

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE LA LESION HEPATICA Y DE LA ACTIVIDAD
ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA
HEPATICAS EN EL METABOLISMO DEL ETANOL.

Julián Panés Díaz

Terrassa, Octubre de 1988



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Como director de la Tesis titulada "Influencia de la lesión hepática y de la actividad alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas en el metabolismo del etanol", presentada por el Licenciado Julià Panés Diaz, hago constar que está en condiciones de ser leída por el Tribunal correspondiente.

Los objetivos son claros y la bibliografía adecuada y actualizada. El trabajo de investigación realizado es de un gran nivel científico y las conclusiones se ajustan a los resultados obtenidos.

Barcelona, 10 de Noviembre de 1988

Fdo: Prof. Joan Rodés i Teixidor
Catedrático de Medicina

INFLUENCIA DE LA LESION HEPATICA Y DE LA ACTIVIDAD
ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA
HEPATICAS EN EL METABOLISMO DEL ETANOL.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Julián Panés Díaz', with a long horizontal line extending to the right.

Julián Panés Díaz

Terrassa, Octubre de 1988

A María Dolores y a Ester

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de esta tesis ha requerido la colaboración de muchas personas. Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que la han hecho posible.

Al profesor Joan Rodés Teixidor, quien con su inagotable inquietud científica a tantos nos ha estimulado para trabajar en la investigación. Mi agradecimiento por aceptar la dirección de esta tesis.

A los Dres. Albert Parés y Joan Caballería cuyo trabajo y labor crítica han estado presentes desde el principio hasta el término de esta tesis. También a ellos debo mi formación como investigador.

A los Dres. Miquel Rodamilans y Raimon Guitart por su incondicional colaboración en el análisis del metabolismo del etanol.

Al profesor Xavier Parés y a Xavier Soler y Dr. Jaume Farrés del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su contribución en el análisis de los enzimas hepáticos.

Al Dr. Miquel Navasa por su labor en la realización de los estudios hemodinámicos.

A todos los miembros de la Unidad de Hepatología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona así como a las enfermeras de las salas de hospitalización por su indispensable ayuda.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS SURGIDAS DE LA

PRESENTE TESIS

1. Hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases in liver disease. A. Parés, X. Soler, J. Panés, X. Parés, J. Caballería, J. Farrés, R. Raz, J. Rodés. En: Advances in biomedical alcohol research. K.O. Lindros, R. Ylikahri, K. Kiianmaa (Eds.). Pergam Press. 1987.
2. Patología médica en el alcoholismo. J. Panés. En: Trastorno por dependencia del alcohol. Aspectos actuales 1988. P.A. Soler-Insa, F. Freixa, F. Reina-Galán (Eds.). 1988
3. Influencia de la función hepática y de la actividad alcohol deshidrogenasa sobre el metabolismo del etanol en el alcoholismo crónico. M Rodamilans, J Panés, R Guitart, A Parés, X Soler, J Caballería, X Parés, J Rodés, J Corbella. VI Jornadas Toxicológicas de la Asociación Española de Toxicología. Córdoba, Noviembre 1985.
4. Influencia del alcoholismo y de la intensidad de la lesión hepática sobre las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas. J Panés, A Parés, X Soler, X Parés, J Caballería, J Farrés, J Rodés. XI Congreso de la Asociación Española de Hepatología. Madrid, Mayo 1986.
5. Metabolismo hepático del etanol en el alcoholismo crónico. Relación con el funcionalismo hepático. J Panés, A Parés, R Guitart, M Rodamilans, J Caballería, X Soler, X Parés, J Rodés. XXX Reunión Nacional Extraordinaria de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Granada, Junio 1986.
6. Hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases in liver disease. A Parés, X Soler, J Panés, X Parés, J Caballería, J Farrés, Raz. J Rodés. Third Congress of the international society for biomedical research on alcoholism. Helsinki, Junio 1986.
7. Factors influencing blood acetaldehyde levels after ethanol administration in chronic alcoholics. J Panés, A Parés, R Guitart, X. Soler, M Rodamilans, J Caballería, X Parés, J Rodés. 21st annual meeting of the European Society for Clinical Investigation. Elsinore (Dinamarca), Marzo 1987.
8. Factores determinantes de los niveles plasmáticos de acetaldehido durante la oxidación del etanol en los alcohólicos crónicos. J. Panés, A. Parés, R. Guitart, X. Soler, M. Rodamilans, J. Caballería, X. Parés, J. Rodés. XII Congreso de la Asociación Española de Hepatología. Madrid, Junio 1987.

9. Factors influencing blood acetaldehyde levels after ethanol administration in chronic alcoholics. J Panés, A Parés, R Guitart, X. Soler, M Rodamilans, J Caballería, X Parés, J Rodés. 22nd meeting of de European Association for the study of the liver. Torino (Italia) Septiembre 1987.

INDICE

I.	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DE LA TESIS	13
II.	PARTE TEORICA	22
1.	METABOLISMO HEPATICO DEL ETANOL	23
1.1.	La via de la alcohol deshidrogenasa	24
1.1.1.	Oxidación del etanol por medio de la alcohol deshidrogenasa	24
1.1.2.	Cambios metabólicos asociados al desequilibrio de oxidorreducción producido por la oxidación del etanol	27
1.1.3.	Factores limitantes de la veloci- dad de oxidación del etanol por medio de la alcohol deshidrogena- sa	33
1.2.	Sistema microsomal oxidativo del etanol.	37
1.2.1.	Oxidación del etanol por medio del sistema microsomal.	37
1.2.2.	Diferenciación del sistema micro- somal oxidativo del etanol de otras vias oxidativas	39
1.3.	Papel de la catalasa	41

2.	ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL ETANOL EN EL ALCOHOLISMO CRONICO	42
2.1.	Aumento de la capacidad oxidativa del etanol relacionado con la alcohol deshidrogenasa.	43
2.2.	Aumento de la capacidad oxidativa del etanol no relacionado con la alcohol deshidrogenasa	46
3.	EFFECTOS TOXICOS DEL ACETALDEHIDO	49
4.	VARIABILIDAD GENETICA DE LOS ENZIMAS OXIDATIVOS DEL ETANOL	61
4.1.	Isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa . . .	62
4.1.1.	Distribución tisular de los isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa . .	64
4.1.2.	Variabilidad genética de la alcohol deshidrogenasa	65
4.1.2.1.	Variabilidad del locus ADH2 .	65
4.1.2.2.	Variabilidad del locus ADH3 .	68
4.1.2.3.	Locus ADH1.	69
4.1.3.	Frecuencias poblacionales de las variantes genéticas de la alcohol deshidrogenasa clase I	70
4.1.3.1.	Frecuencia de alelos ADH2 . .	70
4.1.3.2.	Frecuencia de alelos ADH3 . .	71
4.1.4.	Características estructurales de los genes e isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa	73

4.1.5.	Propiedades cinéticas de las tres clases de isoenzimas alcohol deshidrogenasa hepáticas.	75
4.1.6.	Relación entre el polimorfismo de la alcohol deshidrogenasa y la farmacocinética de eliminación del etanol	77
4.2.	Isoenzimas de la aldehido deshidrogenasa. . .	79
4.2.1.	Variabilidad genética de los isoenzimas de la aldehido deshidrogenasa. .	81
4.2.2.	Estructura y propiedades de los isoenzimas de la aldehido deshidrogenasa	83
4.2.3.	Relación entre el polimorfismo de la aldehido deshidrogenasa y la toxicidad por acetaldehido	85
5.	ENFERMEDADES HEPATICAS DE ORIGEN ALCOHOLICO. . . .	86
5.1.	Epidemiología de las enfermedades hepáticas producidas por el alcohol	86
5.2.	Clínica e histología de la hepatopatía alcohólica.	91
5.2.1.	Esteatosis	91
5.2.2.	Fibrosis Hepática.	93
5.2.3.	Hepatitis Alcohólica	94
5.2.4.	Cirrosis Alcohólica.	97

III. PARTE PRACTICA	100
1. PACIENTES Y METODOS.	101
1.1. Pacientes	101
1.2. Análisis del funcionalismo hepático	102
1.2.1. Biología básica.	102
1.2.2. Prueba del aliento con aminopirina	102
1.2.3. Prueba del verde de indocianina.	103
1.3. Determinación de la capacidad de oxida- ción hepática del etanol.	105
1.3.1. Administración aguda de etanol	105
1.3.2. Determinación de las concentra- ciones de etanol en plasma	106
1.3.3. Cálculo de la capacidad oxidativa del etanol	108
1.4. Determinación de los niveles de acetaldehido en plasma	110
1.5. Biopsia hepática.	115
1.6. Análisis histológico.	116
1.7. Análisis de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas	118
1.7.1. Actividades alcohol deshidrogenasa	119
1.7.2. Actividades aldehido deshidrogenasa.	120
1.8. Determinación de la concentración de proteínas solubles en el tejido hepático.	122

1.9.	Análisis de los isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas	122
1.10.	Análisis estadístico.	126
2.	RESULTADOS	128
2.1.	Metabolismo hepático del etanol	129
2.1.1.	Influencia de la lesión hepática	129
2.1.2.	Influencia del grado de función hepática	133
2.1.2.1.	Prueba de la aminopirina.	133
2.1.2.2.	Prueba del verde de indo- cianina	134
2.1.3.	Influencia de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas	137
2.2.	Niveles plasmáticos de acetaldehido	140
2.2.1.	Relación con el grado de lesión hepática	142
2.2.2.	Influencia de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas	142
2.2.3.	Influencia de la capacidad oxida- tiva del etanol.	144
2.3.	Actividades alcohol deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa hepáticas	147
2.3.1.	Actividad alcohol deshidrogeasa hepática	149

2.3.2.	Actividad aldehido deshidrogenasa.	154
2.3.2.1.	ALDH total.	154
2.3.2.2.	ALDH de alta Km	155
2.3.2.3.	ALDH de baja Km	156
2.3.3.	Relaciones entre las actividades alcohol y aldehido deshidrogenasa.	158
2.4.	Concentración de proteínas en el tejido hepático.	160
2.5.	Análisis de los isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa.	161
2.5.1.	Isoenzimas de la clase I.	161
2.5.1.1.	Variabilidad del locus ADH2.	161
2.5.1.2.	Variabilidad del locus ADH3.	162
2.5.2.	Isoenzimas de la clase II.	165
2.5.3.	Isoenzimas de la clase III	166
2.6.	Análisis de los isoenzimas de la aldehido deshidrogenasa.	166
3.	DISCUSION.	168
IV.	CONCLUSIONES.	198
V.	BIBLIOGRAFIA.	201

I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DE LA TESIS.

El alcohol etílico puede ser una sustancia eficaz para mitigar la ansiedad, la depresión y las presiones de la sociedad moderna. Sin embargo, el uso prolongado del alcohol para lograr estos efectos farmacológicos conduce a un consumo cada vez mayor. A pesar de que los efectos psicofarmacológicos de altas dosis de etanol en el alcohólico crónico son distintos a los efectos de pequeñas dosis en el bebedor ocasional, los consumidores crónicos de etanol son habitualmente incapaces de abandonar la ingesta. De hecho, algunos de ellos mantienen la ingesta con el único fin de evitar los efectos psicológicos y físicos de la abstinencia.

La amplia disponibilidad del etanol y la aceptación social del consumo de alcohol son anunciados de manera casi agresiva en nuestro medio. La industria productora de bebidas alcohólicas gasta enormes cantidades de dinero sugiriendo que el consumo de etanol, tanto para hombres como para mujeres, facilita la sociabilidad y conlleva prestigio y bienestar. No se gasta nada, en cambio, en anunciar los efectos soporíferos del etanol, el deterioro físico y social asociados al consumo crónico, o que la adicción al etanol puede aparecer de forma insidiosa. Muchos médicos hemos podido constatar que una gran parte de la población no se da cuenta de que el consumo mantenido de etanol puede dar lugar a la aparición de graves enfermedades aun en ausencia de adicción y/o de la aparición de consecuencias sociales del alcoholismo. La combinación de los efectos farmacológicos del etanol, su

amplia disponibilidad y la presión social para consumirlo ha dado lugar a la aparición de un grave problema de salud que va cada día en aumento.

En España, como país productor de vino, y también como consecuencia del aumento del nivel de vida experimentado en los últimos años, el problema del alcoholismo es particularmente grave, ya que el consumo medio de alcohol ha ido en constante aumento, pasando de un consumo de 8 litros de etanol puro por habitante y año en 1952, a más de 13 litros en el año 1980. Además, de un total de 24 países europeos, en 1980 España era el segundo país, después de Francia, con mayor consumo de alcohol por habitante y año. Estudios epidemiológicos realizados en diversas regiones españolas coinciden en demostrar que el 70% de los españoles son consumidores de alcohol, aunque sólo un 50% lo hacen regularmente. Estos estudios también revelan que un 10% de la población adulta (de 15 a 65 años) en nuestro país consume una cantidad excesiva de alcohol.

El consumo excesivo de alcohol se acompaña de un aumento marcado de la morbilidad y mortalidad. Se ha constatado que de un 20 a un 30 % de los pacientes que ingresan en un Servicio de Medicina Interna de un Hospital General lo hacen por enfermedades relacionadas directa o indirectamente con el alcoholismo y que un 40% de los ingresos psiquiátricos, según datos de la Dirección General de Sanidad, están relacionados con el alcoholis-

mo. En 1977 se estimó que en España unos 12.000 fallecimientos se podían atribuir al alcoholismo, con una tasa de mortalidad de 35.5 por 100.000 habitantes, que colocaría al alcoholismo en el cuarto lugar de las causas de mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares, las neoplasias y los accidentes.

La mortalidad por cirrosis hepática ha aumentado de forma espectacular en España en las últimas décadas pasando de una tasa de mortalidad estandarizada de 11.8 por 100.000 en 1951 a una tasa de 21.7 por 100.000 en 1977. Diversos estudios han demostrado la asociación causal entre la cirrosis hepática y el alcoholismo. Algunos de estos estudios han demostrado también la relación directa entre mortalidad por cirrosis hepática y disponibilidad de alcohol. Estos estudios han podido demostrar que la incidencia de cirrosis hepática aumenta de forma directa con el consumo de alcohol y, además, que la mortalidad por cirrosis hepática dentro de una comunidad también aumenta si la disponibilidad de bebidas alcohólicas es mayor. Sin embargo, no todos los alcohólicos crónicos con elevado consumo de etanol presentan una hepatopatía, como se ha demostrado en diferentes estudios basados en el análisis histológico del hígado. En la mayoría de ellos se demuestra que la cuarta parte de los pacientes alcohólicos tienen una cirrosis hepática, la quinta parte una hepatitis alcohólica sin cirrosis, la tercera parte una esteatosis hepática y una cuarta parte de los alcohólicos crónicos no presentan lesiones hepáticas. Estos resulta-

dos sugieren que debe existir una cierta predisposición individual para el desarrollo de lesiones hepáticas, ya que ante una misma duración e intensidad del alcoholismo hay sujetos que desarrollan lesiones hepáticas mientras que otros no las presentan. En esta predisposición individual se han implicado fundamentalmente factores genéticos, aunque también se pueden implicar influencias nutricionales. El desarrollo de lesiones hepáticas en los alcohólicos crónicos puede venir determinado por la diferente capacidad individual para metabolizar el etanol en el hígado, ya que a los productos resultantes de la oxidación del etanol -acetaldehído y alteración del potencial redox- se les atribuye la responsabilidad de la mayoría de las lesiones celulares. La capacidad individual para metabolizar el etanol está condicionada por los fenotipos y actividades de los principales sistemas oxidativos del etanol y acetaldehído (alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, respectivamente), los cuales son determinados genéticamente. Si bien se ha sugerido que existe una relación entre el alcoholismo y determinados fenotipos de estas enzimas, se desconoce la relación que pueda existir entre estos y la aparición de lesiones hepáticas.

El acetaldehído es una sustancia sumamente tóxica ya que tiene una gran afinidad para inactivar diversos compuestos que intervienen de forma esencial en el metabolismo celular. A la acción tóxica de este producto se

atribuyen la mayoría de las alteraciones mitocondriales. Otro de los trastornos atribuidos a la toxicidad del acetaldehído es la interferencia con la síntesis y secreción de proteínas celulares. Se ha sugerido también que el acetaldehído podría actuar como hapteno modificando las características antigénicas de ciertas proteínas celulares lo que explicaría algunas de las alteraciones inmunológicas observadas en los pacientes con hepatopatía alcohólica. Además existe la hipótesis de que este producto podría ser también el responsable de la adicción al alcohol que presentan los alcohólicos crónicos debido a la capacidad para combinarse con algunas aminas biógenas cerebrales y dar lugar a compuestos semejantes a la morfina.

El desequilibrio NAD/NADH resultante de la oxidación del etanol y del acetaldehído es responsable de multitud de trastornos del metabolismo de los principios inmediatos, especialmente de los glúcidos y lípidos, que se observan en los pacientes alcohólicos. El aumento del NADH interfiere la gluconeogénesis y explicaría los episodios de hipoglicemia que presentan algunos alcohólicos crónicos. Por otra parte se produce un aumento del glicerofosfato y se favorece la síntesis de triglicéridos, fenómenos que explican en parte la esteatosis hepática. Además, el déficit relativo de NAD podría interferir la oxidación del acetaldehído ya que este cofactor es imprescindible para esta reacción. El incremento de la relación NADH/NAD comporta un aumento del lactato en

relación al piruvato y se produce una hiperlactacidemia que puede contribuir al aumento de la síntesis del colágeno por un incremento de la actividad de la enzima prolil-hidroxilasa. La presencia de elevados niveles de acetaldehído y de un mayor desequilibrio redox podrían ser la traducción de la mayor susceptibilidad que presentan algunos individuos para el desarrollo de lesiones hepáticas. En algunos estudios se ha demostrado que los alcohólicos crónicos sometidos a una sobrecarga aguda de etanol tienen unos niveles de acetaldehído superiores a los que presentan los sujetos no alcohólicos. Además, se han observado niveles plasmáticos de acetaldehído elevados en hijos no alcohólicos de padres alcohólicos crónicos. Estos hechos podrían ser debidos a un aumento de la velocidad de oxidación del etanol o bien a una reducción de la oxidación del acetaldehído. Otro factor que debe considerarse es la contribución de la lesión tisular hepática sobre la actividad de las vías oxidativas del etanol y acetaldehído. En este momento desconocemos si la variabilidad individual en el metabolismo del etanol vendría determinada genéticamente o sería secundaria a la acción tóxica del etanol.

En pocos estudios se considera conjuntamente el grado de lesión hepática y las alteraciones que esta pueda inducir en los sistemas oxidativos del acetaldehído y etanol. La capacidad para metabolizar el etanol en los pacientes alcohólicos crónicos con hepatopatía es muy

variable. Mientras algunos autores observan escasas diferencias respecto a los controles, otros hallan un aumento significativo de la capacidad para oxidar el etanol en pacientes afectos de hepatopatía alcohólica con importantes grados de necrosis. Además de esta variabilidad en los resultados de los estudios, es difícil poder compararlos y establecer conclusiones, ya que los métodos utilizados en cada estudio son distintos y generalmente se analiza la lesión histológica sin tener en cuenta la capacidad funcional hepática. Hasta la actualidad no se han efectuado estudios que analicen conjuntamente el metabolismo hepático del etanol, los niveles de acetaldehído en sangre, el grado de lesión hepática tanto funcional como histológico y los sistemas enzimáticos que intervienen en la oxidación del etanol y del acetaldehído.

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Analizar el metabolismo hepático del etanol en alcohólicos crónicos y relacionarlo con los trastornos funcionales, el grado de lesión hepática y la actividad de los sistemas oxidativos del etanol.
2. Determinar si el incremento de la concentración plasmática de acetaldehído descrita en los alcohólicos crónicos es debida a un aumento de la oxidación

- del etanol o a una deficiente oxidación del acetaldehído, analizando la actividad de los sistemas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.
3. Investigar si la actividad de los sistemas enzimáticos alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa hepáticos están relacionados con el alcoholismo y/o con el grado de lesión hepática.
 4. Analizar la relación de los fenotipos de la alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa con el alcoholismo y con el tipo de lesión hepática.

II. PARTE TEORICA

1. METABOLISMO HEPATICO DEL ETANOL

El etanol se absorbe rápidamente en el aparato gastrointestinal. Sólo del dos al 10% del alcohol absorbido se elimina por las vías renal o respiratoria; el resto es oxidado en el organismo, fundamentalmente en el hígado (Unte et al. 1980). El metabolismo extrahepático del etanol es insignificante (Forsander et al. 1960; Bruno et al. 1983). Esta relativa especificidad orgánica es probablemente la razón por la que, aunque existan mecanismos intracelulares para mantener la homeostasia, la eliminación del etanol produce notables desequilibrios metabólicos en el hígado. Estos efectos se ven agravados por la falta de un mecanismo de retroalimentación que regule el nivel de oxidación del etanol según el estado metabólico del hepatocito y por la imposibilidad de almacenar etanol en el hígado, o de metabolizarlo o almacenarlo en una proporción importante en los tejidos periféricos, a diferencia de lo que ocurre con otras fuentes importantes de calorías. El desplazamiento de los sustratos normales del hígado producido por el etanol y el trastorno metabólico causado por su oxidación y la de sus derivados explican gran parte de las complicaciones hepáticas y metabólicas del alcoholismo.

El hepatocito tiene tres vías principales para metabolizar el etanol (Lieber 1981), cada una localizada en un compartimento subcelular diferente: 1) la vía de la ADH, localizada en el citosol o fracción soluble de la célula, 2) el sistema microsomal oxidativo del etanol,

localizado en el retículo endoplásmico, y 3) la catalasa localizada en los peroxisomas (figura 1).

1.1. LA VIA DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA

1.1.1. Oxidación del etanol por medio de la alcohol deshidrogenasa

La ADH es la principal vía oxidativa del etanol en el hígado, se localiza en el citosol y cataliza la transformación del etanol en acetaldehído (Pawan 1972). La razón de ser de este enzima podría ser la de liberar al organismo de pequeñas cantidades de alcohol producidas por fermentación en el intestino. Otra posible explicación de su presencia en el hígado es que tiene una especificidad de sustrato amplia que incluye la deshidrogenación de los esteroides (Okuda et al. 1970) y la oxidación de ácidos grasos (Bjorkhem 1972), compuestos ambos que podrían actuar también como sustratos "fisiológicos" de la ADH.

Existen múltiples formas de ADH y se ha propuesto un modelo genético para explicar el origen de los diversos isoenzimas, que se detalla en el apartado "Variabilidad genética de los enzimas oxidativos del etanol" de la presente tesis.

En la oxidación del etanol por medio de la ADH, el hidrógeno es transferido desde el sustrato al cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que se convierte en su forma reducida (NADH) (figura 1), y se produce

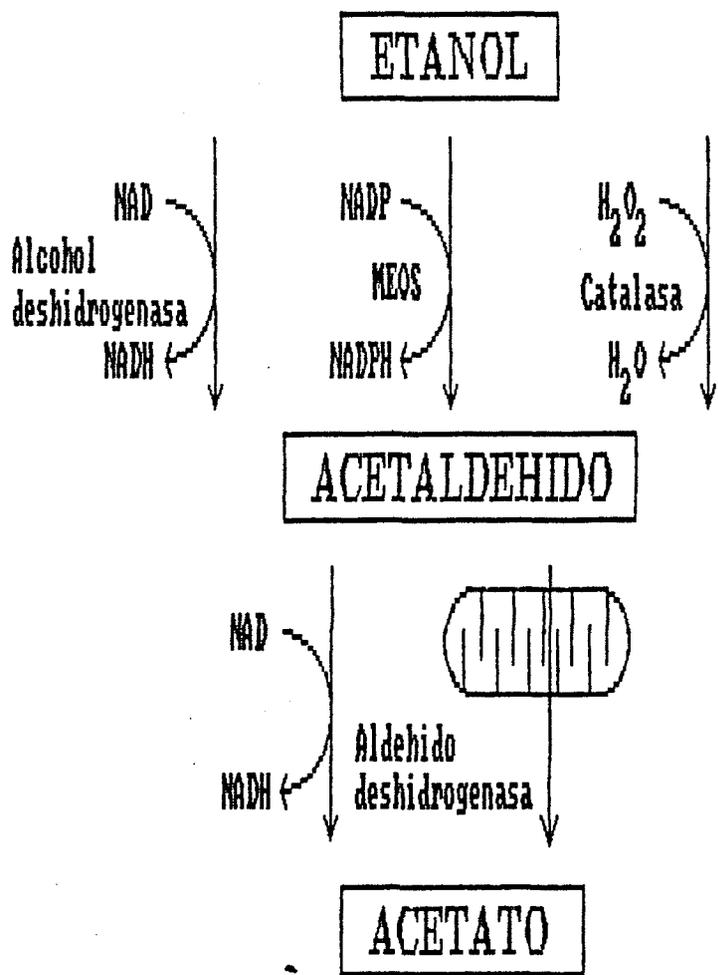


Figura 1.- Principales vías metabólicas del etanol y del acetaldehído en el hepatocito.

acetaldehído. Se ha demostrado que la disociación del complejo NADH-enzima es un paso limitante de esta reacción (Theorell & Chance 1951). Por lo tanto, el primer paso de la oxidación del etanol genera en el citoplasma celular un exceso de equivalentes reductores, fundamentalmente NADH. Así, en las ratas normales a las que se ha dado etanol, existe una marcada desviación en el potencial de oxidorreducción del citoplasma, como lo demuestran los cambios en la relación lactato/piruvato (Domschke et al. 1974). A su vez, la alteración del equilibrio de oxidorreducción es responsable de numerosos cambios metabólicos. Algunos de ellos, como la hiperlactacidemia, están ligados a la utilización del exceso de NADH en el citoplasma. Los equivalentes de reducción pueden también ser transferidos al nicotin adenin dinucleótico fosfato reducido (NADPH), el cual es utilizado en las vías de síntesis del citoplasma y en las funciones microsomales, como se comenta más adelante.

Algunos de los equivalentes de hidrógeno formados en esta reacción son transferidos del citoplasma a las mitocondrias. Dado que la membrana mitocondrial es impermeable al NADH, los equivalentes de reducción entran en el interior de la mitocondria por mecanismos de lanzadera, de los que se han apuntado varios como por ejemplo el ciclo del malato-aspartato (probablemente el más importante desde el punto de vista cuantitativo) y el ciclo del α -glicerofosfato (Bucher et al. 1958). En estos ciclos el NADH reduce el componente oxidativo del par

(oxaloacetato) en presencia de la enzima citoplásmica (málicodeshidrogenasa), con lo que se genera el NAD. El componente reducido (ácido málico) atraviesa entonces la membrana mitocondrial, en la que reacciona con la enzima mitocondrial y con el NAD (o con el flavin adenin dinucleótido, FAD, en el caso del α -glicerofosfato) para formar NADH o flavin adenin dinucleótido reducido (FADH) más el derivado oxidativo; el FADH y el NADH son oxidados por la cadena respiratoria y el derivado oxidado penetra en el citoplasma, donde queda disponible para otro ciclo completo de lanzadera (figura 2).

1.1.2. Cambios metabólicos asociados al desequilibrio de oxidorreducción producido por la oxidación del etanol.

El aumento de la relación NADH/NAD que resulta de la oxidación del etanol se refleja en una elevación del cociente lactato/piruvato que produce hiperlactacidemia (Lieber et al. 1962a; Lieber et al. 1962b) a causa de una disminución de la utilización y una mayor producción de lactato en el hígado. La hiperlactacidemia contribuye a la acidosis y también reduce la capacidad renal para excretar ácido úrico, lo que da lugar a una hiperuricemia secundaria (Lieber et al. 1962a; Sorrell et al. 1979)). La cetosis inducida por el alcohol también puede favorecer la hiperuricemia; este efecto tiene una importante correlación clínica ya que es conocido que el consumo excesivo de bebidas alcohólicas agrava o desencadena a menudo ataques de gota (Newcombe 1972). El desequilibrio

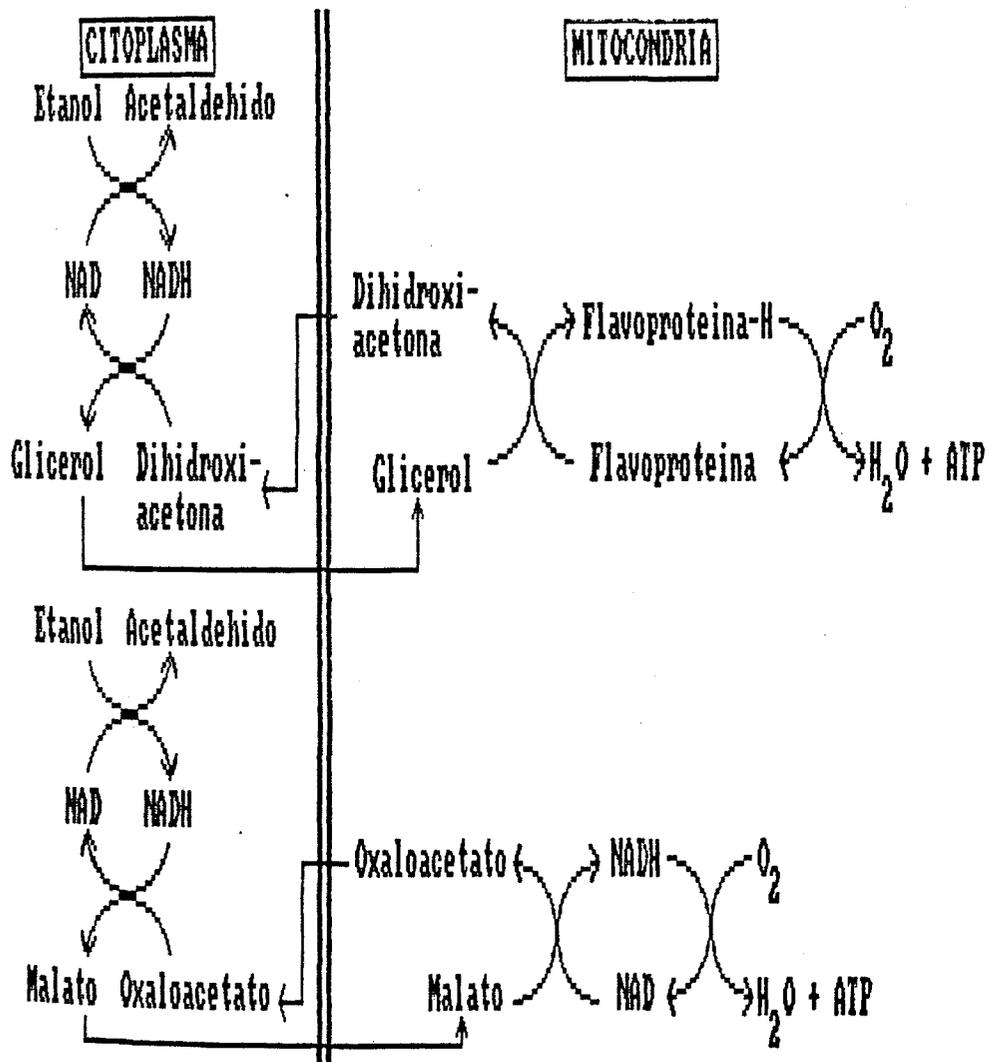


Figura 2.- Mecanismos de lanzadera para el transporte de electrones e hidrógeno desde el citoplasma a la cadena respiratoria mitocondrial.

en el potencial de oxidorreducción también interfiere con la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y puede inducir episodios de hipoglicemia (Frienkel 1966). El aumento de la relación NADH/NAD hace que se eleve la concentración de α -glicerofosfato (Nikkila et al. 1963) que a su vez favorece el acúmulo hepático de triglicéridos al unirse a los ácidos grasos (Johnson 1974). Los equivalentes de hidrógeno son también transferidos a las mitocondrias por distintos mecanismos de lanzadera (antes citados).

