

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efecto de la administración aguda de etanol sobre marcadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratón

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Guillem García Llorens

TUTOR UPV: José Salvador Vicente Antón

TUTORA UJI: Victoria Valls Bellés

Curso Académico: 2015-2016

Valencia, julio 2016



Título del TFG

Efecto de la administración aguda de etanol sobre marcadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratón

Titulación

Grado en Biotecnología

Fecha y localidad de lectura

Valencia, julio de 2016

Autor

Guillem García Llorens

Tutor UPV

José Salvador Vicente Antón

Tutora UJI

Victoria Valls Bellés

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto es determinar, en el cerebro de ratón, el posible daño oxidativo en biomoléculas tras la administración aguda de etanol. Si este daño es detectable, también se pretende aseverar que es el acetaldehído, un metabolito del etanol, el causante de este daño.

El alcohol es una sustancia psicoactiva ampliamente consumida y culturalmente aceptada en casi todo el mundo. Tras su ingesta, se producen en el individuo alteraciones tanto motoras como conductuales. A largo plazo, el consumo habitual de bebidas alcohólicas está relacionada con enfermedades (neurológicas, cardiovasculares y hepáticas, entre otras) y puede generar dependencia y síndrome de abstinencia.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 5,9 % de los fallecimientos mundiales están relacionados con el alcohol. El etanol es transformado a acetaldehído, un compuesto altamente tóxico y al que se le atribuyen los efectos nocivos del alcohol. Esto se debe a su poder carcinógeno y capacidad de interacción con otras moléculas. En el cerebro, el acetaldehído es generado mayoritariamente por la enzima catalasa y es capaz de interaccionar con neurotransmisores. También genera un ambiente de estrés oxidativo neuronal debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionará daños a las biomoléculas.

Para hacer frente a la acción tóxica de estos radicales libres, los organismos presentan un sistema de defensa antioxidante formado por moléculas con actividad antioxidantes y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

En este proyecto, mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo, se pretende averiguar si se produce daño oxidativo tras la administración aguda de etanol en cerebro de ratón. El hecho de realizar una administración aguda y no crónica, corresponde al interés por la extrapolación de los resultados en población joven, caracterizada por un consumo puntual de grandes cantidades de alcohol. Por otra parte, se ha elegido un agente farmacológico que modifica la actividad del acetaldehído, la D-penicilamina. El uso de este fármaco tiene como objetivo esclarecer si es el acetaldehído y no el etanol el causante del daño oxidativo neuronal, en el caso de que la administración aguda lo ocasionase.

Palabras clave

Acetaldehído, estrés oxidativo, D-penicilamina, grupos carbonilo, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión peroxidasa (GPx)

ABSTRACT

The purpose of the current project is to determine the possible oxidative damage in biomolecules after the acute administration of ethanol in the brain of mice. If this damage is detectable, another purpose is to assert that it is produced by the acetaldehyde, a metabolite of ethanol.

Alcohol is a psychoactive substance widely consumed and culturally accepted in almost all the world. After its ingestion, motor and behavioural alterations are produced in the individual. In long term, the regular consumption of alcoholic beverages is related to diseases (neurological, cardiovascular and hepatic, among others) and can produce alcohol dependence and withdrawal symptoms.

According to the World Health Organization (WHO), 5.9% of global deaths are related to alcohol. Ethanol is converted into acetaldehyde, a highly toxic compound and the cause of the harmful effects of alcohol. This is due to its carcinogenic potential and its ability to interact with other molecules. In the brain, acetaldehyde is generated mainly by the enzyme catalase and it is able to interact with neurotransmitters. Also, it generates a neuronal and oxidative stress environment, due to the generation of reactive oxygen species (ROS) which causes biomolecular damage.

To cope with the toxic action of these free radicals, organisms have an antioxidant defence system formed by molecules with antioxidant activity and enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT).

In this project, through the analysis of oxidative stress markers, we want to find out whether oxidative damage occurs after an acute ethanol administration into a mouse's brain. The fact of an acute administration, and not chronic, is to extrapolate these results with the habits of alcohol consumption in young people. Nowadays, youth consumption is being occasional and of large amounts of alcohol. Furthermore, we have chosen a pharmacological agent to modify the activity of acetaldehyde, the D-penicillamine. If the acute administration causes neuronal oxidative damage, another objective of the project is to clarify through this drug, whether it is produced by the acetaldehyde and not by the ethanol.

Key words

Acetaldehyde, oxidative stress, D-penicillamine, carbonyl groups, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione peroxidase (GPx)



AGRAÏMENTS

En principi, m'agradaria donar les gràcies a el departament de Biologia de l' IES Politècnic de Castelló, ja que teniu part de la culpa de que haja estudiat Biotecnologia.

També m'agradaria agrair als professors de l'UPV per aquestos anys d'ensenyament tant exigents. I en especial a Jose com a tutor, per les facilitats ficades per al TFG.

En segon lloc també agrair al departament de medicina de l'UJI per haver-me acollit i poder realitzar aquestes pràctiques. A María, a Juanvi amb la seua peculiar forma d'entendre la investigació, a Pablo per haver-me ensenyat tantes coses de ciència i a Victoria per compartir tants cafès i haver-me cuidat i ajudat tant.

També agrair als meus amics del cole, insti, handbol, conservatori, banda... i com no als meus pares, germans, tios y cosins simplement per aguantar-me, que no es poca cosa. Finalment dedicar aquest treball al meu abuelo Pepe per la seua saviesa i fortalesa. Igualment dedicar aquest treball a aquells que ja no estan: els abuelos de València Bienvenida y Benjamín, en els que m'haguera agradat compartir més temps, y especialment amb la abuela Carmen, a la que tantes coses li dec.

GRÀCIES A TOTS.

ÍNDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>1.1 EL ESTRÉS OXIDATIVO</u>	2
1.1.1 LOS RADICALES LIBRES	2
<u>1.1.1.1 ROS de origen endógeno</u>	3
<u>1.1.1.2 ROS de origen exógeno</u>	5
1.1.2 DAÑO A MACROMOLÉCULAS Y ENZIMAS	5
1.1.3 DEFENSAS ANTIOXIDANTES	6
<u>1.1.3.1 Sistema antioxidante enzimático</u>	8
<u>1.1.3.2 Sistema antioxidante no enzimático</u>	10
<u>1.1.3.3 Sistemas reparadores</u>	11
1.1.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS A ROS	11
<u>1.1.4.1 Enfermedades hepáticas</u>	11
<u>1.1.4.2 Enfermedades neurodegenerativas</u>	12
<u>1.1.4.3 Cáncer</u>	13
<u>1.1.4.4 Otras enfermedades</u>	15
<u>1.2 EL ALCOHOL</u>	15
1.2.1 METABOLISMO DEL ETANOL	16
<u>1.2.1.1 Oxidación del etanol</u>	17
<u>1.2.1.2 Oxidación del acetaldehído</u>	18
<u>1.2.1.3 Productos del metabolismo del etanol</u>	18
1.2.2 PAPEL DEL ACETALDEHÍDO	19
<u>1.2.2.1 Efectos fisiológicos</u>	19
<u>1.2.2.2 Efectos en el cerebro</u>	19
<u>1.2.2.3 Fármacos moduladores del acetaldehído</u>	20
1.2.3 GENÉTICA Y ALCOHOLISMO	21
1.2.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ALCOHOL	22
<u>1.2.4.1 Enfermedades neuropsiquiátricas</u>	23
<u>1.2.4.2 Enfermedades gastrointestinales</u>	24

1.2.4.3 Cáncer.....	26
1.2.4.4 Enfermedades cardiovasculares	26
1.2.4.5 Otras enfermedades.....	27
<u>1.3 RELACIÓN ALCOHOL Y ROS</u>	27
<u>2. OBJETIVOS</u>	29
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	31
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
3.2 APARATOS.....	32
3.3 REACTIVOS.....	33
3.4 MÉTODOS.....	33
3.4.1 Tratamiento de las muestras.....	33
3.4.2 Determinación de proteínas.....	33
3.4.3 Determinación del contenido de grupos carbonilo <u>en proteínas plasmáticas</u>	33
3.4.4 Determinación de las sustancias que reaccionan con <u>el ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u>	34
3.4.5 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa <u>en cerebro de ratón</u>	34
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	35
<u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	36
4.1 RESULTADOS.....	37
4.1.1 Daño inducido a macromoléculas.....	37
4.1.2 Defensa antioxidante enzimática: niveles <u>de glutatión peroxidasa</u>	38
4.2 DISCUSIÓN.....	40

5. CONCLUSIÓN.....-42

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....-44

7. ANEXOS.....-52

Comunicación en Congreso ISAHN Antioxidants (2015). Ethanol-induced
oxidative stress in mouse brain: role of acetaldehyde..... 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental realizado.....	30
Tabla 2. Niveles de contenido en grupos carbonilo tras la administración aguda de etanol..	34
Tabla 3. Niveles de TBARS tras la administración aguda de etanol.....	35
Tabla 4. Niveles de glutatión peroxidasa tras la administración aguda de etanol.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación y estructura de las especies reactivas del oxígeno.....	2
Figura 2. Representación de la cadena respiratoria mitocondrial.....	3
Figura 3. Balance entre la generación de radicales libres y su eliminación.....	6
Figura 4. Esquema del sistema Nrf2/Keap1	7
Figura 5. Representación de la secuencia genética, estructura y ligandos de las SOD.....	8
Figura 6. Proceso de oxidación del glutatión.....	10
Figura 7. Consecuencias del estrés oxidativo en hígado.....	12
Figura 8. Comparación entre una neurona sana y otra en estado degenerativo por el AD.....	13
Figura 9. Evolución de los niveles de ROS en un proceso de transformación maligna celular.....	14
Figura 10. Distribución de los fallecimientos atribuibles al consumo de alcohol.....	16
Figura 11. Transformación del etanol a acetato en hígado.....	16
Figura 12. Rutas oxidativas del metabolismo del etanol.....	18
Figura 13. Estructura molecular del salsolinol.....	19
Figura 14. Estructura química de la D-penicilamina.....	20
Figura 15. Reacción de enrojecimiento o “Asian flushing reaction”	21
Figura 16. Porcentaje acumulativo de sufrir dependencia alcohólica con la edad.....	22
Figura 17. Distribución de los DALYs atribuibles al consumo de alcohol.	23
Figura 18. Comparación de dos cerebros de hombres adultos.	24
Figura 19. Imagen microscópica celular del tejido hepático conforme avanza la ALD.....	25
Figura 20. Niveles de expresión de CYP2E1 en ratones.....	27
Figura 21. Formación de ROS a partir del alcohol y efecto en el balance de Ca ²⁺	28
Figura 22. Niveles de contenido en grupos carbonilo en cerebro de ratón.....	37
Figura 23. Niveles de TBARS en cerebro de ratón.....	38
Figura 24 . Niveles de glutatión peroxidasa en cerebro de ratón.....	39

ABREVIATURAS

AD	Enfermedad de Alzheimer
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH1B	Alcohol deshidrogenasa citosólica del hígado
ALD	La hepatopatía alcohólica
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDH2	Acetaldehído deshidrogenasa mitocondrial
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
AUDs	Trastornos por el consumo de alcohol
BAC	Concentración de alcohol en sangre
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CSC	Células madres del cáncer
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DALYs	Años de vida ajustados por discapacidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTAc	Etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HCl	Ácido clorhídrico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL_{ox}	Lipoproteína lipídica de baja densidad oxidada
MDA	Malondialdehído
MS	Esclerosis Múltiple
mtDNA	DNA mitocondrial
n	Número de muestra
NAD⁺	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NIAAA	National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
NIH	National Institutes of Health
NOX	NADPH oxidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino

PD	Enfermedad de Parkinson
PRXs	Peroxirredoxinas
QH2	Ubiquinol
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROOH	Hidroperóxidos orgánicos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UV/Vis	Ultravioleta / Visible
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxido-reductasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
O₂⁻	Ion superóxido
·OH	Radical hidroxilo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL ESTRÉS OXIDATIVO

1.1.1 LOS RADICALES LIBRES

Se define como radical libre a cualquier molécula, átomo o ion que contenga algún electrón desapareado en su orbital exterior, es decir, en un nivel energético superior. Debido a sus características y propiedades paramagnéticas, son especies altamente reactivas ya que cederán o atraerán electrones de las moléculas de su entorno. Estas moléculas se transformarán en radicales libres e interaccionarán a su vez y de forma indiscriminada con otras moléculas generando una reacción en cadena.

Existen varios tipos de radicales libres según la molécula procedente, aunque destacan los que provienen del oxígeno. Debido a la actuación fundamental del oxígeno en el metabolismo aerobio, se generan estas especies reactivas del oxígeno (ROS), dotadas de una alta reactividad. Los radicales libres derivados del nitrógeno o especies reactivas del nitrógeno (RNS), juegan un papel importante en la señalización celular, vasodilatación y la respuesta inmune (Dhawan, 2014). También existen otros radicales derivados del hidrógeno, carbono, azufre...

En los procesos oxidativos celulares, a partir del oxígeno molecular (O_2) se derivan el resto de ROS destacando el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, como se muestra en la figura 1. También existen otros radicales derivados del oxígeno como el radical alcoxilo ($RO\cdot$) y el radical peroxilo ($ROO\cdot$).

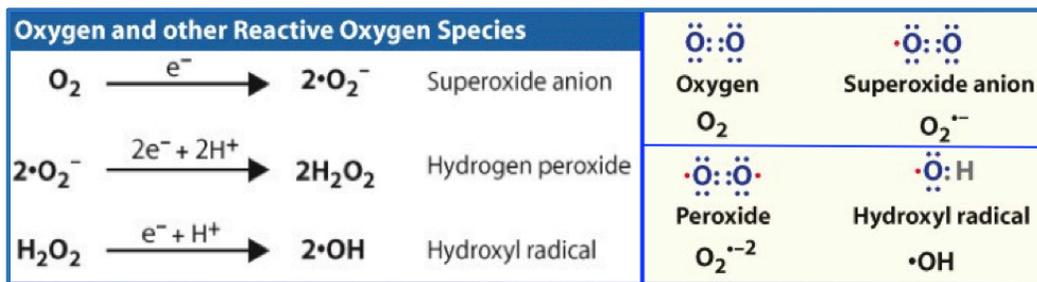


Figura 1. Formación y estructura de las especies reactivas del oxígeno.

(sites.duke.edu/rise)

A continuación, se destacará el papel que juega el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo en los procesos de estrés oxidativo celular según López (2013):

Ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El superóxido es el radical más común ya que es el producto de distintas reacciones enzimáticas y no enzimáticas en las que interviene el O_2 . Se forma debido a la reducción univalente del O_2 y aunque es poco reactivo, es capaz de iniciar reacciones que dan lugar a otras especies más reactivas y tóxicas. El superóxido se convierte en condiciones fisiológicas rápidamente a peróxido de hidrógeno.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Pese a no ser un radical libre en sí, tiene un gran capacidad de difusión a través de las membranas, por lo que puede interaccionar con componentes lejanos al lugar de su formación.

1. Introducción

Además, será el sustrato de varias enzimas como la catalasa, la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas.

Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Finalmente se formará la especie derivada de oxígeno con mayor reactividad como es el radical hidroxilo. Debido a esta característica, tiene una vida media muy corta (10^{-9} s) por lo que reaccionará cerca de donde se ha generado y contra cualquier molécula orgánica o inorgánica.

Según su origen, las especies reactivas del oxígeno, se pueden clasificar en endógeno si son generados por la propia célula o exógeno, según indica Frei (1994).

1.1.1.1 ROS de origen endógeno

a) Mitocondria

Este orgánulo es el principal productor de ROS en su cadena respiratoria durante el transporte electrónico. Como se observa en la figura 2, esta cadena está formada por cuatro complejos proteicos, que se encargan de generar un gradiente de protones (H^+) para la síntesis final de ATP por parte de la ATP-sintasa. El transporte de electrones está acoplado a la translocación de H^+ en los complejos I, III y IV. El proceso empieza por la oxidación de NADH en el complejo I o por la oxidación de FADH_2 en el complejo II. Los complejos están formados por grupos prostéticos capaces de aceptar y ceder uno o dos electrones. El complejo IV o citocromo c oxidasa será el encargado de la reducción tetravalente del O_2 a H_2O .

