

RESUMEN

Se ha abordado el estudio detallado de la localización de distintas formas de alcohol deshidrogenasa (ADH) en tejidos de rata y, en particular, en el sistema vascular, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central y tejidos oculares. Se han estudiado esencialmente ADH1 y ADH4, que son los enzimas más relevantes en la oxidación de etanol a acetaldehído, y en la oxidación de retinol a retinal en la vía de síntesis del ácido retinoico.

ADH4 se detectó como la forma principal en los vasos sanguíneos de la rata, mientras que en los vasos humanos ADH1B era el enzima predominante. Tanto ADH1 como ADH4, se han detectado a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, principalmente en la mucosa, variando su cantidad relativa y su ubicación celular en función del área estudiada. ADH4 es más abundante en las partes más externas del tracto (boca, esófago, colon y recto), mientras que ADH1 es la forma mayoritaria en el intestino. En el cerebro, mediante hibridación *in situ*, ambas formas de ADH se han localizado en el cerebelo, formación hipocampal y áreas muy concretas de la corteza cerebral, mostrando colocalización en algunos tipos celulares y una expresión específica en otros. La inmunodetección de ADH4 en homogeneizados de diferentes regiones cerebrales ha confirmado la presencia de la proteína en áreas concretas del SNC donde también se ha localizado su mRNA. Ambas clases han sido también detectadas en el sistema ventricular y vascular asociado al SNC. En los tejidos oculares, la proteína ADH4 se ha localizado en la coroides, cuerpo ciliar, nervio óptico y en capas concretas de la córnea y retina.

Finalmente, se ha comparado el patrón de expresión ADH en tejido hepático con el de una línea celular de hepatocarcinoma. La línea de hepatocarcinoma de rata H4IIEC3 mostró la expresión de ADH1 y ADH3, presentes en hígado normal, y, además, ADH4, ausente en hígado. Se investigó el efecto del ácido retinoico sobre la expresión de cada una de las tres formas de ADH. Se ha observado un aumento de los niveles de mRNA de ADH1 y un descenso de los de ADH4, mientras que los niveles de mRNA de ADH3 se mantuvieron constantes.

La distribución de ADH1 y ADH4, junto con sus propiedades cinéticas y su regulación, permiten inferir algunas de sus funciones fisiológicas en el metabolismo del etanol y de los retinoides, la reducción de aldehídos citotóxicos derivados de la peroxidación lipídica, el catabolismo de las catecolaminas, etc. Asimismo, el metabolismo endógeno de etanol, proporciona una base molecular para comprender las alteraciones causadas por el abuso del alcohol en determinados órganos y tejidos. En este sentido, proponemos la hipótesis de que algunos de los efectos tóxicos del etanol podrían explicarse por la interferencia, a nivel de la ADH, con la vía de síntesis del ácido retinoico.

ABREVIATURAS

4-MP	4-metilpirazol
A	Adenina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
APAD	Dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina
AR	Ácido retinoico
ARAT	Acil CoA-retinol aciltransferasa
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
Bis	N, N'-metilbisacrilamida
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
cDNA	DNA complementario
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
CRBP	Proteína celular de unión a retinol/retinal
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleótido 5'-trifosfato
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendinitriltetraacético, sal disódica
FALDH	Formaldehído deshidrogenasa
FBS	Suero bovino fetal
G	Guanina
GFAP	Proteína ácida fibrilar de glía
GST	Glutación S-transferasa
5-HIAL	5-hidroxiindol-3-acetaldehído
4-HNE	4-hidroxinonenal
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HTOL	5-hidroxitriptofol
ICC	Inmunocitoquímica
IHC	Inmunohistoquímica
Ig A, etc.	Inmunoglobulina A, etc.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
kb	Kilopar de bases
K_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis
LB	Medio de cultivo de Luria Bertani

Abreviaturas

LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
mer	Oligómero
MDR-ADH	Alcohol deshidrogenasas de cadena media
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NAD, NAD ⁺ , NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido y sus formas oxidada y reducida
NADP, NADP ⁺ , NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y sus formas oxidada y reducida
NBT	<i>Nitro blue</i> tetrazolio
NCS	Suero bovino de neonato
N-terminal	Amino-terminal
NTP	Ribonucleótido 5'-trifosfato
ORF	Pauta abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
P450	Citocromo P450
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMS	Metasulfato de N-metilfenazonio
RAR/RXR	Receptores de ácido retinoico
RARE	Elemento de respuesta a retinoides
RBP	Proteína plasmática transportadora de retinol
RE	Ésteres de retinol
REH	Hidrolasa de ésteres de retinol
RNA: mRNA, rRNA, tRNA	Ácido ribonucleico: mensajero, ribosómico y de transferencia
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa inversa
SNC	Sistema nervioso central
SDR-ADH	Alcohol deshidrogenasas de cadena corta
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TBS	Tampón salino de Tris-HCl
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TESPA	3-aminopropiltriethoxisilano
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol o tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad Internacional de actividad enzimática
3' UTR	Región 3' no codificante

INTRODUCCIÓN

1 LA ALCOHOL DESHIDROGENASA

La alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1) cataliza la oxidación reversible de una amplia variedad de alcoholes primarios, secundarios y cíclicos de origen endógeno o xenobióticos, a sus correspondientes aldehídos y cetonas. La reacción de oxidación tiene lugar con la reducción concomitante del coenzima, que generalmente es el NAD⁺ (Jörnvall y Höög, 1995; Edenberg y Bosron, 1997).

La ADH es un sistema enzimático de localización mayoritariamente citoplasmática ampliamente distribuido en numerosos *phyla* que incluyen organismos pertenecientes a todos los reinos en los que se clasifican los seres vivos (Jörnvall y col., 1993). En vertebrados, todos los miembros de la familia ADH son metaloenzimas, que contienen zinc, y forman parte de la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR). Son dímeros compuestos por subunidades de unos 374 residuos aminoacídicos y de unos 40 kDa de masa molecular. Cada subunidad consta de dos dominios, un dominio catalítico y un dominio de unión al coenzima, separados ambos por una hendidura hidrofóbica que forma el bolsillo de unión al sustrato (Edenberg y Bosron, 1997).

Diferentes formas de ADH, caracterizadas como isoenzimas, fueron inicialmente identificadas en humano (Smith y col., 1971). La familia de las ADH ha ido aumentando con el descubrimiento de nuevas formas enzimáticas, lo que ha dado lugar al término *clase* (Vallee y Bazzone, 1983). La agrupación de las distintas ADH en clases se basa en su especificidad de sustrato y propiedades cinéticas, sensibilidad al inhibidor pirazol y sus derivados, movilidad en la electroforesis en gel de almidón (técnica que se utiliza de forma clásica para la detección e identificación de diferentes formas enzimáticas con actividad ADH), patrón de expresión, identidad de secuencia y análisis de árboles filogenéticos (Duester y col., 1999; Edenberg, 2000; Jörnvall y Höög, 1995; Vallee y Bazzone, 1983).

Las ADHs están codificadas por hasta siete genes diferentes en humanos, cuyos productos génicos han sido agrupados en cinco clases que comparten alrededor de

un 60-70% de identidad aminoacídica (Jörnvall y Höög, 1995). En los vertebrados, el sistema ADH constituye un sistema complejo con diferentes formas y una amplia multiplicidad dividido en ocho clases (ADH1-ADH8) que a la vez incluyen isoenzimas y formas alélicas. Hasta el momento, en ninguna especie se han identificado las ocho clases de ADH. Por ejemplo, en humano, tan sólo han sido descritas las clases I, II, III, IV y V o en rata las clases I, II, III, IV y VI (Duester y col., 1999). En esta Tesis se ha utilizado la nomenclatura recientemente propuesta (Tabla 1) aunque todavía está sujeta a debate.