En condiciones normales, los ácidos grasos son metabolizados mediante β -oxidación por el ciclo del ácido cítrico localizado en el interior de las mitocondrias; este último sirve como donante de hidrogeniones a la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, cuando el etanol es oxidado, los equivalentes de hidrógeno generados, que son transportados al interior de la mitocondria, sustituyen al ciclo del ácido cítrico como fuente de hidrogeniones. La actividad del ciclo se ve deprimida por una disminución de la velocidad de las reacciones que precisan NAD (Forsander et al. 1965). Tras la administración de etanol el potencial redox de la mitocondria pasa a un estado más reducido como lo indica el cambio en la relación β -hidroxibutirato/acetoacetato.

Dentro del ciclo del ácido cítrico, el paso donde el etanol ejerce una mayor interferencia es en la oxidación del α -cetoglutarato (Ontko 1973). Además, la alteración del potencial redox asociado a la oxidación

del etanol, disminuye la concentración hepática de oxaloacetato (Williamson et al. 1969), cuya disponibilidad controla la actividad de la citratosintetasa. Por tanto, las mitocondrias utilizan los equivalentes de hidrógeno que proceden del etanol, en vez de los derivados de la oxidación de ácidos grasos por el ciclo del ácido cítrico. Así, los ácidos grasos, que son normalmente la principal fuente de energía del hígado (Fritz 1961), son sustituidos por el etanol.

Se ha demostrado que el etanol induce una disminución en la oxidación de los ácidos grasos en cortes de hígado (Lieber et al. 1961), en hígados perfundidos (Lieber et al. 1967), en hepatocitos aislados (Ontko 1973), en biopsias de hígado humano e in vivo (Blomstrand 1973). Esta alteración induce un depósito hepático de las grasas ingeridas en la dieta, cuando las hay, o de los ácidos grasos derivados de la síntesis endógena cuando no existen grasas en la dieta (Lieber et al. 1967; Mendenhall 1972) y puede considerarse la principal causa de la esteatosis hepática de origen alcohólico, que constituye la primera fase de la hepatopatía alcohólica.

En teoría, los lípidos que se acumulan en el hígado pueden proceder de tres fuentes principales: 1) lípidos de la dieta (que alcanzan el torrente sanguíneo en forma de quilomicrones), 2) lípidos del tejido adiposo (que son transportados al hígado como ácidos grasos libres) y 3)

lípidos sintetizados en el propio hígado. Estos ácidos grasos de distintos orígenes pueden acumularse en el hígado a causa de un gran número de alteraciones metabólicas, y fundamentalmente por 1) disminución de la oxidación de lípidos en el hígado, 2) aumento de la lipogénesis hepática, 3) reducción de la liberación hepática de lipoproteínas 4) aumento de la movilización de grasas periféricas y 5) aumento de la capacidad hepática para captar lípidos circulantes.

Según el estado metabólico, la oxidación hepática del etanol puede inducir tanto una reducción de la oxidación lipídica como un aumento de la lipogénesis. Además de los cambios funcionales mitocondriales que son consecuencia directa del metabolismo del etanol, el abuso crónico de alcohol provoca alteraciones más persistentes en las mitocondrias. Las llamativas alteraciones estructurales de las mitocondrias se acompañan de las correspondientes anomalías funcionales, incluida una menor capacidad de oxidación de los ácidos grasos. Por lo tanto, la reducción de la oxidación de los ácidos grasos, ya sea por la menor actividad del ciclo del ácido cítrico (secundaria al desequilibrio del estado de oxidorreducción) o como consecuencia de alteraciones permanentes de la estructura mitocondrial, constituyen el mecanismo más probable del depósito de grasa en el hígado, sobre todo de la derivada de la dieta.

Mientras que en las ratas alimentadas normalmente es evidente que tanto la lipogénesis como la utilización de

grasas de la dieta están aumentadas (Arakawa et al. 1975), en las mantenidas en ayuno el etanol no estimula la síntesis de ácidos grasos (Olivecrona 1972). Además, en ratas sometidas a ayuno a las que se administra una elevada dosis de etanol, se acumulan en el hígado ácidos grasos semejantes a los del tejido adiposo (Lieber et al. 1966). Los fármacos o técnicas experimentales que reducen la movilización de grasas periféricas (como adrenalectomía, sección de la médula espinal o fármacos gangliopléjicos) impiden o disminuyen este tipo de acúmulo graso en el hígado (Brodie et al. 1964; Reboucas et al. 1964). En el ser humano, ni siquiera con cantidades de etanol de hasta 300 g/día se eleva la concentración de ácidos grasos libres circulantes; ésta solo aumenta tras el consumo de dosis muy altas de etanol (400 g/día) (Lieber et al. 1963). En estudios a corto plazo, realizados en seres humanos, la administración de etanol se ha asociado a un descenso de los ácidos grasos libres circulantes (Lieber et al. 1962b; Jones et al. 1965), con pocas diferencias entre los ácidos grasos venosos y arteriales periféricos (Lieber et al. 1962b), una disminución de la velocidad de recambio de los ácidos grasos (Jones et al. 1965) y un descenso simultáneo del glicerol circulante (Feinman et al. 1967). Se ha observado que el efecto del etanol sobre la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo está mediado por el acetato (Crouse et al. 1968), que es el producto final del metabolismo del etanol en el

hígado y se libera a la circulación periférica. Probablemente una dosis importante de etanol puede tener a la vez un efecto estimulador de la movilización de ácidos grasos (por medio de la liberación de catecolaminas) y un efecto inhibidor de la misma (a través del acetato producido), el resultado último puede depender de las condiciones concretas de cada momento.

Una vez ha aparecido la esteatosis hepática, el acúmulo de grasa no aumenta indefinidamente aunque se mantenga el consumo de etanol (Salaspuro et al. 1981). Si la alteración del potencial de oxidorreducción inducida por el alcohol tuviera un papel fundamental en el acúmulo de grasa en los hepatocitos, una vez éste se estabilizara, el trastorno del potencial de oxidorreducción debería atenuarse. Se ha observado que así ocurre en la práctica; en ratas a las que se suministra alcohol de forma crónica la alteración del potencial de oxidorreducción producido por una dosis elevada de etanol se ve atenuada (Domschke et al. 1974). De forma similar, en mandriles a los que se suministra alcohol de forma crónica se ha observado una progresiva disminución de la alteración del potencial redox (Salaspuro et al. 1981). En este último modelo experimental, el consumo crónico de etanol origina una lesión hepática alcohólica progresiva que va más allá del hígado graso (Popper et al. 1980). Por tanto, aunque las alteraciones del potencial de oxidorreducción inducido por el etanol puedan tener un papel importante en la génesis de la esteatosis hepática, otros mecanismos deben

influir en la progresión de la lesión hepática hasta superar la fase de esteatosis.

El desequilibrio del potencial de oxidorreducción, además de producir alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, también afecta en ocasiones el metabolismo proteico. Se ha observado una inhibición de la síntesis proteica al añadir in vitro etanol a varias preparaciones (Rothschild et al. 1971). In vivo no son tan claros los efectos del etanol sobre la síntesis proteica. Así, en ratas bien alimentadas no se han hallado alteraciones de la síntesis hepática de proteínas tras la administración de etanol (Baraona et al. 1980).

Se han observado también otros efectos metabólicos del alcohol que cabe también atribuir a la formación de NADH, como la interferencia con el metabolismo de la galactosa y de determinadas aminas (Domschke et al. 1974; Dow et al. 1975). Además, la mayor disponibilidad de NADH provoca la alteración del metabolismo hepático de los esteroides favoreciendo el aumento de los componentes reducidos (Admirant et al. 1970; Chronholm et al. 1970).

1.1.3. Factores limitantes de la velocidad de oxidación del etanol por medio de la alcohol deshidrogenasa.

Se acepta comunmente que el factor más importante que limita la velocidad de oxidación del etanol a través de la vía de la ADH, no es la actividad enzimática del tejido hepático sino la capacidad del hígado para reoxi-

dar el NADH producido al ser reducido el NAD por el hidrógeno procedente del etanol (Bode 1980). Durante muchos años ha habido gran controversia sobre la posibilidad de predecir la velocidad de oxidación del etanol a partir del grado de actividad de la ADH; recientemente se ha prestado una nueva atención a este concepto tras conocer la heterogeneidad genética de la ADH. Aunque algunos individuos con ADH "atípica" tienen in vitro una actividad ADH varias veces superior a la normal, ello no se ve acompañado de una aceleración del metabolismo del etanol in vivo (Edwards et al. 1967). Esta discrepancia apoya la hipótesis de que en el proceso de oxidación del etanol, la actividad ADH puede no ser el principal factor limitante de la velocidad de la reacción. En estas condiciones, la velocidad puede depender de la disponibilidad del cofactor NAD y de la capacidad celular para disociar el complejo ADH-NADH y para reoxidar el NADH. La observación de que en pacientes con uremia la velocidad de oxidación del etanol no está acelerada, a pesar de un marcado aumento de la actividad ADH hepática (Mezey et al. 1975), apoya este concepto.

Se ha demostrado que el ayuno prolongado reduce de forma marcada la velocidad de oxidación del etanol (Bode et al. 1975; Bosron et al. 1984). El mecanismo por el que esto se produce ha sido aclarado gracias a la definición de factores limitantes de la velocidad de oxidación del etanol. Como se ha mencionado anteriormente, el NADH

formado en el citoplasma celular durante la oxidación del etanol por la ADH, precisa ser reoxidado, para lo cual, es necesario, en primer lugar, el transporte de los equivalentes de reducción al interior de la mitocondria mediante mecanismos de lanzadera de la membrana mitocondrial, y, en segundo lugar, la reoxidación de los equivalentes de reducción por la cadena respiratoria mitocondrial.

Los estudios experimentales de Meijer et al. (1975) y Cederbaum et al. (1977b) realizados en ratas, sugieren que según los animales hayan sido alimentados o no antes del estudio experimental, cada uno de estos factores puede ser limitante de la velocidad de oxidación del etanol. En el ayuno, la oxidación del etanol en células hepáticas aisladas está limitada por la velocidad de transferencia de los equivalentes de reducción desde el citoplasma (donde son formados por acción de la ADH) hacia el interior la mitocondria; este transporte está regulado por las concentraciones intracelulares de los intermediarios de los mecanismos de lanzadera (malato, aspartato y α -glicerofosfato). En hepatocitos de animales alimentados normalmente la velocidad de oxidación del etanol era el doble que en los hepatocitos de animales sometidos a ayuno. Dado que las concentraciones de malato, aspartato y α -glicerofosfato eran superiores que en las células de animales alimentados, la mayor velocidad de oxidación del etanol es debida probablemente a una mayor actividad de los sistemas de transporte de hidrogeno-

niones. La adición de agentes desacoplantes indujo un marcado incremento de la oxidación del etanol. Todo ello sugiere que en los animales alimentados la reoxidación del NADH, procedente del citoplasma, o generado en la mitocondria por oxidación del acetaldehído, constituye uno de los principales factores limitantes de la velocidad de oxidación del etanol.

Se ha observado en preparaciones de hígado aislado perfundido (Papenberg et al. 1970), en cortes de hígado (Lieber et al. 1970) y en células hepáticas aisladas (Matsuzaki et al. 1975) que el etanol es metabolizado a pesar de la presencia de pirazol (un potente inhibidor de la ADH). La velocidad de oxidación del etanol no mediada por la ADH es muy variable dependiendo de las concentraciones de etanol utilizadas, pudiendo oscilar desde un 20% (Papenberg et al. 1970) hasta un 50% (Matsuzaki et al. 1981; Salaspuro et al. 1978a). Parece pues que debe existir una vía distinta a la ADH capaz de oxidar el etanol. En teoría hay tres posibilidades que podrían explicar este hecho: La isoenzima X-ADH que es insensible a la inhibición por el pirazol y posee un alto K_m para el etanol, el sistema microsomal oxidativo del etanol y la catalasa.

1.2. SISTEMA MICROSOMAL OXIDATIVO DEL ETANOL

1.2.1. Oxidación del etanol por medio del sistema microsomal.

El primer indicio de la existencia de una interac-

ción entre el etanol y la fracción microsomal del hepatocito fue la observación morfológica de que en las ratas a las que se administraba etanol se producía una proliferación del retículo endoplásmico liso (Iseri et al. 1966). En el ser humano se observaron también cambios parecidos (Lane et al. 1966). El aumento del retículo endoplásmico liso era similar al hallado tras la administración de diversos xenobióticos, tales como agentes hepatotóxicos (Meldolesi 1967) y numerosos fármacos (Conney 1967). La mayoría de las sustancias que producen una proliferación del retículo endoplásmico liso son metabolizadas, al menos en parte, en la fracción microsomal del hepatocito, de la que forma parte el retículo endoplásmico liso. Al observar que el etanol producía una proliferación de éste se pensó que, además de su oxidación por la ADH, el etanol podría ser también metabolizado en los microsomas. Se había descrito con anterioridad un sistema microsomal capaz de metabolizar el etanol (Orme-Johnson et al. 1965) pero su velocidad de oxidación era muy lenta; además no podía oxidar alcoholes alifáticos de cadena larga, como el butanol, y era sensible a los inhibidores de la catalasa ácida y al cianuro. Por lo tanto, Ziegler (1972) llegó a la conclusión de que tal sistema era diferente del sistema dependiente del citocromo P-450, y comprendía la peroxidación del etanol por la catalasa dependiente del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, también se ha descrito un sistema microso-

mal oxidativo del etanol (Lieber et al. 1968, Lieber et al. 1970) con una actividad 10 veces superior a la del descrito por Orme-Johnson et al. (1965). Este sistema necesita NADPH y oxígeno, y es relativamente insensible a la inhibición de la catalasa. Además el sistema microsomal oxidativo del etanol se diferencia del sistema descrito por Orme-Johnson y Ziegler, y de la catalasa, por su capacidad para oxidar alcoholes alifáticos de cadena larga (Teschke et al. 1977), que no actúan como sustratos de la catalasa (Chance et al. 1971).

El aumento de la velocidad de oxidación del etanol cuando este se halla a altas concentraciones podría depender, al menos en parte, de la actividad del sistema microsomal oxidativo del etanol (Grunnet et al. 1973; Matsuzaki et al. 1981; Coon et al. 1987) ya que la K_m de este sistema es de 8-10 mM (Lieber et al. 1972) y este sistema es insensible a la inhibición por el pirazol. La insensibilidad a la inhibición por el pirazol y el alto K_m para el etanol son también características de la isoenzima X-ADH, por lo que esta puede ser también responsable del aumento de la capacidad oxidativa del etanol a altas concentraciones.

1.2.2. Diferenciación del sistema microsomal oxidativo del etanol de otras vías oxidativas.

Se ha conseguido diferenciar el sistema microsomal oxidativo del etanol de la ADH por la localización subcelular, el pH óptimo in vitro, los cofactores requeridos

por cada vía y los efectos de inhibidores (Lieber et al. 1973; Lieber et al. 1970; Fabry et al. 1979). Los estudios mediante inhibidores han indicado también que una parte importante de la actividad oxidativa del etanol en los microsomas es independiente de la catalasa (Lieber et al. 1973; Lieber et al. 1970). Además, el sistema microsomal oxidativo del etanol ha podido ser solubilizado y separado de la ADH y de la catalasa mediante cromatografía en columna de dietilaminocelulosa (Mezey et al. 1973; Teschke et al. 1974).

Posteriormente se ha demostrado actividad oxidativa del etanol con la unión de los tres componentes microsomales (citocromo P-450, citocromo-NADPH o reductasa y lecitina) (Ohnishi et al. 1977; Miwa et al. 1978). La actividad del sistema microsomal oxidativo del etanol reconstituido tiene una dependencia del citocromo P-450, y de la reductasa, y precisa, para tener máxima actividad, fosfolípidos sintéticos como la lecitina. La K_m del sistema microsomal oxidativo del etanol reconstituido es de 10 mM, similar a la de los microsomas no purificados y a la actividad de la fracción del sistema microsomal oxidativo del etanol aislada por cromatografía de columna (Lieber et al. 1970; Teschke et al. 1974). El sistema reconstituido necesita NADPH como cofactor, no reacciona frente a un sistema generador de peróxido de hidrógeno y es insensible a la acida sódica, inhibidor de la catalasa. Estas características son similares a las observadas en microsomas no purificados.

1.3. PAPEL DE LA CATALASA

La catalasa está contenida fundamentalmente en los peroxisomas y mitocondrias del hepatocito. También se han hallado pequeñas cantidades de catalasa en microsomas aislados, pero se cree que en esta fracción la catalasa no es un componente de la membrana del retículo endoplásmico sino una contaminación de la fracción microsómica producida durante el proceso de aislamiento (Redman et al. 1972).

La catalasa puede oxidar el etanol in vitro en presencia de un sistema generador de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la mayoría de autores creen que la catalasa no desempeña ningún papel importante en el metabolismo del etanol (Feytmans et al. 1973; Papenberg et al. 1970). La oxidación del etanol por acción de la catalasa está limitada por la disponibilidad de peróxido de hidrógeno, más que por la cantidad de enzima. Por consiguiente, la cantidad de peróxido de hidrógeno generado por el hígado constituye una estimación indirecta de la importancia de esta vía oxidativa en el metabolismo del etanol. Se estima que la cantidad de peróxido de hidrógeno que se produce en el hígado en condiciones fisiológicas es de 3-3.6 $\mu\text{mol/hora/g}$ de hígado (Leo et al. 1982), lo que representa aproximadamente el 2% del índice de oxidación del etanol in vivo, que se sitúa, por término medio, en 178 $\mu\text{mol/hora/g}$ de hígado (Lieber et al. 1973). De hecho, la concentración de oxígeno en el

hígado, cifrada en menos de 50 μM , puede resultar insuficiente para la formación de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas que tienen una K_m para el oxígeno de 100 μM (Boveris et al. 1972). El aminotriazol (un inhibidor de la catalasa) ha sido muy utilizado para valorar la contribución de la catalasa en el metabolismo del etanol. A excepción de Wendell et al. (1979), quienes encontraron que en ratas tratadas con aminotriazol la velocidad de oxidación del etanol disminuía en un 25%, no se ha observado ningún cambio significativo en la velocidad de oxidación del etanol in vivo (Feytmans et al. 1973; Roach et al. 1972) ni in vitro en cortes de hígado ni en hígados perfundidos (Papenberg et al. 1970). Por lo tanto, en condiciones normales la catalasa no parece desempeñar un papel importante en la oxidación del etanol.

2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL ETANOL EN EL ALCOHOLISMO CRÓNICO.

Los bebedores habituales toleran grandes cantidades de alcohol, sobre todo gracias a una adaptación del sistema nervioso central. Además, los alcohólicos presentan un aumento en la velocidad de oxidación del etanol, es decir, una tolerancia metabólica (Ugarte et al. 1972; Salaspuro et al. 1978b). La administración experimental de etanol también produce un aumento del metabolismo del alcohol (Pikkarainen et al. 1980, Tobon et al. 1974; Bode et al. 1979). El mecanismo por el que se produce este aumento crónico de la capacidad oxidativa del etanol es

todavía objeto de debate.

2.1. AUMENTO DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA DEL ETANOL RELACIONADA CON LA ALCOHOL DESHIDROGENASA.

En contraposición a los hallazgos iniciales, en los que se describió un aumento de la actividad ADH tras la ingesta crónica de etanol (Hawkins et al. 1972), observaciones más recientes indican que la actividad ADH no es superior en los alcohólicos crónicos que en los no alcohólicos (Kalant et al. 1975; Videla et al. 1973). En algunos estudios se ha demostrado incluso una disminución de la actividad ADH hepática tras la ingesta crónica de etanol (Nuutinen et al. 1981; Salaspuro et al. 1981). Sin embargo, en la mayoría de reacciones biológicas, la actividad enzimática no es el factor determinante de la velocidad de reacción, de manera que una reducción de la actividad ADH no debe necesariamente disminuir la velocidad de oxidación del etanol en el hígado (Meijer et al. 1975).

Diversos estudios sugieren que el aumento de la capacidad oxidativa del etanol en el alcoholismo crónico es secundario a un incremento de la oxidación del NADH y a un mayor consumo de oxígeno en la mitocondria, lo que aumentaría la disponibilidad de NAD reducido, verdadero factor limitante de la velocidad de reacción del etanol (Thurman et al. 1977; Videla et al. 1973; Cederbaum et al. 1977a). El aumento del consumo de oxígeno a nivel mitocondrial se cree que es secundario al aumento de

utilización del trifosfato de adenosina (ATP) lo cual, a su vez, aumenta la disponibilidad de ADP en la mitocondria (Thurman et al. 1977; Younes et al. 1987). Los mecanismos que pueden contribuir a aumentar el consumo de ATP en los alcohólicos crónicos son la mayor actividad de la enzima adenosíntrifosfatasa (ATPasa) (Bernstein et al. 1973) y el desarrollo de un estado hipermetabólico similar al que se produce en el hipertiroidismo (Bernstein et al. 1975). Israel et al. (1975) observaron que en cortes de hígado, la uabaina (inhibidor de la ATPasa Na-K dependiente) puede bloquear por completo el aumento del metabolismo del etanol que se produce tras el consumo crónico. El dinitrofenol (desacoplante de la fosforilación oxidativa) aumenta la capacidad hepática de oxidación del etanol en animales a los que se ha administrado alcohol cronicamente, solo en presencia de uabaina. Por otro lado, estos autores describieron también un aumento del consumo hepático de oxígeno en animales a los que se había administrado etanol de forma crónica (Israel et al. 1975), aunque este punto no ha sido confirmado por otros autores (Gordon 1977). En los estudios de Israel et al. se observó, tanto en animales tratados con etanol como en otros tratados con tiroxina, un aumento del consumo de oxígeno acompañado de una desaparición del efecto del dinitrofenol. Por tanto, la situación de hipermetabolismo hepático que aparece en los animales a los que se ha administrado etanol, es en muchos aspectos

similar a la que presentan los animales tratados con hormonas tiroideas. En estos últimos, el estado hipermetabólico está también asociado a un aumento de la hidrólisis del ATP por la ATPasa Na-K dependiente.

Entre los mecanismos que pueden contribuir a aumentar la actividad metabólica es de destacar el aumento de liberación de noradrenalina en las glándulas suprarrenales, que se produce tanto en animales como en el hombre, tras la administración de etanol (Perman 1960; Perman 1961). Esta liberación de noradrenalina puede acelerar indirectamente el metabolismo del etanol. La noradrenalina tiene un efecto hipermetabólico, similar al que producen las hormonas tiroideas (Gale 1973; Himms-Hagen 1979). El estado hipermetabólico producido por el etanol a nivel hepático puede ser reproducido por una dosis única de adrenalina (Bernstein et al. 1975). Así, se ha observado que el consumo de oxígeno de cortes de hígado procedentes de animales a los que se ha administrado adrenalina a dosis de 2 mg/Kg, aumenta entre el 40% y 50%. La uabaina puede bloquear el aumento del consumo de oxígeno, pero no la respiración basal, de estos cortes de hígado. Por otro lado, el dinitrofenol no tiene ningún efecto sobre la actividad de la cadena respiratoria de los cortes de hígado de animales tratados con adrenalina, mientras que aumenta notablemente la actividad respiratoria en animales control. Todo ello sugiere que la liberación de epinefrina asociada a la ingesta de etanol puede contribuir al desarrollo de un estado hipermetabólico que

aumentaría el consumo de ATP, facilitando la reoxidación del NADH y aumentando, consecuentemente la velocidad de oxidación del etanol.

2.2. AUMENTO DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA DEL ETANOL NO RELACIONADA CON LA ALCOHOL DESHIDROGENASA.

Se ha observado que el pirazol no inhibe completamente el aumento del metabolismo del etanol que aparece tras el consumo crónico, lo que sugiere que otras vías, distintas a la ADH, deben estar implicadas en el aumento de la capacidad oxidativa (Lieber et al. 1972; Salaspuro et al. 1975). Estas vías distintas a la ADH actuarían fundamentalmente a concentraciones de etanol elevadas ya que cuando las concentraciones de etanol son bajas (1 mM) los inhibidores de la ADH suprimen por completo el aumento de la capacidad oxidativa (Thurman et al. 1976), mientras que a altas concentraciones solo se produce una inhibición parcial (Matsuzaki et al. 1977; Koop et al. 1984). Dado que estos experimentos han sido realizados en animales, en los que no se ha descrito la existencia de la isoenzima X-ADH, con alto K_m e insensible a la inhibición del pirazol, los fenómenos observados en los estudios citados no pueden ser atribuidos a la acción de este isoenzima, aunque en el hombre la isoenzima X-ADH podría contribuir, al menos en parte, al aumento de la capacidad oxidativa del etanol cuando este se halla a altas concentraciones.

Lieber et al. (1970) sugieren que el incremento de

la capacidad oxidativa del etanol a altas concentraciones es debido a un aumento de la masa microsomal y de la actividad del sistema microsomal oxidativo del etanol. Se ha observado que tras la ingesta de etanol se produce un aumento de diversos componentes del retículo endoplásmico liso, tales como fosfolípidos, citocromo P-450 reductasa y citocromo P-450 (Ishii et al. 1973; Sato et al. 1978). Además, al inhibir las actividades ADH y catalasa mediante pirazol y acida sódica respectivamente, se ha observado que la actividad oxidativa independiente de estas vías, y por tanto atribuible al sistema microsomal oxidativo del etanol, es superior en ratas que habían ingerido etanol que en las controles (Pikkarainen et al. 1980). Además, la diferencia entre ambos grupos de animales es más evidente a una concentración de etanol de 30 mM que a 10 mM. De forma similar, cuando en el mandril se mantiene una concentración constante de etanol mediante infusión continua, el aumento de la capacidad oxidativa del etanol a altas concentraciones es más marcado en animales a los que se ha administrado previamente etanol, que en controles. Todos estos datos indican que el sistema microsomal oxidativo del etanol puede ser responsable del aumento de la capacidad oxidativa del etanol a altas concentraciones, que aparece en los animales que han ingerido alcohol de forma crónica.

En el hombre estos hechos son menos claros. Si bien se ha observado también un aumento de la actividad del

sistema microsomal oxidativo del etanol tras la ingesta crónica de etanol (Kostelnik et al. 1973; Mezey et al. 1971), no existe paralelismo entre los aumentos en la velocidad de eliminación del etanol y las actividades del sistema microsomal oxidativo del etanol (Mezey et al. 1971). Ello puede ser debido, como en el caso de la ADH, a la dificultad de evaluar la actividad hepática total de un sistema enzimático, o bien a que, en el hombre, la actividad del sistema microsomal oxidativo del etanol no constituya un factor determinante de la velocidad de oxidación del etanol en el hígado, como ocurre también con la ADH.

El efecto de la ingesta crónica de etanol sobre la actividad de la catalasa en la rata es un tema debatido ya que algunos autores han hallado un incremento de actividad (Carter et al. 1971) mientras otros no han observado ningún cambio (Hawkins et al. 1966). En el hombre no se han observado cambios en la actividad catalasa hepática (Lieber 1968). Es probable que este aspecto tenga pocas implicaciones sobre la actividad hepática oxidativa del etanol, ya que, como se ha comentado anteriormente, el metabolismo hepático del etanol por vía peroxidativa se halla limitado por la formación de peróxido de hidrógeno más que por la actividad catalasa. Sin embargo, el consumo de etanol aumenta la actividad de la oxidasa NADPH (Thurman 1973) que puede dar lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. Es posible que este mecanismo contribuya al aumento de la velocidad de oxida-

ción del etanol in vivo proveyendo peróxido de hidrógeno, aunque estos cambios podrían también aumentar la velocidad de oxidación del etanol por vías distintas a la catalasa como el sistema microsomal oxidativo del etanol que es dependiente del NADPH.

3. EFFECTOS TOXICOS DEL ACETALDEHIDO

El acetaldehído es el producto "específico" resultante de la oxidación del etanol por acción de la ADH y también del sistema microsomal oxidativo del etanol. Las concentraciones plasmáticas de acetaldehído tras la ingesta de etanol son bajas, a menos de que se administre disulfiram (Tottmar et al. 1983) o por determinadas características étnicas (Argawal et al. 1984), pero se cree que esta molécula puede ser responsable de algunas de las complicaciones asociadas al alcoholismo. El acetaldehído es transformado en acetato por acción de la aldehído deshidrogenasa. Dado que la transformación del acetaldehído en acetato da lugar a la formación de NADH, algunos de los efectos tóxicos del acetaldehído pueden ser atribuidos a la formación de NADH, tal como se ha comentado en relación a la transformación del etanol en acetaldehído.

El acetaldehído, sin embargo, es una molécula muy reactiva capaz de ejercer efectos tóxicos por sí misma (Strublet et al. 1987). Esta molécula puede unirse a las proteínas, efecto que aumenta con el consumo crónico de etanol (Nomura et al. 1981). Se cree que muchos fármacos

ejercen un efecto hepatotóxico por la unión covalente de sus metabolitos activos a las proteínas y éste podría ser también el caso del acetaldehído. El acetaldehído puede también unirse, por un mecanismo no enzimático, a los fosfolípidos (Kenney 1980), y a grupos sulfidrilo (Lindros 1978). El acetaldehído reacciona con la serotonina, dopamina y norepinefrina dando lugar a compuestos farmacológicamente activos (Lindros 1978; Rahwan 1975). Este efecto del acetaldehído es de particular interés en relación a la patogenia de la adicción al etanol y sus efectos sobre el sistema nervioso central. La reacción del acetaldehído con estas aminas biógenas da lugar a la formación de compuestos de características semejantes a la morfina (tetrahidroisoquinolinas) (Rahwan 1975). Si estos compuestos son inyectados a animales de experimentación desarrollan una preferencia por el etanol. Estos efectos son probablemente potenciados por la inhibición de la degradación de las aminas biógenas, ejercida por el acetaldehído. La importancia que estas reacciones puedan tener en el hombre es desconocida, pero la identificación de una posible base bioquímica que induzca la adicción puede tener un notable valor terapéutico.

El acetaldehído ha sido directamente implicado en diversas alteraciones estructurales y funcionales del hepatocito tales como alteraciones de los microtúbulos y de las mitocondrias, así como en el aumento de la peroxidación de lípidos que se observa tras la administración

de alcohol.

Dos de las alteraciones hepáticas más precoces y generalizadas de las inducidas por el etanol son el depósito de grasa y el aumento de tamaño del hígado. La hepatomegalia ha sido atribuida clásicamente al depósito de grasa. Sin embargo, en animales a los que se ha administrado alcohol, el acumulo de lípidos es responsable únicamente de la mitad del aumento del peso del hígado (Baraona et al. 1975), mientras que la otra mitad es debida casi exclusivamente al aumento de las proteínas. Baraona et al. (1977) sugieren que el aumento del contenido proteico puede ser debido a una alteración de la secreción de proteínas por los microtúbulos, inducida por el acetaldehído. Se ha observado que los microtúbulos se hallan acortados y aumentados de grosor (Matsuda et al. 1979). La alteración de los microtúbulos afecta al transporte hepatocelular de los lípidos biliares (Gregory et al. 1978) y se asocia a un aumento de tamaño del aparato de Golgi (Matsuda et al. 1979). El aumento del contenido hepático de proteínas que aparece tras la administración del etanol, no se acompaña de cambios en la concentración proteica (Baraona et al. 1977), indicando que se retiene agua en la misma proporción al aumento de proteína. El mecanismo por el que se retiene agua no ha sido completamente aclarado, aunque el aumento tanto de proteínas como de aminoácidos junto a un aumento de iones podrían ejercer un efecto osmótico que resultaría en el aumento del contenido de agua.

