. Sin embargo, las actividades de las enzimas SMOE y CAT se encuentran aumentadas tras el consumo de alcohol, aunque la enzima CAT es la principal enzima metabolizadora del etanol en el corazón. A este hecho se le añade que tras el consumo de alcohol, existe un incremento en el tamaño y número de peroxisomas en el corazón, localización celular de la CAT, por lo tanto, se observa un aumento en el tamaño del corazón. Este incremento de

los peroxisomas debido al aumento de la actividad CAT tras el consumo de alcohol ha sido reflejado en el incremento del músculo cardiaco generando cardiomegalia e indicando que la enzima CAT juega un papel más importante en el metabolismo del alcohol en el corazón que la enzima ADH.

Diversos autores han determinado que el metabolismo del etanol a través de la SMOE puede contribuir a la patogénesis de las cardiopatías alcohólicas, incluyendo disfunción contráctil, aumento del EO y apoptosis, posiblemente a través de la activación de las señales pro-apoptóticas JNK y ASK-1 (Zhang y cols., 2013).

2.2. ALCOHOL Y SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.2.1. Generalidades

El consumo de alcohol, el cual se conoce comúnmente como “beber”, ha estado integrado en la sociedad desde el comienzo de la historia. Sin embargo, en función del patrón de consumo, el alcohol puede tener efectos tóxicos o beneficiosos en el organismo, especialmente a nivel cardiovascular, por eso se denomina como una sustancia que produce hórmesis debido a que a baja concentración tiene el efecto contrario que a alta concentración a nivel cardiovascular.

Como se ha comentado anteriormente, según la OMS, el consumo abusivo de alcohol provoca la muerte de 3,3 millones de personas al año, siendo causa de muerte por delante de la violencia, SIDA o tuberculosis. Sin embargo, su consumo moderado (de una a dos bebida al día en las mujeres y de dos a tres bebidas al día en los hombres) está asociado con un menor riesgo de mortalidad, de enfermedad coronaria, de isquemia, de trombosis y de síndrome metabólico, debido al mejor perfil lipídico que genera (las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad (HDL) están aumentadas y las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL) están disminuidas), aumento de la fibrinólisis y mayor sensibilidad a la insulina, disminución de los marcadores de disfunción endotelial y homocisteína, y al aumento de adiponectina y factor de crecimiento endotelial (Lucas y cols., 2005) (Figura 2.2.1).

Figura 2.2.1. Manifestaciones clínicas y mecanismos fisiopatológicos que se presentan en el sistema cardiovascular según el patrón de consumo de alcohol.



Modificado de Lucas y cols., 2005.

Por el contrario, el consumo de grandes cantidades de alcohol (más de 3 bebidas al día en las mujeres y más de 5 bebidas al día en el caso de los hombres) produce un aumento del EO, disfunción de los marcadores endoteliales y presencia de un perfil lipídico perjudicial ya que los niveles de triglicéridos están aumentados y los de HDL disminuidos, los cuales suponen factores de riesgo para el sistema cardiovascular, aumentando la presión arterial, arritmias y el síndrome metabólico.

2.2.2. Estrés oxidativo

Como ya se comentó, el EO es una situación de desequilibrio entre las moléculas oxidantes y reductoras en el organismo, por lo tanto, puede aparecer por el aumento en la producción de RL o bien como consecuencia de una disminución de los antioxidantes endógenos.

Radicales Libres:

El término RL es utilizado con frecuencia para designar a un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados, lo cual hace que sea muy inestable y reactivo (Valko y cols., 2004). Los RL se forman en el interior

de las células, en el citoplasma o en las mitocondrias, y en la membrana celular (Bianchi y Antunes, 1999). En general, los RL presentan una vida media corta y reaccionan de forma rápida con diversos compuestos, pudiendo oxidar biomoléculas y provocar daño molecular y celular.

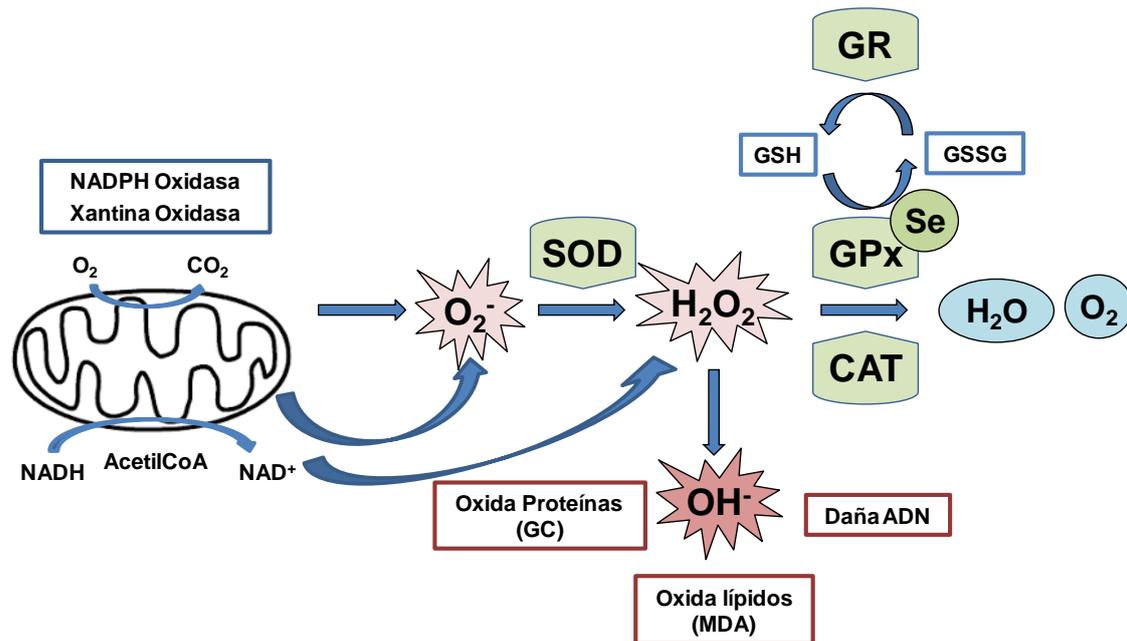
Dentro de los RL, es significativa la acción del grupo de radicales que contienen oxígeno, siendo estos conocidos como EROs (Wu y Cederbaum, 2003). Esta categoría, no incluye solo los EROs, como el anión O_2^- y el radical hidroxilo (OH^*), sino también algunos derivados no radicales como el H_2O_2 y el oxígeno singlete ($^1O_2^*$) (Battin y Brumaghim, 2009; Andresen y cols., 2006). En general las EROs se producen en el organismo y a bajas dosis tienen funciones fisiológicas. Cuando existe un incremento en su formación como en casos donde exista disfunción en la membrana de la mitocondria, NADPH oxidasa y xantina oxidasa (Figura 2.2.2) afectan negativamente al organismo.

Mecanismos de defensa antioxidante:

En el organismo existen numerosos y eficientes mecanismos de defensa antioxidante que actúan en función del tipo de especie dañina y del lugar donde ésta se genera. En las células, el sistema antioxidante es principalmente de tipo enzimático y en el espacio extracelular, es decir, en fluidos biológicos como el plasma, el sistema antioxidante es, principalmente, de tipo no enzimático. Las enzimas antioxidantes forman parte del sistema antioxidante endógeno, los antioxidantes no enzimáticos pueden ser endógenos como el GSH y exógenos.

Las enzimas antioxidantes endógenas son el principal sistema de defensa frente al daño oxidativo y se encargan de eliminar las EROs, especialmente el radical O_2^- y H_2O_2 , para evitar que, a partir de éstos, se generen otras especies más reactivas y peligrosas como el radical OH^* , $^1O_2^*$ y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$). Este sistema incluye a la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), todas ellas actúan de manera concatenada (Figura 2.2.2).

Figura 2.2.2. Esquema de las cuatro enzimas antioxidantes endógenas.



La SOD constituye la primera fase de defensa antioxidante y cataliza la dismutación de los radicales $O_2^{\cdot-}$ mediante su transformación en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2). Actúa a valores de pH fisiológico, siendo su velocidad de catálisis máxima para valores de pH comprendidos entre 7 y 9 (Aydermir y Tarhan, 2001). Esta reacción también se produce de forma espontánea aunque de manera menos eficiente, ya que depende fuertemente de pH.

En humanos se diferencian tres formas de SOD, que difieren con respecto a su ubicación en las células y los iones metálicos que requieren para su función, en el citosol (Cu/ZnSOD), en la mitocondrial (MnSOD) y la extracelular (ECSOD) (Valko y cols., 2006; Fattman y cols., 2003).

La SOD citosólica es una proteína que posee dos subunidades idénticas, que contiene cobre y zinc en su centro activo, siendo el cobre responsable de la transferencia de electrones, mientras que el zinc desempeña únicamente un papel estabilizador.

La SOD mitocondrial es una proteína tetramérica y contiene manganeso en su centro activo, y, aunque su contenido en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de Cu/ZnSOD, la expresión de MnSOD es esencial para la supervivencia ya que tras utilizar ratones Mn-SOD

knockout, se comprobó que estos presentaron una cardiomiopatía letal (Li y cols., 1995) y para el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por EROs (Matés y cols., 1999). Además de su papel en la dismutación del O_2^- esta isoforma influye en la actividad de factores de transcripción tales como el HIF-1 α , el AP-1, el NF- κ B y el p53, y afecta la estabilidad del DNA (Miriyala y cols., 2012).

La SOD extracelular, al igual que la citosólica, contiene cobre y zinc en su centro activo y posee una fuerte afinidad con la heparina y otros proteoglicanos. Se localiza en líquidos extracelulares como el plasma, la linfa y el líquido cerebroespinal y fluido sinovial (Alfonso y cols., 2007).

La CAT se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano. A nivel celular se localiza principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%), aunque también se halla en la mitocondria del tejido cardiaco a baja concentración (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995), donde ejerce un importante papel antioxidante (Radi y cols., 1993) y, a nivel tisular está presente, principalmente, en la sangre, medula ósea, corazón, riñones e hígado. Su actividad varía según el tejido, siendo más elevada en hígado, riñón y corazón, más baja en el tejido conectivo y los epitelios y prácticamente nula en el tejido nervioso (Céspedes y cols., 1996). Su función más significativa es la descomposición del H_2O_2 a H_2O y O_2 .

La CAT requiere que el ión Fe^{3+} se una a su sitio activo para poder ser eficaz. En cualquier caso, su afinidad por el H_2O_2 es baja por lo que requiere elevadas concentraciones de H_2O_2 para actuar, lo que la convierte en la enzima más relevante en la respuesta adaptativa celular frente a condiciones de estrés oxidativo (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995; Cheesman y Slater, 1993). Este hecho sumado a que esta enzima posee una K_m y V_{max} muy altas para el H_2O_2 la convierte en la más adecuada para eliminar el peróxido de hidrogeno a nivel celular cuando éste se encuentra presente en concentraciones elevadas (Barja de Quiroga, 1997). Además al encontrarse mayoritariamente en los peroxisomas, la CAT es menos efectiva que la GPx frente al H_2O_2 producido en compartimentos como el citosol o la mitocondria (Ji, 1995).

La GPx es una de los principales componentes del sistema de defensa antioxidante que incorpora al Se en forma de selenocisteína dentro de su núcleo catalítico, por lo tanto, pertenece a la familia de las selenoproteínas. Estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 y de hidroperóxidos orgánicos a H_2O y O_2 utilizando GSH como agente reductor (Negro, 2008; Papp y cols., 2007). En humanos se conocen cinco isoformas: GPx-1, ubicada en el citosol de todas las células del organismo; GPx-2, ubicada en el tracto gastrointestinal e hígado; GPx-3, puede estar en el interior o exterior de la célula y su importancia radica en que es una de las enzimas transportadoras de Se en el organismo; GPx-4, presente en las membranas celulares y GPx-6, específica del epitelio olfativo y del tejido embrionario (Reeves y Hoffmann, 2009; Papp y cols., 2007; Brigelious-Flohé y cols., 2002).

La GR es una enzima que forma parte del sistema antioxidante GPx/GR. Se encuentra ampliamente distribuida por el organismo, principalmente, en el hígado y los eritrocitos y, también se expresa en niveles elevados en los órganos reproductores de ambos sexos y en el epitelio pulmonar (Fujii y cols., 2011). Cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH, el cual será utilizado por la GPx, en una reacción dependiente de NADPH.

Los antioxidantes no enzimáticos, forman la segunda defensa antioxidante, son distintos compuestos antioxidantes endógenos y exógenos, que atrapan o neutralizan a los RL.

Los antioxidantes de origen endógeno son GSH, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas, son sintetizados por el organismo humano, de modo que, cuando son modificados, se ponen en funcionamiento un mecanismo de síntesis para reemplazarlos.

El GSH es uno de los mecanismos de defensa antioxidantes más importantes para el organismo. De hecho, es el antioxidante que se encuentra en mayores concentraciones intracelulares, pudiendo actuar como tal en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Los principales órganos responsables de su homeostasis son hígado, riñón, corazón, pulmón, intestino y músculo (Deneke y Fanburg, 1989). En el interior de las células se localiza principalmente en mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo.

Por lo tanto, las enzimas que ayudan a generar GSH son fundamentales para la capacidad del organismo para protegerse frente al EO. Se ha demostrado que el consumo agudo de alcohol tipo BD reduce los niveles de GSH (Ojeda y cols., 2015), particularmente en las mitocondrias, que es donde se localizan niveles altos de GSH para eliminar las EROs generadas en la cadena respiratoria (Fernández-Checa y cols., 1998).

Los antioxidantes de origen exógeno, son aquellos que no son sintetizados por las células si no que provienen de la dieta, en concreto, de la ingesta diaria de frutas y vegetales. Son en su mayoría compuestos naturales como vitaminas, compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides) y algunos metales.

Los antioxidantes exógenos más considerados son las vitaminas C, E y β -caroteno (precursor de la vitamina A) ya que son los únicos nutrientes naturales que atrapan directamente radicales libres y al ser componentes estructurales de las membranas celulares, contribuyen, de esta forma, a su protección. Además, tienen un papel primordial ayudando a detener la cadena de reacciones de peroxidación lipídica y protegen al DNA del daño oxidativo (González-Torres y cols., 2000; Getoff, 2007).

Los flavonoides son los más destacados entre los compuestos fenólicos. Estos actúan inactivando los RL en los compartimentos celulares hidrofílicos y lipofílicos. También poseen la capacidad de donar átomos de hidrógeno y, por lo tanto, inhiben las reacciones en cadena provocadas por los RL (Arora y cols., 1998; Hartman y Shankel, 1990).

Entre los metales antioxidantes endógenos se encuentran el Se, el magnesio o el zinc son fundamentales para mantener el balance oxidativo del organismo, debido a que presentan funciones antioxidantes además de formar parte de determinadas enzimas antioxidantes (Steinbrenner y Sies, 2009; Klotz y cols., 2003).

Como se ha expuesto anteriormente, mantener un buen balance oxidativo es esencial para el organismo puesto que un aumento del EO puede afectar a biomoléculas como lípidos, proteínas o DNA provocando daño celular

y alterando diferentes procesos biológicos. El consumo agudo de alcohol induce EO, ya que el alcohol al ser una molécula pro-oxidante aumenta la producción de EROs en su metabolismo oxidativo, como vimos anteriormente.

En concreto, tras el BD los niveles de etanol en sangre aumentan mucho haciendo que se sature la ADH, actuando entonces el SMOE, dependiente del citocromo CYP2E1 que reduce el O_2 a O_2^- y H_2O_2 , ambas dos EROs muy activas. El aumento de CYP2E1 es considerado uno de los factores clave por el que el BD favorece el EO con mayor intensidad que el consumo crónico de alcohol. Este aumento de EO parece ser el mecanismo común que afecta a las distintas alteraciones cardiovasculares y renales que genera este patrón de consumo: cardiopatía alcohólica, hipertensión (HTA) y nefropatía alcohólica (Lu y Cederbaum, 2008; Albano, 2006).

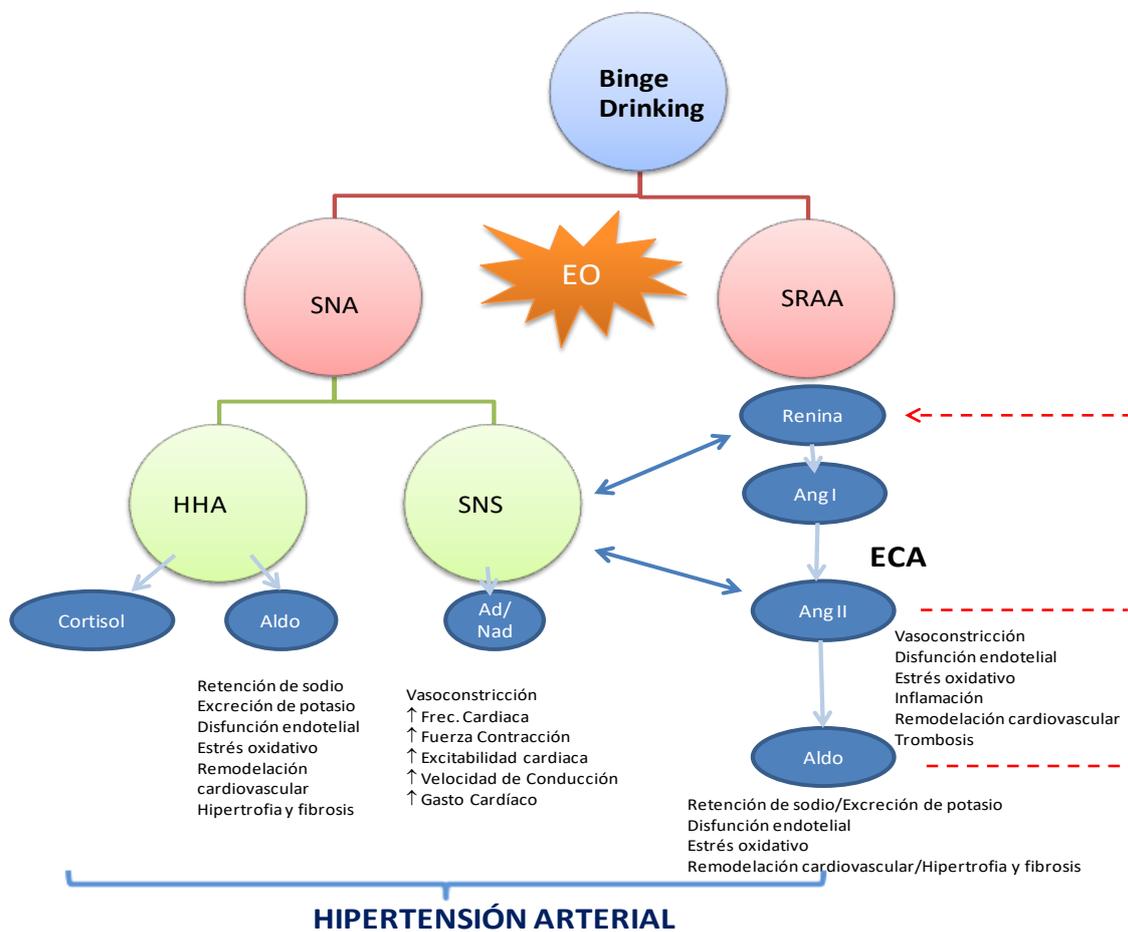
2.2.2.1. Estrés oxidativo y “binge drinking”

Recientemente, se ha observado que el EO está también muy relacionado con la activación del sistema nervioso autónomo (SNA) y del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), dos mecanismos que están aumentados en el BD y relacionados con los problemas cardiovasculares que este genera (Figura 2.2.2.1.).

Tras el BD, se ha observado un aumento de la activación del SNA, que activa al sistema nervioso simpático (SNS) y al eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA), posiblemente relacionado con el aumento de EO generado (Yang y cols., 2017). A modo de resumen, tras la activación del SNS se liberan adrenalina (Ad) y noradrenalina (Nad) provocando vasoconstricción, aumento de la frecuencia cardíaca, de la contracción, de la excitabilidad cardíaca y del gasto cardíaco. Tras la activación del eje HHA aumentan los niveles de Aldosterona (Aldo) y cortisol en sangre. La Aldo retiene sodio (Na^+), excreta potasio (K^+), a su vez produce EO y remodelación vascular e hipertrofia y fibrosis, y el cortisol activa el SRAA produciendo los efectos glucolipotóxicos en corazón así como hipertrofia en los cardiomiocitos. Todos estos mecanismos están relacionados con la génesis de la HTA.

Por otro lado, el SRAA y el EO tienen una relación directa, puesto que la Angiotensina II (Ang II) y la Aldo promueven EO a nivel vascular debido a que la Ang II y la Aldo se unen a sus respectivos receptores y estimulan a la NADPH oxidasa produciendo EROs (González y cols., 2014), en concreto la Ang II también estimula a la Xantina Oxidasa generadora de EROs. Además de favorecerse los efectos de la Aldo, ya comentados, la estimulación de Ang II provoca vasoconstricción, disfunción endotelial, EO, inflamación, remodelación cardiovascular y trombosis.

Figura 2.2.2.1. Esquema de los mecanismos implicados en la génesis de la hipertensión tras el consumo agudo de alcohol.



EO: estrés oxidativo, SNA: Sistema Nervioso Autónomo, SNS: Sistema Nervioso Simpático, Ad: Adrenalina, Nad: Noradrenalina, HHA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, Ang II: Angiotensina II, Aldo: Aldosterona, ECA: enzima convertidora de angiotensina.

Detalladamente se sabe que la activación del SNS, consecuencia de la activación del SNA, produce un aumento de las descargas de las aminas

simpáticas, Ad y Nad, tanto en ratas como en humanos (Rupp y cols., 1996; Russ y cols., 1991; Arkwright y cols., 1982). Estas aminas simpáticas ejercen diversas funciones en el organismo y actúan a varios niveles para aumentar la presión arterial:

- Aumento de la frecuencia cardíaca
- Vasoconstricción
- Aumento de la contracción cardíaca
- Aumento de la excitabilidad cardíaca
- Aumento de la velocidad de conducción
- Aumento del gasto cardíaco

Sin embargo, las alteraciones que se producen en las funciones simpático-suprarenales durante el envejecimiento hacen que las personas mayores con respecto a los jóvenes tengan reacciones diferentes en cuanto a los factores que activan el sistema nervioso autónomo, puesto que en los adolescentes este eje tiene una especial importancia ya que se han observado niveles de Aldo más elevados en los adolescentes.

Otro de los mecanismos por el cual el consumo agudo de alcohol incrementa la presión arterial es debido al aumento de los niveles de cortisol. Puesto que el alcohol es considerado una sustancia estresante capaz de activar el eje HHA, actúa estimulando la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), lo que lleva a activar la secreción hipofisiaria de la hormona ACTH y, por lo tanto, a la estimulación en las glándulas suprarenales que aumentan la secreción de cortisol. El cortisol es una sustancia muy activa con diversas funciones en el organismo y actúa a diversos niveles para aumentar la presión arterial. A nivel cardiovascular aumenta la sensibilidad de los vasos a la Ad y Nad produciendo vasoconstricción y, a nivel renal, actúa reteniendo líquidos puesto que actúa como la hormona antidiurética (ADH) e inhibiendo la excreción de Na^+ . Por este motivo, se puede afirmar que el consumo agudo de alcohol aumenta la producción de cortisol (Helms y cols., 2014; Boyd y cols., 2010).

El SRAA está formado por distintas hormonas y enzimas íntimamente relacionadas entre ellas, secretadas por el riñón y la corteza adrenal, que

actúan en la regulación del balance de Na^+ y K^+ , el mantenimiento del volumen del líquido extracelular y la regulación de la presión arterial a corto y largo plazo.

Los riñones secretan la enzima renina en respuesta a los estímulos que impliquen una reducción de la presión arterial, una vez liberada, se incorpora al torrente sanguíneo y actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, generando Angiotensina I (Ang I). La Ang I plasmática, apenas activa, es convertida en Ang II por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), principalmente, a nivel pulmonar. La Ang II es una sustancia muy activa, que ejerce importantes acciones para incrementar la presión arterial:

- A nivel cardiovascular, es un potente vasoconstrictor ya que produce vasoconstricción periférica sobre arteriolas y venas, produce disfunción endotelial, EO, inflamación, remodelación cardiovascular y trombosis (Figura 2.2.2.1).
- A nivel renal, actúa sobre los riñones causando retención de líquidos.
- En la corteza suprarrenal, la Ang II se une a sus receptores AT1 y estimula la secreción de Aldo, hormona que regula la eliminación de Na^+ , K^+ y agua, de forma que, su secreción, aumenta la eliminación de K^+ y disminuye la de Na^+ y agua al incrementar su reabsorción tubular, es decir, promueve una mayor retención de sal y agua a nivel renal. Así, la concentración plasmática de K^+ disminuye, mientras que la de Na^+ no se modifica sustancialmente, ya que se reabsorbe una cantidad proporcional de agua. En consecuencia, aumenta el volumen del líquido extracelular y la volemia, lo que induce un aumento del gasto cardíaco y de la resistencia vascular periférica y, finalmente, de los valores de la presión arterial.

Se sabe que el consumo agudo de alcohol produce un aumento de la secreción de Aldo en las glándulas suprarrenales favoreciendo, por tanto, un aumento de la presión arterial. Este aumento no se observa en los modelos de consumo moderado de alcohol (Puddey y cols., 1985; Nieminen y cols., 1983; Ibsen y cols., 1981). En este modelo, el aumento de Aldo se debe principalmente a un aumento de la activación del SRAA y aunque no exista una disminución de la presión arterial, principalmente por la disminución de la

concentración de Na^+ , aumentan los niveles renina y de la enzima ECA, lo que se traduce en niveles altos de Ang II que activa la secreción de Aldo y aumenta la presión arterial. Por último, aunque no es la vía principal de activación de la secreción de Aldo, el aumento de ACTH también favorece la secreción de Aldo.

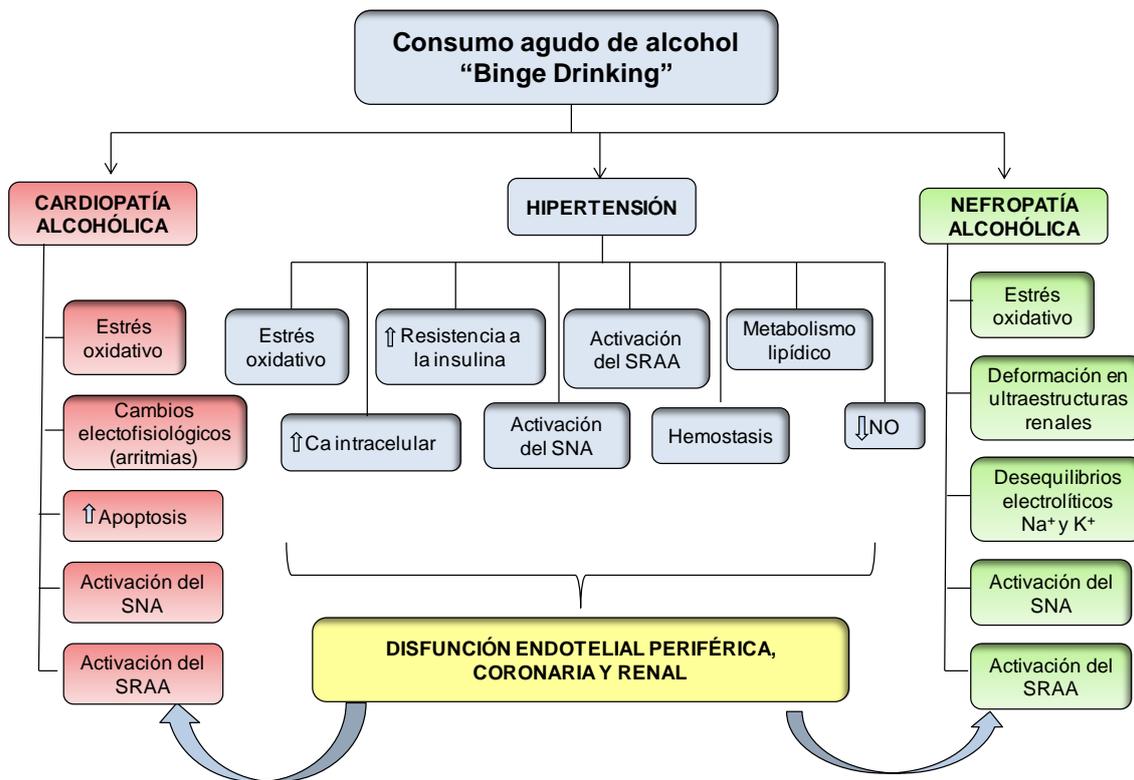
Otros estudios afirman que el aumento del volumen del líquido extracelular después del consumo de alcohol, aumenta la presión arterial sistólica en ratas (Chan y cols., 1983; Hussa, 1977). Este aumento del volumen del líquido extracelular es el resultado de los niveles altos de ADH y renina en plasma, indicando una estimulación del sistema nervioso simpático. Sin embargo, Okuno y cols., (1986) muestran que el incremento de la presión arterial observado en personas que consumen alcohol se debe a la activación prolongada de la actividad de la ECA, por lo tanto, hay un incremento significativo de los niveles de Ang II en sangre.

2.2.3. “Binge drinking” y sistema cardiovascular

Hoy en día existen pocos estudios en humanos y animales que hayan estudiado los mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales el consumo agudo de alcohol produce daños a nivel cardiovascular dando lugar a un aumento de la presión arterial, distintas cardiopatías y nefropatías. En su conjunto, estos estudios coinciden en que el BD está ampliamente asociado con el EO vascular y con cambios electrofisiológicos en las células endoteliales lisas, lo que contribuye a una disfunción endotelial periférica grave que acaba afectando a los vasos que irrigan al corazón y riñón (Piano y cols., 2017; Husain y cols., 2014; O’Keefe y cols., 2007).

Además, el EO generado por el BD no se limita a su acción vascular, ya que también ocurre en los principales tejidos, como el corazón y el riñón, dañando su estructura y funcionamiento (Piano y cols., 2017; Kumar y Vasudevan, 2008).

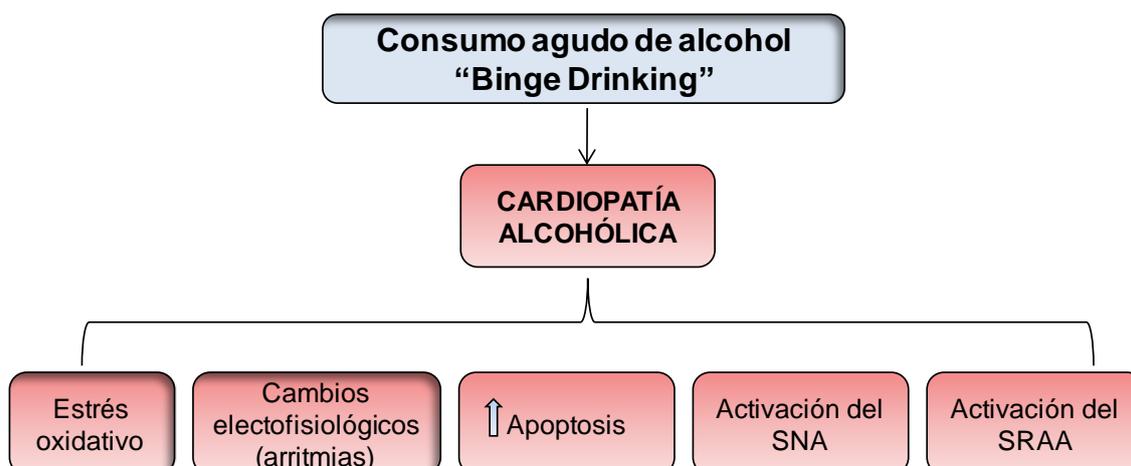
Figura 2.2.3. Esquema de los efectos nocivos que provoca el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” sobre sistema cardiovascular y renal.



2.2.3.1. Cardiopatía alcohólica

Aunque el consumo moderado de alcohol podría ser beneficioso para las funciones cardiovasculares y reducir el riesgo de la enfermedad cardíaca, el consumo agudo de alcohol produce distintos tipos de cardiopatías debidas principalmente 1) al EO cardiovascular, 2) a cambios electrofisiológicos que producen arritmias, 3) al incremento de apoptosis que genera esta droga, 4) activación del SNA y 5) activación del SRAA (Piano y cols., 2017; Husain y cols., 2014).

Figura 2.2.3.1. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” sobre el corazón.



2.2.3.1.1. Estrés oxidativo

Como se ha comentado anteriormente, el consumo agudo de alcohol produce EO debido a su metabolismo oxidativo. En el caso del corazón, el BD contribuye a la disfunción cardíaca debido al aumento de los niveles de catecolaminas que genera numerosas EROs y altera la función mitocondrial (Ren y Wold, 2008; Lucas y cols., 2005; Kanan y cols., 2004; Mansouri y cols., 2001). Esta disfunción cardíaca se debe al incremento de las EROs y a la disminución de las reservas antioxidantes, que se asociado con la hipertrofia del ventrículo izquierdo y el fallo cardíaco (Van Deel y cols., 2008; Hamilton y cols., 2004).

2.2.3.1.2. Cambios electrofisiológicos

Las arritmias cardíacas pueden desempeñar un papel importante en el riesgo de padecer infarto de miocardio o muerte súbita. Estudios previos han determinado que en individuos sanos y en individuos con enfermedades cardiovasculares, el BD está asociado con un mayor riesgo de padecer ciertas arritmias cardíacas, como fibrilación auricular, una de las arritmias más comunes y fuertemente asociada con efectos cardiovasculares adversos, como derrame cerebral (Conen y cols., 2011).

El BD incrementa la vulnerabilidad al desarrollo de arritmias debido a que el consumo agudo de alcohol altera las propiedades electrofisiológicas del corazón puesto que produce una reducción de los niveles de magnesio y

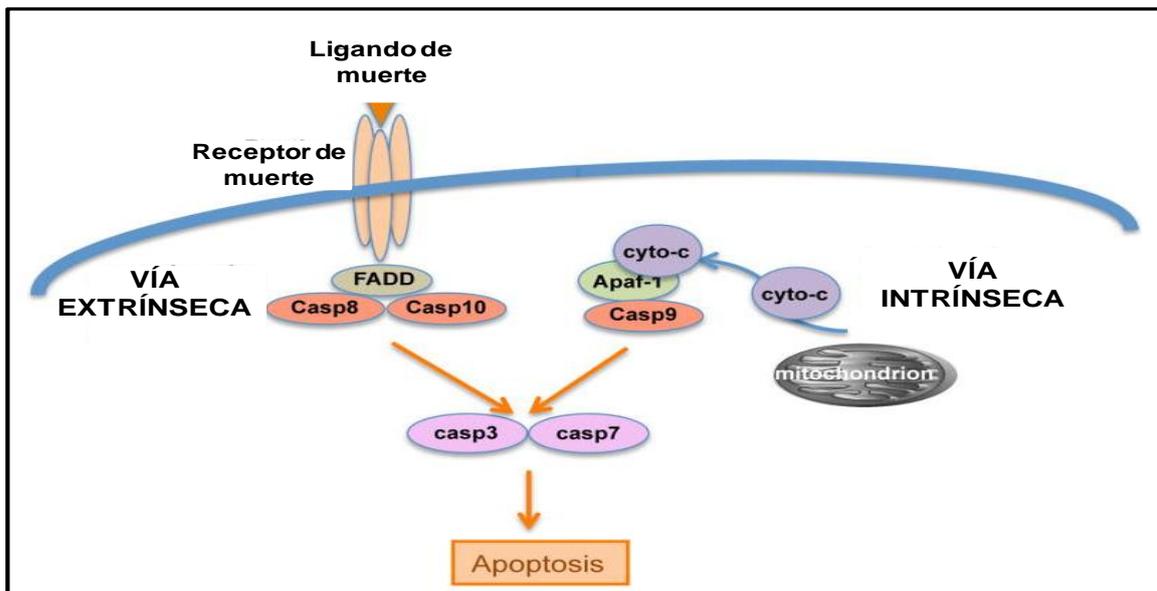
potasio en sangre, es decir, hipomagnesemia e hipopotasemia, respectivamente (George y cols., 2010). Además, Lorscheid y cols., 2005 determinaron que el consumo agudo de alcohol prolonga el intervalo QT y acorta el periodo refractario auricular. La prolongación de este intervalo está relacionado con el desarrollo de arritmias ventriculares (Zhang y cols., 2011).

2.2.3.1.3. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo mediante el cual el organismo elimina las células no deseadas del organismo (Dillon y cols., 2012; Yu y cols., 2009; Los y cols., 1999). Es la forma más común de muerte celular y se produce durante el desarrollo, la remodelación tisular, procesos de defensa y en la respuesta inmune. Este proceso se ejecuta a través de una familia de cisteínas proteasa, conocidas como caspasas, que se sintetizan como zimógenos latentes, y se activan siguiendo un orden jerárquicos como iniciadores y efectores del proceso de muerte celular (Yu y cols., 2009).

La apoptosis está controlada por los receptores de muerte presentes en la superficie celular (vía extrínseca) y otros a través de señales originadas dentro de las células (vía intrínseca) (Figura 2.2.3.1.3.).

Figura 2.2.3.1.3.1. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.



Modificado de Salvesen y Walsh, 2014

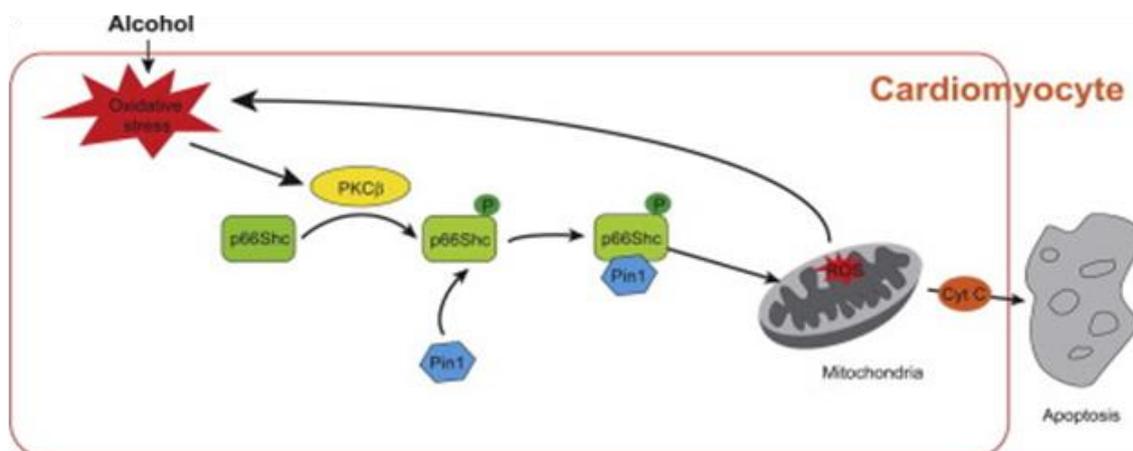
La vía extrínseca de señalización es la encargada del inicio de la apoptosis, se activa por la unión de ligandos de muerte, como FasL, a su receptor de muerte, receptor de Fas, afin de la superficie celular para reclutar y activar a las caspasas iniciadoras (Fricker y cols., 2013; Lee y Gustafsson, 1999; Ashkenazi y Dixit, 1998). Este proceso ocurre como consecuencia de interacciones homotípicas del dominio de muerte (DD) entre la región intracelular del receptor FasL y la proteína adaptadora FADD y las interacciones homotípicas del dominio efector de muerte (DED) entre FADD y el extremo N-terminal de la procaspasa 8 o la procaspasa 10 (Vercammen y cols., 2008). Este mecanismo constituye el complejo de señalización e inducción de muerte (Kischkel y cols., 1995) y la activación de los dominios de la proteasa de la procaspasa 8 y 10. Una vez activadas y procesadas, estas caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras, caspasa 3 y 7, que en última instancia se encargan de proteolizar el contenido de la célula (Fricker y cols., 2013; Yu y cols., 2009; Momoi, 2006) (Figura 2.2.3.1.3.).