Tabla 1. Nomenclatura propuesta para las ADH de algunos vertebrados

Especie	Clase							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Humano	ADH1A (α) ADH1B (β) ADH1C (γ)	ADH2(π)	ADH3(χ)	ADH4(σ)	ADH5	-	-	-
Rata	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4	-	ADH6	-	-
Ratón	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4A ADH4B	ADH5 A ADH5 B	-	-	-
Caballo	ADH1E ADH1S	-	ADH3	-	-	-	-	-
Pollo	ADH1	-	ADH3	-	-	-	ADH 7	-
Rana	ADH1	-	ADH3	-	-	-	-	ADH8

Entre paréntesis se indica la nomenclatura clásica, con letras griegas, de las subunidades enzimáticas de las ADH humanas (Dolney y col., 2001; Duester y col., 1999; Peralba y col., 1999; Szalai y col., 2002).

1.1 ADH clase I (ADH1)

En electroforesis en gel de almidón, a pH 7,6, ADH1 aparece como un grupo de varias bandas con movilidad catódica tanto en rata como humano (Fig. 1). ADH1 es la forma enzimática cuantitativamente más importante y de distribución mayoritariamente hepática en todos los mamíferos, aunque también presente en otros muchos tejidos (Tabla 2). En los roedores, presenta una sola forma enzimática, mientras que en humanos, la duplicación génica ha dado lugar a la aparición de isoenzimas (Fig. 1). Tres genes (*ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*) codifican las subunidades ADH1A, ADH1B y ADH1C (anteriormente, denominadas α , β y γ , Tabla 1) que muestran una elevada

identidad de secuencia (93-94%), lo que hace posible la formación de homodímeros y heterodímeros, todos ellos con características cinéticas diferenciadas. Además, los genes *ADH1B* y *ADH1C* presentan polimorfismo. Los alelos *ADH1B1*, *ADH1B2* y *ADH1B3* codifican las subunidades β_1 , β_2 y β_3 , y los alelos *ADH1C1* y *ADH1C2* las subunidades γ_1 y γ_2 , respectivamente (Duester y col., 1986; 1999).

ADH1 se caracteriza por presentar una amplia especificidad de sustrato y fuerte inhibición competitiva con pirazol y sus derivados (Fries y col., 1979; Tolf y col., 1982). De todas las clases de ADH, ADH1 es la que presenta mayor afinidad por el etanol, siendo el principal enzima responsable de la eliminación del etanol ingerido. ADH1 generalmente muestra valores de K_m para el etanol de 1,4 mM en rata y de 0,05-4 mM en los isoenzimas humanos (a excepción de la variante alélica *ADH1B3*, con una $K_m = 36$ mM) (Bosron y Li, 1987; Edenberg y Bosron, 1997; Julià y col., 1987b; von Wartburg y col., 1964; Wagner y col., 1983). Estudios en ratones *knock-out* han demostrado la participación *in vivo* de ADH1 en el metabolismo del etanol (Deltour y col., 1999b).

Además, ADH1 es activa con alcoholes alifáticos primarios y secundarios, alcoholes cíclicos y aromáticos (von Wartburg y col., 1964; Pietruszko y col., 1973; Pietruszko, 1979). Se ha demostrado su actividad con varios compuestos de origen endógeno como los ácidos grasos ω -hidroxilados (Wagner y col., 1983; Björkhem y col., 1973), compuestos del metabolismo de la noradrenalina (Mårdh y col., 1985), dopamina (Mårdh y Vallee, 1986), serotonina (Consalvi y col., 1986), retinoides (Boleda y col., 1993; Yang y col., 1994), ácidos biliares (Marschall y col., 2000; Okuda y Okuda, 1983) y esteroides (McEvily y col., 1988) (Tabla 3).

1.2 ADH clase II (ADH2)

Esta clase puede ser dividida en dos subgrupos, un grupo que consiste en el enzima humano, junto con la forma de conejo, y otro que incluye las formas de roedor (Svensson y col., 1999a). Esta clase tiene una distribución muy restringida, ya que hasta el momento, la proteína humana y de roedores tan sólo se han encontrado en hígado. La forma humana fue la primera descrita como una variante de elevada K_m para el etanol e insensible a la inhibición por pirazol (Bosron y col., 1983), mientras que la forma de roedor tiene una baja capacidad para la oxidación de este sustrato (Svensson y col., 1999a). ADH2 muestra actividad con diversos alcoholes y aldehídos, alifáticos y aromáticos, aunque con una especificidad más restringida que ADH1 (Ditlow y col., 1984). ADH2 presenta actividad con intermediarios del metabolismo de la serotonina y de la noradrenalina (Consalvi y col., 1986; Mårdh y col., 1986), así como con retinoides (Han y col., 1998; Popescu y Napoli, 2000; Yang y col., 1994).

1.3 ADH clase III (ADH3)

El enzima presenta 1-3 bandas de movilidad electroforética anódica (Fig. 1; Julià y col., 1986; Parés y col., 1985). ADH3 se caracteriza y distingue del resto de las ADHs por ser prácticamente insensible a la inhibición por 4-metilpirazol y por la imposibilidad de saturarse con alcoholes o aldehídos primarios de cadena corta (de 2 a 4 carbonos) (Julià y col., 1987a; 1987b; Vallee y Bazzone, 1983). De hecho, ADH3 cataliza la oxidación del compuesto S-hidroximetilglutati6n, generado espontáneamente por la reacci6n del formaldehído con el glutati6n reducido, para dar lugar a S-formilglutati6n (Koivusalo y Uotila, 1991), por lo que se conoce como formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutati6n (FALDH). Estudios genéticos con ratones *knock-out* han demostrado su participaci6n *in vivo* en el metabolismo del formaldehído (Deltour y col., 1999b). Adem6s de esta actividad, ADH3 cataliza eficientemente la oxidaci6n de alcoholes primarios de cadena larga como el octanol y especialmente los ácidos grasos ω -hidroxilados (Julià y col., 1987a, 1987b). Adem6s, ADH3 es capaz de catalizar la reducci6n del óxido nítrico, previa combinaci6n con el glutati6n para dar S-nitrosoglutati6n (Gow y col., 1997), en una reacci6n dependiente de NADH/NADPH (Jensen y col., 1998), lo que sugiere un papel en la protecci6n frente al estr6s nitrosativo (Liu y col., 2001).

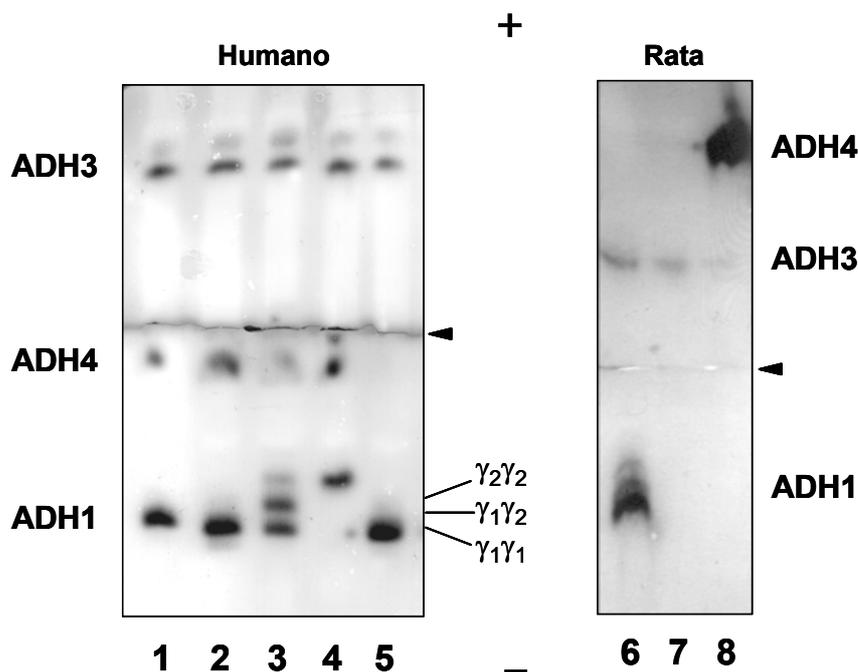


Figura 1. Electroforesis en gel de almid6n y tinci6n por actividad con muestras de tejidos humanos y de rata. 1-5, muestras de biopsia gástrica humana; 6, hígado; 7, cerebro y 8, est6mago de rata. Las flechas indican el lugar de aplicaci6n de las muestras.