Además de inhibir la secreción de proteínas, el etanol y el acetaldehído pueden también inhibir la síntesis hepática de proteínas in vivo en animales sometidos a ayuno, en el hígado aislado perfundido (Oratz et al. 1978; Rothshild et al. 1980), y en hepatocitos in vitro (Morland 1977). Dado que, en ausencia de hepatopatía, el consumo de alcohol no se asocia a cambios importantes de las proteínas circulantes, se ha sugerido (Baraona et al. 1980) que estos efectos son debidos a la falta relativa de los aminoácidos requeridos para la síntesis proteica en los estudios realizados in vitro o en los animales sometidos a ayunas in vivo. Según esta interpretación, los cambios en el estado de oxidorreducción producidos por el etanol producen una mayor disminución de aminoácidos tales como la alanina, e inhiben la síntesis proteica. La adición de azul de metileno o piruvato, contrarrestan los cambios del potencial de oxidorreducción del etanol y suprimen los efectos inhibitorios del etanol sobre la síntesis de proteínas in vitro (Baraona et al. 1980).

El aumento de lípidos, proteínas, aminoácidos, agua y electrolitos provoca un aumento de tamaño de los hepatocitos. El número de hepatocitos y el contenido hepático de ácido desoxiribonucleico, no cambian tras la ingesta de etanol, por tanto, la hepatomegalia refleja únicamente el aumento de tamaño de los hepatocitos (Baraona et al. 1977). Aunque el número de células mesenquimales también

aumenta tras la ingesta de etanol, estas no contribuyen de forma significativa al aumento de tamaño del hígado (Baraona et al. 1975). Se ha sugerido que el aumento de tamaño de los hepatocitos puede inducir aumentos en la presión portal en los pacientes alcohólicos (Orrego et al. 1981a), aunque estudios más recientes indican que los cambios de la presión portal pueden depender del aumento del contenido hepático de colágeno (Caballería et al. 1986). El abalanzamiento de los hepatocitos, con los notables cambios en su volumen, pueden conllevar importantes alteraciones funcionales de la célula hepática. En el hígado de pacientes alcohólicos se observan con frecuencia células que tienen un diámetro de dos a tres veces superior al normal, por tanto, su volumen es de cuatro a 10 veces superior. Es posible que estas profundas alteraciones celulares contribuyan a la progresión de las lesiones hepáticas en los alcohólicos.

El acetaldehído se considera también directamente responsable de la aparición de alteraciones estructurales y funcionales de la mitocondria (Orrego et al. 1981). Estudios de microscopía electrónica han mostrado importantes cambios morfológicos en las mitocondrias de hepatocitos de individuos alcohólicos tales como edema y distorsión de las crestas mitocondriales. Estudios controlados realizados en animales y en el hombre (Lane et al. 1966; Rubin et al. 1967) han puesto de manifiesto que estas alteraciones son consecuencia directa de los efectos tóxicos del etanol y acetaldehído y no de otros

factores, como podría ser la dieta. Estas anomalías estructurales se asocian a trastornos funcionales, especialmente una disminución de la oxidación de ácidos grasos y de toda una serie de sustancias entre las que se cuenta el acetaldehído (Hasumura et al. 1976). Las mitocondrias de animales a los que se ha administrado etanol tienen una disminución del contenido de citocromos a y b (Koch et al. 1977; Rubin et al. 1970a) y de la actividad succinato deshidrogenasa (Rubin et al. 1970a). Al utilizar substratos como el piruvato, el succinato o el acetaldehído se observa una depresión de la capacidad respiratoria mitocondrial (Gordon 1973; Hasumura et al. 1975). La actividad de la ATPasa Mg-dependiente puede ser normal o hallarse deprimida dependiendo de las condiciones experimentales (Hosein et al. 1977). La utilización de albúmina sin ácidos grasos y la administración de una dieta rica en proteínas y pobre en hidratos de carbono evita la aparición de los cambios inducidos por el etanol (Washid et al. 1980). Sin embargo, estas son unas condiciones muy artificiales, y en voluntarios humanos a los que se administra etanol se observa de forma constante la aparición de lesiones mitocondriales a pesar de la administración de una dieta con alto contenido proteico y bajo contenido en grasas (Lieber et al. 1968).

Tras el consumo crónico de etanol, las mitocondrias del hepatocito son especialmente susceptibles a los efectos tóxicos del acetaldehído; toda una serie de

importantes funciones mitocondriales, tales como la oxidación de ácidos grasos, se hallan deprimidas, incluso en presencia de concentraciones relativamente bajas de acetaldehído (Matsuzaki et al. 1977).

El aumento de la peroxidación lipídica que se observa tras la ingesta de etanol parece también mediada por el acetaldehído. Los aldehídos reaccionan bastante rápidamente con los mercaptanos y la L-cisteína puede unirse al acetaldehído para formar hemiacetal. Este complejo puede ser un producto atóxico ya que se ha sugerido que la cisteína puede ejercer un efecto protector sobre la toxicidad del acetaldehído in vivo (Sprince et al. 1974). La cisteína es también uno de los tres aminoácidos que constituyen el glutatión. La unión del acetaldehído con la cisteína o el glutatión pueden tener como consecuencia una disminución de la concentración hepática de glutatión (Shaw et al. 1981; Pentilla et al. 1987). El glutatión, por tanto, constituye uno de los mecanismos de eliminación de radicales libres tóxicos; una importante reducción del glutatión favorece la peroxidación (Wendell et al. 1979; Fernandez-Checa et al. 1987). Se ha sugerido que el aumento de la peroxidación lipídica, mediada probablemente por el acetaldehído podría contribuir a la aparición de esteatosis hepática (DiLuzio et al. 1977).

En la rata se requieren dosis muy elevadas de etanol (5-6 g/Kg) para producir peroxidación de lípidos (Farrell et al. 1978; MacDonald 1973), dosis menores de etanol no tienen ningún efecto (Shaw et al. 1981). Por el contra-

rio, tras la administración crónica de etanol a la rata, pequeñas dosis agudas de etanol son ya capaces de inducir peroxidación en el hígado. Además, este efecto puede ser inhibido, al menos en parte, por la administración de metionina, un precursor del glutati6n (Shaw et al. 1981). La peroxidaci6n de lipidos inducida por el etanol es todavía m1s importante en el mandril; la administraci6n de cantidades relativamente bajas de etanol (1-2 mg/Kg) durante un periodo de 5 a 6 horas da lugar a la aparici6n de peroxidaci6n lipídica y a una deplecci6n de glutati6n reducido. La susceptibilidad del mandril a desarrollar lesiones hep1ticas m1s severas que la rata tras el consumo cr6nico de etanol podría estar relacionado con la mayor predisposici6n del primero a la deplecci6n de glutati6n y el inicio de peroxidaci6n lipídica.

El acetaldehido puede tambi6n ser directamente responsable de algunas de las alteraciones inmunol6gicas que presentan los alcoh6licos (Actis et al. 1978; Dhinagra et al. 1980). El acetaldehido, y en menor grado el etanol, estimulan la transformaci6n de los linfocitos (Sorrell et al. 1972; Nilius 1985)) y la producci6n de linfoquinas (Kakumu et al. 1977). El significado de estos hallazgos es controvertido. Dado el peque1o tama1o molecular del acetaldehido, es poco probable que actue como un antígeno. La activaci6n de los linfocitos por parte del acetaldehido es un hecho inespecífico ya que tambi6n se da en pacientes con hepatitis cr6nica activa de origen no alco-

hólico (Sorrell et al. 1972). Pero, tal como se ha comentado, el acetaldehído es una molécula muy reactiva que puede reaccionar con grupos tiol de muchas enzimas y proteínas y puede unirse de forma covalente a proteínas hepáticas normales o anormales (Cederbaum et al. 1976). El acetaldehído puede alterar la membrana del hepatocito despolimerizando las proteínas y dando lugar a la aparición de antígenos de superficie alterados (Cochrane et al. 1977). Se ha documentado la existencia de antígenos dirigidos contra la membrana del hepatocito en los pacientes con hepatopatía alcohólica (MacSween et al. 1980), y se ha descrito una "lipoproteína hepática específica" (liver specific lipoprotein, LSP) que es una macrolipoproteína de la membrana del hepatocito (Hopf et al. 1974). La LSP se ha utilizado para analizar la citotoxicidad linfocitaria específicamente dirigida contra la membrana, en pacientes con hepatitis alcohólica. Los pacientes con hepatitis alcohólica presentan con frecuencia linfocitos circulantes que son citotóxicos para los hepatocitos autólogos y para hepatocitos de conejo aislados in vitro. Esta citotoxicidad es bloqueada por la adición de LSP (Cochrane et al. 1977). Estos datos sugieren que el daño hepatocelular puede ser causado por una reacción inmunológica dirigida específicamente contra este antígeno. La citotoxicidad mediada por linfocitos, e inhibida por la LSP in vitro, se correlaciona con el grado de necrosis in vivo, y desaparece tras la recuperación clínica y bioquímica (Williams et al. 1977). Se ha

sugerido que, en individuos predispuestos, la incapacidad para suprimir la respuesta inmune a la LSP tras la supresión del alcohol puede explicar la ocasional progresión de la hepatopatía hasta la cirrosis a pesar de la abstinencia (Williams et al. 1977). La observación de un aumento de la prevalencia del HLA-B8 en pacientes con hepatitis alcohólica (Bailey et al. 1976) sugiere que, en algunos pacientes, puede haber una alteración del control de la respuesta inmune. La interpretación de estos datos se ve dificultada por la controversia en torno a la pureza y especificidad de la LSP. La LSP constituye un complejo sistema de antígenos que puede no ser organo-específico aunque puede contener componentes hepáticos específicos muy lábiles (Behrens et al. 1979; Chisari 1980). El papel de la LSP en las reacciones inmunes de la hepatitis alcohólica no podrá ser aclarado hasta que queden bien establecidas la pureza y especificidad de los antígenos.

Una de las principales dificultades para aclarar la verdadera contribución del acetaldehído en los diversos efectos tóxicos del etanol ha sido la falta de métodos adecuados para determinar el acetaldehído en sangre humana. La formación artefactual de acetaldehído a partir del etanol (Truitt 1970; Stowell et al. 1977) y las reacciones de desaparición del acetaldehído que pueden ocurrir durante la recolección y procesamiento de las muestras de sangre (Lindros 1983) constituyen las princi-

pales fuentes de error. El método tradicional de determinación del acetaldehído consistente en la desproteínización de la sangre total con ácido perclórico (Duritz & Truitt 1964) da lugar a la formación de importantes cantidades de acetaldehído durante el proceso de desproteínización. Con el fin de minimizar esta producción artefactual de acetaldehído se han desarrollado más recientemente algunos métodos en los que se aplica el agente desproteínizante al plasma, en lugar de aplicarlo a la sangre total (Von Wartburg & Ris 1979; Stowell et al. 1980) o incluso en los que se obvia la desproteínización realizando el análisis cromatográfico de fase gaseosa directamente del plasma (Pikkarainen et al. 1979). Sin embargo, existe todavía con estos métodos producción artefactual de acetaldehído y deben aplicarse curvas de corrección.

Las primeras evidencias de una mayor concentración de acetaldehído en los alcohólicos fueron aportadas por Truitt (1971). Majchrowicz & Mendelson (1971) hallaron niveles elevados de acetaldehído en los alcohólicos, pero debido a que la metodología empleada fue inadecuada y no estudiaron un grupo control, los resultados de este estudio no son concluyentes. Con una metodología más perfeccionada, pero todavía inadecuada, Korsten et al. (1975) demostraron una mayor elevación de los niveles de acetaldehído en los alcohólicos que en los controles. Más recientemente Palmer & Jenkins (1982) describieron resultados similares. Los resultados de los estudios más

recientes han sido dispares. Erikson et al. (1980) utilizando el método de la semicarbacida no detectó concentraciones significativas de acetaldehído en un grupo de pacientes alcohólicos; este autor sugiere que probablemente las concentraciones plasmáticas de acetaldehído sean inferiores a 0.5 μM , límite de sensibilidad de los métodos analíticos modernos. Por otro lado, Lindros et al. (1980) observó incrementos en las concentraciones de acetaldehído en sangre y en el aliento en el 75% de individuos de un grupo de alcohólicos a los que se administró alcohol. Así mismo, Nuutinen et al. (1983) detectaron una elevación de los niveles plasmáticos de acetaldehído en la mitad de los pacientes alcohólicos que examinaron.

El mecanismo por el que se produce una elevación de los niveles de acetaldehído en una proporción de los pacientes alcohólicos no ha sido del todo aclarada hasta la actualidad (Von Wartburg et al. 1983). En un principio podría depender de una disminución de su metabolización por parte de la ALDH hepática (Palmer & Jenkins, 1982; Nuutinen et al., 1983), del aumento de su velocidad de producción (Lindros et al. 1980), o bien de una combinación de ambos mecanismos. De cualquier forma, las diferencias en los niveles de acetaldehído que aparecen tras la administración de etanol podrían quizás explicar por qué determinadas alteraciones hepáticas asociadas al consumo crónico de alcohol aparecen solo en una propor-

ción de la población de individuos alcohólicos.

4. VARIABILIDAD GENETICA DE LOS ENZIMAS OXIDATIVOS DEL ETANOL

Las principales enzimas responsables del metabolismo del etanol son la ADH y ALDH hepáticas. La reacción catalizada por la ADH es la que limita la velocidad de oxidación del etanol. En el hígado humano existen múltiples isoenzimas de la ADH, que es una molécula dimérica, formada por la asociación de dos subunidades codificadas por distintos genes estructurales. Se ha descrito la existencia de un polimorfismo genético en dos de estos locus genéticos y se han podido aislar y caracterizar todas las formas de isoenzimas homo y heterodiméricas conocidas. Es de destacar que algunas de ellas presentan marcadas diferencias en cuanto a su capacidad para oxidar el etanol. Se ha sugerido, en base a ello, que la variabilidad genética en la capacidad para oxidar el etanol podría depender de las características cinéticas de la ADH.

Para mantener la oxidación del etanol es esencial la eficiente transformación del acetaldehído en acetato por la ALDH, ya que el equilibrio de la reacción de la ADH favorece la formación de etanol a partir del acetaldehído. Existen también diversas formas moleculares de ALDH de las cuales la más activa es la de localización mitocondrial. Se ha descrito una variante inactiva de la ALDH que se halla presente en el 50% de la población oriental y

se cree que puede ser la base de la intolerancia a la ingesta de alcohol que presentan estos individuos.

4.1. ISOENZIMAS DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA

La ADH es una enzima capaz de oxidar toda una serie de alcoholes alifáticos primarios, secundarios y terciarios y un reducido número de alcoholes cíclicos, en presencia de NAD, dando lugar a la formación de los correspondientes aldehidos.

Se han descrito al menos cinco locus genéticos distintos que codifican la ADH. Los estudios de Smith et al. (1971,1972,1973a,b) han permitido definir tres de estos locus genéticos, que codifican tres subunidades distintas de la ADH, las subunidades α codificadas por el locus ADH1, las β codificadas por el locus ADH2 y las γ codificadas por el locus ADH3. Estas subunidades dan lugar a diversas isoenzimas de la ADH resultantes de la unión dimérica de subunidades iguales o distintas. Las isoenzimas homodiméricas (e.g. $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$) poseen características similares aunque no idénticas.

Li & Magnes (1975) describieron una forma distinta de ADH, denominada π ADH. Bosron et al. (1980) han realizado estudios detallados sobre las propiedades de la π ADH purificada. Esta forma de ADH tiene unas propiedades bastante distintas a las formas descritas previamente y se considera el producto de un cuarto locus ADH.

Parés & Vallee (1981) demostraron mediante el uso de alcoholes de mayor peso molecular (pentanol y octanol) la

existencia en el hígado humano de una ADH que migra hacia el ánodo y por tanto tiene una carga distinta a los productos de los locus genéticos previamente descritos. La isoenzima de movilidad anódica fue denominada X-ADH y constituye el producto de un quinto locus ADH. La isoenzima X-ADH tiene unas propiedades cinéticas muy distintas a las otras formas de ADH.

El análisis de los péptidos de las isoenzimas ADH purificadas, ha demostrado que los tres tipos de subunidades ADH de la clase I tienen unos perfiles peptídicos muy similares. Sin embargo, los perfiles peptídicos de las subunidades π y X ADH presentan marcadas diferencias entre sí y con respecto a las subunidades α , β y γ (Strydom et al. 1982). En base a estas diferencias se ha propuesto que las isoenzimas que contienen subunidades α , β y γ , codificadas por los locus ADH1, ADH2 y ADH3, sean denominadas ADH de la clase I, la π ADH codificada por el locus ADH4 se denomine ADH clase II y la isoenzima X ADH, codificada por el locus ADH5, se denomine ADH clase III.

Es probable que cuando se lleven a cabo estudios detallados utilizando un mayor número de alcoholes y diferentes tejidos, se descubran nuevos locus genéticos que codifiquen ADH. Así, por ejemplo, es posible que en el hombre exista un análogo de la ADH específica de la retina descrita recientemente (Juliã et al. 1983).

4.1.1. Distribución tisular de los isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa.

La ADH de la clase III (X ADH) es la única ADH que se expresa de forma generalizada, ya que se ha detectado en todos los tejidos estudiados así como en los glóbulos blancos (Adinolfi et al. 1984). Las ADH de la clase I son primariamente isoenzimas hepáticas; sin embargo se expresan también en otros tejidos como el riñón, tracto gastrointestinal y en menor grado en el pulmón. Se han detectado muy pequeñas cantidades de ADH de clase I (principalmente $\beta\beta$) en células de la piel, fibroblastos en cultivo y raíces capilares (Goedde et al. 1979b). Smith et al. (1971, 1972) han estudiado la distribución tisular de los isoenzimas de la clase I en diferentes etapas del desarrollo. El producto del gen ADH1, $\alpha\alpha$, es la única ADH de clase I que se detecta en el hígado durante el primer trimestre de vida fetal. Posteriormente se expresa la isoenzima ADH2, $\beta\beta$; solo después del nacimiento se detecta en el hígado la isoenzima ADH3 $\gamma\gamma$. El producto del locus ADH2, β , es la única isoenzima detectable en el pulmón a lo largo de toda la vida. En el tracto gastrointestinal el locus ADH3 es el único activo a lo largo de toda la vida.

Los estudios de la isoenzima de la clase II (π ADH), se han centrado fundamentalmente en el hígado (Bosron et al. 1979a). Sin embargo, hay evidencias de que existen isoenzimas con propiedades similares en otros órganos tales como el tracto gastrointestinal, riñón y

pulmón (Smith et al. 1972).

4.1.2. Variabilidad genética de la alcohol deshidrogenasa.

Los estudios de electroforesis y de cinética enzimática han permitido identificar variantes genéticas de los locus ADH2 y ADH3.

4.1.2.1. Variabilidad del locus ADH2

Alelo ADH2-2 (Subunidad β 2). Von Wartburg & Schurch (1968), realizando estudios en la población suiza, describieron una forma atípica de la ADH hepática que se diferenciaba por su pH óptimo, especificidad de sustrato y sensibilidad a determinados inhibidores. Estos investigadores describieron un método para diferenciar la forma atípica de la usual. El procedimiento incluía el estudio de la actividad ADH a pH 8.8 y 11.0. En muestras que contienen la isoenzima atípica la actividad a pH 11 es aproximadamente la mitad que a pH 8.8, mientras que las muestras con ADH usual muestran una actividad a pH 11 que es doble que a pH 8.8.

En estudios llevados a cabo en poblaciones de origen inglés (Smith et al. 1971, 1972), se ha observado que la prevalencia del fenotipo atípico es del 6%. Smith et al. (1971, 1972) demostraron que la ADH atípica tiene una distinta movilidad electroforética. Los estudios electroforéticos y enzimáticos de la ADH atípica llevaron a la conclusión de que la ADH atípica es el resultado de una

variante alélica del locus ADH2. El alelo ADH2-2 codifica unidades $\beta 2$, que, cuando se hallan en forma homodimérica o heterodimérica, dan lugar a cambios de las propiedades cinéticas y de la movilidad electroforética de la isoenzima de la ADH. El alelo atípico descrito por vez primera en la población suiza se ha denominado también $\beta 2$ Berna (Buhler et al. 1984a).

En algunas poblaciones orientales, como la japonesa (Fukui et al. 1972; Stamatoyannopolous et al. 1975; Harada et al. 1978) o la china (Teng et al. 1979), el fenotipo atípico se da en el 85-90% de los individuos. Se han realizado también estudios sobre la ADH atípica en individuos orientales residentes en Hawai. El alelo atípico ha sido denominado, en esta población, $\beta 2$ -Oriental o $\beta 2$ -Honolulu.

Recientemente se ha determinado la secuencia de aminoácidos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ aisladas de la población suiza y de la unidad $\beta 2$ procedente de individuos orientales (Buhler et al. 1984b; Jornvall et al. 1984). La subunidad $\beta 2$ ha resultado ser idéntica en ambas poblaciones y se diferencia de la subunidad $\beta 1$ en un solo aminoácido en la posición 47. La subunidad $\beta 1$ tiene un residuo de arginina en esta posición mientras que la subunidad $\beta 2$ tiene un residuo de histidina.

Jornvall et al. (1984) pudo establecer que el cambio mutacional de la subunidad $\beta 2$ aparece en la posición que se une al grupo pirofosfato de la coenzima NAD. Los autores relacionan este hecho con las diferencias obser-

vadas entre las isoenzimas $\beta_1\beta_1$ y $\beta_2\beta_2$ en cuanto a su pH óptimo y capacidad catalítica.

Alelo Indianápolis (Subunidad β_{Ind}). Bosron et al. (1979b) identificaron una forma variante de las unidades β a la que se denominó variante Indianápolis (β_{Ind}). Las isoenzimas que tienen la subunidad β_{Ind} en forma homodimérica o heterodimérica poseen una mayor movilidad catódica que las isoenzimas compuestas por subunidades β_1 . Bosron et al. (1979a) analizaron la actividad ADH a distintos pH y demostraron que los especímenes que contienen isoenzimas β_{Ind} muestran dos pH óptimos distintos para la oxidación del etanol: un pH óptimo a 10 y otro pH óptimo a 7.0. En sus estudios las muestras de hígado que contenían solo isoenzimas β_1 mostraban un pH óptimo a 10.0-10.5, mientras que las muestras hepáticas con fenotipo atípico mostraban un pH óptimo a 8.5.

Variante β_{Bahai} . Azevedo et al. (1975) analizó los isoenzimas de la ADH de un grupo de individuos de origen mestizo en Brasil y observó la existencia de un alelo β_{ADH2} que daba lugar a isoenzimas con una mayor movilidad catódica que las isoenzimas que poseen subunidades β_1 y que eran distintas a las isoenzimas que contienen subunidades β_2 . Parece probable que β_{Ind} y β_{Bahai} sean productos de la misma variante alélica, que puede haberse originado en algunas poblaciones africanas. Esta variante no ha sido nunca hallada en poblaciones europeas (Agarwal

et al. 1981b).

4.1.2.2. Variabilidad del locus ADH3

A partir de estudios electroforéticos de tejido gástrico e intestinal de fetos y adultos, de tejido renal fetal, donde las isoenzimas ADH3 constituyen la principal forma de ADH, y a partir de estudios de tejido hepático de adultos, se ha podido establecer la variabilidad genética que posee el locus ADH3 (Smith et al. 1972, 1973a). Esta variabilidad da lugar a la aparición de isoenzimas que se diferencian por su movilidad electroforética en geles de almidón que contienen NAD. El alelo ADH3-1 da lugar a la subunidad r_1 y el alelo ADH3-2 da lugar a la subunidad r_2 . La isoenzima r_1r_1 tiene una movilidad electroforética más lenta que la isoenzima r_2r_2 . Los individuos heterocigóticos para el locus ADH3 muestran un patrón electroforético de la ADH gástrica con tres bandas. Adinolfi & Hopkinson (1979b) demostraron que las isoenzimas r_1r_1 y r_2r_2 exhibían marcadas diferencias en su afinidad por el NAD. La isoenzima r_2r_2 presenta una marcada disminución de su movilidad en gel de almidón al añadir NAD. Los estudios sobre afinidad de estas enzimas para la sefarosa azul han aportado más evidencias sobre las diferencias existentes entre ambos. Adinolfi et al. (1978) demostraron que la isoenzima r_2r_2 no se une a esta resina, mientras que la isoenzima r_1r_1 se une rápidamente a la sefarosa azul de la que solo es posible eluirla mediante NAD 5 mM.

4.1.2.3. Locus ADH1

No se han descrito variantes electroforéticas del locus ADH1. Smith et al. (1971,1972) realizó estudios electroforéticos en 261 hígados fetales. Dado que la ADH predominante durante la vida fetal es la α , se podrían haber detectado alteraciones en la movilidad electroforética, pero no se observaron en ningún caso.

Al examinar los patrones electroforéticos de la ADH en hígados humanos, se puede apreciar en ocasiones que la banda α es muy débil o incluso ausente. Este hallazgo podría sugerir que existen variaciones cuantitativas en la actividad del locus ADH1. Sin embargo, debe de tenerse en cuenta que la isoenzima ADH α es mucho menos estable que los productos de los locus ADH2 o ADH3, y es posible que se produzcan alteraciones durante el almacenamiento o procesado de las muestras que den lugar a estas variaciones cuantitativas. En un estudio sobre actividad ADH en biopsias hepáticas de individuos alcohólicos, Ricciardi et al. (1983) observaron que la isoenzima ADH α era con frecuencia débil o podía estar incluso ausente.

No se ha demostrado que exista variabilidad genética en los genes de la ADH clase II (π) ni de la clase III (X).

4.1.3. Frecuencias poblacionales de las variantes genéticas de la alcohol deshidrogenasa clase I.

4.1.3.1. Frecuencia de los alelos ADH2

En los estudios iniciales de Von Wartburg et al. (1968), llevados a cabo en un grupo de población suiza, se detectó el fenotipo de ADH "atípica" en un considerable porcentaje de las muestras, que llegaba al 15%. Smith et al. (1972), al estudiar la actividad ADH hepática en 598 adultos de origen británico, hallaron el fenotipo atípico en 36 individuos (6%). En estudios realizados sobre la población germana por Harada et al. (1980), estos autores indicaron que la frecuencia del fenotipo atípico podría ser del 20%. Todos los estudios coinciden en que la frecuencia del fenotipo atípico es mucho más alta entre la población oriental. Así, los estudios realizados en población japonesa por Harada et al. (1978) y en población china por Teng et al. (1979) demuestran que la frecuencia del fenotipo atípico es del 90%.

Está bien establecido que el fenotipo atípico lo presentan tanto los individuos homocigóticos como los heterocigóticos para el alelo ADH2-2 ($\beta 2$). En la electroforesis en gel de almidón es difícil distinguir entre el fenotipo ADH2 2-2 y el fenotipo ADH2 2-1. Yin et al. (1984) usaron un sistema de enfoque isoeléctrico en agarosa que les permitía diferenciar en dos grupos a los individuos con fenotipo atípico, individuos que poseían

ADH2 2-1 e individuos con ADH2 2-2. Yin et al. (1984) lograron también la separación de los distintos isoenzimas ADH2. Estos autores hallaron que la isoenzima $\beta 1\beta 1$ presenta un cociente de pH (pH 10.5/pH 8.5) de 2.4, mientras que el de la isoenzima $\beta 1\beta 2$ es de 0.35 y el de la isoenzima $\beta 2\beta 2$ es de 0.3.

El fenotipo atípico es, aparentemente, menos común en individuos de raza negra. Bosron et al. (1983a) hallaron este fenotipo en solo un individuo entre 17 negros norteamericanos, y Azevedo et al. (1975), en un estudio realizado en población brasileña mestiza, halló que la frecuencia del fenotipo atípico era del 2.8%.

En estudios realizados en individuos de origen indú, Teng et al. (1979) no hallaron ningún caso con fenotipo atípico.

Bosron et al. (1983b) han establecido que la frecuencia del alelo ADH2Ind es de 0.16 entre la población negra americana. Argawal et al. (1981) no han podido detectar ningún caso con el alelo ADH2Ind entre la población europea.

4.1.3.2. Frecuencia de los alelos ADH3

En estudios realizados en población inglesa, Smith et al. (1972) observaron que la frecuencia del alelo ADH3-1 era de 0.6 y la frecuencia del alelo ADH3-2 de 0.4. En poblaciones de origen chino o japonés se ha observado una frecuencia del alelo ADH3-1 de 0.91 y una frecuencia del alelo ADH3-2 de 0.09 (Teng et al. 1979;

Harada et al. 1980a).

Smith et al. (1972) observaron que entre los caucásicos que poseían la variante atípica de la ADH (alelo ADH2-2), la frecuencia del alelo ADH3-1 es mayor a la esperada. En el grupo de individuos con ADH atípica estos autores observaron las siguientes frecuencias genotípicas: ADH3 1-1:22; ADH3 2-1:9; ADH3 2-2:2. Las frecuencias genotípicas esperadas según la ley del equilibrio de los genotipos de Hardy-Weinberg serían: ADH3 1-1:12; ADH3 2-1:16; ADH3 2-2:5, ya que las frecuencias génicas de esta población son de 0.6 para la ADH3-1 y de 0.4 para la ADH3-2. Una posible explicación de las discrepancias entre las frecuencias observadas y esperadas de los alelos ADH3 en el grupo de individuos con el alelo ADH2-2 es que exista un desequilibrio entre los alelos ADH2 y ADH3 debido a que el alelo ADH2-2 ha sido introducido hace relativamente poco en la población europea por portadores del genotipo ADH3-1 y puede que no se haya alcanzado todavía el equilibrio en esta población. Además, podría ocurrir que el equilibrio se alcanzase solo lentamente dado que los genes ADH2 y ADH3 están estrechamente relacionados.

Los estudios en población mestiza brasileña (Azevedo et al. 1975) y en población negra americana (Bosron et al. 1983b), indican que el alelo ADH3-2 es relativamente infrecuente en los individuos de estirpe africana. Los estudios realizados por Bosron et al. (1983a) indican que en la población americana de raza negra el 51% de los

individuos posee el genotipo ADH3 1-1, mientras que en la población americana de raza blanca el genotipo ADH3 1-1 aparece en el 21% de los individuos.

4.1.4. Características estructurales de los genes e isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa.

Mientras que la distribución de los fenotipos de la ADH determinados mediante el análisis electroforético de las isoenzimas en diferentes grupos raciales, apoya el modelo genético descrito anteriormente, la prueba de tal modelo solo puede ser obtenida mediante el análisis de la secuencia peptídica de diferentes subunidades de la ADH o mediante el análisis de la secuencia nucleica del ADN génico determinante de las isoenzimas ADH. Tales análisis solo han sido posibles en los últimos años (Duester et al. 1986).