La vía intrínseca se induce intracelularmente y puede ser desencadenada por daño en el DNA, grandes aumentos en la concentración de Ca^{2+} citosólico o estrés celular (Lozano y cols., 2009), así como un aumento en la generación de EROs en la mitocondria. Esto activa la expresión del gen supresor de tumores p53, que, a continuación, activa las proteínas pro-apoptóticas que esta mediada por la familia de proteína Bcl-2, compuesta por Bax y Bak, las cuales causan la liberación del citocromo c de la mitocondria y ellos conduce a la activación de la caspasa 9. Esta caspasa posee un dominio de reclutamiento asociado a caspasas (CARD) en el extremo N-terminal que media las señales de apoptosis después del daño mitocondrial. La caspasa 9 se activa a través del complejo apoptoma citosolico asociado con Apaf-1, que se une al citocromo c a través del dominio CARD (Fricker y cols., 2013; Momoi, 2004). Una vez que la caspasa-9 se activa, se produce la activación de otras caspasas, como las caspasas- 3 y 7 (Figura 2.2.3.1.3.).

El consumo agudo de alcohol está asociado con el aumento de apoptosis en los cardiomiocitos (Doser y cols., 2009; Kandadi y cols., 2013), aunque los mecanismos mediante los cuales se producen no están del todo descrito. Por un lado, hay autores que establecen que, como se ha comentado

anteriormente el BD aumenta la producción de EROs. La mayoría de las EROs se generan dentro de la fosforilación oxidativa mitocondrial, un proceso mediante el cual los electrones de NADH y FADH se transfieren al O_2 molecular a través de la cadena de cuatro complejos enzimáticos y se reduce a H_2O . Las EROs activan a la proteína quinasa C- β (PKC- β) e induce la fosforilación de la proteína p66Shc produciendo la transferencia de esta proteína desde el citosol al interior de la mitocondria. Una vez en la mitocondria, la proteína p66Shc se une al complejo de importación TIM-TOM el cual es desestabilizado por las señales pro-apoptóticas y conduce a la liberación y activación de la proteína p66Shc. Una vez activado, el p66 oxida el citocromo c y cataliza la reducción de O_2 a H_2O_2 . Este ultimo induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), con posterior aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial a los iones, solutos y agua produciendo hinchazón y disrupción del organelo y la consiguiente liberación de factores pro-apoptótico, como el citocromo c, al citosol (Camici y cols., 2007). Por lo tanto, se considera que la proteína p66 es una enzima redox que genera el H_2O_2 mitocondrial como una señal para la apoptosis (Cosentino y cols., 2008) (Figura 2.2.3.1.3.).

Figura 2.2.3.1.3.2. Esquema de la apoptosis en cardiomiocitos.



Tomado de Wang y cols., 2015

Por otro lado, el BD favorece la producción de EROs, en situaciones de fallo cardiaco donde las EROs están muy aumentadas y se sabe que también son capaces de activar la vía extrínseca (Guan y cols., 2004).

Por otro lado, un estudio con ratones albinos transgénicos con Virus tipo B a los cuales se le insertaron el DNA de ADH clase I (puesto que es la isoforma más eficaz en la oxidación del etanol) se encontró que el consumo agudo de alcohol incrementó significativamente la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Caspasa-3 en el corazón mientras que disminuyó los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. El trasgén de ADH en sí mismo no produjo ningún efecto sobre la expresión de Bax, Bcl-2 y Caspasa-3 en ausencia de alcohol. Además, ni el consumo de alcohol ni el trasgén de ADH modificaron la vía extrínseca puesto que no se modificaron las proteínas de TNF- α , receptor y ligando Fas y caspasa-8, pero si aumentaron los niveles de citocromo c y pro-caspasa 9 en el citosol de los cardiomiocitos (Guo y Ren, 2010).

2.2.3.1.4. Activación del sistema nerviosos autónomo

Como se ha comentado anteriormente en la figura 2.2.2.1, el consumo agudo de alcohol es uno de los patrones que más favorece el EO y activa al SNA, activando este, a su vez, al SNS que provoca el aumento de la frecuencia y excitabilidad cardíaca, aumento de la fuerza de contracción, de la velocidad de conducción y del gasto cardíaco. El eje HHA provoca el aumento de los niveles de cortisol y Aldo aumenta los efectos glucolipotóxicos en el corazón así como produce hipertrofia en los cardiomiocitos y, la Aldo produce remodelación cardiovascular en el corazón.

2.2.3.1.5. Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona

Como se ha comentado anteriormente en la figura 2.2.2.1, el consumo agudo de alcohol es uno de los patrones que más favorece el EO y activa al SRAA, aumentando los niveles de Ang II que provoca vasoconstricción y remodelación cardiovascular y, los de Aldo en el corazón.

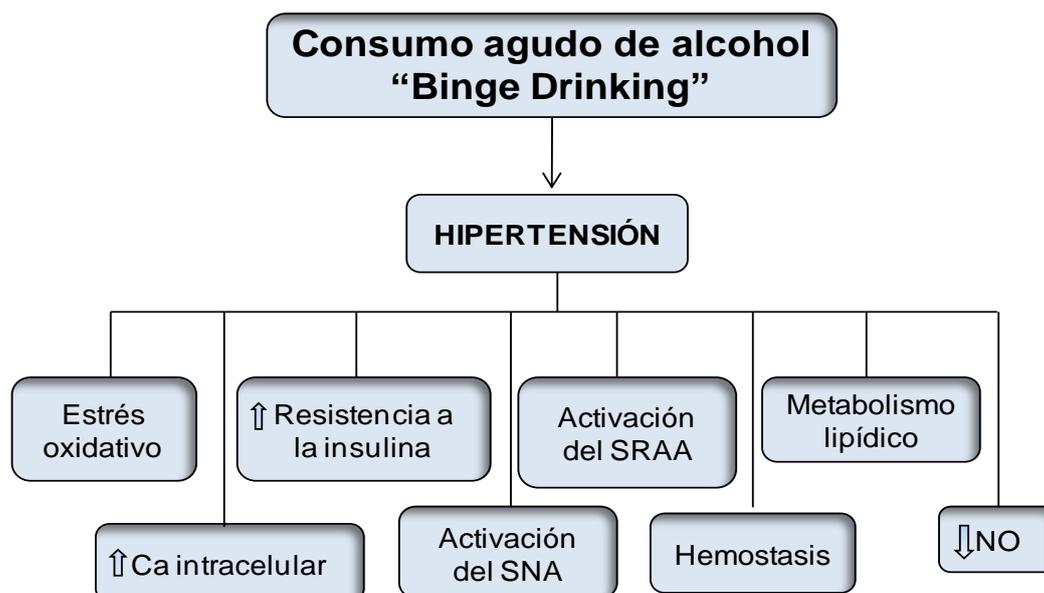
2.2.3.2. Hipertensión

Según la OMS, la hipertensión arterial (HTA), también conocida como tensión arterial alta, es un trastorno en que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta. Se considera elevada cuando la presión arterial

sistólica (PAS) es igual o superior a 140 mm Hg y/o la presión arterial diastólica (PAD) es igual o superior a 90 mm Hg.

La OMS ha identificado la HTA como un factor de riesgo cardiovascular que representa un importante problema de salud pública en los países desarrollados y en desarrollo, afectando aproximadamente a mil millones de personas en todo el mundo. Es una patología asintomática hasta que causa complicaciones y, aunque es fácil de diagnosticar y tratar, en ausencia de tratamiento, incrementa de forma lineal y aumenta la incidencia de sufrir enfermedades cardiovasculares (cardiopatía isquémica, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia cardiaca, vasculopatías periféricas y neuropatías) y muerte súbita, con respecto a individuos normotensos de la misma edad y sexo (Tamargo y cols., 2007).

Figura 2.2.3.2. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” a nivel vascular.



Numerosos estudios epidemiológicos, preclínicos y clínicos establecen una relación directa entre HTA y el consumo de grandes cantidades de alcohol. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el alcohol aumenta la presión arterial son diversos, entre ellos se encuentran 1) el EO, 2) el incremento de la reactividad vascular debido al incremento de los niveles de Ca^{2+} , 3) resistencia a la insulina, 4) estimulación de la secreción hipofisiaria de

la hormona adrenocorticotropa (ACTH) que conlleva a un aumento de los niveles de cortisol, 5) la estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), 6) la activación del sistema nervioso simpático (SNS), 7) alteración del perfil lipídico, problemas de coagulación y 8) la disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) (Figura 2.2.3.2).

2.2.3.2.1. Estrés oxidativo

En el sistema cardiovascular, el EO provocado por un aumento de los elementos oxidantes y/o disminución de los sistemas antioxidantes, se asocia con el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares como hipertensión, hipercolesterolemia, aterosclerosis o fallo cardíaco (Hamilton y cols., 2004). El exceso de EROs se relaciona con el desarrollo de un proceso inflamatorio en el sistema cardiovascular y con un incremento del daño peroxidativo, y, por tanto, de la oxidación de lipoproteínas LDL, que se acumulan en la pared arterial como consecuencia de su modificación oxidativa. Todos estos factores favorecen la progresión de aterosclerosis y de la disfunción endotelial que acompaña a esta patología (Bau y cols., 2007; Lebreo y cols., 2003).

El EO es un mecanismo importante mediante el cual el consumo abusivo de alcohol produce efectos vasculares. Tirapelli y cols (2008) realizaron un investigación con ratas Wistar y llevando a cabo un modelo de consumo abusivo de alcohol, encontrando un incremento de los niveles de algunos marcadores oxidativos (Simplicio y cols., 2016; Gonzaga y cols., 2015; Yogi y cols., 2012). Se encontraron niveles plasmáticos de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), un aumento del anión superóxido en las células endoteliales y en las células del músculo liso junto con un incremento de la expresión de la NADPH oxidasa, enzima encargada de generar el anión superóxido (Yogi y cols., 2012). Estos mismos investigadores, determinaron un incremento plasmático de la actividad de la ECA y renina y disminución de los niveles de óxido nítrico (NO), junto con un aumento de la presión arterial. Por lo tanto, concluyen que el consumo agudo de alcohol produce EO en los distintos vasos sanguíneos.

2.2.3.2.2. Aumento de Ca^{2+} intracelular

El BD puede alterar directamente la vasoreactividad de las células del músculo liso ya que ratas tratadas con alcohol presentan vasoconstricción debido a que existe una mayor unión de Ca^{2+} en las células del músculo liso de las arterias y arteriolas que hacen que se aumente la sensibilidad a vasoconstrictores endógenos (Yang y cols., 2001). Se ha constatado un incremento de la respuesta vasoconstrictora a endotelina-1, un potente vasoconstrictor, en arteriolas aisladas de jóvenes adultos bebedores en comparación con no bebedores (Goslowski y cols., 2013). Sin embargo, en otro estudio basado en un modelo animal y al cual sólo se le administro una vez BD, no se encontró un incremento de la respuesta vasoconstrictora (Gonzaga y cols., 2014). Por lo tanto, la diferencia entre los dos últimos estudios puede estar relacionada con la duración del BD y las diferencias fisiológicas entre tejidos vasculares humanos y los animales.

2.2.3.2.3. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) se caracteriza por una disminución en la capacidad de la insulina para llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales en los adipocitos, músculo e hígado, provocando un aumento de la insulinemia basal para mantener la glucemia en un rango normal (Meshkani y Adeli, 2009; Petersen y Shulman, 2006). Además, se ha demostrado que es un factor de riesgo cardiovascular y que los sujetos con mayor RI tienen más riesgo de desarrollar complicaciones vasculares (Sanhuenza y cols., 2014; Kilpatrick y cols., 2007).

Se sabe que el consumo agudo de alcohol genera EO y, algunos autores han establecido que el EO y los niveles elevados de EROs están relacionados con el comienzo, la progresión y el desarrollo de diabetes y de RI (Zhai y cols., 2011), ya que activan las cascadas de señalización en respuesta al estrés como es el caso de la cascada de las MAP Kinasas (Al-Lahhman y cols., 2015). Mediante esta vía se induce la fosforilación de los residuos de serina (Ser)/treonina (Thr) de sustrato de receptor de insulina (IRS-1), lo que promueve la liberación de esta molécula del lado citoplasmático de la membrana y su posterior degradación y disminución. En definitiva, como

consecuencia del EO los niveles funcionales de IRS-1 disminuyen y la insulina no puede ejercer su acción en las células, lo que desencadena la resistencia a esta hormona.

Además se sabe que el BD en ratas, produce RI debido a que disminuye la acción hipotalámica de la insulina. La interrupción de la señal hipotalámica esta mediada por citoquinas inflamatorias y fosfatasa tales como TNF- α , interleukina 6 (IL-6), NF- κ B y proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP1B). Este hecho cobra especial relevancia entre la población adolescente (García-Ruiz y Fernández-Checa, 2013).

Estudios previos demuestran que la hiperinsulinemia causa retención de Na⁺ y aumento de la actividad simpática, dos causas que aumentan la presión arterial (Sternberg y cols., 1994). Además, la insulina por si sola tiene acciones vasodilatadoras, las cuales dependen del NO pero al existir resistencia, disminuye la vasodilatación y produce HTA (Hayashi y cols., 1997).

2.2.3.2.4. Activación del sistema nervioso autónomo

Como se ha mostrado en la figura 5, el consumo agudo de alcohol aumenta la generación de EROs produciendo EO que activa al SNA y, éste, a su vez activa el eje HHA y el SNS. La activación del eje HHA aumenta los niveles de cortisol y de Aldo que provoca disfunción endotelial y, la activación del SNS produce la liberación de las catecolaminas Ad y Nad que producen vasoconstricción.

2.2.3.2.5. Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona

El EO que produce el BD activa el SRAA que conlleva al aumento de los niveles de renina en sangre, que a su vez, aumenta los niveles de Ang I y ésta aumenta los niveles de Ang II que produce vasoconstricción, disfunción endotelial y aumenta los niveles de Aldo, que también conlleva a la disfunción endotelial.

2.2.3.2.6. Metabolismo lipídico

El BD también altera el metabolismo lipídico, los niveles de las lipoproteínas LDL y las lipoproteínas HDL. Algunos estudios han sugerido que

un patrón de consumo excesivo puede ser proaterogénico, ya que se favorece la formación de placas aterogénicas en las arterias, se reduce la función plaquetaria y aumenta el tiempo de coagulación, lo que favorece el desarrollo de aterosclerosis y la formación de trombos (Piano y cols., 2017; Zakhari, 1997).

Así, el consumo agudo de alcohol produce un aumento de la oxidación de las LDL, que es uno de los eventos más incipientes en el desarrollo de aterosclerosis (Ceconi y cols., 2003; Griendling y FitzGerald, 2003; Lebreo y cols., 2003). Las LDL oxidadas son reconocidas de forma específica y transportadas por los macrófagos, dando lugar a las llamadas “células espumosas”, que sufren apoptosis y se acumulan en la pared arterial contribuyendo a la formación de la placa aterosclerótica. Además, actúan directamente en la pared de los vasos estimulando la producción de citoquinas y factor de crecimiento, lo que da lugar a la inflamación y al desarrollo de disfunción endotelial (De Mattia y cols., 2008; Seifried y cols., 2007).

Estudios en un modelo animal han demostrado que 4 semanas de BD están asociadas a mayores niveles LDL comparados con grupos de consumo moderado o grupos controles. Estos investigadores también compararon los efectos del consumo moderado respecto al consumo agudo en el desarrollo de la placa aterosclerótica. El consumo moderado se asoció con una disminución del 40% de la placa, mientras que el grupo de consumo agudo presentó un aumento del 60% del volumen de la placa aterosclerótica (Liu y cols., 2011).

Cuando el consumo de alcohol es moderado, los niveles de HDL se encuentran aumentados y este aumento protege de la formación de la placa aterosclerótica, debido a que evitan los procesos de iniciación de la cascada de eventos del proceso aterosclerótico porque evitan la oxidación de LDL, evitando a su vez que estas moléculas oxidadas sean absorbidas por los macrófagos, que forman las células espumosas, y apoptosis. Además, promueve el flujo de lípidos y colesterol de la lesión, así como disminuyen la expresión del receptor de adhesión. Sin embargo, el consumo agudo de alcohol conlleva a la disminución de los niveles de HDL, por lo tanto, aumentan los niveles de LDL oxidado (Libby y cols., 2002).

2.2.3.2.7. Hemostasis

El patrón de consumo BD también puede alterar los mecanismos hemostático, ya que existe un mayor riesgo en la formación de trombos. En un pequeño ensayo clínico con voluntarios jóvenes sanos, Numminien y cols., 2000 examinaron los efectos de una cantidad total de 1,5 g alcohol/Kg, consumidos durante 2,5 horas, sobre la actividad del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (tPAI-1), una proteína de fase aguda que, normalmente, se expresa en los adipocitos y en las células endoteliales, sin embargo, parece tener una fuerte presencia en casi todas las células como respuesta al estrés. El tPAI-1 inhibe el activador tisular del plasminógeno y la uroquinasa (ambos activadores del plasminógeno), jugando de este modo un papel crucial en el metabolismo de la fibrina, al inhibir la fibrinólisis (Shukla y cols., 2013; Massey y Arteel, 2012). En este estudio se encontró un aumento transitorio pero significativo (siete veces), en la actividad tPAI-1 tres horas después de la ingesta de alcohol. A nivel urinario, también aumentó el nivel de 2,3-dinor-tromboxano B₂ pero sin incrementar los niveles de 2,3-dinor-6-cetoprostaglandinas, lo que sugiere un aumento de la activación plaquetaria. Estas determinaciones, establecen que el consumo agudo de alcohol tipo BD puede incrementar la formación de trombos debido a la activación del tPAI-1 (disminuye la fibrinólisis) y de la agregación de plaquetas (la cual facilita la formación de coágulos).

2.2.3.2.8. Disminución de los niveles de óxido nítrico

El NO es un mediador fundamental en la vasodilatación dependiente del endotelio y juega un importante papel en la agregación plaquetaria, debido a que inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, y en el mantenimiento del balance entre el crecimiento y la diferenciación de las células del musculo liso, ya que inhibe su crecimiento. Es producido en el endotelio por una familia de oxido nítrico sintetasa (eNOS).

Precisamente, otro de los mecanismos mediante el cual el consumo de alcohol produce hipertensión es debido a la disminución de los niveles de NO. Existen diferentes hipótesis de cómo el BD disminuye los niveles de NO, y aunque la producción de NO, es muy dependiente de la enzima eNOS, la cual

está regulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Husain y cols., 2014 han demostrado que el alcohol inhibe la expresión de la proteína de eNOS. Por tanto, los niveles de NO están disminuidos tras el consumo de alcohol debido a la menor expresión de eNOS y no al VEGF.

Previamente, Tsuji y cols. (1992) establecieron que se produce un desbalance entre vasoconstrictores endógenos como Ang II, endotelina-1 y norepinefrina y vasodilatadores como NO, como mecanismos productores de hipertensión arterial.

2.2.3.3. Nefropatía alcohólica

Los riñones son órganos vitales para el organismo debido a que desempeñan gran variedad de funciones, pues filtran la sangre, regulan el pH, la volemia, la osmolaridad y la presión arterial, por lo que cualquier alteración puede conllevar a un gran número de desórdenes. El alcohol, es uno de los factores que puede comprometer la función renal, ya sea de forma directa tras un consumo agudo o crónico, o indirecta como consecuencia de la enfermedad hepática asociada al alcoholismo. Entre los mecanismos directos provocados por el alcohol que alteran la fisiología renal están el 1) EO, 2) desequilibrios electrolíticos, 3) deformación de las ultraestructuras renales, 4) estimulación de SRAA y 5) estimulación del SNA (Rodrigo y Rivera, 2002; Omoto y cols., 1997) (Figura 2.3.3).

Figura 2.2.3.3. Esquema de los efectos nocivos que provocan el consumo agudo de alcohol tipo “binge drinking” a nivel renal.



2.2.3.3.1. Estrés oxidativo

Tras el consumo de alcohol, éste y sus metabolitos pasan a través de los riñones y se excretan por la orina, llegando a ser su contenido mayor en la orina que en sangre y en hígado, así, en el riñón se observa EO tras el consumo de alcohol (Dinu y cols., 2005).

Este aumento de EO se debe a la metabolización renal del etanol, puesto que los niveles altos de alcohol provocan un aumento de los niveles de acetaldehído y NADH, debido a la mayor actividad de la enzima ADH. Los niveles altos de NADH, como ya se comentó, tienen el potencial de aumentar la reducción de un electrón del oxígeno molecular y, por lo tanto, aumentar la producción de EROs (Lieber, 1997).

Hay que tener en cuenta que éste órgano es altamente vulnerable a cualquier daño causado por las EROs, debido a la presencia de abundantes ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en los lípidos renales, de modo que, el EO puede mediar en la aparición de diferentes lesiones renales provocando múltiples anormalidades funcionales como fallo renal, nefropatía obstructiva o daño glomerular, entre otros (Rodrigo y Rivera, 2002). La mayoría de estas alteraciones son debidas a que las EROs están involucradas en mecanismos patológicos que producen glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial (Rodrigo y Rivera, 2002).

2.2.3.3.2. Desequilibrios electrolíticos Na^+ y K^+

La ingesta de grandes cantidades de alcohol induce un gran número de alteraciones en la función renal, produciendo un desbalance ácido-base, alterando el balance hídrico e interrumpiendo los mecanismos de control hormonal que rigen el funcionamiento renal, afectando al SRAA y a la ADH, ya que el etanol tiene la capacidad de alterar la excreción de agua y electrolitos y de modificar el nivel y la composición de los fluidos corporales (Epstein, 1997). Así se ha observado que tras el consumo agudo de alcohol en ratas aparece alteración en la excreción renal de Na^+ y K^+ (Assadi, 1989).

El consumo de alcohol está estrechamente relacionado con cambios en la composición de las membranas y la peroxidación lipídica de las células

epiteliales de los túbulos renales de las nefronas (Das y cols., 2008). Además, interfiere con los transportadores tubulares allí localizados, en concreto, el consumo agudo de alcohol disminuye la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

En estudios *in vitro*, el uso agudo de alcohol en la membrana basolateral de células del túbulo proximal de la nefrona de riñón de rata, provoca inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ afectando a su estructura y a sus mecanismos de activación (Rothman y cols., 1994). Estudios *in vivo* en ratas sometidas a una dosis elevada de alcohol, muestran que no existe diferencia en la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la corteza renal, pero sí un aumento no significativo de la papilar (Rodrigo y cols., 2002), en dicho estudio tampoco se encontró oxidación lipídica renal. Este hecho es importante, pues se relaciona la oxidación lipídica de las membranas celulares del túbulo de la nefrona con los cambios en la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. Sin embargo, se encontró disminución de la GSH, un aumento en el grosor de las membranas basales glomerulares, apoptosis mesangiales y fibrosis túbulo intersticial.

Por el contrario, el consumo crónico de alcohol hace que aumente la actividad de esta enzima (Rodrigo y cols., 1998).

El aumento de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ favorece la absorción renal de Na^+ para que el consumo crónico de alcohol aumente el número de unidades catalíticas de esta ATPasa (Rodrigo y cols., 1996) y aumente la selectividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ para Na^+ aumentando la afinidad de Na^+ para los sitios de K^+ y reduciendo la afinidad de K^+ por sus propios sitios (Rothman y cols., 1994), disminuyendo así su función portadora de K^+ (Rodrigo y cols., 1998) y aumentando los niveles de Na^+ en sangre y disminuyendo los de K^+ . Además el consumo crónico de alcohol aumenta especialmente la $V_{\text{máx}}$ de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Rodrigo y cols., 1997). Rodrigo y cols., 2002b, demostraron que el consumo crónico de alcohol también aumenta la exposición de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ papilar por el aumento que el alcohol provoca en los niveles de aldosterona y dexametasona, además de por la peroxidación lipídica.

Hasta la fecha, no existen modelos de BD repetidos que estudien la actividad de esta enzima. Hay que tener en cuenta que la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ es una enzima reguladora encargada de la salida de Na^+ desde el interior de la

célula, lo que conlleva a un aumento de la concentración de Na^+ extracelular que, a su vez, está relacionado con el Ca^{2+} intracelular. Por lo tanto, debido a este aumento de Na^+ extracelular, se facilita la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula y, en consecuencia, se incrementa la contractibilidad de la musculatura vascular así como la sensibilidad de estas células a la acción de diversos vasoconstrictores endógenos (Tamargo y cols., 2007) colaborando con otro de los mecanismos por el que el aumento de Na^+ implica aumento de la presión arterial. Pues hay que recordar que los niveles de Na^+ tienen una estrecha relación con los valores de presión arterial. La excesiva retención de Na^+ participa en el desarrollo de HTA, ya que, niveles elevados de este elemento en sangre, se asocia con un incremento del agua corporal, y, en consecuencia, de la volemia, del volumen minuto y de la presión arterial, y, además, potencian la respuesta a otros estímulos presores principalmente a través del SRAA (Fouad-Tarazi, 1997).

2.2.3.3.3. Deformación en ultraestructuras renales

Investigaciones recientes han determinado que el consumo agudo de alcohol actúa induciendo cambios ultraestructurales a nivel renal, ya que el etanol penetra en la bicapa lipídica y afecta a las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las membranas celulares (Taraschi y cols., 1987), así actúa potenciado la fluidificación de las membranas de las células endoteliales de los túbulos de la nefrona y afecta a las enzimas y/o transportadores unidas a esta, como la Na^+ - K^+ -ATPasa (Goldstein, 1984), ya comentado anteriormente.

Estructuralmente, el BD ejerce una acción directa sobre el riñón y las nefronas produciendo hinchazón en los glomérulos y túbulos, proliferación de las células mesangiales y caída del hialino en las células epiteliales tubulares (Omoto y cols., 1997).

También, se observa inflamación, aumento del tamaño celular acompañado de incremento en la cantidad de proteínas, grasas y agua, además de una reducción significativa de la función renal (Omoto y cols., 1997).

2.2.3.3.4. Activación del sistema nervioso autónomo

Como se ha comentado anteriormente en la figura 2.2.2.1, el EO que se genera tras el consumo agudo de alcohol activa el SNA y al SNS, que provoca retención de Na^+ y excreción de K^+ debido al aumento de los niveles de Aldo. La activación del SNS aumenta los niveles de Ad y Nad que conlleva a una vasoconstricción de la arteriola aferente, provocando que llegue menos cantidad de sangre al riñón y, en consecuencia, disminuye la tasa de filtración glomerular.

2.2.3.3.5. Activación del sistema renina angiotensina aldosterona

Como se ha expuesto anteriormente en la figura 2.2.2.1, la activación del SRAA conlleva a un aumento de los niveles de Ang II y, en consecuencia, de Aldo favoreciendo de nuevo la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ , a nivel renal.

2.3. SELENIO Y SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.3.1. Selenio y Selenoproteínas

El selenio (Se) fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacobs Berzelius y, posteriormente, ha sido reconocido como un elemento esencial para todas las formas de vida, incluyendo los mamíferos (Lu y Holmgren, 2009).

La selenometionina y selenocisteína son las principales formas orgánicas de Se encontradas en los alimentos de origen vegetal y animal, respectivamente. La ingesta de Se inorgánico, como selenato y selenito ocurre, principalmente, en forma de suplementos, y en el agua, siendo útil también como fuente nutricional en animales (Lucia y cols., 2010; Rayman, 2012). De manera general, el Se es bien absorbido por el tracto gastrointestinal (cerca del 93%) (Lucia y cols., 2010) y el contenido de Se en el organismo varía entre 10 y 20 mg, siendo inferior al 0.01% del peso corporal total (Forceville, 2001). Este nutriente es almacenado en los tejidos en concentraciones variables: el 30% del Se tisular se localiza en el hígado, el 15% en los riñones, un 30% en el músculo, un 10% en el plasma y el 15% restante se encuentra distribuido por otros órganos (Patrick, 2004).

Su biodisponibilidad depende de su absorción intestinal y de su conversión a una forma biológicamente activa, presentando las formas orgánicas del Se una mayor biodisponibilidad (Navarro-Alarcón y Cabrera Vique, 2008). Una vez ingerido, la transformación del Se a formas biológicamente activas tienen lugar mediante diferentes rutas metabólicas (Mercadal y cols., 2005). La selenometionina se incorpora al azar en lugar del aminoácido metionina, en distintas proteínas, y es transformada a selenocisteína mediante una transulfuración (Almondes y cols., 2010). La selenocisteína, en contra de la selenometionina, no se almacena de esta forma, sino que es catabolizada directamente y, el Se resultante (Selenuro) constituye otra reserva de Se.

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

En la actualidad, se han identificado más de 25 selenoproteínas, todas ellas con Se en su centro catalítico, que desempeñan diversas funciones en la regulación de los procesos biológicos debido a que se expresan en tejidos y células diferentes, desempeñando numerosas acciones (Tabla 2.3.1). Dentro de estas selenoproteínas, las más conocidas y estudiadas son las enzimas antioxidantes endógenas GPxs (Rayman, 2012; Sánchez, 2009), las enzimas tioredoxinas reductasas (TrxR) que regulan numerosos procesos redox en las células, incluyendo la señalización y comunicación celular así como el metabolismo y la reparación de DNA (Maulik y Das, 2008) y las deionidasas (DIO) imprescindibles para el metabolismo de las hormonas tiroideas ya que deiodinizan estas hormonas (Schomburg y Köhrle, 2008).

Por formar parte de las diferentes selenoproteínas, se le han atribuido al Se propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptótica (Negro, 2008). Se cree que el Se está implicado en la modulación del EO, principalmente, a través de las diferentes GPxs (GPx1-GPx6) y por la selenoproteína P (Sel P), principal selenoproteína transportadora de Se en plasma, fundamentalmente,

reduciendo los niveles de la ERO H_2O_2 y los hidroperóxidos de lípidos y fosfolípidos de membranas celulares (Rayman, 2000). Así, la deficiencia de Se ha sido relacionada con diversas alteraciones como son el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, infertilidad, deterioro de las funciones inmunes y tiroideas, de patologías neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, e incluso en la enfermedad alcohólica (Tinggi, 2008; Papp y cols., 2007; Johansson y cols., 1986).

Tabla 2.3.1. Clasificación de las principales selenoproteínas presentes en el organismo según sus funciones.

FUNCIÓN	SELENOPROTEINAS
Capacidad Antioxidante	GPx1-GPx6, SelK, SelR, SelW
Señalización Redox	TrxR1, TrxR2, TrxR3
Metabolismo Tiroideo	DIO1, DIO2, DIO3
Transporte y almacenamiento	SelP
Plegamiento de proteínas	Sel15, SelN, SelM, SelS
Síntesis de selenofosfato	SPS2
Función desconocida	SelH, SelI, SelO, SelT, SelV

En la presente memoria nos centraremos en el análisis de las GPxs y la SelP por estar directamente relacionadas con el EO, principal daño biológico generado por el consumo de alcohol, especialmente en forma de BD.

2.3.1.1. Glutación peroxidasas

2.3.1.1.1. Glutación peroxidasa 1

La glutación peroxidasa 1 (GPx-1) se localiza en el citosol celular y se expresa de manera ubicua (Tapiero y cols., 2003). La GPx-1 protege a las células de los fenómenos oxidativos generados por especies reactivas de oxígeno. Para ello, cataliza la reducción del H_2O_2 y de algunos hidroperóxidos orgánicos, utilizando el GSH como reductor, transformándolos en agua y alcoholes. Durante este proceso, el GSH es oxidado a GSSG, volviendo a su estado original por acción de la enzima GR, con el objetivo de mantener los niveles de GSH (Papp y cols., 2007).

La GPx-1 es una de las selenoproteínas más sensibles a los cambios de Se en el organismo, presentando niveles drásticamente reducidos ante una disminución de este elemento (Sunde y cols., 2009). La síntesis global de la proteína se reduce en condiciones de estrés como forma de reserva de recursos celulares y su recuperación se produce de forma más rápida que otras selenoproteínas por eso se analizan sus niveles para valorar las reservas biológicas de Se (Reeves y Hoffmann, 2009).

Recientemente, esta selenoproteína ha sido relacionada con la RI, tanto por exceso como por defecto, pues afecta a la cascada de señalización de la insulina principalmente actuando sobre la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y PTP1B (Lindtner y cols., 2013).

2.3.1.1.2. Glutación peroxidasa 3

La glutación peroxidasa 3 (GPx-3) se caracteriza por poseer una secuencia líder N-terminal y por carecer de una señal de retención en el retículo endoplasmático. Esto sugiere que la GPx-3 se sintetiza en el RE pero no se queda retenida aquí, si no que es liberada al plasma sin secuencia líder como una proteína glicosilada.

Esta selenoproteína fue descrita por primera vez en el riñón, su órgano principal, desde donde es sintetizada y secretada al plasma, aunque también se ha encontrado en otros tejidos y fluidos corporales extracelulares como en el líquido de la cámara del ojo, luz coloide tiroide (Schomburg y Köhrle, 2008; Köhrle, 2005), el tejido adiposo (Maeda y cols., 1997) y líquido amniótico (Brigelius-Flohé, 1999), pulmón, músculo y corazón (Burk y cols., 2011). La GPx-3 actúa en estos tejidos en la matriz extracelular, reduciendo el H₂O₂ a nivel extracelular. Se ha encontrado GPx-3 en las membranas basales de células endoteliales de diferentes tejidos, como el tracto gastrointestinal proveniente del plasma (Burk y cols., 2011).

Junto con la Sel P, la GPx-3 representa el 97% de todo el Se en el plasma de ratones. Este hecho hace que esta selenoproteína esté asociada con el transporte Se y contribuya a la homeostasis de Se en el organismo.

La GPx-3 parece estar relacionada también de algún modo con la RI y los problemas cardiovasculares derivados, así en ratones obesos la expresión de GPx-3 disminuyó en tejido adiposo pero no en el riñón (Lee y cols., 2008). Parece que esta disminución de la síntesis de la GPx3 está mediada en los adipocitos por señales inflamatorias relacionadas con el TNF α y los lipopolisacáridos (LPS) (Lee y cols., 2008). Así mismo, también se han encontrado valores elevados de GPx-3 en el corazón de ratones diabéticos (Iwata y cols., 2006), es más, estos autores sugieren que la GPx-3 juega un papel primordial en la defensa antioxidante cardíaca frente al EO generado por la hiperglucemia.

2.3.1.1.3. Glutación peroxidasa 4

La glutación peroxidasa 4 (GPx-4) es una enzima esencial para la vida como se comprobó al utilizar ratones knockout GPx-4, que presentaron mortalidad embrionaria temprana (Liang y cols., 2009). Esta selenoproteína es la única GPx, y probablemente la única enzima antioxidante, que reduce de manera directa los hidroperóxidos de fosfolípidos en las membranas celulares y lipoproteínas (Brigelius-Flohé y Kipp, 2009). Debido a esta función biológica, la GPx-4 se encuentra íntimamente asociada a la membrana celular y mitocondrial, protegiendo específicamente a este orgánulo. De hecho esta selenoproteína se encuentra en la parte alta de la jerarquía de selenoproteínas frente a los depósitos de Se, disminuyendo su síntesis solo cuando los niveles de Se están muy deplecionados.

Se ha comprobado que la sobreexpresión de esta enzima disminuye la activación del NF- κ B en una diversidad de células sometidas a diferentes estímulos, lo que pone de manifiesto, aún más, su importancia como mediador en los procesos inflamatorios y antiapoptótico (Brigelius-Flohé y Kipp, 2009). Además, por amortiguación de la vía de señalización del NF- κ B, la GPx-4 reduce la expresión de la metaloproteínasa 1 de la matriz, la cual se sobreexpresa durante los periodos de invasión y metástasis de diversos tumores (Ufer y Wang, 2011).

Por otro lado, la GPx-4 se expresa de manera elevada en los testículos de mamíferos, existiendo estudios que correlacionan la infertilidad masculina

con una depleción de los niveles de GPx-4 (Foresta y cols., 2002; Imai y cols., 2001). Estando también implicada en la maduración de los espermatozoides, y por lo tanto, en la fertilidad masculina. Es el componente estructural principal de la cápsula espermática mitocondrial y juega un papel preponderante en la condensación de la cromatina espermática, al actuar como tiol de proteínas (Conrad y cols., 2005).

2.3.1.1.4. Selenoproteína P

La selenoproteína P (Sel P) es una proteína de gran importancia muy abundante en el plasma y, se produce y libera en el hígado, siendo con la GPx-1y GPx-4, las selenoproteínas más abundantes en el hígado. Esta proteína también se expresa en otros tejidos como corazón, riñón, testículos, cerebro, sistema digestivo y está asociada a células endoteliales (Moschos, 2000).

La Sel P tiene dos propiedades importantes debido a que actúa como transportador de Se a los tejidos periféricos, ya que contiene un alto porcentaje del Se total del plasma, entorno un 60-70% (Combs, 2015) pues contiene 10 residuos de Se-Cys en su estructura y, además, actúa como antioxidante extracelular asociada al endotelio vascular (Saito y cols., 2004) que inhibe la actividad de los RL como el peroxinitrito e hidroperóxidos actuando en asociación con el GSH o la tioredoxina (Andoh y cols., 2005). Recientemente, se ha identificado a la Sel P como una hepatokina que produce RI y altera el metabolismo de la glucosa en el hígado y el músculo esquelético en humanos asociada a la proteína mediadora de la homeostasis energética AMPk y el metabolismo energético (Misu y cols., 2010).

Como ya se ha comentado, la biosíntesis de las selenoproteínas está organizada jerárquicamente, aunque no siguen una regla establecida, ya que las selenoproteínas no responden igual a la suplementación de Se y la demanda por parte de los órganos no es la misma. Pero si se establece una jerarquía en función de su actividad respecto a los niveles de Se existentes. Por lo tanto, si existe una deficiencia de Se no pueden expresarse todas las selenoproteínas a la vez, así que, se produce una regulación en la síntesis de algunas de ellas, mientras que aquellas selenoproteínas que realizan funciones más importantes, mantienen niveles altos de expresión (Brigelius-Flohé y

Flohé, 2016; Burk y Hill, 2015). Así las GPx-1 y GPx-3 ocupan el lugar más bajo en esta jerarquía, la GPx-4 depende del tejido en el que se encuentre se sintetiza en primer o segundo lugar. Este hecho lo confirman Barnes y cols., 2009 que demostraron que la deficiencia de Se produce una rápida disminución de los mRNA de la GPx-1 en riñón, hígado y músculo, así como de la GPx-3 en plasma. Sin embargo, la GPx-4 se sintetiza en primer lugar incluso cuando hay una deficiencia severa de Se, ya que esta selenoproteína es esencial para la vida, encontrándose, como hemos comentado anteriormente, en los niveles, más altos de la jerarquía (Burk y Hill, 2015). Por otro lado, la Sel P también se encuentra dentro de los primeros puestos ya que su expresión permanece incluso en condiciones de deficiencias severas (Burk y Hill, 2005).

También hay que tener en cuenta que bajo condiciones selenodeficientes, el cerebro, los testículos y el tiroides se mantienen cerca de los niveles normales de Se, mientras que otros tejidos como el hígado, el pulmón y los pertenecientes al sistema inmune, muestran una bajada significativa de Se así como de la síntesis de selenoproteínas (Brigelius-Flohé y Flohé, 2016). A este hecho habría que unir, que las distintas selenoproteínas no se sintetizan por igual en los diferentes tejidos. Por todo ello es necesario valorar la expresión de las distintas selenoproteínas individualmente en cada tejido.

2.3.2. Selenio y sistema cardiovascular

El Se, como se ha comentado anteriormente, es un elemento traza con capacidad antioxidante ya que es parte esencial de las selenoproteínas GPxs, Sel P y las TrxRs con capacidad de detoxificar las EROs en los espacios intracelulares y extracelulares así como participa en la destrucción del peróxidos hidrogeno y de los hidroperóxidos orgánico, ayudando a mantener la integridad de las membranas celulares, protegiendo del daño oxidativo a biomoléculas como los lípidos, las lipoproteínas y el DNA, y reduciendo la agregación plaquetaria y la acumulación de LDL oxidadas en la pared de las arterias (Aaron y Hoffmann., 2015; Rayman, 2000). Además, mantener unos niveles adecuados de Se es importante para la síntesis de prostaciclina, ya que se ha observado que en estados deficitarios, la acumulación de

hidroperóxidos inhibe la producción de esta sustancia vasodilatadora en el endotelio, y, además estimula la producción de tromboxano, que está asociado a la vasoconstricción y la agregación plaquetaria (Rayman, 2000).

Actualmente, se sabe que el Se está implicado en la etiología de la enfermedad cardiovascular y, en los últimos años, se ha despertado un gran interés en el papel que juega el Se en el sistema cardiovascular, por lo que ha aumentado la investigación experimental con objeto de conocer con más detalles los mecanismos de acción a nivel cardiovascular y el posible potencial de Se en los tratamientos y prevención de estas enfermedades.