ADH3 es un enzima ubicuo, presente en todos los animales y plantas y en numerosos microorganismos (Fernández, 1997). Es la ADH mayoritaria y más ampliamente distribuida en el cerebro adulto de rata y humano (Beissweger y col., 1985; Giri y col., 1989; Mori y col., 2001). Su localización no sólo es citoplasmática como el resto de ADHs (Parés y col., 1984; Uotila y Koivusalo, 1989), sino que también se ha detectado en el núcleo de hepatocitos y astrocitos de rata (Iborra y col., 1992). Se cree que una de las funciones de este enzima podría ser la protección de las estructuras celulares, inclusive la cromatina, frente al formaldehído que se produce de manera endógena en varios procesos metabólicos.

Recientemente, ensayos *in vitro* y estudios genéticos han demostrado la contribución de ADH3, como retinol deshidrogenasa, en la síntesis de AR (Molotkov y col., 2002b).

Tabla 2. Patrón de expresión de las diferentes clases de ADH en mamífero

Clase	Patrón de expresión
ADH1	Principalmente en hígado y también en intestino, riñón, pulmón, glándula adrenal, epidídimo, testículos, útero y ovarios. Ciertas células de la corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo. Expresión en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario
ADH2	Hígado, intestino delgado y piel
ADH3	Patrón ubicuo, abundante en hígado. Es la ADH mayoritaria en cerebro
ADH4	Piel, ojo, glándula adrenal y en la mucosa de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. No se expresa en hígado. Expresión en varios tejidos durante el desarrollo embrionario incluido el cerebro.
ADH5	Tejidos fetales.
ADH6	Elevada expresión en hígado y en menor cantidad en riñón y pulmón.

Ang y col., 1996a; 1996b; 1997; Beissweger y col., 1985; Bilanchone y col., 1986; Boleda y col., 1989; Cederbaum y col., 1975; Chen y Yoshida, 1991; Cheung y col., 1999; Deltour y col., 1997; Estonius y col., 1993; 1996; Giri y col., 1989; Haselbeck y col., 1997a; 1997b; 1997c; 1998; Hedberg y col., 2000; Höög y Brandt, 1995; Julià y col., 1987b; Kerr y col., 1989; Moreno y Parés, 1991; 1994; Mori y col., 2001; Parés y Farrés, 1995; 2001; Pestalozzi y col., 1983; Stromberg y Höög, 2000; Svensson y col., 1999b; Yasumani y col., 1991; Yin y col., 1990, 1993; 1997; Zgombic-Knight y col., 1995a; Zheng y col., 1993.

1.4 ADH clase IV (ADH4)

Este enzima, en la rata, presenta una marcada movilidad anódica y se muestra como una única banda en electroforesis en gel de almidón, mientras que presenta una movilidad catódica en humano (Fig. 1; Julià y col., 1987b; Moreno y Parés, 1991).

ADH4 fue aislada, purificada y caracterizada por primera vez en nuestro grupo de investigación a partir de tejido ocular de rata (Julià y col., 1983; Parés y col., 1985). ADH4 es comúnmente conocida como la ADH gástrica ya que posteriormente se purificó a partir de estómago (Moreno y Parés, 1991; Yin y col., 1990). Es una forma ausente en hígado y principalmente distribuida en mucosas y en epitelios externos (Tabla 2). Se ha demostrado, también, su expresión durante el desarrollo embrionario de ratón, en la etapa de gastrulación (Tabla 2).

Tabla 3. Constantes cinéticas de ADH1 y ADH4 de rata frente a sustratos fisiológicos

SUSTRATO	ADH1		ADH4	
	K_m mM	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ . min ⁻¹	K_m mM	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ . min ⁻¹
Etanol	1,4	28	2400	1,08
Acetaldehído	0,17	1000	ns	50
Hexanol	0,12	570	2	550
2-hexenol	0,018	4000	0,26	44000
Hexanal	0,05	21200	2,4	32600
2-Hexenal	0,14	3100	1,1	41800
4-Hidroxinonenal	0,15	500	1,3	2150
Todo- <i>trans</i> -Retinol	0,047	250	0,008	580
9- <i>cis</i> -Retinol	nd	nd	0,025	3080
13- <i>cis</i> -Retinol	nd	nd	na	na
Todo- <i>trans</i> -Retinal	0,01	500	0,008	1750
9- <i>cis</i> -Retinal	0,013	1070	0,012	2580
13- <i>cis</i> -Retinal	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.

Todas las determinaciones se realizaron a pH 7,5 y 25°C. Boleda y col., 1993; Crosas y col., 2000; Farrés y col. 1994; Julià y col., 1987b. Abreviaturas: na, actividad no detectada; ns, el sustrato no satura el enzima; nd, actividad no determinada.

ADH4 es la forma que presenta una actividad más elevada en términos de k_{cat} frente a alcoholes primarios alifáticos, incluido el etanol (Boleda y col., 1989; Crosas y col., 2000; Jörnvall y col., 2000). Presenta actividad con sustratos de relevancia fisiológica como los ω -hidroxiácidos grasos, los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica y los retinoides (Tabla 3; Boleda y col., 1993; Julià y col., 1986). De todas las ADHs, ADH4 es la que presenta la mayor actividad para los retinoides (Boleda y col., 1993; Crosas y col., 2000; Jörnvall y col., 2000; Yang y col., 1994). ADH4 de ratón, rata y humano catalizan eficientemente la oxidación del retinol, tanto el isómero *todo-trans* como el *9-cis*, pero no el *13-cis* (Allali-Hassani y col., 1998; Boleda y col., 1993; Crosas y col., 2000; Han y col., 1998; Kedishvili y col., 1998; Yang y col., 1994), con una mayor eficiencia con el isómero *9-cis*-retinol (Allali-Hassani y col., 1998; Crosas y col., 2000), en contraste con la ADH1 que prefiere el *todo-trans*-retinol (Yang y col., 1994).

1.5 ADH5 y ADH6

Estas formas enzimáticas han sido poco investigadas hasta el momento y poco se sabe acerca de su especificidad de sustrato (Höög y Brandt, 1995; Yasumani y col., 1991). La ADH5 no se ha detectado a nivel proteico. Su mRNA se ha detectado en estómago, hígado y tejidos fetales humanos (Tabla 2; Yasumani y col., 1991). No hay evidencias hasta el momento de la presencia del enzima activo en estos tejidos, pero se ha conseguido la expresión *in vitro* de su cDNA. El enzima muestra una K_m para el etanol superior a la de la ADH4, y actividad con propanol y alcohol benzílico (Chen y Yoshida, 1991). ADH6 ha sido tan sólo detectada en roedores, el mRNA en rata y como proteína recombinante activa en *Peromyscus* (Tabla 2; Höög y Brandt, 1995; Zheng y col., 1993).

2 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA ADH

Una gran variedad de alcoholes, aldehídos y cetonas, generados de forma endógena o que llegan de manera exógena a los seres vivos, son sustratos de las ADHs, por lo que éstas están involucradas en un elevado número de vías metabólicas y procesos de interés biomédico (Tabla 3): eliminación del etanol y otros alcoholes alifáticos, homeostasis y el metabolismo de los retinoides, eliminación de productos de la peroxidación lipídica, metabolismo de la serotonina y catecolaminas, oxidación de los ácidos grasos ω -hidroxilados, metabolismo hormonal, eliminación de formaldehído y óxido nítrico, etc. A continuación, se exponen algunas vías metabólicas en las que participan especialmente las formas enzimáticas ADH con actividad etanol deshidrogenasa, tales como ADH1, ADH2 y ADH4 (Tabla 3 y 4).