La cromatografía de afinidad o de intercambio iónico ha permitido la purificación de todos los isoenzimas hepáticos humanos en cantidades suficientes como para permitir el análisis de la secuencia proteica. (Lange et al. 1976; Bosron et al. 1986). Se ha logrado la separación de las subunidades ADH mediante proteasas y se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución para purificar los péptidos. Jornvall et al. (1984) han podido determinar la secuencia completa de las subunidades β_1 y α_1 y han establecido secuencias parciales de las subunidades α y β_2 (Buhler et al. 1984b; Hempel et al. 1984). Hempel et al (1985a) observaron que existe una

identidad del 87% en la secuencia de la ADH humana $\beta 1$ y la ADH equina E, la forma de ADH que había sido estudiada durante años mediante análisis cristalográfico por rayos X. Tal como se ha comentado, las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ difieren solo en un residuo, que consiste en la sustitución de la arginina de la posición 47 de la subunidad $\beta 1$, por una histidina en la subunidad $\beta 2$ (Hempel et al. 1984b; Jornvall et al. 1984). Entre las subunidades $\beta 1$ y $\gamma 1$ la homología es del 94% (Eklund et al. 1987). Se ha podido determinar la secuencia de dos fragmentos de la subunidad α , que resulta diferir de la subunidad $\beta 1$ en 7 de las 64 posiciones y de la $\gamma 1$ en 11 de las 64 posiciones (Hempel et al. 1985a). Jornvall et al. concluyen que las subunidades α y $\gamma 1$ son las que presentan mayores diferencias entre las subunidades de la clase I.

La tecnología del ADN recombinante se ha aplicado al análisis de la secuencia de cinco genes ADH y su posición dentro de los cromosomas. Duester et al. (1984) logró la síntesis de un oligonucleótido para la ADH humana basado en la secuencia de una región de la ADH equina que resulta ser idéntica a la secuencia de las subunidades humanas $\beta 1$ y $\gamma 1$, estos autores aislaron el ADN que codifica los 91 aminoácidos carboxiterminales de la subunidad $\beta 1$. Este ADN- $\beta 1$ incluye también 593 nucleótidos del final 3'-no traducido. Más recientemente se ha logrado aislar el ADN para toda la subunidad $\beta 1$ (Ikuta et al. 1985; Edenberg et al. 1986), y determinar la estructura

del gen ADH2-1 que codifica la subunidad β 1 (Duester et al. 1986). Recientemente también, se han publicado las secuencias del ADH correspondiente a las subunidades α y r 2, Ikuta et al. (1986) postulan que la diferencia genética entre aloenzimas con subunidades r 1 y r 2 es la sustitución de una Valina en la posición 276 de la r 1 por una Metionina en la r 2.

4.1.5. Propiedades cinéticas de las tres clases de isoenzimas alcohol deshidrogenasa hepáticas

Estudios recientes han demostrado que existen notables diferencias en las características cinéticas y estructurales de las tres clases de isoenzimas de la ADH (Bosron et al. 1986; Buhler 1982a,b; Buhler 1984d). De hecho, las diferencias en la movilidad electroforética, la K_m para el etanol y la K_i para el pirazol han servido para dividir las isoenzimas en tres clases (Cornell et al. 1983). La clase I incluye los isoenzimas producidos por los locus genéticos ADH1, ADH2 y ADH3, que codifican respectivamente las subunidades α , β y r . En la electroforesis en gel de almidón migran hacia el cátodo, su K_m para el etanol, a pH 7.5, se sitúa entre 0.05 y 5 mM y poseen una K_i para el 4-metilpirazol que oscila entre 0.1 y 10 μ M. La isoenzima de la clase II, π -ADH, que es codificada por el locus ADH4, migra también hacia el cátodo aunque su situación es más anódica que las isoenzimas de la clase I (Li et al. 1977), posee una alta K_m para el etanol (34 mM a pH 7.5) y tiene una alta K_i para

el 4-metilpirazol (2.0 mM) (Li et al. 1977). Esta diferencia en la K_i para el 4-metilpirazol es responsable de la diferente afinidad para la sefarosa "CapGapp" resina utilizada para la separación de estas dos clases de isoenzimas (Li et al. 1977). Recientes estudios electroforéticos sobre las subunidades de la ADH indican que la isoenzima de la clase II es homodimérica y ha sido denominada $\pi\pi$ (Keung et al. 1985). La isoenzima de la clase III, X-ADH, que migra hacia el ánodo en electroforesis en gel de almidón, no resulta saturada por el etanol a concentraciones de hasta 1 M y no es inhibida por el 4-metilpirazol (Parés et al. 1984). La X-ADH es la única isoenzima ADH presente en el cerebro (Beisswenger et al. 1985).

Los estudios inmunológicos y de secuencia de péptidos de las isoenzimas de la ADH indican que las diferencias estructurales que existen entre las tres clases de ADH son más marcadas que las diferencias observadas entre las isoenzimas de la clase I. Tal como se ha comentado, los estudios de secuencia de las subunidades β_1 , β_2 y α_1 indican que existe entre ellas una identidad de más del 90% de la secuencia, mientras que el estudio de los péptidos de la isoenzima de la clase II ($\pi\pi$) y de la clase III (X-ADH) muestra diferencias sustanciales con respecto a los isoenzimas de la clase I (Strydom et al. 1982). Los anticuerpos dirigidos contra la isoenzima $\beta_1\beta_1$ poseen una reactividad cruzada con otras isoenzimas de la clase I, pero no con la $\pi\pi$ (Adinolfi et al. 1978).

Dentro de las isoenzimas de la clase I se han observado diferencias sustanciales en sus propiedades cinéticas. Las mayores diferencias se dan entre las tres aloenzimas $\beta\beta$, codificadas por el locus ADH2. La aloenzima $\beta_1\beta_1$ tiene un pH óptimo para el etanol de 10.5, mientras que el pH óptimo para la $\beta_2\beta_2$ es de 8.5 y para la $\beta_3\beta_3$ es de 7.0 (Bosron et al. 1986). La isoenzima $\beta_2\beta_2$ posee una K_m para el etanol y el NAD y una V_{max} para la oxidación del etanol significativamente superiores a las de la isoenzima $\beta_1\beta_1$ (Yoshida et al. 1984). A su vez, la isoenzima $\beta_3\beta_3$ posee mayores K_m para el etanol y el NAD y mayor V_{max} que las isoenzimas $\beta_1\beta_1$ y que $\beta_2\beta_2$. A diferencia de las formas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$, las isoenzimas $\gamma_1\gamma_1$ y $\gamma_2\gamma_2$ no muestran una cinética de Michaelis-Menten sino que muestran una cooperatividad negativa con coeficientes de Hill de 0.5 a 0.6 (Bosron et al. 1983c).

4.1.6. Relación entre el polimorfismo de la alcohol deshidrogenasa y la farmacocinética de eliminación del etanol.

Diversos estudios efectuados en animales de experimentación han demostrado que la reacción catalizada por la ADH constituye el factor limitante de la velocidad de eliminación del etanol (Li 1983). Se ha sugerido que el contenido hepático de ADH y la velocidad de reoxidación del NADH son factores limitantes para la oxidación del etanol. Estas hipótesis se han basado en la relación observada entre la capacidad de oxidación del etanol in

vivo observada en la rata y la calculada a partir de las constantes cinéticas de la ADH y la concentración de etanol, NAD, acetaldehído y NADH en los hepatocitos de los animales a los que se ha administrado etanol (Crabb et al. 1983). Dado que en la actualidad se conocen las constantes cinéticas de muchas de las isoenzimas ADH hepáticas del hombre, en teoría podría estimarse la contribución de cada una de las isoenzimas al metabolismo del etanol, pero en la práctica esto resulta imposible, puesto que requiere también conocer la concentración de cada uno de los sustratos, productos de reacción y coenzimas a nivel hepático.

Tal como se ha comentado, existe una notable variación en la capacidad de eliminación del etanol entre diferentes individuos a los que se administra una misma dosis de alcohol, incluso cuando las diferencias se corrigen en relación al peso corporal. Se ha sugerido que esta variabilidad viene determinada, al menos en parte, por factores genéticos, por lo que resulta lógico suponer que las diferencias en las propiedades cinéticas de la ADH podrían justificar las diferencias en la capacidad de oxidación del etanol. Los únicos genes que poseen polimorfismo son ADH2 y ADH3. Los estudios cinéticos de las aloenzimas $r1r1$ y $r2r2$, producidas por ADH3 indican que existen pocas diferencias en su K_m para el etanol y NAD y las diferencias en la V_{max} no son remarcables. Por tanto, el polimorfismo de ADH3 puede justificar solo en parte la

variabilidad genética en la eliminación del etanol ya que las isoenzimas que contienen subunidades codificadas por ADH1, ADH2 y ADH4 contribuyen también a la oxidación del etanol in vivo.

Las variantes dependientes del locus ADH2 poseen, en cambio, mayores diferencias en sus características cinéticas. Tal como se ha comentado las Km para etanol y NAD de $\beta 3\beta 3$ son superiores a las de $\beta 2\beta 2$ y estas a su vez mayores que las de $\beta 1\beta 1$, lo que puede, a priori, hacer suponer que la cinética de eliminación del etanol puede tener marcadas diferencias entre individuos con distintos fenotipos ADH2. Un apoyo, aunque indirecto, a esta hipótesis lo constituye la observación de Hanna (1978) quien halló que la velocidad de oxidación del etanol era significativamente superior en individuos de origen chino o japonés, en los que la frecuencia del alelo ADH2-2 es del 85%, que en individuos europeos, en los que la frecuencia del alelo ADH2-2 es baja. Sin embargo, al examinar individuos del mismo origen étnico con y sin alelo ADH2-2 no se han observado diferencias significativas en la capacidad de oxidación del etanol, si bien el número de individuos examinados ha sido escaso (Edwards et al. 1967).

4.2. ISOENZIMAS DE LA ALDEHIDO DESHIDROGENASA

Las aldehido deshidrogenasas son enzimas que oxidan una variedad de aldehidos alifáticos ó cíclicos, en presencia de NAD, dando lugar a la formación de los correspondientes cetoácidos.

En el hígado humano se han hallado dos clases principales de ALDH que se diferencian por su K_m para aldehídos alifáticos de cadena corta y por su localización dentro de la célula hepática (Pietruszko 1983; Tipton 1985; Hempel et al. 1985b). La K_m de las distintas isoenzimas ALDH del hígado humano oscila entre 1 μM y 1 mM (Pietruszko 1983). Las isoenzimas de alto K_m , ALDH1, ALDH3 y ALDH4 se localizan fundamentalmente en el citoplasma del hepatocito mientras que la ALDH de bajo K_m , ALDH2, es de localización mitocondrial (Henehan et al. 1985; Duley et al. 1985; Johnson et al. 1987). Dado que los niveles hepáticos de acetaldehído tras la administración de etanol no suelen superar los 100 μM , la ALDH de bajo K_m (ALDH2), es probablemente la principal responsable de la mayor parte de la oxidación del acetaldehído in vivo (Messiha 1983).

Cuando los extractos de hígado humano se someten a enfoque isoeléctrico en gel de agarosa o poliacrilamida y se tiñen para detectar actividad oxidativa de aldehídos, se pueden observar cuatro bandas de actividad (Duley et al. 1985; Harada et al. 1980; Goedde et al. 1983). La banda más anódica posee un pI de 4.9 y se denomina ALDH2 ó E2 de acuerdo con la nomenclatura de Yoshida et al. (1983) y de Greenfield & Pietruszko (1977) respectivamente, y ALDH I según la nomenclatura de Goedde et al. (1983). La ALDH2 posee un bajo K_m para el acetaldehído, de alrededor de 1 μM a pH 9.5. La siguiente banda con

mayor movilidad anódica posee un pI de 5.3 y se denomina ALDH1, E1 ó ALDH II. La ALDH II posee una Km para el acetaldehído de aproximadamente 0.1 mM. La isoenzima ALDH3 migra más catódicamente que la ALDH1 y posee un pI de 6.4. La ALDH3 es la principal isoenzima en pulmón y estómago (Duley et al. 1985; Harada et al. 1980). La isoenzima ALDH4 migra más catódicamente que la ALDH3 en la electroforesis en gel de almidón y posee un pI entre 7.0 y 7.5 en el enfoque isoeléctrico (Duley et al. 1985; Harada et al. 1980). Tanto la ALDH3 como la ALDH4 poseen un alto Km para el acetaldehído, alrededor de 1 mM a pH 9.5 y, por tanto, no deben contribuir de forma significativa en la transformación del acetaldehído in vivo

4.2.1. Variabilidad genética de las isoenzimas aldehído deshidrogenasa.

Harada et al. (1978) en un estudio realizado sobre 40 muestras hepáticas de individuos japoneses halló un fenotipo ALDH atípico en aproximadamente la mitad de ellos. La isoenzima ALDH más anódica (mitocondrial) estaba ausente. Goedde et al. (1979a) propusieron que la reacción de vasodilatación y los síntomas de intoxicación etílica aguda inducidos por pequeñas dosis de alcohol en una considerable proporción de los individuos orientales era debida a una deficiencia de la ALDH mitocondrial.

Impraim et al. (1982), logró obtener anticuerpos dirigidos contra las isoenzimas ALDH1 y ALDH2 mediante la inmunización de conejos con preparaciones purificadas de

estas isoenzimas. Los anticuerpos así obtenidos reaccionaban con ambas isoenzimas. Sin embargo, la actividad antigénica de cada isoenzima se podía determinar por separado mediante inmunolectroforesis (cruzada). Esta consiste en una electroforesis en gel de almidón en la primera dimensión, seguida de una electroforesis de los enzimas separados en gel de agarosa, que contiene el anticuerpo. Impraim et al. (1982) utilizó esta técnica para estudiar los extractos hepáticos de los individuos japoneses que presentaban, aparentemente, una deficiencia de la isoenzima mitocondrial. En estos extractos los autores pudieron demostrar la existencia de ALDH2 que era enzimáticamente inactiva pero antigenicamente activa. Sobre la base de estos estudios, los autores postularon que la ausencia de ALDH2 en los individuos orientales se debe a una mutación genética estructural, que da lugar a la síntesis de una proteína enzimáticamente inactiva. Posteriormente Yoshida et al. (1983) completaron estos estudios utilizando una combinación de determinaciones de la actividad enzimática y de la actividad inmunológica de la ALDH en individuos de origen japonés. En el estudio de 10 muestras hepáticas pudieron demostrar que algunos individuos que poseen ALDH2 enzimáticamente activa poseen también material enzimáticamente inactivo pero inmunológicamente activo. Estos casos corresponderían a individuos que son heterocigotos para el alelo ALDH2 normal y el alelo ALDH2 deficiente. Yoshida et al. (1983) observaron que en la población japonesa el genotipo

ALDH2-1/ALDH2-1 (normal) se da con una frecuencia de 0.11, el genotipo ALDH2-1/ALDH2-2 aparece con una frecuencia de 0.33, y el fenotipo ALDH2-2/ALDH2-2 (deficiente) se da con una frecuencia de 0.56.

Se ha descrito, también en individuos orientales otra variante del fenotipo ALDH, caracterizado por la ausencia de la banda ALDH1 en la electroforesis en gel de almidón (Yoshida et al. 1983). Sin embargo, dado el escaso número de muestras estudiado no se ha podido determinar la frecuencia del probable alelo ALDH1-2 ni tampoco la naturaleza de la alteración de la ALDH1 que da lugar a este fenotipo.

Se ha detectado también la existencia de variabilidad genética de la ALDH3, esta vez en individuos europeos. Estos individuos poseen un patrón electroforético de ALDH3 con tres bandas (Santisteban et al. 1985), lo que sugiere la existencia de una variabilidad genética para el alelo ALDH3, que daría lugar a la aparición de isoenzimas con distinta movilidad electroforética.

4.2.2. Estructura y propiedades de las isoenzimas aldehído deshidrogenasa.

Las isoenzimas ALDH1 y ALDH2 son tetraméricas (Hempel et al. 1982, 1983). Las subunidades de la isoenzima ALDH mitocondrial (ALDH2) tienen un peso aproximado de 51.000, mientras que las subunidades de la ALDH1 (citoplásmica) poseen un peso molecular de 53.000 (Jones et al. 1983; Algar et al. 1986). Los estudios de Santis-

teban et al. (1985) indican que la isoenzima ALDH3 posee un peso molecular de 85.000. La aparición de un patrón electroforético en tres bandas en los individuos que son heterocigóticos para esta isoenzima sugiere que la ALDH3 es un dímero. Forte-McRobbie et al. (1986) purificaron la isoenzima ALDH4 y hallaron que se trata de una enzima dimerica compuesta de subunidades con un peso molecular de 69.000.

Todas las aldehido deshidrogenasas poseen un amplio espectro de actividad sobre numerosos aldehidos alifáticos que incluyen el formaldehido, acetaldehido, propionaldehido y butaraldehido (Abriola et al. 1987; Harada et al. 1980; Jones et al. 1983). Las isoenzimas ALDH3 son particularmente activas frente a aldehidos cíclicos como el benzaldehido y furfuraldehido (Santisteban et al. 1985).

La determinación de los valores de la K_m de las isoenzimas ALDH para el propionaldehido indican que la ALDH mitocondrial posee la K_m más baja, 3.5 μM , mientras que la ALDH4 posee la K_m más alta, de 1.4 mM. En la mayoría de trabajos se examina unicamente la ALDH1 y ALDH2 que son denominadas ALDH de alto K_m y ALDH de bajo K_m respectivamente (Greenfield et al. 1977).

Harada et al. (1980) determinaron que el pH óptimo de la ALDH mitocondrial es de 9.7 mientras que el de las otras isoenzimas ALDH es de 8.8.

El NAD es el cofactor requerido por las isoenzimas

ALDH2 (mitocondrial) y la ALDH4, las isoenzimas ALDH1 (citoplásmica) y ALDH3 pueden utilizar indistintamente NAD ó NADP (Santisteban et al. 1985).

Existe una marcada diferencia en la sensibilidad de las isoenzimas ALDH citoplásmica y mitocondrial con respecto a la inhibición por el disulfiram. De forma característica la isoenzima citoplásmica es especialmente sensible a la inhibición por el disulfiram (Greenfield et al. 1977).

4.2.3. Relación entre el polimorfismo de la aldehído deshidrogenasa y la toxicidad por acetaldehído.

Goedde et al. (1979) sugirieron que la mayor prevalencia en la población japonesa de la reacción de vasodilatación producida por el alcohol, estaba directamente relacionada con el polimorfismo de la isoenzima ALDH2, de bajo Km. Posteriormente se constató que la mitad de los japoneses poseen la forma inactiva de la ALDH2 (Harada et al. 1980; Teng 1981), y Mizoi et al. (1983) demostró que los individuos con una deficiente actividad ALDH2, es decir, con la variante inactiva de este enzima, presentan tras la administración de 0.4 g de etanol por Kg de peso, niveles muy elevados de acetaldehído en sangre periférica que llegan a alcanzar concentraciones de 30 μ M. De manera concomitante presentan rubicundez facial y otras reacciones disfóricas tras el consumo de etanol. Esta reacción es muy similar a la de los alcohólicos que toman disulfiram y consumen alcohol. Es de interés notar que la

frecuencia de alcoholismo entre los individuos con el fenotipo ALDH2-deficiente es significativamente inferior que en los individuos con el fenotipo ALDH2 normal (Mizoi et al. 1983). Esta sería la primera demostración de una relación directa entre una variante genética de un enzima implicado en el metabolismo del etanol y el hábito alcohólico.

Antes de que se conociera el polimorfismo de la ALDH2 en la población japonesa, Stamatoyannopoulos et al. (1975) propuso que la reacción de vasodilatación tras el consumo de alcohol podría estar relacionado con el aumento de la capacidad oxidativa del etanol y producción de acetaldehído inducidos por la isoenzima ADH- β 2, que aparece en el 85% de la población japonesa. Si bien es verdad que los efectos fisiológicos aversivos se correlacionan mejor con la deficiencia de ALDH2 (Mizoi et al. 1983, Goedde et al. 1979), es significativo notar que existen amplias variaciones individuales en la severidad de los efectos aversivos, por lo que, es posible que la variabilidad genética de la actividad ADH determine, al menos en parte, la susceptibilidad individual a la reacción de aversión.

5. ENFERMEDADES HEPATICAS DE ORIGEN ALCOHOLICO.

5.1. EPIDEMIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES HEPATICAS PRODUCIDAS POR EL ALCOHOL.

Diversos estudios epidemiológicos indican que existe una estrecha relación entre el consumo de alcohol y la

prevalencia de lesiones hepáticas. Uno de los primeros estudios epidemiológicos realizados en EEUU (Jolliffe 1941) demostró que existía una relación directa muy marcada entre la tasa anual de mortalidad por cirrosis hepática y el consumo de alcohol por habitante.

Sin embargo, aunque hay una clara relación epidemiológica entre el consumo de alcohol y la presencia de enfermedades hepáticas en la población, ello no implica necesariamente que exista una relación causal directa entre ambos. Así, es bien conocido que la cirrosis sólo la presentan una proporción variable y relativamente baja de alcohólicos crónicos. En series basadas en estudios necrópsicos, se ha observado que la incidencia de cirrosis en los sujetos alcohólicos varía entre el 2.4 y el 28.2 %, mientras que en estudios basados en el examen de una biopsia hepática, la incidencia de cirrosis oscila entre el 12 y el 30.8% (Leibach 1985). En un estudio epidemiológico clásico realizado por Leibach se halló una correlación muy significativa entre la cantidad de alcohol ingerido, corregido por el peso corporal, y la prevalencia de cirrosis (Leibach 1976). La incidencia de hepatitis alcohólica y/o cirrosis, en este estudio, aumentó en relación directa con el consumo de alcohol y la cirrosis se presentó en el 40% del grupo de pacientes que bebieron más cantidad durante más tiempo. Sin embargo, hasta el 60% de los pacientes que habían consumido cantidades de alcohol superiores a los 200 g/día, durante

un periodo de tiempo superior a 10 años, no presentaron alteraciones hepáticas. Estos datos sugieren que la ingesta alcohólica no es el único factor determinante para la aparición de una hepatopatía alcohólica y es probable que existan otros factores de tipo genético, nutricional o ambiental que puedan influir en el desarrollo de las lesiones hepáticas.

Entre los factores de tipo genético que se han implicado en el desarrollo de hepatopatía, uno de los más importantes es el sexo. Es conocido que las mujeres desarrollan una lesión hepática más grave con menor cantidad y duración de ingesta alcohólica que los hombres (Johnson 1985; Tuys 1984). Además, las mujeres con hepatitis alcohólica pueden evolucionar hacia una cirrosis a pesar de la supresión de la ingesta enólica, hecho que raramente se observa en los hombres (Parés 1986). Estos fenómenos pueden ser debidos a diferencias en el contenido corporal de agua, ya que las mujeres tienen un menor volumen de distribución de etanol (Marshall AW 1983). Estas diferencias también podrían estar influenciadas por factores hormonales, aunque esto no ha sido demostrado en la especie humana.

Se ha observado que algunos antígenos de histocompatibilidad (HLA) son más frecuentes en algunos pacientes con cirrosis alcohólica cuando se comparan con controles sanos. Sin embargo, todavía no se ha podido establecer ningún antígeno específico que sea un marcador para el desarrollo de enfermedad hepática en el alcoholismo cró-

nico, ya que la prevalencia de los antígenos es muy variable según el grupo étnico estudiado (Eddleston 1982).

También se ha considerado la importancia que puedan tener los aspectos genéticos relativos a la prevalencia de distintas isoenzimas de la ADH Y ALDH en la población alcohólica. En este sentido, los resultados son poco concluyentes y si bien se conoce que los alcohólicos con determinados fenotipos, como la deficiencia de ALDH de bajo Km, conllevan una menor predisposición al alcoholismo debido a los efectos aversivos que se producen en estos sujetos tras la ingesta de alcohol, no se ha podido, por el momento, establecer si la posesión de un determinado patrón de isoenzimas puede predisponer al desarrollo de lesiones hepáticas en los individuos que consumen alcohol. También se ha sugerido que los alcohólicos tendrían una distinta actividad de los enzimas que intervienen en el metabolismo oxidativo del etanol en el hepatocito, habiéndose observado que existe una menor actividad enzimática en los alcohólicos que presentan lesiones hepáticas graves (Nilius 1985), aunque se discute si estos cambios en la actividad enzimática serían defectos primarios que podrían predisponer a la aparición de una hepatopatía o bien ser secundarios a la lesión hepática.

En los pacientes alcohólicos crónicos que presentan lesiones hepáticas, existen alteraciones de la inmunidad

celular y humoral más acentuadas que en los sujetos alcohólicos sin hepatopatía. Se ha sugerido que estos trastornos inmunológicos, que aparecerían más frecuentemente en algunos alcohólicos, contribuirían a la aparición de la lesión celular (Paronetto 1981). Sin embargo, no hay una clara confirmación de la influencia de estas alteraciones inmunitarias sobre la lesión celular, ya que estos trastornos podrían ser secundarios a la misma lesión hepática, más que ser los agentes causantes de la lesión.

Otro factor implicado en el desarrollo de la lesión celular, y que puede coexistir con el alcohol, es la infección por el virus B. Se ha observado que la prevalencia de marcadores del virus de la hepatitis B es mayor en los alcohólicos con lesión hepática que en los alcohólicos sin hepatopatía (Mills JR 1979). Sin embargo, no existen evidencias claras que indiquen que el virus B sea un elemento que contribuya a la progresión de la lesión hepática en estos casos.

Por último, uno de los temas más controvertidos en la etiopatogenia de la lesión hepática alcohólica es la malnutrición que presentan estos pacientes, ya que es frecuente el hallazgo de deficiencias nutricionales más o menos importantes, que pueden contribuir o modular el desarrollo y progresión de la hepatopatía alcohólica (Jacobs 1981).

5.2. CLINICA E HISTOLOGIA DE LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

La expresividad clínica y bioquímica de la enfermedad hepática alcohólica es muy variable ya que los distintos patrones histopatológicos pueden cursar de forma asintomática o bien manifestarse por graves signos de insuficiencia hepatocelular y por tanto, en muchos casos, el diagnóstico definitivo del tipo de lesión hepática tan sólo puede establecerse mediante la práctica de una biopsia hepática (Sherlock 1982). Además, la incidencia de alteraciones hepáticas en los alcohólicos asintomáticos resulta elevada. En un estudio efectuado sobre 115 alcohólicos crónicos ingresados en un centro de deshabitua- ción se demostró que únicamente la cuarta parte tenían un hígado estrictamente normal. Una proporción importante tenía lesiones mínimas tales como un depósito de hemosi- derina o una ligera fibrosis portal, y aproximadamente un 7% tenían una cirrosis hepática y porcentajes similares tenían una hepatitis alcohólica o cambios de hepatitis crónica (Bruguera 1977).

5.2.1. Esteatosis

El depósito de vacuolas de grasa en el interior del hepatocito es la lesión hepática más frecuente y se observa en la mayoría de alcohólicos ya sea como lesión única ó acompañando a otras lesiones más graves (Popper et al 1981). La esteatosis aparece preferentemente en el área centrolobulillar, pero no es infrecuente que ocupe toda la extensión del lobulillo. Inicialmente se forman

pequeñas vacuolas rodeadas de una membrana que se unen progresivamente hasta formar una gran vacuola sin membrana, que ocupa todo el citoplasma y que desplaza el núcleo hacia la periferia. Cuando se rompen las células por la distensión provocada por la vesícula, se produce una respuesta inflamatoria con la participación de linfocitos, macrófagos y en ocasiones eosinófilos, constituyendo los lipogranulomas (Christoffersen P 1971). Estas lesiones se sitúan alrededor de la vena centrolobulillar y suelen desaparecer sin secuelas.

Clinicamente la esteatosis hepática aislada suele ser asintomática, y manifestarse únicamente por hepatomegalia blanda y no dolorosa, con mínima o nula perturbación de las pruebas de función hepática. Es habitual la elevación de la gammaglutamiltranspeptidasa y un ligero aumento de las transaminasas. Frecuentemente se asocia a otras lesiones hepáticas como fibrosis, hepatitis alcohólica ó cirrosis, y en estas ocasiones las manifestaciones clínicas observadas dependerán fundamentalmente de la enfermedad asociada y no del depósito graso. En casos excepcionales la esteatosis hepática es masiva y puede manifestarse como una insuficiencia hepatocelular grave.

La esteatosis sin otras lesiones asociadas, es un proceso benigno que por sí mismo carece de potencial evolutivo. La abstinencia de alcohol va acompañada en la mayoría de las ocasiones, de una desaparición del acúmulo de grasa en un plazo generalmente breve, entre 4 y 6 semanas.

5.2.2. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática alcohólica sin otras lesiones asociadas, no es una entidad clinicopatológica suficientemente reconocida. Sin embargo, en los últimos años se ha observado que existe un número creciente de pacientes alcohólicos que presentan como única manifestación histológica un aumento del contenido hepático de colágeno. Se había sugerido que la fibrosis resultaría del colapso de las zonas necrosadas tras una hepatitis alcohólica, pero en la actualidad se considera que es la consecuencia de un incremento de la actividad fibrogénica hepática (Scheuer 1980). Sin embargo lo más habitual es encontrar fibrosis o esclerosis alrededor de la vena central asociada a hepatitis alcohólica con presencia de necrosis celular, constituyendo el patrón morfológico descrito como necrosis hialina esclerosante centrolobulillar (Edmondson 1963). Cuando es muy intensa llega a ocluir las venas centrales y puede contribuir a la presencia de hipertensión portal.

La fibrosis hepática alcohólica tiene una mayor expresividad clínica que la esteatosis, pero, en general, menor que la hepatitis alcohólica. Muchos pacientes tienen hepatomegalia y trastornos generales inespecíficos. En la biología hay aumento discreto de las transaminasas. La evolución de la fibrosis hepática es poco conocida, pero se considera que la fibrosis pericelular y el engrosamiento de la pared de las venas hepáticas

terminales serían los principales trastornos morfológicos que podrían desempeñar un papel importante en la progresión a la cirrosis (Nakano 1982).

5.2.3. Hepatitis alcohólica

Aunque este término fue utilizado inicialmente para describir un síndrome clinicopatológico, su aplicación actual es más morfológica, ya que el espectro clínico es muy variable y va desde pacientes totalmente asintomáticos a enfermos con una grave insuficiencia hepatocelular con ascitis, ictericia y encefalopatía hepática (Parés et al. 1978). El patrón histológico de la hepatitis alcohólica comprende áreas de necrosis celular, generalmente de localización centrolobulillar con un infiltrado inflamatorio constituido por leucocitos polimorfonucleares. En las áreas de necrosis es característica la presencia de hepatocitos grandes con un citoplasma claro, en cuyo interior se observan acúmulos de material homogéneo, de contornos irregulares, de distribución generalmente perinuclear e intensamente eosinofílicos, que reciben el nombre de hialina alcohólica o cuerpos de Mallory, y que están constituidos por una agregación de fibrillas de naturaleza proteica (Popper et al. 1981). Habitualmente coexisten lesiones de esteatosis y de fibrosis portal y pericelular más o menos extensa.

Lesiones similares a las de la hepatitis alcohólica han sido encontradas en pacientes no alcohólicos que han sido sometidos a una derivación intestinal como medida

terapéutica para la obesidad extrema. También pueden observarse lesiones similares en pacientes diabéticos, en la enfermedad de Weber Christian, en pacientes tratados con maleato de perhexilina, en la enfermedad de Wilson, en la cirrosis infantil de la India y en la colestasis crónica (Popper et al. 1981).