Estudios previos experimentales y clínicos han demostrado que los niveles de Se y la enfermedad cardiovascular están relacionados. La incidencia de enfermedad cardíaca se correlaciona negativamente con los niveles de Se en sangre y el nivel de Se es un importante indicador para la determinación de la enfermedad cardíaca (Benstoem y cols., 2015; Vinceti y cols., 2014). La primera evidencia de que los niveles bajos de Se afectan a enfermedades cardiovasculares en humanos surgen tras la enfermedad de Keshan, una enfermedad cardíaca la cual es caracterizada por necrosis y calcificación del miocardio (Mchuron y cols., 2014; Xu y cols., 1997). Esta enfermedad es propia de una región de China donde el suelo tiene déficit de Se (Xu y cols., 1997; Li y cols., 1985). La deficiencia de Se se consideró como factor etiológico de esta enfermedad desde su descubrimiento en 1935, aunque posteriormente se consideró como un factor predisponente más que como un factor causal del desarrollo de esta cardiopatía (Beck y cols., 2003).

2.3.2.1. Selenio y corazón

A nivel cardíaco, estudios previos demuestran que la lesión mitocondrial es el primer resultado del daño causado por la disminución de los niveles de Se en los cardiomiocitos. El déficit de Se se refleja en el daño de la membrana mitocondrial, la generación de ERO y la elevación de la oxidación lipídica que finalmente lleva a la apoptosis de los cardiomiocitos (Esteve y cols., 2014). Así, la importancia de los niveles adecuados de Se en la enfermedad cardíaca se debe principalmente a su efecto antioxidante, mediadas por GPx-1, GPx-3 y GPx-4.

La GPx-1 representa el papel más importante en el sistema cardiovascular debido a que es imprescindible para detoxificar intracelularmente las EROs de los cardiomiocitos. Además, una deficiencia de esta enzima conlleva a la disfunción endotelial, que a su vez produce anomalías estructurales significativas en los tejidos vasculares y cardiacos (Forgione y cols., 2002). También, protege al organismo de la isquemia producida por el daño oxidativo que provocan las EROs. Este hecho se constata en estudios con ratones transgénicos con sobreexpresión de GPx-1 que son más resistentes al infarto de miocardio, mientras que los ratones no transgénicos presentan una mayor susceptibilidad a sufrir daños vasculares (Maulik y cols., 1999; Yoshida y cols., 1997).

La GPx-3 también protege del EO debido a la capacidad de neutralizar las EROs en los espacios extracelulares, por lo tanto, es una enzima importante para proteger a la matriz extracelular cardiaca y es efectiva contra accidentes vasculares. Destaca un estudio en el cual se muestra un papel de la GPx-3 en la regulación de la biodisponibilidad de NO producido a partir de plaquetas y células vasculares. Cuando disminuyen los niveles de esta enzima antioxidante aumenta la hiperreactividad de las plaquetas y el riesgo de sufrir trombosis (Freedman y cols., 1995). Además, parece ser que la GPx-3 juega un papel importante frente al daño oxidativo provocado en el tejido cardíaco por el EO generado por la hiperglucemia (Iwata y cols., 2006).

La GPx-4 está involucrada en la reducción de los hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol unidos a la membrana plasmática y de diferentes orgánulos, entre ellos la mitocondria. Evitando así la peroxidación lipídica que incrementa el número de EROs que producen hipertrofia en los cardiomiocitos (Hollander y cols., 2003). Al proteger a la mitocondria, disminuye la liberación de citocromo c por ésta y evita la cascada de señalización endógena apoptótica. Pero además, la GPx-4 contribuye directamente a remover distintos mediadores de la cascada de señalización de la apoptosis (Brigelius-Flohé, 2017). La GPx-4 también está inversamente relacionada con la activación de NF- κ B en los cardiomiocitos, lo que hace que tenga funciones antiinflamatorias y antifibrótica sobre el corazón, evitando la hipertrofia cardiaca (Rose y Hoffmann, 2015).

Figura 2.3.2.1. Esquema de las principales selenoproteínas cardíacas.

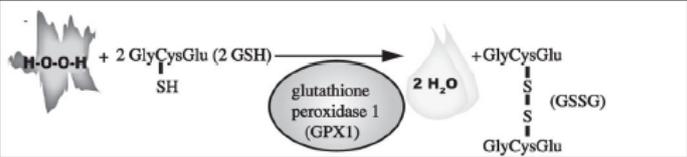
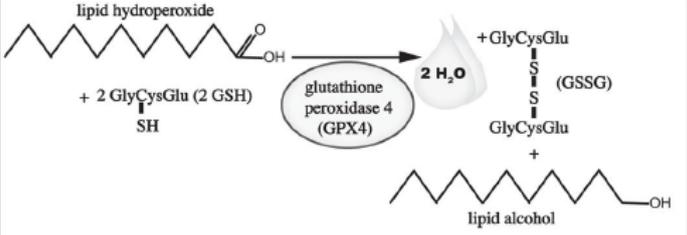
Localización	Reacción catalizada	Función en el SCV
Citoplasma de cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales		Elimina H ₂ O ₂ protegiendo a lípidos, proteínas y DNA del EO. También protege del EO en isquemia
Espacio extracelular del tejido cardíaco y vasos		Detoxifica EROs, protegiendo la matriz extracelular en el corazón, así como, plaquetas y células vasculares
Citoplasma, núcleo y mitocondria de cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales		Detoxifica lípidos hidroperóxidos en la membrana plasmática y en la membrana de orgánulos celulares en condiciones basales y en condiciones de EO como isquemia, hipertrofia y otras

Imagen modificada de Rose y Hoffmann, 2015

Por otro lado, los canales de K⁺ y la apoptosis están íntimamente relacionados. Así la pérdida de iones de K⁺ promueve la apoptosis de células normales y conduce a la aparición y agravamiento de la enfermedad cardíaca (Molina y cols., 2015). Se sabe que los niveles bajos de Se afectan a los canales de K⁺ disminuyéndolos y a la expresión mitocondrial del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) relacionado con el funcionamiento de la mitocondria (Koc y cols., 2016). Zhang y cols., 2017 encontraron que los niveles bajos de Se en los cardiomiocitos disminuye los canales de K⁺, la actividad de STAT3 y la función mitocondrial promoviendo la apoptosis. Por ello, los depósitos de Se en el corazón no deben estar deplecionados para que este órgano actúe eficazmente.

Así, Liu y cols., 2013 encontraron que la toxicidad cardíaca generada por la adriamicina disminuye al suministrar una suplementación de Se, pues restauraba la actividad cardíaca de la GPx y la expresión cardíaca de los canales de K⁺.

2.3.2.2. Selenio y endotelio vascular

A nivel vascular, varios autores afirman que el EO tiene un papel muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis (Bonomini y cols., 2008; Stocker y Keaney, 2004). La aterosclerosis es una enfermedad progresiva de la pared arterial caracterizada por el almacenamiento de materia grasa y colesterol, iniciada por el depósito de LDL, su retención y modificación (oxidativa principalmente). Así, la aterosclerosis es causada principalmente por la peroxidación de los lípidos de la membrana de las células endoteliales de las arterias. Niveles bajos de Se conducen a la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que agrava el desarrollo de la aterosclerosis. Una correcta suplementación con Se puede bloquear muchos procesos claves del desarrollo de la aterosclerosis, incluyendo las EROs que inducen EO, inflamación, disfunción endotelial, la apoptosis de las células vasculares y calcificación, principalmente, a través de las diferentes selenoproteínas (Figura 2.3.2.2).

Figura 2.3.2.2. Mecanismos del Se para prevenir la aterosclerosis.

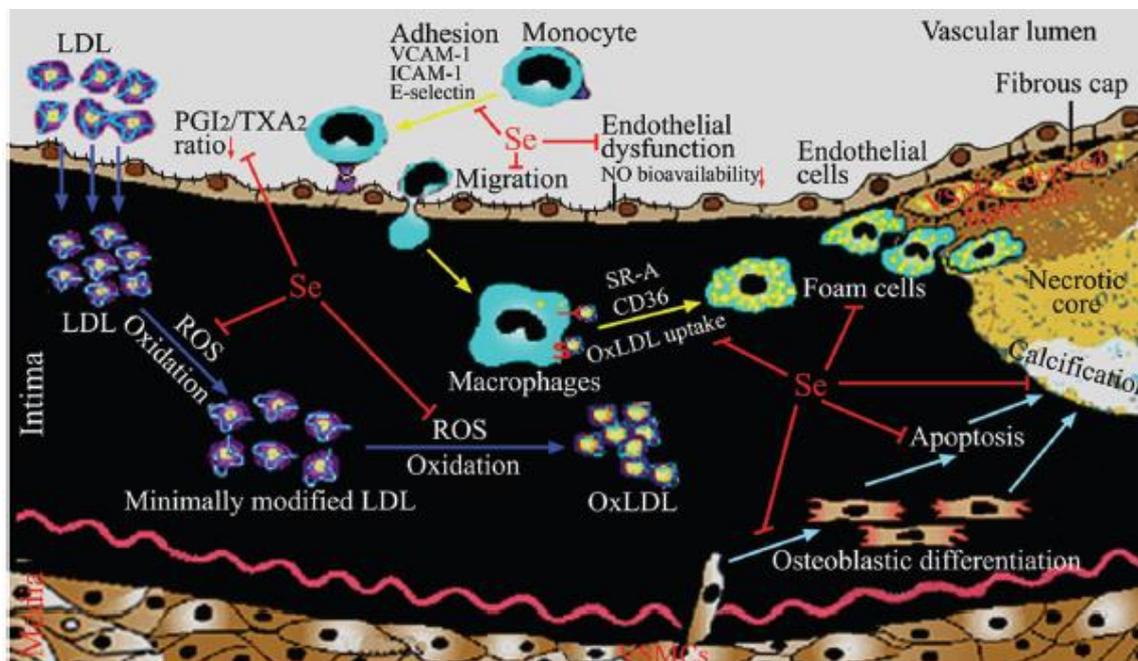


Imagen tomada de Liu y cols., 2017

A nivel vascular, la suplementación de Se incrementa la expresión y actividad de la GPx-1, TrxR1 y GPx-4 de la pared arterial. Estas selenoproteínas evitan la aparición de la aterosclerosis por diferentes mecanismos (Tabla 2.3.2.2). El suplemento de Se también aumenta la presencia en plasma de la GPx-3 y Sel P que pueden unirse a las células endoteliales de la pared arterial y ejercer su acción (Burk y Hill., 2005; Brigelius-Flohé y cols., 2003).

En contraposición, algunos estudios han observado que la exposición a altos niveles de Se está implicado en un aumento de la presión arterial así como en el desarrollo de hipertensión (Su y cols., 2016; Coudray y cols., 1997). Para explicar estas evidencias contradictorias, existe una relación en forma de U entre los niveles de Se y los marcadores cardiovasculares de mortalidad (Grotto y cols., 2017; Joseph, 2013; Bleys y cols., 2008). Por lo tanto, el Se es un arma de doble filo puesto que según la dosis de Se y el tiempo de suplementación puede tener un efecto beneficioso o perjudicial sobre la presión arterial, aunque los mecanismos implicados en el aumento de la presión arterial no están claros, pero si están potencialmente relacionados con otras rutas biológicas de Se además de la síntesis de selenoproteínas (Grotto y cols., 2017).

Tabla 2.3.2.2. Funciones de las principales selenoproteínas que intervienen en la prevención de la aterosclerosis.

Selenoproteínas	Funciones mediante las cuales previenen la aterosclerosis
GPx1	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enzima antioxidante en el espacio intracelular. ➤ Inhibiendo el EO, la adhesión molecular a la pared endotelial, los macrófagos. ➤ Disminuye disfunción endotelial
GPx3	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enzima antioxidante en plasma y espacio extracelular de células endoteliales ➤ Se une a las células endoteliales en la pared arterial y la peroxidación lipídica.
GPx4	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enzima antioxidante en citoplasma, retículo endoplasmático, membrana plasmática, mitocondria y núcleo. ➤ Elimina los hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol unido a la membrana. ➤ Inhibe EO, la adhesión molecular y la apoptosis en células vasculares.
SelP	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se une a las células endoteliales en la pared arterial e inhibe el EO
TrxR1	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Es la selenoproteína más numerosa de las células endoteliales vasculares, regeneración de las Trx. ➤ Inhibe el EO y la disfunción endotelial.

Tabla modificada de Liu y cols ., 2017.

2.3.2.3. Selenio y riñón

El riñón es un órgano que contiene gran cantidad de Se, jugando un papel importante en la actividad antioxidante de las GPxs en este tejido y en el plasma, especialmente por la síntesis de GPx-3.

En pacientes con enfermedad renal aguda o crónica es frecuente encontrar niveles bajos de Se, aunque la relación entre hiposelenemia y las comorbilidades asociadas a la enfermedad renal no está muy estudiadas. Además, un reciente estudio ha determinado que los niveles bajos de Se en el riñón puede contribuir al mal funcionamiento del sistema inmune lo que aumenta el riesgo de muerte por enfermedad infecciosa en pacientes en hemodiálisis. La suplementación de Se por vía oral o intravenosa revierte esta situación (Iglesias y cols., 2013). Actualmente se sabe que hay mucha relación entre los niveles bajos de Se y la enfermedad renal aunque no se ha estudiado mucho sobre ello.

Estudios realizados en pollos han demostrado que el Se actúa protegiendo al riñón, reduciendo el daño renal, aumenta la tasa de filtración glomerular (TFG) y disminuye la inflamación (Kiss, 2013). Liang y cols., 2015 han demostrado que la suplementación con Se 0,4 mg/Kg en estos animales disminuye claramente los cambios histológicos en el riñón provocado por el carcinógeno Aflatoxina B1, mejora los niveles séricos de creatinina y la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa renal, mejorando la función renal.

Sin embargo, al analizar la expresión de las selenoproteínas renales en pollos y ratón, los resultados son distintos. En pollos, el Se parece jugar un papel más importante en el riñón, siendo las principales selenoproteínas implicadas la Sepp1 y Sel U (Zhang y cols., 2016). En modelos roedores, el riñón sintetiza grandes cantidades de GPx-3, siendo el principal órgano sintetizador de esta selenoproteína, que posteriormente es liberada en parte al plasma (Burk y cols., 2011). Por tanto, la GPx-3 es la selenoproteína principal de este tejido, aunque también se sintetiza cantidades importantes de GPx-4 y menor cantidad de GPx-1 (Hoffman y cols., 2007). En el riñón, se detectan altas cantidades de GPxs en los túbulos proximales y distales del riñón y en las células del músculo liso de las arterias renales (Muse y cols., 1994). De las

distintas isoformas, la GPx-1 y GPx-4 se encuentran fácilmente en las células epiteliales de los túbulos renales y, la GPx-3 se encuentra en los túbulos proximales del riñón (Hann y cols., 2005).

En los pocos trabajos existentes en roedores, Hann y cols., 2005 muestran en los riñones de ratas diabéticas de ratones alterados genéticamente que presentan un aumento de la actividad GPx-1, no existiendo protección frente al daño oxidativo renal y la nefropatía asociada a esta enfermedad. Esto puede ser porque la principal selenoproteína implicada en la protección renal es la GPx-3, o porque se sabe que el aumento de la GPx-1 está implicado en la RI y puede empeorar esta patología.

Nuestro grupo de investigación, ha estudiado en ratas crías de madres expuestas a un consumo crónico de alcohol y suplementadas con Se durante la gestación y la lactancia, que la suplementación con Se aunque no mejora la tasa de filtración glomerular alterada por el consumo de alcohol, si mejora los depósitos de Se renal, el desarrollo renal y el contenido de proteínas renales a la vez que disminuye la oxidación de lípidos y proteínas y modifican la actividad de las enzimas antioxidantes en crías alcohólicas (Ojeda y cols., 2012).

En cualquier caso, existe escasa literatura que expresamente relaciona la suplementación de Se y las selenoproteínas con el funcionamiento renal, a pesar de que existen evidencias clínicas de su relación.

2.3.3. Selenio y consumo de alcohol: “binge drinking”

Numerosos estudios demuestran como el consumo agudo o crónico de alcohol altera la biodisponibilidad de Se y su función antioxidante pudiendo contribuir con el alto daño oxidativo que genera esta droga sobre el organismo (Ojeda y cols., 2015; Rua y cols., 2014). Existen varias hipótesis para explicar la depleción de Se como consecuencia al consumo de alcohol: 1) ingesta dietética insuficiente como resultado de una mala nutrición, 2) déficit en la absorción intestinal, por alteración de la mucosa intestinal provocada por el etanol, 3) producción de EROs por el metabolismo oxidativo.

Generalmente los individuos alcohólicos pueden presentar malnutrición ya que no suelen llevar una dieta equilibrada, pudiendo presentar alteraciones a

nivel de absorción intestinal y aprovechamiento de nutrientes. Esta situación puede provocar que estos pacientes, puedan padecer malnutrición primaria o secundaria (Moreno y Cortés, 2008). La malnutrición primaria tiene lugar cuando el consumo de alcohol reemplaza a otros nutrientes de la dieta, disminuyendo la ingesta sólida (Lieber, 2003). Esto puede ser debido a que el alcohol es un nutriente rico en energía (1 g de alcohol equivale a 7.1 Kcals), con un valor superior al que aportan los hidratos de carbono y proteínas. A su vez, la malnutrición secundaria ocurre cuando, a pesar de ingerir alimentos de manera adecuada, el consumo excesivo de alcohol interfiere con su absorción intestinal, disminuyendo la biodisponibilidad de los nutrientes ya que modifica morfológica y bioquímicamente la mucosa intestinal (Foster y Marriott, 2006; Bode y Bode, 2003; Lieber, 2003).

Además, otros autores consideran que el alcohol *per se*, y no solo la malnutrición, contribuye a la disminución de Se en el organismo. Así, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en ratas madres distribuidas en 3 grupos: control, alcohol y pair-fed, las cuales tienen una alimentación y valores nutricionales similares a las madres alcohólicas pero no reciben tratamiento alcohólico, se encontró que las madres alcohólicas y pair-fed habían ingerido menos alimentos y, en consecuencia, menos Se. Sin embargo, las madres pair-fed presentaron mayor absorción aparente de Se que el grupo control, y no las alcohólicas, por lo tanto, se confirma que el alcohol *per se* altera la absorción intestinal de Se, además la distribución tisular de Se fue diferente entre el grupo isocalórico y el alcohólico en madre y en crías (Ojeda y cols., 2009).

Otro de los mecanismos por el que el alcohol actúa sobre la homeostasis del Se, es por su metabolismo oxidativo, ya que al generar ERO el organismo consume Se para sintetizar la enzima antioxidante GPx. Esto concuerda con lo encontrado por diversos autores, que observaron en pacientes alcohólicos una disminución de la actividad de la GPx en suero (Huang y col., 2009; Peng y cols., 2005).

En los diferentes modelos experimentales de alcoholización, los cambios de biodisponibilidad de Se vendrán dados por diferentes circunstancias, si van

asociados a malnutrición, si la ingesta es oral o si se administra por vía intraperitoneal afectando o no a la integridad de la barrera intestinal, y si la dosis y tiempo de exposición es agudo o crónico, pues la cantidad de EROs varía en cada uno de los casos.

Estudios en pacientes alcohólicos crónicos. En estudios previos con este tipo de pacientes se ha observado que los niveles séricos de Se disminuyen drásticamente en pacientes con hepatopatía y sin enfermedad hepática (Rua y cols., 2014; González-Reimers y cols., 2009). Rua y cols., 2014 establecen que en pacientes alcohólicos crónicos el Se tiene una correlación directa con la actividad GPx, la oxidación lipídica y con el daño y la evolución del daño hepático generado. Estos autores sugieren que existe una relación directa entre la ratio Se/MDA sérica y el daño hepático generado por el etanol, señalando a esta ratio como un indicador del daño hepático causado por el consumo de alcohol. Además apuntan a la correcta suplementación con Se como una posible terapia antioxidante que disminuye los daños generados por el alcohol en su principal órgano metabolizador, el hígado.

Estudios en crías expuestas a alcohol crónico durante la gestación y lactancia. En otros modelos de alcoholización experimentales, bien definidos, como el de crías de ratas que presentan trastornos del espectro alcohólico fetal (FASD) debido al consumo crónico de alcohol por parte de las madres durante el embarazo y la lactancia, y en sus madres, se ha encontrado cambios sustanciales en la biodisponibilidad de Se. En concreto la exposición al alcohol disminuye la ingesta y retención de Se afectando a sus depósitos tisulares de diferente modo. A pesar de recibir menos Se durante la gestación y lactancia, las crías FASD presentan niveles séricos de Se mayores a los de ratas controles, probablemente para tener mayor disponibilidad de este nutriente y actividad GPx sérica, sin embargo, su distribución de Se tisular se vio alterada, en algunos órganos replecionados y en otros deplecionados, así como la actividad antioxidante de GPx y la expresión de diferentes selenoproteínas (Ojeda y cols., 2017a) (Figura 2.3.3).

En este mismo modelo experimental, las madres que consumen alcohol durante la gestación y la lactancia se suplementan con Se (0.5 ppm de selenito

de sodio). Tras esta suplementación se observó una mejora en la absorción y retención de Se en el organismo de las madres y también en el de las crías. En las crías recién nacidas mejora la biodisponibilidad de Se e incluso mejorar su estado nutricional (Figura 2.3.3) (Nogales y cols., 2011). También se encontró que la suplementación con Se tiene implicaciones antioxidantes en el hígado y en el riñón mejorando la actividad de la GPx y la función hepática (Ojeda y cols., 2012).

Figura 2.3.3. Distribución de Se tisular y en suero en madres lactantes, crías recién nacidas y crías lactantes expuestas a un consumo crónico de alcohol y el efecto de la suplementación con Se.

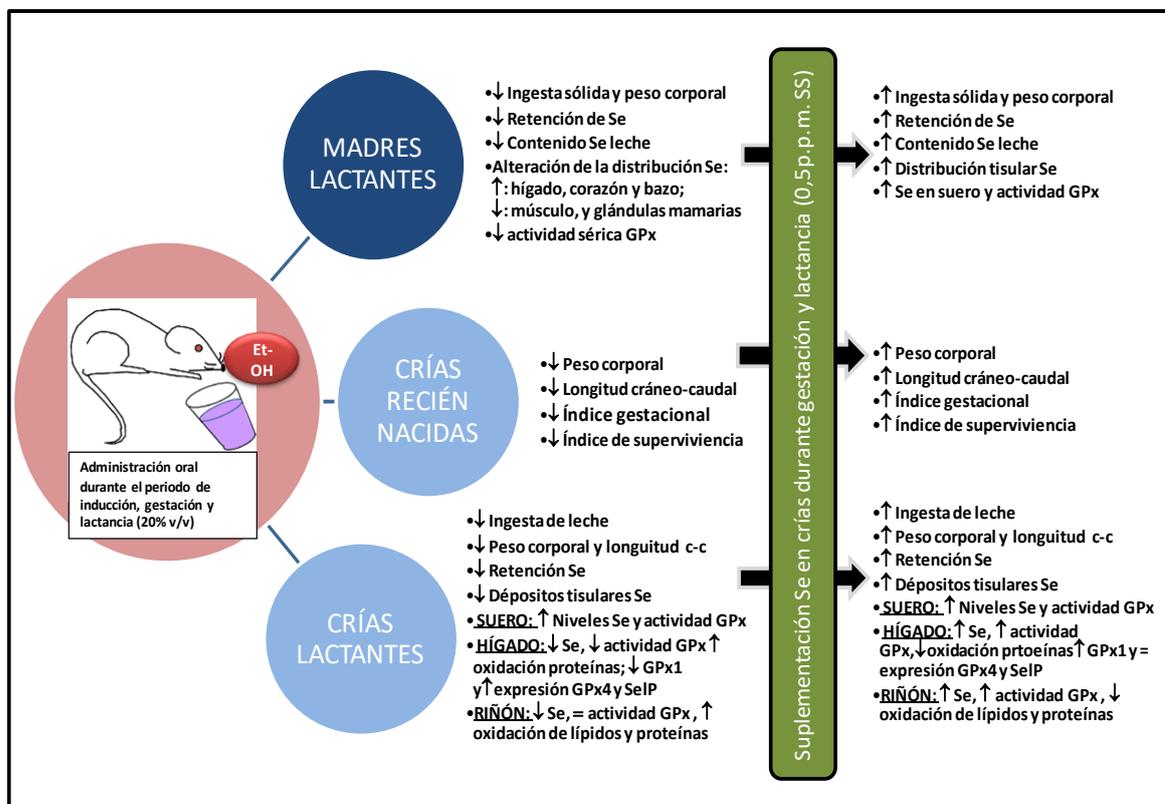


Tabla modificada de Ojeda y cols., 2017

Estudios en ratas adolescentes con patrón de consumo BD. Se ha confirmado que el consumo agudo en atracón repetido de alcohol en ratas adolescentes con 28 días de edad a las cuales se les administra intraperitonealmente alcohol (3 g/Kg/d) en suero salino fisiológico (20% v/v) tres días a la semana durante tres semanas, disminuyen los niveles séricos de Se (Ojeda y cols., 2015). En este trabajo se demuestra, por primera vez, que el BD produce una depleción severa en los depósitos hepáticos de Se que están

relacionados directamente con una disminución de la actividad de la GPx-3 sérica y GPx-1 hepática, que contribuye al desequilibrio oxidativo generado por el BD. Por otro lado, la disminución de los depósitos de Se en el hígado afecta a la expresión de la GPx-1 y GPx-4. Este hecho podría estar relacionado con la menor expresión del factor transcripcional NF- κ B en el hígado, una pieza clave en la regulación de los procesos inflamatorios.

Posteriormente Ojeda y cols., 2017a comprobaron que los depósitos de Se tisulares estaban también deplecionados en el corazón y riñón de ratas adolescentes sometidas a BD, indicando que durante el consumo agudo y repetido de etanol, el organismo consume grandes cantidades tisulares de Se, probablemente porque necesita sintetizar grandes cantidades de GPx *in situ* para luchar contra el EO generado por el consumo agudo de alcohol.

En este mismo trabajo se suplementó con Se en agua de bebida a los roedores siguiendo el modelo experimental anteriormente mencionado y, se observó que la suplementación es efectiva ya que aumenta la expresión GPx-1 y GPx-4 y evita la disminución de NF- κ B y el incremento de los niveles caspasa-3, lo cual conduce a un mejor perfil hepático oxidativo, inflamatorio y apoptótico. Por lo tanto, se puede considerar que la terapia propuesta, la suplementación dietética con Se, tiene una gran eficacia biológica y es adecuada para los adolescentes que llevan a cabo un patrón de consumo agudo con el fin de evitar futuras complicaciones hepáticas (Ojeda y cols., 2017a)

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Actualmente, el consumo agudo de alcohol tipo BD entre los adolescentes está en auge, siendo una situación de interés y de alarma social, ya que los adolescentes constituyen un grupo de población especialmente vulnerable. Este patrón agudo de consumo produce efectos nocivos sobre la salud debida, en parte, al metabolismo oxidativo de esta droga que genera un aumento en la producción de EROs, produciendo EO y daño celular. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en los efectos que ejerce el alcohol en forma de atracción sobre el SNC de los adolescentes, pero recientemente también se ha demostrado, clínicamente, que el hígado está especialmente comprometido por el consumo de alcohol en estos individuos. Así, se ha puesto de manifiesto en ratas adolescentes tras BD, que el alcohol a través de la ADH y especialmente de la SMOE genera grandes cantidades de EO y consume cantidades importantes de GSH, lo que compromete especialmente la actividad de la GPx.

Por otro lado, este grupo de investigación ha demostrado recientemente, que este patrón de consumo en adolescentes altera específicamente la homeostasis de Se, disminuyendo la concentración de este micronutriente en el hígado y suero, comprometiendo, aún más la actividad de la selenoproteína GPx hepática y generando un desequilibrio en la actividad del resto de las enzimas antioxidantes. Suplementar dietéticamente con Se a este colectivo actúa beneficiosamente sobre el hígado, protegiendo a los hepatocitos del daño oxidativo, a través de la GPx.

Además de provocar cambios bioquímicos a nivel sistémico relacionados, en parte, con las alteraciones hepáticas, el consumo agudo de alcohol también se relaciona con un desequilibrio metabólico como la RI e hígado graso, afectando a la funcionalidad del sistema cardiovascular. Se reconoce una relación directa entre el BD y la aparición de arritmias e hipertensión, sin embargo los mecanismos por los cuales se desencadenan no se conocen con exactitud. Entre los mecanismos que cobran más peso están el

EO generado, o la estimulación del SNS y SRAA, entrando también en juego el riñón y el balance electrolítico.

Por todo ello, el **objetivo principal** de este estudio es evaluar, por primera vez, los cambios sobre el balance oxidativo que genera el BD repetido en ratas adolescentes sobre el sistema cardiovascular y renal. Como objetivos específicos, se estudiarán en corazón, suero y riñón, los depósitos de Se, la actividad GPx, la expresión de las principales selenoproteínas antioxidantes GPx-1, GPx-3, GPx-4 y Sel P, y su relación con diversos eventos moleculares como la estimulación del factor clave en la inflamación NF- κ B y de la apoptosis a través de la caspasa-3, así como su relación con marcadores de daño endotelial. Además se analizarán diversos parámetros funcionales cardíacos y vasculares como la frecuencia cardíaca y la presión arterial, y renales como la tasa de filtración glomerular, los niveles de aldosterona y el balance hídrico-salino entre otros, con el fin de encontrar relación con los cambios moleculares encontrados.

Para constatar el papel que en todo ello juega el Se, el **segundo objetivo** planteado es la suplementación con éste micronutriente, con el fin de valorar si la suplementación con Se es una posible estrategia a tener en cuenta para amortiguar los cambios cardiovasculares y renales que genera el consumo de alcohol en forma de BD durante la adolescencia, analizándose de nuevo todos los parámetros anteriormente citados

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

4.1.1. Animales y condiciones de experimentación

Para la realización de este trabajo se utilizaron 32 machos adolescentes de la raza Wistar procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Estas ratas se recibieron con 21 días de edad y se alojaron en jaulas de plástico, con libre acceso a la comida y a la bebida. Las jaulas se ubicaron 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).

A los 28 días de edad, tras comenzar el periodo de la adolescencia, los animales se distribuyeron, de forma aleatoria, en cuatro grupos experimentales (n=8) denominados: Grupo control intraperitoneal (CI), grupo alcohol intraperitoneal (AI), grupo control intraperitoneal Se (CISE), grupo alcohol intraperitoneal Se (AISE).

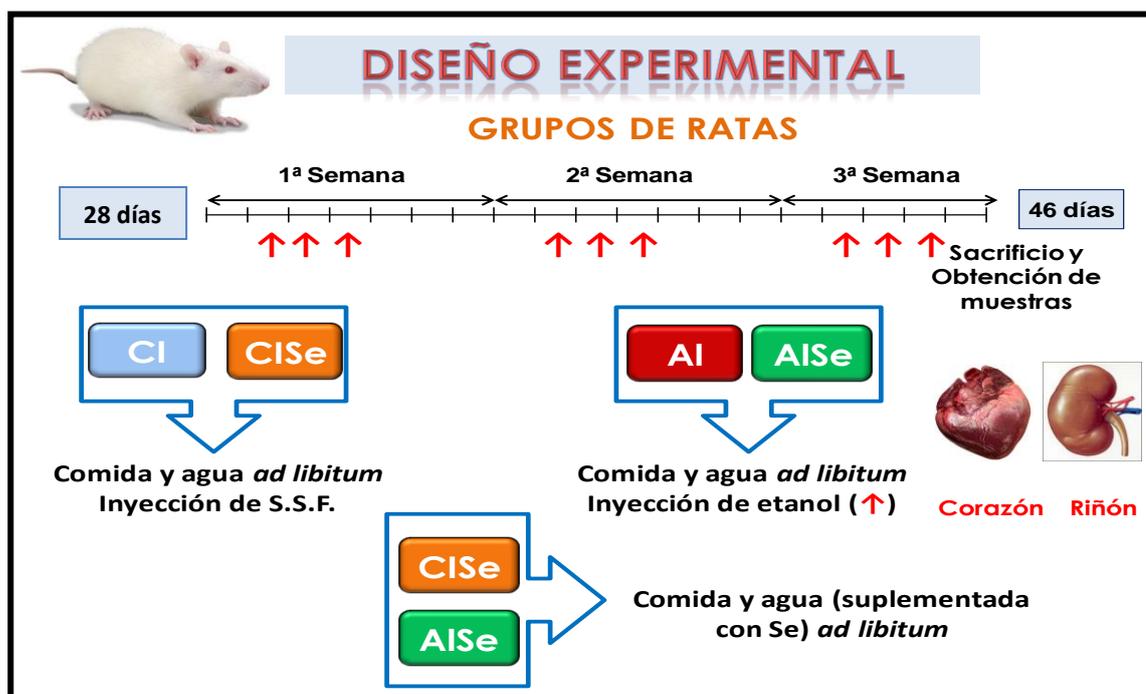
Las condiciones experimentales de cada grupo fueron:

- **CI:** alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm Se) y agua y, recibiendo, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **AI:** alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm Se) y agua y, recibiendo, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).
- **CISE:** alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm) y agua suplementada con Se (0.3 ppm Se), y, recibiendo, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- **AISE:** alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm) y agua suplementada con Se (0.3 ppm Se), y, recibiendo, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).

Los tratamientos se realizaron 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. Los animales estuvieron en estas condiciones hasta el momento de su sacrificio para la obtención de las muestras. Antes del sacrificio, las ratas permanecieron en período de ayuno de 12 horas.

Figura 4.1.1. Esquema del diseño experimental



4.1.2. Dieta utilizada

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética (Harlan Laboratorios) que cubría todas las necesidades nutricionales y energéticas, esta contenía 0.23 ppm de Selenio. Los grupos suplementados recibieron, además, 0.3 ppm de Se (en forma de selenito sódico pentahidratado, PANREAC) en el agua de bebida.

4.1.3. Método de alcoholización

El método de alcoholización que se utilizó para los grupos alcohol intraperitoneal (AI) y alcohol intraperitoneal selenio (AISE) tuvo como base el modelo de alcoholización “binge drinking” basado en 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 y cols., 2010). Por otra parte, a

los grupos control intraperitoneal (CI) y control intraperitoneal Se (CISe) se les administró intraperitonealmente un volumen equivalente de solución salina durante el mismo período de tiempo.

4.1.4. Determinación de parámetros nutricionales

4.1.4.1. Estudio nutricional y de la ingesta de selenio

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

La ingesta de Se ($\mu\text{g}/\text{día}$) se calculó a partir de los datos de la ingesta sólida y líquida (0.3 ppm), teniendo en cuenta el Se presente en la dieta (0.23 mg/Kg). Las calorías diarias aportadas se calcularon a partir de los datos de ingesta sólida multiplicado por 3.96 Kcal/g pienso ingerido.

4.1.4.2. Estudio macroscópico

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

Una vez concluido el periodo experimental, los animales se pesaron antes de ser sacrificados y se anestesiaron vía intraperitoneal con uretano (SIGMA) al 28 % p/v a razón de 0,5 ml/100 g de peso corporal. A continuación se determinó la circunferencia abdominal y torácica usando un pie de rey métrico de precisión 0.01 mm. Además, también se determinó la longitud craneo-caudal (Novelli y cols., 2007), así como el índice organosomático (IOS) del corazón y riñón mediante la relación $\text{IOS} = (\text{peso del órgano}/\text{peso total}) \times 100$.

4.2. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE RATAS

4.2.1. Obtención y tratamiento de las muestras de orina y heces

La recolección de la orina y las heces se llevó a cabo colocando las ratas individualmente en jaulas de metabolismo, en ayuno y teniendo libre acceso a la bebida durante un periodo de 12 horas. Tras medir el volumen total, la orina se dividió en alícuotas y se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Las muestras de heces se pesaron, se sumergieron en N_2 líquido y se conservaron a -80°C para su posterior tratamiento.

4.2.2. Obtención y tratamiento de las muestras de suero

Una vez anestesiados los animales, se procedió a extraer la sangre mediante punción intracardiaca a través del tórax. Enseguida, se dejó retraer el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C hasta ser utilizado para la determinación de los diversos parámetros.

4.2.3. Obtención y tratamiento de los distintos órganos

Tras extraer el suero y después de realizar una laparotomía media, se procedió a la extracción de los órganos (corazón y riñón), determinando su peso. Los órganos se sumergieron en N_2 líquido y se conservaron a -80°C para su posterior análisis.

4.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL SELENIO

La determinación de Se en las distintas muestras se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) de alto rendimiento Perkin Elmer[®] (AANALYST 800) con software WinLab32. Este equipo cuenta con un horno de grafito con climatización transversal (THGA) y sistema de efecto Zeeman para corregir la señal así como con un inyector automático (Perkin Elmer, Überlingen, Alemania) y como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco especial de Selenio (ELDs).

Los parámetros instrumentales se determinaron teniendo en cuenta "Las técnicas Perkin Elmer y las condiciones recomendadas: Zeeman-THGA", y las condiciones para hornos de grafito utilizados por Grinberg y cols., (2005). Para la medición se utilizó una curva de calibración de Se (MERCK) a distintas concentraciones (5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/L}$) y modificadores de matriz de paladio y magnesio (MERCK).

Las muestras de suero se diluyeron cinco veces en 0,2% v/v HNO_3 y 0,2% de Triton X-100; en cambio, las muestras de orina no necesitaron tratamiento. El resto de muestras (corazón, riñón, y heces) se desecaron en estufa durante 72 horas a 110°C y digirieron en un baño de arena (OVAN) durante 72 horas y ácido nítrico (HNO_3 al 65%, PANREAC) en una concentración de 1mL/ 0.1 g de tejido seco. Pasado este tiempo, se adicionó ácido perclórico (HClO_4 al 70%, PANREAC) en concentración 0.05 mL/ 0.1 g de tejido seco y se dejaron enfriar. Finalmente, se añadió ácido clorhídrico (HCl 6N, PANREAC) en concentración 0.5 mL/10 mL de muestra y se procedió a la determinación de Se en las diferentes muestras según sus características tisulares (Ojeda y cols., 2009).

4.4. ESTUDIO DE ÍNDICES BIOLÓGICOS

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

Coefficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A)	$\text{C.D.A} = (A/I) \times 100$ $A = I - F$
Balance Aparente (B)	$B = I - (F + U)$

Las siglas usadas son las indicadas por la FAO/OMS (1966): A = Se absorbido, I = Se ingerido, F = Se en la excreción fecal, y U = Se en la excreción urinaria.

4.5. DETERMINACIONES EN CORAZÓN Y RIÑÓN

4.5.1. Actividad antioxidante y oxidación de biomoléculas

4.5.1.1. Homogeneización tisular

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración total de proteínas, una parte del corazón y del riñón congelados se pesaron, se trocearon y se sumergieron en proporción 1:4 p/v en el tampón de sacarosa (Sacarosa (ROIG FARMA) 250 mM; TRIS (SIGMA-ALDRICH), 15 mM; DTT (SIGMA), 1 mM; EDTA (SIGMA), 1 mM) utilizando un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón (Pobel 245432, España). El pH del tampón se ajustó con HCl (PANREAC; pH = 7, a 4°C).

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

4.5.1.2. Concentración total de proteínas

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

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

Los reactivos empleados en este método son: Reactivo A: Na_2CO_3 2% (p/v) en NaOH 0,1 M, Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v), Reactivo C: Tartrato de sodio potasio 2,7% p/v, Reactivo D: 1.5 mL de reactivo B y 1.5 mL de reactivo C en 150 mL de reactivo A, Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en

agua bidestilada (1:1 v/v). Los reactivos D y E deben prepararse en el momento del uso.

Procedimiento: La técnica consiste en elaborar una curva patrón a partir de la cual, conociendo las concentraciones de los estándares y midiendo sus absorbancias, podemos calcular las concentraciones de las muestras por medio de la medición de absorbancia de cada muestra.

Para ello, se prepara una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 1 mg/mL, a partir de la cual se preparan cuatro soluciones estándares cuyas concentraciones son: P1: 0,1 mg/mL, P2: 0,05 mg/mL, P3: 0,025 mg/mL y P4: 0,0125 mg/mL.