2.1 Metabolismo del etanol y acetaldehído

2.1.1 Propiedades del alcohol y fuentes de producción

El término alcohol es utilizado frecuentemente como sinónimo de etanol o alcohol etílico, de forma que para referirse a otros alcoholes se utiliza el nombre sistemático. El etanol es un alcohol primario de bajo peso molecular, de carácter polar, soluble en agua y solventes orgánicos, pero prácticamente insoluble en grasas y aceites (Windholz, 1976). La concepción errónea de que es “soluble en lípidos” posiblemente se debe a que al ser una molécula de pequeño tamaño, es capaz de atravesar libremente las membranas celulares de la misma forma que lo hacen las sustancias liposolubles.

Tabla 4. Sustratos fisiológicos y vías metabólicas en las que están implicadas las ADH

Sustrato	ADH	Vía metabólica o proceso
Etanol y alcoholes alifáticos	ADH1, ADH2 y ADH4	Metabolismo del etanol Alcoholismo Desintoxicación
Retinoides	ADH1, ADH2, ADH3 y ADH4	Homeostasis y metabolismo de los retinoides Regulación génica Mantenimiento y proliferación celular Ciclo visual
4-Hidroxinonenal Hexanal	ADH1 y ADH4	Peroxidación lipídica Estrés oxidativo
Aminas biógenas	ADH1 y ADH2	Metabolismo de serotonina y catecolaminas
ω -Hidroxiácidos	ADH1, ADH3 y ADH4	Oxidación de ácidos grasos
Esteroides	ADH1	Metabolismo hormonal, del colesterol y esteroides Epimerización de ácidos biliares
S-Hidroximetilglutación S-nitrosoglutación	ADH3	Eliminación de formaldehído y óxido nítrico Protección de estructuras celulares

En los mamíferos, el etanol es un metabolito presente normalmente en el organismo a una concentración que varía entre 0,1 y 1 mM, siendo la mayor parte del etanol de origen microbiano, debido a la flora presente en el tracto gastrointestinal (Baraona y

col., 1986; Fisher, 1988; McManus y col., 1966). De hecho, se ha detectado etanol en el intestino de ratas no expuestas a alcohol (Krebs y Perkins, 1970). Otra parte del etanol endógeno es debida a la producción en otros tejidos, principalmente en hígado (Krebs y Perkins, 1970; McManus y col., 1966). En el organismo, tienen lugar varias reacciones de degradación que generan acetaldehído (Krebs y Perkins, 1970), el cual puede ser reducido a etanol, por la alcohol deshidrogenasa.

El etanol también puede ser aportado por la dieta o el consumo directo. Existen numerosos trabajos que demuestran que los animales en condiciones normales de vida, pueden estar expuestos a grandes cantidades de alcohol. Ejemplos de ello lo constituyen los elefantes africanos y los jabalís cuando ingieren la fruta podrida del árbol marula, y el lémur, *Lemur catta*, cuando come las vainas en fermentación del tamarindo (Jolly, 1966). El etanol también se ha encontrado como producto mayoritario de la fermentación en el ciego intestinal de las perdicis nivales (*Lagopus lagopus*), llegando a alcanzar concentraciones de 130 mM. Los camachuelos (*Pyrrhula pirrhula*) y los picogordos (*Coccothraustes coccothraustes*) pueden llegar a intoxicarse si comen en los cactus un néctar que fermenta rápidamente. Finalmente, también animales domésticos pueden intoxicarse al ingerir las manzanas caídas (Krebs y Perkins, 1970).

En el hombre, sin embargo, la principal fuente de etanol es su consumo directo a través de las bebidas alcohólicas. El alcohol es producido principalmente por la fermentación de azúcares o carbohidratos, procedentes de materias vegetales que incluyen los cereales (cerveza, sake, *shochu*), fruta (vino, sidra), savia (vino de palma, *pulque*) y miel (vino de miel) (Kato, 1995).

2.1.2 Absorción y distribución del etanol

Tras la ingestión de etanol, su absorción empieza inmediatamente a través de la mucosa bucal y como vapor en los alvéolos pulmonares (Batt, 1989). Sin embargo, la cantidad de etanol que es absorbido a través de estos dos sistemas es prácticamente despreciable, y se considera que todo el alcohol ingerido va al estómago y es absorbido por simple difusión a través del epitelio gástrico y de la primera porción del intestino delgado de manera similar a como ocurre con el agua (Batt, 1989; Watson, 1989). Con el estómago vacío, el etanol ingerido pasa rápidamente a través de éste y es absorbido principalmente en el intestino delgado (duodeno y yeyuno), de manera que a los 5 min ya se detecta su presencia en sangre y la máxima concentración plasmática se alcanza alrededor de los 30 min (Watson, 1989). La comida sólida y las soluciones hipertónicas retrasan el vaciado gástrico, de forma que cuando el etanol es consumido durante las comidas o con el estómago todavía lleno, una parte del etanol es absorbida en el estómago (Cortot y col., 1986; Oneta y col. 1998). La absorción del alcohol, iniciada inmediatamente después de la ingestión, continúa mientras exista un gradiente de concentración de etanol entre el tracto gastrointestinal y la sangre de la

red de capilares. La velocidad de absorción depende de factores genéticos, la concentración de alcohol y el tipo de bebida alcohólica, el consumo de drogas, la presencia de comida en el estómago y la velocidad de vaciado gástrico, entre otros (Agarwal y Goedde, 1992; Cortot y col., 1986; Oneta y col., 1998). Una vez absorbido, el etanol entra en la vena porta, atraviesa el hígado del que sale a través de la vena hepática hacia el corazón, el cual lo envía a los pulmones y, tras su retorno, alcanza la circulación periférica. Una vez el etanol en sangre, éste se distribuye por todos los tejidos y fluidos del organismo, atravesando libremente todas las membranas y barreras biológicas. El etanol se distribuye en el organismo proporcionalmente al contenido de agua presente en cada tejido (Batt, 1989). El establecimiento del equilibrio ocurre más rápidamente en los órganos y tejidos mejor vascularizados que tienen un elevado flujo de sangre, tales como el cerebro, hígado, pulmones y riñones.

El etanol no se acumula en ningún órgano específico ni tampoco interacciona preferentemente con ningún componente celular, de forma que es eliminado casi totalmente a través del metabolismo oxidativo, principalmente en hígado. El resto, únicamente alrededor del 10% del etanol absorbido, es eliminado a través de los riñones, por la orina, de los pulmones, por la respiración, y de la piel, por el sudor; y por el metabolismo extrahepático del etanol, en el cual destacan el estómago, intestino, pulmón y riñón.

2.1.3 Eliminación del etanol. Implicación de la ADH en el metabolismo del etanol

2.1.3.1 Metabolismo hepático

El hígado es el principal órgano implicado en la eliminación del alcohol y muchas otras sustancias tóxicas. El etanol es eliminado a través de dos procesos oxidativos mediante los cuales se convierte primero en acetaldehído y posteriormente en acetato. El acetato pasa al torrente sanguíneo y a los tejidos, donde se incorpora en parte al ciclo de Krebs en forma de acetil coenzima A y es metabolizado a dióxido de carbono y agua (Fig. 2; Lieber, 1994).

En la célula hepática, la oxidación de etanol a acetaldehído puede darse a través de tres sistemas enzimáticos con orígenes, estructuras y mecanismos de reacción diferentes: el sistema microsomal de oxidación de etanol (MEOS) en el retículo endoplasmático liso, la catalasa localizada en los peroxisomas (Lieber, 1997) y la ADH localizada en el citosol (Fig. 2). Se considera que la mayor parte de la eliminación del etanol, aproximadamente el 90%, tiene lugar por la vía enzimática de la ADH, aunque existe cierta controversia en cuanto a la importancia de la contribución de los otros dos sistemas enzimáticos (Handler y col., 1986; Kato y col., 1987; Norsten y col. 1989).