La presentación clínica es muy variable y va desde casos totalmente asintomáticos a formas de insuficiencia hepática grave.

- Forma Común: Se caracteriza por un cuadro de malestar general, dolor en hipocondrio derecho, ictericia y fiebre. En la exploración física se halla una hepatomegalia dolorosa e ictericia y es frecuente que existan abundantes estigmas de hepatopatía crónica, particularmente arañas vasculares, y signos de malnutrición. Casi una cuarta parte de los pacientes tienen ascitis. En los exámenes biológicos es frecuente hallar una anemia y trombopenia y en más de la mitad de los casos hay una leucocitosis con neutrofilia. Suele haber una hiperbilirrubinemia conjugada y un incremento de las transaminasas que no se corresponde con la extensión de la necrosis celular, con predominio de GOT sobre GPT. La gammaglutamiltranspeptidasa suele estar muy elevada en casi todos los pacientes.

- Forma de hepatopatía crónica: Incluye pacientes con manifestaciones de hepatopatía crónica, particularmente aquellas que son consecuencia de una hipertensión portal

tales como ascitis o hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas. En estos casos es frecuente comprobar que los signos histológicos propios de la hepatitis alcohólica se asocian a un aumento del colágeno en las áreas centrolobulillares, hecho que explica la hipertensión portal, aún en ausencia de cirrosis hepática.

- Forma asintomática: Suele detectarse en pacientes que consultan por problemas extrahepáticos o que están ingresados en centros de deshabitación alcohólica, en quienes el hallazgo de una hepatomegalia o de una hipertransaminasemia induce a practicar una biopsia hepática con fines diagnósticos y en donde se observan los cambios morfológicos propios de la enfermedad.

Otras formas clínicas poco frecuentes son las de pacientes que presentan una hepatitis alcohólica y cursan con signos y síntomas de grave insuficiencia hepatocelular. En otras ocasiones, la hepatitis alcohólica se manifiesta con una colestasis muy intensa, de instauración brusca, simulando una etiología obstructiva.

La mortalidad inmediata de la hepatitis alcohólica oscila entre el 10 y el 25% de los casos y esta variabilidad viene determinada por la distinta gravedad de los pacientes incluidos en cada serie. La existencia de una hiperbilirrubinemia superior a 12 mg/dl, de encefalopatía hepática, insuficiencia renal y un tiempo de protrombina inferior al 50% son indicadores de mala evolución de la enfermedad, ya que la mayoría de pacientes con uno o más de estos trastornos fallecen en un corto periodo de

tiempo, por lo general durante su estancia hospitalaria (Parés et al 1978).

La hepatitis alcohólica es una lesión precirrótica (Galambos 1972) y algunos autores han considerado que sería el paso intermedio obligado para que los alcohólicos crónicos desarrollaran una cirrosis hepática. En la evolución de la hepatitis alcohólica influyen distintos factores, probablemente uno de los más importantes sea la abstinencia de etanol. En este sentido, existen claras diferencias en la evolución según que los pacientes observen o no una completa abstinencia. Una proporción considerable de enfermos con hepatitis alcohólica desarrolla una cirrosis en el curso de los meses siguientes al diagnóstico inicial, y esta proporción es mucho más importante cuando no se suspende la ingesta de alcohol. No obstante es importante conocer que los pacientes del sexo femenino también pueden desarrollar una cirrosis aunque se abstengan de beber, fenómeno que podría estar ligado a factores hormonales, menor volumen de agua corporal, y probablemente también a una mayor intensidad de la lesión hepática (Parés et al. 1986)

5.2.4. Cirrosis Alcohólica

La cirrosis alcohólica es la denominada tradicionalmente cirrosis micronodular o de Laennec. En ella el tamaño del hígado es variable, dependiendo de la extensión de la esteatosis, de la inflamación y de la fibro-

sis. En los estadios iniciales los nódulos son uniformes; de menos de 3 cm de diámetro, pero en los estadios finales el tamaño de los nódulos aumenta semejando una cirrosis macronodular como en las de etiología postnecrótica (Rubin 1973). La cirrosis micronodular se caracteriza por la presencia de nódulos de regeneración rodeados por bandas de tejido fibroso. Es difícil reconocer la presencia de venas centrales debido a las conexiones entre vasos aferentes y eferentes y a la neoformación vascular en los tractos fibrosos. Frecuentemente se observan grados variables de proliferación ductular y de inflamación con necrosis celular.

Se considera que la cirrosis es el estadio evolutivo final de las lesiones hepáticas inducidas por el alcohol y que la hepatitis alcohólica es una de las lesiones precursoras. Sin embargo, en estudios secuenciales de pacientes sometidos a varias biopsias hepáticas, se han descrito casos de cirrosis sin una fase previa de hepatitis alcohólica, por lo que debe considerarse la posibilidad de la progresión a la cirrosis desde una esteatosis con fibrosis perivenular, o bien desde la fibrosis hepática (Nakano 1982).

Desde un punto de vista clínico, la cirrosis hepática alcohólica presenta las mismas características clínicas que la cirrosis de otra etiología, aunque son más frecuentes las alteraciones ligadas al alcoholismo. En este sentido son más evidentes los signos de desnutrición e hipovitaminosis, la hipertrofia parotídea y la retrac-

ción palmar de Dupuytren, así como otras manifestaciones extrahepáticas del alcoholismo crónico, como polineuropatía, hipogonadismo, trastornos de la conducta o cuadros delirantes indicativos de un síndrome de abstinencia.

La evolución de la cirrosis alcohólica es variable, pero en general la supervivencia se ha relacionado con la prosecución o el abandono del consumo de alcohol. Los signos de mal pronóstico son el incremento de la ictericia en ausencia de una obstrucción extrahepática o de una hepatitis alcohólica, la presencia de ascitis refractaria al tratamiento diurético, la hemorragia digestiva por rotura de varices esofagogástricas y el desarrollo de una insuficiencia renal progresiva. De todas formas la cirrosis hepática compensada en un enfermo que no presenta episodios de hepatitis alcohólica tiene una supervivencia acumulada media relativamente prolongada que puede llegar a ser de casi 10 años (Ginés et al. 1987).

III. PARTE PRACTICA

1. PACIENTES Y METODOS

1.1. PACIENTES

El análisis del metabolismo hepático del etanol y la producción de acetaldehído se ha estudiado en 31 pacientes (28 hombres y tres mujeres) afectados de diversos tipos de hepatopatía. Veinticinco de estos pacientes eran alcohólicos crónicos, todos ellos habían consumido como mínimo 80 g de etanol puro al día durante un periodo de tiempo que superaba los 4 años. Los otros seis pacientes nunca habían consumido alcohol y tenían lesiones hepáticas debidas a otras etiologías.

Ninguno de los 31 pacientes en los que se analizó el metabolismo hepático del etanol habían recibido en los dos últimos meses ninguna medicación que potencialmente pudiera afectar el metabolismo del etanol.

El análisis de las actividades enzimáticas y de los isoenzimas de la ADH y ALDH hepáticas se ha efectuado en 84 pacientes. De ellos, 60 eran pacientes alcohólicos crónicos que cumplían los criterios de alcoholismo antes citados, y los 24 pacientes restantes eran enfermos portadores de una hepatopatía de origen no alcohólico. En 25 casos coincidió el análisis del metabolismo del etanol con la determinación de las actividades enzimáticas de la ADH y ALDH hepáticas.

1.2. ANÁLISIS DEL FUNCIONALISMO HEPÁTICO

1.2.1. Biología básica

Se efectuó en todos los enfermos de ambos protocolos. Consistió en la determinación sérica de la bilirrubina total y fracción conjugada, de las transaminasas glutámicooxalacética y glutamicopirúvica, la fosfatasa alcalina, la gammaglutamil transpeptidasa y las proteínas totales por autoanalizador. En todos los casos se efectuó un fraccionamiento electroforético de las proteínas séricas para cuantificar la concentración de albúmina y gamma-globulinas. También se determinó la tasa de protrombina por las técnicas habituales de laboratorio.

1.2.2. Prueba del aliento con aminopirina-C14

En 22 de los pacientes alcohólicos a los que se estudió el metabolismo del etanol, se efectuó además como prueba especial de función hepática la prueba del aliento con aminopirina-C14.

Esta prueba se realizó según el método descrito por Hepner y Vesell (1975). Se administró por vía oral 1.5 μCi de aminopirina-C14 (Amersham-Searle, Chicago, Illinois, USA) con una actividad específica de 11.1 mCi/mmol y con una pureza superior al 99%. Se recolectaron muestras del aire exhalado a la hora y a las dos horas a través de un filtro que contenía cloruro cálcico para extraer la humedad del aliento. El aire exhalado burbujeó en viales de centelleo que contienen dos ml de hiamina 1M y dos ml de etanol con unas gotas de timolftaleina como

indicador. La desaparición del color azul indica que han sido atrapados en el vial 2 mmol de CO₂. Dado que cada vial contiene una cantidad conocida de CO₂, la radiactividad de cada muestra se expresa en desintegraciones por minuto por mmol de CO₂.

La excreción acumulativa de ¹⁴C-CO₂ se calcula multiplicando la actividad específica del ¹⁴C-CO₂ de las muestras por la producción endógena de CO₂ (9 mmol/Kg/h). La concentración del ¹⁴C-CO₂ exhalado se expresó como el porcentaje de la dosis administrada eliminado a las dos horas.

Para eliminar la variabilidad del test causada por la deambulación o la comida los pacientes permanecieron en ayunas desde la noche anterior y en reposo durante la realización de la prueba. Esta prueba se realizó siempre 24 horas antes del estudio del metabolismo del etanol.

1.2.3. Prueba del verde de indocianina.

En 10 de los pacientes alcohólicos en los que se estudió el metabolismo hepático del etanol, se efectuó también la prueba del verde de indocianina. Estos pacientes fueron trasladados, estando en ayunas, al laboratorio de hemodinámica hepática. Bajo anestesia local se introdujo en la vena femoral derecha un introductor de catéteres a través del cual y bajo control fluoroscópico se guió un catéter balón 7F hasta la vena suprahepática principal derecha. Tras la medición de las presiones

suprahepáticas enclavada y libre, se inyectaron 0.25 mg/kg de peso de verde de indocianina (ICG) en solución con suero salino y albúmina por una vena periférica de un brazo. Inmediatamente después se añadió una infusión de verde de indocianina a una velocidad constante de 0.2 mg/min. Tras un período de equilibración de 40 minutos, se obtuvieron 4 nuevas muestras simultáneas de vena suprahepática y vena femoral a intervalos de 2 minutos. El plasma fue separado mediante centrifugación doble, y las concentraciones plasmáticas de ICG se midieron por espectrofotometría a 808 nm, utilizando el método de Nielssen para la corrección de la turbidez del plasma.

El aclaramiento plasmático (Cl) del ICG se calculó a partir del área debajo de la curva de las concentraciones plasmáticas de ICG en vena periférica extrapolada de cero a infinito (AUC) como:

$$Cl = \frac{\text{Dosis inyectada}}{\text{AUC}}$$

Con el método de la infusión continua, el aclaramiento plasmático de ICG se calculó como:

$$Cl = \frac{VI}{C_{vp}}$$

siendo VI la velocidad de infusión de ICG y C_{vp} el promedio de las concentraciones plasmáticas de ICG en vena periférica (femoral).

La extracción hepática (E) del ICG se calculó como:

$$E = \frac{C_{vp} - C_{sh}}{C_{vp}}$$

en la que C_{vp} y C_{sh} corresponden a los promedios de las concentraciones plasmáticas de ICG obtenidas en vena periférica y en vena suprahepática respectivamente.

El flujo plasmático hepático (FPH) se calculó según la siguiente fórmula:

$$FPH = \frac{CI}{E}$$

y el flujo sanguíneo hepático (FSH), dividiendo FPH por (1-hematocrito).

El aclaramiento intrínseco hepático (Cl_i) se calculó de acuerdo con el modelo sinusoidal como:

$$Cl_i = -FPH \cdot \ln(1-E)$$

1.3. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE OXIDACION HEPATICA DEL ETANOL

1.3.1. Administración aguda de etanol.

El análisis de la capacidad de oxidación hepática del etanol y producción de acetaldehído se efectuó en 31 pacientes según el procedimiento detallado a continuación.

El paciente permaneció en ayunas desde las 22 horas del día anterior a la práctica de la prueba. A la mañana siguiente, entre las 8 y 8.30 h se colocó un cateter central. Tras comprobar radiológicamente la correcta colocación del cateter se procedió a la obtención de

muestras de sangre en situación basal para determinar niveles de etanol, acetaldehído y otras cinco muestras para realizar una curva patrón para el análisis de los niveles de acetaldehído (vide infra). A través del cate-ter central, para evitar la aparición de flebitis, se perfundió una solución de etanol al 20%, diluido en suero salino, a dosis de 1 g de etanol por Kg de peso, en un tiempo de 30 minutos. Al finalizar la perfusión y poste-riormente cada hora, hasta pasadas seis horas, se extra-jo una muestra de sangre para la determinación de la concentración de etanol. Así mismo, al finalizar la per-fusión y a los 60, 120 y 180 min se extrajeron muestras de sangre para determinar las concentraciones de acetal-dehído.

1.3.2. Determinación de las concentraciones de etanol en plasma

a) Materiales:

Tubos Vacutainer de 5 ml con oxalato potásico y fluoruro sódico (Beckton-Dickinson, Ref. 6471-6N006).

Tubos de Eppendorf

Isopropanal para cromatografía (Merk Ref. 1040)

Etanol para cromatografía (Merk Ref. 11727)

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5790A, con detector de ionización de llama (FID)

Integrador Hewlett-Packard 3390A

b) Procedimiento:

Se extrae la sangre con jeringas de 5 ml, previamen-

te enfriadas y se deposita la muestra en un tubo Vacutainer de 5 ml que contiene oxalato potásico como anticoagulante y fluoruro sódico como conservante e inhibidor de los sistemas enzimáticos. La muestra se centrifuga a 3000 rpm y a 4°C durante 10 min.

Una vez centrifugado se deposita 0.5 ml del plasma en un tubo Eppendorf al que se añade 0.5 ml de una solución de Isopropanol a una concentración de 50 mg/dl. Se mezcla el contenido durante 10 seg en un mezclador y se procede a la cuantificación por cromatografía de gases.

La determinación del etanol se realiza en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5790A, con detector de ionización de llama, equipado con una columna 5% Carbowax, Carbopack B 60/80, de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo fueron: temperatura del horno 100°C, temperatura del inyector 120°C, temperatura del detector 140°C. El gas portador fue el nitrógeno a un flujo de 30 ml/min. Los tiempos de retención fueron de 0.94 min para el etanol y de 1.98 para el isopropanol.

Los cálculos de las concentraciones de etanol se realizan mediante la integración del área del pico cromatográfico del etanol respecto al área del pico cromatográfico del estándar interno (isopropanol), según la siguiente fórmula:

$$[\text{Etanol}] = \frac{\text{Área del etanol}}{\text{Área del isopropanol}} \times 0.5 \text{ [estándar interno]} \times Fr$$

Donde Fr (factor de respuesta) es el cociente de las áreas obtenidas al inyectar en el cromatógrafo una mezcla de etanol e isopropanal a la misma concentración (figura 3).

Se realizó antes de cada ensayo una curva de calibración de etanol a concentraciones de 25 mg/dl, 50 mg/dl, 100 mg/dl, 200 mg/dl y 400 mg/dl.

1.3.3. Cálculo de la capacidad oxidativa del etanol.

La capacidad hepática de eliminación del etanol se determinó en cada paciente según el método de Widmark, efectuando una representación de la relación entre las concentraciones de etanol y el tiempo. Se utilizaron todos los puntos a partir de los 60 min del final de la perfusión de etanol y con concentraciones de etanol por encima de 40 mg/100 ml.

La eliminación del etanol fue analizada siguiendo una cinética de orden cero, ya que la relación entre la concentración de etanol y el tiempo es lineal una vez se ha efectuado la distribución y a una concentración de etanol por encima de 40 mg/dl (figura 4).

La velocidad de eliminación del etanol de la sangre (VEE) se obtuvo a partir de un análisis de regresión lineal mediante el método de los cuadrados mínimos. La concentración de etanol en el tiempo 0 fue extrapolada a partir de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas. El volumen aparente de distribución del etanol

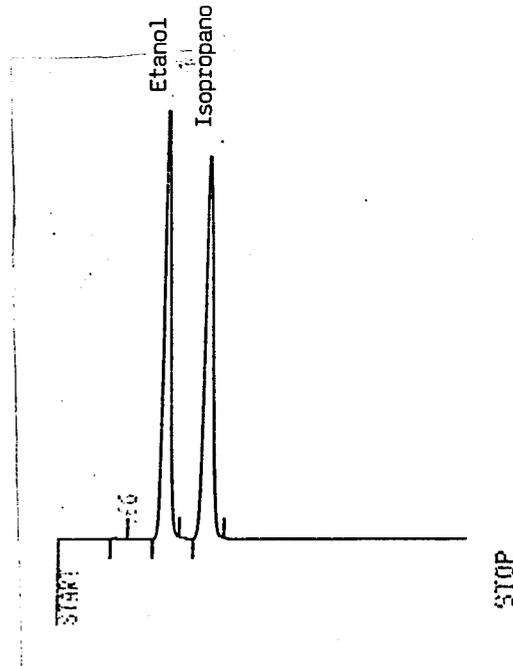


Figura 3.- Cromatograma obtenido tras la inyección de una mezcla de etanol e isopropanal a la misma concentración.

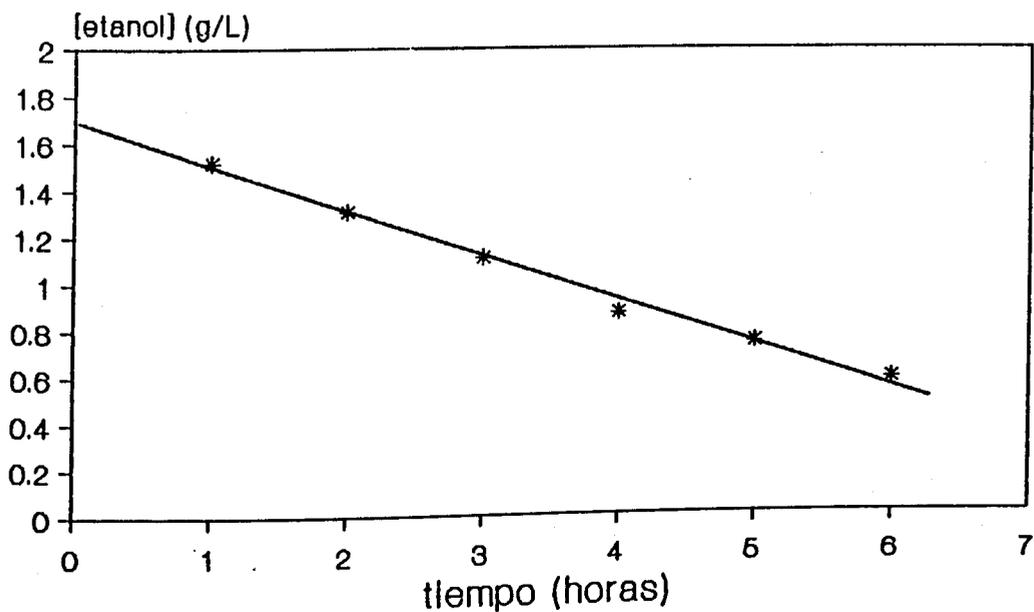


Figura 4.- Cálculo de la capacidad oxidativa del etanol en un paciente con esteatosis. La correlación entre concentración de etanol y tiempo fue de 0,996. La VEE fue de 190 ml/L/h.y la VME de 112 mg/Kg/h.

fue calculado dividiendo la dosis total de etanol administrada por la concentración en el tiempo 0 y expresado en litros. La velocidad de metabolización del etanol (VME) se obtuvo multiplicando la VEE por el volumen de distribución y dividiéndolo por el peso, expresándose en mg/Kg/h.

1.4. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ACETALDEHIDO EN PLASMA

En una primera fase del estudio se ensayaron diversos métodos descritos en la literatura a fin de determinar cual de ellos era el que permitía un análisis más reproducible, sin producción artefactual ni pérdida de acetaldehído en muestras de sangre que contenían etanol. En concreto los métodos estudiados fueron los siguientes:

1.-Método de DeMaster et al. (1983), que utiliza polietilenglicol (200 mg/ml de sangre) y azida sódica (0.65 mg/ml de sangre).

2.-Método de Christensen et al. (1981), que utiliza nitrito sódico (3 mg/ml de sangre) y ácido sulfosalicílico (20 mg/ml de sangre).

3.-Método de Von Wartbrug y Ris (1979), que utiliza hidrato de cloral (16.85 mg/ml de sangre) y ácido perclórico al 60 % (0.1 ml/ml de sangre).

4.-Método de Stowell (1979) que utiliza semicarbácida hidroclicórica (0.67 mg/ml de sangre) y ácido perclórico (60.3 mg/ml de sangre).

El primero de estos métodos fue el que demostró a lo

largo de los estudios reales y las pruebas de control realizadas una mayor fiabilidad, siendo eficaz tanto en la detención de la reacción de producción como en la de desaparición del acetaldehído y ha sido por tanto el método empleado en el presente trabajo.

a) Materiales

Polietilenglicol 6000, para síntesis (Merck).

Azida sódica para síntesis, 99% de pureza (Scharlau).

Cloruro sódico, calidad analítica, 99.5% de pureza (Merck).

Acetaldehído para síntesis, 99% de pureza (Merck).

Tubos de polipropileno de 3 ml con tapón de cierre hermético.

Viales de fondo cónico Sulpeco de 5 ml, con cierre hermético mediante rosca y séptum de teflon.

Jeringa Hamilton modelo 1002 LTN de 2.5 ml, con cuerpo de vidrio, émbolo con punta de teflon y aguja de acero inoxidable.

Cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5790A, equipado con detector de ionización de llama y una columna de vidrio (1.8 m de longitud y 2 mm de diámetro interno) empaquetada con Porapak Q de 80-100 mesh, con helio como gas portador.

Integrador-registrador Hewlett-Packard modelo 3390A.

b) Procedimiento

La solución de polietilenglicol-azida sódica se preparó dentro de las 24 horas previas a cada prueba. A

75 ml de agua destilada se añadieron 20 g de polietilenglicol-6000 y 65 mg de acida sódica, más 900 mg de cloruro sódico, cuya adición, se pudo comprobar, impide la lisis celular y permite obtener un sobrenadante más claro tras la cetrifugación de la sangre. Una vez disueltas completamente estas sustancias, el volumen de la solución se llevó hasta 100 ml mediante agua destilada. Se distribuyó 1 ml de la solución resultante en tubos de polipropileno, que hasta su inmediata utilización fueron guardados a +4°C.

La sangre fue recogida en jeringas de plástico estériles previamente enfriadas a 4°C, sin la presencia de ningún anticoagulante, ya que se comprobó que ciertos anticoagulantes pueden producir en los análisis cromatográficos picos interferentes. Se depositó 1 ml de sangre por tubo siendo este rápidamente cerrado, agitado y centrifugado a +4°C para separar células y precipitado de proteínas, y almacenado a +4°C hasta el momento de proceder a los análisis, que se efectuaron antes de las 4 horas de finalizada la total recogida de muestras.

En cada prueba se tomaron 5 puntos duplicados. El primero de ellos correspondiente a la muestra basal, antes de perfundir etanol, el segundo al momento de finalizar la perfusión, y los tres restantes a tiempos posteriores separados 60 min entre ellos. Previamente a la perfusión de etanol se recogieron además otros 5 tubos de sangre basal que fueron posteriormente utilizados para

la realización de la curva patrón para cuantificar el acetaldehído en aquella sangre.

El análisis de las muestras se realizó como sigue. En primer lugar, los viales de fondo cónico de 5 ml fueron tapados hermeticamente y colocados en el congelador, a temperatura inferior a 0°C, un mínimo de 15 min. Pasado este tiempo, se depositó en cada vial 100 µl de una solución de estandar interno consistente en éter dietílico an agua destilada a una concentración de 570 ng/100 µl (8 µl/l). Una vez colocado el estandar interno en los viales de fondo cónico estos fueron cerrados y de nuevo puestos en el congelador un tiempo mínimo de 10 min. Pasado este tiempo, se adicionó cuidadosamente a cada uno de ellos 1 ml de sobrenadante de los tubos con sangre centrifugados. Los viales fueron entonces inmediatamente cerrados, mezclado su contenido y colocados en un baño maría, que los cubría totalmente, a una temperatura de 60°C por un periodo de 15 min. Durante este tiempo de "incubación" el contenido de los viales fue sometido a agitación.

Seguidamente se retiró el vial y se procedió entonces a perforar el séptum mediante una jeringa de vidrio de 2.5 ml, también calentada a 60°C. La jeringa fue cargada y limpiada dos veces con la fase gaseosa del vial y finalmente cargada con dos ml de gas que fueron inmediatamente inyectados en el cromatógrafo.

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo fueron las siguientes: flujo de gas portador 30 ml, de aire 450

ml y de hidrógeno 40 ml. Programado de temperatura de 95°C hasta 170°C a 12°C/min, con temperatura de inyector de 150°C y de detector de 200°C. Una vez iniciado el programa de temperatura y simultáneamente conectado el integrador (tiempo 0), la inyección de la muestra se realizó a las 50 centésimas de minuto. En estas condiciones el tiempo de retención corregido es, para el acetaldehído de 1.75 min, y para el alcohol etílico y éter dietílico (estandar interno) de 2.73 y 5.06 min, respectivamente.

Para obtener la curva patrón, a fin de lograr una precisa cuantificación de los picos de acetaldehído para cada caso estudiado, se prepararon 250 ml de una solución inicial que contenía 440.5 mg de acetaldehído en agua destilada a +4°C, a partir de la cual se efectuó un banco de diluciones hasta conseguir una serie de soluciones conteniendo 17.62 ng/µl, 8.81 ng/µl, 4.405 ng/µl y 2.2025 ng/µl de acetaldehído en agua. Todo el proceso de diluciones se realizó con el disolvente (agua) previamente refrigerado, a fin de evitar pérdidas por volatilización de acetaldehído.

Seguidamente se procedió a resuspender, mediante agitación, el pellet de los 5 tubos de la curva patrón. Se depositó entonces en los mismos 10 µl de las soluciones de acetaldehído antes preparadas. El tubo que recibió 176.2 ng de acetaldehído corresponde al punto 4 µM, puesto que posee igualmente 1 ml de sangre; los

restantes son los puntos 2 μM (88.1 ng/ml), 1 μM (44.05 ng/ml) y 0.5 μM (22.05 ng/ml). El quinto tubo, 0 μM , se consiguió adicionando 10 μl de agua destilada. Los tubos fueron entonces refrigerados, centrifugados durante 10 minutos y refrigerados nuevamente. El procedimiento de análisis de los mismos fue, a partir de este momento, idéntico al descrito anteriormente.

La cuantificación del acetaldehído se realizó por medición de las alturas. La representación gráfica del cociente altura pico de acetaldehído/altura pico estandar interno frente a la concentración (en μM) de acetaldehído, permite trazar una recta de calibración que permite a su vez cuantificar aquellas muestras de la prueba de concentración desconocida. El límite de detección de la técnica así llevada a cabo está situado en 0.5 μM .

1.5. BIOPSIA HEPATICA

En cada paciente se practicó una ecografía para descartar la presencia de lesiones focales y localizar el punto más idóneo para efectuar la biopsia hepática. Esta se realizó con una aguja de Tru-cut.

El espécimen obtenido se dividió en dos partes. Dos tercios de la biopsia fueron fijados en formol para el posterior análisis histológico. El tercio restante, destinado al análisis de las actividades e isoenzimas de la ADH y ALDH, fue introducido inmediatamente tras la extracción en un tubo de propileno, transportado en nieve

carbónica y almacenado en a -70°C hasta el momento del análisis enzimático.

1.6. ANALISIS HISTOLOGICO

Tras la fijación del tejido hepático en formol al 4% el cilindro de biopsia fue incluido en parafina. Se efectuaron diversos cortes de 5 µm de grosor que se tiñeron con hematoxilina-eosina, reticulina y tricrómico de Masson.

Las alteraciones histológicas fueron evaluadas según los siguientes criterios:

1.- Hígado normal o con cambios mínimos: En los casos en que la arquitectura hepática se mantenía conservada y no existía acúmulo de grasa, fibrosis ni necrosis afectando a los lobulillos ni a los espacios porta.

2.- Esteatosis: Grados variables de acúmulo lipídico en el interior de los hepatocitos, con una arquitectura lobulillar conservada y sin aumento del depósito de colágeno ni necrosis.

3.- Fibrosis: Aumento del depósito de colágeno en los espacios porta o alrededor de las venas centrales, sin desestructuración de la arquitectura hepática ni signos de hepatitis alcohólica, independientemente de la presencia o no de esteatosis.

4.- Hepatitis Alcohólica: Existencia en el parénquima hepático de necrosis celular con infiltrado inflamatorio

constituido fundamentalmente por polinucleares. No fué necesaria para el diagnóstico de hepatitis alcohólica la presencia de hialina de Mallory.

5.- Cirrosis alcohólica: Existencia de una marcada desestructuración de la arquitectura hepática con formación de nódulos de regeneración rodeados por tractos fibrosos, sin cambios de hepatitis alcohólica.

6.- Cirrosis alcohólica asociada a lesiones de hepatitis alcohólica.

Los pacientes no alcohólicos fueron divididos, según el análisis histológico en dos grupos:

1.- Hepatitis crónica: Existencia de infiltrado inflamatorio en el interior de los espacios porta constituido por células mononucleares con afectación o no de la membrana limitante e independientemente de la afectación lobulillar.

2.- Cirrosis no alcohólica: Existencia de desestructuración de la arquitectura hepática con formación de nódulos de regeneración rodeados por tractos fibrosos, en pacientes no alcohólicos.

1.7. ANALISIS DE LAS ACTIVIDADES ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA HEPATICAS

Inicialmente se procedió a la homogenización de las muestras, utilizando los siguientes materiales y procedimiento:

a) Materiales:

El tampón de homogenización utilizado fue el Tris-HCl 20 mM pH 8.2 a temperatura ambiente.

Se empleó un homogenizador mecánico provisto de punta de teflón.

b) Procedimiento:

Se pesó la biopsia hepática, aun congelada, en un tubo de Eppendorf y se añadieron 5 μ l de tampón por mg de tejido. Una vez descongelada la muestra, se procedió a la homogenización durante 2 minutos y a 4°C.

Del homogenado se obtuvieron 10 μ l que se destinaron a la posterior realización de la electroforesis en gel de almidón. Al volumen restante se le añadieron 50 μ l del mismo tampón de homogenización volviéndose a homogenizar para conseguir una total uniformidad.

La actividad enzimática se determinó mediante espectrofotometría midiendo la cinética de aparición del NADH a 340 nm y a 25°C. El NAD⁺ y el NADH absorben fuertemente la luz en la zona del ultravioleta, cerca de los 260 nm. Cuando el NAD⁺ se reduce, aparece un nuevo máximo de absorción a 340 nm. Por ello, la aparición de la absorción a 340 nm se emplea para seguir el curso de las

reacciones catalizadas por las deshidrogenasas NAD-dependientes.