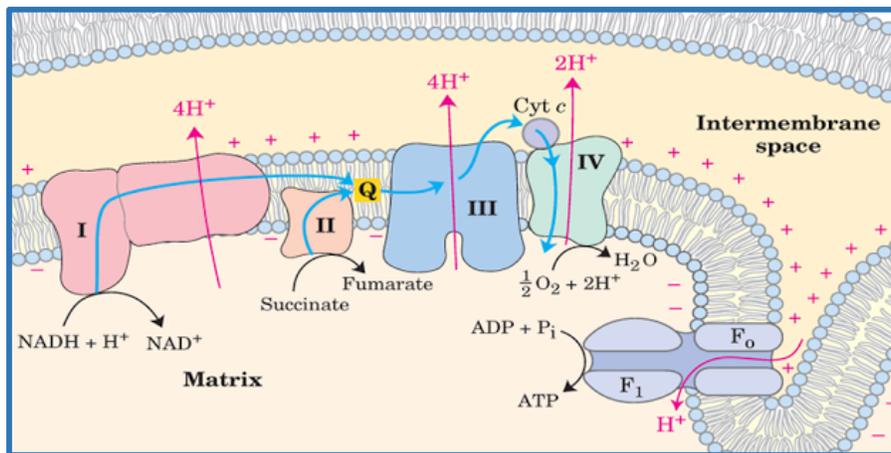


Figura 2. Representación de la cadena respiratoria mitocondrial.
(Lehninger Principles of Biochemistry, 4^a edición)

Más del 90% del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por el complejo IV sin formación de ROS. Pero una pequeña parte del oxígeno será consumido parcialmente vía 1 electrón convirtiéndose en el radical O_2^- y posteriormente en los productos de su transformación (Lushchak, 2014). Este proceso sucede sobretodo en los complejos I y III, ya que durante el transporte, los electrones pueden escapar del grupo flavina o hierro-azufre y ser capturado por el O_2 .

b) Retículo endoplasmático

También se forman estos radicales en el retículo endoplasmático celular, ya que presentan un transporte electrónico no fosforilante en los microsomas. Este sistema se encuentra sobretodo en las células del hígado cuya principal función es la eliminación de productos endógenos y compuestos exógenos como fármacos, carcinógenos y xenobióticos. Múltiples isozimas citocromo p450 serán las encargadas de este proceso de detoxificación que consiste en la incorporación de un átomo de oxígeno en la estructura del compuesto orgánico. El proceso es muy parecido al que ocurre en la cadena respiratoria mitocondrial con la oxidación del NADPH y la entrada de los dos electrones a una flavoproteína que posteriormente los transferirá a la citocromo p450. Pero al igual que ocurre en la mitocondria, la eficiencia en el proceso de transferencia de los electrones o grado de acoplamiento no es del 100%. Por lo que esos electrones pueden ser captados por una molécula de oxígeno formando ROS (Zangar *et al.*, 2004).

c) Sistema inmune

Las células inmunes con actividad fagocitaria como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y algunas células pulmonares generan ROS como mecanismos de defensa contra los microorganismos patógenos. Cuando un microorganismo es fagocitado, la enzima NADPH oxidasa (NOX) será la encargada de la generación de superóxido dentro del fagosoma para su eliminación. Además ROS actúa como una señal quimioatrayente para neutrófilos u otros moduladores de la respuesta inmune debido a su fácil difusión a través de las membranas. Las ROS también son capaces de promover la autofagia para la eliminación de aquellos patógenos intracelulares (Paiva & Bozza, 2014).

d) Peroxisomas

También se producen ROS en los peroxisomas, que son orgánulos celulares que presentan una gran variedad de enzimas tipo oxidoreductasas y que producen peróxido de hidrógeno como subproducto. Son fundamentales en el metabolismo de los lípidos, acortando las cadenas de los ácidos grasos en la β -oxidación y oxidando el colesterol.

e) Sistemas Oxidasa

La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa y son fuentes representativas de esta producción. Como ejemplo cabe destacar, la xantina oxido-reductasa (XOR) que es una enzima fundamental en el catabolismo de purinas. Esta enzima se presenta en dos estados: deshidrogenasa (XDH) y oxidasa (XO). La diferencia radica en el aceptor final de electrones siendo NAD^+ para la forma deshidrogenasa y O_2 para la forma oxidada. Esta última forma, será la causante de la formación de superóxido (Robert & Robert, 2014).

Ante condiciones de hipoxia, se produce una activación de la expresión génica de la forma oxidada. A parte, la forma reducida cuya proporción es del 70-90% podrá sufrir oxidaciones en los grupos tiol pasando también a la forma oxidada. Por tanto, se aumenta la producción de superóxido y el nivel de estrés oxidativo celular ante estados de hipoxia (Diana, 2005).

1. Introducción

d) Otras enzimas

Hay otras enzimas que contribuyen a la formación de ROS, como las enzimas citosólicas catalíticas aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa. También las enzimas unidas a la membrana plasmática lipooxigenasa y ciclooxigenasa generan ROS (López, 2013).

1.1.1.2 ROS de origen exógeno

Dentro de las fuentes de ROS de origen exógeno destacan las ambientales, nutricionales y farmacológicas.

En las ambientales, destacamos la producción de ROS debido a las radiaciones ionizantes que ocasionan un proceso de radiólisis del agua. También existen otras fuentes como el tabaco, hidrocarburos aromáticos, contaminación (partículas ultrafinas)... Estos agentes ambientales pueden poseer *per se* radicales libres o convertirse en radicales tras intervenir en el metabolismo celular o procesos de detoxificación.

Las nutricionales se deben a contaminaciones en los alimentos, grasas saturadas...

Finalmente las farmacológicas se deben a los xenobióticos y drogas que son metabolizadas directamente o detoxificadas por activación de mecanismos endógenos con la consiguiente producción de ROS (López, 2013).

Aunque haya una visión negativa de los radicales libres, también tienen su papel en funciones de señalización y modulación de la expresión génica. Además algunos autores como Park *et al.* (2011), consideran que es cuestión de dosis el efecto beneficioso o perjudicial de las especies reactivas de oxígeno, destacando su papel fundamental como segundos mensajeros, como activadores de procesos celulares a bajas concentraciones y como defensa contra los microorganismos patógenos.

1.1.2 DAÑO A MACROMOLÉCULAS Y ENZIMAS

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1985). Por tanto, este fenómeno se puede producir ante un incremento de las especies prooxidantes, cuando se disminuya la cantidad de especies antioxidantes o bien cuando ocurran ambas a la vez. Este desequilibrio, pondrá en riesgo la viabilidad celular debido a la alteración de su estructura y pérdida funcional de las distintas biomoléculas y enzimas celulares. A continuación describiremos el efecto de estas especies oxidantes sobre las distintas biomoléculas:

a) Daño a glúcidos

Los glúcidos no se ven gravemente afectados tras la exposición a ROS, ya que los monosacáridos y disacáridos resisten a la acción de las especies reactivas del oxígeno. Es más, la glucosa es capaz de secuestrar el radical superóxido impidiendo así sus efectos sobre otras biomoléculas (López, 2013). El principal daño se produciría en los polisacáridos estructurales por procesos de despolimerización.

b) Daño a proteínas

Los aminoácidos son susceptibles de ser oxidados por ROS, sobretodo a nivel de la cadena lateral y en concreto en los residuos de cisteína y metionina. De esta manera, se pueden formar

entrecruzamientos de las cadenas, fragmentaciones o la formación de los grupos carbonilo que afecta a la funcionalidad de la proteína al alterar su conformación (Ponczek & Wachowicz, 2005).

c) Daño a Lípidos

La acción de ROS sobre los lípidos, se llama peroxidación, siendo su producto final el malondialdehído (MDA). Este proceso de oxidación ocurre en membranas, afectando a su fluidez, permeabilidad y conductividad (Pamplona, 2008). La peroxidación también sucede en lipoproteínas como la LDL y en el colesterol. Los ácidos grasos poliinsaturados serán los más vulnerables a este proceso de peroxidación debido a sus dobles enlaces.

d) Daño al DNA

El radical hidroxilo reacciona con las bases nucleotídicas, afectando a su estructura y induciendo un primer paso en la mutagénesis ya que durante la replicación celular, el nucleótido afectado inducirá a error a la DNA polimerasa. También se ha de destacar que el DNA mitocondrial (mtDNA) es más susceptible al daño oxidativo que el nuclear (Richter *et al.*, 1988). Esto es debido a que la mitocondria es el principal productor de estas especies oxidantes y por ende, su DNA se ve ampliamente afectado. También se debe a que su sistema de reparación es menos eficiente debido a la ausencia de histonas entre otros.

1.1.3 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos han desarrollado un sistema formado por enzimas y otras moléculas antioxidantes encargadas de disminuir o inhibir la oxidación celular al ser capaces de eliminar o transformar estos radicales libres en moléculas más estables.

En cualquier tejido u órgano, existe una homeostasis entre las especies de oxígeno que se generan y las que se eliminan mediante sistemas de defensa antioxidante, tal como se observa en la figura 3.

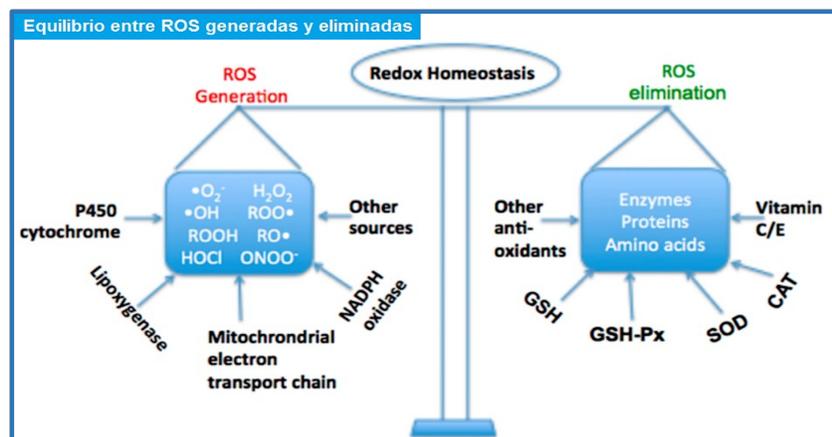


Figura 3. Balance entre la generación de radicales libres y su eliminación.
(Li *et al.*, 2015)

1. Introducción

Un desequilibrio en este balance podría conllevar a un estado patológico del tejido. Tal desequilibrio puede deberse a un incremento en el nivel de oxidantes tanto exógenos como endógenos, a una pérdida de las reservas de moléculas antioxidantes, a la inactivación de las enzimas antioxidantes o por un descenso en la síntesis de estos compuestos (Lushchak, 2014).

Las células poseen un complejo sistema de respuesta adaptativa ante la exposición a ROS. Normalmente estos sistemas se componen por moléculas que actúan como sensores y que se encuentran al citosol. Cuando son oxidadas o modificadas, migrarán al núcleo celular y actuarán como factores de transcripción sobrerregulando genes encargados de la defensa antioxidante.

El ejemplo más significativo es el del sistema Nrf2/Keap1, detallado en la figura 4:

En condiciones normales (A), los niveles del factor de transcripción Nrf2 se mantienen bajos ya que se degrada constantemente vía proteosoma. En este proceso, Nrf2 interactúa inicialmente con el homodímero Keap1 en el citosol. Seguidamente, Keap1 interactuará con Cul3 que actúa como núcleo estructural para la acción de la enzima E3 ubiquitín ligasa. De esta forma se consigue que la proteína Nrf2 sea ubiquitinada para su degradación por el proteosoma (B) evitando así su excesiva acumulación y actividad como factor de transcripción.

En cambio, ante unas condiciones de estrés oxidativo (C), la actividad de Keap1 se ve disminuida, ya que sus residuos de cisteína que interactúan con Nrf2 y Cul3 son vulnerables a la oxidación. Esto, impediría la unión con Cul3 (E) o dificultaría la interacción con Nrf2 (D). Al reducir la tasa de destrucción de Nrf2 se producirá una acumulación y posterior migración al núcleo interactuando con una pequeña proteína Maf. Ya en el núcleo (F), el heterodímero Nrf2/Maf actuará como factor de transcripción dirigiéndose específicamente a regiones de genes que contienen elementos de respuesta ante estrés oxidativo, incluyendo muchos antioxidantes, enzimas de detoxificación, transportadores ABC... (Canning *et al.*, 2015)

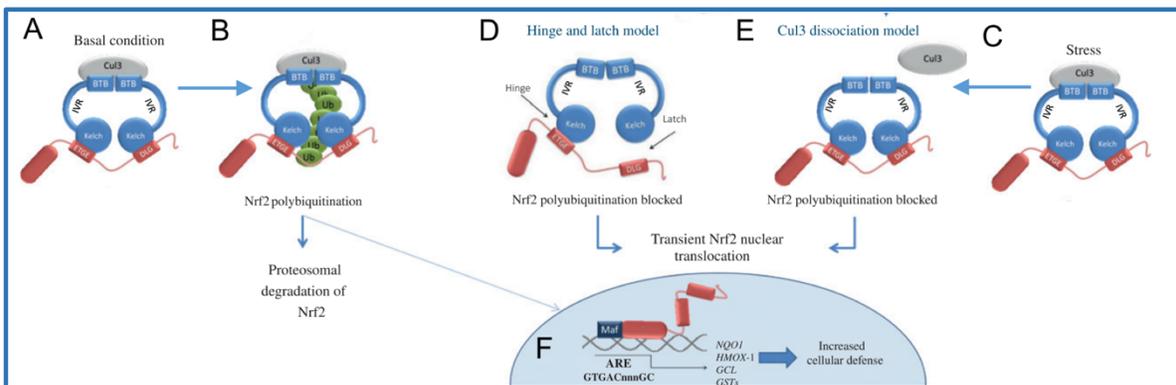


Figura 4. Esquema del sistema Nrf2/Keap1. En rojo se presenta el factor de transcripción Nrf2 y en azul la proteína Keap1 (Kansanen *et al.*, 2013).

El proceso anterior sucede en niveles bajos de ROS, pero ante niveles moderados se activarán otras vías de señalización como las MAP kinasas, que a parte de incrementar la síntesis de enzimas antioxidantes, inducirán la síntesis de proteínas inflamatorias y de choque térmico (heat shock proteins).

Finalmente unos niveles altos de ROS activarán vías de necrosis o apoptosis celular a través de la transición de permeabilidad mitocondrial (Lushchak, 2014).

A nivel fisiológico, los organismos, para protegerse de las especies oxidantes, mantienen reducidas las presiones parciales de O₂ (pO₂).

A nivel bioquímico, presentan tres tipos de sistemas detallados a continuación:

1.1.3.1 Sistema antioxidante enzimático

Dentro de las enzimas antioxidantes, destacamos la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas.

a) Superóxido Dismutasa (SOD):

La SOD cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno.



Existen diversos tipos de SOD, descritos en Fukay & Ushio-Fukay (2011) y que seguidamente se mostrarán sus características y similitudes, observables en la figura 5:

-SOD1 se encuentra mayoritariamente en el citosol y es la isoforma más abundante en la célula. Es dependiente de cobre (Cu) por su actividad catalítica y del zinc (Zn) ya que aporta estabilidad al actuar en su plegamiento. Este último elemento se puede remplazar por cobalto (Co) o cobre.

-SOD2 se encuentra en la mitocondria y es dependiente del Manganeseo (Mn). Pese a que es sintetizada en el citoplasma, presenta en el extremo N-terminal un péptido señal que lo transportará a la mitocondria. Su secuencia genética no presenta homología con SOD1 y SOD3. En cambio, su secuencia es similar a la SOD dependiente del hierro (Fe), ausente normalmente en eucariotas pero presente en bacterias.

-SOD3 se halla en el espacio extracelular y es dependiente de Cu y Zn. El dominio activo de SOD1, está presente en SOD3, pero además muestra un péptido señal para su secreción en el extremo N- terminal y un sitio de glicosilación. En la región C-terminal presenta un sitio de unión a heparina. Este tipo de SOD se expresa altamente en tejidos como vasos sanguíneos, pulmones, riñones y en menor medida en el corazón.

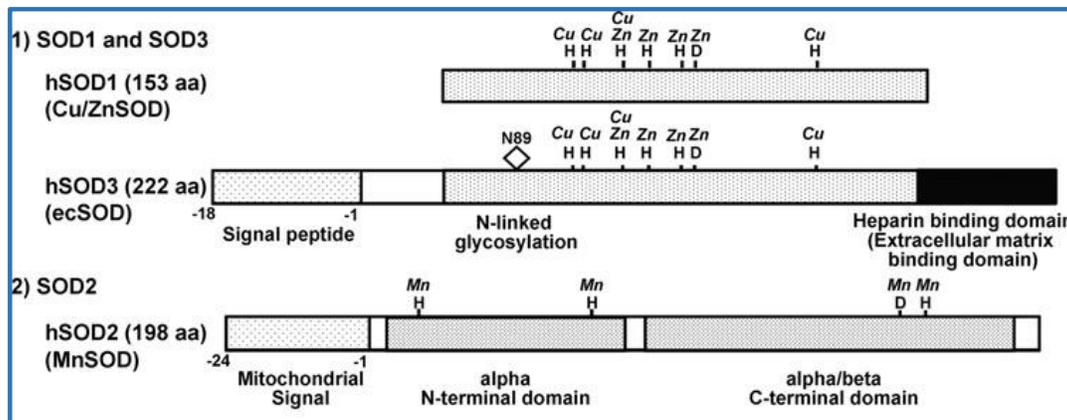
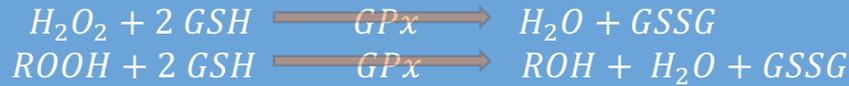


Figura 5. Secuencia genética, estructura y ligandos de los diferentes tipos de SOD. (Fukay & Ushio-Fukay, 2011)

1. Introducción

b) Glutati3n Peroxidasa (GPx)

La glutati3n peroxidasa (GPx) cataliza la reducci3n del per3xido de hidr3geno y los hidroper3xidos org3nicos (ROOH) hasta agua y alcohol, respectivamente. Esta reacci3n necesita un segundo sustrato, es decir, va acoplada a la oxidaci3n del glutati3n reducido (GSH).