ADH1 es la principal responsable de la eliminación de etanol en hígado con una capacidad de oxidación de 2 mmol etanol/min (Li, 1983). Se ha sugerido la posible contribución de ADH2 del hígado humano, pero sus constantes cinéticas con el etanol (Bosron y col., 1983) hacen pensar que sea limitada. Sin embargo, en casos de intoxicación alcohólica grave, en los que pueden alcanzarse concentraciones de etanol en sangre del orden de 50-100 mM, podría llegar a ser significativa (Li y col. 1977).

2.1.3.2 Metabolismo extrahepático del etanol

La eliminación extrahepática del etanol (aproximadamente el 10%) se realiza principalmente a través de la oxidación catalizada por la ADH, representada por las formas ADH1 y ADH4, que se distribuyen en numerosos órganos extrahepáticos (Tabla 2, Boleda y col., 1989; Parés y Farrés, 1995; Parés y col., 2001). Aunque es cuantitativamente poco importante, implica un nivel activo de oxidación de etanol en distintas células y tejidos del organismo. La contribución de este metabolismo se ha calculado en unos 0,4 mmol etanol/min, aumentando con la concentración sanguínea de alcohol (Li, 1983). La distribución de las diferentes clases de ADH, a nivel de proteína y mRNA, así como sus actividades, se ha ido caracterizando en roedores y en humanos (Tabla 2). Hasta el momento, los tejidos más implicados son sobre todo piel, pulmón, estómago, intestino y riñón, en los cuales se han detectado las formas ADH1 y/o ADH4.

2.1.3.3 Metabolismo de etanol de primer paso

Numerosos estudios, realizados tanto en humano como en rata, han mostrado que la concentración de etanol en sangre puede ser apreciablemente menor cuando una misma dosis es administrada por vía oral en lugar de por vía intravenosa, indicando por tanto cierto metabolismo del etanol ingerido, antes de alcanzar la circulación periférica. Como ya se ha descrito anteriormente, el tracto gastrointestinal, el hígado y los pulmones serían capaces de metabolizar parte de este etanol antes de su llegada a la circulación general, lo que se conoce con el nombre de metabolismo de primer paso del etanol o *first pass metabolism* (FPM). Sin embargo, existe gran controversia en torno a la relevancia del FPM y al órgano donde tiene lugar predominantemente. Mientras que los trabajos de Lieber y colaboradores apuntan a una preponderancia del estómago como lugar del FPM del etanol (Caballería y col., 1987; 1989; Lim y col., 1993), otros autores lo sitúan como un fenómeno predominantemente hepático (Han y col., 1998; Levitt y col., 1994; Levitt, 1997). Multitud de factores, además, pueden influir sobre el FPM del etanol, como son el alcoholismo crónico, el ayuno o la ingestión conjunta de alimentos y etanol, la velocidad de vaciado gástrico, la edad, el sexo, y la morfología gástrica que puede verse modificada por estados patológicos como la gastritis, la infección por *Helicobacter pylori* o la desnutrición (Furne y Levitt,

1999; Jones y col., 1997; Lieber y col., 1995; Oneta y col., 1998; Pozzato y col., 1995; Seitz y col., 1993; Simanowski y col., 1998).

La contribución de la ADH en el FPM ha sido ampliamente estudiada (Han y col., 1998; Parés y Farrés, 1995; Parés y col., 2001; Yin y col., 1990). Basándose en la elevada eficiencia frente al etanol de la ADH4 humana ($K_m = 37 \text{ mM}$ y $k_{cat} = 1500 \text{ min}^{-1}$; Farrés y col., 1994) y a su elevada expresión en el tracto digestivo superior y estómago (Tabla 2) se ha postulado que podría ser la responsable del metabolismo de primer paso en estos tejidos (Lim y col., 1993; Moreno y Parés, 1991; Seitz y col., 1993). Por el contrario, ADH1 sería la que contribuiría al FPM y ADH2 en humanos, si el fenómeno se sitúa preferentemente en hígado (Han y col., 1998; Levitt, 1997; Levitt y col., 1994).

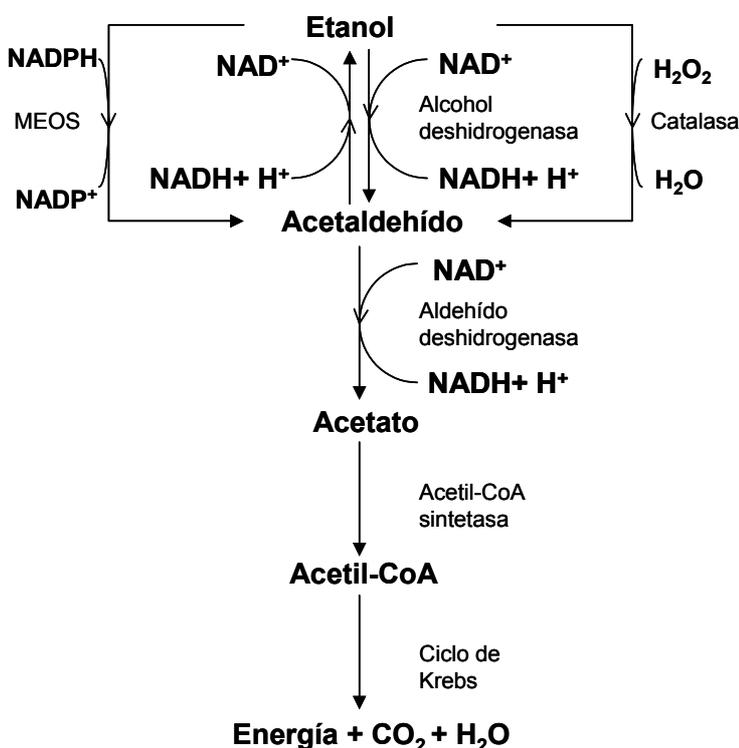


Figura 2. Sistemas enzimáticos de oxidación del etanol

2.1.4 Metabolismo del acetaldehído

2.1.4.1 Toxicidad del acetaldehído

El acetaldehído es de 10 a 30 veces más tóxico que el etanol, es mutagénico y teratogénico. La toxicidad del acetaldehído se debe, en parte, a su capacidad de formar aductos con diversas moléculas, principalmente con proteínas (Gross y col., 1994; Rintala y col., 2000; Tuma y col., 1996; Worrall y col., 1998), resultando en la

producción de anticuerpos, inactivación de diversas moléculas con actividad biológica e inhibición de la reparación del DNA. Además, puede afectar a la síntesis y secreción de proteínas (Lieber, 1995), desencadenar la formación de cataratas en el cristalino (Jedziniak y Rokita, 1983), promover la peroxidación lipídica a través de su unión al glutatión reducido (Salaspuro, 1985) e inducir alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias, reduciendo su capacidad respiratoria (Lieber, 1995). Por otra parte, el acetaldehído provoca la liberación de catecolaminas en las células cromafines de la médula adrenal y en las terminaciones sinápticas (Akabane, 1970), así como la liberación de histamina, bradiquinina y prostaglandinas en diferentes tipos celulares (Lieber, 1997, 2000). De forma que, cuando los niveles de acetaldehído se ven especialmente incrementados, aumenta la presencia de estas aminas vasoactivas en el plasma, desencadenando una sintomatología de origen alérgico, conocida con el nombre genérico de rojez facial o “*flushing*”, y caracterizada por un aumento de la temperatura dérmica, vasodilatación periférica y eritema cutáneo, aceleración del ritmo cardíaco, mareos, cefaleas, náuseas, vómitos ocasionales, hipotensión y broncoconstricción (Whitfield y Martin, 1993; Wolf, 1972; Zeiner y col., 1979).