1.7.1. Actividades alcohol deshidrogenasa

a) Materiales

Tampón pH 10.5: Glicina-NaOH 0.1 M pH 10.5 a 25°C

Tampón pH 8.5: Na₄P₂O₇-H₃PO₄ 0.1 M pH 8.5 a 25°C

Tampón pH 7.0: NaH₂PO₄-NaOH 0.1 M pH 7.0 a 25°C

Etanol 1 M preparado a partir de etanol absoluto (Merk)

NAD⁺ 50 mg/ml (NAD⁺ grado III Sigma). Esta solución se preparó siempre el mismo día del ensayo enzimático.

Espectrofotómetro "Cary 219, Varian" termostatzado a 25.0±0.2°C.

b) Procedimiento

Al homogenado de la muestra de biopsia hepática se añadieron 10 µl de una solución conteniendo tampón y NAD⁺ para lograr una concentración final de NAD⁺ de 2.4 mM. Tras registrar la actividad "de fondo" se añadió seguidamente etanol para lograr una concentración final de 33 mM y se midió nuevamente la actividad. La actividad neta ADH es la diferencia entre la actividad con etanol 33 mM y la actividad "de fondo".

Se utilizaron cubetas de reacción de 1 ml con los siguientes volúmenes:

923.7 µl del tampón correspondiente según el pH

33.3 µl de NAD (50 mg/ml). Concentración final: 2.4 mM

10 µl de homogenado hepático

33 µl de etanol 1 M. Concentración final: 33 mM

La actividad enzimática se expresó en unidades enzimáticas por mg de proteína soluble. Dado que una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto durante la fase lineal de la reacción, en el presente estudio una unidad corresponde a una variación de concentración de NADH de 1 μmol por minuto.

Una vez determinada la concentración de proteína por ml de homogenado se puede expresar la actividad enzimática en unidades enzimáticas (U)/mg proteína soluble.

Se observó que la adición al tampón de Triton X-100 o bien rotenona 3 μM no cambiaron de forma sensible las actividades ADH.

1.7.2. Actividades aldehído deshidrogenasa

a) Materiales:

Tampón pirofosfato sódico-HCl 33 mM pH 8.5 a 25°C.

Solución de 4-metilpirazol 30 mM

Solución de NAD⁺ 50 mg/ml (NAD grado III Sigma)

Propanal recientemente destilado

Soluciones de propanal (400 mM y 20 mM) en tampón pirofosfato sódico 33 mM y pH 8.5 a 25°C

Espectrofotómetro "Cary 219 Varian"

b) Procedimiento

Se añadieron 15 μl del homogenado a una mezcla que contenía el tampón a pH 8.5 y NAD⁺ para lograr una concentración final de 1 mM. Se determinó la actividad "de fondo" y a continuación se añadió 4-metilpirazol, en

cantidad suficiente para lograr una concentración final de 1 mM. Finalmente se añadió propanal de manera que la concentración final fuera de 13.3 mM ó 68 μ M y se volvió entonces a registrar la actividad. La actividad neta de la ALDH es la diferencia entre la actividad con propanal 13.3 mM ó 68 μ M y la actividad de fondo.

Se observó que la adición al tampón de Triton X-100 al 1% o rotenona 3 μ M, no alteraron de forma sensible la actividad de la ALDH

Los volúmenes utilizados en cada cubeta de reacción (1ml) fueron los siguientes:

905.1 μ l de tampón de pirofosfato sódico 33 mM, pH 8.5

+
13.3 μ l de NAD (50 mg/ml). Concentración final 1 mM

15 μ l de homogenado

33.3 μ l de 4-metilpirazol. Concentración final 1 mM

33.3 μ l de propanal (400 mM para 13.3 mM y 2.04 mM para 68 μ M)

Las actividades se expresan en Unidades enzimáticas/mg proteína soluble.

La actividad ALDH estimada con propanal 13.3 mM refleja la actividad conjunta de los isoenzimas de alto y bajo Km, mientras que la actividad ALDH con propanal 68 μ M mide solo la actividad de la ALDH de bajo Km. La actividad ALDH de alto Km se calculó restando la actividad ALDH de bajo Km a la actividad ALDH total.

1.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SOLUBLES EN EL TEJIDO HEPATICO

Para referir las actividades ADH y ALDH hepáticas a la cantidad de proteína presente en el tejido hepático se determinó la concentración de proteína soluble en el homogenado hepático por el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

1.9. ANALISIS DE LOS ISOENZIMAS DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA HEPATICAS

Los isoenzimas de la ADH y ALDH hepáticas se estudiaron mediante electroforesis de alto voltaje en gel de almidón.

a) Materiales:

Almidón (Sigma)

NAD⁺ (Grado AA1, Sigma)

PMS (Fenacina Metosulfato) (Sigma)

NBT (Nitro Blue Tetrazolium) (Sigma)

Tampón pirofosfato sódico 50 mM pH 8.5

Tris-HCl 0.3 M pH 8.2 a temperatura ambiente (a 4°C el pH será de 8.6)

Aparato de electroforesis LKB 2117 Multiphor

Refrigerador "Savant Instruments Inc"

Instrumento para cortar el gel "Buchler Instruments"

Fuente de alimentación LKB 2197

b) Procedimiento

- Preparación del gel. La composición del gel fue la

siguiente: 13% almidón, Tris-HCl 20 mM, NAD 0.7 mM, pH 8.2 a temperatura ambiente. Las dimensiones del gel son 3x120x240 mm.

En un vaso de precipitados se vertieron 26 g de almidón, 0.48 g de Tris y 0.098 de NAD⁺ disolviéndose en 180 ml de agua destilada. El pH se ajustó a temperatura ambiente a 8.2 con HCl 0.1 M. La solución se calentó hasta presentar un aspecto líquido y transparente, vertiéndose posteriormente en el molde de 3x120x240 mm.

- Aplicación de las muestras. Se realizaron 6 hendiduras en la porción central del gel, separadas entre sí por 1 cm. Se aplicaron entonces 10 µl del homogenado inicial (dilución peso muestra/tampón = 1/5), a papeles Whatman de 3x8 mm, los cuales fueron introducidos en las hendiduras.

- Condiciones de la electroforesis de alto voltaje. Se llenó cada cubeta de los electrodos con Tris-HCl 0.3 M pH 8.2, enfriado a 4°C. Además en la cubeta del cátodo se añadieron 200 mg de NAD⁺ grado AA1 (Sigma). Se conectó el gel de almidón con las cubetas mediante papel Whatman de dimensiones 110x250 mm. Se cubrió el gel con una lámina de plástico y se aplicó el sistema refrigerante (a 4°C) en las dos caras del gel. Se aplicaron 720 Volt a una intensidad de 35-40 mA. La duración total de la electroforesis fue de 6-7 horas y las condiciones limitantes fueron 720 V, 60 mA, 60 W.

- Tinción del gel. El método de tinción fue por activi-

dad, específica para las deshidrogenasas NAD^+ dependientes. El NAD^+ presente en la tinción se transforma en $\text{NADH} + \text{H}^+$ por acción enzimática. El poder reductor generado en esta reacción se acopla con el NBT, que es un aceptor de electrones. La sal de tetrazolium es reducida a su respectivo formazan, sustancia de color azul oscuro e insoluble. El PMS es un transportador de electrones que acopla la reacción de la deshidrogenasa con la reducción de la sal de tetrazolium.

Las bandas que aparecen en el gel revelan las zonas que contienen los isoenzimas responsables de la reducción del NAD^+ . Si se añade etanol o pentanol como sustrato se revelan los isoenzimas de la ADH, mientras que si se añade propanal como sustrato se muestran los isoenzimas de la ALDH.

Una vez completada la electroforesis el gel es dividido longitudinalmente en dos láminas, una de ellas se tiñe con pentanol, mientras que de la otra lámina, la parte anódica se tiñe con propanal y la parte catódica con etanol. La solución de tinción consiste en tampón pirofosfato sódico 50 mM, pH 8.5, NAD^+ 0.57 mM, NBT 0.23 mM, PMS 0.07 mM, piruvato sódico 11 mM y el correspondiente sustrato.

La metodología utilizada se detalla a continuación.

Tinción con Propanal:

En 250 ml de tampón de pirofosfato sódico 50 mM pH

8.5 a temperatura ambiente, se disolvieron 2 ml de propional (concentración final de 0.11 M). Una vez disuelto se volvió a ajustar el pH. A continuación se disolvieron en el siguiente orden:

+
100 mg NAD (grado AA1)

50 mg NBT

5 mg PMS

300 mg piruvato

Este volumen se vertió en una cubeta que contenía la parte anódica de una lámina de gel. La cubeta se incubó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad por un tiempo de 60 a 90 min.

Tinción con Pentanol y Etanol

En 500 ml de tampón de pirofosfato sódico 50 mM pH 8.5 a 45°C se disolvieron en el siguiente orden:

+
200 mg NAD (grado AA1)

100 mg NBT

10 mg PMS

600 mg piruvato (inhibe la aparición de la lactato deshidrogenasa)

Los 500 ml de la solución de tinción se dividieron en dos volúmenes de 250 ml. Un volumen de 250 se vertió en una cubeta que contenía la parte catódica de una lámina de gel y se añadieron 2 ml de etanol (concentración final de 0.14 M). Los restantes 250 ml se vertieron en una cubeta que contenía toda una lámina del gel y se añadió 1 ml de pentanol (concentración final de 0.04 M). Las dos cubetas se colocaron en un baño metabólico a 45°C

y en condiciones de oscuridad. El tiempo de tinción fue de 15 a 30 min.

La tinción con etanol permite observar los isoenzimas de la ADH de las clases I y II.

La tinción con pentanol permite observar los isoenzimas de la ADH de las clases I, II y III.

La tinción con propanal permite visualizar los isoenzimas de la ALDH.

1.10. ANALISIS ESTADISTICO

Para la comparación de dos proporciones se utilizó el método de la X^2 , tablas de 2×2 en el caso de comparación entre dos grupos, con la corrección de Yates si alguno de los efectivos calculados fuese inferior a 5 y el test de Fisher si alguno de los efectivos calculados fuese inferior a 3.

Las diferencias en las variables cuantitativas entre los distintos grupos histopatológicos se evaluaron mediante el análisis de la varianza, y se utilizó el test de Student-Neuman-Keuls para las comparaciones múltiples.

En la comparación de dos medias se comprobó primero su distribución normal mediante el test de Kolgomorov y la igualdad de variancias mediante el coeficiente de Snedecor. Si no se cumplían las condiciones de la ley de Student-Fisher se empleó el test de Mann-Whitney para datos independientes.

El estudio de la relación entre dos variables cuan-

titativas se realizó mediante el cálculo del coeficiente de regresión lineal.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estandar de la media. Se han considerado significativos los valores de $p < 0.05$.

2. RESULTADOS

2.1. METABOLISMO HEPATICO DEL ETANOL.

2.1.1. Influencia de la lesión hepática sobre el metabolismo del etanol

Según el análisis histológico de la biopsia hepática, los pacientes alcohólicos fueron divididos en cinco grupos. Cuatro casos (16%) tenían un hígado histológicamente normal o con cambios mínimos, cuatro (16%) una esteatosis, cuatro (16%) una fibrosis, siete (28%) una hepatitis alcohólica y los seis restantes (24%) una cirrosis alcohólica. De los seis pacientes no alcohólicos cuatro padecían una cirrosis criptogenética, uno una cirrosis biliar primaria y otro una hepatitis crónica activa.

En la Tabla 1 se expresan los resultados del consumo de etanol y función hepática de los cinco grupos de pacientes alcohólicos y de los no alcohólicos. No existieron diferencias en la edad, consumo diario de etanol ni duración del alcoholismo entre los grupos de pacientes alcohólicos. Todos ellos eran varones a excepción de tres casos, una paciente con hepatitis alcohólica, otra con cirrosis alcohólica y una tercera con hígado histológicamente normal. Se observó una mayor alteración de las pruebas de función hepática en los pacientes alcohólicos que sufrían lesiones hepáticas más severas como hepatitis alcohólica o cirrosis. Estos pacientes mostraron un aumento de los niveles de bilirrubina sérica y de gammaglobulina, y una disminución de la concentración de albúmina

Tabla 1. Análisis de la función hepática según el diagnóstico histológico de los enfermos alcohólicos y no alcohólicos en los que se estudió el metabolismo hepático del etanol.

Diagnóstico Histológico	Normal ó cambios mínimos	Esteatosis	Fibrosis	Hepatitis Alcohólica	Cirrosis Alcohólica	Cirrosis No Alcohólica
n	4	4	4	7	6	6
edad (años)	41.2 ± 15.2	41.2 ± 4.2	50.2 ± 14.5	46.0 ± 9.1	42.0 ± 9.8	50.6 ± 15.4
sexo (V/H)	3 / 1	4 / 0	4 / 0	6 / 1	5 / 1	6 / 0
etanol (g/día)	130 ± 62	150 ± 40	182 ± 79	184 ± 92	163 ± 69	0 ± 0
duración enol (a.)	20 ± 13	17 ± 6	20 ± 5	20 ± 9	16 ± 7	0 ± 0
Bilirrubina (mg/dl)	0.6 ± 0.3	1.5 ± 1.6	1.3 ± 0.5	3.2 ± 3.0	4.9 ± 4.6	1.6 ± 0.5
GOT U/L	30 ± 10	40 ± 14	41 ± 10	74 ± 33	58 ± 21	62 ± 13
GPT U/L	26 ± 15	35 ± 16	40 ± 16	51 ± 30	42 ± 11	88 ± 34
Fosfatasa Alc (U/L)	159 ± 28	150 ± 45	333 ± 121	382 ± 161	288 ± 87	315 ± 158
γ-GT (U/L)	62 ± 8	138 ± 126	288 ± 215	634 ± 313	252 ± 156	140 ± 155
Prot. Total (g/L)	71 ± 3	63 ± 8	64 ± 3	74 ± 9	77 ± 6	69 ± 9
Albúmina (g/L)	42 ± 3	38 ± 7	34 ± 4	36 ± 3	34 ± 5	33 ± 6
γ-globulina (g/L)	9 ± 3	8 ± 3	12 ± 4	17 ± 8	24 ± 7	17 ± 5
T. Protrombina (%)	92 ± 9	98 ± 2	85 ± 11	73 ± 15	63 ± 22	79 ± 14
T. Aminopirina (%)	5.9 ± 1.6	4.1 ± 1.8	4.0 ± 2.9	1.8 ± 0.7	1.1 ± 1.6	3.3 ± 2.2

Tabla 2. Metabolismo hepático del etanol. Influencia de la lesión hepática.

Diagnóstico Histológico	Normal ó cambios mínimos	Esteatosis	Fibrosis	Hepatitis Alcohólica	Cirrosis Alcohólica	Cirrosis No Alcohólica
n	4	4	4	7	6	6
VEE (mg/L/h)	224 ± 52	202 ± 41	188 ± 40	171 ± 47	165 ± 33	129 ± 16
VME (mg/kg/h)	119 ± 23	124 ± 18	122 ± 15	102 ± 14	108 ± 10	90 ± 9
Co etanol (g/l)	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1
Pico acetaldehído (μg/l)	1.4 ± 2.2	1.7 ± 1.8	1.7 ± 1.9	0.5 ± 0.6	1.3 ± 1.6	0 ± 0

VEE: Velocidad de eliminación del etanol. VME: Velocidad de metabolización del etanol. Co etanol: [etanol] en tiempo 0

Las diferencias entre los subgrupos de pacientes se detallan en el texto.

y del tiempo de protrombina en comparación con los pacientes alcohólicos con un hígado histológicamente normal, con esteatosis o con fibrosis.

En la Tabla 2 se expresan los resultados del metabolismo del etanol en los cinco grupos de pacientes alcohólicos y en los pacientes no alcohólicos. En los individuos alcohólicos la VEE osciló entre 114 mg/l/h y 294 mg/l/h y la VME entre 89 mg/Kg/h y 150 mg/Kg/h. En los pacientes no alcohólicos la VEE osciló entre 108 mg/l/h y 152 mg/l/h y la VME entre 80 mg/Kg/h y 98 mg/Kg/h. La VEE fue significativamente más elevada en los pacientes alcohólicos que en los no alcohólicos (185.6 ± 44.5 mg/l/h vs 129.0 ± 16.1 mg/l/h, $p < 0.01$). Así mismo, se observaron diferencias significativas en la VME entre los individuos alcohólicos y los no alcohólicos (113.0 ± 16.9 mg/Kg/h vs 90.5 ± 8.9 mg/Kg/h, $p < 0.01$) (figura 5).

Al comparar individuos alcohólicos y no alcohólicos con lesiones histológicas de las mismas características, es decir, pacientes con cirrosis de origen alcohólico y pacientes con cirrosis no alcohólica se observó que los primeros presentaban una VEE y VME significativamente superior que los últimos (VEE 165 ± 33 mg/l/h vs 129 ± 16 mg/l/h, $p < 0.03$; VME 108 ± 10 mg/Kg/h vs 90.5 ± 9 mg/Kg/h, $p < 0.01$).

En los pacientes alcohólicos la VEE fue descendiendo de manera progresiva a medida que aumentó la severidad de la lesión histológica. La VME tuvo un comportamiento similar (figura 6). Si bien las diferencias en la VEE y

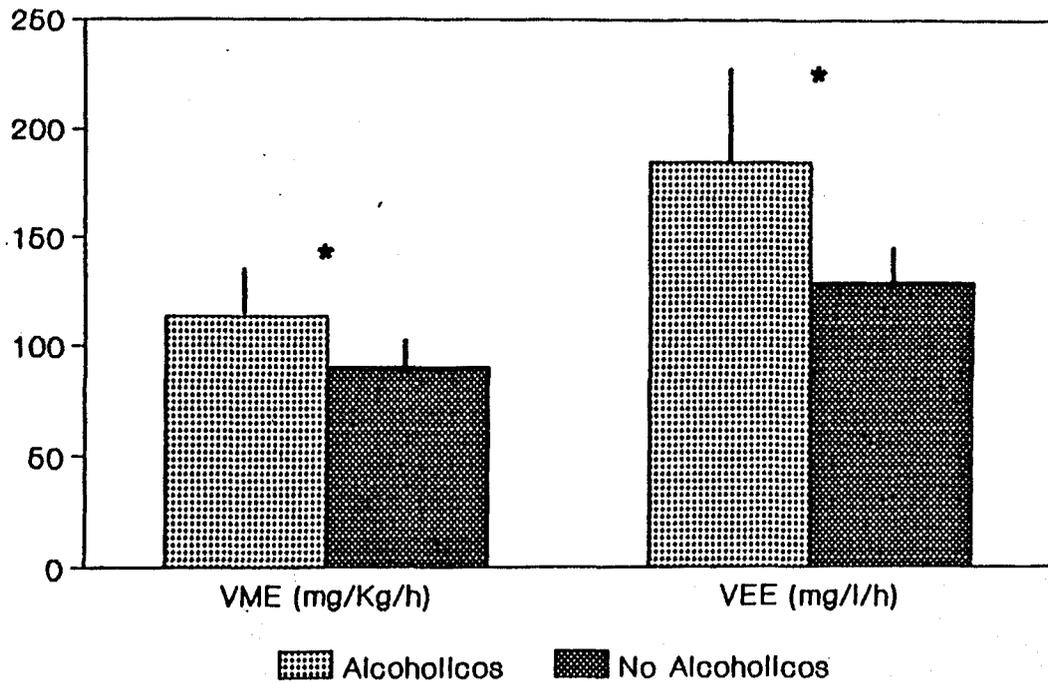


Figura 5. Velocidad de metabolización del etanol (VME) y velocidad de eliminación del etanol (VEE) en los pacientes alcohólicos y no alcohólicos. (* $p < 0.01$).

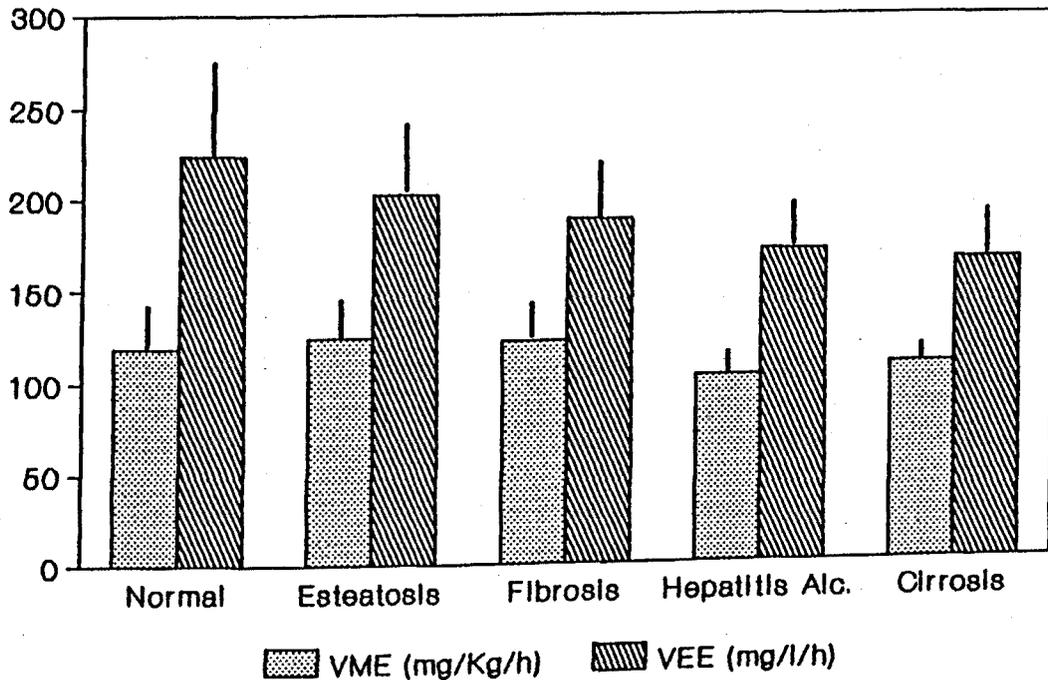


Figura 6. Velocidad de metabolización del etanol (VME) y velocidad de eliminación del etanol (VEE) en los pacientes alcohólicos crónicos según el tipo de lesión hepática.

la VME entre los cinco grupos de pacientes alcohólicos no alcanzaron significación estadística, tanto la VEE como la VME fueron significativamente superiores en los pacientes con lesiones hepáticas poco graves (hígado normal, esteatosis o fibrosis) con respecto a los otros pacientes portadores de lesiones hepáticas de mayor severidad (hepatitis alcohólica o cirrosis) (VEE 204.3 ± 32.5 mg/l/h vs 168.2 ± 28.0 mg/l/h, $p < 0.02$; VME 121.8 ± 17.5 mg/Kg/h vs 104.9 ± 12.4 mg/Kg/h, $p < 0.01$).

2.1.2. Influencia del grado de función hepática sobre el metabolismo del etanol

2.1.2.1. Prueba de la aminopirina

La prueba del aliento con aminopirina marcada con ^{14}C estuvo más alterada cuanto mayor fue la severidad de la lesión hepática (tabla 1). La excreción de ^{14}C por el aliento tras la administración de aminopirina ^{14}C fue significativamente más elevada en los pacientes con hígado normal (5.8 ± 1.6 %) ó esteatosis (4.1 ± 0.8 %) que en los enfermos con hepatitis alcohólica (1.8 ± 0.7 %)($p < 0.002$ vs hígado normal, $p < 0.004$ vs esteatosis) o cirrosis (1.1 ± 1.6 %)($p < 0.002$ vs hígado normal, $p < 0.03$ vs esteatosis) (tabla 1). Además la prueba del aliento con aminopirina se correlacionó con otros parámetros de función hepática; se observó una correlación lineal directa entre esta prueba y el tiempo de protrombina ($r=0.58$, $p < 0.01$) y con la concentración sérica de albúmina ($r=0.50$, $p < 0.05$), y una correlación inversa significativa entre la prueba

de la aminopirina y los niveles de bilirrubina ($r=-0.52$, $p<0.05$) y la concentración sérica de gammaglobulinas ($r=-0.65$, $p<0.001$).

El metabolismo hepático del etanol se relacionó con la el estado funcional del hígado, estimado mediante la prueba de la aminopirina. Se observó una relación lineal altamente significativa entre la VME y la prueba de la aminopirina ($r=0.70$, $p<0.001$) (figura 7), así como entre dicha prueba y la VEE ($r=0.60$, $p<0.01$).

2.1.2.2. Prueba del verde de indocianina.

La eliminación del etanol resultó independiente del flujo sanguíneo hepático. La VME no se correlacionó con el flujo sanguíneo hepático total ($r=-0.56$, $p:N.S.$) ni con el flujo sanguíneo hepático por Kg de peso ($r=-0.34$, $p:N.S.$) (figura 8).

En cambio, se comprobó de nuevo una relación entre el grado de función hepática y la eliminación del etanol. El aclaramiento hepático del verde de indocianina se correlacionó de manera directa y significativa con la VME ($r=0.64$, $p<0.05$) (figura 9). Así mismo, el aclaramiento hepático intrínseco del verde de indocianina, estimación que obvia la posible variabilidad en el aclaramiento de esta sustancia que podría depender del flujo sanguíneo hepático, se correlacionó también de manera directa y significativa con la VME ($r=0.76$, $p<0.01$) (figura 10).

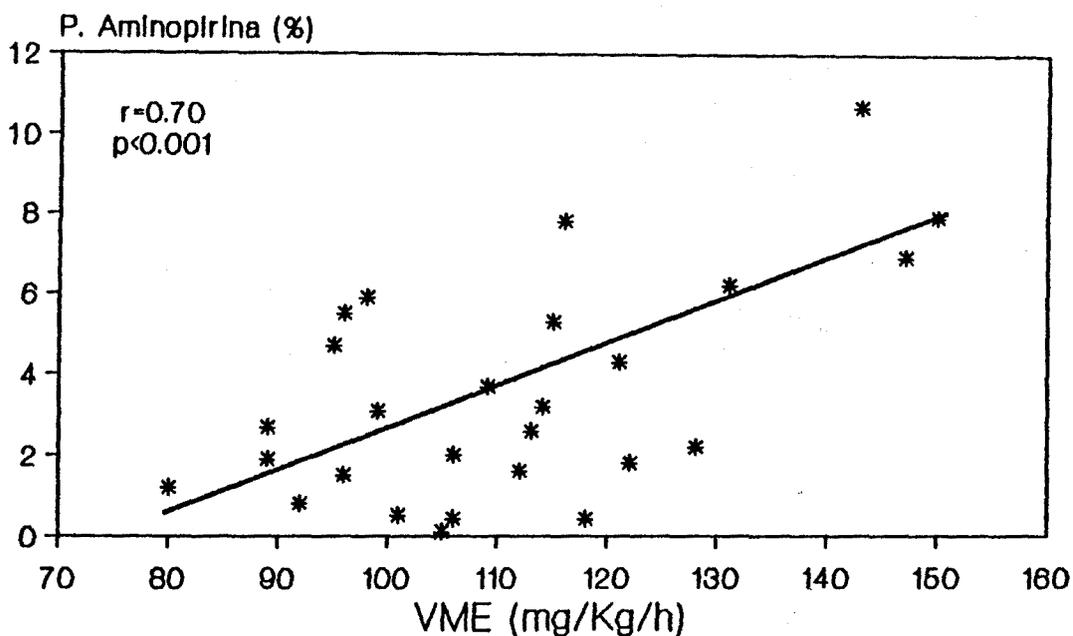


Figura 7. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y el grado de funcionalismo hepático medido según la prueba de la aminopirina.

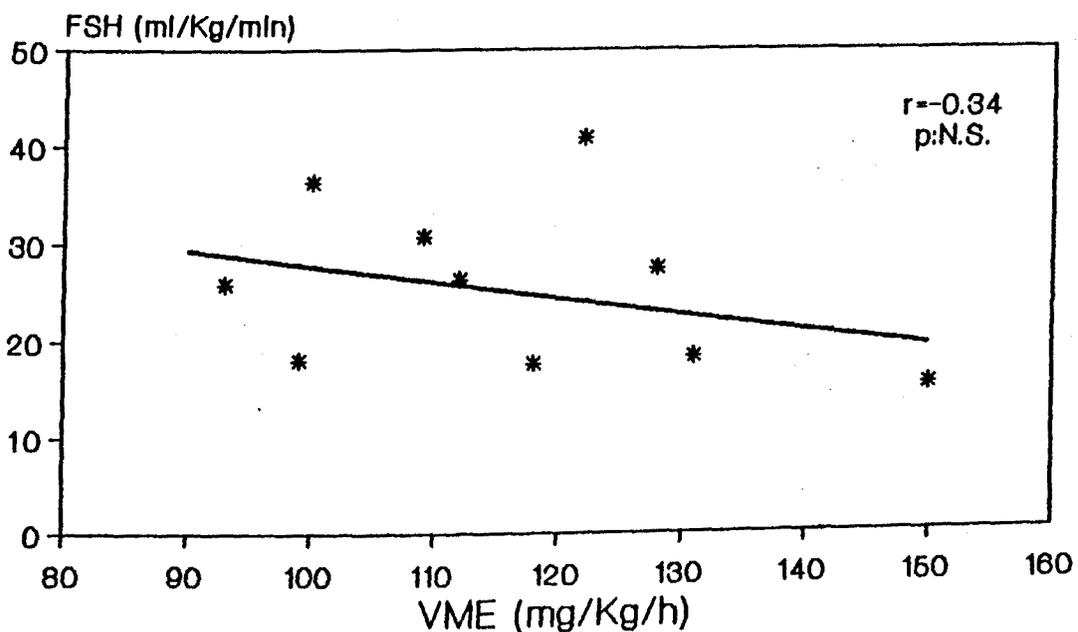


Figura 8. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y el flujo sanguíneo hepático medido mediante la prueba del verde de indocianina.

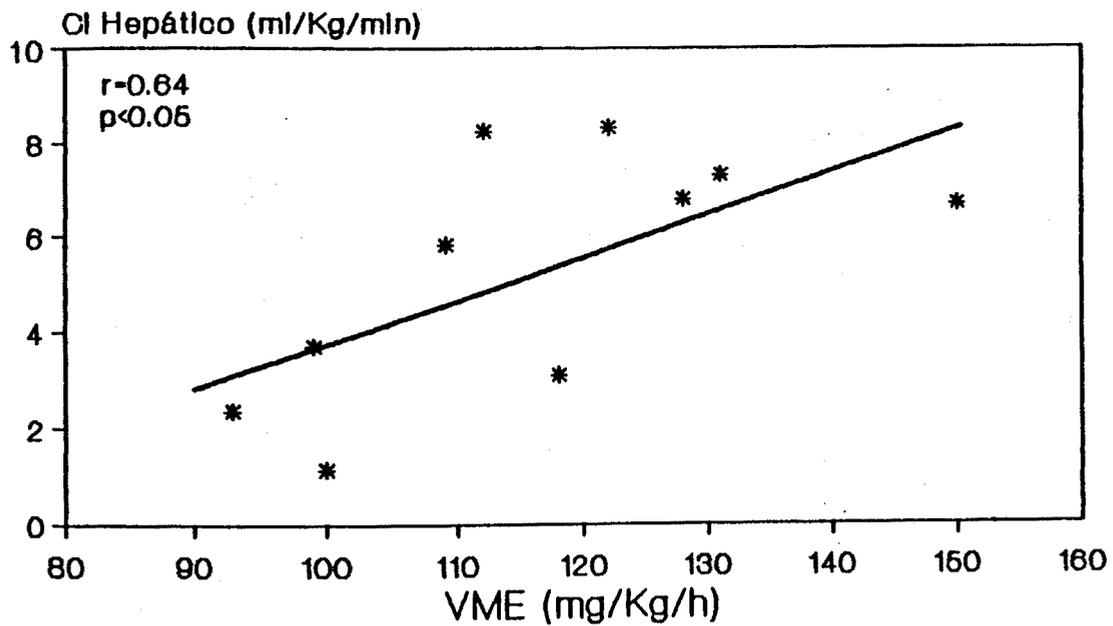


Figura 9. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y el funcionalismo hepático medido mediante el aclaramiento hepático de verde de indocianina.