El glutati3n oxidado (GSSG) no tiene ninguna funci3n protectora ante radicales libres, por lo que ha de ser nuevamente transformado en glutati3n reducido. Esta reacci3n es catalizada por la enzima glutati3n reductasa (GR) necesitando NADPH.



El ratio GSH:GSSG es usado como marcador de estr3s celular. En celular normales, el ratio es de alrededor de 100:1 (Zitka *et al.*, 2012). Existen distintas isoformas de GPx y se clasifican seg3n su lugar o tejido de expresi3n. A diferencia de otros tipos de peroxidasa, la GPx usa como factor el selenio (Se), a excepci3n de la GPx5 que es seleno-independiente (OLALLA & MAT3S).

c) Catalasa (CAT)

La catalasa, al igual que la GPx, act3a transformando el per3xido de hidr3geno en agua y ox3geno. A diferencia de la anterior, esta reacci3n no va acoplada a la oxidaci3n de un segundo sustrato.



La catalasa es una hemoprote3na ya que necesita de la uni3n de Fe³⁺ para su actuaci3n y se encuentra sobretodo en los peroxisomas. Otra diferencia a destacar entre ambas enzimas, es su grado de afinidad por el per3xido. En general, la glutati3n peroxidasa es la principal encargada de la detoxificaci3n del per3xido, ya que presenta una mayor afinidad que la catalasa. Por tanto, ante bajos niveles de ROS se destaca la acci3n de GPx. La catalasa, debido a su menor afinidad por el H₂O₂, ser3 fundamental en casos de estr3s oxidativo severo o intoxicaci3n donde existe una alta concentraci3n de H₂O₂ (OLALLA & MAT3S).

d) Peroxirredoxinas (PRXs)

Recientemente se han descubierto una familia de peque3as peroxidasa fundamental en la defensa antioxidante como son la peroxirredoxinas. Son importantes secuestradores de radicales libres *in vivo* (Halliwell, 2012). Adem3s, la modulaci3n de los sitios catal3ticos de esta enzima se relacionan con la funci3n se3alizador de per3xido de hidr3geno. La inactivaci3n transitoria de PRXs I mediante su fosforilaci3n, permite la acumulaci3n de H₂O₂ alrededor de las membranas celulares para realizar procesos de se3alizacion (Woo *et al.*, 2010).

1.1.3.2 Sistema antioxidante no enzimático

Dentro del sistema de defensas antioxidantes no enzimáticos, se encuentran distintas moléculas destacando el glutatión reducido y las vitaminas E y C.

a) Glutatión reducido (GSH)

Se trata de una molécula formada por tres péptidos: glutamato, cisteína y glicina. Se sintetiza en el hígado y será usada como sustrato por la glutatión peroxidasa (GPx) pasándola a su estado oxidado (GSSG). La forma oxidada se produce por la unión de dos moléculas de GSH entre sus cisteínas formando un puente disulfuro, tal y como se muestra en la figura 6. Además los 2 electrones producidos en la reacción serán los causantes de procesos antioxidantes o detoxificantes.

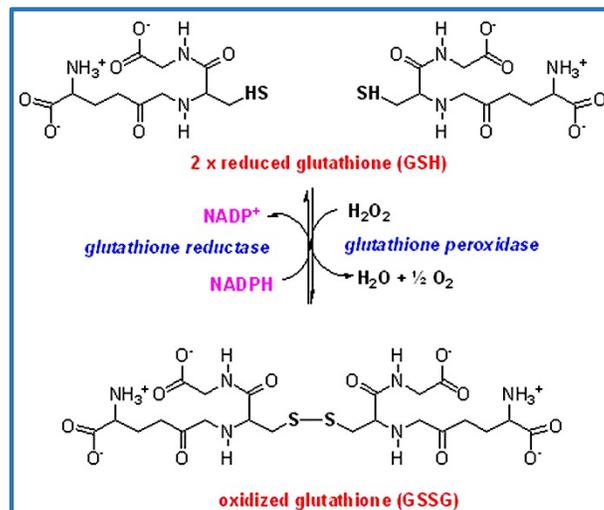


Figura 6. Proceso de oxidación del glutatión. (david-bender.co.uk)

b) Vitaminas E y C

La vitamina E o α -tocoferol, es de naturaleza liposoluble y ejerce una función antioxidante en las membranas celulares, ya que reacciona con varias especies reactivas del oxígeno incluyendo el radical peróxido causante de peroxidación lipídica. La vitamina E no se consume en ese proceso ya que la forma oxidada se reduce nuevamente por la acción de GSH o del ubiquinol (QH₂).

La vitamina C o ácido ascórbico, es de naturaleza hidrosoluble actuando así a nivel citosólico y extracelular. Al igual que la vitamina E, reaccionará con las especies oxidantes y no se consumirá, sino que podrá ser reducido de nuevo a ácido ascórbico por la acción de enzimas con actividad dehidroascorbato reductasa (Dhremmer *et al.*, 2001). También se puede reducir vía no enzimática por el glutatión.

c) Otras moléculas

Finalmente, destacar a los flavonoides y carotenoides. Los flavonoides, cuya estructura consta de dos anillos aromáticos unidos por 3 átomos de carbono, son capaces de secuestrar radicales libres. Los carotenoides son pigmentos con acción antioxidante debido a su estructura de dobles enlaces conjugados.

1. Introducción

1.1.3.3 Sistemas reparadores

Para impedir la acumulación de biomoléculas dañadas por los radicales libres, existen sistemas reparadores que se subdividen en dos grupos según sean directos o indirectos (López, 2013).

a) Sistema reparador directo

Está formado por grupos de enzimas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa que se encargan de reducir los grupos (S-S) de los aminoácidos de las proteínas.

b) Sistema reparador indirecto

Primero se reconoce el daño molecular, siendo este eliminado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Este sistema actúa ante la oxidación de DNA o RNA, ante proteínas oxidadas o ante peróxidos lipídicos.

1.1.4. ENFERMEDADES ASOCIADAS A ROS

En muchas patologías el estrés oxidativo se produce como resultado del daño tisular, y además puede jugar un papel importante en la evolución o agravamiento de ésta. Sucede así en el caso del cáncer, enfermedades neurodegenerativas y la enfermedad inflamatoria intestinal. También hay evidencias en el caso de la aterosclerosis, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, diabetes, cataratas, isquemias, asma...(Halliwell, 2012 y Phaniendra *et al*, 2015).

Por otra parte, se ha de tener en cuenta que algunos factores exógenos como el alcohol, drogas, contaminación y exposición a radiación ionizante, contribuyen a la aparición del estrés oxidativo en diferentes tejidos que puede derivar a un estado patológico (Li *et al*, 2015).

1.1.4.1 Enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas suelen iniciarse debido al efecto de ROS sobre las células de Kupffer, las células hepáticas estrelladas y las células endoteliales. Todas estas células hepáticas son muy sensibles a los radicales libres ocasionando procesos de apoptosis, inflamación y alteración de su función celular, como se muestra en la figura 7. En algunos casos estos procesos oxidativos dañarán a las distintas biomoléculas y generarán las distintas patologías hepáticas como esteatosis o hígado graso, hepatitis crónica, fibrosis, cirrosis y en el peor caso carcinoma hepatocelular.

En algún caso de fibrosis hepática, el daño oxidativo es el causante de que las células hepáticas estrelladas que se encuentran en un estado de quiescencia se activen. Al activarse, se produce una transición epitelio-mesenquimal (Tresierra, 2015) y las células estrelladas adquieren una morfología similar a miofibroblastos con capacidad proliferativa y fibrogénica ya que producen colágeno I y otros componentes de la matriz extracelular (Páramo *et al*, 2010). De esta forma se producirán las cicatrices típicas de la fibrosis y la alteración de la estructura y función hepática.

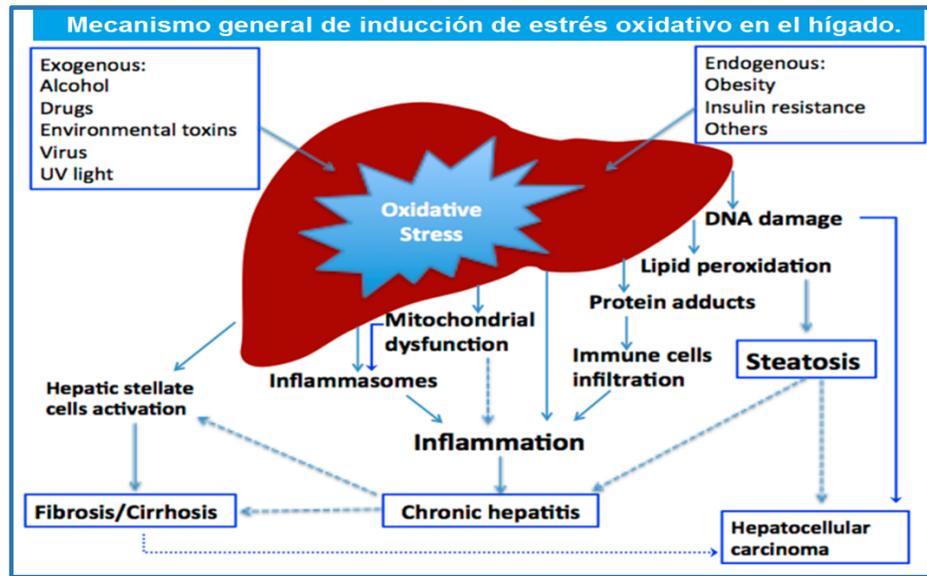


Figura 7. Consecuencias del estrés oxidativo en hígado. (Li et al., 2015)

1.1.4.2 Enfermedades neurodegenerativas

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, el estrés oxidativo juega un papel muy importante debido a la particular composición cerebral y su metabolismo. El cerebro es un órgano muy activo metabólicamente por lo que requiere un alto consumo de oxígeno, sin embargo presenta bajos niveles de antioxidantes.

Además tiene un alto contenido de lípidos, aproximadamente la mitad del peso seco cerebral según Sabourdy *et al.*, (2015). La peroxidación lipídica causada por ROS, conduce a una pérdida de la fluidez de las membranas, disminución del potencial de membrana y aumento de la permeabilidad a iones como el Ca^{2+} (Phamiendra *et al.*, 2015). Además, regiones como el hipocampo, sustancia negra y estriado son particularmente sensibles al ataque de los radicales libres. Este tipo de enfermedades se caracterizan por una degeneración gradual de las neuronas hasta llevarlas a la muerte.

a) Parkinson (PD)

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la afectación de las capacidades motoras del individuo debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas situadas en una región cerebral llamada sustancia negra. También se producen unas acumulaciones de la proteína α -synucleína llamadas cuerpos de Lewy. Aunque no se conoce la causa exacta de la enfermedad, distintos factores genéticos, ambientales y el estrés oxidativo, juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad (NIH, NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE, 2015).

b) Alzheimer (AD)

El Alzheimer es la enfermedad que más casos de demencia causa en personas mayores. Se caracteriza por un deterioro cognitivo y un trastorno de la conducta. Esta asociada con la acumulación de proteínas β -amiloides (placas seniles) y de neurofibrillas intracelulares (agregaciones de la proteína Tau) tal como se observa en la figura 8.

1. Introducción

La proteína Tau, se asocia con los microtúbulos de las neuronas para su normal funcionamiento, pero cuando se encuentra hiperfosforilada esta asociación no sucede y se forman ovillos neurofibrilares. Estas acumulaciones proteicas producirán en la neurona pérdida de actividad sináptica, alteración en la localización de los componentes celulares como las mitocondrias, neuroinflamación y daño oxidativo, llegando así a la muerte neuronal (Zempel & Mandelkow, 2015).

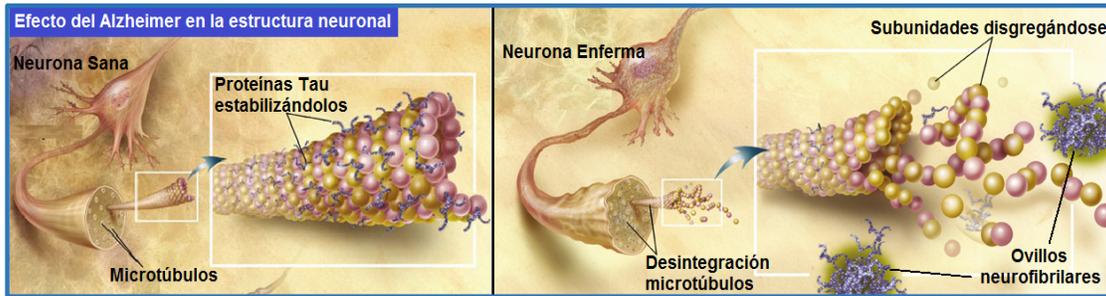


Figura 8. Comparación entre una neurona sana y otra en estado degenerativo por la enfermedad de Alzheimer. (Imagen modificada de: nia.nih.gov)

c) Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es otra enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas del tallo cerebral y médula espinal encargadas del movimiento voluntario. También se observan acumulaciones proteicas en las neuronas, pero no se conoce la causa concreta de la enfermedad (NIH, NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE, 2010).

Aunque no parece haber una causa genética en el 90-95% de los casos de ELA, entre el 5-10% puede tener causa genética o familiar. Dentro de este ELA familiar, un 20% se corresponde con una alteración en el gen SOD1 encargado de la síntesis de la enzima antioxidante (Rothstein, 2009).

d) Esclerosis Múltiple (MS)

La esclerosis múltiple es una enfermedad neuroinflamatoria que afecta a una sustancia que envuelve y protege a los axones de las neuronas llamada mielina. La mielina también ayuda a acelerar los impulsos nerviosos. No se conoce exactamente el origen de la enfermedad, pero hay estudios que indican que está relacionada con la desregulación del metabolismo del hierro y la generación de ROS (Uttara *et al.*, 2009).

1.1.4.3 Cáncer

El cáncer es un término que engloba a más de 200 enfermedades con características diferentes según su origen, evolución, pronóstico, tratamiento... Pese a esto, existen unas características o hallmarks en común: autonomía en las señales de crecimiento, evasión de las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, inestabilidad genómica y mutagénesis, metabolismo energético desregulado, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, invasión y metástasis, un entorno inflamatorio alterado y una evasión de la respuesta inmune.

Un entorno con un alto nivel de estrés oxidativo puede conllevar un daño al DNA por parte de los radicales libres y en algunos casos este daño será el causante de la mutación precancerosa. A continuación, mostraremos la evolución de una célula normal a una cancerosa a medida que aumentan los niveles de ROS.

Como se observa en la figura 9, bajos niveles son necesarios para un comportamiento celular normal, ya que tienen efectos en la proliferación y intervienen en rutas de supervivencia celular. Sin embargo, unos niveles excesivos de ROS conducirán a la muerte celular.

En el caso de una célula sana, existe un equilibrio entre los procesos de generación de ROS propios del metabolismo y las defensas antioxidantes. Pero en procesos tumorales, se producen eventos como la activación de oncogenes o la hipoxia que aumentan los niveles de ROS y promueven otros fenómenos cancerígenos como la alteración del metabolismo celular, crecimiento descontrolados, angiogénesis... Estos procesos generan una cantidad anormal de ROS que conduciría a la muerte de la célula. Pero la célula tumoral es capaz de adaptarse y de sintetizar una mayor cantidad de enzimas y otros compuestos antioxidantes evitando su colapso. Una forma de aumentar el nivel de radicales para forzar a la célula cancerosa a que entre en senescencia sería mediante el uso de quimio-radioterapia (Cairns *et al.*, 2011).

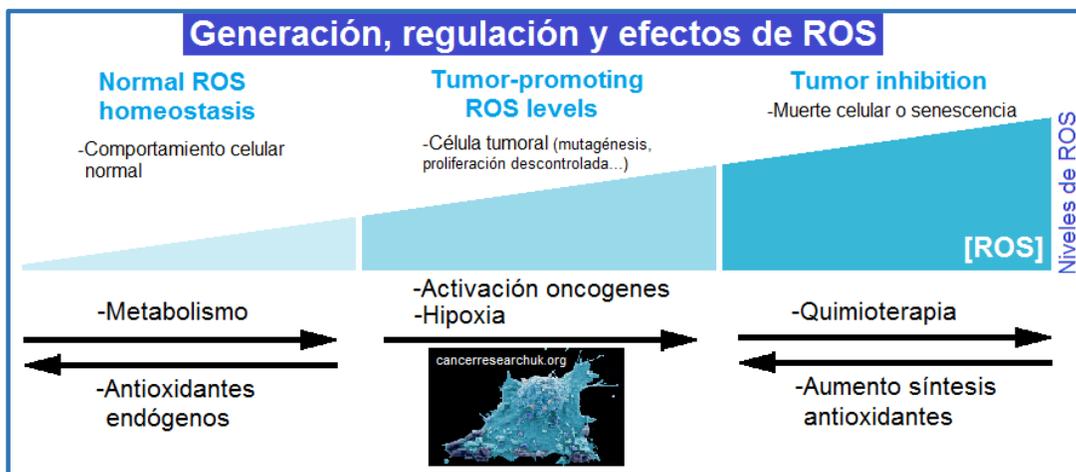


Figura 9. Evolución de los niveles de ROS en un proceso de transformación maligna celular. (Cairns *et al.*, 2011)

El uso de moléculas o suplementos con actividad antioxidante como mecanismo de prevención del cáncer está cuestionado. En López-Lázaro (2007), se apunta que estos agentes pueden actuar como prooxidantes a altas concentraciones. También, diversos ensayos en los que se tomaban antioxidantes β -caroteno, vitaminas y selenio no se han mostrado eficaces, e incluso pueden conducir a algún tipo de cáncer (Watson, 2013).