2.1.4.2 Eliminación del acetaldehído

La oxidación del acetaldehído a acetato, segundo paso en la eliminación del etanol, se produce prácticamente en su totalidad en el hígado a través de tres sistemas enzimáticos: aldehído deshidrogenasa (ALDH), que requiere NAD^+ como aceptor de electrones (Arnon y col., 1995; Ehrig y col., 1990), aldehído oxidasa, dependiente de oxígeno (Mira y col., 1995) y el sistema recientemente descrito como sistema microsomal de oxidación de acetaldehído (MAOS), que requiere la participación de citocromos P-450 y cataliza la oxidación acoplada a la oxidación del NADPH, análoga a la descrita para el MEOS (Kunitoh y col., 1996; Terelius y col., 1991). De estos tres sistemas, el más importante es la ALDH, el cual es responsable no sólo del metabolismo del acetaldehído sino también de otros grupos aldehído, como los presentes en las monoaminas biogénicas, diaminas y poliaminas, en la oxidación del retinal y de aldehídos generados en los procesos de peroxidación lipídica (Ambroziak y Pietruszko, 1991). Existen múltiples formas moleculares de la ALDH en el hígado humano y de rata, pero sólo ALDH1 y ALDH2 parecen estar involucradas en la oxidación del acetaldehído. ALDH1 presenta una alta K_m (30 μM), con una expresión constitutiva y abundante en la fracción citosólica de la célula. ALDH2 o ALDH de baja K_m (3 μM), localizada en la fracción mitocondrial, es la principal responsable de la oxidación del acetaldehído en el hígado. Existen otras varias ALDHs citosólicas, con una K_m para el acetaldehído muy superior y, en consecuencia, con menor importancia en el metabolismo de este compuesto (Perozich y col., 1999).

2.2 Metabolismo y mecanismo de acción de los retinoides

2.2.1 Propiedades de los retinoides

El término retinoide hace referencia a cada una de las formas naturales o sintéticas de la vitamina A o retinol y a todos sus derivados, con o sin actividad biológica. Los retinoides están compuestos por tres dominios estructurales: un anillo de β -ionona, una cadena carbonada poliinsaturada y un grupo polar. Tanto el anillo como la cadena carbonada son de naturaleza marcadamente apolar, lo que hace que los retinoides sean moléculas hidrofóbicas. En cuanto al grupo polar, puede presentar tres estados de oxidación: alcohol, aldehído y ácido carboxílico. Además, los dobles enlaces de la cadena carbonada pueden presentar diversos estados de isomerización, siendo los más frecuentes: *todo-trans*, *9-cis*, *11-cis* y *13-cis* (Fig. 3).

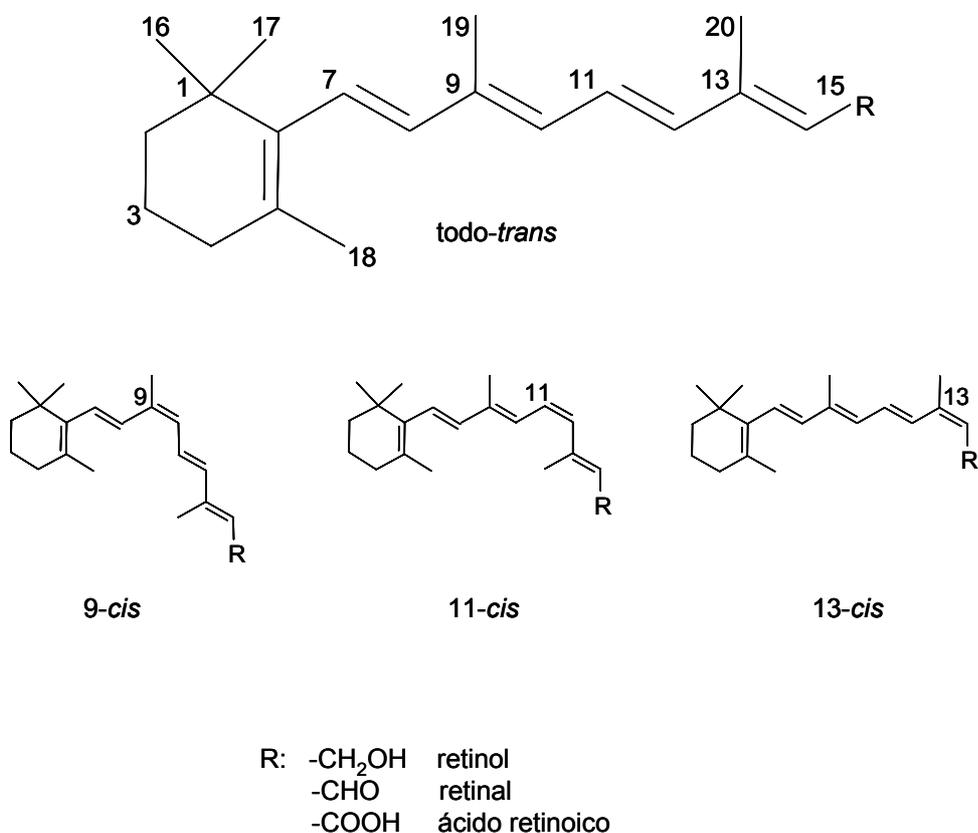


Figura 3. Estructura química de diferentes retinoides. Se indican las diferentes partes de la molécula y la numeración de los átomos de carbono.

2.2.2 Absorción y biosíntesis

La vitamina A se obtiene a partir de fuentes animales, en forma de ésteres de retinol, retinol y una pequeña cantidad de ácido retinoico (AR), y por la ingestión de frutas y verduras en forma de carotenoides.

Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen del intestino delgado, a retinol, el cual junto con el retinol proveniente de la dieta es captado por las células de la mucosa intestinal, los enterocitos. Al ser insoluble, el retinol requiere su emulsión con sales biliares y ácidos grasos libres para poder ser captado por las células. Finalmente, la pequeña cantidad de AR obtenida directamente de la dieta es absorbida por las células de la mucosa y llevado a la circulación portal, donde unido a la albúmina será repartido al resto del organismo.

Los carotenoides, entre los que destaca el β -caroteno como más activo, se absorben intactos en el lumen intestinal por difusión pasiva, y en los enterocitos son convertidos en retinol por un mecanismo bioquímico no del todo caracterizado. Para ello, el β -caroteno, a través de la reacción catalizada por la 15,15'-dioxigenasa citosólica, es escindido dando lugar a dos moléculas de retinal. Del retinal generado, un pequeño porcentaje, puede ser oxidado a AR y pasar a la circulación unido a albúmina. El resto es convertido a retinol por una reductasa microsomal del enterocito.

En el interior del enterocito, el retinol unido a la proteína unidora de retinol celular tipo II (CRBP-II), es esterificado con ácidos grasos de cadena larga por acción del enzima lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT). En la misma mucosa intestinal, los ésteres de retinol son empaquetados en los quilomicrones, que son secretados al sistema linfático, y después pasan a la circulación general para ser captados por las células parenquimáticas del hígado a través de receptores específicos. Es durante esta captación cuando los ésteres de retinol son hidrolizados a retinol en la membrana plasmática de estas células hepáticas. El retinol generado, insoluble en el entorno celular acuoso, se une a una proteína celular unidora de retinol (CRBP), y este complejo es transferido a las células estrelladas del hígado, donde el retinol se almacena en forma de ésteres de retinol.

Cuando el retinol es requerido por células y tejidos, se moviliza a partir de estos ésteres de retinol, cuya hidrólisis es catalizada por el enzima hidrolasa de ésteres de retinol (REH) de las células hepáticas, y es secretado a la circulación general unido a una proteína plasmática transportadora de retinol (RBP), que a la vez se compleja con otra proteína, la transtiretina (TTR), para reducir la filtración glomerular del retinol.

La mayor parte del retinol (más del 90%) que entra en las células se recicla hacia el plasma, mientras que una pequeña parte se esterifica para su almacenaje, se activa a ácido retinoico o bien es catabolizada (Blomhoff, 1994).

2.2.3 Síntesis de ácido retinoico

La formación de AR, a partir de retinol, implica dos etapas de oxidación. Una primera oxidación de retinol a retinal que es reversible y el paso limitante de la vía; y una segunda oxidación de retinal a ácido retinoico, que es una reacción irreversible (Fig. 4).