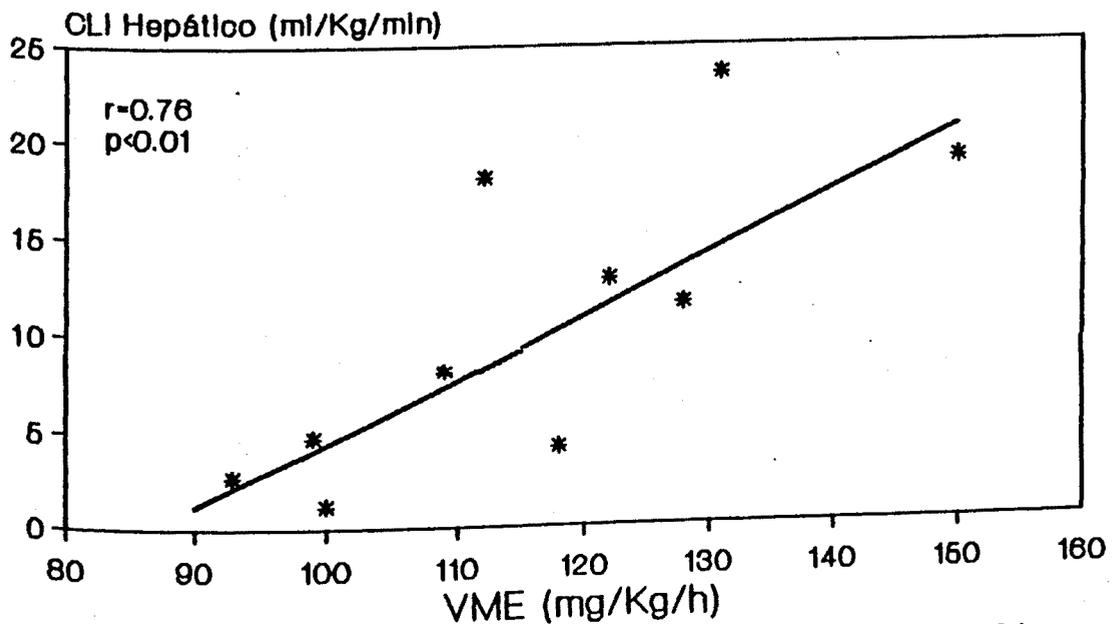


Figura 10. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y el aclaramiento hepático intrínseco de verde de indocianina.

2.1.3. Influencia de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa sobre el metabolismo del etanol

En la Tabla 3 se expresan las actividades ADH en el tejido hepático a diversos pH, desde un pH similar al del interior del hepatocito (pH 7), al de máxima actividad de este enzima (pH 10.5), así como las actividades ALDH de alta y baja Km, de los pacientes en los que se estudió la capacidad para metabolizar el etanol.

Se observó un progresivo descenso de las actividades ADH y ALDH de baja Km a medida que la lesión hepática fue más grave, aunque estas diferencias solo alcanzaron significación estadística entre los alcohólicos con hígado normal y los pacientes con cirrosis alcohólica en el caso de la ADH ($p < 0.05$) y entre estos últimos y los pacientes con hígado normal ($p < 0.04$) ó esteatosis ($p < 0.05$) en el caso de la ALDH de baja Km. La actividad ALDH de alta Km fue similar en todos los grupos de pacientes.

A pesar de que las actividades ADH y ALDH de baja Km fueron más bajas en los pacientes con una menor capacidad oxidativa del etanol, no existió una relación directa significativa entre la actividad ADH y la VEE ($r = 0.27$, $p : N.S.$) ó la VME ($r = 0.10$, $p : N.S.$) (figura 11). La actividad ALDH de baja Km no se correlacionó con la VEE ($r = 0.35$, $p : N.S.$) ni con la VME ($r = 0.32$, $p : N.S.$) (figura 12). La actividad ALDH de alta Km no guardó tampoco ninguna relación con la VEE ($r = 0.07$, $p : N.S.$) ni con la VME ($r = 0.21$, $p : N.S.$).

Tabla 3. Actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en el tejido hepático según la histología, en los pacientes en los que se estudió el metabolismo hepático del etanol.

Diagnóstico Histológico	Normal ó cambios mínimos	Esteatosis	Fibrosis	Hepatitis Alcohólica §	Cirrosis Alcohólica §	Cirrosis No Alcohólica
n	4	4	4	7	6	6
ADH pH 7	16.0 ± 16.9	8.5 ± 3.6	8.8 ± 4.1	6.8 ± 6.7	3.4 ± 2.6	7.0 ± 2.4
ADH pH 8.5	26.6 ± 14.1	15.1 ± 2.8	13.0 ± 5.8	20.0 ± 24.4	10.0 ± 12.3	14.4 ± 5.0
ADH pH 10.5	43.4 ± 23.1	29.6 ± 12.7	32.0 ± 20.6	24.0 ± 13.7	12.0 ± 11.7	27.0 ± 5.5
ALDH 13.3 mM	12.9 ± 10.4	19.0 ± 3.0	9.3 ± 11.0	16.1 ± 6.1	7.3 ± 5.5	4.2 ± 2.2
ALDH 68 pH	3.75 ± 1.74	4.23 ± 2.30	2.13 ± 1.97	2.16 ± 1.17	0.96 ± 1.46	1.60 ± 0.84

§ Está incluido 1 enfermo con ADH "atípica".

Las actividades enzimáticas se expresan como mU/mg proteína hepática.

Las diferencias entre los subgrupos de pacientes se detallan en el texto.

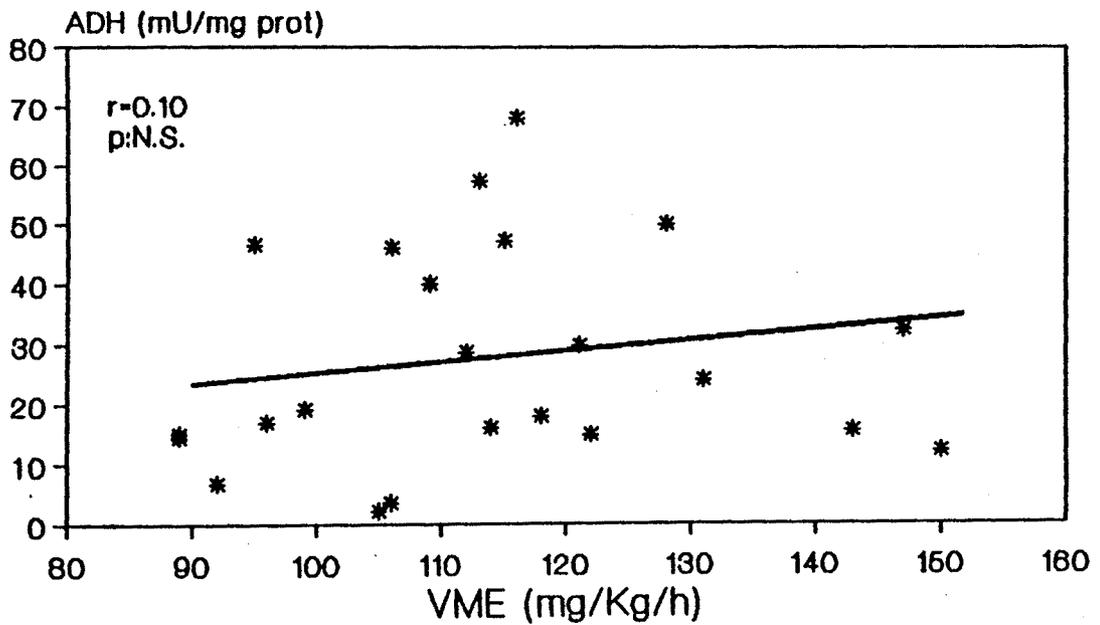


Figura 11. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y la actividad alcohol deshidrogenasa del tejido hepático.

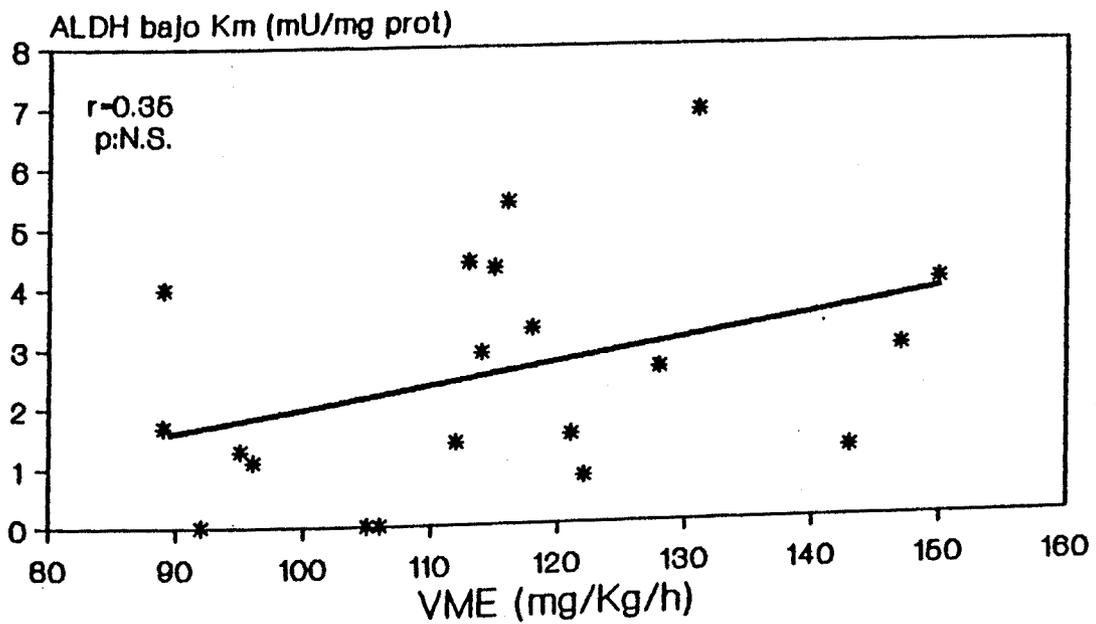


Figura 12. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y la actividad aldehído deshidrogenasa de baja Km en el tejido hepático.

Dos de los individuos alcohólicos en los que se estudió el metabolismo hepático del etanol, poseían la variante "atípica" de la ADH. La VEE de estos dos individuos (165 mg/l/h y 228 mg/l/h) fue similar a la del resto de pacientes alcohólicos (185.6±8.9 mg/l/h, rango 114 mg/l/h-294 mg/l/h). Así mismo la VME de estos dos casos (118 mg/Kg/h y 128 mg/Kg/h) no difirió del resto de casos (113.0±3.4 mg/Kg/h, rango 108 mg/Kg/h-152 mg/Kg/h).

2.2. NIVELES PLASMATICOS DE ACETALDEHIDO

Los niveles plasmáticos de acetaldehído en condiciones basales, fueron indetectables en los 31 pacientes estudiados.

Tras la infusión de etanol se detectaron incrementos de los niveles de acetaldehído en 14 de los pacientes alcohólicos (56%). Estos niveles oscilaron entre concentraciones de 0.7 a 4.7 µM. En ninguno de los seis pacientes no alcohólicos se detectó acetaldehído en sangre periférica tras la administración de etanol.

En la Tabla 4 se detallan las características clínicas, datos de función hepática, capacidad de oxidación del etanol y actividades ADH y ALDH de los 14 pacientes alcohólicos que presentaron un incremento de los niveles plasmáticos de acetaldehído tras la infusión de etanol y de los 11 pacientes alcohólicos en los que no se detectó acetaldehído en sangre.

El incremento máximo de acetaldehído en los pacientes alcohólicos se produjo generalmente en las primeras

Tabla 4. Características clínicas, metabolismo hepático del etanol y actividades de los sistemas oxidativos en los enfermos alcohólicos con y sin acetaldehído en plasma.

	Incremento acetaldehído	No inc. acetaldehído	p
n	14	11	
edad	45.2 ± 11.5	42.9 ± 9.2	N. S.
consumo etanol (g/día)	150 ± 63	182 ± 78	N. S.
duración consumo (años)	18.2 ± 9.4	19.4 ± 6.5	N. S.
Bilirrubina (mg/dl)	2.1 ± 2.6	3.3 ± 3.5	N. S.
Albumina (g/l)	37.2 ± 5.1	35.9 ± 4.9	N. S.
Protrombina (%)	84 ± 18	75 ± 19	N. S.
P. Aminopirina (%)	4.0 ± 3.1	2.8 ± 2.1	N. S.
VEE (mg/L/h)	201.1 ± 43.4	165.8 ± 39.2	<0.05
VME (mg/Kg/h)	120.1 ± 17.4	104.0 ± 11.8	<0.02
ADH pH 7	8.6 ± 4.8	8.0 ± 11.4	N. S.
ADH pH 10.5	28.9 ± 16.4	25.1 ± 20.4	N. S.
ALDH 13.3 mM	15.3 ± 5.9	11.3 ± 9.1	N. S.
ALDH 68 µM	3.08 ± 1.86	1.75 ± 1.80	N. S.

Las actividades enzimáticas se expresan como mU/mg proteína hepática.

horas tras el inicio de la perfusión de alcohol, cuando las concentraciones de etanol eran más elevadas.

2.2.1. Relación de los niveles plasmáticos de acetaldehído con el grado de lesión hepática

Se detectó acetaldehído en sangre tras la infusión de etanol en dos de los cuatro individuos alcohólicos con hígado normal, en tres de los cuatro pacientes con esteatosis, en tres de los cuatro pacientes con fibrosis, en tres de los siete pacientes con hepatitis alcohólica y en tres de los seis pacientes con cirrosis, sin que existan entre estas proporciones diferencias estadísticamente significativas (figura 13). Además, la media de los incrementos de acetaldehído fué similar en los diversos grupos de pacientes alcohólicos (tabla 2).

Al comparar a los pacientes alcohólicos con y sin incremento en los niveles plasmáticos de acetaldehído, no se observaron diferencias en la edad, duración e intensidad del consumo de alcohol, ni en los parámetros de función hepática (tabla 4).

2.2.2. Influencia de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa sobre los niveles plasmáticos de acetaldehído

La actividad ADH hepática fue similar en los individuos alcohólicos con y sin incremento de los niveles de acetaldehído (28.9 ± 4.7 mU/mg prot vs 25.1 ± 6.15 mU mg/prot, p:N.S.). Aunque, paradójicamente, las actividades ALDH fueron algo superiores en los pacientes al-

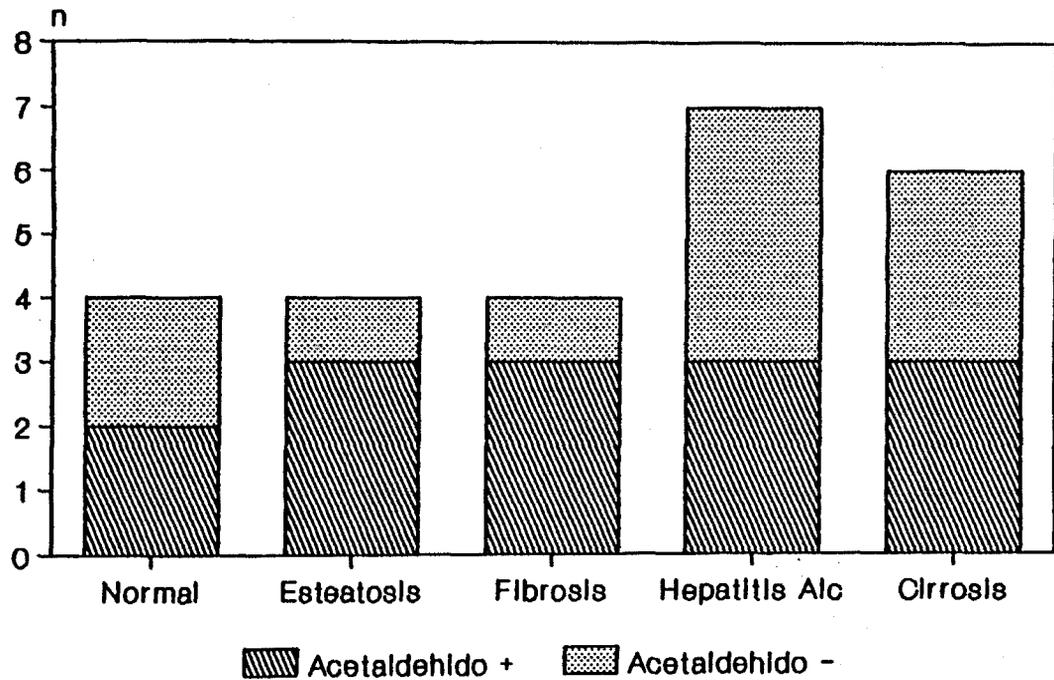


Figura 13. Proporción de pacientes con alcoholismo crónico que presentaron, tras la infusión de etanol, niveles de acetaldehído detectables en sangre periférica, divididos según el tipo de lesión hepática.

cohólicos con incremento de los niveles de acetaldehído respecto a los alcohólicos con acetaldehído indetectable, estas diferencias no alcanzaron significación estadística ni para la actividad ALDH de alta Km (15.33±5.94 mU/mg prot vs 11.30±9.10 mU/mg prot, p:N.S.) ni para la actividad ALDH de baja Km (3.08±1.86 mU/mg prot vs 1.75±1.80 mU/mg prot, p:N.S.).

Los niveles plasmáticos de acetaldehído tras la administración de etanol no se correlacionaron con la actividad ADH ($r=0.006$, p:N.S.) (figura 14), ALDH de alta Km ($r=0.12$, p:N.S.) ni ALDH de baja Km ($r=0.28$, p:N.S.) (figura 15).

2.2.3. Influencia de la capacidad oxidativa del etanol sobre los niveles plasmáticos de acetaldehído

La única diferencia observada entre los alcohólicos con incremento de los niveles plasmáticos de acetaldehído y aquellos otros en los que no se detectó acetaldehído tras la administración de etanol, fué la capacidad de uno y otro grupo para oxidar el etanol. En efecto, se hallaron marcadas diferencias entre ambos grupos tanto en la VEE (201.1±43.4 mg/l/h vs 165.8±39.1 mg/l/h, $p<0.05$) como en la VME (120.1±17.4 mg/Kg/h vs 104.0±11.7 mg/Kg/h, $p<0.02$) (figura 16).

Además existió una correlación lineal directa significativa entre el pico máximo de acetaldehído y la VME ($r=0.48$, $p<0.02$) (figura 17).

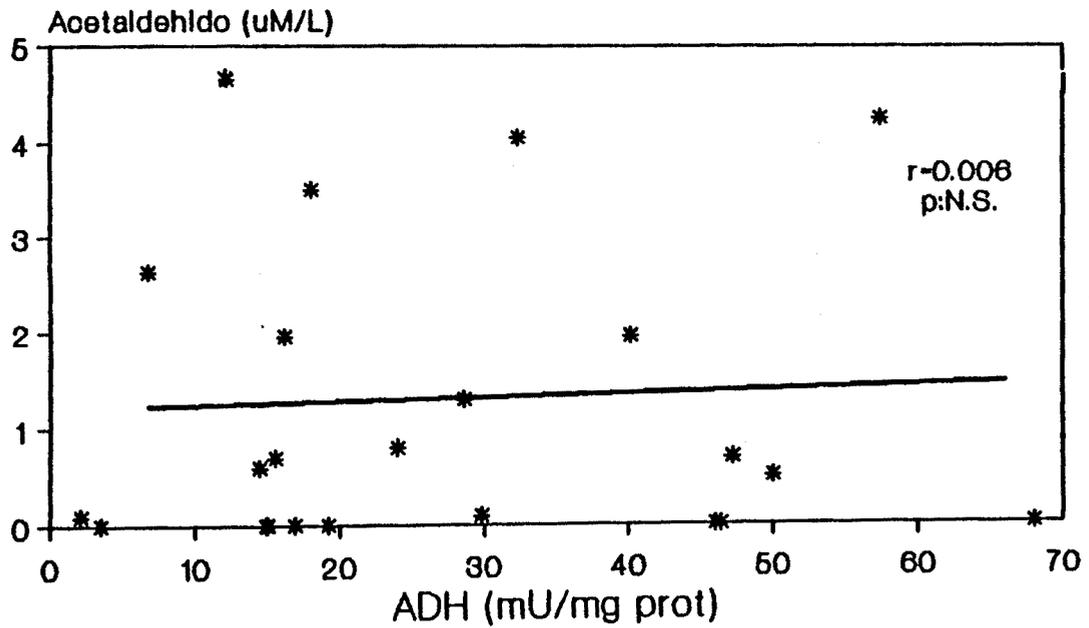


Figura 14. Correlación entre la actividad alcohol deshidrogenasa en el tejido hepático y los niveles plasmáticos de acetaldehído tras la infusión de etanol.

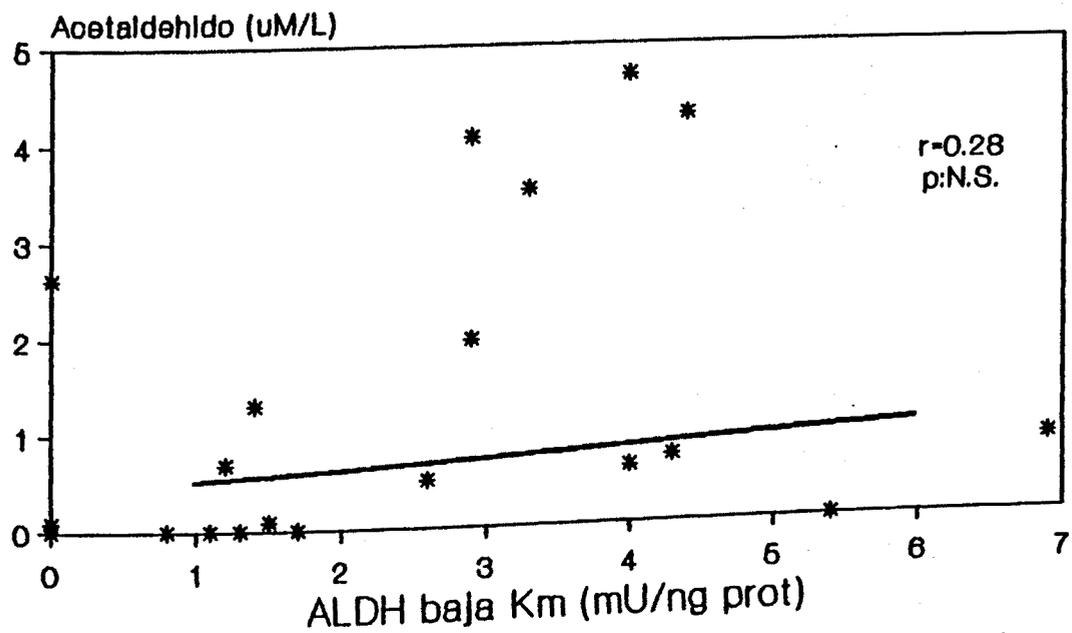


Figura 15. Correlación entre la actividad aldehído deshidrogenasa del tejido hepático y los niveles plasmáticos de acetaldehído tras la infusión de etanol.

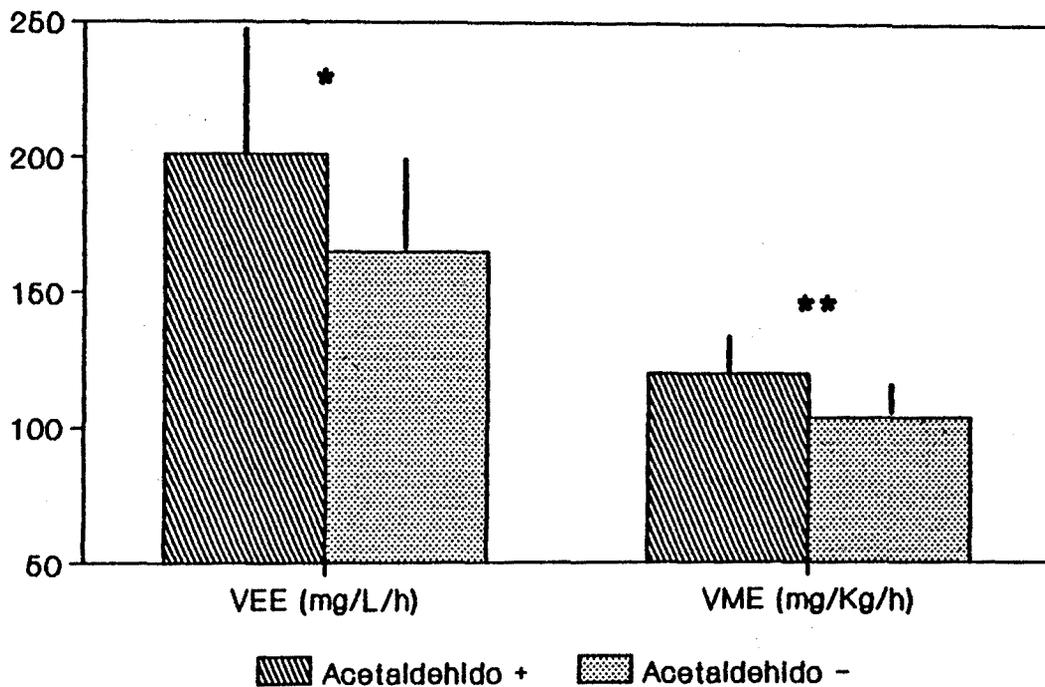


Figura 16. Velocidad de eliminación del etanol (VEE) y velocidad de metabolización del etanol (VME) de los pacientes alcohólicos crónicos según los niveles de acetaldehído tras la administración de etanol. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

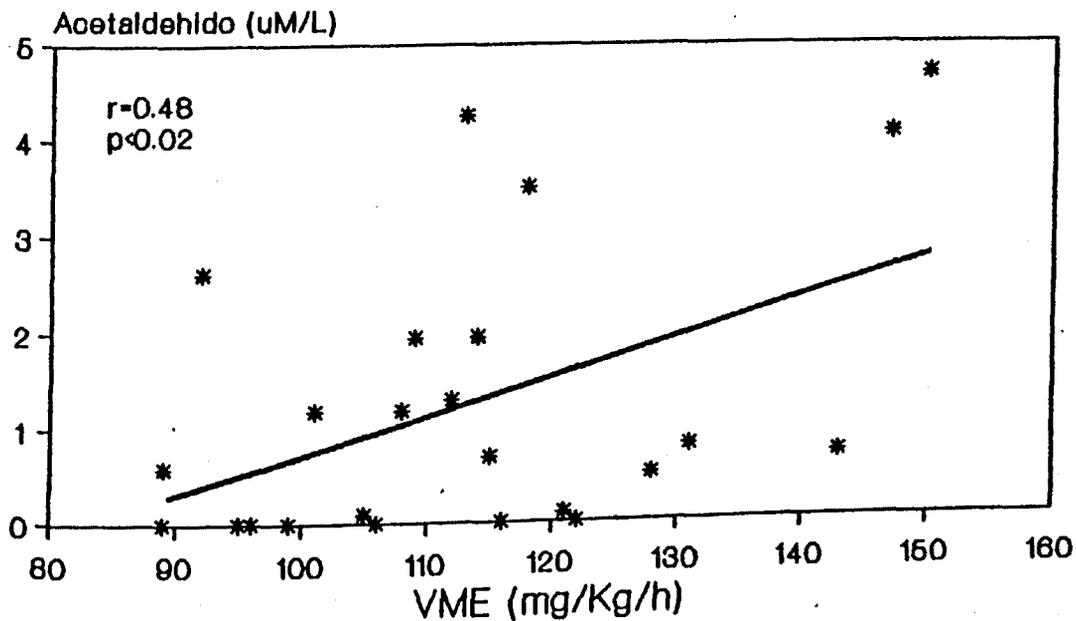


Figura 17. Correlación entre la velocidad de metabolización del etanol y los niveles plasmáticos de acetaldehído tras la infusión de etanol.

2.3. ACTIVIDADES ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA HEPATICAS

Las actividades de los enzimas ADH y ALDH se han estudiado en 84 pacientes, de ellos 60 eran individuos alcohólicos y los 24 restantes enfermos portadores de una hepatopatía de origen no alcohólico. De los 60 alcohólicos cinco (8.3%) tenían una histología hepática normal o con cambios mínimos, nueve (15%) una esteatosis, nueve (15%) una fibrosis, 11 (18.3%) una hepatitis alcohólica, 19 (31.7%) una cirrosis alcohólica y siete (11.7%) una cirrosis asociada a hepatitis alcohólica. De los 24 pacientes no alcohólicos 14 (58.4%) tenían una hepatitis crónica y 10 (41.6%) una cirrosis no alcohólica (tabla 5).

No se observaron diferencias significativas en la edad, sexo, ingesta diaria de etanol y duración del alcoholismo entre los diferentes grupos de pacientes alcohólicos, aunque la edad de los pacientes con cirrosis fue algo superior a la del resto. Las pruebas de función hepática presentaron una progresiva alteración a medida que aumentó la severidad de la lesión hepática (tabla 5). Los pacientes con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica mostraron unos niveles de bilirrubina significativamente más elevados que los pacientes con esteatosis ($p < 0.01$), fibrosis ($p < 0.02$) y cirrosis ($p < 0.04$). La concentración sérica de albúmina fue superior en los individuos con hígado normal que en los pacientes con fibrosis ($p < 0.02$) o con hepatitis alcohólica ($p < 0.006$). El tiempo

Tabla 5. Características clínicas y bioquímicas de los distintos grupos de pacientes

Diagnóstico Histológico	Normal ó cambios mín.	Esteatosis	Fibrosis	Hepatitis Alcohólica	Cirrosis Alcohólica	Cirrosis y Hep. Alcohólica	Hepatitis Crónica	Cirrosis No Alc.
n	5	9	9	11	19	7	14	10
edad (años)	41.2 ± 15.7	39.6 ± 12.7	50.4 ± 13.7	49.7 ± 9.4	51.5 ± 13.7	51.1 ± 7.4	45.3 ± 13.4	50.7 ± 14
sexo (V/H)	4 / 1	7 / 2	6 / 1	9 / 2	16 / 3	6 / 1	10 / 4	8 / 2
consumo alc. (g/día)	126 ± 54	167 ± 75	177 ± 70	189 ± 103	165 ± 93	155 ± 73	-	-
duración (años)	19 ± 11	17 ± 12	20 ± 8	23 ± 4	24 ± 12	22 ± 11	-	-
Bilirrubina (mg/dl)	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.4	2.4 ± 2.6	2.2 ± 2.2	5.3 ± 5.2	2.6 ± 5.2	1.1 ± 0.6
Albúmina (g/L)	42.7 ± 3.4	36.4 ± 7.8	37.4 ± 3.2	35.6 ± 3.7	34.5 ± 7.9	35.1 ± 6.1	39.9 ± 6.9	39.8 ± 6.1
Protrombina (Z)	93 ± 8.8	94 ± 8.9	86 ± 8	78 ± 13	64 ± 13	59 ± 11	94 ± 10	86 ± 12
GOT U/L	32 ± 10	49 ± 34	40 ± 8	91 ± 53	53 ± 28	64 ± 31	102 ± 89	97 ± 107
GPT U/L	29 ± 15	51 ± 39	38 ± 15	55 ± 35	44 ± 36	47 ± 28	156 ± 128	142 ± 133
γGT U/L	68 ± 13	130 ± 104	169 ± 135	631 ± 300	126 ± 117	192 ± 57	184 ± 178	113 ± 123

de protrombina fué significativamente inferior en los pacientes con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica que en los individuos con hígado normal ($p < 0.001$), esteatosis ($p < 0.001$), fibrosis ($p < 0.001$), hepatitis alcohólica ($p < 0.01$) ó cirrosis no alcohólica ($p < 0.001$), así mismo, los enfermos con cirrosis alcohólica (sin hepatitis alcohólica asociada) presentaron un tiempo de protrombina inferior al de los enfermos con un hígado normal ($p < 0.01$), esteatosis ($p < 0.01$), fibrosis ($p < 0.01$), hepatitis alcohólica ($p < 0.01$) o cirrosis no alcohólica ($p < 0.01$) (tabla 5).