Finalmente otro factor a considerar son las células madres del cáncer (CSC) involucradas en las recaídas tras los tratamientos de quimio y radioterapia. Son pequeñas subpoblaciones celulares con marcadores de células madre y con una alta resistencia a los tratamientos. Además mantiene unos niveles de ROS menores y una actividad antioxidante mayor respecto de las células tumorales. Esto permite a las CSC resistir a los tratamientos (Liou & Stortz, 2014).

1. Introducción

1.1.4.4 Otras enfermedades

Las especies reactivas del oxígeno también intervienen en las enfermedades cardiovasculares. En el caso de la aterosclerosis, juegan un papel fundamental el aumento de los niveles de la lipoproteína lipídica de baja densidad oxidada (LDLox) la cual favorece la inflamación del tejido debido a la actuación de células inmunitarias. Esto dará lugar junto a otros procesos a la formación de la placa de ateroma, disfunción endotelial...

La diabetes mellitus, es una enfermedad caracterizada por un aumento de la concentración de glucosa en sangre debido a un déficit de producción de insulina, una resistencia a la insulina o ambas. Este estado de hiperglucemia conlleva un incremento de la producción de radicales libres al igual que ocurre con la obesidad.

También hay otras enfermedades donde interviene los radicales libres como cataratas, artritis reumatoide, asma... (Phaniendra *et al.*, 2015).

1.2 EL ALCOHOL

El alcohol es la droga o sustancia adictiva más consumida y culturalmente aceptada en el mundo. Si bien se conoce popularmente como alcohol, el compuesto psicoactivo de las bebidas alcohólicas es el etanol o alcohol etílico. Químicamente, un alcohol es un compuesto orgánico que contiene uno o varios grupos hidroxilo (-OH). Aunque es debatible si el consumo moderado de alcohol ofrece algún beneficio en salud cardiovascular, están bien reconocidos los efectos perjudiciales que tiene el consumo excesivo de estas bebidas fermentadas o destiladas sobre el cuerpo, fundamentalmente en cerebro e hígado.

La OMS estima que el consumo de alcohol causa alrededor de 3,3 millones de muertes por año, representando el 5,9% del total de muertes globales en 2012. Respecto a estas muertes atribuibles al alcohol, existe una mayor incidencia en hombres, ya que representa el 7,6% de las muertes totales respecto al 4,0% de las mujeres. En la figura 10, podemos ver la distribución de estas muertes debidas al desarrollo de una patología achacable al consumo de alcohol, destacando las enfermedades cardiovasculares y diabetes, lesiones no intencionales, enfermedades gastrointestinales y cáncer. (WHO 2014, Global status report on alcohol and health).

El consumo de alcohol afecta al sistema nervioso central (SNC) generando una alteración de la actividad cerebral, una mala coordinación motora y cambios en el comportamiento. Las alteraciones en las actividades del SNC son debidas al efecto del alcohol en la síntesis, liberación y señalización de los neurotransmisores, incluyendo glutamato y GABA entre otros (Jiang *et al.*, 2013).

Según el *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA), las regiones cerebrales más vulnerables al efecto del consumo de alcohol son el cerebelo (coordinación motora), el sistema límbico (memoria y emoción) y el córtex cerebral (pensamiento y percepción).

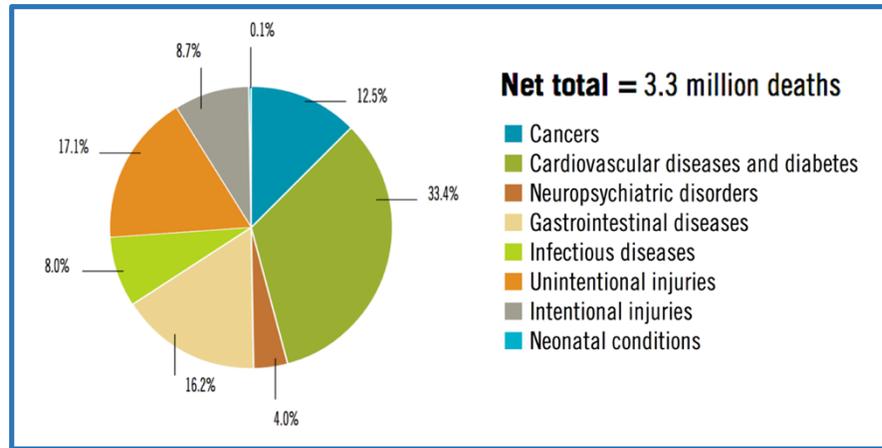


Figura 10. Distribución de los fallecimientos atribuibles al consumo de alcohol.
(WHO 2014, Global status report on alcohol and health)

1.2.1 METABOLISMO DEL ETANOL

Después de la administración oral, el etanol se absorbe fácilmente a través del tracto gastrointestinal. La absorción se produce mediante difusión pasiva en las paredes del estómago, representando sobre el 20%, y en el intestino delgado, representando el restante 80% (Norberg *et al.*, 2003).

La mayor parte del etanol es transformado a acetaldehído en el hígado mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) como se muestra en la figura 11. Posteriormente el acetaldehído pasará a acetato a través de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH).

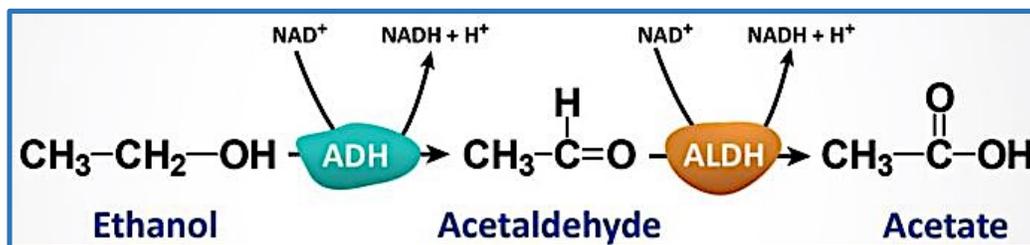


Figura 11. Transformación del etanol a acetato en hígado.
(meetgenes.blogs.uv.es)

Los efectos del alcohol dependen de su concentración en la sangre (BAC). Este parámetro está determinado por la rapidez en que es absorbido, distribuido, metabolizado y excretado. La concentración de alcohol en sangre también depende de otros valores como el tipo bebida alcohólica consumida, la presencia de comida en el estómago, factores genéticos relacionados con alteraciones en las enzimas que se encargan de su metabolización, edad y tipo de dieta.

Las consecuencias del metabolismo del alcohol incluyen el déficit de oxígeno en el hígado, interacciones entre subproductos del alcohol y otros componentes celulares, formación de compuestos dañinos, incremento en la generación de ROS, cambios en el ratio de NADH/NAD⁺, daño tisular, interacciones con medicamentos y diversas patologías (Zakhari S, 2006).

1. Introducción

Este proceso está formado por dos etapas oxidativas catalizadas enzimáticamente:

1.2.1.1 Oxidación del etanol

La primera etapa consiste en oxidar el etanol a acetaldehído. Este proceso está catalizado por tres enzimas: la ADH, la citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y la catalasa. En la figura 12, se puede ver este proceso donde se generan ROS (en amarillo) y aumento ratio NADH/NAD⁺ (en rosa).

a) Alcohol deshidrogenasa (ADH)

La mayor ruta de oxidación del etanol a acetaldehído en el hígado se lleva a cabo mediante la enzima ADH. Esta oxidación del etanol tiene lugar en el citosol y es una reacción reversible.



También se genera un ambiente altamente reducido ya que la reacción está acoplada a una reducción del NAD⁺ generándose protones (H⁺).

La enzima ADH se expresa altamente en el hígado, y presenta 5 variantes o isozimas dependiendo de su cinética y propiedades estructurales. En otros tejidos u órganos como el cerebro, su expresión es muy reducida (Zakhari S, 2006).

b) Citocromo P450 2E1 (CYP2E1)

Esta ruta microsomal oxidante adquiere importancia o se induce en bebedores crónicos jugando un papel importante durante la metabolización de grandes cantidades de etanol. CYP2E1 pertenece a la familia de las citocromo P450 y funciona en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos y otras celulares convirtiendo el etanol a acetaldehído (Zakhari S, 2013). Este proceso genera especies reactivas de oxígeno como se muestra en la figura 12.



c) Catalasa (CAT)

La catalasa es capaz de oxidar pequeñas cantidades de etanol a acetaldehído en los peroxisomas. Para llevar a cabo la reacción se necesita peróxido de hidrógeno.



Su contribución en la transformación del etanol es mucho menor que las otras enzimas, pero será fundamental en órganos o tejidos como el cerebro donde es nula la expresión de ADH.

1.2.1.2 Oxidación del acetaldehído

La segunda etapa es de nuevo una oxidación, en este caso de acetaldehído a acetato mediante la aldehído deshidrogenasa (ALDH). La mayor parte de la reacción es llevada a cabo por la ALDH mitocondrial, aunque también contribuye la ALDH citosólica (Edenberg & Foroud, 2013).



Cuando la enzima ALDH alcanza un punto de saturación, el acetaldehído se escapa hacia el torrente sanguíneo y ocasiona los diversos efectos o daños moleculares asociados al alcohol. La reacción de la enzima ALDH, tal y como se observa en la figura 12, va acoplada a la reducción de NAD^+ , aumentando así el ratio NADH/NAD^+ . En la mitocondria, el NADH será usado en la cadena transporte electrónica generando ROS y ATP.

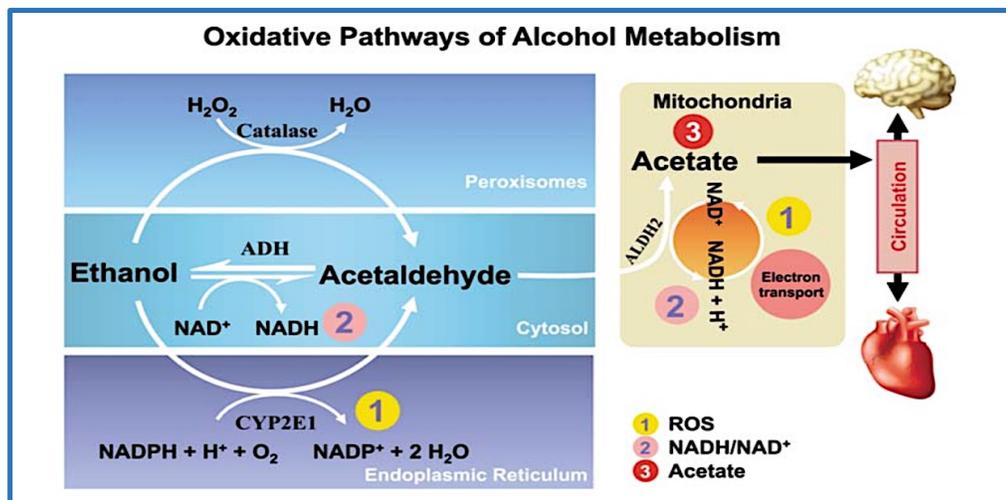


Figura 12. Rutas oxidativas del metabolismo del etanol. (Zakhari S, 2013)

1.2.1.3 Productos del metabolismo oxidativo del etanol

a) Acetaldehído

Esta molécula es un subproducto altamente tóxico y reactivo que contribuye al daño tisular y probablemente este involucrado en los procesos de adicción. El acetaldehído es capaz de unirse con el DNA formando aductos con potencial carcinógeno. También tiene la capacidad de interactuar con los aminoácidos de las proteínas, aunque se ha visto que hay algunas más susceptibles como las proteínas de las membranas de eritrocitos, lipoproteínas, la tubulina de los microtúbulos, hemoglobina, albumina, colágeno y las enzimas del tipo citocromo (Tuma & Casey, 2003).

En el cerebro, también forma aductos con los neurotransmisores u otros señaladores químicos. Un ejemplo sería el salsolinol, mostrado en la figura 13, una molécula formada tras la condensación del acetaldehído con la dopamina. Esta molécula está relacionada con los procesos de adicción y mecanismos de refuerzo relacionados con el alcohol (Zakhari, 2006).

1. Introducción

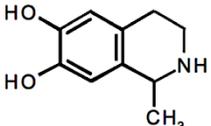
Biogenic Amines Condensing With Acetaldehyde	Name of Condensation Product	Chemical Structure
Dopamine	6,7-dihydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (Salsolinol)	

Figura 13. Estructura molecular del salsolinol. (Quertemont & Didone, 2006)

b) Acetato

Esta molécula también produce efectos fisiológicos ya que aumenta el flujo sanguíneo en el hígado, deprime el sistema nervioso central y afecta a otros procesos metabólicos. El acetato será metabolizado a través de una oxidación a CO_2 no sólo en el hígado, sino que también en corazón, musculo esquelético y cerebro. Esto es debido a que el acetato es capaz de escapar del hígado a la sangre.

En el cerebro, el acetato es usado como fuente alternativa de energía a la glucosa, siendo este otro mecanismo que produce dependencia en aquellos bebedores crónicos y que *a posteriori* estará involucrado en el síndrome de abstinencia (Jiang *et al*, 2013).

El acetato puede ser metabolizado a acetyl-CoA, molécula involucrada en distintas rutas anabólicas y catabólicas. En el caso de consumo de alcohol, toma importancia la ruta de biosíntesis de lípidos. Además, la alteración del estado redox a favor de NADH causa la inhibición de la gluconeogénesis y de la β -oxidación. Por tanto, la ingesta de alcohol conduce a la síntesis y acumulación de ácidos grasos pudiendo causar esteatosis o hígado graso (Rasineni & Casey, 2012).

1.2.2 PAPEL DEL ACETALDEHÍDO

Como ya se ha comentado, el acetaldehído es un intermediario tóxico y su acumulación se manifiesta con mareos, náuseas, taquicardia, cambios en la conducta...

1.2.2.1 Efectos fisiológicos

La acumulación del acetaldehído produce vasodilatación, aumento de la temperatura corporal, náuseas y dolores. Estas alteraciones son fruto del efecto del acetaldehído en múltiples dianas moleculares. Por ejemplo, estimula la liberación de las hormonas epinefrina y norepinefrina desde células nerviosas pertenecientes al sistema simpático y desde las glándulas suprarrenales. Esta secreción actúa sobre el sistema cardiovascular aumentando la intensidad y frecuencia cardiaca, ocasionando broncodilatación... Asimismo, el acetaldehído induce la liberación de histamina y bradiquinina causantes de vasodilatación y enrojecimiento facial (Eriksson, 2001).

1.2.2.2 Efectos en el cerebro

Cuando es administrado acetaldehído en el cerebro de animales de laboratorio, se producen los mismos efectos atribuibles al alcohol, por tanto existen indicios de que el acetaldehído

generado en el cerebro, mediante la acción de la catalasa y CYP2E1, es el responsable de los cambios de comportamiento y otras alteraciones cerebrales, ya que. Altas dosis de acetaldehído producen efectos sedantes, alteraciones del movimiento y deterioro de la memoria. Bajas dosis producen efectos en el comportamiento similares a otras drogas de adicción (Quertemont & Didone, 2006).

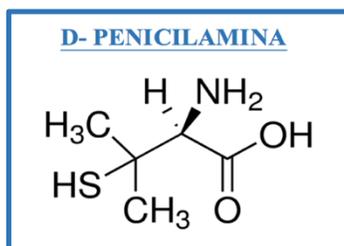
A nivel cerebral, el acetaldehído también actúa en la alteración de varios mecanismos de señalización neuronal tales como las catecolaminas, los opioides endógenos y los canales de calcio. Las catecolaminas son una familia de neurotransmisores que incluyen la dopamina, epinefrina y norepinefrina. Los opioides endógenos modulan la acción de los neurotransmisores y pueden inducir al alivio del dolor, estados de euforia y también están involucrados en los mecanismos de refuerzo del alcohol. Finalmente, también modula los mecanismos de señalización implicados en la actividad de los canales de calcio, componentes esenciales en la excitabilidad neuronal (Quertemont *et al.*, 2005).

1.2.2.3 Fármacos moduladores del acetaldehído

El acetaldehído es un compuesto muy volátil y reactivo, lo que hace que sea muy difícil su cuantificación directa en sangre y tejido celular (Ledesma *et al.*, 2013). En el caso del cerebro, la modificación de los efectos psicofarmacológicos inducidos por el alcohol, puede ser usada como una evidencia indirecta de los niveles de acetaldehído. Esta modificación conductual puede realizarse mediante el uso de fármacos que intervengan en la formación o acción del acetaldehído. A continuación, se describe un fármaco usado en experimentos con ratones, que consolidará la evidencia de que el causante de los efectos asociados al consumo de bebidas alcohólicas es el acetaldehído.

El fármaco D-penicilamina, consigue reducir los efectos sobre la conducta atribuibles al consumo de alcohol, ya que es capaz de reducir los niveles de acetaldehído (Ledesma *et al.*, 2013). La D-penicilamina es un compuesto resultante de la hidrólisis de la penicilina y que actúa como quelante de metales pesados como cobre, plomo... Debido a sus características se ha usado en el tratamiento de la enfermedad de Wilson, artritis reumatoidea y cistinuria. La estructura de la molécula, mostrada en la figura 14, presenta un grupo sulfhidrilo libre que le confiere sus propiedades quelantes, pero también presenta gran afinidad por los grupos aldehído. En el caso del acetaldehído, la interacción con el fármaco formará unos productos de condensación llamados tiazolidinas.