2.2.3.1 Oxidación del retinol

Los enzimas que catalizan la oxidación fisiológica del retinol no han sido del todo establecidos. Básicamente, se han propuesto dos familias de enzimas para la catálisis de esta reacción: las alcohol deshidrogenasas citosólicas de cadena media (MDR-ADH) (Boleda y col., 1993; Duester 1996; Napoli, 1996; Yang y col., 1994) y las alcohol deshidrogenasas de cadena corta citosólicas o microsomales (SDR-ADH) (Duester 1996; Napoli, 1996).

Varias formas enzimáticas de la ADH de rata y humana oxidan diferentes isómeros de retinol a retinal *in vitro*: ADH1, ADH2 y ADH4 (Duester, 1996; Napoli, 1996), aunque recientemente también se ha involucrado a ADH3 (Molotkov y col., 2002b). Estudios genéticos con ratones *knock-out* han demostrado la participación *in vivo* de ADH1, ADH3 y ADH4 en el metabolismo del retinol (Deltour y col., 1999a; 1999b; Molotkov y col., 2002a, 2002b). A ADH1 se le ha atribuido una importante función protectora frente a la toxicidad del retinol (Molotkov y col., 2002a), mientras que ADH4 intervendría en la producción *in vivo* de este morfógeno durante la embriogénesis (Deltour y col., 1999a; 1999b; Molotkov y col., 2002a), dada la colocalización de su expresión con el patrón de producción del AR durante el desarrollo embrionario, y el descenso de la supervivencia fetal, durante la deficiencia en vitamina A, en los ratones *knock-out* (Ang y col., 1996a; 1996b; Deltour y col., 1999a; 1999b; Haselbeck y col., 1997b; 1998). ADH2 cataliza de forma eficiente la oxidación del retinol (Han y col., 1998; Yang y col., 1994), pero representa tan sólo el 2% de la actividad retinol deshidrogenasa citosólica en el hígado, mientras que ADH1 contribuye en más de un 80% (Popescu y Napoli, 2000). Además, la distribución tisular tan reducida de ADH2 y las importantes diferencias cinéticas entre mamíferos, sugiere que no debe tener una función conservada evolutivamente como retinol deshidrogenasa.

Recientemente, en nuestro grupo se ha demostrado que la aldo-ceto reductasa de *Gallus domesticus*, presenta actividad retinol deshidrogenasa con propiedades similares a ADH4 de mamífero y ADH8 de anfibio (Crosas y col., 2001).

Las retinol deshidrogenasas de la superfamilia SDR-ADH son también capaces de oxidar retinol o de reducir retinal, utilizando $\text{NAD}^+(\text{H})$ o $\text{NADP}^+(\text{H})$ como coenzima. Se han descrito, básicamente, en hígado y en ojo de mamíferos, con una localización subcelular que puede ser citoplasmática o microsomal. Entre ellas cabe citar la retinol deshidrogenasa de hígado de roedor (RoDH, Chai y col., 1995; 1996; 1997; Gough y col., 1998), la 11-*cis*-retinol deshidrogenasa (11*cis*RDH), de retina (retSDR1), y la

retinol deshidrogenasa de fotorreceptor (prRDH). Presentan actividad cuando utilizan el retinol-CRBP, a diferencia de las MDR-ADH, que no son activas con el complejo sino solo con el retinol libre (Napoli, 1999), lo que ha puesto en duda la participación fisiológica de éstas en el metabolismo de los retinoides, en favor de las SDR (Napoli, 1999). Sin embargo, los trabajos con ratones deficientes en CRBP han demostrado que la síntesis de AR a partir de retinol se puede dar de manera normal en ausencia de CRBP (Quadro y col., 1999).

2.2.3.2 Oxidación del retinal

Existen dos mecanismos para la oxidación irreversible de los isómeros de retinal a los correspondientes de AR, uno que implica a algunas formas de la familia de las ALDH y otro al citocromo P-450.

En la familia de las ALDH, se han caracterizado al menos tres formas citosólicas capaces de catalizar la oxidación de retinal *in vitro*, en una reacción dependiente de NAD^+ : RALDH1 (denominada ALDH1 en humano, AHD2 en ratón y RALDH o RaLDHI en rata), RALDH2 (originariamente denominada enzima V2 de la retina de embrión de ratón o RaLDHII de testículo de rata y RALDH2 en humano) y RALDH3 (inicialmente conocida como ALDH6, Duester, 2001; Labrecque y col., 1995). RALDH1 y RALDH2 producen AR tanto a partir de retinal libre como unido a la CRBP, presentando la segunda una actividad catalítica 15 veces superior a la de RALDH1 (Duester, 2000; Napoli, 1999). RALDH1 y RALDH2 se distribuyen en tejidos dependientes de AR para el normal desarrollo embrionario y el mantenimiento y buen funcionamiento en la vida adulta (Tabla 5).

Tabla 5. Miembros de la familia ALDH con actividad retinal deshidrogenasa en mamífero

Enzima	Patrón de expresión
RALDH1	Desarrollo embrionario: ojo, timo y mesonefros. Adulto: ojo, pulmón, hígado, intestino, esófago, estómago, riñón, cerebro, dermis, glándula adrenal y tejidos reproductores.
RALDH2	Desarrollo embrionario: vesículas ópticas, somitas, corazón, médula espinal y mesonefros. Adulto: bulbo olfatorio y meninges y órganos reproductores, con elevada expresión en testículos y útero.
RALDH3	Desarrollo embrionario: tejidos oculares y cerebrales, con una expresión preferente en epitelios y tejidos neurosensitivos (p.e. vesículas ópticas, vesícula óptica, placas olfatorias, retina y el epitelio pigmentado dorsal). Adulto: Estómago, piel, riñón, glándulas salivares, epitelio de la glándula

mamaria.

Ang y Duester, 1997; Cheung y col., 1999; Duester, 2001; Grün y col., 2000; Haselbeck y col., 1999; Hsu y col., 1994; Li y col., 2000; McCaffery y col., 1994; 1999; Mic y col., 2000; Napoli, 1999; Niederreither y col., 1997; Parés y Farrés, 1995; Parés y col., 2001; Zhao y col., 1996.

Algunos miembros de la familia de los citocromos P-450, P-4501A1 y 1A2, son capaces de oxidar el retinal a AR, siendo 1A1 la forma más activa (Roberts y col., 1992; Raner y col., 1996). Sin embargo, lo hacen con unos valores de K_m (p.e., 12 mM con retinal) de escasa significación fisiológica (Roberts y col., 1992; Raner y col., 1996; Tomita y col., 1996).

2.3 Mecanismos de acción de los retinoides

La acción de los retinoides está mediada por receptores nucleares pertenecientes a la familia de receptores de hormonas esteroides, tiroideas y de la vitamina D, que actúan como factores de transcripción (Napoli, 1996; Ross y col., 2000). Se han descrito dos tipos de receptores nucleares de retinoides, RAR y RXR, con sus respectivos subtipos α , β y γ , codificados por genes independientes con una distribución tisular específica. Los RAR pueden unir tanto *todo-trans* como el isómero *9-cis* de ácido retinoico, así como el 4-oxoretinol, pero no tienen afinidad por el isómero *13-cis*, mientras que los receptores RXR tan sólo tienen afinidad por el *9-cis*-AR (Mangelsdorf, 1994).