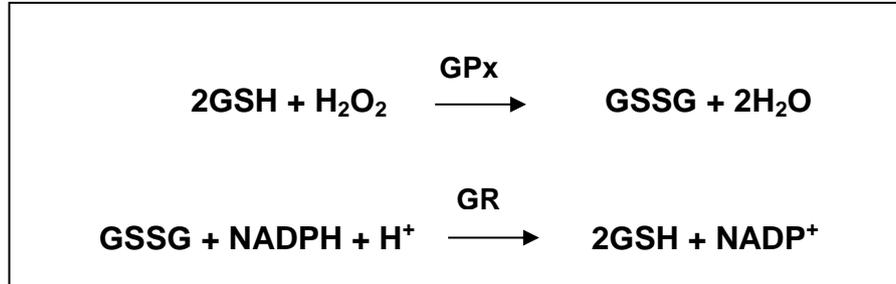
A continuación se mezclan en tubos de ensayo 5 mL de reactivo D con 1 mL de suero en el caso de las muestras (diluido con agua bidestilada 1/1000, para las enzimas antioxidantes) ó 1 mL de homogeneizado de corazón y riñón de ratas (diluido con agua bidestilada 1/500, para las enzimas antioxidantes y 1/300 para la determinación de la presencia de proteínas por western blotting), 1 mL de estándares en el caso de los patrones ó 1 ml de agua bidestilada en el caso del blanco, y se dejan reposar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 0,5 mL de reactivo E a los tubos, se agitan y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

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

4.5.1.3. Actividad de la glutatión peroxidasa

Fundamento: La enzima glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno en una reacción en que interviene el glutatión. La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Lawrence y Burk (1976) ligeramente modificado. En este método, el glutatión oxidado (GSSG) formado por la acción de la enzima GPx

se acopla a la reacción que cataliza la glutatión reductasa (GR), midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH.



Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7,4 a 4°C), 250 mM ; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10 mM; Solución azida (NaN₃) (SIGMA), 10 mM; Solución NADPH (en NaHCO₃ al 0,75% p/v) (SIGMA), 2 mM; Solución GR (en tampón TPK) (SIGMA), 10 U; Solución peróxido de hidrógeno (FORET), 2,5 mM y Solución glutatión reducido (SIGMA), 10 mM.

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 100µL de suero diluido en agua bidestilada (dilución 1/10) en ratas o 100 µl de homogeneizado de corazón de ratas (dilución 1/40) o 150 µl de homogeneizado de riñón de ratas (dilución 1/200). 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 peróxido hidrógeno, para evitar el comienzo de la reacción.

Cálculos: La actividad de la enzima GPx se calcula según la fórmula:

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

Donde: mU = nmol/minuto, $\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, Vf = volumen final en ml en la microcubeta, ϵ = coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, Vm = volumen de muestra (homogeneizado diluido) en mL en la cubeta, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL), D = dilución del homogeneizado.

4.5.1.4. Actividad de la glutatión reductasa

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

La determinación de la actividad GR se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Worthington y Rosemeyer (1974) ligeramente modificado, donde se mide la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH.

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7,4 a 4°C), 0,066 M; Solución cloruro potásico (ACOFARMA), 2 M; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10 mM; Solución glutatión oxidado GSSG (SIGMA), 10 mM y Solución NADPH (en NaHCO_3 al 0,1% p/v) (SIGMA), 1 mM.

Procedimiento: Para la determinación en homogeneizado de corazón y riñón de ratas, se añadieron en una microcubeta: 590 μL de tampón fosfato, 100 μL de KCl, 100 μL de EDTA, 100 μL de GSSG y 100 μL de NADPH. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició adicionando 10 μL de homogeneizado puro, y se aguardó la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Todas las muestras problema se midieron frente al blanco, que se preparó de la misma manera aunque contenía TPK en lugar del homogeneizado.

Cálculos: La actividad de la enzima GR se obtiene por el siguiente cálculo:

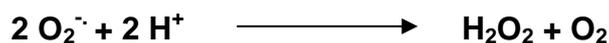
$$\text{mU/mg} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f \cdot 10^3 / \epsilon \cdot d \cdot V_m \cdot C]$$

Donde: mU = nmol/minuto, $\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, Vf = volumen final en ml en la microcubeta, ϵ = coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo

valor es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, V_m = volumen de muestra (homogeneizado) en ml en la cubeta, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/ml).

4.5.1.5. Actividad de la superóxido dismutasa

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



La actividad SOD se ensaya siguiendo el método descrito por Fridovich (1985), parcialmente modificado, en el que se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa para generar radicales superóxido (O_2^-).

El radical superóxido es capaz de reducir el citocromo c y esta reducción es inhibida por la enzima SOD, que compite por los radicales superóxidos y los “secuestra” llevando a cabo su dismutación. Por ello, según este método, el grado de inhibición en la reacción de reducción del citocromo c es un indicador de la actividad de la SOD.

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7,8 a 4°C) c/DTPA, 0,066 M; Solución xantina (SIGMA), 0,5 mM; Solución citocromo c (SIGMA), 100 μM ; Solución cianuro sódico (NaCN) (PANREAC), 0,5 mM; Solución catalasa (SIGMA), 10 U y Solución xantina oxidasa (SIGMA), 25 U.

Procedimiento: En una microcubeta se depositaron todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, excepto la xantina oxidasa: 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 (suero/hígado). A continuación, se inició la reacción adicionando 10 μL de xantina oxidasa, y se observó el aumento de absorbancia a 550 nm durante 3 minutos, debido a la reducción del citocromo c.

Para medir la reducción neta del citocromo c (es decir, en ausencia de SOD), se realizó una medida de referencia que se procesó de la misma forma pero no contenía muestra, de forma que se produjo la reducción del citocromo

c debida a la acción de los radicales superóxidos formados por el sistema xantina/xantina oxidasa.

En las muestras, como se ha explicado anteriormente, la SOD compite con el citocromo c por los radicales superóxido, de forma que hubo una inhibición de la reducción del mismo. Se definió una unidad (U) de SOD como la cantidad de enzima que produce la inhibición de un 50 % de la reducción del citocromo c.

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

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

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

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

Donde: ΔA = incremento de absorbancia y c = mg de proteína presente en la muestra.

4.5.1.6. Actividad de la catalasa

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



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

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7,4 a 4°C), 0,066 M y Solución peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (FORET), 1/100 v/v.

Procedimiento: En una cubeta macro de cuarzo con un paso de luz de 1 cm, se añadió 2 mL de TPK y 120 μL de muestra (homogeneizado de corazón y riñón diluido en agua bidestilada 1/120). Posteriormente, se inició la reacción

añadiendo 480 μL 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.

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

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

Donde: U = $\mu\text{mol}/\text{minuto}$, $\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, V_f = volumen final en mL en la cubeta, ϵ = coeficiente de extinción molar de H_2O_2 ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, V_m = volumen de muestra en la cubeta en mL, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL), D = dilución de homogeneizado.

4.5.1.7. Peroxidación lipídica

Fundamento: Uno de los métodos más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica es la cuantificación de malondialdehído (MDA) por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA es un producto final de la degradación oxidativa de los lípidos que, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participa fácilmente en una reacción de adición nucleófila con el TBA, generando un pigmento rojo fluorescente (compuesto por una molécula de MDA y dos de TBA) que puede ser determinado por espectrofotometría.

Para la determinación del MDA seguimos el método descrito por Beers y Sizer (1952), en el cual se valora espectrofotométricamente a 535 nm el aducto de color rojo formado al reaccionar el MDA con el TBA.

Los reactivos usados para la determinación de la peroxidación lipídica fueron: Solución ácido tricloroacético (TCA) (MERCK), 20% p/v y Solución ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA) al 0,67% p/v.

Procedimiento: En el interior de tubos eppendorf con tapón de seguridad, una alícuota de 150 μl de suero o homogeneizado de corazón y riñón se mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) y se centrifugó durante 10

minutos a 14000 g y 4°C para precipitar las proteínas. Del sobrenadante que resultó, se tomó una alícuota (150 µl) y se añadió una parte igual de TBA al 0,67%, incubando la mezcla en un baño de agua hirviendo (100°C) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se bajó la temperatura introduciendo los tubos en hielo y se midió la absorbancia de la muestra frente al blanco a 535nm. El blanco se procesó igual que una muestra pero contenía una alícuota de agua bidestilada en lugar de suero.

Cálculos: La concentración de MDA presente en las muestras se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: A = absorbancia de la muestra, ϵ = coeficiente de extinción molar para el MDA a 535 nm ($\epsilon = 153 \cdot 10^3$ ml/mol.cm), C = concentración de MDA en la muestra (mol/ml), d = paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en moles de MDA formados/mg proteína en los 10 minutos de incubación.

4.5.1.8. Oxidación de proteínas

Fundamento: La oxidación de proteínas provoca un aumento de los grupos carbonilos en éstas. La 2,4-dinitrofenilhidrazina se une a estos grupos para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, un complejo coloreado que absorbe a una longitud de onda de 366 nm (Reznick y Packer, 1994).

Los reactivos utilizados para esta determinación fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7,0 a 4°C), 10 mM; Solución dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 24% p/v; Solución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (en HCL) (ACOFARMA), 10 mM; Solución TCA (MERCK), 20% p/v; Solución de etanol/acetato de etilo, 1/1 v/v y Solución guanidina en ácido fórmico (diluido en agua bidestilada 1/1 v/v), 6 M.

Procedimiento: A partir del suero o del homogeneizado de corazón y riñón se prepararon 300 μL de muestra que contenían aproximadamente una concentración de 5 mg proteína/mL. Para ello, una alícuota de suero u homogeneizado (125 μL) se mezcló con un volumen igual de SDS al 24% para solubilizar las proteínas, y se completó con TPK hasta alcanzar el volumen final deseado.

La muestra se incubó durante 3 minutos en baño de agua a 100°C y, posteriormente, se enfrió en hielo. A continuación, a los 300 μL de muestra se le añadieron 300 μL de DNPH y la mezcla se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora, agitando cada 15 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 300 μL de TCA y se centrifugó la mezcla 3 minutos a 11000 g y 4°C. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó tres veces con 1 mL de la solución de etanol/acetato de etilo, centrifugando (3 minutos, 11000 g, 4°C) después de cada lavado y desechando el sobrenadante tras la centrifugación. Por último, el precipitado final se resuspendió en 600 μL de guanidina 6 M y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 11000 g, 4°C durante 3 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante frente al blanco (solución de guanidina) a 366 nm.

Cálculos: La concentración de los grupos carbonilos presente en la muestra se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: A = absorbancia de la muestra, ϵ = coeficiente de extinción molar para la 2,4-dinitrofenilhidrazona ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), C = concentración de grupos carbonilos en la muestra (mol/L), d = paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en nmoles de grupos carbonilos formados/mg proteína.

4.5.2. Análisis de la expresión de proteínas cardíacas y renales

4.5.2.1. Homogenización tisular para Wester Blotting

El corazón y riñón se homogeneizaron en tampón fosfato preparado en una dilución 1:10 p/v con los siguientes reactivos: K_2HPO_4 (PANREAC), 50mM; KH_2PO_4 (PANREAC), 50mM y EDTA (SIGMA), 0,01mM.

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

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

4.5.2.2. Características generales de los anticuerpos

Los niveles de expresión de la GPx-1, GPx-3 GPx-4 ,Sel P, NF- κ B y caspasa-3 fueron determinados por medio de la técnica de inmunodetección de proteínas o Western Blotting por el método de Laemmli (1970), que se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, además de proporcionar información acerca del tamaño de la proteína de interés mediante la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma.

Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma. En la Tabla 4.5.2.2 se encuentran las características de los anticuerpos y las diluciones usadas en cada determinación:

Tabla 4.5.2.2. Características de los anticuerpos usados en la Inmunodetección.

Anticuerpo	Clasificación y peso molecular	Dilución	Variante	Referencia comercial
GPx 1	Primario (23 kDa)	1:2.000	IgG policlonal en conejo	(SC-30147) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
GPx 3	Primario (23 kDa)	1:2.000	IgG policlonal en conejo	(SC-50496) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
GPx 4	Primario (21 kDa)	1:5.000	IgG policlonal en conejo	(SC-50497) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Sel P	Primario (57 kDa)	1:2.500	IgG policlonal en conejo	(SC-30162) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
NF-κB	Primario (65 kDa)	1:1.000	IgG policlonal en conejo	(SC-372) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Caspasa-3	Primario (19 kDa)	1:1.000	IgG policlonal en conejo	(Asp 175) CELL SIGNALING TECHNOLOGY
Anti-rabbit IgG	Secundario	GPx1- 1:5.000 GPx3- 1:5.000 GPx4-1:10.000 Sel P-1:5.000 NF-Kb-1 :2.500 Caspasa-1:2.500	Anti-IgG en conejo	(SC-2030) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti-β-Actina (Mouse IgG1)	Primario (42 kDa)	1:20.000	IgG1 monoclonal en ratón	(A5441) SIGMA
Anti-Mouse IgG1	Secundario	1:8.000	Anti-IgG1 monoclonal en ratón	(A9044) SIGMA

4.5.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con sds: sds-page

Fundamento: La separación de las proteínas según su masa molecular se efectuó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se obtienen por la polimerización de moléculas de acrilamida y N,N'-metilén-bisacrilamida, disueltas en un tampón adecuado. Para ello, requieren la acción de un polimerizador como el persulfato amónico (APS), que al disolverse en agua induce la formación de diversos radicales libres en la acrilamida, favoreciendo de esta manera su polimerización.

La gelificación se consigue mediante la formación de enlaces cruzados en presencia de la bisacrilamida. Así se obtiene una malla de cadenas de poliacrilamida. A este proceso de polimerización también se añade un estabilizador de los radicales libres, el tetrametilén diamina (TEMED).

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se realiza en función de su carga y de su forma, dependiendo esta última del plegamiento de la proteína.

Los detergentes desnaturalizan las proteínas, rompiendo el plegamiento y consiguen que todas las proteínas presenten la misma forma y también una densidad de carga muy similar. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que se une en una proporción de aproximadamente 1,4 g de SDS por 1 g de proteína, lo que proporciona una relación carga/masa muy uniforme para la mayor parte de las proteínas. El tratamiento simultáneo con un agente reductor de puentes disulfuro, como el 2-mercaptoetanol, asegura que la proteína está completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, garantizando que corre de manera uniforme.

Para controlar visualmente el avance de la proteína en la electroforesis y evitar que sobrepase el extremo del gel, se emplea un colorante como el azul de bromofenol.

Procedimiento: Previamente a la carga de las muestras, en un tubo de eppendorf de 1,5 mL se pipeteó el volumen necesario de muestra para la

cantidad de proteína que queríamos cargar (150 µg en corazón y 200 µg en riñón) y se llevó hasta el volumen deseado con tampón de carga, con el objetivo de pipetear el mismo volumen y la misma cantidad para todas las muestras. A continuación, se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas.

A continuación se prepararon los geles con la composición establecida en la tabla 4.5.2.3

Tabla 4.5.2.3. Componentes empleados en los geles.

REACTIVO	Cantidades		
	Gel separador para la GPx-1, GPx-3, GPx-4 y caspasa-3 (12% acrilamida)	Gel separador para Sel P y NFκB (8% acrilamida)	Gel concentrador
Agua Bidestilada	3,3 mL	4,6 mL	5,5 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30% (BIO-RAD)	4 mL	2,7 mL	1,3 mL
Tris (SIGMA) 1.5 M a pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	1 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 10% p/v en agua destilada	100 µL	100 µL	80 µL
Persulfato amónico (APS) (SIGMA) al 10% p/v en agua destilada	100 µL	100 µL	80 µL
TEMED (BIO-RAD)	5 µL	6 µL	8 µL

El gel separador, se vertió entre los dos vidrios de un equipo de BIO-RAD LABORATORIES para Western Blotting. Para que la superficie del gel quedase plana y se evitase la entrada de oxígeno atmosférico, se añadió agua bidestilada entre los vidrios. Cuando el gel polimerizó (aproximadamente en 25-30 minutos), se eliminó el agua bidestilada, se vertió el gel concentrador y se introdujo un peine evitando la formación de burbujas. Este último se retiró con cuidado tras la polimerización del gel (después de 30 minutos). A continuación

se montó el equipo de electroforesis y se llenó la cubeta con tampón de electroforesis diluido (1/10) en agua bidestilada, se cargaron las muestras en los pocillos, así como el marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker 26612- THERMO SCIENTIFIC) con ayuda de una pipeta y se conectó la cubeta a una fuente de voltaje. Se aplicó una intensidad de 150 V con un regulador de voltaje (PowerPac™ Basic – BIO-RAD), hasta que el frente de las muestras alcanzó el extremo final del gel.

La composición de los tampones fue:

1. Tampón de carga: Tris (SIGMA) a pH 6,8 en concentración 1M; Glicerol (PANREAC), 0,1 % p/v; Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 10% p/v; Azul de Bromofenol (SIGMA), 2 % v/v y 2-mercaptoetanol (BIO-RAD) al 5 % v/v.
2. Tampón de electroforesis: Tris (SIGMA), 250 mM; Glicina (SIGMA), 1,92 M y Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 1% p/v.

4.5.2.4. Transferencia de proteínas

Fundamento: Esta técnica permite que las proteínas separadas por electroforesis sean accesibles a la detección por anticuerpos, dado que las proteínas se quedan fuertemente adheridas a la superficie de una membrana, generalmente de nitrocelulosa.

Los reactivos usados para la preparación del tampón de transferencia fueron: Tris (SIGMA), 20 mM; Glicina (SIGMA), 192 mM y Metanol (PANREAC), 20 %v/v.

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

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

4.5.2.5. Inmunodetección

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

Los reactivos utilizados fueron:

1. Solución TBST: Tris (SIGMA), 10 mM; NaCl (ACOFARMA), 100 mM y Tween 20 (SIGMA), 0,1% v/v.
2. Solución de bloqueo y de dilución de anticuerpos (BIO-RAD), 3% p/v disuelta en TBST.
3. Solución de Ponceau S en 5% de ácido acético (SIGMA), 0,1 %p/v.

Procedimiento: Una vez efectuada la transferencia se comprobó la eficacia de la misma. Para ello, en un recipiente plástico se tiñó la membrana con el colorante de Ponceau, durante breves instantes, y seguidamente se lavó cuidadosamente con agua bidestilada. Tras este paso, se introdujo la membrana en una solución de bloqueo, de forma que quedase completamente cubierta y se dejó incubando a temperatura ambiente durante una hora en agitación orbital a 50 r.p.m. (aparato Orbit 1000-LABNET).

Finalizado el bloqueo de la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario específico diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en el agitador orbital (Tabla 4.5.2.2). Terminada la incubación, se realizaron

ocho lavados con TBST de tres minutos cada uno. El anticuerpo secundario se preparó de la misma forma que el primario con las diluciones específicas detalladas anteriormente (Tabla 4.5.2.2). Este se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavar de la misma forma que con el anticuerpo primario.

4.5.2.6. Revelado

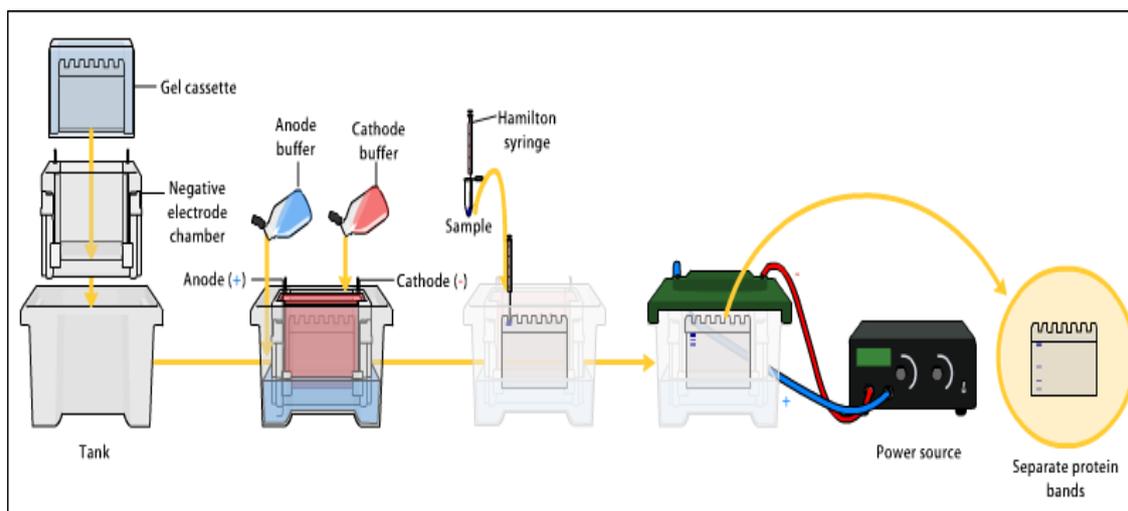
Fundamento: En este estudio se utilizó el proceso de quimioluminiscencia. Este se basa en la emisión de energía en forma de luz a partir de una sustancia, como consecuencia de una reacción química. Para este efecto es común la utilización de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano, actuando esta como catalizadora de la reacción.

Los materiales empleados en esta fase son: Cassette de exposición, Películas de alta sensibilidad (KODAK), Revelador y Fijador (KODAK) y Detector de quimioluminiscencia (ADVANSTA - WesternBright™ Quantum).

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

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

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

Figura 4.5.2.6. Resumen de la técnica de Western Blotting

4.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EN SUERO Y ORINA

4.6.1. Determinaciones bioquímicas

4.6.1.1. Perfil bioquímico

El estudio bioquímico se realizó en las ratas una vez finalizado el periodo de tratamiento, tras un periodo de ayuno de 12 horas. La extracción de la sangre y la obtención del suero, se realizaron de acuerdo con el procedimiento citado anteriormente en el apartado 1.3.1. Los análisis se efectúan en un analizador automático discreto multicanal (BAYER RA 1000). Los parámetros medidos fueron los siguientes: fosfatasa alcalina, colesterol, glucosa, aspartato-aminotransferasa (AST), alanino-aminotransferasa (ALT), bilirrubina total, y triglicéridos.

4.6.1.2. Parámetros relacionados con la función renal

Los niveles de creatinina, albúmina, urea, Na^+ y K^+ en suero y orina se determinaron en el Hospital Universitario Virgen de Valme mediante pruebas de bioquímica clínica de rutina, en el módulo Cobas 6000 (Roche Diagnostics GmbH), según las especificaciones del fabricante y utilizando reactivos patentados. El instrumento se calibró con el material estándar de referencia patentado y se verificó con el uso de controles de calidad propios.

4.6.2. Determinación de los niveles de aldosterona

Fundamento: Los niveles de aldosterona en suero y orina se determinaron mediante ELISA, utilizando el Kit Inmunoensayo de la Enzima Aldosterona Enzo Life Sciences, un kit completo para determinar la cantidad de aldosterona en muestras de suero y orina. La aldosterona se determina mediante la unión del anticuerpo presente en la pared de los pocillos a los anticuerpos primarios que se le añaden a través de las soluciones comerciales que se van adicionando durante el ensayo.

Los reactivos utilizados son los suministrados por el fabricante: Tampón de ensayo, 27 mL Catalog No. 80-0010: Tampón tris que contiene proteínas y azida sódica, estándar de aldosterona, 0.25 mL, Catalogo No. 80-2071: una solución de 10.000 pg/mL de aldosterona, Placa de 96 pocillos IgG anticuerpo: una placa transparente de tiras separables recubiertas con un anticuerpo policlonal, Anticuerpo aldosterona ELISA, 5 mL, Catalogo No. 80-2072: una solución amarilla de anticuerpo policlonal de aldosterona, Conjugado aldosterona ELISA, 5 mL, Catalogo No. 80-2073: una solución azul de aldosterona conjugada con fosfatasa alcalina, Concentrado de tampón de lavado, 27 mL, Catalogo No. 80-1286: Detergentes que contienen solución salina de tampón de tris, Substrato de pNpp, 20 mL, Catalogo No. 80-0075: solución de p-nitrofenil fosfato., Solución de parada, 5 mL, Catalogo No. 80-0247: solución acuosa de fosfato trisodio.

Procedimiento: primeramente, las muestras de suero se diluyeron 1:8 y las de orina 1:20 en tampón de ensayo, y se procedió a la preparación de los estándares de aldosterona a partir de la solución estándar 10.000 pg/mL (250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/mL) A continuación, los estándares y muestras en un volumen de 100 µl se vertieron en los pocillos con el anticuerpo de aldosterona. Seguidamente se añade una solución azul de aldosterona conjugada con fosfatasa alcalina, y posteriormente una solución amarilla de anticuerpo secundario de aldosterona. Durante la incubación a 4°C los anticuerpos se unen, de manera competitiva durante 24 horas. Tras la unión, la placa se lava con el tampón de lavado quedando solo la aldosterona unida. La

solución de sustrato de pNpp se añade y se incuba durante 1 hora dando coloración amarilla cuando son catalizados por la fosfatasa alcalina en la aldosterona conjugada. Inmediatamente tras la incubación se añade la solución de parada y la solución amarilla generada se lee a 405 nm mediante el refractómetro M-2000 Reader, Optic Ivymen® System, Clinicord, S.L. La cantidad de aldosterona de la señal es indirectamente proporcional a la cantidad de aldosterona en la muestra.

Cálculos: La concentración de aldosterona se calcula a partir de los datos de DO obtenidos:

1. Se calcula el promedio neto de la densidad óptica (DO) de cada estándar y muestra restando al promedio de las uniones no específicas de la DO de cada estándar y muestra:

Promedio neto DO= promedio DO – promedio DO uniones no específicas

2. Se calcula la unión de estándar como el porcentaje máximo de unión (Bo), usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de unión = DO neta/DO neta de estándares

3. Se traza una recta de calibrado del porcentaje de unión (B/Bo) frente a la concentración de aldosterona de los estándares. La concentración de aldosterona de los muestras es determinada por interpolación. Las muestras cuya concentración este fuera de la recta de calibrado se puede usar una dilución distinta para calcular su concentración de aldosterona.

4.6.3. Determinación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca

El día anterior al sacrificio se midió la presión arterial sistólica y diastólica, y la frecuencia cardiaca de las ratas madres mediante el método indirecto de oclusión de la cola (Gómez-Amores y cols., 2007). Las mediciones se realizaron usando un Medidor de presión 645 NIPREM (CIBERTEC, Barcelona,España). Las señales recogidas se trataron con un soporte

informático a través de un sistema de adquisición de datos acoplado al medidor de presión. Cada medición en cada animal se realizó 3-4 veces sucesivamente con el fin de calcular la media aritmética, que fue el valor utilizado. Una vez obtenidos los valores de la presión arterial sistólica y diástolica se calculó el valor de la presión arterial media mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PAM} = \text{PAD} + 1/3 (\text{PAS}-\text{PAD})$$

4.7. MARCADORES DE LA FUNCIÓN RENAL

4.7.1. Cálculo de la función renal

4.7.1.1. Aclaramientos

Una vez obtenidas las concentraciones de creatinina, sodio, potasio y selenio en suero y orina, se calcula el aclaramiento de creatinina, sodio, potasio y selenio usando la siguiente expresión:

$$\text{CL} = \text{Vo} \cdot \text{Co} / (\text{Cs} \cdot 1440)$$

Donde:

CL = aclaramiento de creatinina, sodio, potasio y selenio (ml/min)

Vo = volumen de orina recogido en 24 horas (ml)

Co = concentración de creatinina, sodio, potasio y selenio en orina (mg/dl)

Cs = concentración de creatinina, sodio, potasio y selenio en suero (mg/dl)

Una vez obtenido los aclaramientos de sodio, potasio y selenio se relativizan con el aclaramiento de creatinina para obtener más información acerca del funcionamiento renal.

4.7.1.2. Excreción fraccional de sodio

La excreción fraccional de sodio (EFNa), es la cantidad de sodio que se elimina del organismo a través de la orina comparada con la cantidad filtrada y reabsorbida por el riñón. Es uno de los factores que se utilizan para evaluar el origen de la insuficiencia renal, ya que ayuda a determinar si la reducción en la producción de orina se debe a una disminución del flujo sanguíneo al riñón (fallo prerrenal), los valores de EFNa son menores al 1% y indica situaciones

prerrenales y glomerulonefritis agudas. Mientras que cuando el daño es en el riñón en si (fallo renal) los valores EFNa son mayores al 1%, siendo habitual en la mayoría de las necrosis tubulares aguda, enfermedades renales crónica y tras la administración de diuréticos.

Se obtiene mediante un cálculo basado en las concentraciones de sodio y creatinina en la sangre y en la orina a través de la siguiente fórmula:

$$\text{EFNa} = (\text{Na}^+ \text{ orina} / \text{Na}^+ \text{ plasma}) / (\text{Cr orina} / \text{Cr plasma}) \times 100$$

4.7.1.3. Gradiente transtubular de potasio

El gradiente transtubular de potasio (GTTK) es un índice para analizar la actividad renal en su balance de K^+ en relación con el K^+ presente en plasma y la osmolaridad en ambos medios. Permite valorar la presencia y actividad de la aldosterona en el túbulo distal.

Se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{GTTK} = [\text{K}^+ \text{ orina} / (\text{Osm orina} / \text{Osm plasma})] / \text{K}^+ \text{ plasma}$$

4.7.1.4. Osmolaridad

Para medir la osmolaridad de la orina, se separa de cada muestra una alícuota de 50 μl y se realiza la lectura empleando un osmómetro crioscópico Osmomat 30 (Alemania).

4.8. DETERMINACIÓN DE MARCADORES VASCULARES

Se determinaron en suero los niveles de Caveolin-1 (Cav-1), CTGF (Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo), tPAI-1 y VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) usando el MAPA MILLIPLEX RV1MAG-26K (Millipore Corporation, Missouri, EUA), basado en inmunoensayos en la superficie de microesferas codificadas con fluorescencia, siguiendo las especificaciones del fabricante (50 eventos por perla, muestra de 50 μl , Configuración de la puerta: 8000-15000, tiempo de espera 60 segundos,

melatonina conjunto de microesferas 34). La placa se leyó en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Texas, EE.UU.) con el software xPONENT para la obtención de los datos. Los valores medios para cada conjunto de muestras o estándares duplicados estaban dentro del 15% de la media.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (ESM), siendo “n” el número de muestras utilizadas. Las medias mostradas se obtienen a partir de 8 datos. Para comparar las distintas variables objeto de nuestro estudio en los diferentes grupos experimentales, los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza ANOVA en el programa (GraphPad InStat 3). Posteriormente, se utilizó el test de Tukey-Kramer para determinar las diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos para los cuatro grupos estudiados, considerándose diferencias estadísticamente significativa valores de $p < 0,05$.

Para expresar las diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos experimentales en ratas se utilizó la siguiente simbología:

Tabla 4.9. Significación utilizada

Grupos	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
CI vs AI	*	**	***
CI vs CISe	c	cc	ccc
AI vs AISe	a	aa	aaa
CISe vs AISe	•	••	•••

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CONTROL NUTRICIONAL, MORFOLÓGICO Y METABÓLICO

5.1.1. Control nutricional y morfológico

Al observar los resultados del control nutricional y morfológico, se puede comprobar que la ingesta sólida y calórica fue similar en los cuatro grupos experimentales, no encontrándose diferencias significativas en el incremento de peso ni en la longitud cráneo caudal de dichos animales. Respecto a la ingesta líquida fue significativamente menor en el grupo AI que en el grupo CI (Tabla 5.1.1). Parece ser que la vía de administración y la concentración de alcohol utilizada pueden ejercer efectos adversos en la función adrenal, la cual está fisiológicamente involucrada en el consumo de agua y en su absorción por el riñón (Rivier, 1996). Por ello, en el grupo experimental AI, los días de tratamiento en los que se inyectaron 3g/Kg/d de alcohol se alcanzaron alrededor de 200 mg/dl de alcohol en sangre lo cual ha producido que las ratas hayan ingerido menos cantidad de agua durante esos días en concreto, y así en el periodo experimental.

Para conocer la distribución de la grasa corporal y posible obesidad visceral se han medido la circunferencia torácica y abdominal, así como la ratio entre ambas. La circunferencia abdominal en los grupos AI y CISe son significativamente mayores que el grupo CI, sin embargo la ratio entre la circunferencia abdominal y circunferencia torácica es significativamente mayor sólo en el grupo AI. A pesar de que las ratas expuestas a BD ingieren la misma cantidad de comida que las demás se favorece el almacenamiento de grasa a nivel visceral exclusivamente. En el grupo AI la grasa visceral es alta, produciéndose posiblemente esteatosis hepática en estos animales (Ojeda y cols., 2017b), otra causa más para generar un mal funcionamiento hepático (Tabla 5.1.2). Así, existen cambios metabólicos a nivel lipídico, sin embargo el efecto sumatorio de BD y la suplementación con Se no afecta a esta disposición de la grasa, manteniéndose estable la ratio entre la grasa visceral y subcutánea.

El peso relativo, así como la concentración proteica en el corazón y el riñón fue similar en los cuatro grupos estudiados, así el consumo de alcohol agudo

y repetido, y la suplementación de Se utilizada no afectan al desarrollo macroscópico de estos tejidos.

Tabla 5.1.1. Control nutricional y morfológico al final del periodo experimental.

Parámetros	CI	AI	CISe	AISe
Ingesta sólida (g/día)	13.10 ± 0.79	12.06 ± 0.67	13.58 ± 0.61	12.10 ± 0.61
Ingesta líquida (ml/día)	23.45 ± 1.0	20.42 ± 0.9 [*]	23.94 ± 1.1	21.7 ± 1.0
Ingesta calórica (Kcal/día)	53.71 ± 3.22	49.44 ± 2.96	55.67 ± 3.34	46.37 ± 2.78
Incremento peso corporal (g/día)	5.38 ± 0,19	5.03 ± 0.27	5.34 ± 0.25	5.17 ± 0.23
Longitud Cráneo Caudal (cm)	16.78 ± 0.26	15.82 ± 0.32	16.7 ± 0.37	15.6 ± 0.18
Circunferencia Torácica (cm)	8.34 ± 0.23	8.5 ± 0.44	9 ± 0.35	8.7 ± 0.20
Circunferencia Abdominal (cm)	8.5 ± 0.22	9.45 ± 0.32 [*]	9.43 ± 0.22 ^C	8.84 ± 0.26
Ratio C. Abdominal / C. Torácica	1.02 ± 0.06	1.11 ± 0.06 [*]	1.04 ± 0.07	1.01 ± 0.06
Peso Relativo Corazón (%)	0.52 ± 0.024	0.52 ± 0.011	0.47 ± 0.009	0.50 ± 0.023
[Prot] Corazón (mg prot/ml)	9.82 ± 0.64	9.03 ± 0.67	8.34 ± 0.50	9.04 ± 0.73
Peso Relativo Riñón (%)	0.962 ± 0.033	0.984 ± 0.026	1.025 ± 0.035	1.014 ± 0.058
[Prot] Riñón (mg prot/ml)	15.32 ± 0.70	15.99 ± 1.07	15.39 ± 0.42	16.87 ± 0.73

Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CI vs AI: ^{*} $p < 0.05$; CI vs CISe: ^c $p < 0.05$.

5.1.2. Parámetros bioquímicos

El consumo de alcohol tipo BD en las ratas produce cambios en sus perfiles bioquímicos. Como vemos en la tabla 5.1.2, determinados parámetros bioquímicos en suero como las enzimas hepáticas AST y ALT, así como su ratio, triglicéridos, colesterol, glucosa y bilirrubina total, se encuentran significativamente aumentados en el grupo AI respecto al grupo CI. La suplementación con Se a las ratas alcohólicas disminuye significativamente los niveles de AST y la ratio entre transaminasas con respecto a AI. Sin embargo, la AST, ALT, colesterol y glucosa siguen aumentados en el grupo AISe respecto al grupo CISe.

El análisis de las concentraciones séricas de las enzimas aminotransferasa puede ser muy útil como índice de lesión hepatocelular. En los grupos alcohol, suplementados con Se y no suplementados, se observa un incremento significativo de la AST y ALT en comparación con los grupos controles, lo que indica que el patrón de consumo alcohólico tipo BD afecta la integridad hepática. La suplementación con Se es efectiva disminuyendo los niveles de AST, beneficiando los valores de la ratio entre transaminasas, usada como marcador de daño hepático (Sorbi y cols., 1999).

Recientemente, se han encontrado datos similares en ensayos clínicos (Binder y cols., 2016), con un aumento en la relación AST/ALT, lo que refleja el daño de los hepatocitos después del consumo intensivo de alcohol en adolescentes. Se sabe que la mayoría de las enfermedades hepáticas cursan con un aumento de las transaminasas séricas, especialmente ALT, excepto en la hepatopatía alcohólica crónica en la que los niveles de AST duplican a los de ALT, con un aumento resultante en la ratio AST/ALT. La ratio aumentada está relacionada con el hecho de que el alcohol promueve un déficit de fosfato de piridoxal y conduce a una marcada toxicidad en las mitocondrias, la ubicación principal de la AST, lo que permite la liberación de esta enzima a la sangre (Sorbi y cols., 1999). Es importante remarcar que la suplementación con Se utilizada disminuye los niveles de AST, pero no de ALT, en el suero, disminuyendo esta ratio característica del consumo de alcohol.

La diferencia entre AST y ALT radica en el hecho de que las AST se encuentran dentro de la célula, ligadas a las mitocondrias, mientras que la ALT está libre en el citoplasma. Además, la ALT generalmente no se encuentra fuera del hígado; AST, sin embargo, está presente en el hígado y en el músculo cardíaco en cantidades significativas. De hecho, esta determinación de transaminasas se utilizó por primera vez para diagnosticar ataques cardíacos. Por lo tanto, el Se podría estar actuando a través de dos vías: 1) específicamente en las mitocondrias, mejorando su función debido a la expresión aumentada de GPx4 que protege las mitocondrias específicamente del daño oxidativo, y 2) al llevar el Se al corazón contribuye a la repleción de los depósitos de Se en este tejido, donde este nutriente tiene conocidos efectos cardioprotectores (Hoffmann y cols., 2011).

Tabla 5.1.2. Análisis bioquímicos de suero de las ratas.

Parámetros	CI	AI	CISe	AISe
Fosfatasa Alcalina (U/L)	533 ± 52.5	590 ± 45.4	547 ± 50.5	584 ± 24.9
AST (U/L)	120 ± 4.7	208 ± 11.7 ***, a	131 ± 2.8	167.7 ± 11.9 •
ALT (U/L)	38 ± 0.9	51 ± 2.4 **	40 ± 3.4	56 ± 2.9 ••
Ratio AST/ALT	3.16 ± 0.16	4.07 ± 0.20 **, aaa	3.26 ± 0.16	2.99 ± 0.15
Triglicéridos (mg/dL)	65.6 ± 1.2	95.6 ± 4.6 **	72.7 ± 3.6	83.3 ± 4.3
Colesterol (mg/dL)	86.4 ± 2.1	96 ± 2.3 *	86.3 ± 2.3	101.2 ± 3.3 •
Glucosa (mg/dL)	148.5 ± 5.2	189 ± 4.5 *	157.3 ± 12.1	212 ± 11.3 ••
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.56 ± 0.034	0.69 ± 0.041 *	0.53 ± 0.036	0.63 ± 0.036

Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; AI vs AISe: ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$; CISe vs AISe: [•] $p < 0.05$, ^{••} $p < 0.01$.

Además, el modelo de BD repetido durante la adolescencia modifica drásticamente el metabolismo, produciendo aumentos séricos de triglicéridos, colesterol, glucosa y bilirrubina. Estas alteraciones metabólicas no se modifican con la suplementación de Se. Recientes estudios relacionan el Se y a diferentes selenoproteínas con RI y cambios metabólicos importantes relacionados con el perfil glucídico y lipídico (Ojeda y cols., 2018).

Lindtner y cols. (2013) desarrollaron una investigación para determinar los efectos del BD sobre la homeostasis de la glucosa y la actividad de la insulina, administrando, diariamente, durante tres días consecutivos, 3g/Kg de etanol por vía intraperitoneal, a ratas de la raza Sprague-Dawley. Estos investigadores observaron que las ratas presentaban un incremento de los niveles de glucosa en sangre y una mayor expresión de la PTP1B, proteína inhibidora en la vía de señalización de la insulina, por lo que concluían que el BD disminuye la tolerancia a la glucosa e induce la RI, incrementado el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Incluso, cuando los niveles de alcohol en sangre de estos animales eran prácticamente indetectables ambos fenómenos se mantenían. Así, teniendo en cuenta estos datos, se podía sugerir que el aumento de glucosa encontrado en los grupos de nuestro estudio AI y AISe, podía ser el resultado de un desequilibrio homeostático en la glucosa y de un aumento en la RI, provocado por el BD. En este punto, también se conoce que el Se participa tanto por exceso como por defecto en la RI (Wang y cols., 2014; Zhou y cols., 2013; Seale y cols., 2012; Lanbuskyy y cols., 2011) aumentando los triglicéridos y el colesterol sérico, así como generando esteatosis hepática, principalmente a través de la GPx-1 y la Sel P hepática, alterando la cascada de señalización de insulina a través del PTP1B y la PTEN y/o la AMPk, mediadora fundamental de la homeostasis energética. Por tanto, en el caso del grupo AISe, los efectos sobre el perfil bioquímico serían sumatorios.