Según Font (2006), otras características importantes que hacen a la D-penicilamina ser un candidato idóneo como desactivador del acetaldehído cerebral es su solubilidad en agua ya que posee un grupo funcional ácido. Y sobre todo, que a diferencia de otros compuestos con grupos sulfhidrilo, la D-penicilamina es un compuesto metabólicamente estable, es decir, forma conjugados con el acetaldehído persistentes.



*Figura 14. Estructura química de la D-penicilamina.
(sigmaaldrich.com)*

1. Introducción

1.2.3 GENÉTICA Y ALCOHOLISMO

Existen evidencias de que los genes involucrados en el metabolismo del alcohol están relacionados con el alcoholismo. Los genes más estudiados debido a su clara implicación son ALDH2 y ADH1B.

a) Acetaldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2)

La enzima codificada por el gen ALDH2, presenta dos variantes genéticas o alelos. La modificación se encuentra el nucleótido 487 de la proteína madura o en el nucleótido 504 si todavía conserva la secuencia líder. Los individuos con el alelo ALDH2 487E>K (sustitución del glutamato por una lisina en la posición 487), sintetizan una enzima inactiva. Este cambio de un aminoácido de polaridad negativa a positiva, causa la inhibición de la actividad enzimática de la ALDH mitocondrial con la consecuente acumulación del acetaldehído en la circulación sanguínea. Esto ocasiona distintas reacciones como náuseas, vasodilatación, aumento de la temperatura corporal, taquicardia y enrojecimiento; tal y como se observa en la figura 15. Este conjunto de síntomas ante el consumo de pequeñas cantidades de alcohol se llama “Asian flushing reaction” y la mutación es común en los países de la Asia oriental y extremadamente rara en países europeos y africanos.

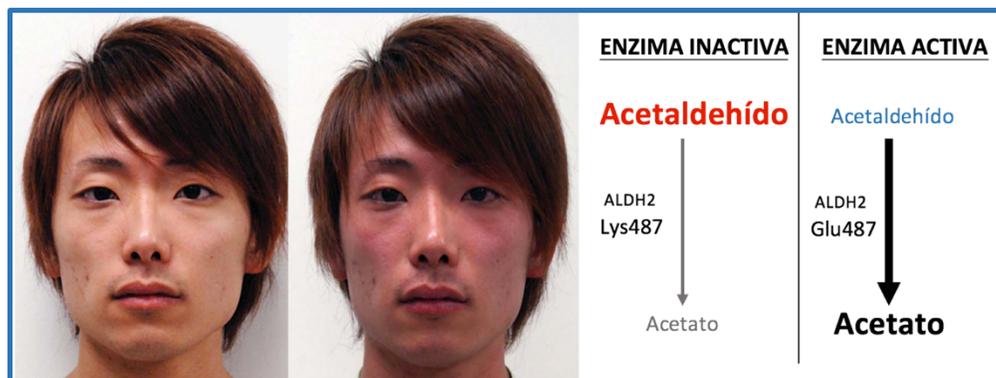


Figura 15. Reacción de enrojecimiento o “Asian flushing reaction”.

Se observa a un joven asiático, antes (derecha) y después (izquierda) de consumir alcohol. El joven es heterocigoto para el gen ALDH2. (Brooks et al., 2009); A la parte derecha de la figura, se muestra como actúan ambas variantes del gen. Siendo el alelo que contiene lisina (Lys487) el causante de la acumulación del acetaldehído.

Debido a que no pueden consumir grandes cantidades de alcohol y por tanto el cerebro no genera mecanismos de recompensa, los portadores del alelo ALDH2 487E>K presentan resistencia a los distintos trastornos producidos por el consumo de alcohol como la dependencia. Esta resistencia al alcoholismo es completa en los individuos homocigóticos para este alelo (Edenberg & Foroud, 2013).

b) La alcohol deshidrogenasa citosólica del hígado (ADH1B)

La enzima codificada por el gen ADH1B, presenta tres variantes genéticas o alelos. El la población europea domina el alelo ADH1B*1 que presenta en las posiciones 48 y 370 el

aminoácido arginina (R). En la población asiática el alelo predominante es el ADH1B*2 o ADH1B 48R>H ya que presenta un residuo de histidina en la posición 48 en sustitución de la arginina. En la población americana y africana domina el alelo ADH1B*3 o ADH1B 370R>C que presenta una cisteína en la posición 370 en lugar de la arginina. Las diferentes variantes enzimáticas difieren en la concentración de etanol que requieren para su máxima función y en la velocidad de metabolización del etanol. Los alelos ADH1B*2 y ADH1B*3 presentan un número de recambio mayor (número de moléculas de sustrato que es capaz de transformar la enzima por unidad de tiempo) respecto al alelo ADH1B*1 (Hurley & Edenberg, 2012). Por tanto, los individuos homocigóticos para ADH1B*1 tendrán durante más tiempo mayores concentraciones de etanol en sangre tras su consumo. Por el contrario, en los individuos con algún alelo ADH1B*2 o ADH1B*3, tras el consumo de alcohol se producirá un incremento rápido de los niveles de acetaldehído con sus efectos adversos en el organismo. Por tanto, estos dos últimos alelos están relacionados con una resistencia al alcoholismo y a la dependencia (Edenberg & Foroud, 2013).

Para corroborar esto, un estudio de Bierut *et al.* (2012), trata de cuantificar la posible asociación del alelo ADH1B*1 con el desarrollo de dependencia al alcohol. Tras los análisis que se pueden apreciar en la figura 16, se muestra una fuerte asociación del alelo ADH1B*1 (mostrado en rojo) con la dependencia ya que matemáticamente se obtiene un ratio de hazard de 0.51. Es decir, el grupo ADH1B*2 (mostrado en azul) tiene un 49% menos de probabilidad de desarrollar dependencia al alcohol.

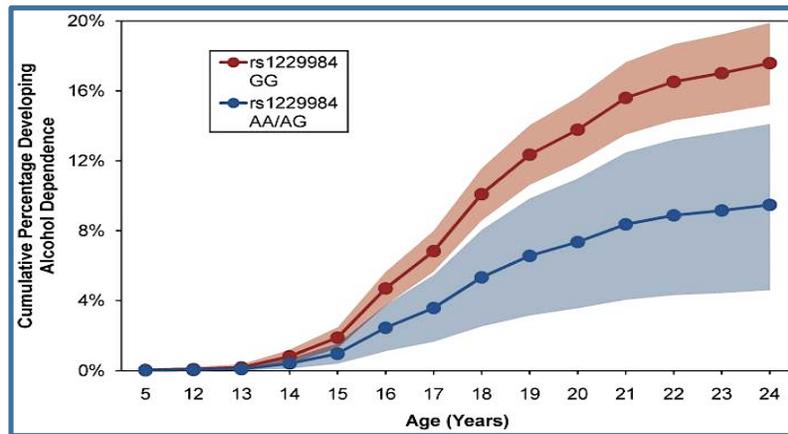


Figura 16 . Porcentaje acumulativo de sufrir dependencia alcohólica con la edad.
 En rojo y bajo la denominación rs1229984 GG, se muestra el alelo ADH1B*1 y en azul y bajo la denominación rs1229984 AA/AG se muestra el alelo ADH1B*2. Las sombras representan el intervalo de confianza del 95%. (Bierut *et al.*, 2012)

1.2.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ALCOHOL

El consumo de alcohol es un factor de riesgo para el desarrollo de problemas tanto físicos, psicológicos y sociales. La OMS apunta que el 5,1% de las enfermedades y lesiones son atribuibles al consumo del alcohol en 2012. Este porcentaje corresponde a 139 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs). Este valor representa la suma de los años de vida perdidos por una muerte prematura junto con los años vividos con una mala salud o

1. Introducción

discapacidad. En la figura 17, podemos ver la distribución de estos DALYs achacables al alcohol, destacando los que son debidos a trastornos neuropsiquiátricos.

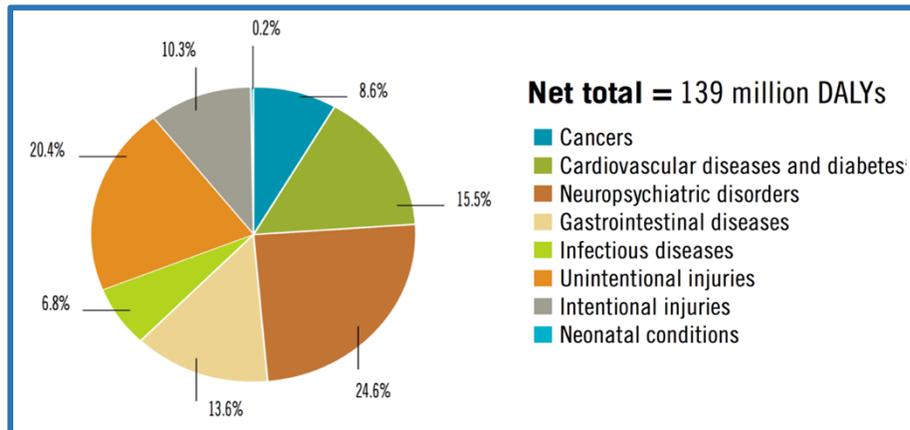


Figura 17. Distribución de los DALYs atribuibles al consumo de alcohol.
(WHO 2014, Global status report on alcohol and health)

A continuación, se describirán las principales enfermedades en las que el alcohol juega un papel importante en la aparición, progresión o agravamiento de la patología. Siendo los trastornos por el consumo de alcohol (AUDs) y el síndrome alcohólico fetal las dos únicas enfermedades íntegramente atribuibles al alcohol (WHO 2014, Global status report on alcohol and health).

1.2.4.1 Enfermedades neuropsiquiátricas

El consumo de alcohol no sólo induce daño al cerebro debido a su efecto tóxico, también está involucrado en la modificación estable de los circuitos neuronales y en la pérdida de volumen cerebral.

Como se describe en Crews & Vetreno (2014), el consumo de alcohol en la adolescencia ocasiona una grave pérdida de la neurogénesis en el hipocampo, zona relacionada con la memoria y aspectos espaciales. También daña otros procesos neurales que suceden dentro de la adolescencia y hasta la etapa adulta temprana como son la arborización neuronal, mielinización, maduración cerebral y la eliminación o poda sináptica (Crews *et al.*, 2007).

La corteza prefrontal y el sistema límbico son también estructuras especialmente vulnerables a los efectos neurotóxicos del alcohol. Estas áreas están involucradas en la toma de decisiones, la motivación, la planificación, la fijación de objetivos y la inhibición de los impulsos. El consumo crónico, caracterizado por una pérdida del control sobre la ingesta del alcohol, producirá cambios neurobiológicos que ocasionarán un aumento de la toma de decisiones arriesgadas, de la impulsividad y de la ansiedad. Estas características junto a la pérdida de atención se encuentran en individuos con lesiones en la corteza prefrontal debido tanto a el alcohol como a otras drogas generadoras de dependencia (Crews & Vetreno, 2014).

Mediante técnicas de imagen, se ha comprobado que los cerebros de consumidores crónicos presentan una reducción en el volumen de la materia gris y blanca de la parte cortical, una reducción del espesor del cuerpo caloso y un agrandamiento de los ventrículos (Bühler & Mann, 2011); tal y como se observa en la figura 18. La materia blanca está compuesta

mayoritariamente por los axones o fibras nerviosas recubiertas de mielina y su función es la del transporte de la información nerviosa. La materia gris está compuesta por los cuerpos neuronales y se relaciona con el razonamiento. El cuerpo calloso es imprescindible para la comunicación de los dos hemisferios cerebrales y está formado por fibras nerviosas. Finalmente los ventrículos cerebrales son las cavidades donde se encuentra el líquido cefalorraquídeo.

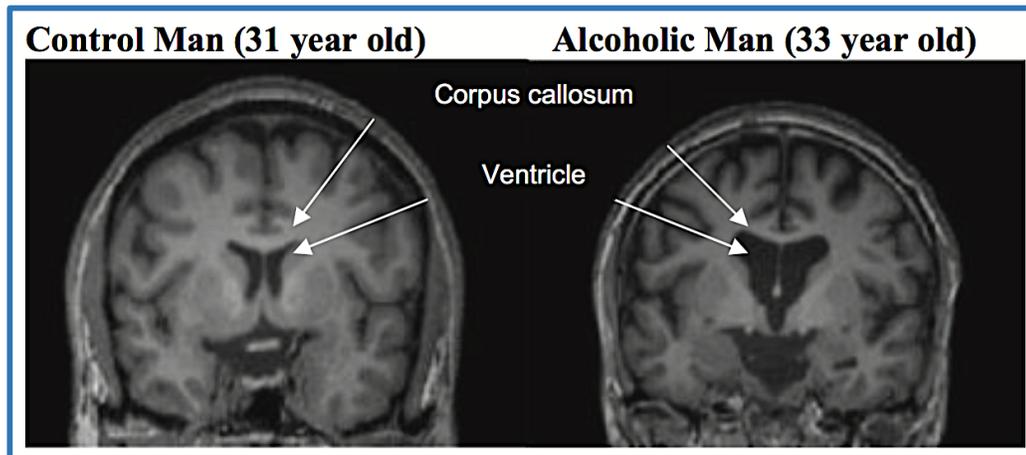


Figura 18. Comparación de dos cerebros de hombres adultos.

El de la derecha pertenece a un hombre no alcohólico y el de la izquierda corresponde a un hombre alcohólico. (Bühler & Mann, 2011)

En cuanto al metabolismo cerebral, la glucosa es el principal suministro energético, aunque el acetato puede ser usado por los astrocitos como fuente de energía alternativa a la glucosa. Los astrocitos son un tipo de células gliales de forma estrellada cuya función principal es la de soporte, suministro de metabolitos y protección de las neuronas. También se ha demostrado que el consumo crónico aumenta la utilización del acetato en el cerebro, así como también facilita su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Por tanto, cuando la glucosa escasea, el acetato derivado del consumo alcohol podría mantener las necesidades energéticas de los astrocitos dejando más glucosa disponible para abastecer a las neuronas y generando así un mecanismo de recompensa (Jiang et al., 2013).

Estas alteraciones cerebrales que se acaban de describir debidas al alcohol, ocasionan varios tipos de enfermedades neuropsiquiátricas. Una de las más importantes son los trastornos por el consumo de alcohol (AUDs). Este término es usado en aquellos individuos que abusan del alcohol y presentan una dependencia. Otras enfermedades neuropsiquiátricas en las que el alcohol contribuye a su desarrollo o agravamiento son la epilepsia, los estados de depresión y los estados de ansiedad (WHO 2014, Global status report on alcohol and health).

1.2.4.2 Enfermedades gastrointestinales

a) Pancreatitis

En el páncreas, el alcohol puede causar una alteración de la normal secreción del jugo pancreático. Este jugo esta formado por enzimas que sólo se activan en el intestino, pero si se vuelven activas en el páncreas se ocasionará su propia digestión ocasionando un estado de

1. Introducción

inflamación, sangrado y de daño a los vasos sanguíneos. La pancreatitis será un factor importante de riesgo para el desarrollo de diabetes o cáncer de páncreas (NIH 2015, Beyond hangovers).

b) Enfermedades hepáticas

La hepatopatía alcohólica (ALD), abarca diversos estados patológicos como hígado graso (esteatosis), hígado inflamado (hepatitis), fibrosis progresiva, cirrosis o hepatocarcinoma, tal y como se observa en la figura 19.

Según Altamirano & Bataller (2011), sobre el 80-90% de pacientes consumidores crónicos tienen algún grado de esteatosis o hígado graso, que suele ser asintomático y reversible con la abstinencia alcohólica. En caso de que se continúe ingiriendo alcohol, se desarrollará una inflamación del tejido o esteatohepatitis caracterizada por la infiltración de leucocitos polimorfonucleados (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y por daño en las células hepáticas. En el 20-40% de estos pacientes se producirán deposiciones de fibras debido a la activación de las células estrelladas por exposición al acetaldehído y a las ROS. En un 8-20% de los pacientes, la fibrosis avanzará hasta una completa cicatrización y función deficiente del hígado llamada cirrosis. El estado de cirrosis, confiere un alto riesgo de complicaciones tales como infección bacteriana, fallo renal, acumulación de líquidos (ascitis), varices esofágicas sangrantes, encefalopatía hepática y entre un 3-10% podrán desarrollar hepatocarcinoma.