2.3.1. Actividad alcohol deshidrogenasa hepática

Para el análisis de la actividad ADH hepática se excluyeron 6 enfermos (7.1%), cuatro alcohólicos y dos no alcohólicos con la isoenzima "atípica", ya que posee una actividad muy superior al resto de isoenzimas.

Los resultados de la actividad ADH hepática se resumen en la Tabla 6. La mayor actividad enzimática se detectó a pH 10.5, y la menor a pH 7. En ningún caso se detectó una actividad a pH 7 superior a la actividad a pH 10.5, característica específica de la isoenzima "Indianápolis". El comportamiento de las tres estimaciones de la actividad ADH (pH 10.5, pH 8.5 y pH 7) en relación a la severidad de las lesiones hepáticas fue paralelo.

La actividad ADH resultó significativamente diferente entre los distintos grupos histológicos ($F=4.16$, $p=0.0007$) (figura 18).

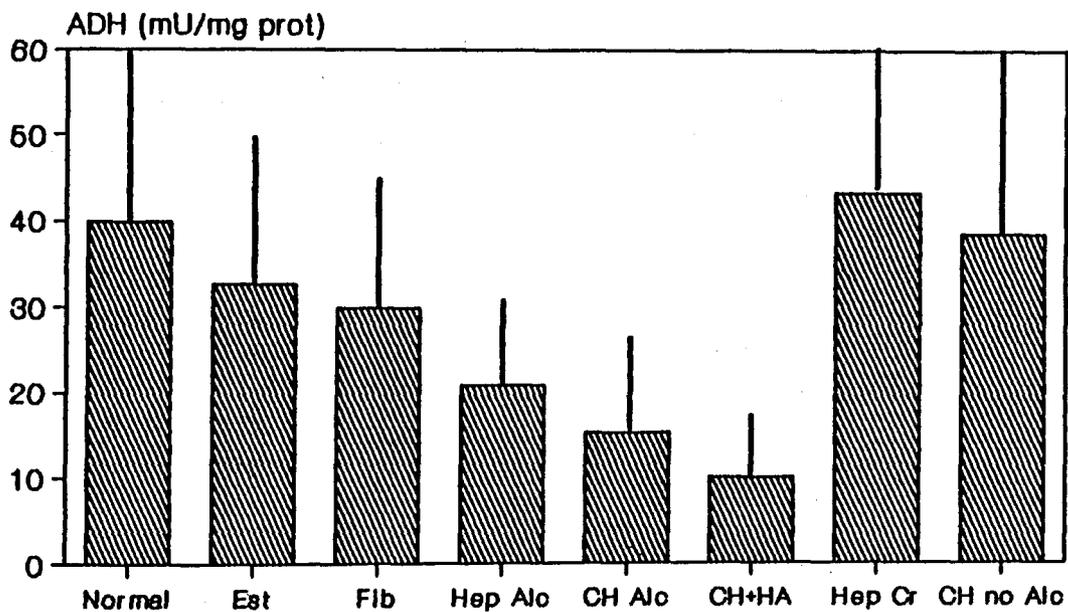


Figura 18. Actividad alcohol deshidrogenasa en el tejido hepático, en pacientes alcohólicos y no alcohólicos, según el tipo de lesión hepática.

Al analizar únicamente los distintos subgrupos de pacientes alcohólicos la actividad ADH resultó ser también significativamente diferente entre ellos ($F=4.80$, $p=0.001$). La actividad de la ADH disminuyó de forma progresiva a medida que aumentó la severidad de la lesión hepática. Así los pacientes alcohólicos con hígado normal presentaron una actividad ADH significativamente más elevada que los pacientes con hepatitis alcohólica ($p<0.05$), cirrosis alcohólica ($p<0.01$) o bien cirrosis asociada a hepatitis alcohólica ($p<0.01$) según el test de Student-Neuman-Keuls (tabla 6).

A diferencia de los pacientes alcohólicos, en los individuos no alcohólicos la actividad ADH no guardó relación con el grado de lesión histológica. Los pacientes con hepatitis crónica presentaron una actividad muy similar a la de los pacientes con cirrosis de origen no alcohólico (tabla 7).

Las diferencias entre los subgrupos de pacientes alcohólicos y no alcohólicos en las actividades ADH a pH 7 y pH 8.5 fueron similares a las observadas a pH 10.5 (tablas 6 y 7).

Al comparar individuos alcohólicos y no alcohólicos con similar grado de lesión hepática, se observó que la actividad ADH fue significativamente superior en los pacientes con cirrosis no alcohólica que en los enfermos alcohólicos con cirrosis ($p<0.01$) ó con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica ($p<0.01$). Así mismo, los pacientes alcohólicos con fibrosis tenían una actividad ADH infe-

Tabla 6. Actividad alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en el tejido hepático de los enfermos alcohólicos según el tipo de lesión hepática.

Diagnóstico Histológico	Normal ó cambios mínimos	Esteatosis	Fibrosis	Hepatitis Alcohólica §	Cirrosis Alcohólica §	Cirrosis y Hepatitis Alcohólica
n	5	9	9	11	19	7
ADH pH 7	14.7 ± 14.9	10.4 ± 9.5	7.4 ± 2.9	4.4 ± 1.2	3.7 ± 2.1	2.1 ± 1.8
ADH pH 8.5	25.5 ± 12.5	16.3 ± 9.5	13.5 ± 4.8	10.7 ± 4.6	8.7 ± 7.9	3.9 ± 2.3
ADH pH 10.5	39.9 ± 21.5	32.6 ± 18.8	29.8 ± 14.9	20.8 ± 11.2	15.2 ± 12.2	10.0 ± 7.6
ALDH 13.3 mM	17.1 ± 11.8	17.5 ± 3.4	13.6 ± 6.9	18.7 ± 5.9	11.1 ± 9.6	7.9 ± 3.7
ALDH 68 pH	4.38 ± 2.06	4.08 ± 1.39	2.28 ± 1.42	2.37 ± 1.49	1.88 ± 1.97	1.24 ± 1.38
Proteínas tisulares (mg prot/g tejido)	97 ± 10	79 ± 6	75 ± 3	80 ± 6	69 ± 7	57 ± 5

§ Para el análisis de las actividades ADH se han excluido dos individuos con el fenotipo "atípico"

Las actividades enzimáticas se expresan como mU/mg proteína hepática.

Las diferencias entre los subgrupos de pacientes se detallan en el texto.

Tabla 7. Actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en el tejido hepático de los pacientes no alcohólicos

Diagnóstico Histológico	Hepatitis Crónica §	Cirrosis no alcohólica §
n	14	10
ADH pH 7	10.3 ± 8.9	9.7 ± 8.2
ADH pH 8.5	32.0 ± 49.8	21.9 ± 23.3
ADH pH 10.5	43.3 ± 30.5	36.4 ± 25.8
ALDH 13.3 mM	19.7 ± 11.1	11.9 ± 12.5
ALDH 68 μM	3.89 ± 3.54	2.14 ± 2.14
Proteínas tisulares (mg prot/g tejido)	76 ± 19	70 ± 24

§ Para en análisis de las actividades alcohol deshidrogenasa se ha excluido un paciente con ADH "atípica"

Las actividades enzimáticas se expresan como mU/mg proteína hepática.

Las diferencias entre los subgrupos de pacientes se detallan en el texto.

rior a la de los pacientes no alcohólicos con hepatitis crónica, si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística.

La actividad ADH hepática se correlacionó con los parámetros de función hepática. Se observó una relación directa significativa de la actividad ADH con la albúmina sérica ($r=0.29$, $p<0.01$) y el tiempo de protrombina ($r=0.46$, $p<0.001$) y una relación inversa significativa con la bilirubina sérica ($r=-0.44$, $p<0.001$). Al analizar estas correlaciones separadamente en pacientes alcohólicos y no alcohólicos se observó que en los individuos alcohólicos la actividad ADH se correlacionó con la bilirubina ($r=0.38$, $p<0.01$) y con el tiempo de protrombina ($r=0.46$, $p<0.001$); en cambio, en los individuos no alcohólicos la actividad ADH no correlacionó con los parámetros de función hepática.

En los pacientes alcohólicos la actividad ADH no se correlacionó con la duración de la ingesta de alcohol ($r=-0.02$, $p:N.S.$) ni con la intensidad de la misma ($r=0.10$, $p:N.S.$).

2.3.2. Actividad aldehido deshidrogenasa hepática

2.3.2.1. Actividad aldehido deshidrogenasa total

La actividad ALDH total no fue significativamente diferente entre los distintos grupos histológicos ($F=1.89$, $p=0.08$) (tablas 6 y 7) (figura 19). Al comparar las medias de los distintos subgrupos de pacientes al-

cohólicos y no alcohólicos mediante el test de Student-Neuman-Keuls no se observaron diferencias entre ellos.

La actividad ALDH total guardó una correlación significativa, aunque débil, con el tiempo de protrombina ($r=0.26$, $p<0.05$), pero no se correlacionó con los niveles séricos de albúmina o bilirrubina. Al analizar separadamente individuos alcohólicos y no alcohólicos se observó en estos últimos una relación directa significativa entre la actividad ALDH total y el tiempo de protrombina ($r=0.42$, $p<0.05$), siendo el resto de correlaciones no significativas.

En los pacientes con hepatopatía de origen alcohólico la actividad ALDH total no se correlacionó con la duración de la ingesta de alcohol ($r=-0.21$, $p:N.S.$) ni con la cantidad diaria de alcohol ingerido ($r=-0.11$, $p:N.S.$)

2.3.2.2. Actividad aldehido deshidrogenasa de alta Km

La actividad ALDH de alta Km, tuvo un comportamiento muy similar a la actividad ALDH total, sin que existieran diferencias entre los distintos grupos histológicos ($F=1.80$, $p=0.10$). Al comparar entre sí las medias de los distintos subgrupos de pacientes alcohólicos y no alcohólicos mediante el test de Student-Neuman-Keuls no se observaron diferencias significativas entre ellos.

La actividad ALDH de alta Km no se correlacionó con los parámetros de función hepática en el conjunto de los pacientes ni al analizar separadamente individuos alcohó-

licos y no alcohólicos.

2.3.2.3. Actividad aldehído deshidrogenasa de baja Km

Se observaron marcadas diferencias en la actividad ALDH de baja Km entre los distintos grupos histológicos ($F=5.27$, $p<0.0001$). La actividad de este enzima disminuyó de forma progresiva al aumentar la gravedad de las lesiones hepáticas tanto en los pacientes alcohólicos como en los no alcohólicos (figura 20).

Al analizar únicamente a los pacientes alcohólicos se observaron también diferencias significativas en la actividad ALDH de baja Km entre los distintos subgrupos ($F=3.94$, $p<0.004$). Se observaron además diferencias significativas en la actividad ALDH de baja Km entre los subgrupos de pacientes con hígado normal y los que presentaban cirrosis ($p<0.05$) o cirrosis asociada a hepatitis alcohólica ($p<0.01$), y entre los pacientes con esteatosis y los pacientes con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica ($p<0.05$) (test de Student-Neuman-Keuls) (tabla 6).

Entre los individuos no alcohólicos, los pacientes con cirrosis tenían una actividad significativamente inferior a la de los enfermos con hepatitis crónica ($p<0.02$) (tabla 7).

La actividad ALDH de baja Km se correlacionó también con las pruebas de función hepática. Se observó una relación directa significativa con la albúmina ($r=0.44$, $p<0.001$) y con el tiempo de protrombina ($r=0.40$, $p<0.001$)

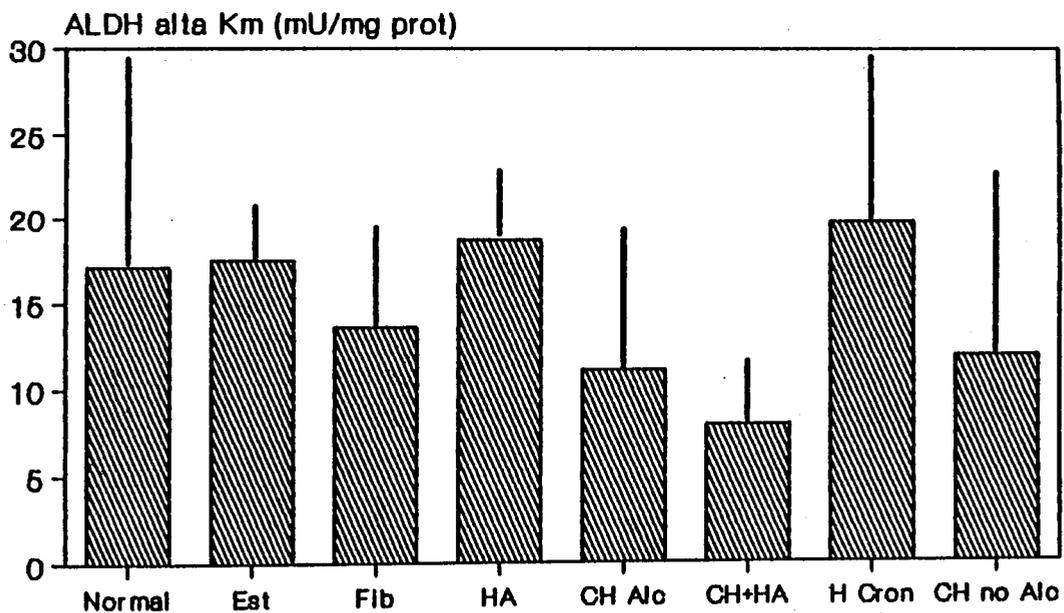


Figura 19. Actividad aldehido deshidrogenasa de alta Km en el tejido hepático, en pacientes alcohólicos y no alcohólicos según el tipo de lesión hepática

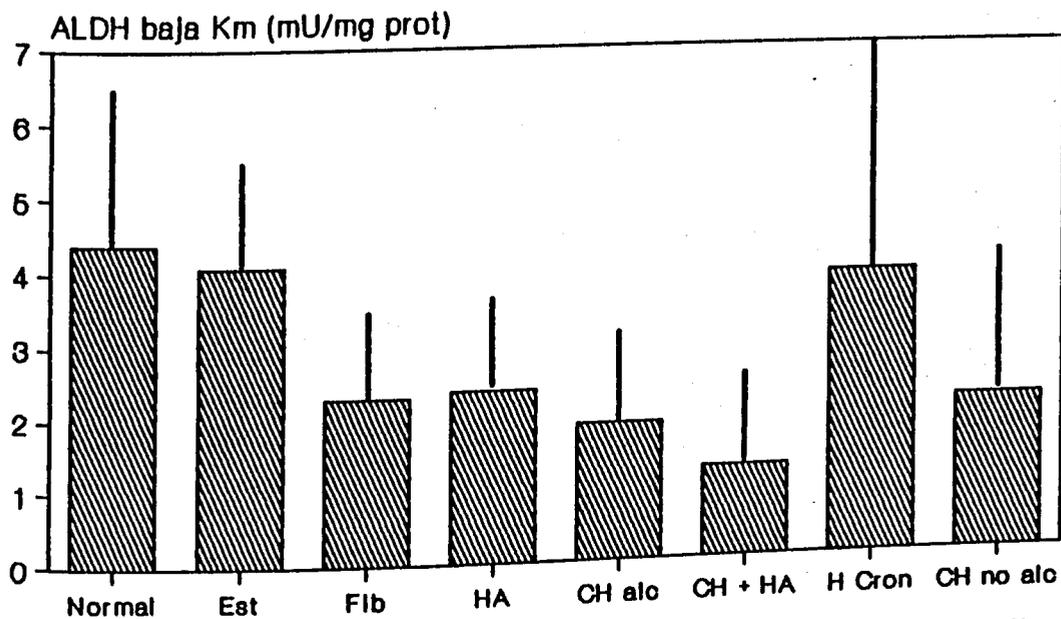


Figura 20. Actividad aldehido deshidrogenasa de baja Km en el tejido hepático, en pacientes alcohólicos y no alcohólicos, según el tipo de lesión hepática.

y una relación inversa significativa con la bilirrubina sérica ($r=-0.27$, $p<0.05$). Al analizar separadamente los individuos alcohólicos, la actividad ALDH de baja Km se correlacionó también de forma significativa con la albúmina ($r=0.39$, $p<0.001$), con el tiempo de protrombina ($r=0.41$, $p<0.001$) y con la bilirrubina ($r=-0.29$, $p<0.05$). En los pacientes no alcohólicos la actividad ALDH de baja Km se correlacionó con la concentración sérica de albúmina ($r=0.54$, $p<0.01$).

En los pacientes alcohólicos la actividad ALDH de baja Km guardó una debil correlación inversa, aunque significativa, con la intensidad de la ingesta alcohólica diaria ($r=-0.25$, $p<0.05$). No se correlacionó en cambio con la duración de la ingesta ($r=0.17$, $p:N.S.$).

2.3.3. Relaciones entre las actividades alcohol y aldehído deshidrogenasa

Las actividades ADH medidas a pH 7, pH 8.5 y pH 10.5 guardaron una estrecha relación. La correlación entre la actividad ADH pH 7 y ADH pH 8.5 fue de 0.80 ($p<0.001$) en el conjunto, 0.83 ($p<0.001$) en los alcohólicos y 0.80 en los no alcohólicos ($p<0.001$). La correlación entre la actividad ADH pH 7 y ADH pH 10.5 fue de 0.78 ($p<0.001$) en el conjunto, 0.79 ($p<0.001$) en los alcohólicos y 0.91 ($p<0.001$) en los no alcohólicos. Finalmente, la correlación entre la actividad ADH pH 8.5 y ADH pH 10.5 fue de 0.89 ($p<0.001$) en el conjunto, 0.90 ($p<0.001$) en los

alcohólicos y 0.85 ($p < 0.001$) en los no alcohólicos.

La actividad ALDH de alta Km se correlacionó con las actividades ADH en los pacientes no alcohólicos (ADH pH 7: $r = 0.55$, $p < 0.01$; ADH pH 8.5: $r = 0.63$, $p < 0.001$; ADH pH 10.5: $r = 0.56$, $p < 0.01$). Estas correlaciones fueron débiles, aunque significativas en el conjunto de los pacientes alcohólicos y no alcohólicos (ADH pH 7: $r = 0.23$, $p < 0.05$; ADH pH 8.5: $r = 0.37$, $p < 0.002$; ADH pH 10.5: $r = 0.33$, $p < 0.01$). En cambio, en los pacientes alcohólicos las actividades ADH fueron independientes de la actividad ALDH de alto Km (ADH pH 7: $r = 0.11$, $p: N.S.$; ADH pH 8.5: $r = 0.17$, $p: N.S.$; ADH pH 10.5: $r = 0.14$, $p: N.S.$).

La actividad ALDH de baja Km se correlacionó con las actividades ADH en el conjunto de los pacientes alcohólicos y no alcohólicos (ADH pH 7: $r = 0.37$, $p < 0.02$; ADH pH 8.5: $r = 0.49$, $p < 0.001$; ADH pH 10.5: $r = 0.42$, $p < 0.001$) y en el grupo de pacientes alcohólicos (ADH pH 7: $r = 0.35$, $p < 0.01$; ADH pH 8.5: $r = 0.44$, $p < 0.001$; ADH pH 10.5: $r = 0.39$, $p < 0.002$). En los pacientes no alcohólicos la actividad ALDH de baja Km se correlacionó con la actividad ADH a pH 7 ($r = 0.45$, $p < 0.02$) y ADH a pH 8.5 ($r = 0.49$, $p < 0.02$), pero no con la actividad ADH a pH 10.5 ($r = 0.33$, $p: N.S.$).

Las actividades ALDH de alta Km y baja Km guardaron una buena correlación en el conjunto de los pacientes ($r = 0.60$, $p < 0.001$) y en el grupo de individuos alcohólicos ($r = 0.72$, $p < 0.001$). Esta correlación fue más débil en los pacientes no alcohólicos ($r = 0.45$, $p < 0.05$).

2.4. CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EL TEJIDO HEPATICO

La concentración de proteínas en el tejido hepático fue similar en los pacientes alcohólicos y no alcohólicos (74.5±3.3 mg proteína/g tejido vs 75.7±4.4 mg proteína/g tejido, p:N.S.), así como entre los subgrupos de pacientes alcohólicos y no alcohólicos (tablas 6 y 7). Solo los pacientes con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica mostraron una concentración hepática de proteína significativamente inferior a los pacientes alcohólicos con hígado normal ($p<0.01$), esteatosis ($p<0.01$) ó hepatitis alcohólica ($p<0.01$).

En los pacientes alcohólicos, la concentración de proteínas en el tejido hepático se correlacionó de forma directa y significativa con la concentración plasmática de albúmina ($r=0.40$, $p<0.002$). La correlación con la bilirrubina ($r=0.22$) y protrombina ($r=0.24$) no fueron significativas. En los enfermos con hepatopatía de origen no alcohólico la concentración hepática de proteínas no se correlacionó con la concentración plasmática de albúmina ($r=0.14$), bilirrubina ($r=0.03$) ni tiempo de protrombina ($r=0.07$).

La concentración de proteínas en el tejido hepático no se correlacionó con las actividades ADH en el conjunto de los pacientes (ADH pH 7 $r=0.06$, pH 8.5 $r=0.05$, pH 10.5 $r=-0.08$, p:N.S.) ni al examinar separadamente los individuos alcohólicos (ADH pH 7 $r=0.09$, pH 8.5 $r=0.13$, pH 10.5 $r=-0.04$, p:N.S.) y no alcohólicos (ADH pH 7 $r=-0.07$, pH 8.5 $r=-0.20$, pH 10.5 $r=-0.24$, p:N.S.).

La actividad ALDH de alta Km no se correlacionó con la concentración de proteínas en el tejido hepático en el conjunto de los pacientes ($r=0.16$, $p:N.S.$), ni en los pacientes no alcohólicos ($r=0.02$, $p:N.S.$). En cambio, en los pacientes alcohólicos se observó una correlación significativa, aunque debil, ($r=0.25$, $p<0.05$) entre ambos parámetros.

La actividad ALDH de baja Km se correlacionó con la concentración hepática de proteínas en el conjunto de los pacientes ($r=0.24$, $p<0.05$) y en el grupo de pacientes alcohólicos ($r=0.33$, $p<0.01$), pero no se correlacionaron en el grupo de enfermos con hepatopatía de origen no alcohólico ($r=0.09$, $p:N.S.$).

2.5. ANALISIS DE LOS ISOENZIMAS DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA

2.5.1. Isoenzimas de la clase I

Se observó un polimorfismo genético en los locus ADH2, que codifica las cadenas polipeptídicas β , y ADH3, que codifica las cadenas polipeptídicas γ . El locus ADH1 fue de caracter monomorfo codificando solo un tipo de cadenas α .

2.5.1.1. Variabilidad del locus ADH2

El fenotipo de la ADH2 pudo ser estudiado en todos los pacientes. En seis casos (7.1%) la electroforesis en gel de almidón reveló bandas más catódicas que el isoenzima $\beta\beta$. En todos estos casos la actividad ADH a pH 8.5

fue superior que a pH 10.5. Estas características conforman el fenotipo de ADH denominado "atípico". Las técnicas electroforéticas utilizadas permitieron resolver que se trataba en todos los casos de fenotipo ADH2 2-1. No se halló ningún individuo con fenotipo ADH2 2-2.

La prevalencia de la ADH "atípica" fué similar en pacientes alcohólicos (4/60, 6.7%) y no alcohólicos (2/24, 8.3%). La prevalencia de isoenzima "atípica" en los distintos grupos de pacientes, estratificados según el tipo de lesión hepática se expresa en la Tabla 8.

En el conjunto de los pacientes estudiados la frecuencia génica de la ADH2-1 fue de 0.96 y la frecuencia génica de la ADH2-2 fue de 0.04. La frecuencia fenotípica observada ($\beta_1\beta_1$ 78, $\beta_1\beta_2$ 6, $\beta_2\beta_2$ 0) no fue significativamente distinta a la esperada según la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.16$, p:N.S.).

No se halló ningún caso de fenotipo ADH2 Indianápolis, caracterizado por la aparición en la electroforesis de bandas más catódicas que la $\beta_1\beta_1$ y un máximo de actividad de oxidación del etanol a pH 7.

2.5.1.2. Variabilidad del locus ADH3

El fenotipo del locus ADH3 pudo ser estudiado en 60 pacientes, 38 alcohólicos y 22 no alcohólicos.

El locus ADH3 codificó dos tipo de subunidades distintas: r_1 y r_2 , dando lugar a tres fenotipos: uno homocigótico para r_1 , uno homocigótico para r_2 y un tercero heterocigótico, con ambas subunidades r_1 y r_2 .

Tabla 8. Distribución de los isoenzimas ADH2 y ALDH2 según el tipo de lesión hepática.

	ADH "atípica"		ALDH2 indetectable	
	n	%	n	%
Normal	0 / 5	0	0 / 5	0
Esteatosis	0 / 9	0	1 / 8	12.5
Fibrosis	0 / 9	0	3 / 6	50.0
Hepatitis alcohólica	2 / 10	20.0	4 / 7	57.1
Cirrosis alcohólica	2 / 19	11.7	5 / 11	45.4
Cirrosis + hepatitis alcohólica	0 / 7	0	4 / 6	66.6
Total alcohólicos	4 / 64	6.6	17 / 43	39.5
Hepatitis crónica	1 / 14	7.1	1 / 13	7.6
Cirrosis no alcohólica	1 / 10	10.0	1 / 8	12.5
Total no alcohólicos	2 / 24	8.3	2 / 21	9.5

En los 60 casos estudiados la frecuencia génica del alelo ADH3-1, que codifica la subunidad r1, fue de 0.60 y la del alelo ADH3-2, que codifica la subunidad r2, fue de 0.40. El fenotipo r1r1 se observó en 16 pacientes (27%), 39 casos (65%) presentaron el fenotipo r1r2 y 5 casos (8%) el fenotipo r2r2. La frecuencia fenotípica observada fue significativamente distinta a la calculada a partir de la frecuencia génica según la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2=6.31$, $p<0.02$, para grados de libertad = nº fenotipos - nº alelos = 1), lo que no permite aceptar que esta población está de acuerdo con la distribución de equilibrio de los genotipos.

En los pacientes alcohólicos la frecuencia génica del alelo ADH3-1 fue de 0.61 y la del alelo ADH3-2 de 0.39. Presentaron el fenotipo r1r1 11 pacientes (29%), el fenotipo r1r2 24 pacientes (63%) y el fenotipo r2r2 3 pacientes (8%). Esta frecuencia fenotípica es significativamente distinta a la calculada según la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2=3.95$, $p<0.05$), lo que indica que la frecuencia fenotípica observada en la población de pacientes alcohólicos estudiada no está de acuerdo con la distribución de equilibrio de los genotipos.

En los pacientes alcohólicos, la distribución de los fenotipos del locus ADH3 fue diferente según la gravedad de las lesiones hepáticas que sufrían los pacientes. Así, la distribución de fenotipos observada en los pacientes con lesiones hepáticas severas, es decir, enfermos con

fibrosis, hepatitis alcohólica o cirrosis (r_1r_1 5, r_1r_2 19, r_2r_2 2), fue significativamente distinta a la calculada según la ley de Hardy-Weinberg ($X^2=6.052$, $p<0.025$). En cambio, en los pacientes alcohólicos con hígado normal o esteatosis la frecuencia fenotípica observada (r_1r_1 6, r_1r_2 5, r_2r_2 1) no fue significativamente distinta a la calculada según la citada ley de equilibrio de los genotipos ($X^2=0.136$, $p:N.S.$).

En los pacientes no alcohólicos la frecuencia génica del alelo ADH3-1 fue de 0.57 y la del alelo ADH3-2 de 0.43. Se observó el fenotipo r_1r_1 en 5 casos (23%), el fenotipo r_1r_2 en 15 casos (68%) y el fenotipo r_2r_2 en 2 casos (9%). En este grupo de enfermos la frecuencia fenotípica observada no se diferenció de forma significativa de la calculada según la ley de Hardy-Winberg ($X^2=3.3$, $p:N.S.$) indicando que en estos enfermos la frecuencia fenotípica observada está de acuerdo con la ley de equilibrio de los genotipos

2.5.2. Isoenzimas de la clase II

Esta clase está constituida por el isoenzima π -ADH, que migra hacia el cátodo, localizandose entre el origen y el isoenzima de la clase I α , en la electroforesis en gel de almidón a pH 8.2.

La π -ADH se detectó en todos los pacientes, tanto alcohólicos como no alcohólicos.

2.5.3. Isoenzimas de la clase III

La electroforesis de gel de almidón reveló en todos los casos, al teñir el gel con pentanol, dos bandas que migran hacia el ánodo, a diferencia de los demás isoenzimas de la ADH que migran hacia el cátodo, y que corresponden a los isoenzimas de la clase III X1-ADH y X2-ADH.

En ningún caso se ha observado X2-ADH en ausencia de X1-ADH., ni ningún tipo de polimorfismo, lo que sugiere que la banda minoritaria, la X2, derivaría de X1 por modificación postraduccionaI.

2.6. ANALISIS DE LOS ISOENZIMAS DE LA ALDH

Se realizó un estudio electroforético en gel de almidón de los isoenzimas de la ALDH en 64 pacientes, 43 alcohólicos y 21 no alcohólicos. En los 20 pacientes restantes el volumen de la muestra de tejido hepático fue insuficiente para realizar este análisis.

Se detectó la banda del isoenzima ALDH1, de localización predominantemente citosólica y con una alta Km, en todas las muestras estudiadas, tanto de los pacientes alcohólicos como de los no alcohólicos.

La banda del isoenzima ALDH2, que posee una baja Km y se halla localizada predominantemente en el interior de la mitocondria, fue indetectable en 17 alcohólicos (39.5%) y en dos pacientes no alcohólicos (9.5%), existiendo entre ambas proporciones una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).

Entre los individuos alcohólicos, la proporción de

pacientes con ausencia de la banda de ALDH2, fue mayor a medida que aumentó la severidad de la lesión hepática (tabla 8). Este isoenzima estuvo presente en todos los alcohólicos con hígado normal, mientras que resultó indetectable en el 12.5 % de los pacientes con esteatosis (1/8), en el 50.0 % de los pacientes con fibrosis (3/6), en el 57.1% de los enfermos con hepatitis alcohólica (4/7), en el 45.5% de los cirróticos (5/11) y en el 66.7% de los pacientes con cirrosis asociada a hepatitis alcohólica (4/6).