Por otro lado, es conocido que la ingesta de alcohol puede promover un aumento en la síntesis y acumulación de triglicéridos hepáticos, bien a través de la PKC ϵ activada o bien, por la inhibición del PPAR α y la estimulación de la SREBP1 (Suh y Jeong, 2011; Kaiser y cols., 2009). Una vez acumulados en el hígado, los triglicéridos son transportados por la apolipoproteína B, que se ensambla a ellos, favoreciendo su secreción y por tanto, su aumento en sangre.

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

(Lu y cols., 2007; Vendemiales y Lieber, 1984) Nuestros resultados concuerdan con estas investigaciones, y la suplementación con Se no parece ser efectiva en este punto.

5.2. HOMEOSTASIS DE SE

Como ya se comentó, el Se es un elemento esencial para la vida y se necesita una adecuada cantidad para tener un buen estado de salud (Reszka y cols., 2012; Papp y cols., 2007; Forceville, 2001) Por ello, se han medido los niveles de Se en los dos órganos de estudio así como el balance y distribución de Se en las ratas expuestas a BD y suplementadas con Se.

Como se observa en la tabla 5.2, la ingesta de Se en el grupo CI y AI son significativamente menores que la observada en los CISe y AISe con lo que se confirma que el método usado para la suplementación de Se es correcto.

Tabla 5.2. Valores de la homeostasis de Selenio.

Parámetros	CI	AI	CISe	AISe
Se ingerido (µg/día)	3.01 ± 0.22	2.77 ± 0.16 aaa	5.4 ± 0.32 ccc	4.8 ± 0.27
Se Suero (µg/L)	205.35 ± 6.86	178.70 ± 5.70 **,aaa	335.32 ± 7.91 ccc	235.26 ± 6.37 ...
C.D.A (%)	96.27 ± 5.77	97.07 ± 6.97	96 ± 6.77	98 ± 5.88
Balance Aparente (µg/día)	2.67 ± 0.14	2.6 ± 0.17 aaa	4.69 ± 0.32 ccc	4.62 ± 0.32
Se en Heces (ng/día)	112 ± 7	81 ± 5 *	170 ± 10 ccc	90 ± 7 ...
Se en Orina (ng/día)	220 ± 24	90 ± 10 ***	540 ± 20 ccc	150 ± 10 ...
Se Corazón (µg Se/g tejido seco)	0.12 ± 0.1	0.09 ± 0.01 **, aaa	0.18 ± 0.02 cc	0.17 ± 0.02
Se Riñón (µg Se/g tejido seco)	0.46 ± 0.02	0.37 ± 0.01 **, aaa	0.57 ± 0.01 cc	0.64 ± 0.01

Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; CI vs CISe: ^{cc} $p < 0.01$; ^{ccc} $p < 0.001$; AI vs AISe: ^{aaa} $p < 0.001$; CISe vs AISe: ^{...} $p < 0.001$.

También, en nuestro estudio se encuentra una disminución significativa en los niveles de Se en suero entre los grupos que consumen alcohol (AI y AISe) y sus respectivos controles (CI y CISE). Este hecho implica una relación directa entre BD y los niveles séricos de Se. Por lo tanto, el alcohol modifica la biodisponibilidad de este nutriente, aunque la suplementación usada restablece los niveles séricos de Se hasta niveles controles. Esta disminución de Se puede ser debido a que el alcohol actúa sobre el metabolismo del Se y/o a que el Se se desplaza hacia los tejidos para sintetizar selenoproteínas antioxidantes (GPxs) para disminuir el EO generado por el consumo agudo y repetido de alcohol.

Nuestros datos coinciden con la literatura existente que establece que el consumo crónico de alcohol altera los niveles de Se, en animales y humanos (Ojeda y cols., 2009; González-Reimers y cols., 1999). Otra posible explicación de la disminución de los niveles séricos de Se podría residir en el propio metabolismo del alcohol, ya que genera una serie de productos tóxicos que, en el hígado, interfieren con la síntesis de diferentes selenoproteínas, tales como Sel P, principal transportador de Se en el plasma, así como de otras proteínas transportadoras de Se como la albúmina (Gao y cols., 2004). Sin embargo en estudios previos con un exacto modelo experimental al usado en esta memoria, la Sel P hepática (principal fuente de síntesis) no estaba alterada por el BD (Ojeda y cols., 2017b).

Respecto a la absorción aparente de Se (C.D.A) no se encuentran diferencias significativas entre los grupos experimentales, por lo que no estaría influenciado por el consumo agudo de alcohol ni por la cantidad de Se ingerida en el agua de bebida. Sin embargo, la retención de Se (balance aparente) si se encuentran disminuidas significativamente en los grupos no suplementados respecto a los grupos suplementados, lo que está en consonancia con la menor ingesta de este micronutriente, aunque no con el consumo de alcohol.

La excreción de Se, en las heces y en la orina, es significativamente menor en los grupos que consumen alcohol, AI y AISe, respecto a sus respectivos controles. Mostrando que tras el consumo de alcohol agudo, el organismo hace

un esfuerzo por no eliminar este nutriente, y lo deriva a los tejidos por su importancia como antioxidante, pues los niveles séricos están disminuidos.

Sin embargo, por primera vez se constata en este trabajo, que los niveles de Se en el grupo AI son significativamente inferiores a los del grupo control en el corazón y en el riñón, mostrando que el consumo de alcohol agudo y repetido tipo BD altera los depósitos tisulares de Se, del mismo modo que lo hace el consumo crónico de alcohol en hígado, corazón y riñón (Ojeda y cols., 2010), a pesar de que estos animales ingieren la misma cantidad de Se en dieta que los controles. Habría que seguir explorando los depósitos tisulares de Se en otros tejidos para comprender mejor la homeostasis de Se, tales como músculo y páncreas.

Esta depleción de Se observada en el corazón y riñón de los animales que consumen alcohol puede producirse, en parte, como consecuencia del metabolismo oxidativo del etanol, ya que los productos tóxicos formados, como los radicales libres y las ERO, podrían interferir en el metabolismo de Se alterando la formación de selenoproteínas cardíacas y renales, proteínas mediante las cuales el Se se almacena en el corazón y riñón, pero también por su uso como antioxidante, pues el Se forma parte del centro catalítico de la enzima antioxidante GPx necesaria para luchar contra el EO generado por esta droga (Benstoem y cols., 2015; Pappas y cols., 2008).

5.3. ESTUDIOS EN CORAZÓN

5.3.1. Balance oxidativo

Como ya se mencionó, diversos estudios demuestran que la ingesta aguda y crónica de alcohol tienen importantes efectos sobre el estado oxidativo del organismo, alterando el balance entre los procesos oxidantes y antioxidantes, aumentando así el EO en diferentes tejidos (Cigremis y cols., 2004; Zhang y cols., 2004; Asha y cols., 2003; Scott y cols., 2000).

Al estudiar la actividad de las distintas enzimas antioxidantes cardíacas se puede observar (Figura 5.3.1.1) que el consumo agudo de alcohol aumenta significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GR, y disminuye los de GPx respecto al grupo CI. Este desbalance entre las enzimas

antioxidantes produce oxidación de proteínas y peroxidación lipídica en los miocitos. La suplementación con Se al grupo alcohol disminuye parcialmente la actividad de la enzima CAT y totalmente la de GR, así como, aumenta significativamente la actividad de GPx evitando en parte la oxidación de proteínas y anulando completamente la de lípidos en el tejido cardíaco.

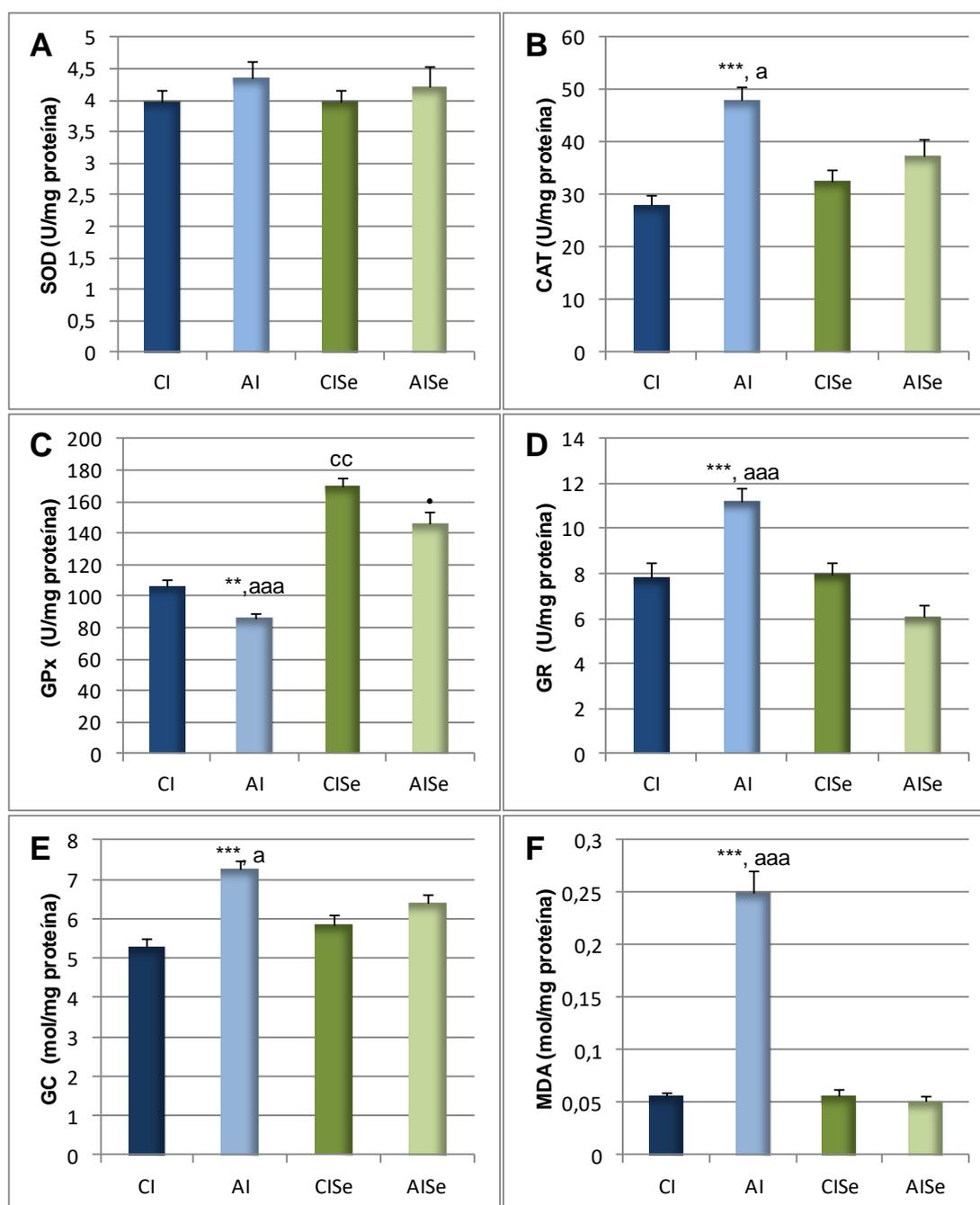
Es importante recordar que la CAT forma parte del sistema enzimático de defensa antioxidante catalizando la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 , pero, además, interviene en el metabolismo oxidativo del alcohol. Como hemos visto anteriormente, el alcohol se metaboliza a través de tres rutas enzimáticas: la ADH, el sistema SMOE y la CAT, jugando esta última un papel esencial en el metabolismo del alcohol a nivel cardíaco que no ocurre en otros tejidos (Orellana y cols., 1998). Por tanto, el aumento de su actividad tras el consumo de alcohol nos sugiere que su síntesis está inducida en respuesta a una mayor necesidad de metabolizar las altas dosis de etanol ingeridas por estos animales, es por ello que la suplementación con Se sólo disminuye en parte la actividad de la CAT, pues su estimulación depende más de la cantidad de alcohol que llega al tejido que al balance oxidativo.

Respecto a la actividad de la principal selenoproteína antioxidante, la GPx, se observa que tras el consumo de alcohol su reducción está en consonancia con los niveles de Se encontrados en el corazón, deplecionados tras el consumo de esta droga, algo esperable. La suplementación con Se aumenta los depósitos de Se en el corazón y la actividad de esta enzima. Lo mismo ocurre en el grupo control suplementado respecto al grupo control.

Se sabe que la GPx y la GR son dos enzimas íntimamente relacionadas, ya que la GR se encarga de reciclar el GSSG oxidado por GPx a GSH, necesario para el funcionamiento de la GPx (Das y Vasudevan, 2005). Si hay una menor actividad de la GPx habrá, en parte, menos GSSG oxidado que regenerar a GSH y hace falta menor actividad de la GR. Así, el equilibrio entre este par enzimático es muy importante en la lucha antioxidante, mejorando la lucha contra el EO una menor actividad de GR respecto GPx. Sin embargo, en el caso de BD aunque se mantiene la proporción del par, al ser tan pequeña la actividad de la GPx aparece EO que oxida a lípidos y a proteínas del corazón.

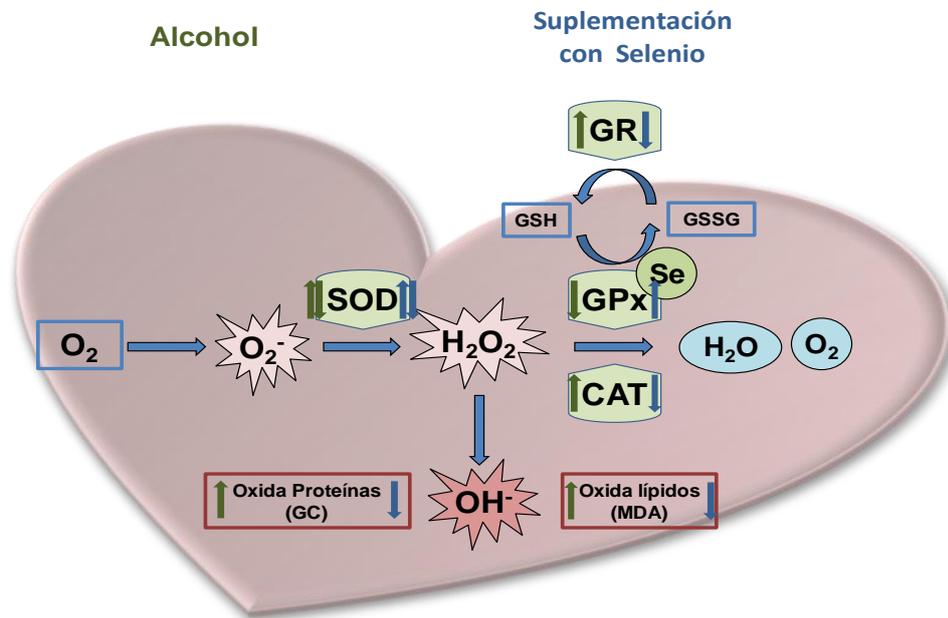
Por ello, la suplementación con Se al aumentar la actividad GPx mejora la oxidación de proteínas (GC) y evita totalmente la peroxidación lipídica (MDA), pudiéndose achacar la acción antioxidante de la suplementación casi en su totalidad a la GPx.

Figura 5.3.1.1. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B), GPx (C), GR (D) y niveles de GC (E) y MDA (F).



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$; CI vs CISe: ^{cc} $p < 0.01$; AI vs AISe: ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$; CISe vs AISe: ^{*} $p < 0.05$.

Figura 5.3.1.2. Representación esquemática de los eventos ocurridos en los sistemas de defensa antioxidante en el corazón en respuesta al consumo agudo de alcohol y a la suplementación con Se.



Incremento o disminución de la actividad de las distintas enzimas antioxidantes y la oxidación de macromoléculas tras el consumo agudo de alcohol.



Incremento o disminución de la actividad de las distintas enzimas antioxidantes y la oxidación de macromoléculas tras el consumo agudo de alcohol suplementado con Se.

5.3.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1, GPx-3, GPx-4 y Sel P en el corazón

Debido a la importancia que adquiere la GPx en la defensa antioxidante cardiaca tras el BD, se analizaron las expresiones de las isoformas cardiacas más importantes, GPx-1, GPx-3 y GPx-4, además de la expresión de la Sel P. Resaltar que la actividad GPx medida en el corazón, por la técnica usada corresponde a la acción de la GPx-1 y GPx-3.

Tras la exposición a un consumo agudo de alcohol la expresión de las enzimas GPx-1 y GPx-4 disminuyeron significativamente, mientras que la expresión de las selenoproteínas GPx-3 y Sel P no se modificaron. La suplementación con Se al grupo alcohol aumentó significativamente la expresión de GPx-1 y GPx-4 incluso por encima de los valores controles. Sin

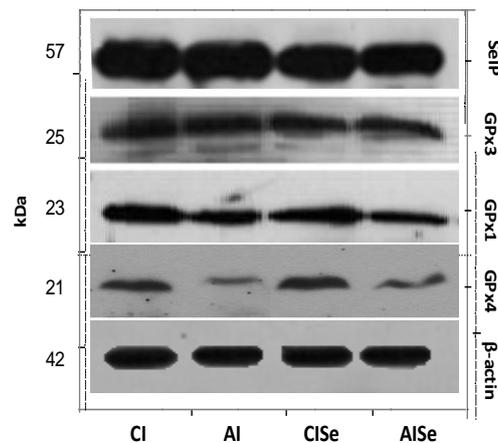
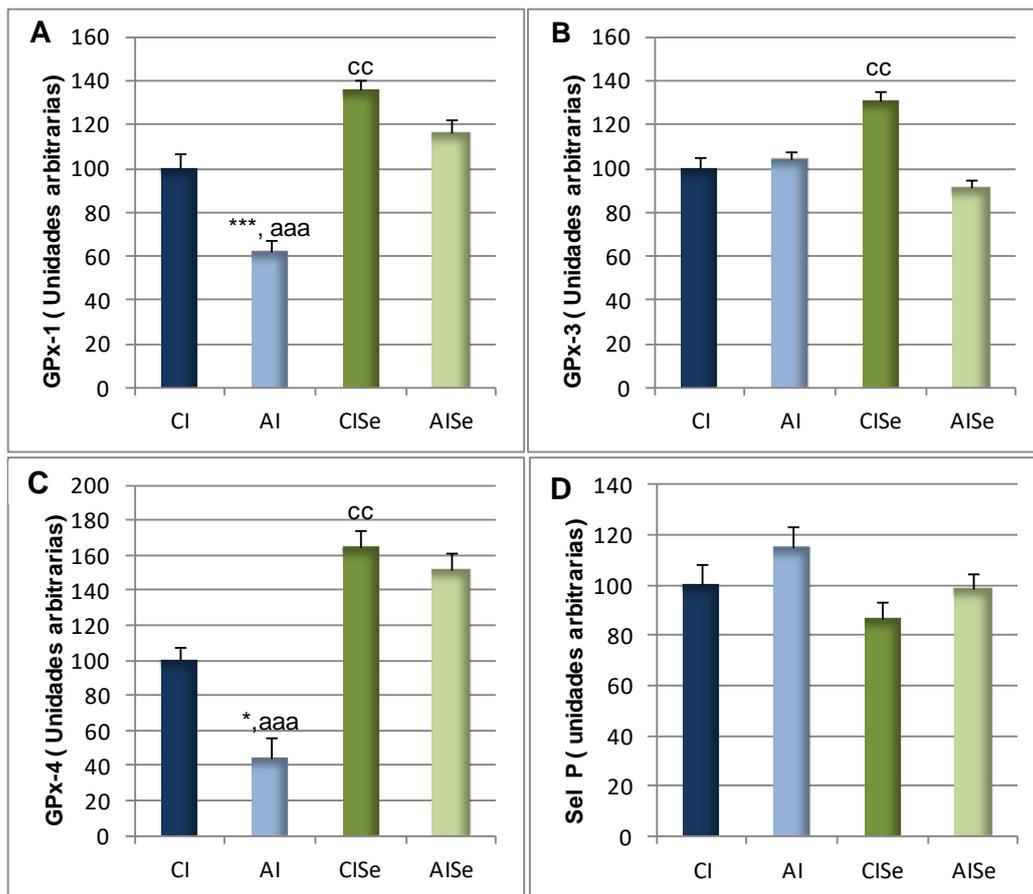
embargo, la GPx-3 y Sel P no aumentaron su expresión. El grupo control suplementado con Se presentó la expresión más alta de GPx-1, GPx-3 y GPx-4, demostrando que la suplementación utilizada es eficaz en el tejido cardíaco pues el Se accede a él sin dificultades.

Estudios previos han demostrado que existe una relación entre la disminución de la actividad GPx y la lesión cardíaca. En este estudio, la menor actividad GPx tras la exposición a BD depende de la GPx-1, pues la expresión de la GPx-3 no se ve afectada, de hecho, la enzima más sensible a los niveles de Se es la GPx-1 (Carreras y cols., 2015) debido a esto, su expresión tiene similitud con los depósitos tisulares de Se, deplecionados en este tejido. Aunque la GPx-3 se sintetiza principalmente en el riñón, también lo hace en el corazón, pulmón, hígado, ojos y tejido adiposo. GPx-3 juega un papel significativo en la protección a los cardiomiocitos del EO generado por la hiperglucemia (Iwata y cols., 2006). De hecho, se ha visto que la GPx-3 es necesaria para que actúe el antioxidante receptor activado por proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ), eficaz en la lucha contra el EO generado por la RI (Chung y cols., 2009). Quizás los niveles de GPx-3 se mantienen elevados en el corazón de las ratas expuestas a BD para defender a los miocitos del EO generado por el aumento de la glucosa encontrado (Tabla 5.1.2). La GPx-3 actúa principalmente en la matriz extracelular de los miocitos y parece jugar un papel muy importante en reducir H₂O₂ extracelular a nivel cardíaco (Hoffmann y cols., 2011).

La menor expresión de la GPx-4 en las ratas expuestas alcohol no es solo consecuencia de la depleción de Se, pues esta selenoproteína presenta una mayor jerarquía respecto a los depósitos de Se, si no consecuencia específica de la función protectora que esta ejerce sobre los fosfolípidos de la membrana celular y de orgánulos celulares contra el EO y, por lo tanto, de la mitocondria (Knopp y cols., 1999), principal orgánulo afectado en el corazón por el BD (Sorbi y cols., 1999). La mitocondria necesita GSH, cuyos transportadores se inhiben por el consumo de alcohol y, esta inhibición es la que se considera responsable de la disminución de GSH mitocondrial y, por lo tanto, de daño mitocondrial (Kanan y cols., 2004). Además, diversos estudios encontraron que la lesión mitocondrial fue el resultado primario de la lesión cardiomiocítica

causada por la disminución del nivel de Se en la sangre y se refleja en el daño de la membrana mitocondrial, en la generación de EROs y en la elevación de la oxidación de lípidos, que finalmente lleva a la apoptosis de los cardiomiocitos (Estevez y cols., 2014).

Figura 5.3.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1 (A), GPx-3 (B), GPx-4 (C) y Sel P (D). Wester blotting representativo de la expresión de estas selenoproteínas.



Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; CI vs CISe: ^{cc} $p < 0.01$; AI vs AISe ^{aaa} $p < 0.001$.

La expresión de Sel P no se ha modificado significativamente en los cuatro grupos experimentales, así el alcohol no parece afectar a la síntesis de esta selenoproteína en el corazón, si bien es importante tener en cuenta que la Sel P, al igual que la GPx-3, son selenoproteínas plasmáticas transportadoras de Se de diferente origen, pues como se ha comentado anteriormente la GPx-3 es sintetizada en riñón y, la Sel P en el hígado mayoritariamente y ambas son liberadas al plasma donde ejercen su actividad antioxidante y podrían también estar llegando a este tejido desde el plasma. Se ha comprobado que la GPx-3 plasmática llega a las membranas basales endoteliales de diferentes tejidos para ejercer allí su acción aunque este efecto no se ha comprobado en el corazón (Burk y cols., 2011).

La suplementación con Se a ratas expuestas a BD, acorde con la repleción de Se encontrada en el tejido cardíaco, aumenta la expresión de la GPx-1 y su actividad intracelular antioxidante, así como la de GPx-4 protegiendo principalmente a la mitocondria, orgánulo principalmente afectado por el consumo de alcohol. Posiblemente estos efectos repercutirán positivamente en el funcionamiento de este tejido tras el consumo agudo de alcohol.

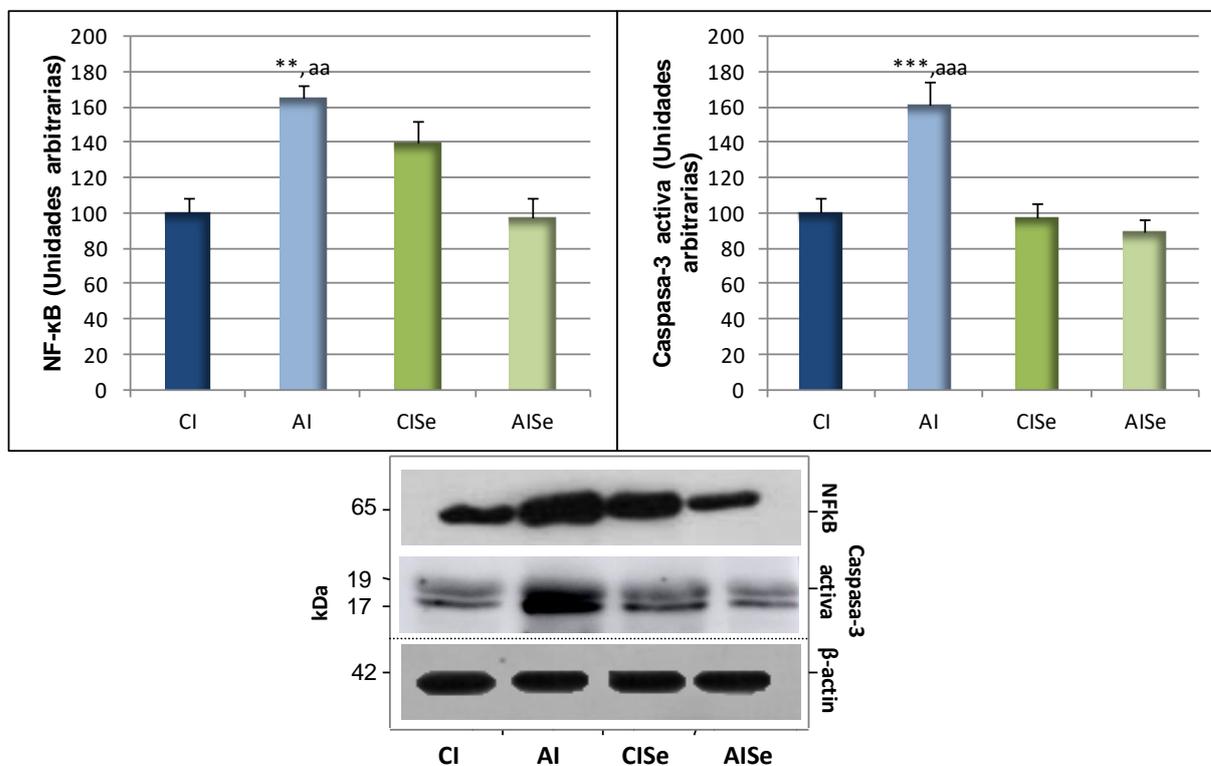
5.3.3. Expresión de NF- κ B p65 y caspasa 3 activada en el corazón

El consumo agudo de alcohol aumenta significativamente la expresión cardíaca de NF- κ B p65 respecto a las ratas controles indicando la activación de este complejo proteico que controla la transcripción del ADN jugando un papel clave en la regulación de la respuesta inmune y en la apoptosis. La suplementación con Se a las ratas expuestas a BD disminuye significativamente la expresión de esta proteína a valores controles.

En el corazón de las ratas que consumen alcohol agudo se observa que existe un proceso inflamatorio deletorio ya que el nivel de NF- κ B se encuentra muy elevado. Algo similar ocurre en el corazón de las ratas con síndrome metabólico e hipertensión (Serrano y cols., 2016). La activación del NF- κ B tras dosis agudas de alcohol, ya ha sido comprobada por Umoh y cols (2014) demostrando que existe un incremento en la activación del factor NF- κ B relacionado con el EO modulado por PI3K/AKT y de la apoptosis,

concretamente encontraron una mayor expresión de la actividad caspasa 3/7 y de la viabilidad celular en el tejido cardiaco.

Figura 5.5.3. Expresión de NF- κ B p65 y caspasa 3 activa en el corazón. Wester blotting representativo de la expresión de estas proteínas.



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; AI vs AISe ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$. Imagen representativa de los resultados de expresión de las proteínas NF- κ B p65 y caspasa-3 activa.

Tras la suplementación los valores de NF- κ B se estabilizan, coincidiendo con un aumento de la expresión de GPx-4, que aumenta la capacidad antioxidante a nivel de los fosfolípidos de membranas y de mitocondrias. Además se ha visto que la GPx-4 influye en las vías de señalización inflamatorias al inhibir la cascada NF- κ B, lo que produce una inhibición de la producción de interleukinas y sus acciones (Forman y cols., 2002). Así, en general la disminución de la expresión de NF- κ B mejora la respuesta cardiaca inflamatoria y el funcionamiento del corazón. Si bien es cierto que no en todos los tejidos existe esta relación inversa entre GPX-4 y NF- κ B (Wullaert y cols., 2007; Greten y cols., 2004; Nomura y cols., 2000).

5.3.4. Funcionalidad cardíaca

Con el fin de valorar si los cambios en el balance oxidativo inflamatorio y apoptóticos encontrados en el corazón tras el BD se relacionan funcionalmente con la regulación de la presión arterial, se analizaron la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC) de los cuatro grupos experimentales al final del tratamiento. La figura 4.4 muestra que el consumo agudo de alcohol tipo BD aumenta significativamente la PAS tanto en el grupo AI como AISe, respecto a sus respectivos grupos controles. Sin embargo, la PAS es significativamente menor en el grupo BD suplementado que en el no suplementado, aunque no la baja a valores controles. Esto indica que la suplementación ofrecida contribuye solo parcialmente a la mejora de este parámetro, y por tanto la menor oxidación lipídica y proteica a nivel cardíaco encontrada tras la suplementación no es la causa principal del incremento de PAS tras el consumo de alcohol.

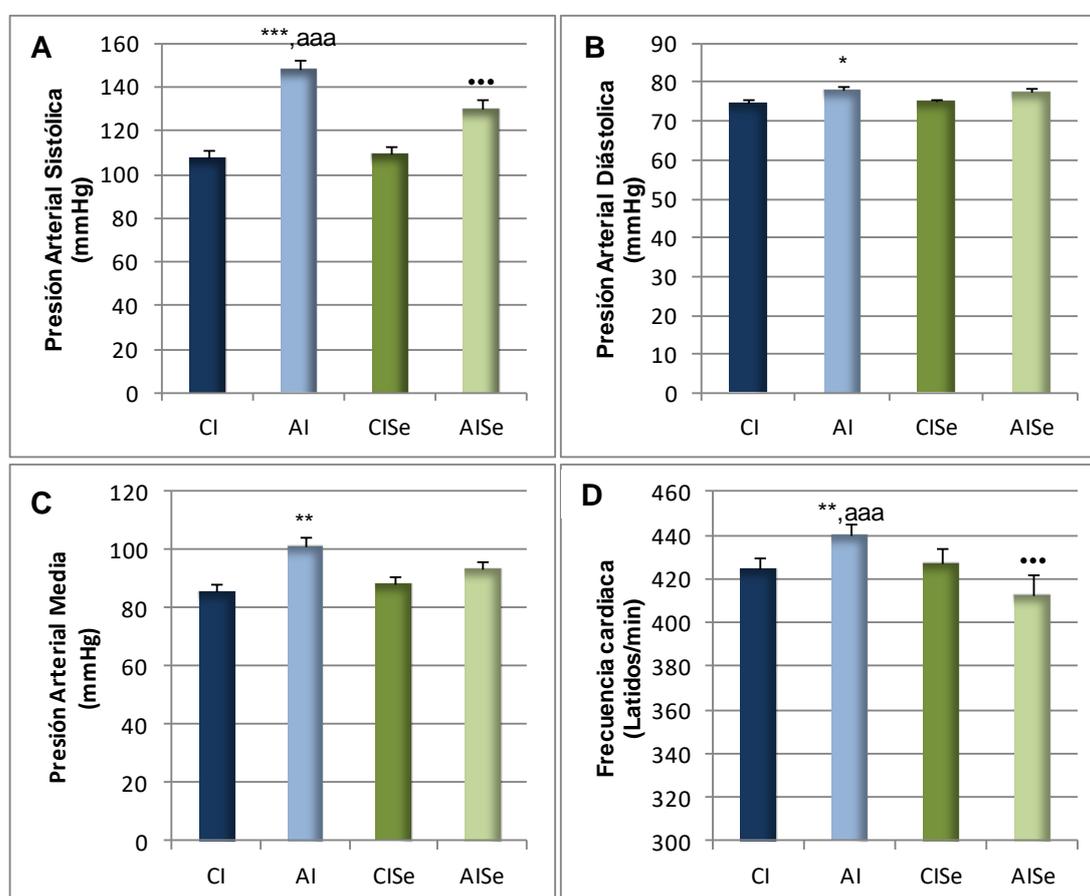
En el caso de la PAD y PAM, el consumo de alcohol en forma de BD provoca un aumento significativo de estos parámetros respecto al grupo control. La suplementación con Se no afectó significativamente a estos parámetros. Por lo que la acción del Se sobre la presión arterial parece estar más relacionada con la PAS que con la PAD, y por lo tanto, con la funcionalidad cardíaca, más que con la resistencia periférica.

Al analizar la FC observamos que el grupo AI presenta un aumento significativo de este parámetro respecto al grupo control, y en esta ocasión la suplementación con Se sí produce un significativo descenso de los latidos por minuto, incluso menores que los obtenidos en el grupo CSe, mostrando que el Se actuaría como un mecanismo compensatorio para disminuir la PAS, pues la PAS es el producto de volumen sistólico, FC y resistencia periférica total.

Estudios previos demuestran que los efectos agudos del alcohol provocan debilitamiento de la capacidad del corazón para contraerse, es decir, efecto inotrópico negativo (Danziger y cols., 1991; Guarnieri y Lakatta 1990) y una disminución del volumen sistólico (Umoh y cols., 2014). Estos efectos también pueden implicar una FC irregular, a veces muy rápida, produciendo arritmia para compensar el menor volumen sistólico, durante la cual las aurículas se

contraen caóticamente fuera de la coordinación con sus ventrículos, conocidas como fibrilación auricular o, rara vez, muerte súbita cardíaca. Además, las anomalías en la repolarización miocárdica y en la prolongación de la duración del potencial de acción son causas importantes para el desarrollo de las arritmias, en la que las corrientes de K^+ mediadas por el canal de K^+ desempeñan un papel importante (Zhang y cols., 2017), hecho que coincide con nuestros datos pues las ratas expuestas a BD presentan niveles de K^+ disminuidos (Tabla 5.6.4) confirmando que las ratas expuestas a BD pueden sufrir arritmias y presentar una mayor FC.

Figura 5.3.4. Presión arterial sistólica (A), diastólica (B) y media (C) y frecuencia cardíaca (D).



Los resultados obtenidos se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; AI vs AISe: ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$; CISe vs AISe: *** $p < 0.001$.

La suplementación con Se disminuye la FC muy significativamente, así se podría relacionar la depleción de este nutriente con la desregulación de la FC y

la PAS. Esta acción del Se a nivel cardíaco no es nueva, pues se sabe que sus niveles normales son importantes para un buen funcionamiento cardíaco, ya que favorece el estatus antioxidante, disminuye la apoptosis, regula la expresión del factor NF- κ B asociados a la supervivencia de los cardiomiocitos, es esencial para el correcto funcionamiento sistólico y actúa regulando los efectos de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa (Chen y cols., 2012; Tanguy y cols., 2012).

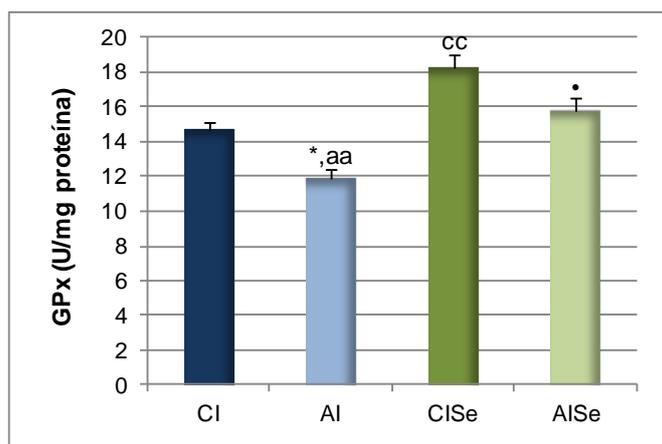
En este punto, futuros estudios funcionales a nivel renal nos darán más información causal de los cambios en la PAS y PAD, pues este órgano está relacionado con la diuresis y la volemia y a través del SRAA con la resistencia periférica total (Pletcher y cols., 2005). Por otro lado, el BD afecta al funcionamiento vascular por diversos mecanismos, como se explicó ampliamente en la introducción (Apartado 2.2.3.2) pero además, en concreto encontraron que el consumo excesivo de alcohol en adultos jóvenes, con una edad media de 25.2 años, se asocia significativamente con una mayor calcificación coronaria, lo que sugiere la presencia de una posible aterosclerosis coronaria, aumentando, en consecuencia, la resistencia periférica total. Así habría que valorar otros marcadores vasculares.

5.4. ESTUDIOS VASCULARES

Con el fin de analizar la funcionalidad de los vasos sanguíneos tras la exposición repetida a BD, se estudió el balance oxidativo en suero, pues el EO es una de las causas más importantes de disfunción endotelial y cambios en la resistencia periférica total, y por tanto de la PAM (Liu y cols., 2017).

Este estudio se centra en la actividad de la selenoproteína GPx y los productos de oxidación de lípidos y proteínas. El BD produce una disminución de la actividad GPx en suero (Figura 5.4.1.1) relacionado con los menores niveles de Se en este líquido respecto a las ratas control y con la existencia de oxidación lipídica en suero. La suplementación recupera la actividad de esta enzima antioxidante proporcionalmente a los niveles de Se sérico que también estaban aumentados y disminuye sólo parcialmente la oxidación de proteínas (Figura 5.4.1.2). La actividad GPx medida, se corresponde con la actividad de la GPx-3.

Figura 5.4.1.1. Actividad de GPx en suero.



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$; AI vs AISe: ^{aa} $p < 0.01$; CI vs CISe: ^{cc} $p < 0.01$; CISe vs AISe: ^ˆ $p < 0.05$.

En trabajos previos se ha demostrado que la otra selenoproteína principal transportadora de Se en suero (Sel P), sintetizada principalmente en hígado, no se ve afectada por el BD repetido (Ojeda y cols., 2017b), así que en este modelo experimental, la disminución de Se sérico afecta principalmente a la síntesis y actividad de la GPx-3. Esto es importante pues clínicamente se ha comprobado que niveles bajos de la actividad de GPx-3 y HDLc en suero son marcadores de riesgo de mortalidad en pacientes con problemas vasculares (Buijsse y cols., 2012). Así el Se parece disminuir en parte el riesgo cardiovascular asociado a EO sistémico y posible disfunción vascular.