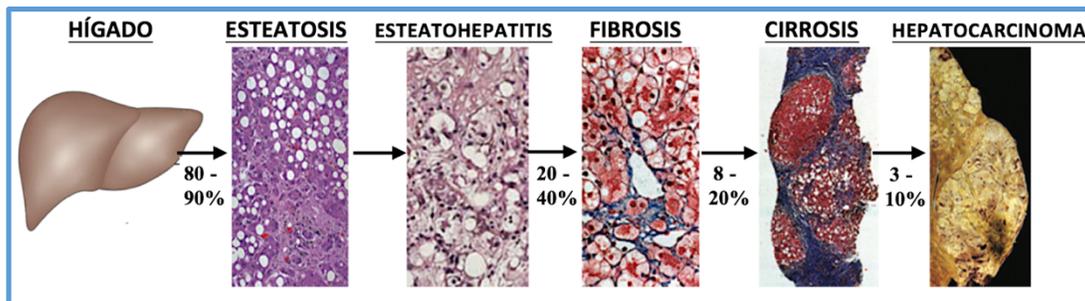


Figura 19. Imagen microscópica celular del tejido hepático conforme avanza la hepatopatía alcohólica. Se observan cortes celulares en las diferentes fases de la enfermedad hepática alcohólica. (Modificada de Altamirano & Bataller, 2011)

c) Alteraciones en la microbiota intestinal

La microbiota intestinal está compuesta por al menos 1000 especies diferentes de bacterias conocidas, perteneciendo la gran mayoría al filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Ley *et al.*, 2008). El tracto gastrointestinal establece una relación simbiótica con la microbiota intestinal, ya que las bacterias obtienen energía de los alimentos a cambio de una barrera de protección ante patógenos y de la síntesis de aminoácidos y vitaminas (Tappenden & Deutsch, 2007).

Según se señala en Engen *et al.*(2015), la ingesta de alcohol es capaz de alterar la composición de la microbiota intestinal pudiendo asociarse a distintas enfermedades de inflamación intestinal, hepáticas y de alergias entre otras. Esta pérdida del balance de especies bacterianas se llama dysbiosis.

En estudios realizados en humanos consumidores crónicos de alcohol, se ha observado un descenso de *Bacteroidetes* y un incremento de *Proteobacterias*, como por ejemplo las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

1.2.4.3 Cáncer

Tanto el etanol como sus subproductos, sobretudo el acetaldehído, presentan un potencial carcinógeno elevado debido a que son capaces de dañar el material genético. Por tanto, su consumo esta relacionado con un aumento en la incidencia del cáncer de boca, nasofaringe, faringe, laringe, colon e hígado entre otros. Además, estudios en animales muestran que ante el consumo de alcohol aumentan los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Esta molécula está muy relacionada en los procesos de crecimiento tumoral y metástasis. (NIH 2015, Beyond hangovers).

En la revisión realizado por Seitz & Stickel (2007), se indica que los cánceres debidos al alcohol son difíciles de tratar y normalmente requieren de una compleja cirugía y radioquimioterapia. Además, se muestran diversos estudios que relacionan un aumento del riesgo de sufrir cáncer con el consumo de alcohol.

Entre 2 y 3 veces aumenta el riesgo de sufrir cáncer de la cavidad superior gastrointestinal por el consumo de 50 gramos de alcohol al día (50 gramos de alcohol se ingieren aproximadamente con media botella de vino) respecto a los no consumidores.

En la población asiática con la mutación del gen ALDH2 (que les ocasiona una acumulación del acetaldehído) hay un incremento del riesgo entre 7,5 y 16 de sufrir cáncer de esófago.

Respecto al hepatocarcinoma, aumenta la probabilidad de sufrirlo entre 4,5 y 7,3 por el consumo de más de 80 gramos de alcohol diario.

En el cáncer de mama, múltiples estudios muestran una relación dependiente de la dosis de alcohol, aumentando el riesgo un 7,1% por cada 10 gramos de alcohol adicional al día. En este caso, se puede relacionar con las hormonas, ya que el consumo de alcohol incrementa los niveles de estrógenos que estimulan el crecimiento de las células mamarias.

Finalmente, en el caso de cáncer colorectal, los pacientes que consumían 50 gramos de alcohol tenían un riesgo relativo del 1,4 respecto de los abstemios. Además también existe una relación entre el alcohol y los pólipos colorectales.

1.2.4.4 Enfermedades cardiovasculares

Hay estudios que indican que un consumo de alcohol bajo o moderado puede tener efectos cardioprotectores en la cardiopatía isquémica y en el ictus isquémico. Con consumos mayores, no sólo estos efectos beneficiosos desaparecen, sino que surgen efectos perjudiciales como hipertensión, fibrilación auricular y accidente cerebrovascular (Roerecke & Rehm, 2012).

El consumo de alcohol produce a largo plazo un debilitamiento del músculo del corazón causando una condición llamada cardiomiopatía alcohólica. Además el corazón aumenta su tamaño y no logra contraerse de forma eficiente ocasionando una insuficiencia cardiaca o bombeo sanguíneo insuficiente. Entre sus síntomas, se incluyen problemas respiratorios, fatiga, inflamación de las piernas y bombeo irregular. El alcohol también esta relacionado con

1. Introducción

arritmias ya que afecta al sistema de marcapasos cardíaco causando un latido irregular o demasiado rápido (NIH 2015, Beyond hangovers).

1.2.4.5 Otras enfermedades

a) Síndrome alcohólico fetal

El término es usado en aquellos bebés cuya salud está perjudicada debido al consumo de alcohol por parte de su madre durante el embarazo ocasionando malformaciones en el cerebro, disfunciones del SNC y deficiencias en el crecimiento del cuerpo y órganos. Durante el embarazo, el alcohol consumido por la madre atraviesa la placenta afectando al desarrollo embrionario (MEDLINE PLUS, 2014).

b) Diabetes Mellitus

Existen varios estudios que relacionan el consumo moderado de alcohol con la reducción de sufrir diabetes. Aunque no se conoce la razón biológica, esta reducción de un 30%, sucede tanto en hombres como en mujeres. Los mismos estudios también señalan que un consumo mayor de alcohol está relacionado en un incremento de desarrollar diabetes (Baliunas et al., 2009).

c) Enfermedades infecciosas

El consumo de alcohol debilita al sistema inmune tanto innato como adaptativo, por lo que los bebedores son más susceptibles al desarrollo de enfermedades como neumonía o tuberculosis. También disminuye la velocidad de producción de citoquinas inflamatorias (NIH 2015, Beyond hangovers).

Finalmente también se ha de mencionar que el consumo de alcohol está relacionado con lesiones involuntarias, debido a sus efectos en las habilidades psicomotoras, y con lesiones voluntarias como suicidio y cualquier tipo de violencia.

1.3 RELACIÓN ALCOHOL Y ROS

Un mecanismo por el cual el alcohol ocasiona efectos dañinos sobre el organismo es mediante la formación de ROS. En la revisión de Linhart *et al.*(2014), se determina que enzima encargada de relacionar alcohol y ROS es la CYP2E1, pues su actividad NADPH oxidasa genera especies como el ion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Además su expresión se ve inducida ante un consumo continuado de alcohol, tal como muestra la figura 20.

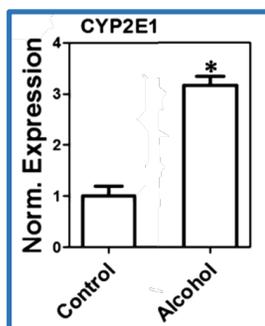


Figura 20. Niveles de expresión de CYP2E1 en ratones. Medida del mRNA mediante PCR real-time en ratones control y en ratones con alcohol en su dieta. (Sun *et al.*, 2015)

En varios estudios en ratones donde se les subministra una dieta que contiene etanol para la inducción de la enfermedad alcohólica del hígado (ALD), se demuestra la importancia de la enzima:

-Ratones en los que se ha sobreexpresado CYP2E1, muestran una mayor gravedad en la ALD, mostrando así que el papel de ROS es fundamental (Morgan et al.,2002).

-Ratones knockout para este gen o ratones tratados con clormetiazol (inhibidor fuerte de la CYP2E1), muestran una ALD más leve (Lu et al.,2008). También los niveles de DNA oxidados fueron menores en los ratones knockout (Bradford et al.,2005).

Los ROS producidos por el alcohol, ocasionan una reducción de los niveles de glutatión (GSH) y un aumento del glutatión oxidado (GSSG), ocasionando así una alteración del estado redox celular según Ji (2012). También se producirá un agotamiento del glutatión reducido llegando a ocasionar un estrés en el retículo endoplasmático, caracterizado por una alteración en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} como se muestra en la figura 21. La liberación descontrolada de Ca^{2+} influirá en la mitocondria, ya que su excesiva absorción promueve la formación de ROS a través de la desestabilización de la cadena electrónica y la apoptosis.

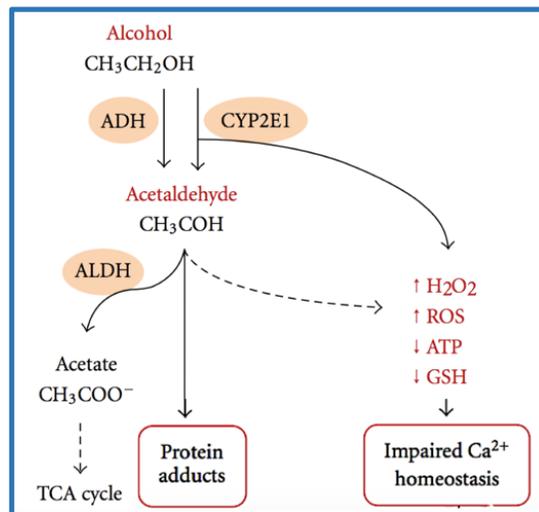


Figura 21. Formación de ROS a partir del alcohol y efecto en el balance de Ca^{2+} . (Ji, 2012)

Por otra parte, en bebedores crónicos los niveles de hierro son elevados en hígado y en suero. Este exceso ocasiona daños en los grupos hierro-azufre mitocondriales ocasionando de nuevo un incremento de ROS. La homeostasis del hierro esta regulada por la hepcitina, una hormona producida en el hígado y que su expresión puede ser regulada por un estado de estrés oxidativo en el retículo endoplasmático.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo son:

- 1- Probar si la administración aguda de etanol es capaz de causar en el cerebro de ratón daño oxidativo en macromoléculas.
- 2- Probar si la administración aguda de etanol produce cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa
- 3- En el caso de que la administración aguda ocasionase daño, comprobar que es debido al acetaldehído y no al etanol.
- 4- Evaluar los posibles efectos de la D-penicilamina como agente protector contra el daño causado por el alcohol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el experimento se usan ratones macho albinos Swiss (IOPS Orl) obtenidos de CERL-Janvier (Spain) con una edad de 5 semanas. Estos ratones, pertenecientes a una línea genéticamente estandarizada, fueron enjaulados en grupos de 4 con agua y comida disponibles de forma continua durante al menos una semana antes del experimento. La temperatura de la habitación fue mantenida en $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo de 12/12 horas luz/oscuridad. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo conforme a la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/CEE).

Como se muestra en la tabla 1, un total de 24 ratones fueron divididos en 4 grupos diferentes según el pretratamiento efectuado:

Grupo 1: Se realiza un pretratamiento con suero fisiológico, transcurrida media hora, se inyecta suero fisiológico de nuevo.

Grupo 2: El pretratamiento es con suero fisiológico, transcurrida media hora, se inyecta etanol (2,5 g/kg, intraperitoneal).

Grupo 3: Se realiza un pretratamiento con D-penicilamina (75 mg/kg, inyección intraperitoneal), transcurrida media hora, se inyecta suero fisiológico.

Grupo 4: El pretratamiento será con D-penicilamina (75 mg/kg, inyección intraperitoneal), transcurrida media hora, se inyecta etanol (2,5 g/kg, intraperitoneal).

Tabla 1: Diseño experimental realizado. Para cada grupo se muestra el tamaño de la muestra y el pretratamiento y tratamiento realizado.

	Pretratamiento (30 minutos)	Tratamiento (60 minutos)	Tamaño de la muestra
Grupo 1	Suero	Suero	n=6
Grupo 2	Suero	Etanol	n=6
Grupo 3	D-penicilamina	Suero	n=6
Grupo 4	D-penicilamina	Etanol	n=6

Transcurrida una hora desde el tratamiento, el ratón es sacrificado para realizar la extracción del cerebro. Este será congelado en nitrógeno líquido y guardado en un congelador de -80°C hasta el procesado y posterior determinación de los parámetros bioquímicos.

3.2 APARATOS

Para los diferentes ensayos se usó un espectrómetro UV/Vis de la marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25 acoplado a un termostato. También se usó una microcentrifuga refrigerada de la compañía Hettich modelo MIKRO 220R. Para las proteínas se usó un espectrofotómetro de la marca WWR, modelo Multiskan GO.

También se empleó un baño de agua, medidor de pH, balanza de precisión, nevera, congelador -80°C , homogeneizador de tejidos, vórtex y agitador magnético.

3.3 REACTIVOS

Los reactivos para las soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas y la D-penicilamina, son proporcionados por Sigma-Aldrich. Los disolventes y otros reactivos son adquiridos de Scharlau (Barcelona, España). Y el agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore).

3.4. MÉTODOS

3.4.1 Tratamiento de las muestras

A medio hemisferio cerebral del ratón se le añaden 3mL de tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH=7 y se disgrega el tejido usando un homogeneizador. A continuación, se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm, manteniendo la temperatura a 4 °C para evitar la degradación de la muestra. Finalmente el sobrenadante será transferido a eppendorfs que se almacenarán en un congelador hasta realizar los distintos ensayos.

3.4.2 Determinación de proteínas

Para cada muestra, también se realizó una determinación proteica mediante el método de Bradford usando como patrón la albúmina de suero bovino (BSA). Para realizar la cuantificación de proteínas de las muestras, se usó una placa de 96 pocillos. Se realizó una recta patrón con BSA a diferentes concentraciones desde 0,05 mg/ml hasta 1,5 mg/ml. Tanto los patrones como las muestras se realizarán por duplicado. A cada pocillo se agregará 200µl del agente de Bradford. Seguidamente se añadirán 10µl de los patrones y de las muestras. Al acabar, se dejará incubando unos 10 minutos (nunca más de una hora) a temperatura ambiente, antes de leer la microplaca a una absorbancia a 595 nm.

3.4.3. Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas

La oxidación proteica se mide por la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según el procedimiento desarrollado por Levine et al. (1990), con algunas modificaciones de Tian et al. (1998). La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente ($\epsilon_{373}=21.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

Para cada muestra de cerebro se necesitarán dos eppendorfs: 200µL de muestra serán introducidos en un eppendorf y 200 µL en el otro eppendorf para el control. A continuación se añaden a los eppendorfs que corresponden a los controles 400 µL de (HCl 2,5 M) y a los eppendorfs de las muestras se añaden 400µL de DNFH (10 mM) disuelto en HCl (2,5 M). Seguidamente se incuban 1 hora a temperatura ambiente, oscuridad y con agitación mediante vórtex cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se añaden 600µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se deja a 4°C durante 15 minutos para posteriormente centrifugar los eppendorfs a 12.600 rpm durante 3 minutos. A continuación, se recoge el pellet y se realiza tres

veces un proceso de lavado que consiste en añadir 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1, v/v), dejar reposar a 4°C durante 10 minutos y centrifugar otra vez a 12.600 rpm durante 3 minutos. Una vez finalizados los lavados se añaden a todos los eppendorfs 500µL de guanidina (6 N) a pH 2,3. Seguidamente se incuba en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos para que se disuelva el pellet y se centrifuga a 12.600 rpm durante 3 minutos. Finalmente se mide en el espectrofotómetro a una $\lambda = 373$ nm tras realizar el blanco con el grupo control correspondiente a cada muestra.

3.4.4 Determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA)

La determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico se realiza mediante la técnica de Flora *et al.*(2002). Se pipetea en tubos de vidrio con rosca 200µL de muestra a una concentración aproximada de 5g/100mL. También se hace un blanco con 200µL de agua miliQ. A continuación, se añaden 50µL de dodecilsulfato sódico SDS al 8,1%, se agita mediante vórtex y se deja transcurrir 10 minutos. Seguidamente se añaden 375µL de ácido acético al 20% y 375µL de TBA al 0,6%. Seguidamente, se tapan los tubos y se ponen a hervir en un baño durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se dejan enfriar unos 15 minutos y se añade 1,25mL de butanol:Pyr (15:1). Se vuelve a agitar mediante el vórtex y se centrifuga 5 minutos a 1000rpm.

Finalmente, se observarán dos fases líquidas, siendo la superior de color rosado la que se pondrá en la cubeta para medir la absorbancia a una $\lambda = 532$ nm. Paralelamente realizaremos patrones para poder extrapolar los resultados usando un análogo de MDA, el 1,1,3,3, Tetramethoxy propano a diferentes concentraciones: 50µM, 25µM, 10µM y 5µM.

3.4.5 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa en cerebro de ratón

El método para medir su actividad es el propuesto por Lawrence *et al.*(1978). Primero, en una cubeta se introducen 25µL de muestra, (en el caso del blanco se pondrá PBS), 575µL de una solución formada por PBS (0,1M) a pH=7, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 1mM) y azida sódica (1mM). También se introducirán 100µL de la enzima glutatión reductasa (2,4U/mL) y 100µL de glutatión reducido (10mM). Seguidamente se incubará a 37°C durante 5 minutos dentro del espectrofotómetro.

Transcurrido el tiempo, se añaden 100µL de una solución de NADPH (1,5mM en NaHCO_3 al 0,1%) y tras agitar con la pipeta, se lee en el espectrofotómetro hasta que se estabiliza la reacción (debido a la oxidación del NADPH no dependiente de hidroperóxidos). Tras estabilizarse, la reacción se iniciará introduciendo 100µL de peróxido de hidrógeno(1,5mM) y se monitorizará durante 5 minutos, correspondiendo esa disminución de la absorbancia con la oxidación del NADPH. Es importante controlar la temperatura del proceso. El resultado será expresado en nmol de NADPH consumidos por mg de proteína y minuto.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se obtienen tras aplicar la ley de Lambert-Beer a las anteriores determinaciones teniendo en cuenta el factor de dilución y aplicando una corrección por proteínas.