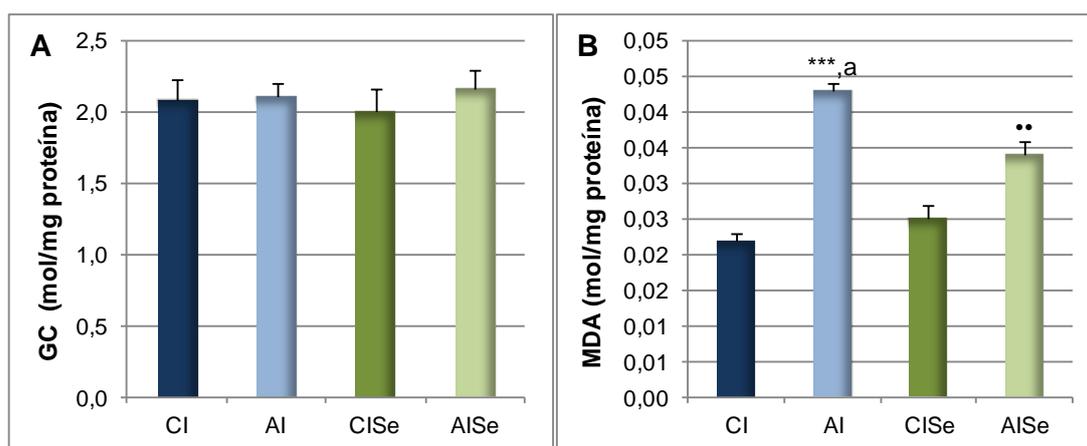
5.4.1. Balance oxidativo en suero

El consumo agudo de alcohol provocó un incremento significativo de la peroxidación lipídica en suero, aunque no afectó a las proteínas. La suplementación con Se disminuyó en parte esta peroxidación, pero no completamente a diferencia de lo que pasaba en el corazón.

El consumo agudo de alcohol aumenta el EO sérico, dando lugar a disfunción endotelial e hipertensión. Nuestros datos coinciden con otra investigación en la cual encontraron un aumento de la presión arterial y disfunción en los vasos sanguíneos por distintos mecanismo como por el aumento de los niveles plasmáticos de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Yogi y cols., 2012). La suplementación con Se disminuye

parcialmente la peroxidación lipídica, y por tanto, sólo en parte mejora la disfunción endotelial, por eso, quizás, la RPT no se recupera totalmente y no actúa sobre PAD. Por todo esto, el mecanismo de acción principal sigue siendo a nivel cardiaco. Si bien es cierto que el Se previene la aterosclerosis por diversos mecanismos (Figura 2.3.2.2). Para comprobar este hecho analizaremos a continuación otros marcadores vasculares.

Figura 5.4.1.2. Niveles de los productos de la oxidación de las biomoléculas, GC y MDA en suero.



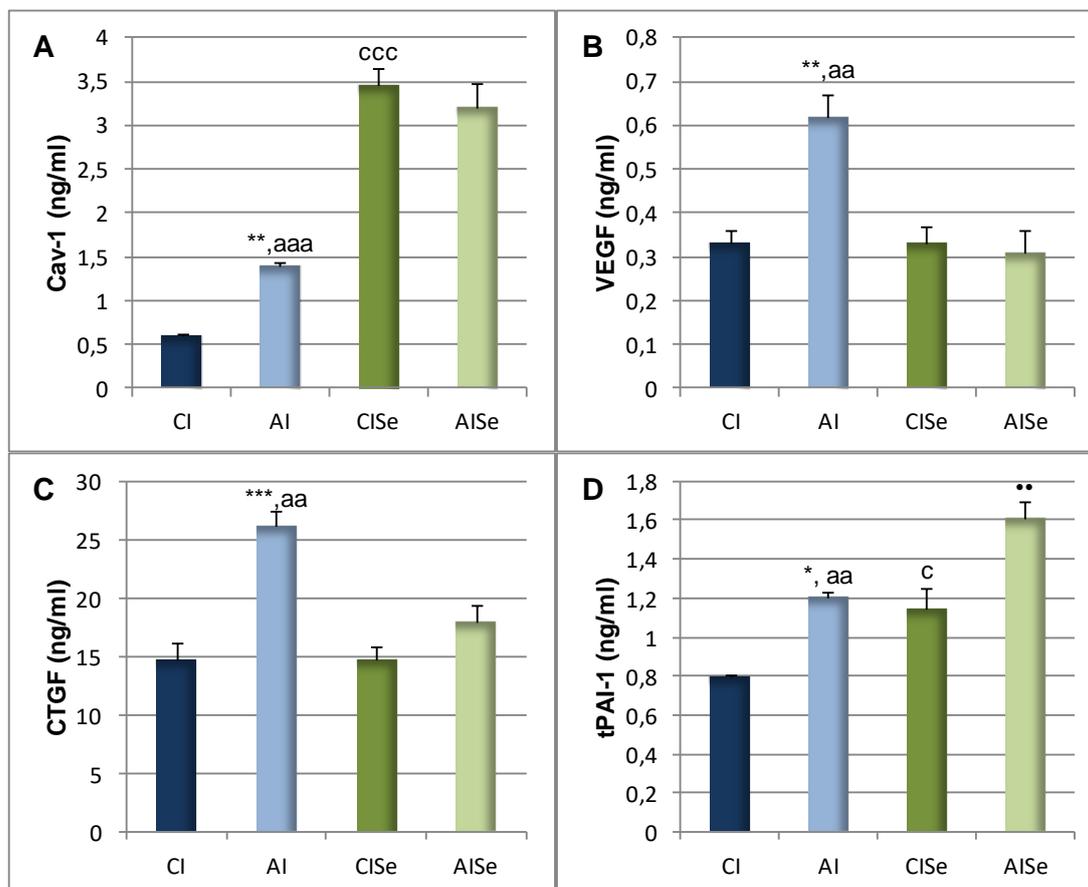
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: *** $p < 0.001$; AI vs AISe: ^a $p < 0.05$; CISe vs AISe: ^{**} $p < 0.01$.

5.4.2. Marcadores vasculares

Siguiendo en el estudio de la disfunción endotelial, este trabajo se centra en analizar cuatro marcadores vasculares como son la caveolina-1 (cav-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (tPAI-1).

El BD repetido en ratas adolescentes aumentó significativamente los cuatro marcadores estudiados respecto al grupo control, en especial el CTGF. La suplementación con Se disminuye significativamente los valores de VEGF y CTGF a niveles controles, y aumentan aún más los de cav-1 y tPAI-1, que también fueron más elevados en el grupo CISe respecto al grupo CI, demostrando que estos dos parámetros están incrementados por la exposición a Se, y que la suplementación de Se es eficaz disminuyendo CTGF y VEGF marcadores de angiogénesis, fibrosis, infiltración y aterosclerosis.

Figura 5.4.2. Niveles de los marcadores vasculares Cav-1 (A), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (B), Factor de crecimiento tejido conectivo (CTGF) (C), inhibidor del activador del plasminógeno (tPAI-1) (D).



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; AI vs AISe: ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$; CI vs CISe: ^c $p < 0.05$, ^{ccc} $p < 0.001$; CISe vs AISe: ^{''} $p < 0.001$.

La cav-1 es una proteína necesaria para la formación de caveolas, que son un tipo especial de balsa lipídica, con funciones en la transducción de señales, en la endocitosis, oncogénesis, y la captura de determinadas bacterias patógenas y virus. La cav-1 es predominante en el sistema cardiovascular, en concreto se expresa en las células endoteliales, siendo allí un factor clave para la regulación de la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial y, por tanto, de los niveles del vasodilatador óxido nítrico, así como de calcio, y de crecimiento vascular. Sus niveles están inversamente relacionados con el VEGF, y mejora los niveles de NO endotelial, por ello su aumento se considera beneficioso (Wang y Abdel-Rahman, 2005). Sin embargo, en este estudio los valores de cav-1 no son inversamente proporcionales a los VEGF en el grupo

AI. Por ello, también hay que tener en cuenta que la cav-1 está relacionada con el tráfico de colesterol y cambios metabólicos como RI e hipertrigliceridemia, alteraciones que aparecen en el grupo AI y AISe (Tabla 5.1.2) (Williams y Lisanti, 2004; Ju y cols., 1997; Murata y cols., 1995). Gao y cols. (2014) observaron el aumento de los niveles de cav-1 en hígado y suero tras el BD, coincidiendo con nuestros datos (Figura 5.4.2).

Por otro lado, el Se es un nutriente relacionado con la RI y cambios metabólicos lipídicos intensos, es por ello que tanto el grupo CISe como AISe presentan mayores niveles de cav-1 que sus respectivos no suplementados.

El VEGF y CTGF, son proteínas señalizadoras implicadas en la angiogénesis. Pero guardan pequeñas diferencias ya que las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares, por ejemplo, estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular. El CTGF es una proteína que también está implicada en la adhesión celular, migración, proliferación, reparación tisular, y está especialmente implicada en cánceres de tejido conectivos y en la fibrosis que aparece en el fallo cardiaco (Loubotin y cols., 2012; Panek y cols., 2009; Ohnishi y cols., 1998). Por todo ellos sus aumentos están relacionados con disfunción endotelial y problemas en la regulación de la presión arterial. En este caso el Se parece jugar un papel protector frente a la disfunción endotelial y la regulación de la presión arterial, pues claramente los disminuye.

El tPAI-1 es una proteína de fase aguda que, normalmente, se expresa en los adipocitos y en las células endoteliales, sin embargo, parece tener una fuerte presencia en casi todas las células como respuesta al estrés. Es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la uroquinasa (uPA), ambos activadores del plasminógeno, jugando un papel crucial en el metabolismo de la fibrina, al inhibir la fibrinólisis (Shukla y cols., 2013; Massey y Arteel, 2012). La angiotensina II estimulada por el consumo agudo de alcohol aumenta la síntesis de tPAI-1 por lo que acelera el desarrollo de aterosclerosis. La activación del tPAI-1 detectada en las ratas expuestas a

BD también puede ser considerada un mecanismo potencial de daño hepático. Así, estudios recientes sugieren que el PAI-1 puede contribuir al desarrollo de diversas fases de la enfermedad hepática alcohólica (esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis) ya que interfiere en la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad, favoreciendo el estado de esteatosis (Liv y cols., 2015). Es por ello, que el aumento de tPAI-1 y la mayor grasa visceral que presentan las ratas expuestas alcohol nos puede indicar que estos animales presenten daño hepático, además de disfunción endotelial. El Se aumenta los niveles de tPAI-1 en suero, tanto en las ratas controles como las expuestas a BD, demostrando que este nutriente incrementa por algún mecanismo los niveles séricos de tPAI-1, probablemente relacionado con el desbalance del metabolismo lipídico con el que está relacionado este nutriente tanto como por exceso como por defecto.

5.6. ESTUDIOS EN EL RIÑÓN

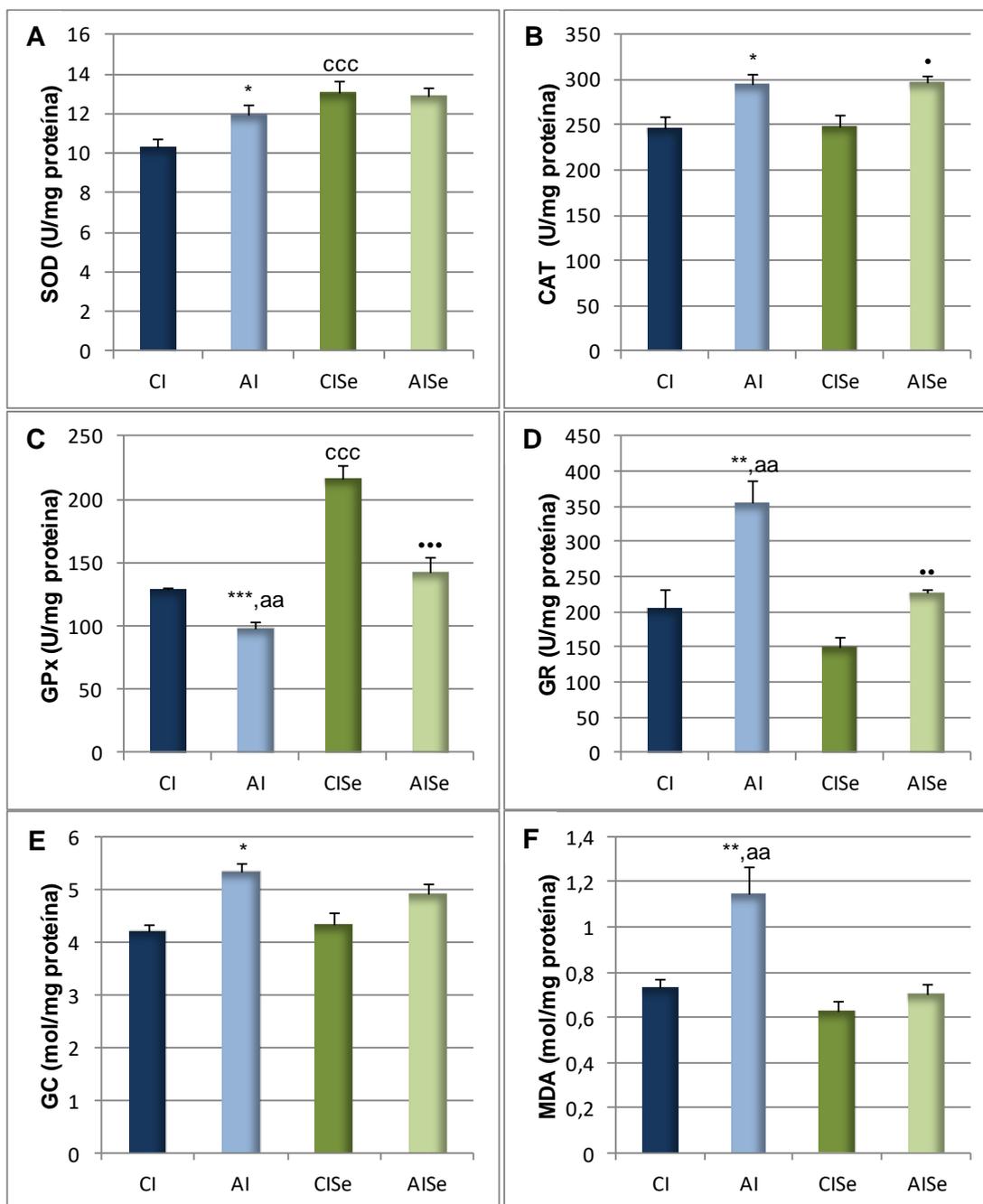
5.6.1. Balance oxidativo

La actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón muestran (Figura 5.6.1.1), que el consumo de alcohol aumenta significativamente la actividad de la SOD, CAT y GR. Sin embargo, disminuye muy significativamente la actividad de la GPx, lo que conlleva a peroxidación lipídica y oxidación de las proteínas renales. La suplementación con Se a ratas expuestas a BD, actuó aumentando la actividad GPx y disminuyendo la GR, acompasando a este par enzimático, que resultó ser eficaz disminuyendo la oxidación lipídica, no así la proteica.

Estos resultados indican que hay un aumento de la generación de hidroperóxidos causados por la actividad de la SOD tras la exposición repetida a BD y, este exceso de EROs se intenta neutralizar por el aumento de la actividad de CAT tanto en la suplementadas como en las que no. La diferencia entre ambos grupos radica en que el consumo agudo de alcohol disminuye la actividad de la GPx respecto al grupo control, aunque aumenta la actividad GR para intentar compensarlo, siendo ineficaz pues aparece oxidación de lípidos y proteínas renales. Sin embargo la suplementación, de acuerdo con los depósitos renales de Se incrementa la actividad de la GPx, y evita la oxidación de lípidos, demostrando que la suplementación elegida es altamente eficaz en

el modelo de BD repetido, que parece consumir al igual que en el corazón la actividad de la GPx específicamente.

Figura 5.6.1.1. Actividad de SOD (A), CAT (B), GPx (C), GR (D), niveles de GC (E) y niveles de MDA (F) en el riñón.



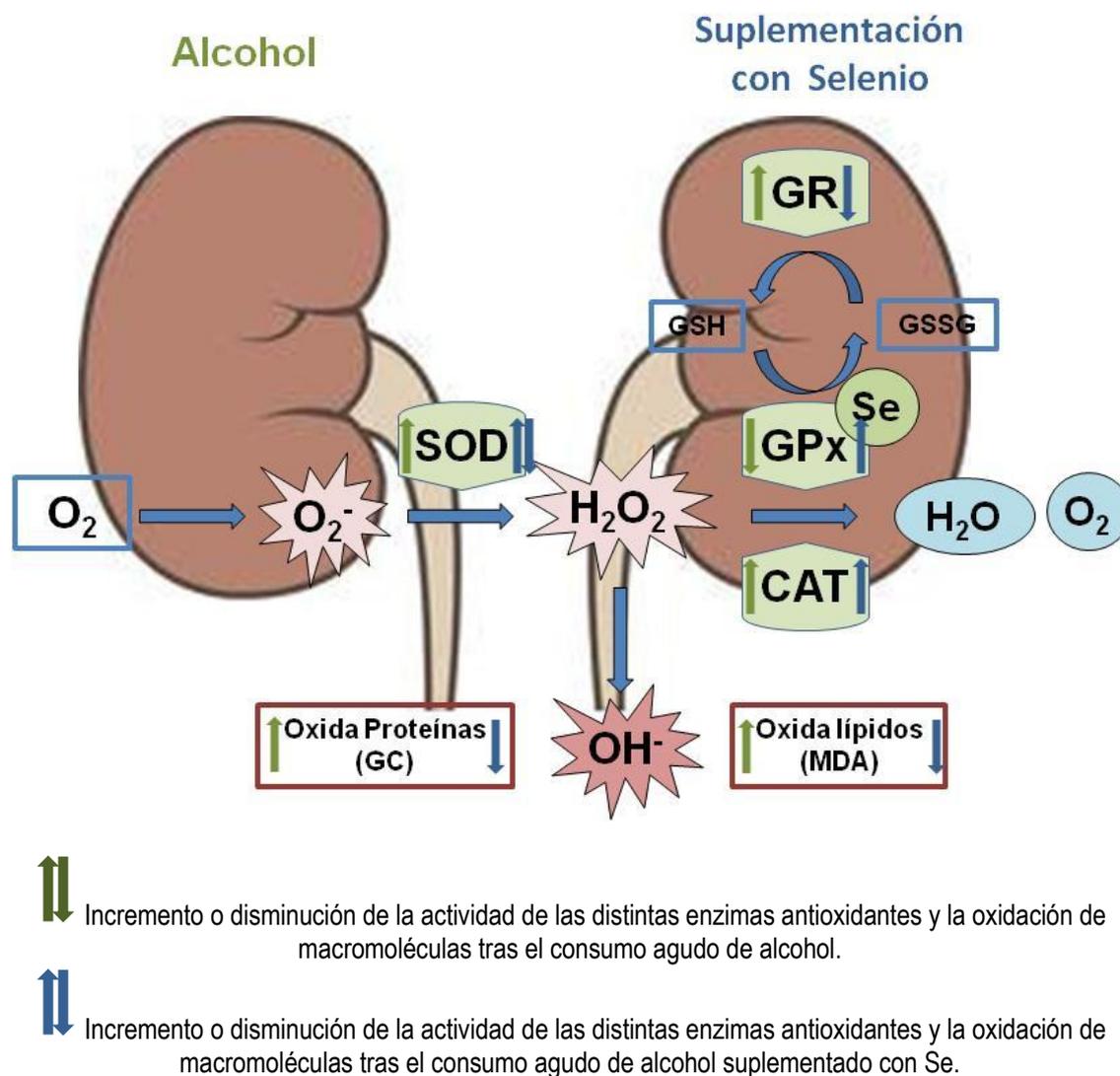
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; CI vs CISe: ^{ccc} $p < 0.001$; AI vs AISe ^{aa} $p < 0.01$; CISe vs AISe: ^{***} $p < 0.001$.

Así, dado que en el riñón el resto de las actividades enzimáticas antioxidantes se incrementaron, el Se y la GPx parecen jugar un importante

papel antioxidante después de la exposición a BD. Esta alteración exclusiva de GPx no se observa en otras alteraciones renales relacionadas con el EO como la insuficiencia renal, donde la CAT (Sindhu y cols., 2005) y las actividades SOD disminuyeron (Vaziri y cols., 2003) y la actividad de GPx permaneció inalterada. Es más, en otros tejidos como el corazón y el hígado sucede algo parecido. Se sabe que el BD intermitente durante la adolescencia redujo específicamente los niveles hepáticos de GSH, que es necesario para una función correcta de GPx (Ojeda y cols., 2015). Además, cuando se mide las actividades enzimáticas antioxidantes hepáticas solo se disminuye la actividad de GPx proporcionalmente a la depleción hepática de Se encontrada (Nogales y cols., 2014).

En esta investigación, la actividad de la enzima antioxidante GR renal se encuentra muy aumentada en ratas alcoholes, lo cual implica un aumento en la generación de GSH, sin embargo la GPx está significativamente disminuida, apuntando a la depleción de Se como un factor clave en la desregulación de la actividad GPx y el equilibrio oxidativo. Además, tras la suplementación con Se a las ratas alcoholes, aumentaron los niveles séricos (Figura 5.4.1.1 y 5.4.1.2) y los depósitos renales (figura 6.2) y cardiacos (Figura 5.6.2) y, por lo tanto, las actividades GPx en estos órganos (figura 5.4.1.1, 5.3.1.1C y 5.6.1.1C), evitando totalmente la oxidación de lípidos en el riñón y corazón, la peroxidación lipídica parcialmente en suero además de evitar, en parte, la oxidación de proteínas en el tejido cardiaco. Mostrando que, la homeostasis de Se es realmente importante para luchar contra el EO generado por la exposición BD, especialmente en el riñón y más aún en el corazón.

Figura 5.6.1.2. Representación esquemática de los eventos ocurridos en los sistemas de defensa antioxidante en el riñón en respuesta al consumo agudo de alcohol y al suplemento con Se.



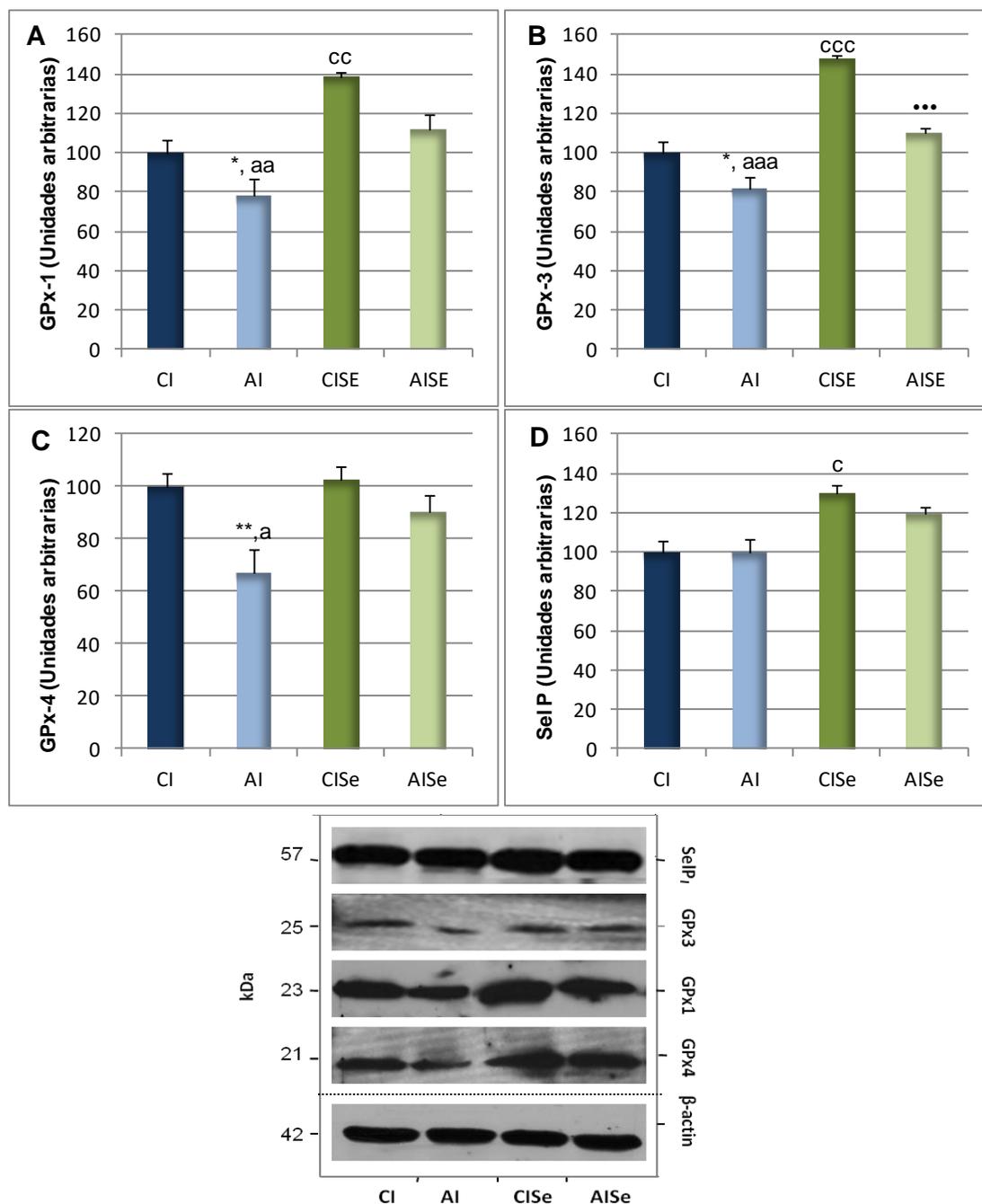
5.6.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx1, GPx3, GPx4 y Sel P en el riñón

Tras comprobar que el BD repetido compromete muy significativamente la actividad de la enzima GPx renal. A continuación se procedió a determinar la expresión de las isoenzimas GPx-1, GPx-3, GPx-4 y la Sel P, puesto que la expresión y síntesis de estas selenoproteínas son dependientes del estado de Se, de manera que se produce una competición por este nutriente cuando éste empieza a ser limitante. Así, se ha estudiado como el consumo agudo de alcohol tipo BD al deplecionar los niveles de Se renales, puede afectar la expresión renal de estas selenoproteínas con funciones antioxidantes distintas de diferente manera.

Como se puede observar en la figura 5.6.2, la expresión de la GPx-1 es significativamente menor en el grupo alcohol respecto al grupo control, coincidiendo con la disminución de la actividad GPx y los niveles de Se en el riñón. Sin embargo, cuando los grupos experimentales están suplementados con Se, aumentan significativamente su expresión respecto a los grupos no suplementados. En general, la actividad de la enzima GPx medida por la técnica empleada mide actividad GPx-1 y GPx-3, en este estudio está en parte directamente relacionada con la expresión de la GPx-1, siendo esta isoenzima una de las más sensibles a los cambios de Se, presentando una rápida disminución en su actividad enzimática y en sus niveles de expresión en los animales con deficiencia de este nutriente puesto que es la última en la jerarquía (Brigelius-Flohé y Flohé, 2016; Burk y Hill, 2015). Este hecho se vuelve a confirmar con la suplementación puesto que se reestablece la actividad y expresión de GPx-1 en los animales que están suplementados con Se, y se mejora la acción antioxidante a nivel intracelular.

Así que, a pesar del hecho de que las ratas BD ingieren la misma cantidad de Se que las controles y hacen un esfuerzo por reabsorber Se de la orina disminuyendo su aclaramiento (CL), los valores séricos de Se y los depósitos renales y cardíacos se redujeron significativamente. Confirmando el hecho de que la exposición repetida al alcohol agudo reduce drásticamente la biodisponibilidad de Se. Este hecho podría deberse al consumo corporal de este elemento para sintetizar la selenoproteína GPx para combatir el EO agudo generado por esta droga. Lo que está en consonancia con la menor actividad de GPx y la mayor peroxidación en el suero, riñón y corazón de los animales de los animales que consumen alcohol, y su menor expresión renal de GPx-1, GPx-3 y GPx-4 y cardíaca de GPx-1 y GPx-4.

Figura 5.6.2. Expresión de las enzimas antioxidantes GPx-1 (A), GPx-3 (B), GPx-4 (C) y Sel P (D). Western Blotting representativo de la expresión de estas selenoproteínas.



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$; CI vs CISE: ^{cc} $p < 0.01$, ^{ccc} $p < 0.001$; AI vs AISE ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$.

Tal y como se puede ver en la figura 5.6.2, la expresión de la selenoproteína GPx-3 también se encuentra disminuida significativamente en el grupo expuesto alcohol respecto al grupo control. La suplementación con Se aumenta muy significativamente la expresión de esta isoforma en el grupo

control y en el alcohol. No en vano, la GPx-3 también denominada GPx plasmática, es sintetizada en el riñón principalmente y rápidamente liberada al plasma donde actúa como scavenger, neutralizando las EROs en el espacio extracelular (Rose y Hoffman, 2015; Burk y cols., 2011; Olson y cols., 2010; Whittin y cols., 2002). Sin embargo, parte de la GPx-3 en el riñón también actúa en este tejido (Olson y cols., 2010) principalmente, en la matriz extracelular de los túbulos de la nefrona. A igual que ocurre con la GPx-1, la expresión de esta selenoproteína se afecta rápidamente con la disminución de los niveles de Se. Por lo tanto, tras la suplementación se reestablece su expresión. El 10% de Se en plasma es transportado por esta selenoproteína y su acción en este líquido corporal es muy relevante en la protección contra el daño oxidativo (Payne y Southern, 2005), así la suplementación incrementa la actividad GPx-3 en riñón y en suero. En este punto, recordar que este trabajo mide en suero la actividad de GPx-3 y la actividad de GPx renal medida corresponde con la expresión de la GPx-3 y GPx-1. En este estudio ambas expresiones se encuentran disminuidas y tras la suplementación con Se se reestablecen la actividad GPx y la expresión de ambas selenoproteínas en la misma proporción (GPx-1 y GPx-3).

En la figura 5.6.2 se muestra que la expresión de GPx-4 también está disminuida significativamente en el grupo alcohol. La suplementación con Se aumenta significativamente y parcialmente su expresión en el grupo expuesto a alcohol, pero no en el control. Se sabe que al contrario de otras selenoproteínas, la GPx-4 no se ve inmediatamente afectada por los depósitos de Se (Burnes y cols., 2015). Así tras el consumo de alcohol debe haber algún mecanismo más además de la depleción de Se que disminuye su expresión, probablemente sea su relación con la protección de las membranas celulares del EO y las mitocondrias (Knopp y cols., 1999) orgánulos especialmente afectados por el BD. Estudios previos con ratones transgénicos han demostrado que la GPx-4 inhibe el EO, el cual induce la liberación de citocromo c de la mitocondria dando lugar a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Liang y cols., 2007). La suplementación con Se en este estudio aumenta la expresión de esta selenoproteína, lo que puede repercutir positivamente sobre el EO mitocondrial y la apoptosis de las células renales.

Además, parece ser que existe una relación entre GPx-4 y NF- κ B en diferentes cultivos celulares (Banning y cols., 2004; Wenk y cols., 2004; Toborek y cols., 2002; Brigelius-Flooe y cols., 1997), y que esta selenoproteína pueda modular también el estado inflamatorio del tejido. Por ello, posteriormente analizaremos la activación del NF- κ B en este tejido.

Por último también se ha medido la expresión de la Sel P, donde no se han encontrado diferencia significativa entre el grupo experimental alcohol y el grupo control, pero si de este con el grupo control suplementado, aumentando la expresión de esta selenoproteína en el grupo suplementado control. Por lo tanto, parece que el consumo de alcohol no afecta a la expresión de Sel P en este tejido (Burk y cols., 2011).

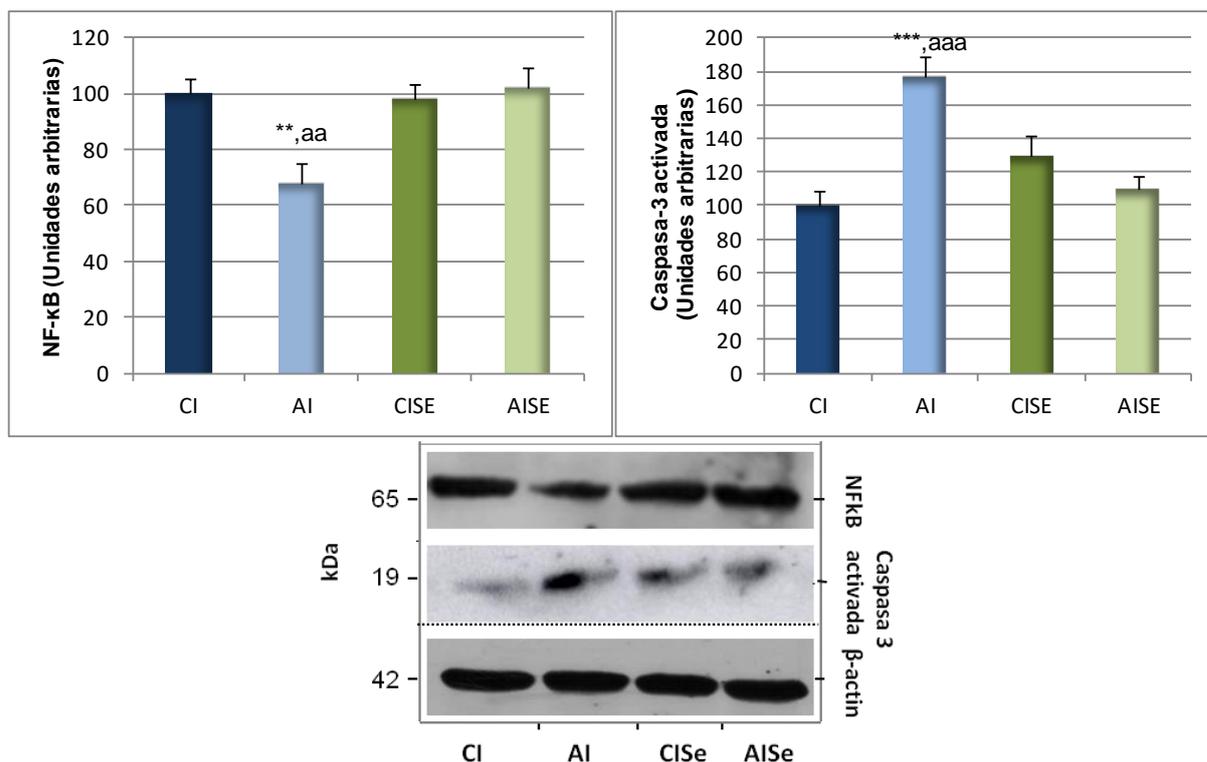
5.6.3. Expresión de NF- κ B p65 y caspasa-3 activada en el riñón

El consumo agudo de alcohol disminuye significativamente la expresión renal de NF- κ B respecto al grupo control y el grupo alcohol suplementado con Se, así la suplementación restablece la expresión de NF- κ B a niveles controles.

Además de su papel clave en la regulación de la inflamación, el NF- κ B juega un papel crucial en la decisión entre la vida y la muerte de las células. La activación de NF- κ B ejerce un efecto antiapoptótico por el cual protege las células contra la apoptosis durante la lesión del tejido, sin embargo, cuando se reduce, la apoptosis se activa (Wullaert y cols., 2007). En el hígado de ratas adolescentes se ha observado que la exposición intermitente de BD regula negativamente la expresión GPx4 y activación de NF- κ B y aumenta la expresión y activación de la caspasa-3 y la apoptosis (Ojeda y cols., 2017b), favoreciendo la muerte de los hepatocitos. La disminución de la activación del NF- κ B coincide con la mayor susceptibilidad en sufrir infecciones que tienen los consumidores de alcohol en forma de BD (Rua y cols., 2013).

Al igual que ocurre en el hígado, en el riñón las expresiones GPx4 y NF- κ B disminuyen y la activación de caspasa-3 aumenta en los riñones de ratas adolescentes expuestas a BD, estando en estos dos tejidos presentes las mismas vías oxidativas del metabolismo del etanol, ADH y SMOE principalmente, que generan gran cantidad de EROs.

Figura 5.6.3. Expresión de NF- κ B p65 y caspasa-3 activa. Wester blotting representativo de la expresión de estas proteínas.



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; AI vs AISE ^{aaa} $p < 0.001$; ^{aa} $p < 0.01$. Imagen representativa de los resultados de expresión de las proteínas NF- κ B p65 y caspasa-3 activa.

Existen pocos estudios que analicen los efectos inflamatorios y apoptóticos en el riñón después de la exposición alcohol. Lu y cols., 2015 encontraron en cultivos de podocitos "in vitro" que la exposición aguda alcohol solo generaba EO en estas células renales si el aumento de H_2O_2 era realmente alto porque los podocitos tienen un sistema antioxidante muy eficaz contra estas EROs. Además, encontraron que en estas células el etanol induce la apoptosis a través del influjo de Ca^{2+} hacia el potencial transitorio del canal canónico 6 (TRPC6) que afecta a las mitocondrias y la vía apoptótica intrínseca a través de la caspasa 9 (Huang y cols., 2017). Por el contrario, parece que el alcohol crónico induce daño renal oxidativo principalmente en células epiteliales tubulares (Latchoumycandane y cols., 2014). Latchoumycandane y cols., 2015 también encontraron que la ingesta crónica de etanol en ratas aumenta la apoptosis principalmente en las células epiteliales tubulares, especialmente en la pared tubular distal relacionada con el EO y la actividad de caspasa-3.

Probablemente por la vía intrínseca de la apoptosis que se relaciona con la liberación de citocromo.c en el citosol por la oxidación mitocondrial. Sin embargo, hasta ahora se sabe poco sobre la exposición a BD, la inflamación del riñón o la expresión de NF-kB.

Por otro lado, en el corazón, como hemos analizado anteriormente, no ocurre lo mismo que en el riñón y el hígado, puesto que las expresiones de GPx4 y NF-kB son inversamente proporcionales en el grupo de ratas expuestas BD, disminuyendo la expresión de la primera y aumentando la de la segunda coincidiendo con la mayor expresión de caspasa-3. Este hecho puede deberse al metabolismo oxidativo del alcohol que es distinto en este tejido, puesto que en el corazón los niveles de CAT están aumentados debido a que es una de las principales enzimas implicada en su metabolismo. Por otro lado, el metabolismo no oxidativo de etanol de este tejido, juega un papel importante en la lucha contra el alcohol, y se sabe también que produce un aumento de las expresiones de NF-kB y caspasa-3 debido a que el alcohol induce el aumento de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos dando lugar a un aumento de EEFA que afectan directamente a la capacidad oxidativa de la mitocondria (Orellana y cols., 1998) dando lugar a apoptosis en las células cardíacas.

La suplementación de Se a las ratas BD aumentó la expresión renal de NF-kB p65, que alcanza valores similares a los controles que además conducen a un equilibrio de apoptosis. Estos resultados coinciden con una mayor expresión GPx-4 que podría estar disminuyendo el EO en las mitocondrias renales, favoreciendo su supervivencia y disminuyendo los niveles de citocromo c liberado por las mitocondrias al citosol y, por lo tanto, evitando la apoptosis. Se encontraron resultados similares en tejidos hepáticos de ratas expuestas a BD suplementadas con Se (Ojeda y cols., 2017).

5.6.4. Valoración de la función renal

Para conocer la funcionalidad del riñón tras el consumo agudo de alcohol, se ha procedido a la determinación de la concentración de creatinina, de los iones Na⁺ y K⁺ y de urea en suero y orina, además, de la concentración de albumina en orina (Tabla 5.6.4) para calcular posteriormente el CL de

creatinina y así conocer la TFG y el CL relativo de Na^+ , K^+ , urea y Se, con el fin de valorar si existe secreción o reabsorción renal de dichas sustancias.

En suero, el parámetro más afectado tras el BD fue la concentración de Na^+ , siendo significativamente mayor en los grupos expuestos alcohol respecto a sus respectivos controles. Sin embargo, la suplementación con Se a las ratas que consumen alcohol disminuye significativa y parcialmente este valor.

La concentración de Na^+ está muy relacionada con la de K^+ de modo inverso especialmente por el SRAA, así la concentración de K^+ en el grupo AI fue significativamente menor que el grupo CI, en este caso las ratas AISe mostraron valores superiores pero no significativos, aunque tampoco lo fueron con sus respectivos controles.

En orina se midieron los mismos valores y, además, la albumina. La creatinina, Na^+ , K^+ y albúmina no presentaron diferencias significativas entre los cuatros grupos experimentales. Sin embargo, la urea en orina fue significativamente mayor en el grupo alcohol respecto al grupo alcohol selenio, pudiendo indicar que la urea se excreta en mayor medida en los animales que han consumido alcohol y tras la suplementación con Se esta eliminación se reduce en gran medida. Sin embargo, la concentración de sustancias en orina no es un buen parámetro para determinar lo sucedido, pues depende en gran medida de la diuresis de cada grupo experimental. Por ello se analizó la ratio entre CL de la sustancia y CL creatinina o CL relativo, y se encontró que tras el consumo de alcohol agudo tipo BD en cL relativo de Na^+ estaba disminuido muy significativamente en los grupos AI y AISe respecto a sus controles (CI y CISe), indicando que se reabsorbe a nivel renal gran cantidad este ión hacia sangre, lo que coincide con la hipernatremia encontrada en estos grupos, y que parece deberse a la acción del SRAA, especialmente de la aldosterona.