Los resultados se expresan como la media de cada grupo \pm la desviación estándar (s). Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial y con un nivel de confianza del 95% (p-value <0,05), se determinaron las diferencias entre grupos y las posibles interacciones entre los factores.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa de análisis STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Daño inducido a macromoléculas

a) Daño inducido a proteínas: niveles de contenido en grupos carbonilo

Cuando se determinó el contenido en grupos carbonilo (Tabla 2, figura 22), dentro del grupo pretratados con suero, no se observó un aumento significativo en aquel grupo de ratones a los que se administró posteriormente alcohol (G-2) frente al grupo control (G-1) ($32,75 \pm 15,42$ vs $31,71 \pm 3,42$). Entre otros motivos, no se observan diferencias significativas ya que las desviaciones estándar son muy dispersas.

Asimismo, cuando comparamos el grupo de animales control (G-1) con el grupo que recibió un tratamiento con D-penicilamina (G-3) los valores son similares ($31,71 \pm 3,42$ vs $34,97 \pm 23,92$), lo que nos indica que la D-penicilamina no tiene efecto tóxico. En cambio cuando comparamos los grupos tratados con alcohol ($38,76 \pm 18,9$ vs $29,44 \pm 10,25$), se observa, en el pretratado con D-penicilamina, una disminución en el contenido de grupos carbonilo, no siendo esta significativa ya que las desviaciones son elevadas.

Tabla 2. Niveles de contenido en grupos carbonilo tras la administración aguda de alcohol. Efecto de la D-penicilamina.

	Pretratam. / Tratam.	Media \pm s
G-1	Suero / Suero	$31,71 \pm 3,42$
G-2	Suero / EtOH	$32,75 \pm 15,42$
G-3	D-pen / Suero	$34,97 \pm 23,92$
G-4	D-pen / EtOH	$29,44 \pm 10,25$

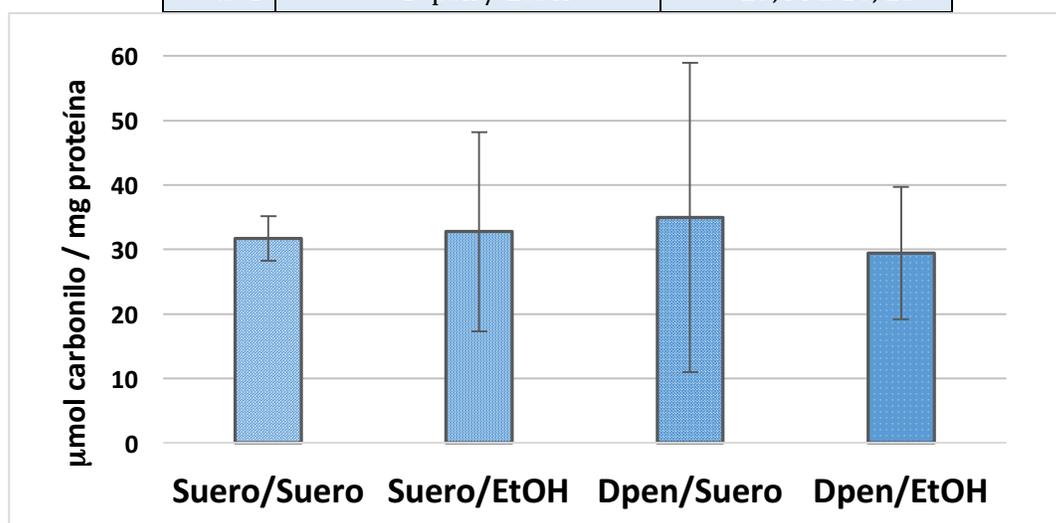


Figura 22. Niveles de contenido en grupos carbonilo en cerebro de ratón. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. En cada grupo la $n=6$. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la ANOVA.

Estos resultados nos indican que, aunque no tengamos valores significativos, la tendencia de la D-penicilamina es protectora frente a la inducción de las especies oxigénicas reactivas (ROS). Al realizar el análisis multifactorial con ANOVA, tampoco mostro una interacción pretratamiento-tratamiento.

b) Daño inducido a lípidos: niveles de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Respecto al daño inducido a lípidos, mediante la cuantificación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Tabla 3, figura 23) tampoco se observan diferencias significativas entre el grupo control (G-1) y el grupo tratado con alcohol (G-2) ($23,66 \pm 3,63$ vs $21,46 \pm 3,38$). Asimismo, tampoco se observan diferencias significativas entre el grupo tratado con alcohol (G-2) y el grupo tratado con alcohol más D-penicilamina (G-4) ($21,46 \pm 3,38$ vs $19,43 \pm 4,12$). Con el análisis ANOVA, tampoco hemos obtenido una interacción entre los factores pretratamiento-tratamiento.

Tabla 3. Niveles de TBARS tras la administración aguda de alcohol.
Efecto de la D-penicilamina.

	Pretratam. / Tratam.	Media \pm s
G-1	Suero / Suero	$23,66 \pm 3,63$
G-2	Suero / EtOH	$21,46 \pm 3,38$
G-3	D-pen / Suero	$20,30 \pm 0,56$
G-4	D-pen / EtOH	$19,43 \pm 4,12$

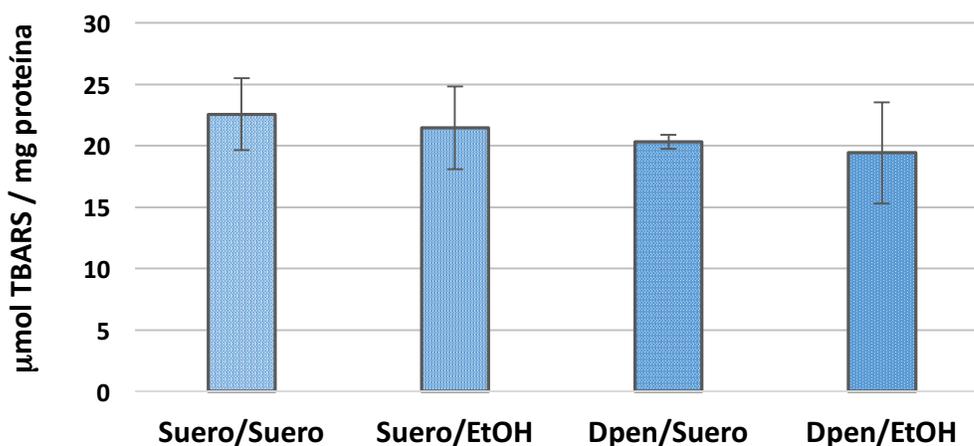


Figura 23. Niveles de TBARS en cerebro de ratón Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. En cada grupo la $n=6$. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la ANOVA.

4.1.2 Defensa antioxidante enzimática: niveles de glutatión peroxidasa

Respecto a los niveles de glutatión peroxidasa (Tabla 4, figura 24) observamos que en el grupo de animales que se les administraron dosis agudas de etanol (G-2 = $20,64 \pm 2,45$) se

4. Resultados y discusión

produce un incremento significativo (p -value $<0,05$) respecto al grupo control que solo se administró suero fisiológico (G-1 = $14,95 \pm 2,45$). Estos resultados nos exponen la toxicidad que está ejerciendo el alcohol. Por otra parte, el grupo de animales que se ha administrado la D-penicilamina junto con suero fisiológico (G-3), no cambian los niveles de GPx respecto al control(G-1)($14,65 \pm 4,27$ vs $14,95 \pm 2,45$). Esto nos indica que la D-penicilamina no produce ningún efecto tóxico *per se*.

En cambio en el grupo que se les administro etanol junto con D-penicilamina (G-4), observamos una disminución significativa (p -value $<0,05$) respecto al grupo que solo habían recibido la administración de alcohol (G-2): $20,64 \pm 4,51$ vs $13,94 \pm 2,8$, lo que nos indica que la D-penicilamina está ejerciendo un efecto protector frente al alcohol ya que disminuyen significativamente los niveles de GPx y por tanto de estrés oxidativo.

En esta determinación, el ANOVA mostro una interacción entre los factores pretratamiento-tratamiento y cuya explicación es el efecto protector de la D-penicilamina que sólo actuará ante el tratamiento alcohol (no ante el tratamiento suero). Todos los grupos establecen diferencias significativas frente al grupo 2, donde ha actuado el etanol.

Tabla 4. Niveles de glutatión peroxidasa tras la administración aguda de alcohol. Efecto de la D-penicilamina

	Pretratam. / Tratam.	Media \pm s
G-1	Suero / Suero	$14,95 \pm 2,45$ a
G-2	Suero / EtOH	$20,65 \pm 4,51$
G-3	D-pen / Suero	$14,65 \pm 4,3$ b
G-4	D-pen / EtOH	$13,94 \pm 2,8$ c

a) $p < 0,05$ - Comparando control (G-1) vs etanol (G-2)

b) $p < 0,05$ - Comparando etanol (G-2) vs D-penicilamina / suero (G-3)

c) $p < 0,05$ - Comparando etanol (G-2) vs D-penicilamina / etanol (G-4)

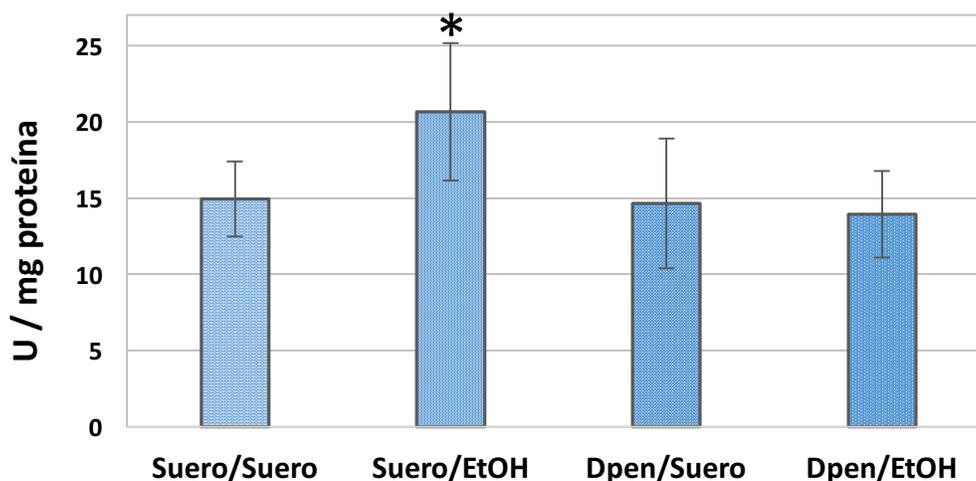


Figura 24 . Niveles de glutatión peroxidasa en cerebro de ratón. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. En cada grupo la $n=6$. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó la ANOVA. (* = grupo significativo frente al resto)

Todos estos resultados ponen de manifiesto el efecto de la D-penicilamina frente al etanol, aunque sean pocos resultados los presentados en este trabajo.

4.2 DISCUSIÓN

Tras la administración aguda de alcohol (2,5 g de etanol /kg de peso) hemos estudiado el daño inducido a macromoléculas (proteínas) y como parámetro del sistema enzimático de defensa antioxidante, hemos determinado la actividad de la enzima glutatión peroxidasa:

a) Grupos carbonilo

Respecto al contenido en grupos carbonilo de las proteínas, no observamos un aumento significativo del grupo tratado con alcohol respecto a su control; otros autores han observado un aumento significativo tras el tratamiento agudo con etanol en el cerebro de ratas (Rouach *et al.*, 1997). Cuando se administra etanol más D-penicilamina observamos una disminución no significativa del contenido en grupos carbonilo de proteínas, resultado que pone patente el efecto protector de la D-penicilamina. Asimismo, en otros estudios en los cuales se suministra alcohol de forma crónica a ratas, también se observa un aumento significativo en cuanto al contenido de grupos carbonilo en proteínas (Singh *et al.*, 2007 & Ozel-Turkcu *et al.*, 2010).

Con lo cual podemos confirmar que el etanol o productos de su metabolización como el acetaldehído producen un daño oxidativo a las proteínas.

b) Peroxidación lipídica

Aunque una administración aguda de etanol al 20% (v/v) mediante inyección intraperitoneal muestra alteraciones conductuales en los ratones (Ledesma & Aragón, 2013), no está bien descrito si en estas condiciones hay un efecto oxidativo sobre los lípidos como postulan algunas investigaciones (Ozel-Turkcu *et al.*, 2010 & Hernández, *et al.*, 2016)

Sin embargo en los resultados obtenidos en nuestro estudio, respecto a los niveles de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), no encontramos diferencias significativas tras la administración aguda de etanol, resultados que también han sido corroborados por otros autores (Fachinetto *et al.*, 2006 & Pyun *et al.*, 2013). Cuando, además, de etanol administramos D-penicilamina no observamos respuesta ante el estrés oxidativo, ya que no se ha producido una inducción oxidativa por etanol a nivel cerebral. Sin embargo, ante el estrés oxidativo inducido por ROS, la D-penicilamina sí tiene un efecto protector (Singh *et al.*, 2007)

c) Glutatión peroxidasa.

Asimismo, hemos determinado los niveles de la glutatión peroxidasa como enzima que forma parte de la defensa enzimática antioxidante, donde hemos observado que tras el tratamiento agudo de etanol a ratones se produce un aumento significativo ($P < 0,05$) respecto a su control (grupo tratado con suero fisiológico), resultados corroborados por otros estudios en ratas (Liew *et al.*, 2016). Asimismo, se han observado los mismos resultados en tratamientos crónicos (Rouach *et al.*, 1997).

4. Resultados y discusión

Cuando, además, del etanol administramos D-penicilamina observamos una disminución significativa ($p < 0,05$) indicativo del papel antioxidante que está ejerciendo ante la inducción de especies oxigénicas reactivas.

Como podemos comprobar con los resultados obtenidos y los obtenidos por otros autores existen bastantes controversias respecto al efecto agudo del etanol. Sin embargo, de los resultados obtenidos, tanto el daño oxidativo a proteínas como los niveles de glutatión peroxidasa como indicador de defensa antioxidante, podemos observar un efecto protector de la D-penicilamina frente a los radicales libres inducidos por el etanol o productos de su metabolización como el acetaldehído que inducen daño a proteínas y activan la defensa antioxidante.

Por otra parte, el hecho de que la D-penicilamina anule el efecto que produce el alcohol sobre la glutatión peroxidasa, nos muestra de forma indirecta que es el acetaldehído el causante del daño oxidativo en el cerebro y no el etanol. La D-penicilamina es un quelante del acetaldehído, por tanto, si el daño fuese causado por el etanol los valores del grupo 4 (D-penicilamina / etanol) de la determinación de la enzima serían significativamente más elevados, ya que la este fármaco no nos protegería frente el etanol. Por tanto, al ejercer un efecto protector oxidativo, nos dilucida indirectamente que es ocasionado por el acetaldehído (Comporti *et al.*, 2010 & Finnerty *et al.*, 2015).

El sistema de recompensa celular podría estar detrás de estos resultados, donde en estas condiciones, todavía no se ha producido daño macromolecular pero si que se observan variaciones enzimáticas. En las células existe un sistema de compensación a través del cual ante un agente tóxico o que pueda ocasionar un daño biomolecular, se aumenta la actividad o expresión de enzimas reparadoras intentando evitar un daño celular. En el caso de las ROS, se aumentaría la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa. Este mecanismo de protección celular no puede mantenerse continuamente, por lo que llegará a un punto en el que decae y por tanto, empezará a ocasionarse el daño macromolecular.

Un ejemplo de este sistema de compensación sería el descrito por Hernández *et al.* (2016), donde para protegerse del daño lipídico inducido por el etanol, las membranas de neuronas presentan un incremento en el colesterol. El etanol es capaz de ocasionar la desestabilización lipídica de las membranas, por otra parte el colesterol aporta rigidez en la membrana. Por ende, el aumento de colesterol sería un mecanismo de compensación para combatir el daño del etanol.