Tabla 5.6.4. Valores de creatinina, Na⁺, K⁺, urea en suero y en orina y, albumina en orina y aclaramientos.

		CI	AI	CISe	AISe
SUERO	Creatinina (mg/dl)	0.25 ± 0.015	0.26 ± 0.005	0.22 ± 0.015	0.28 ± 0.020
	Na ⁺ (mmol/l)	139.25 ± 1.32	150.5 ± 1.02 ***,a	138 ± 1	146.8 ± 1.08 ***
	K ⁺ (mmol/l)	6.37 ± 0.14	5.53 ± 0.23 *	6.25 ± 0.18	5.75 ± 0.09
	Urea (mg/dl)	41.17 ± 1.18	36.77 ± 1.76	38.17 ± 0.90	34.52 ± 1.65
ORINA	Creatinina (mg/dl)	15.09 ± 1.29	18.39 ± 1.75	13.34 ± 0.73	15 ± 1.31
	Na ⁺ (mmol/l)	26.83 ± 1.30	17.75 ± 2.8	25.5 ± 1.24	18.75 ± 1.28
	K ⁺ (mmol/l)	46.88 ± 4.99	47.61 ± 3.33	39.25 ± 1.82	41.47 ± 2.20
	Urea (mmol/l)	625.7 ± 33.6	749.4 ± 35.7 a	610.9 ± 35.7	603.5 ± 18.9
	Albumina (g/dl)	12.73 ± 1.26	12.43 ± 0.96	10.31 ± 0.80	12.68 ± 1.04
ACLARAMIENTOS (CL)	CL Na ⁺ /CL creatinina	0.0031 ± 1.59 10 ⁻⁴	0.0015 ± 9.52 10 ⁻⁵ ***	0.0029 ± 1.425 10 ⁻⁴	0.0017 ± 1.25 10 ⁻⁴ ***
	CL K ⁺ /CL Creatinina	0.113 ± 5.8 10 ⁻³	0.151 ± 6 10 ⁻³ ***	0.11 ± 5.8 10 ⁻³	0.14 ± 6 10 ⁻³ **
	CL Urea /CL creatinina	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01
	CL Selenio /CL Creatinina	0.019 ± 8.6 10 ⁻⁴	0.008 ± 2.8 10 ⁻⁴ ***, aa	0.028 ± 1.1 10 ⁻³ ccc	0.012 ± 4.1 10 ⁻⁴ ***

Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: CI vs AI: *** $p < 0.001$; CI vs CISe: ^{ccc} $p < 0.001$; AI vs AISe ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$; CISe vs AISe: ^{***} $p < 0.001$.

Al contrario ocurre con el ión K⁺, pues su CL relativo se encuentra aumentado en los dos grupos alcoholes respecto a sus controles aunque en el caso de los suplementados el incremento fue significativamente menor frente a su control. Así se puede concluir que los animales expuestos a BD secretan

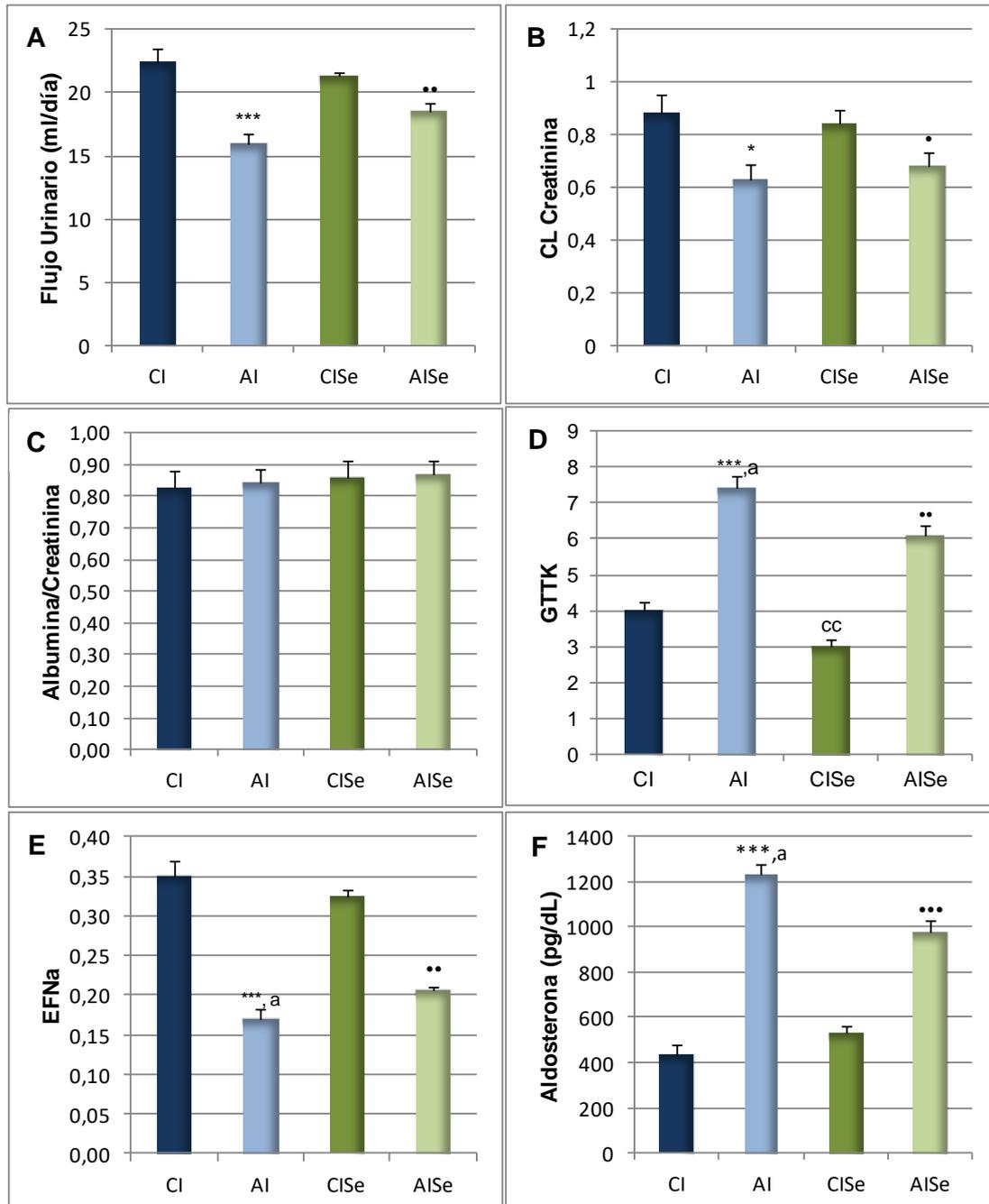
mayor cantidad de K^+ en orina, concordando con los niveles séricos de Na^+ y la hipokalemia encontrada en el grupo AI. Tras la suplementación los efectos sobre el K^+ parecen estar más aplacados bien porque los efectos sobre la Aldo son menores o porque actúa sobre otros mecanismos.

En la tabla 5.6.4 se muestra el CL relativo del Se que fue significativamente menor en los grupos alcoholes que en sus respectivos controles, incluso el CL relativo del grupo AISe fue menor que el CL del grupo control, mostrando que la suplementación utilizada no ha llegado a su tope funcional pues existe reabsorción renal en el grupo AISe, y que el modelo de alcoholización de BD afecta especialmente a la biodisponibilidad de este nutriente.

En la siguiente figura (Figura 5.6.4.1) se representan varios parámetros de la función renal, que indican el grado de daño renal sufrido tras el consumo agudo de alcohol BD. Dichos cambios funcionales intentaremos relacionarlos con los cambios moleculares analizados anteriormente.

En primer lugar se ha medido el flujo urinario en los cuatro grupos experimentales, resultando ser significativamente menor en los grupos expuestos a alcohol que en sus controles. Estos datos concuerdan con los de ingesta líquida, aunque los efectos son más significativos en la diuresis, pues el grupo AI ingería significativamente menos que el CI y la suplementación aunque no lo incrementaba significativamente, no presentaba valores menores que sus respectivos controles, CISe (Tabla 5.1.1). Así parece existir cierto efecto antidiurético tras el consumo de alcohol que podría estar relacionado con una menor TFG o tener origen hormonal y estar relacionado con la aldosterona.

Figura 5.6.4.1. Volumen de orina excretado (A), aclaramiento de creatinina (B), ratio albúmina/creatinina (C), Gradiente Transtubular de Potasio (GTTK) (D), Excreción Fraccional de Sodio (EFNa) (E) y niveles de aldosterona en suero (F).



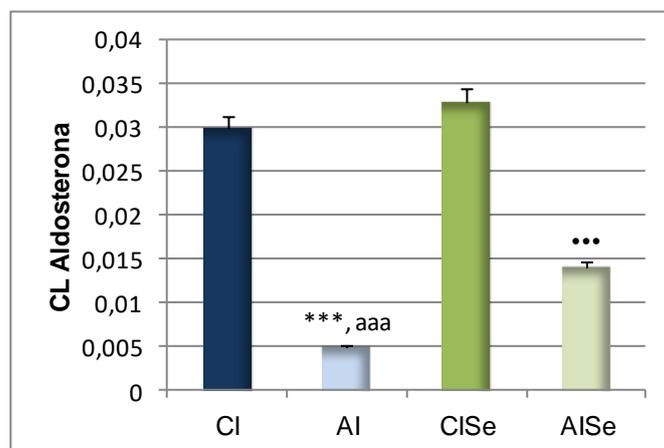
Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; AI vs AISe: ^a $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.05$; CISe vs AISe: [·] $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$

Además, se ha determinado el CL de creatinina para valorar la filtración renal. Después de la exposición a BD, se ha observado una disminución significativa de la TFG. Tras la terapia de suplementación utilizada, la tasa de filtración glomerular sigue disminuida, lo que indica que el BD afecta a la

filtración renal, por eso existe además menos diuresis, y que no parece que la oxidación esté implicada en este mecanismo, ya que el EO generado por el consumo agudo de alcohol afecta principalmente a las células epiteliales del túbulo distal y no a los podocitos glomerulares donde tiene lugar la filtración, así, la reducción de la TFG se relaciona principalmente con un proceso de infiltración de neutrófilos que provocan activación de la mieloperoxidasa y dañan a las células, más que con el EO directamente (Latchoumycandane y cols., 2015).

La albúmina es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre. Ayuda a mantener el líquido dentro del torrente sanguíneo sin que se filtre a otros tejidos. También transporta varias sustancias por el cuerpo, como, hormonas, vitaminas y enzimas. Se mide en orina como indicador de daño renal (Herrerías y cols., 1996).

Figura 5.6.4.2. Aclaramiento de aldosterona



Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: *** $p < 0,001$; AI vs AISe: ^{aaa} $p < 0,05$; CISe vs AISe: ^{***} $p < 0,001$

Tras el consumo agudo de alcohol tipo BD, la excreción fraccional de sodio (EFNa) y gradiente transtubular de K^+ (GTTK), dos medidas del comportamiento funcional de estos iones, fueron significativamente menor y mayor respectivamente que en el grupo control. Tras la suplementación con Se estos valores mejoraron significativamente, aunque no llegaron al valor control. Lo que concuerda con los resultados séricos de estos iones.

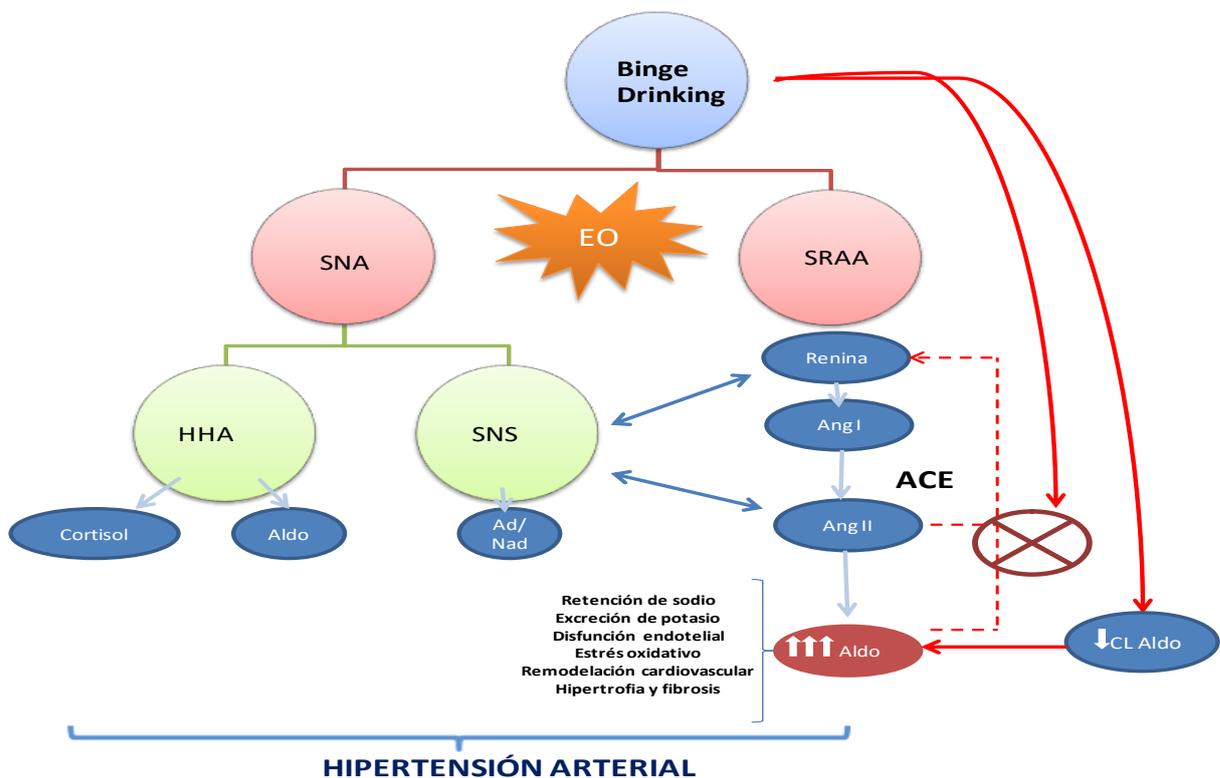
Como mencionamos anteriormente, el comportamiento de estos iones está regulado hormonalmente y principalmente por la hormona Aldo, que depende principalmente del SRAA, aunque también de otros estímulos. Al analizar los niveles séricos de Aldo, se observa que el grupo AI presenta valores muy significativamente aumentados respecto al grupo CI, y la suplementación con Se los disminuyó significativamente pero parcialmente, siendo significativamente mayores que el grupo CISE. Estos datos concuerdan perfectamente con los de EFNa y GTTK encontrados. Por otro lado es interesante resaltar que los valores de GTTK están significativamente disminuido en el grupo CISE respecto al CI, lo que nos indica que el Se juega un papel importante en la regulación del K^+ . De hecho, la peroxidación lipídica a nivel de los túbulos renales, genera cambios en la composición de las membranas celulares que interfieren con los transportadores, entre ellos afecta a la $Na^+-K^+-ATPasa$ (Rodrigo y cols., 2002). En concreto, Rodrigo y Rivera (2002) sugieren que el etanol provoca un aumento de la $Na^+-K^+-ATPasa$ debido a la peroxidación lipídica y a los altos niveles de Aldo, incrementando la reabsorción de Na^+ y la disminuyendo la de K^+ . Estos datos concuerdan con los obtenidos tras el BD en los animales de experimentación, y explicaría la mejora provocada por la suplementación de Se que disminuye la peroxidación lipídica y los niveles de Aldo así como el EFNa y el GTTK.

Con el fin de analizar en mayor profundidad el papel del alcohol y el Se sobre la homeostasis de la Aldo y en base a estudios anteriores en ratas alcohólicas crónicas, donde el alcohol disminuía drásticamente el CL de Aldo contribuyendo así a su aumento en sangre (Barrero y cols., 2012) analizamos el CL relativo de esta hormona, y se observó que el BD producía una muy significativa disminución de su eliminación por orina contribuyendo a su incremento en sangre dando lugar a una hiperaldosteronemia (Figura 5.6.4.2).

La suplementación con Se a las ratas expuestas a BD disminuye muy significativamente esta tendencia, aunque no totalmente. Así se puede pensar que, el BD además de activar al SNS y SRAA por el incremento de EO generado, la hipernatremia e hipokalemia encontrada, se deben también en gran medida a una menor eliminación de la Aldo por orina que se acumula en sangre, provocándose una descompensación absoluta en el feed back negativo

del SRAA. La suplementación con Se, mejora en parte los niveles de Aldo, la EFNa y la GTTK y los niveles séricos de Na^+ y K^+ porque favorece en parte la eliminación renal de Na^+ y la reabsorción de K^+ posiblemente por su acción antioxidante sobre los nefronas de los túbulos renales que mejoran además el funcionamiento de la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$.

Figura 5.6.4.3. Esquema de los mecanismos implicados en la génesis de la hipertensión tras el consumo agudo de alcohol.



En el anterior esquema, ya mostrado en el apartado 2.2.2.1, se refleja que los niveles altos de Aldo deben inhibir la liberación de renina a sangre puesto que los niveles de Aldo son elevados y no es necesario la presencia de mayor cantidad de Aldo, pero en las ratas expuestas a BD esta regulación está inhibida, dando lugar a una mayor liberación de esta hormona llegando a alcanzar niveles muy elevados respecto al grupo control.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la Aldo es una hormona esteroidea que necesita ser metabolizada a nivel hepático para ser soluble en agua y así, ser excretada por vía urinaria. El metabolismo hepático de esta hormona consta de dos fases, fase I la cual necesita citocromo P-450 y la fase II en la cual los grupos hidroxilos de los metabolitos resultantes de la primera fase se conjugan con glucurónido o sulfato donde se necesita GSH. Tanto el

citocromo P-450 como el GSH, son, por tanto, indispensables para el metabolismo de la Aldo, y ambos son consumidos en grandes cantidades por el metabolismo oxidativo del alcohol en el hígado (Ojeda y cols., 2015; Aragón y cols., 2012), haciendo que el consumo de alcohol dificulte especialmente el metabolismo de la Aldo (Levy y cols., 2006). Además, el consumo agudo de alcohol produce daño hepático, pues aumenta claramente los niveles de transaminasas. Así, si el BD disminuye el metabolismo de la Aldo y su solubilidad, esta no puede ser eliminada por orina y se acumula en sangre. Esta podría ser la causa de la disminución del CL de Aldo en orina, de origen hepático más que renal. La suplementación con Se mejora claramente el balance oxidativo hepático (Ojeda y cols., 2017b) y los niveles de transaminasas, por lo que el CL hepático de Aldo puede estar mejorado e indirectamente su CL renal.

A modo de resumen se han realizado esquemas representativos de los dos órganos estudiados y el suero indicando los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar tras el consumo agudo de alcohol en adolescentes y los efectos tras la suplementación con Se.

Figura 5.6.4.4. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en el corazón tras el BD y suplementación con Se.

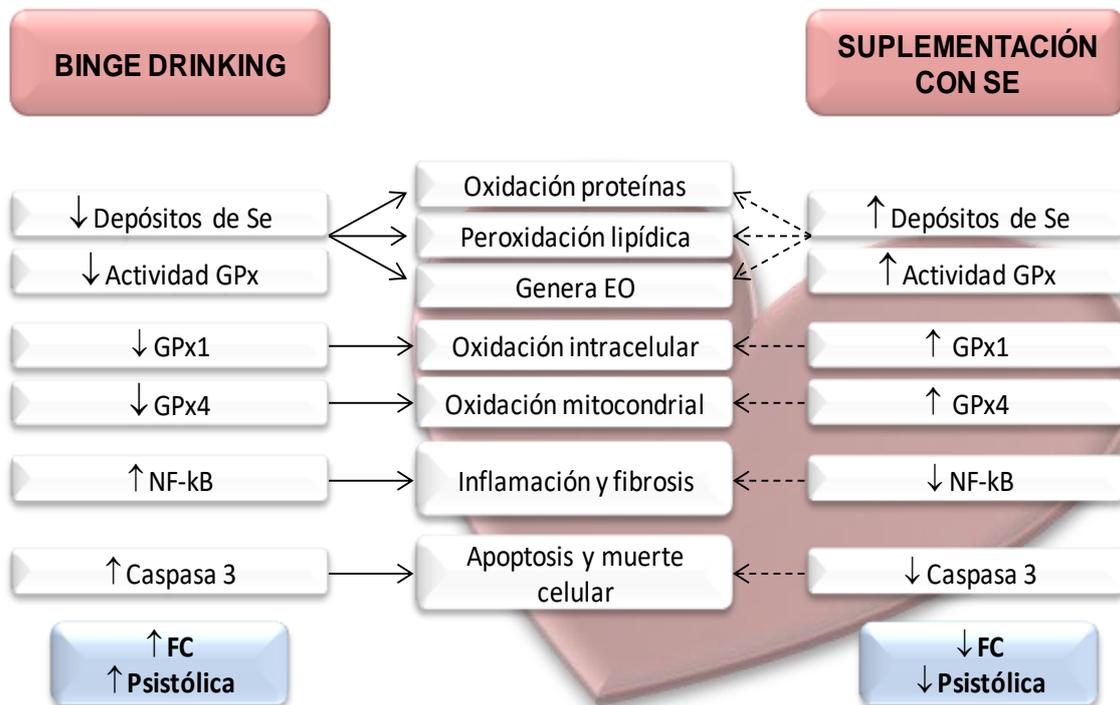


Figura 5.6.4.5. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en el riñón tras el BD y suplementación con Se.

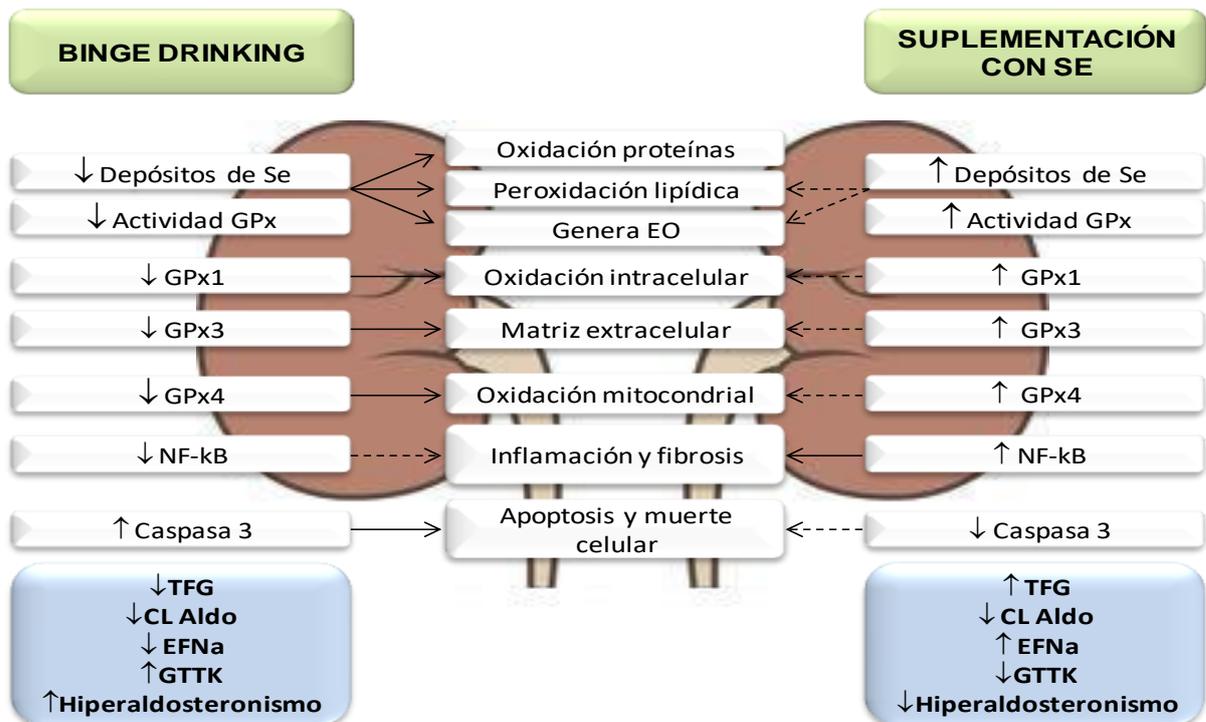
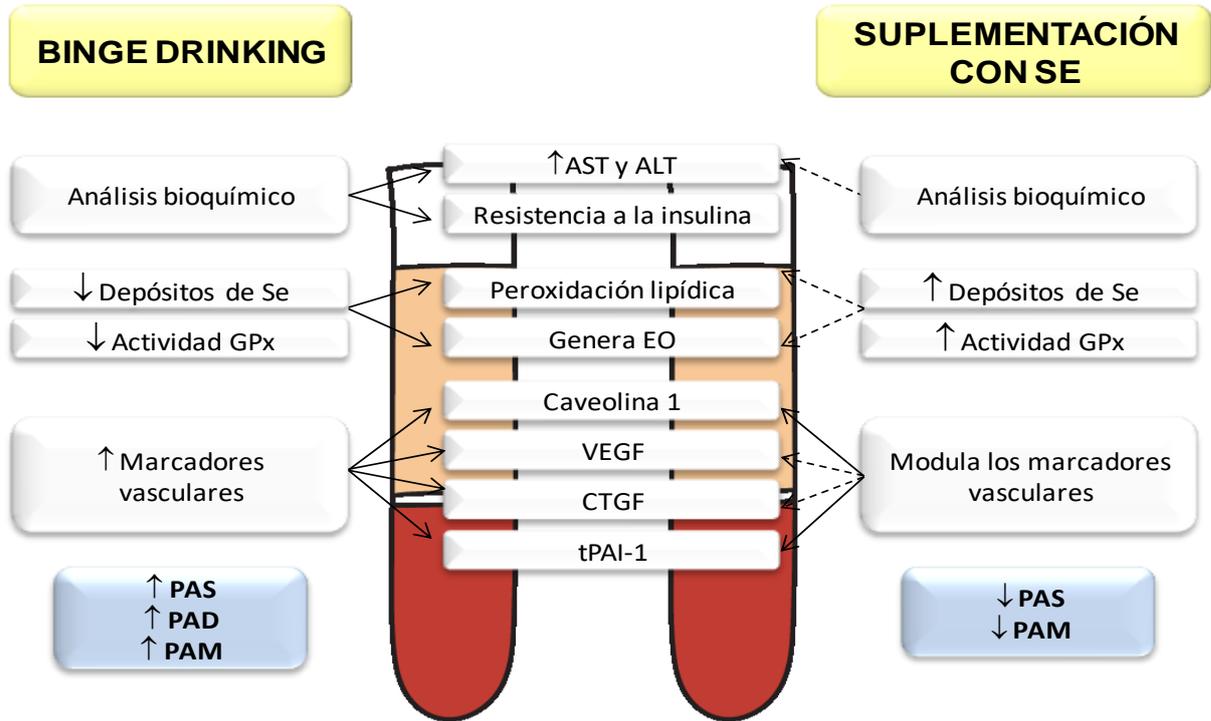


Figura 5.6.4.6. Esquema representativo de los cambios moleculares y funcionales que tienen lugar en suero tras el BD y suplementación con Se.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

El consumo de alcohol en forma de “binge drinking” repetido durante la adolescencia provoca cambios biomoleculares y funcionales en el corazón. Así depleciona los niveles de Se en este tejido, la actividad de la selenoproteína antioxidante GPx dando lugar a oxidación lipídica y proteica en este tejido. En concreto disminuye la expresión cardíaca de GPx1 y GPx4 favoreciendo la oxidación intracelular en los miocitos y en la mitocondria. Esta alteración mitocondrial aumenta la inflamación y fibrosis vías NF- κ B y la apoptosis. Todo ello favorece un aumento de la FC y un aumento de la PAS.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La suplementación con Se utilizada repleciona, en el corazón, los depósitos de este nutriente, la actividad GPx, la expresión GPx1 y GPx4, así como el balance oxidativo, inflamatorio y apoptótico, disminuyendo la FC y en parte la PAS.

CONCLUSIÓN TERCERA

El modelo de alcoholización utilizado provoca a nivel sistémico cambios bioquímicos relacionados con alteraciones hepáticas y desbalance metabólico propios de resistencia a la insulina. Los niveles de Se séricos están disminuidos así como la actividad de la GPx3 apareciendo oxidación lipídica. Todos estos cambios están relacionados con disfunción endotelial, como demuestran los altos valores de Cav-1, VEGF, CTGF y tPAI-1 encontrado y con el aumento de la PAS, PAD y PM.

CONCLUSIÓN CUARTA

La suplementación de Se utilizada mejora la ratio hepática AST/ALT, aumenta los niveles de Se en suero, aumenta la actividad GPx3 y disminuye parcialmente la oxidación en suero, así como los marcadores de disfunción endotelial VEGF y CTGF que favorece la permeabilidad, crecimiento y fibrosis

endotelial. Sin embargo, el Se no mejora el perfil metabólico, y aumenta aun más la Cav-1 y el tPAI-1 relacionados con el transporte de triglicéridos y colesterol. Aun así, la suplementación con Se mejora la PAS, aunque no la PAD ni la PM.

CONCLUSIÓN QUINTA

Durante la adolescencia el modelo de alcoholización utilizado depleciona los niveles de Se renales, disminuye la actividad GPx y favorece la oxidación de lípidos y proteínas. En concreto, disminuye la expresión de GPx1, GPx3 y GPx-4 y así favorece la oxidación intracelular, extracelular y mitocondrial, especialmente de las células tubulares de la nefrona, colaborando con una menor activación del factor NF- κ B y mayor de la caspasa-3 provocando un desequilibrio inflamatorio y apoptótico. Estos cambios biomoleculares favorecen la disminución de la tasa de filtración glomerular, la aparición de hipernatremia, hipokalemia e hiperaldosteronemia relacionado con un bajo aclaramiento de aldosterona y una estimulación no regulada del SRAA que colabora con la alta PAM encontrada.

CONCLUSIÓN SEXTA

La suplementación con Se aumenta los depósitos renales de Se, la actividad GPx y disminuye el EO en este tejido, aumentando la expresión de GPx-1, GPx-3 y GPx-4 y mejorando el balance inflamatorio y apoptótico. A nivel funcional, no mejora la tasa de filtración glomerular pues los glomérulos son muy resistentes a la oxidación, pero si mejora el aclaramiento de aldosterona, disminuyendo parcialmente el hiperaldosteronismo encontrado y mejorando los cambios iónicos de Na⁺ y K⁺, disminuyendo en parte la PAS.

CONCLUSIÓN FINAL

El consumo de alcohol en forma de “binge drinking” durante la adolescencia provoca cambios sustanciales a nivel cardiovascular y renal ya que entre los mecanismos que generan este patrón de consumo está el EO. En los tres tejidos estudiados la única enzima antioxidante que disminuyó fue la selenoproteína GPx, pues los niveles séricos y tisulares de Se estuvieron deplecionados, a pesar de ingerir la misma cantidad de comida que los

animales controles. La suplementación con Se utilizada mejora sustancialmente el balance oxidativo en el corazón donde disminuye significativamente la frecuencia cardíaca, pareciendo éste el mecanismo principal por el que el Se actúa sobre el sistema cardiovascular. En el riñón él Se mejora el aclaramiento de aldosterona y el balance hídrico-salino, reduciendo así la presión arterial encontrada tras el BD.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Agarwal DP. Pharmacokinetic and pharmacogenetic aspect of alcohol. In Snel, Lorist, Eds., *Nicotine, Caffeine and Social Drinking*. The Netherlands: Harwood. 1988; 259-274.
- Alfonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007; 74 (4): 324-9.
- Al-Lahham R, Deford JH, Papaconstantinou J. Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 419:1-11.
- Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondó PH. The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; (4):484-8.
- Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, Sasaki M, Takahashi K, Fujiyama Y. Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2002; 21(5):574-9.
- Andresen HM, Regueira HT, Leighton F. Oxidative stress in critically ill patients. *Rev Med Chil*. 2006; 134(5):649-56.
- Antonenkov VD, Panchenko LF. Activation of peroxisomal acyl-CoA-oxidase and of lipid peroxidation in the raty myocardium during long-term ethanol intake. *Biull Eksp Biol Med*. 1986; 105: 550-2.
- Aragon C, Miquel M, Correa M, Sanchos-Segura C. Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones* 2002; 14 (supl 1): 23-42.
- Arkwright PD, Beilin LJ, Vandongen R, Rouse IA, Lalor C. The pressor effect of moderate alcohol consumption in man: a search for mechanisms. *Circulation*. 1982; 66: 515-519.
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 356(2):133-41.

Artun BC, Küskü-Kiraz Z, Güllüoğlu M, Cevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 29(8):659-65.

Asha GS, Suresh MV, Indira M. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol C.* 2003; 134: 397-401.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998; 281(5381):1305-8.

Assadi FK. Acute effect of ethanol on renal electrolyte excretion in rats. *Alcohol.* 1989; 6(3):257-60.

Aydermir T, Tarhan L. Purification and partial characterisation of superoxide dismutase from chicken erythrocytes. *Turk J Chem.* 2001; 25: 451-459.

B

Bailey SM, Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(1):11-6.

Banning A, Schnurr K, Böl GF, Kupper D, Müller-Schmehl K, Viita H, Ylä-Herttua S., Brigelius-Flohe R. Inhibition of basal and interleukin-1-induced VCAM-1 expression by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and 15-lipoxygenase in rabbit aortic smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 135–144.

Bardag-Gorce F, French BA, Li J, Riley NE, Yuan QX, Valinluck V, Fu P, Ingelman-Sundberg M, Yoon S, French SW. The importance of cycling of blood alcohol levels in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease in rats. *Gastroenterology.* 2002; 123(1):325-35.

Barja de Quiroga G. Radicales libres y antioxidantes. En: Cascales M. *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés oxidativo.* Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 1997.

Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA. Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on

selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. *J Nutr.* 2009; 139(2):199-206

Barrero MJ, Ojeda ML, Díaz-Castro J, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. The action of folic acid upon aldosterone clearance: a possible hypotensor in alcoholic rats. *Life Sci.* 2012; 90: 337-42.

Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 55(1):1-23.

Bau PFD, Bau CHD, Rosito GA, Manfroi WC, Fuchs FD. Alcohol consumption, cardiovascular health, and endothelial function markers. *Alcohol.* 2007; 41: 479-488.

Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *J. Nutr.* 2003; 133: 1463S–1467S

Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(11): 2487-94.

Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195(1): 133-40.

Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. Selenium and its supplementation in cardiovascular disease – what do we know?. *Nutrients.* 2015; 7: 3094–3118.

Bergheim I, Parlesak A, Dierks C, Bode JC, Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57: 431-8.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12 (2): 123-130.

Binder C, Knibbe K, Kreissl A, Repa A, Thanhaeuser M, Greber-Platzer S, Berger A, Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med.* 2008; 168: 404–410.

- Binder C, Knibbe K, Kreissl A, Repa A, Thanhaeuser M, Greber-Platzer S, Berger A, Jilma B, Haiden N. Does acute alcohol intoxication cause transaminase elevations in children and adolescents?. *Alcohol*. 2016; 51: 57-62.
- Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003. 17(4): 575-92.
- Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianche R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histopathol*. 2008; 23: 381-390.
- Bosron WF, Li TK. Catalytic properties of human liver alcohol deshydrogenases isoenzymes. *Enzymes*. 1987; 37:19-28.
- Boyd KN, Kumar S, O'Buckley TK, Morrow AL. Chronic ethanol exposure produces tolerance to elevations in neuroactive steroids: mechanisms and reversal by exogenous ACTH. *J Neurochem*. 2010. 115(1): 142-52.
- Brigelius-Flohé R, Wingler K, Muller C. Estimation of individual types of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 2002; 101-112.
- Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K. Selenium dependent enzymes in endothelial cell function, *Antioxid. Redox Signaling*. 2003; 5: 205–215.
- Brigelius-Flohé R, Flohé L. Selenium and redox signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2017; 617:48-59.
- Brigelius-Flohe R, Friedrichs B, Maurer S, Schultz M, Streicher R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J*. 1997; 328: 199–203.
- Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogénesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790 (11): 1555-68.
- Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10):951-65.
- Buhler R, von Wartburg JP. Quantitation of alcohol deshydrogenase in human tissue and serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Alcohol Clin Exp Res*. 1982; 33: 684.692.

- Buijsse B, Lee D, Steffen L, Erickson RR, Luepker RV, Jacobs Jr DR, Holtzman JL. Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with low HDLc's. 2012. PLoS One. 2012; 7(6): e38901.
- Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr.* 2015; 35:109-34.
- Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25: 215-35.
- Burk RF, Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Yin D. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011; 301: G32–G38.

C

- Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Roper P. Long-term modulations in the vertebral transcriptome of adolescent-stage rats exposed to binge alcohol. *Alcohol Alcohol.* 2010; 45(4):332-46.
- Camici GG, Schiavoni M, Francia P, Bachschmid M, Martin-Padura I, Hersberger M, Tanner FC, Pelicci P, Volpe M, Anversa P, Lüscher TF, Cosentino F. Genetic deletion of p66 (Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(12):5217-22.
- Carreras O, Ojeda ML, Nogales F. Selenium dietary supplementation and oxidative balance in alcoholism. In: Patel, V.B. (Ed.), *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition.* 2015. Elsevier, pp. 133–142.
- Castro WM. Selenio en pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutr Hosp.* 2007; 22: 295-306.
- Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 420(2):217-21.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol;* 2009; 83(6): 519-48.

- Cederbaum AI. CYP2E1—biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med.* 2006; 73(4): 657-72.
- Cederbaum AI. Farmacocinética y aspectos forenses del alcohol. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 492: 35-49.
- Cederbaum AI. Microsomal generation of hydroxyl radicals: its role in microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) activity and requirement for iron. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 492: 35-49.
- Céspedes EL, Hernandez I, Llópiz N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1996: ISSN 0864-0300.
- Chan TC, Sutter MC. Ethanol consumption and blood pressure. *Life Sci.* 1983; 33: 1965-1973.
- Cheesman KH, Slater TF. Free radical in medicine. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 479-724
- Chen G, Ke Z, Xu M, Liao M, Wang X, Qi Y, Zhang T, Frank JA, Bower KA, Shi X and Luo J. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. *Autophagy.* 2012; 8:1577-1589.
- Chung SS, Kim M, Youn BS, Lee NS, Park JW, Lee IK, Lee YS, Kim JB, Cho YM, Lee HK, Park KS. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(1): 20-30.
- Cigremis Y, Turkoz Y, Akgoz M. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urol Res.* 2004; 32: 213-218.
- Combs GF. Biomarkers of selenium status. *Nutrients.* 2015; 7(4):2209-36.
- Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A, Vecchio D, Arezzini B. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* 2010; 5(2): 101-9.

Conen D, Chae CU, Glynn RJ, Tedrow UB, Everett BM, Buring JE, Albert CM. Risk of death and cardiovascular events in initially healthy women with new-onset atrial fibrillation. *J Am Med Assoc*. 2011; 305: 2080-2087.

Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kollens, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(17): 7637-44.

Cosentino F, Francia P, Camici GG, Pelicci PG, Lüscher TF, Volpe M. Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(4):622-8.

Coudray C, Roussel AM, Arnaud J, Favier A. Selenium and antioxidant vitamin and lipidperoxidation levels in preaging French population. EVA Study Group. *Etude de vieillissement artériel*. *Biol Trace Elem Res*. 1997; 57(2):183-90.

D

Danziger RS, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford RG, Lakatta EG. Ethanol acutely and reversibly suppresses excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1991; 68: 1660–1668.

Das SK, Vasudevan DM. Alcohol induced effects on kidney. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2008; 23 (1): 4-9.

Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci*. 2007; 81(3): 177-87.

De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Moretti A, Cipriani R, Gatti A, Mandosi E, Morano S. Endothelial dysfunction and oxidative stress in type 1 and type 2 diabetic patients without clinical macrovascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 79: 337-342.

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 1989; 257:L163-73.

Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 2006; 43(2): S63-S74.

Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, Janke LJ, Kang TB, Ben-Moshe T, Mak TW, Wallach D, Green DR. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Rep*. 2012; 1(5):401-7.

Dinu D, Nechifor MT, Movileanu L. Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney. *J Biochem Mol Toxicol*. 2005.9: 386-395.

Doser TA, Turdi S, Thomas DP, Epstein PN, Li SY, Ren J. Transgenic overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 rescues chronic alcohol intake-induced myocardial hypertrophy and contractile dysfunction. *Circulation*. 2009; 119:1941–1949.

E

Ehlers CL, Gizer IR, Vieten C, Gilder A, Gilder DA, Stouffer GM, Lau P, Wilhelmsen KC. Age at regular drinking, clinical course, and heritability of alcohol dependence in the San Francisco family study: a gender analysis. *Am J Addict*. 2010; 19(2):101-10.

Esteve AO, Morgan KL, Szewczyk NJ, Gems D, Estevez M. The neurodegenerative effects of selenium are inhibited by FOXO and PINK1/PTEN regulation of insulin/insulin-like growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*. 2014; 41: 28-43.

F

Fahimi HD, Kino M, Hicks L, Thorp KA, Abelman WH. Increased myocardial catalase in rats fed ethanol. *Am J Physiol*. 1979; 96: 373-86.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis*. 1998; 18(4):389-401.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(3): 236-256.

Forceville X. Selenium and the "free" electron. Selenium--a trace to be followed in septic or inflammatory ICU patients? *Intensive Care Med*. 2001; 27(1):16-8.

- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod.* 2002; 67 (3): 967-71.
- Forgione MA, Cap A, Liao R, Moldovan NI, Eberhardt RT, Lim CC, Jones J, Goldschmidt-Clermont PJ, Loscalzo J. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. *Circulation.* 2002; 106(9); 1154-8.
- Forman, H.J.; Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, 166, S4–S8.
- Fortea MS, Cuevas JB, Sanchis MA. Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones.*1999; 11(2): 115-26.
- Foster R, Marriott H. Alcohol consumption in the new millennium-weighing up the risk and benefits for our health. *Nutrition Bulletin.* 2006; 31: 286-331.
- Fouad-Tarazi FM. Hypertension hemodynamics. *Med Clin North Am.* 1997; 81(5):1131-45.
- Freedman JE, Frei B, Welch GN, Loscalzo J. Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J Clin Invest.* 1995; 96(1): 394-400.
- French SW. Chronic alcohol binging injures the liver and other organs by reducing NAD+ levels required for sirtuin's deacetylase activity. *Exp. Mol. Pathol.* 2016; 100: 303–306.
- Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood levels in women: the role of decreased gastric Alcohol Dehydrogenase Activity and First-Pass Metabolism. *The New England Journal of Medicine.* 1990; 322(2):95-99.

Fricker M, Vilalta A, Tolkovsky AM, Brown GC. Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglia. *J Biol Chem.* 2013; 288(13):9145-52.

Fujii J, Ito JI, Zhang X, Kurahashi T. Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 49(2): 70-8.

G

Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L. ALDH mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2003; 14: 637-647.

Gao L, Zhou Y, Zhong W, Zhao X, Chen C, Chen X, Gu Y, Chen J, Lv Z, Shen J. Caveolin-1 is essential for protecting against binge drinking-induced liver damage through inhibiting reactive nitrogen species. *Hepatology.* 2014; 60(2):687-99.

Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. To binge or not to binge: binge drinking disrupts glucose homeostasis by impairing hypothalamic but not liver insulin signaling. *Hepatology.* 2013; 57(6):2535-8.

George A, Figueredo VM. Alcohol and arrhythmias: a comprehensive review. *J Cardiovasc Med.* 2010; 11:221–228.

Getoff N. Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals. *Radiat Phys Chem.* 2007; 76: 1577-1586.

Goldstein DB. The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984; 24:43-64.

Gómez MI, de Castro CR, Fanelli SL, Quintans LN, Costantini MH, Castro JA, Castro GD. Biochemical and ultrastructural alterations in the rat ventral prostate due to repetitive alcohol drinking. *J Appl Toxicol.* 2007; 27: 391-398.

- Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jimenez L, Jos A, Camean AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007; 18:533-40.
- Gonzaga NA, Callera GE, Yogi A, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Queiroz RH, Touyz EM, Tirapelli CR. Acute ethanol intake induces mitogen-activated protein kinase activation, platelet-derived growth factor receptor, and oxidative stress in resistance arteries. *J Physiol Biochem*. 2014; 70: 509-523.
- Gonzaga NA, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, De Martinis BS, Padovan CM, Tirapelli CR. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. *Alcohol*. 2015; 49(1):47-56.
- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol*. 2014; 6(6): 353-66.
- González-Reimers E, Martín-González MC, Alemán-Valls MR, de la Vega-Prieto MJ, Galindo-Martín L, Abreu-González P, Santolaria-Fernández F. Relative and combined effects of chronic alcohol consumption and HCV infection on serum zinc, copper, and selenium. *Biol Trace Elem Res*. 2009; 132(1-3): 75-84.
- Gonzalez-Reimers E, Rodriguez-Moreno F, Martinez-Riera A, Mas-Pascual A, Delgado-Ureta E, Galindo-Martin L, Arnay-de la Rosa M, Santolaria-Fernandez F. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on strontium and barium bone content and fecal and urinary excretion. *Biol Trace Elem Res*. 1999; 68(1):41-9.
- González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 2000; 25(1): 3-9.
- Goslowski M, Piano MR, Bian JT, Church EC, Szczurek M, Phillips SA. Binge drinking impairs vascular function in young adults. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62(3):201-207.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004; 118: 285–296.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108(16):1912-6.

Grotto D, Hornos MF, Mazzaron M, Garcia SC, Barbosa F. Long-term excessive selenium supplementation induces hypertension in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2017; 182(1):70-77.

Guan Z, Lui CY, Morkin E, Bahl JJ. Oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte induced by high-dose alcohol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44(6):696-702.

Guarnieri T, Lakatta EG. Mechanism of myocardial contractile depression by clinical concentrations of ethanol: A study in ferret papillary muscles. *Journal of Clinical Investigation*. 1990; 85(5):1462-1467.

Guo R, Ren J. Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(4): 1285-301.

H

Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5: 253-295.

Hamilton CA, Miller WH, Al-benna S, Brosnan MJ, Drummond RD, McBrde MW, Dominiczak AF. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci*. 2004; 106: 219-234.

de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(3):F544-51.

Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen*. 1990; 15(3): 145-82.

Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1997; 273: E1039-51.

- Helms CM, Park B, Grant KA. Adrenal steroid hormones and ethanol self-administration in male rhesus macaques. *Psychopharmacology*. 2014; 231: 3425-3436.
- Herrerías JM, Díaz A, Jiménez M. *Tratado de hepatología*. Sevilla: Universidad de Sevilla: Schering Plough; 1996.
- Herzog V, Fahimi HD. Identification of peroxisomes (microbodies) in mouse myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1976; 8:271-87.
- Hicks BM, Iacono WG, McGue M. Consequences of an adolescent onset and persistent course of alcohol dependence in men: Adolescent risk factors and adult outcomes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2010; 34: 819-833.
- Hicks L, Fahimi HD. Peroxisomes (microbodies) in the myocardium of rodents and primates. A comparative ultrastructural cytochemical study. *Cell Tissue Res*. 1977; 175: 467-81.
- Hingson RW, Heeren T, Edwards EM. Age at drinking onset, alcohol dependence, and their relation to drug use and dependence, driving under the influence of drugs, and motor-vehicle crash involvement because of drugs. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*. 2008; 69: 192-201.
- Hoffman PR. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55(5): 289-97.
- Hoffmann FW, Hashimoto AS, Lee BC, Rose AH, Shohet RV, Hoffmann PR. Specific antioxidant selenoproteins are induced in the heart during hypertrophy. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 512, 38–44.
- Hollander JM, Lin KM, Scott BT, Dillmann WH. Overexpression of PHGPx and HSP60/10 protects against ischemia/reoxygenation injury. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(7): 742-51.
- Huang MC, Chen CH, Peng FC, Tang SH, Chen CC. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. *J Formos Med Assoc*. 2009; 108(7): 560-9.

Huang H, You Y, Lin X, Tang C, Gu X, Huang M, Qin Y, Tan J, Huang F. Husain K, Ansari RA, Ferder L. Alcohol-induced hypertension: mechanism and prevention. *World J Cardiol.* 2014; 6(5):245-252.

Hussa RO. Immunologic and physical characterization of human chorionic gonadotropin and its subunits in cultures of human malignant trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 44:1154-1162.

I

Ibsen H, Christensen NJ, Rasmussen S, Hollnagel H, Damkjaer Nielsen M, Giese J. The influence of chronic high alcohol intake on blood pressure, plasma noradrenaline concentration and plasma rennin concentration. *Clin Sci.* 1981; 61 Suppl 7: 377s-379s.

Iglesias P, Selgas R, Romero S, Díez JJ. Selenium and kidney disease. *J Nephrol.* 2013; 26(2): 266-72.

Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod.* 2001; 64(2):674-83.

Inhibition of TRPC6 Signal Pathway Alleviates Podocyte Injury Induced by TGF- β 1. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 41(1):163-172.

Iwata K, Nishinaka T, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Increased gene expression of glutathione peroxidase-3 in diabetic mouse heart. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29(5): 1042-1045.

J

Jelski W, Kutylowska E, Laniewska-Dunaj M, Orwal K, Laszewick W, Szmikowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with acute and chronic pancreatitis. *Exp Mol Pathol.* 2011; 91: 631-635.

Ji LL. Exercise and oxidative stress: a role of the cellular antioxidant system. *Exercise Sport Sci. R.*, Baltimore. 1995; pp. 135-166.

Jilma B, Haiden N. Does acute alcohol intoxication cause transaminase elevations in children and adolescents?. *Alcohol*. 2016; 51, 57–62.

Johansson I, Eliasson E, Norsten C, Ingelman-Sundberg M. Hydroxylation of acetone by ethanol- and acetone-inducible cytochrome P-450 in liver microsomes and reconstituted membranes. *FEBS Lett*. 1986; 196(1):59-64

Johnston LD, O'Malley PM, Miech RA, Bachman JG, Schulenberg JE. Key Findings on Adolescent Drug Use. Ann Arbor: Institute for Social Research, The University of Michigan. 2014. Monographs.

Joseph J. Selenium and cardiometabolic health: inconclusive yet intriguing evidence. *Am J Med Sci*. 2013 Sep; 346(3):216-20.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272:18522-18525.

K

Kaiser JP, Beier JI, Zhang J, David Hoetker J, von Montfort C, Guo L, Zheng Y, Monia BP, Bhatnagar A, Arteel GE. PKCepsilon plays a casual role in acute ethanol-induced steatosis. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 482(1-2): 104-11.

Kanan M, Wang L, Kang YJ. Myocardial oxidative stress and toxicity induced by acute ethanol exposure in mice. *Exp Biol Med*. 2004; 229: 553-559.

Kandadi MR, Hu N, Ren J. ULK1 plays a critical role in AMPK-mediated myocardial autophagy and contractile dysfunction following acute alcohol challenge. *Curr Pharm Des*. 2013; 19(27):4874-87.

Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2007; 30(3):707-12.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995; 14(22):5579-88.

- Kiss I. Importance of selenium homeostasis in chronic and end-stage kidney diseases. *Orv Hetil.* 2013; 154(41):1641-7.
- Kitson KE, Weiner H. Ethanol and acetaldehyde metabolism: Past, present and future. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20: 82A-2A.
- Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr.* 2003; 133 (5 Suppl 1): S1448-S1451.0
- Knopp EA, Arndt TL, Eng KL, Caldwell M, LeBoeuf RC, Deeb SS, O'Brien KD, Koc S, Cayli S, Aksakal C, Ocakli S, Soyalic H, Somuk BT, Yüce S. Protective effects of melatonin and selenium against apoptosis of olfactory sensory neurons: a rat model study. *Am J Rhinol Allergy.* 2016; 30: 62-66.
- Köhrle J. Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid.* 2005; 15(8):841-53.
- Koivisto T, Salaspuro M. Aldehyde dehydrogenase of rat colon: comparison with other tissues of the alimentary tract and the liver. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20: 551-555.
- Kumar DS, Vasudevan DM. Alcohol induced effects on kidney. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23(1): 4-9.

L

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.
- Lanbuskyy VM, Lee BC, Handy DE, Loscalzo J, Hatfield DL, Gladyshev VN. Both maximal expression of selenoproteins and selenoprotein deficiency can promote development of type 2 diabetes-like phenotype in mice. *Antiox Redox Signal.* 2011; 14(12):2327-36.
- Laposata M. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1996; 60: 313-5.

- Latchoumycandane C, Nagy LE, McIntyre TM. Myeloperoxidase formation of PAF receptor ligands induces PAF receptor-dependent kidney injury during ethanol consumption. *Free Radic Biol Med.* 2015; 86: 179-90.
- Latchoumycandane C, Nagy LE, McIntyre TM. Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2014; 69: 403-16.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71(4):952-8.
- Lebrede I, Herrera A, Céspedes E, Puldón G. Variables de estrés oxidativo en conejos tratados con etanol y dieta hipercolesterolémica. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003; 22(4): 253-258.
- Levy MN, Stanton BA, Koepfen BM. *Berne y Levi Fisiología*. Cuarta edición. Madrid: Elsevier; 2006.
- Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 2009; 14:536-548.
- Lee SD, Kuo WW, Ho YJ, Lin AC, Tsai CH, Wang HF, Kuo CH, Yang AL, Huang CY, Hwang JM. Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis in ovariectomized rats. *Maturitas.* 2008; 61(3):268-77.
- Li GS, Wang F, Kang D, Li C. Keshan disease: an endemic cardiomyopathy in China. *Hum Pathol.* 1985; 16(6): 602-9.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace dc, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995; 11(4): 376-81.
- Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J Biol Chem.* 2009; 284(45): 30836-44.
- Liang N, Wang F, Peng X, Fang J, Cui H, Chen Z, Lai W, Zhou Y, Geng Y. Effect of Sodium Selenite on Pathological Changes and Renal Functions in Broilers Fed

a Diet Containing Aflatoxin B₁. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12(9):11196-208.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5; 105(9):1135-43.

Lieber CS, Pignon JP. Ethanol and lipids. En: *Human plasma lipoproteins: chemistry, physiology and pathology*. Fruchart JC y Sheperd J (eds.). New York: Walter De Gruyter and Co. 1989; 245-280.

Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta*. 1997; 257(1): 59-84.

Lieber CS. Hepatic and other medical disorders of alcoholism: from pathogenesis to treatment. *J Stud Alcohol*. 1998; 59: 9-25.

Lieber CS. Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanisms and management. *Plenum Press*. 1992: 579.

Lieber CS. Medical disorders of alcoholism. *New Eng J Med*. 1995; 333: 1058-1065.

Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005; 9(1): 1-35.

Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) - a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999; 23(6): 991-1007.

Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2005; 50:7-20.

Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(3): 220-31.

Lieber CS. Interaction of alcohol with the liver, nutrition, drugs and carcinogens. *Gastroenterol Clin Biol*. 1985; 9(12): 893-8.

Lindtner C, Scherer T, Zielinski E, Filatova N, Fasshauer M, Tonks NK, Puchowicz M, Buettner C. Binge drinking induced whole body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action. *Sci Transl Med*. 2013; 30: 5(170).

- Lisdahl KM, Thayer R, Squeglia LM, McQueeney TM, Tapert SM. Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents. *Psychiatry Res.* 2013; 211(1):17-23.
- Liu H, Xuab H, Huang K. Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics.* 2017; 9: 21-37
- Liu W, Redmond EM, Morro D, Cullen JP. Differential effects of daily-moderate versus weekend-binge alcohol consumption on atherosclerotic plaque development in mice. *Atherosclerosis.* 2011; 219: 448-454.
- Lorsheyd A, de Lange DW, Hijmering ML, Cramer MJ, van de Wiel A. PR and OTc interval prolongation on the electrocardiogram after binge drinking in healthy individuals. *Neth J Med.* 2005; 63(2):59-63.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* 1999; 10(6):629-39.
- Louboutin JP, Marusich E, Gao E, Agrawal L, Koch WJ, Strayer DS. Ethanol protects from injury due to ischemia and reperfusion by increasing vascularity via vascular endothelial growth factor. *Alcohol.* 2012; 46(5):441-54.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Lozano GM, Bejarano I, Espino J, González D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev.* 2009; 55(6):615-2.
- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009; 284 (2): 723-27.
- Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(5): 723-38.
- Lu ZM, Tao WY, Zou XL, Fu HZ, Ao ZH. Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 110(1): 160-4.

Lucas DL, Brown RA, Wassef M, Giles TD. Alcohol and the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1916-1924.

Lucia CMD, Esteves de Oliveira FC, Oliveira DS, Abranches MV, Santos de Sales N, Bruonoro NS. Selênio: mais que um nutriente essencial, um nutrient functional. *Rev Bras Nutr Clin*. 2010; 25(1): 57-65.

M

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997; 190(2): 227-35.

Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298(2): 737-43.

Manzo-Avalos S, Saavedra Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(12): 4281-304.

Martinotti G, Lupi M, Carlucci L, Santacroce R, Cinosi E, Acciavatti T, Sarchione F, Verrastro V, Diotaiuti P, Petruccelli I, Ferrari S, Nanni MG, Pinna F, Volpe U, Saggino A, Janiri L, Leggio L, Di Giannantonio M. Alcohol drinking patterns in young people: A survey-based study. *J Health Psychol*. 2017; 22(14): 1889-1896.

Massey VL, Arteel GE. Acute alcohol-induced liver injury. *Front Physiol*. 2012; 3:193.

Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32(8): 595-603.

Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1780: 1368-1382.

Maulik N, Yoshida T, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis in ischemic reperfused mouse heart by glutathione peroxidase. *Mol Cell Biochem*. 1999; 196 (1-2): 13-21.

- Mchuronn EA, Harvey JT, Castellini JM, Stricker CA, O'Hara TM. Selenium and mercury concentrations in harbor seals (*Phoca vitulina*) from central California: health implications in an urbanized estuary. *Mar Pollut Bull.* 2014; 83: 48-57.
- Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009; 42(13-14):1331-46.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Prevención de los problemas derivados del alcohol: Primera Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España. 2008.
- Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, Batinic-Haberle I. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochem Biophys Acta.* 2012; 1822(5): 794-814.
- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010; 12(5):483-95.
- Molina ML, Giudici AM, Poveda JA, Fernández-Ballester G, Montoya E, Renart ML, Fernández AM, Encinar JA, Riquelme G, Morales A. Competing lipid-protein and protein-protein interactions determine clustering and gating patterns in the potassium channel from *Streptomyces lividans* (KcsA). *J Biol Chem.* 2015; 290: 25745-25755.
- Momoi T. Conformational diseases and ER stress-mediated cell death: apoptotic cell death and autophagic cell death. *Curr Mol Med.* 2006; 6(1):111-8.
- Moreno R, Cortés JR. Nutrición y alcoholism crónico. *Nutr Hosp.* 2008; 2:3-7.
- Moschos MP. Selenoprotein P. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(13-14):1836-45
- Mourad JJ. The evolution of systolic blood pressure as a strong predictor of cardiovascular risk and the effectiveness of fixed-dose ARB/CCB combinations in lowering levels of this preferential target. *Vas Health Risk Manag.* 2008; 4: 1315-1325.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland E, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:10339-10343.

Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mamm. Genome*. 1999; 10: 601–605.

Muse KE, Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW. Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *Histochem J*. 1994; 26(9):734-53.

N

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. *NIAAA Newsletter*. 2004; 3:3.

Navarro-Alarcon M, Cabrera Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*. 2008; 400(1-3): 115-41.

Nechifor MT, Dinu D. Ethanol-induced redox imbalance in rat kidneys. *J Biochem Mol Toxicol*. 2011; 25: 224-30.

Negro R. Selenium and thyroid autoimmunity. *Biologics*. 2008; 2(2): 265-73.

NIAAA Newsletter 3, 2004. https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf.

Nieminen MM. Renin-aldosterone axis in ethanol intoxication during sodium and fluid repletion versus depletion. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1983; 21: 552-557.

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.

Nogales, F., Ojeda, M.L., Delgado, M.J., Jotty, K., Diaz Castro, J., Murillo, M.L., Carreras, O. 2011. Effects of antioxidant supplementation on duodenal Se-Met absorption in ethanol-exposed rat offspring in vivo. *J. Reprod. Dev*. 57(6):708-14.

Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J.* 2000; 351:183-93.

Numminien H, Syrjala M, Benthin G, Kaste M, Hillbom M. The effect of acute ingestion of a large dose of alcohol on the hemostatic system and its circadian variation. *Stroke.* 2000; 31:1269-1273.

O

O'Keefe JH, Bhatti SK, Bajwa A, DiNicolantonio JJ, Lavie CJ. Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89(3): 382-393.

O'Keefe JH, Bybee KA, Lavie MD. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1009-1014.

Ojeda ML, Carreras O, Sobrino P, Murillo ML, Nogales F. Biological implications of selenium in adolescent rat exposed to binge drinking: Oxidative, immunologic and apoptotic balance. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2017b; 329: 165-172.

Ojeda ML, Jotty K, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid intakes improve the detrimental effects of ethanol on pups' selenium balance. *Fod Chem Toxicol.* 2010; 48 (12): 3846-91.

Ojeda ML, Nogales F, Jotty K, Barrero MJ, Murillo ML, Carreras O. Dietary selenium plus folic acid as an antioxidant therapy for ethanol-exposed pups. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2009; 86(6): 490-5.

Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid-supplemented diets ameliorate renal oxidation in ethanol-exposed pups. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012; 36(11): 1863-72.

Ojeda ML, Rua RM, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Binge drinking during adolescence disrupts se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015; 39: 818–826.

- Ojeda ML, 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 Alcohol*.2016; 51: 235–241.
- Ojeda ML, Vázquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol consumption by wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Int. J. Environ Res*. 2009; 6: 2139-2149.
- Ojeda ML, Nogales F, Membrilla A, Carreras O. Maternal Selenium status is profoundly involved in metabolic fetal programming by modulating insulin resistance, oxidative balance and energy homeostasis. *European Journal of Nutrition*.2018. *In press*
- Ojeda ML, Nogales F, Murillo L, Carreras O. The role of folic acid and selenium against oxidative damage from ethanol in early life programming: a review. *Biochem Cell Biol*. 2017a; 96(2):178-188.
- Okuno F, Arai M, Ishii H, Shigeta Y, Ebihara Y, Takagi S, Tsuchiya M. Mild but prolonged elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in alcoholics. *Alcohol*. 1986; 3(6):357-9.
- Olson GE, Whitin JC, Hill KEM Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, Deal J, Cohen HJ, Burk RF. Extracellular glutathione peroxidase (GPx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298(5): F1244-53.
- Omoto M, Imai T, Seki K, Nomura R, Nomoto K. Effects of long-term ethanol administration(1). Effects of long-term ethanol administration on kidney studied at several periods of time during the administration. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 1997; 32 (1): 27-45.
- 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 Pharmacol*. 1998; 30: 719-23.
- Organización Mundial de la Salud. Informe mundial de situación sobre alcohol y salud 2018. Informe de un grupo científico de la OMS. Ginebra: OMS; 2018.

Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(11):2411-22.

P

Panchenko LF, Pirozhkov SV, Popova SV, Antonenkov VD. Effect of ethanol and the catalase inhibitor aminotriazole on lipid peroxidation in the rat myocardium. *Biull Eksp Biol Med.* 1987; 103:407-10.

Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Dietz R, Morano I, Bader M, Ozcelik C. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiachypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One.* 2009; 4(8):e6743.

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(7): 775-806.

Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G. Selenoproteins and maternal nutrition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151(4):361-72.

Parada M, Corral M, Caamaño-Isorna F, Mota N, Crego A, Rodríguez Holguín S, Cadaveira F. Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking). *Adicciones.* 2011; 23(1): 53-63.

Patrick L. Selenium biochemistry and cáncer: a review of the literatura. *Altern Med Rev.* 2004; 9(3): 239-58.

Payne RL, Southern LL. Changes in glutathione peroxidase and tissue selenium concentrations of broilers after consuming a diet adequate in selenium. *Poult Sci.* 2005; 84: 1268-1276.

Peng FC, Tang SH, Huang MC, Chen CC, Kuo TL, Yin SJ. Oxidative status in patients with alcohol dependence: a clinical study in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(17-18): 1497-1509.

Pérez de la Cruz A, Abilés J, Castaño Pérez J. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. *Nutrición Clínica en medicina*. 2008; 2(2): 45-64.

Petersen KF¹, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med*. 2006; 119(5 Suppl 1):S10-6.

Piano MR, Mazzuco A, Kang M, Phillips SA. Cardiovascular consequences of binge drinking: an integrative review with implications for advocacy, policy, and research. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017; 487-496.

Pletcher MJ, Varosy P, Kiefe CI, Lewis CE, Sidney S, Hulley SB. Alcohol consumption, binge drinking, and early coronary calcification: findings from the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Epidemiol*. 2005 Mar 1;161(5):423-33.

Pronko P, Bardino L, Satanouskaya V, Kuzmich A, Zimetkin S. Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol- and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. *Alcohol Alcohol*. 2002; 37: 229-235.

protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007; 356: 893–898.

Puddey IB, Vandongen R, Beilin LJ, Rouse IL. Alcohol stimulation of rennin release in man: its relation to the hemodynamic, electrolyte, and sympatho-adrenal responses to drinking. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 61: 37-42.

Purusholham A, Xu Q, Li X. Systemic SIRT1 insufficiency results in disruption of energy homeostasis and steroid hormone metabolism upon high-fat-diet feeding. *FASEB J*. 2012; 26: 656-667.

Q

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

Qulali M, Ross RA, Crabb DW. Estradiol induces class I alcohol dehydrogenase activity and mRNA in kidney of female rats. *ARCH Biochem Biophys*. 1991; 288: 406-413.

R

Radi R. Biological antioxidant defenses. *Toxicol Ind Health*. 1993; 9(1-2):53-62.

Rayman MP, Clark LC. Selenium in cancer prevention. In: Rousel AM, Favier A, Anderson RA (eds). *Trace elements in man and animals 10: proceedings of the 10th international symposium on trace elements in man and animals*. Plenum Press pp, New York. 2000: 575-580.

Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012; 379(9822): 1256-68.

Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(15): 2457-78.

Ren J, Babcock SA, Li Q, Huff AF, Li SY, Doser TA. Aldehyde dehydrogenase-2 transgene ameliorates chronic alcohol ingestion-induced apoptosis in cerebral cortex. *Toxicol Lett*. 2009; 187: 149–156.

Ren J, Wold LE. Mechanisms of alcoholic heart disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008; 2(6): 497-506.

Reszka E, Jablonska E, Gromadzinska J, Wasowicz W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. *Genes Nutr*. 2012; 7(2): 127-37.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233:357-63.

Rintala J, Jaatinen P, Parkkila S, Sarviharju M, Kiianmaa K, Hervonen A, Niemelä O. Evidence of acetaldehyde-protein adducts formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol*. 2000; 35(5): 458-63.

Rivier C. Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanism of action and interactions with other stimuli. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 233: 357-63.

Roberfroid M, Buc-Calderon P. Free radical and oxidation phenomenon in a biological system. Marce Dekker Inc., New York, USA, 1995.

Rodrigo R, Novoa E, Thielemann L, Granata P, Videla L. Mechanism of enhancement of Na⁺K⁺-ATPase activity following chronic ethanol exposure. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1996. 46(1); 49-56.

- Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:409-422.
- Rodrigo R, Thielemann L, Olea L, Munoz P, Cereceda M, Orellana M. Effect of ethanol ingestion on renal regulation of water and electrolytes. *Arch Med Res.* 1998; 29(3): 209-18.
- Rodrigo R, Thielemann L. Effects of chronic and acute ethanol exposure on renal Na^+K^+ -ATPase in the rat. *Gen Pharmacol.* 1997; 29(5): 719-23.
- Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C, Orellana M, Thielemann L, Araya J. Changes in Na^+K^+ -adenosine triphosphatase activity and ultrastructure of lung and kidney associated with oxidative stress induced by acute ethanol intoxication. *Chest.* 2002; 121(2); 589-96.
- Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C, Orellana M, Thielemann L, Araya J. Changes in Na^+K^+ -adenosine triphosphatase activity and ultrastructure of lung and kidney associated with oxidative stress induced by acute ethanol intoxication. *Chest.* 2002; 121(2): 589-96.
- Rose AH, Hoffmann PR. Selenoproteins and cardiovascular stress. *Thromb Haemost.* 2015; 113(3): 494-504.
- Rothman A, Proverbio T, Proverbio F. Studies on the effect of ethanol on the Na^+ , and the Na^+K^+ -ATPase activities of plasma membranes of rat kidney proximal tubular cells. *Acta Cient Venez.* 1994; 45(4): 281-6.
- Rothman A, Proverbio T, Proverbio F. Studies on the effect of ethanol on the Na^+ , and the Na^+ , K (+)-ATPase activities of plasma membranes of rat kidney proximal tubular cells. *Acta Cient Venez.* 1994; 45(4): 281-6.
- Rua RM, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Romero-Gómez 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):158-63.
- Rupp H, Brilla CG, Maisch B. Hypertension and alcohol: central and peripheral mechanisms. *Herz.* 1996; 21: 258-264.

Russ R, Abdel-Rahman AR, Wooles WR. Role of the sympathetic nervous system in ethanol-induced hypertension in rats. *Alcohol*. 1991; 8:301-307.

S

Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K. Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem J*. 2004; 381 (Pt 3):841-6.

Salaspuro M. Inhibitors of alcohol metabolism. *Acta Med Scand Suppl*. 1985; 703:219-24.

Saleem MM, Al-Tammer YY, Skursky L, Al-Habbak Z. Alcohol dehydrogenases activity in the human tissue. *Biochem Med*. 1984; 31: 1-9.

Salvesen GS, Walsh CM. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. *Semin Immunol*. 2014; 26(3):246-52.

Sánchez A. Selenio y tiroides. *Glánd Tir Paratir*. 2009; 18: 40-5.

Sánchez-Pardo L. Consumo alcohólico e la población española. *Adicciones* 2002; 14: 79-97.

Sánchez-Pardo L. Situación actual y evolución de los consumos de drogas ilícitas en España. *Trast Adict*. 2001; 3: 85-94.

Sanchís M, Cuevas J, Sanchís MA. Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución genética del alcoholismo. *Adicciones*. 1999; 11 (2): 115-126.

Sanhuenza L, Concha L, Durruty P, Rubio C, Wolff C, García de los Ríos M. Type 1 Diabetics patients carriers of metabolic síndrome: quantification of insulin resistance. *Rev Chil Endocrinol Diabetes*. 2014; 7(3):89-93

Schomburg L, Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52(11):1235-46.

Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology*. 2000; 7: 25-32.

- Seale LA, Hashimoto AC, Kurokawa S, Gilman CL, Seyedali A, Bellinger FP, Raman AV, Berry MJ. Disruption of the selenocysteine lyase-mediated selenium recycling pathway leads to metabolic syndrome in mice. *Mol Cell Biol.* 2012; 32(20): 4141-54.
- Seifired HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(9): 567-79.
- Serrano A, Nogales F, Sobrino P, Murillo ML, Carreras O, Ojeda ML. Heart selenoproteins status of metabolic syndrome-exposed pups: A potential target for attenuating cardiac damage. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 2633–2641.
- Shubha GH, Warner JB, Warner DR, McClain CJ, Kirpich IA. Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Role of Binge Ethanol Administration. Received: 8 December 2017; Accepted: 11 January 2018; Published: 13 January 2018
- Shukla SD, Pruett SB, Szabo G, Arteel GE. Binge ethanol and liver: new molecular developments. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013; 37(4): 550-7.
- Simplicio JA, Hipólito UV, Vale GT, Callera GE, Pereira CA, Touyz RM, Tostes RC, Tirapelli CR. Acute Ethanol Intake Induces NAD(P)H Oxidase Activation and Rhoa Translocation in Resistance Arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 107(5):427-436.
- Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1743(1-2): 86-92.
- 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.
- Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(11): 1478-85.
- Sternberg F, Meyerhoff C, Mennel FJ, Hoss U, Mayer H, Bischof F, Pfeiffer EF. Calibration problems of subcutaneous glucosensors when applied "in-situ" in man. *Horm Metab Res.* 1994; 26(11): 523-5.

- Stipp D. Beyond resveratrol: the anti-aging NAD Fad. Sci Amer Blog Network. 2015: 1-10.
- Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84; 1381-1478.
- Su L, Jin Y, Unverzagt FW, Liang C, Cheng Y, Hake AM, Kuruppu D, Ma F, Liu J, Chen C, Bian J, Li P, Gao S. Longitudinal association between selenium levels and hypertension in a rural elderly Chinese cohort. *J Nutr Health Aging.* 2016; 20(10): 983-988.
- Suh YG, Jeong WI. Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(20): 2543-51.
- Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK. Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci Rep.* 2009; 29(5): 329-38.

T

- Tamargo J, Vaquero LM, Níñez L. Hipertension arterial. En: *Principios de Fisiopatología para la Atención farmacéutica.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (ed.) BGA Asesores. 2007. Madrid, pp: 295-313.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57 (3-4): 134-44.
- Taraschi TF, Ellingson JS, Rubin E. Membrane structural alterations caused by chronic ethanol consumption: the molecular basis of membrane tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 492:171-80.
- Teschke R, Moreno F, Petrides AS. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic alcohol consumption. *Biochem Pharmacol.* 1981; 30(13): 1745-51.
- Tian X, Hu Y, Li M, Xia K, Yin J, Chen J, Liu Z. Carnosic acid attenuates acute ethanol-induced liver injury via a SIRT1/p66Shc-mediated mitochondrial pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016; 94: 416–425.

Timon R, Olcina G, Maynar JI, Maynar M. Effects of regular and abusive intake of alcohol at weekends on physiological parameters in Spanish young. *Public Health*. 2012; 126(10): 873-80.

Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008 Mar; 13(2):102-8.

Tirapelli CR, Leone AF, Yogi A, Tostes RC, Lanchote VL, Uyemura SA, Resstel LB, Corrêa FM, Padovan CM, de Oliveira AM, Coelho EB. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60: 331-341.

Toborek M, Lee YW, Garrido R, Kaiser S, Hennig B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75(1): 119-25.

Tsuji S, Kawano S, Michida T, Masuda E, Nagano K, Takei Y, Fusamoto H, Kamada T. Ethanol stimulates immunoreactive endothelin-1 and -2 release from cultured human umbilical vein endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992; 16: 347-349.

U

Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 12.

Umoh NA, Walker RK, Al-Rubaiee M, Jefress MA, Haddas GE. Acute alcohol modulates cardiac function as PI3K/Akt regulates oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014; 38(7): 1847-1864.

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160: 1-40.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004; 266(1-2): 37-56.

- Valle BL, Bazzone TJ. Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.* 1983; 8: 219-244.
- Van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, Bache RJ, Duncker DJ, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(7): 1305-1313.
- Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003; 63(1):179-85.
- Vendemiale G, Lieber CS. Acute and chronic effects of ethanol on biliary secretion of bilirubin and bile acids. *Subst Alcohol Actions Misuse.* 1984; 5(6):307-17.
- Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(1):13-25.
- Verdin E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science.* 2015; 350: 1208-1213.
- Vinceti M, Mandrioli J, Borella P, Michalke B, Tsatsakis A, Finkelstein Y. Selenium neurotoxicity in humans: bridging laboratory and epidemiologic studies. *Toxicol Lett.* 2014; 230: 295-303.

W

- Wang Y, Zhao J, Yang W, Bi Y, Chi J, Tian J, Li W. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via PKC- β /p66Shc in mouse primary cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 456(2):656-61.
- Wang X, Abdel-Rahman AA. Effect of chronic ethanol administration on hepatic eNOS activity and its association with caveolin-1 and calmodulin in female rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 285:G579-G585.
- Wang X, Zhang W, Chen H, Liao N, Wang Z, Zhang X, Hai C. High selenium impairs hepatic insulin sensitivity through opposite regulation of ROS. *Toxicol Lett.* 2014; 224(1):16-23.

- Waskiewicz M, Swier K, Szajda SD. Salivary alcohol dehydrogenase in non-smoking and smoking alcohol-dependent persons. *Alcohol*. 2014; 48: 611-616.
- Wellman RJ, Vaughn JA, Sylvestre MP, O'Loughlin EK, Dugas EN, O'Loughlin JL. Relationships between current and past binge drinking and systolic blood pressure in young adults. *J Adolesc Health*. 2016; 58(3): 352-7.
- Wenk J, Schüller J, Hinrichs C, Syrovets T, Azoitei N, Podda M, Wlaschek M, Brenneisen P, Schneider LA, Sabiwalsky A, Peters T, Sulyok S, Dissemond J, Schauen M, Krieg T, Wirth T, Simmet T, Scharffetter-Kochanek K. Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxidemediated NFkappaB activation and interleukin-6 release. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 45634–45642.
- Whitin JC, Vaharme S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283:F20-F28.
- WHO: Global status report on alcohol and health, 2014. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/. 2014. 2. National Institute of Alcohol Abuse Alcoholism: NIAAA council approves definition of binge drinking.
- Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004; 5:214.
- Worthington DJ, Rosemeyer MA. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem*. 1974; 48(1):167-77.
- Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(4): 277-84.
- Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: S26-S29.
- Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr. Rev.* 2007; 28: 365–386.

Wurst FM, Kempter C, Metzger J, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol*. 2000; 20(2): 111-6.

X

Xu GL, Wang SC, Gu BQ, Yang YX, Song HB, Xue WL, Liang WS, Zhang PY. Further investigation on the role of selenium deficiency in the etiology and pathogenesis of Keshan disease. *Biomed. Environ. Sci.* 1997; 10: 316–326.

Y

Yang L, Wu d, Wang X, Cederbaum AI. Cytochrome P4502E1, oxidative stress, JNK, and autophagy in acute alcohol-induced fatty liver. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(5): 1170-80.

Yang M, Coles BF, Delongchamp R, Lang NP, Kadluban FF. Effects of the ADH₃, CYP2E1 and GSTP1 genetic polymorphism on their expressions in Caucasian lung tissue. *Lung Cander.* 2002; 38: 15-21.

Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol.* 2017. 23; 8:600.

Yang Z, Wang J, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Importance of extracellular Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ release in ethanol-induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. *Alcohol.* 2001; 24(3):145-53.

Yin SJ, Chov FJ, Chao SF, Tsai SF, Liao CS, Wang SL, Wu CW, Lee SC. Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagys: comparison with the stomach enzyme activities. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993; 13: 376-381.

Yogi A, Callera GE, Mecawi AS, Batalhao ME, Carnio EC, Antunes-Rofrigues J, Queiroz RH, Touyz RM, Tirapelli CR. Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat

aorta: a role for angiotensin type 1 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 264:470-478.

Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Magnenat JL, Rousou JA, Flack JE, Deaton D, Das DK. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation.* 1997; 96 (9 Suppl):II-216-20.

Yu HL, Yu QS, Pan JF. Effect of qihuang decoction on epithelial cell apoptosis of ischemia/reperfusion injured intestinal mucosa in rat. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2009; 29(12): 1096-9.

Z

Zakhari S. Alcohol and the cardiovascular system: molecular mechanisms for beneficial and harmful action. *Alcohol Health Res World.* 1997; 21(1): 21-29.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health.* 2006; 29(4): 245-54.

Zhai L, Ballinger SW, Messina JL. Role of reactive oxygen species in injury-induced insulin resistance. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(3):492-502.

Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl₄ rats. *Am J Chin Med.* 2004; 32(1):21-31.

Zhang Q, Chen L, Guo K, Zheng L, Liu B, Yu W, Guo C, Liu Z, Chen Y, Tang Z. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and oxidative capacity in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 154: 255-261.

Zhang X, Liu C, Guo J, Song Y. Selenium status and cardiovascular diseases: meta-analysis of prospective observational studies and randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2016; 70: 162–169.

Zhang Y, Post WS, Dalal D, Blasco-Colmenares E, Tomaselli GF, Guallar E. Coffee, alcohol, smoking, physical activity and QT interval duration: results from the

Third National Health and Nutrition Examination Survey. PLoS One. 2011; 6: e17584.

Zhang Z, Li S, Jiang H, Liu B, Lv Z, Guo C, Zhang H. Effects of selenium on apoptosis and abnormal amino acid metabolism induced by excess fatty acid in isolated rat hepatocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017; 61(9).

Zhou X, Wang F, Yang H, Chen J, Ren Y, Yuan Z, Wang X, Wang Y. Selenium-enriched exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 alleviate adipose inflammation in diabetic KKAY mice through the AMPK/Sirt1 pathway. *Mol Med Rep*. 2014; 9(2):683-8

Zima T, Fialová L, Mestek O, Janebová M, Crkovská J, Malbohan I, Spípek S, Mikulíková L, Popop P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*. 2001; 8(1): 59-70.

Zimatkin SM, Deitrich RA. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19(5):1300-6.