Finalmente, para poder dilucidar los efectos concretos del acetaldehído sobre los distintos componentes celulares mediante la generación de ROS, se necesitaría realizar estudios más exhaustivos introduciendo variables de tiempo y concentración en base a encontrar, entre otros aspectos, el momento en el que el sistema de compensación decae y se empieza a observar daño macromolecular.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

A estas condiciones de los tratamientos y método de administración, se puede concluir:

- 1- Tras administración aguda de etanol no se observan cambios significativos en los niveles de grupos carbonilo entre los grupos.
- 2- Tras administración aguda de etanol tampoco se observan cambios significativos en los niveles de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.
- 3- Respecto a los niveles de glutatión peroxidasa se muestra un aumento significativo tras la administración de etanol respecto a su grupo control, y una disminución en el grupo que además de administrar etanol, se ha pretratado con D-penicilamina.
- 4- Se demuestra el papel del acetaldehído y no del etanol, como principal molécula inductora de ROS.
- 5- Se deduce una acción neuroprotectora de la D-penicilamina ante el consumo de alcohol.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Bibliografia

- ALTAMIRANO, J. & BATALLER, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(9), 491-501.
- BALIUNAS, D.O.; TAYLOR, B.J., IRVING, H.; ROERECKE, M.; PATRA, J.; MOHAPATRA, S. & REHM, J. (2009). Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes : A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 32(11), 2123-32.
- BIERUT, L.J.; GOATE, A.M.; BRESLAU, N.; JOHNSON, E.O.; BERTELSEN, S.; FOX, L.; AGRAWAL, A.; BUCHOLZ, K.K.; GRUCZA, R.; HESSELBROCK, V.; KRAMER, J.; KUPERMAN, S.; NURNBERGER, J.; PORJESZ, B.; SACCONI, N.L.; SCHUCKIT, M.; TISCHFIELD, J.; WANG, J.C.; FOROUD, T.; RICE, J.P. & EDENBERG, H.J. (2012). ADH1B is associated with alcohol dependence and alcohol consumption in populations of European and African ancestry. *Mol Psychiatry.* 17(4), 445-50.
- BRADFORD, B.U.; KONO, H.; ISAYAMA, F.; KOSYK, O.; WHEELER, M.D.; AKIYAMA, T.E.; BLEYE, L.; KRAUSZ, K.W.; GONZALEZ, F.J.; KOOP, D.R. & RUSYN, I. (2005). Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology.* 41(2), 336-44.
- BROOKS, P.J.; ENOCH, M.A.; GOLDMAN, D.; LI, T.K.; YOKOYAMA, A. (2009). The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. *PLoS Med.* 6(3), e50.
- BÜHLER, M. & MANN, K. (2011). Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. *Alcohol Clin Exp Res.* 35(10): 1771-93.
- CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S. & MAK, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Rev Cancer* , 11(2), 85-95.
- CANNING, P.; SORRELL, F.J. & BULLOCK, A.N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med.* , 88(Pt B), 101-107.
- COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; LEONCINI, S.; GARDI, C.; CICCOLI, L.; GIARDINI, A.; VECCHIO, D. & AREZZINI, B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* 5(2), 101-109
- CREWS, F.; HE, J. & HODGE, C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 86(2), 189-99.
- CREWS, F.T. & VETRENO, R.P. (2014). Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int Rev Neurobiol.* 118, 315-57.

- DHAWAN, V. (2014). Chapter 2 Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. *Studies on Respiratory Disorders* (págs. 27-47). Springer.
- DIANA, A. (2005). Papel regulador de la enzima xantina oxidasa en el proceso apoptótico. estudio en glándula mamaria de rata. Tesis doctoral. Universitat de València.
- DREHMER, E.; VALLS, V.; MUÑIZ, P., CABO, J. & SÁEZ, G.T. (2001). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and antioxidant status in rat liver fed with olive and corn oil diets: Effect of ascorbic acid supplementation. *J Food Lipids*, 8(4), 281-294.
- EDENBERG H.J. & FOROUD, T.(2013). Genetics and alcoholism. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 10(8), 487-94.
- EDENBERG, H.J. (2007). The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health*. 30, 5-13.
- ENGEN, P.A.; GREEN, S.J.; VOIGT RM.; FORSYTH C.B. & KESHAVARZIAN, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res*. 37(2), 223-36.
- ERIKSSON, C.J. (2001) The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 25(5 Suppl ISBRA), 15S-32S.
- FACHINETTO, R.; PIVETTA, L.A.; FARINA, M.; PEREIRA, R.P.; NOGUEIRA, C.W. & ROCHA, J.B. (2006). Effects of ethanol and diphenyl diselenide exposure on the activity of delta-aminolevulinate dehydratase from mouse liver and brain. *Food Chem Toxicol*. 44(4), 588-94.
- FINNERTY, N.; O'RIORDAN, S.L.; KLAMER, D.; LOWRY, J. & PÅLSSON, E. (2015). Increased brain nitric oxide levels following ethanol administration. *Nitric Oxide*(47), 52-7
- FLORA, G.; LEE, Y.W.; NATH, A.; MARAGOS, W.; HENNING, B. & TOBOREK, M.(2002). Methamphetamine-induced TNF-alpha gene expression and activation of AP-1 in discrete regions of mouse brain: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Neuromolecular Med*. (Vol. 2(1)).
- FREI, B. (1994). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*, 97 (3A), 5S-13S.
- FUKAI, T. & USHIO-FUKAI, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, 15(6), 1583-1606.
- HALLIWELL, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutricion Reviews*, 70(5), 257-265.

6. Bibliografia

- HURLEY, T.D. & EDENBERG, H.J. (2012). Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. *Alcohol Res.* 34(3), 339-44.
- Ji, C. (2012). Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochem Res Int.* 216450, 1-12.
- JIANG, L.; GULANSKI, B.I.; DE FEYTER, H.M.; WEINZIMER, S.A.; PITTMAN, B.; GUIDONE, E.; KORETSKI, J.; HARMAN, S.; PETRAKIS, I.L.; KRYSTAL, J.H. & MASON, G.F. (2013). Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. *J Clin Invest.* 123(4), 1605-14.
- KANSANEN, E.; KUOSMANEN, S.M.; LEINONEN, H. & LEVONEN, A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* , 1, 45-49.
- LAWRENCE, R.A.; PARKHILL, L.K. & BURK, R.F. (1978). Hepatic cytosolic non-selenium dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 108, 981-987
- LEDESMA, J.C. & ARAGON, C.M. (2013). Acquisition and reconditioning of ethanol-induced conditioned place preference in mice is blocked by the H₂O₂ scavenger alpha lipoic acid. *Psychopharmacology (Berl)*. 226(4), 673-85.
- LEDESMA, J.C.; FONT, L.; BALIÑO, P. & ARAGON, C.M. (2013). Modulation of ethanol-induced conditioned place preference in mice by 3-amino-1,2,4-triazole and D-penicillamine depends on ethanol dose and number of conditioning trials. *Psychopharmacology (Berl)*. 230(4), 557-68.
- LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G. *et al.* (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* , 186, 464-479.
- LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; *et al.* (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651
- LI, S.; TAN, H.Y.; WANG, N.; ZHANG, Z.J.; LAO, L.; WONG, C.H. & FENG, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Science* , 16, 26087-26124.
- LIEW, H.K.; CHENG, H.Y.; HUANG, L.C.; LI, K.W.; PENG, H.F.; YANG, H.I.; LIN, P.B.; KUO J.S. & PANG, C.Y. (2016). Acute Alcohol Intoxication Aggravates Brain Injury Caused by Intracerebral Hemorrhage in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 25(1), 15-25.

- LINHART, K.; BARTSCH, H. & SEITZ, H.K. (2014). The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 3,56-62.
- LIU, GY. & STORZ, P (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* Vol. 44(5):479-496.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* 252(1), 1-8.
- LÓPEZ, A.B. (2013). Efecto del zumo de mandarina sobre el estrés oxidativo: estudio experimental y en patologías mediadas por radicales libres. Tesis Doctoral en Bioquímica Clínico-Médica e Inmunología. Universitat de València.
- LU, Y.; ZHUGE, J.; WANG, X.; BAI, J. & CEDERBAUM, A.I.(2008). Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *Hepatology.* 47(5), 1483-94.
- LUSHCHAK, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* , 224C, 164-175.
- MORGAN, K.; FRENCH, S.W. & MORGAN, T.R.(2002). Production of a cytochrome P450 2E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage. *Hepatology.* 36(1): 122-34.
- NIH. MEDLINE PLUS. SÍNDROME DE ALCOHOLISMO FETAL. (2014). Visto en mayo 2016. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000911.htm>
- NIH. NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE 2010. Visto en mayo 2016. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/esclerosis_lateral_amiotrofica.htm
- NIH. NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. (2015). Visto en mayo 2016. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm
- NIH. NIAAA. BEYOND HANGOVERS.UNDERSTANDING ALCOHOL'S IMPACT ON YOUR HEALTH.(2015). NIH Publication No. 15-7604
- NORBERG, A.; JONES, A.W.; HAHN, R.G. & GABRIELSSON, J.L. (2003). Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet.* 42(1), 1-31.
- OLALLA, L. & MATES, J.M. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES . UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. Visto el 6 de Enero de 2016. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros56/radicales.html>

6. Bibliografía

- OZEL-TURKCU, U.; BILGIHAN, A.; BIBEROGLU, G. & MERTOGLU CAGLAR, O. (2010). Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 339(1-2), 55-61.
- PAIVA, C.N. & BOZZA, M.T. (2014). Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxidants & Redox Signaling* , 20:(6).
- PAMPLONA, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. . *Biochim Biophys Acta.* , 1777(10), 1249-1262.
- PÁRAMO, D.; OTERO, W. & PINEDA, L.F. (2010). Fibrogénesis hepática. *Rev Col Gastroenterol* , 25 (2) , 187-197.
- PARK, S.G.; KIM, J.M.; XIA, Y. & SUNG, J.M. (2011). Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets* , 15(11), 1297-1306.
- PHANIEDRA, A.; BABU, D. & PERIYASAMY, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Ind J Clin Biochem* , 30(1), 11-26.
- PONCZEK, B. & MACHOWICZ. (2005). Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins. *Postepy Biochem* , 51, 140-155 .
- QUERTEMONT, E. & DIDONE, V. (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res Health.* 29(4), 258-65.
- QUERTEMONT, E.; TAMBOUR, S. & TIRELLI E. (2005). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol.* 75(4), 247-74.
- RASINENI, K. & CASEY, C.A. (2012). Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian J Pharmacol.* 44(3), 299-303.
- RICHTER, C.; PARK, J.W. & AMES, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* , 85(17), 6465-6467.
- ROBERT, A.M. & ROBERT, L. (2014). Xanthine Oxido-Reductase, Free Radicals and Cardiovascular Disease. A Critical Review . *Pathol. Oncol. Res.* , 20, 1-10.
- ROERECKE, M. & REHM, J. (2012). Alcohol intake revisited: risks and benefits. *Curr Atheroscler Rep.* Dec; 14(6), 556-62.
- ROTHSTEIN, J.D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 65, S3-S9.
- ROUACH, H.; HOUZÉ, P.; GENTIL, M.; ORFANELLI, M.T. & NORDMANN, R. (1997). Changes in some pro- and antioxidants in rat cerebellum after chronic alcohol intake. *Biochem Pharmacol.* 53(4), 539-45.

- SABURDY, F.; ASTUDILLO, L.; COLACIOS, C.; DUBOT, P.; MRAD, M.; SÉGUI, B.; ANDRIEU-ABADIE, N. & LEVADE, T. (2015). Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. (Vols. 1851, Issue 8).
- SEITZ, H.K. & STICKEL, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7(8), 599-612.
- SIES, H. (1985). *Oxidative Stress*. London: Academic Press.
- SINGH, I.N.; SULLIVAN, P.G. & HALL, E.D. (2007). Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers. *J Neurosci Res*. 85(10), 2216-23.
- SUN, Q.; LONG, Z.; WU, H.; LIU, Y.; WANG, L.; ZHANG, X.; WANG, X. & HAI, C. (2015). Effect of alcohol on diethylnitrosamine induced hepatic toxicity: Critical role of ROS, lipid accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Exp Toxicol Pathol*. 67(10), 491-8.
- TAPPENDEN, K.A.; DEUTSCH, A.S. (2007). The physiological relevance of the intestinal microbiota contributions to human health. *J Am Coll Nutr*. 26(6), 679S-83S.
- TIAN, L.; CAI, Q. & WEI, H. (1998). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med*. 1998, 24(9), 1477-1484.
- TRESIERRA, L. (2015). *Linfangiopatía intestinal en la colestasis extrahepática microquirúrgica experimental*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- TUMA, D.J. & CASEY, C.A. (2003). Dangerous by products of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res Health*. 27(4), 285-90.
- UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P. & MAHAJAN, R.T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
- WATSON, J. (2013). Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol*, 3 (120144), 1-9.
- WHO. GLOBAL STATUS REPORT ON ALCOHOL AND HEALTH. (2014). WHO Library Cataloguing in publication data.
- WOO, H.A.; YIM S.H.; SHIN, D.H.; KANG, D.; YU, D.Y. & RHEE, S.G. (2012). Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signal. *Cell*, 140, 517-528.

6. Bibliografia

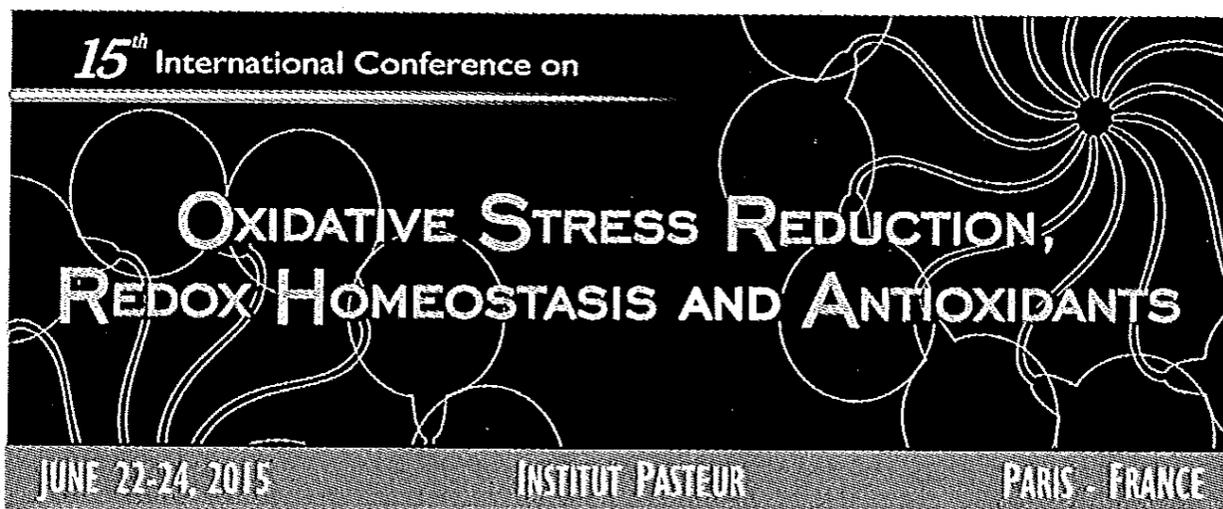
- ZAKHARI, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol Res Health*. 29(4), 245-54.
- ZAKHARI, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res*. 35(1):6-16.
- ZANGAR, R.C.; DAVYDOV, D.R. & VERMA, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 199(3), 316-331.
- ZEMPEL, H. & MANDELKOW, EM. (2015). Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Molecular Neurodegeneration*, 10:68, 1-12.
- ZITKA, O.; SKALICKOVA, S.; GUMULEC, J.; MASARIK, M.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; TRNKOVA, L.; KRUSEOVA, J.; ECKSCHLAGER, T. & KIZEK, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett*, 4(6), 1247-1253.

VII. ANEXOS

International Society of Antioxidants

15th ISANH Conference on

Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants



Abstracts Book



INTERNATIONAL SOCIETY
— OF —
ANTIOXIDANTS

**15th International Conference on
Oxidative Stress Reduction,
Redox Homeostasis &
Antioxidants**

22-24 June, Paris – France

Chairpersons of the Scientific Committee

Marvin Edeas - Miria Ricchetti



INTERNATIONAL SOCIETY
OF
ANTIOXIDANTS
IN NUTRITION & HEALTH

ISBN 978-2-35609-088-1

ETHANOL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN MOUSE BRAIN: ROLE OF ACETALDEHYDE

Baliño, Pablo (1); Garcia, Guillem (2); Valls-Belles, Victoria (3); Sanchez-Andres, Juan Vicente (3); Aragon, Carlos Manuel (3); Muriach, Maria (3)

1: University of Leicester, United Kingdom 2: Universidad Politécina de Valencia, Spain

3: Universitat Jaume I, Spain

muriach@uji.es

Introduction: Ethanol, one of the most widely consumed substances of abuse, can induce brain damage and neurodegeneration, although the particular mechanism of action at a central level has not been described in detail yet. Ethanol is centrally metabolized into acetaldehyde, which has been shown to be responsible for some of the neurophysiological and cellular effects elicited by ethanol (1). Moreover, centrally formed acetaldehyde seems to play a key role in the burst of ROS levels observed after acute ethanol administration (2). However, the particular mechanism by which ethanol or acetaldehyde contribute to oxidative stress is still unclear. Objectives: To ascertain the role of acetaldehyde on ethanol-induced generation of ROS in the brain. Methodology: Swiss mice were pretreated with the acetaldehyde scavenging agents D-penicillamine (75 mg/kg, i.p.) and alpha lipoic acid (100 mg/kg, i.p.) at different times before ethanol (2.5 g/kg, i.p.) administration. Brains were immediately removed and glutathione peroxidase (GPx) activity and protein carbonyl groups (PCGs) were determined. Results: Ethanol administration increased the PCGs and enhanced GPx activity in a dose fashion. Pretreatment with these two acetaldehyde scavengers protected against these ethanol effects. Conclusions: These data point out the key role of acetaldehyde on the generation of brain ROS.

1. Tarragon E, Baliño P, Aragon CM. Centrally formed acetaldehyde mediates ethanol-induced brain PKA activation. *Neurosci Lett.* 2014 Sep 19;580:68-73.

2. Ledesma JC, Baliño P, Aragon CM. Reduction in central H₂O₂ levels prevents voluntary ethanol intake in mice: a role for the brain catalase-H₂O₂ system in alcohol binge drinking. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014 Jan;38(1):60-7.