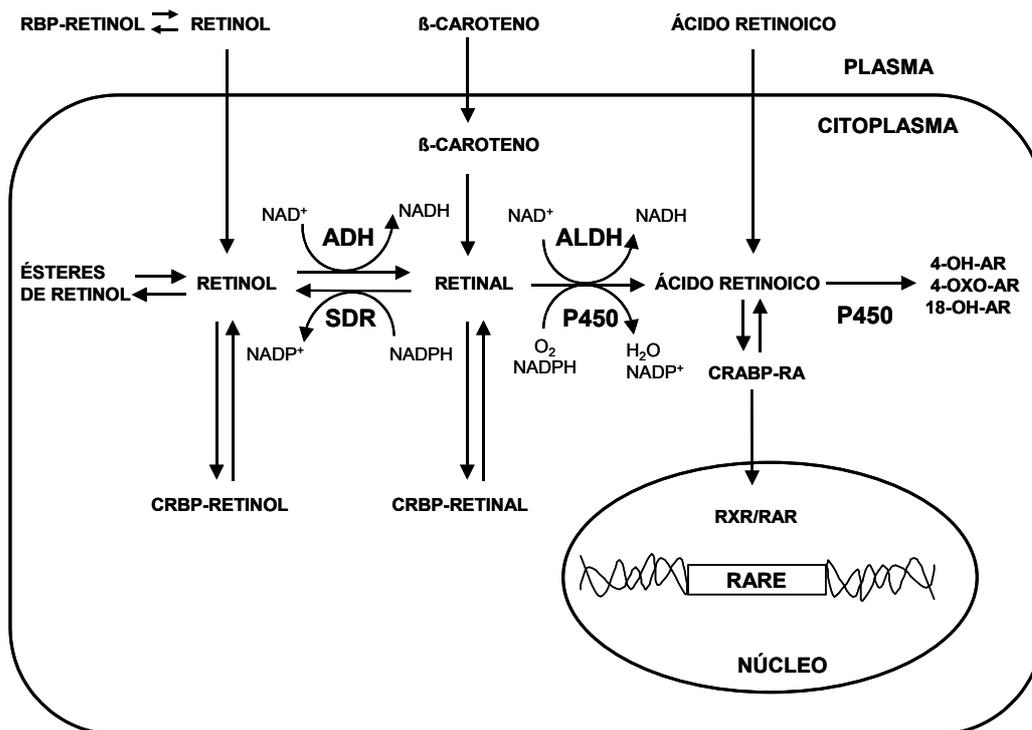


Figura 4. Vía de síntesis de AR. El retinol es transportado en el plasma unido a la RBP y es captado por las células diana uniéndose a la CRBP, la cual favorece su entrada. El retinol puede ser convertido a ésteres de retinol para ser almacenado, o convertido a AR. La síntesis de AR implica la oxidación de retinol a retinal por enzimas de la familia ADH y SDR, seguida de la oxidación del retinal por formas específicas de la ALDH y del citocromo P-450. El AR se une a receptores nucleares específicos, los cuales median la regulación de la transcripción de los genes diana. El catabolismo del AR es mediado por enzimas del citocromo P450, RAI-1 y RAI-2, que convierten el AR en metabolitos más polares e inactivos como son el 4-oxo, 4-OH y el 18-OH todo-*trans*-AR (Ray y col., 1997, White y col., 1997; 2000).

Los receptores de AR actúan sobre la transcripción génica, uniéndose en forma de dímeros a secuencias específicas, presentes en la región promotora de genes diana, denominadas elementos de respuesta a retinoides (RARE) (Fig. 4; Mangelsdorf, 1994). Los receptores RXR son capaces de formar homodímeros (RXR-RXR) y también heterodímeros con otros receptores de ácido retinoico (RXR-RAR), de hormona tiroidea (RXR-TR), de vitamina D (RXR-DR) y con el receptor activado de los proliferadores de peroxisomas (RXR-PPAR) (Chu y col., 1995a; 1995b). En contraste, los RAR sólo forman heterodímeros con los RXR (Napoli, 1996). Los receptores RAR y RXR presentan una distribución tisular específica y diferenciada durante el desarrollo embrionario y en el adulto, lo que sugiere que cada uno de ellos tiene una función específica en la regulación de la transcripción de genes específicos, hipótesis reforzada por los estudios con animales “*knock-out*” (Chambon, 1993; Grondona y col., 1996; Krezel y col., 1998; Lampron y col., 1995; Lohnes y col., 1993; Lufkin y col., 1993).

Los retinoides pueden tanto estimular como reprimir la transcripción génica, dependiendo de la cantidad y tipo de receptores presentes, así como de la concentración de sus ligandos (Napoli, 1996). Son esenciales para el desarrollo de los vertebrados y el mantenimiento de los tejidos en la vida adulta. En general, regulan una variedad de procesos fisiológicos fundamentales que incluyen la visión, la reproducción, el desarrollo óseo, y el patrón de formación durante la embriogénesis (Gudas y col., 1994; Love y Gudas, 1994; Ross y col., 2000). Además, algunos retinoides son capaces de modular el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, suprimiendo la carcinogénesis en una amplia variedad de tipos tisulares (Figura 5).

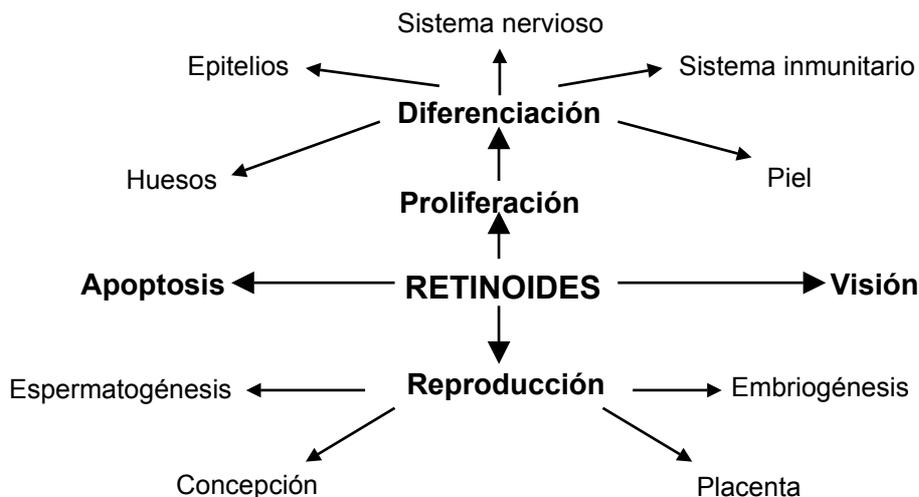


Figura 5. Funciones de los retinoides

En general, en la hipovitaminosis o deficiencia en vitamina A, los niveles en sangre disminuyen hasta valores inferiores a 15 µg por 100 ml (los valores normales son de 20-50 µg por 100 ml de sangre). Las causas más frecuentes son la desnutrición en los pueblos subdesarrollados, y el alcoholismo en los desarrollados. Es común, también, en áreas como el sudeste de Asia (Ahmed, 1999), donde el arroz refinado, faltarle vitamina A, es la mayor fuente de alimento. El primer síntoma de deficiencia en vitamina A es generalmente la ceguera nocturna, seguida de formación y aparición de manchas de aspecto espumoso (manchas de Bitot) en la esclerótica del ojo, endurecimiento y aparición de cicatrices en la córnea, y finalmente la xeroftalmia, que puede llevar a una ceguera permanente (Smith y Steinemann, 2000). También se ha descrito la pérdida de las células caliciformes en la conjuntiva y un descenso en las microvellosidades en la conjuntiva y córnea y alteraciones en las células del epitelio pigmentado y degeneración y desaparición de las células fotorreceptoras (Amemiya, 2000). La piel y la mucosa de los pulmones,

intestino y tracto urinario pueden verse endurecidas. En la piel, provoca inflamación (dermatitis) y un aumento en la susceptibilidad a infecciones. La deficiencia en vitamina A materna resulta en un incremento en la mortalidad fetal así como una variedad de malformaciones congénitas siendo los tejidos más afectados el corazón, ojo y sistemas respiratorio, urogenital y circulatorio. Estas anomalías pueden ser revertidas por suplementos de vitamina A (Ross y col., 2000).

La hipervitaminosis o exceso en vitamina A también produce toxicidad, que puede ser aguda o bien crónica si es debida a una toma durante un periodo de tiempo largo. Los síntomas (somnolencia, irritabilidad, cefaleas y vómitos, entre otros) pueden aparecer de forma ocasional en pacientes que toman isotretinina o ácido 13-*cis*-retinoico (Accutane®, Roaccutan®) para la prevención y cura de enfermedades de la piel, como el acné. La toxicidad crónica, sobretodo en los niños, puede desarrollarse a las pocas semanas de iniciado el tratamiento, presentando como primeros síntomas cabello áspero y ralo, pérdida parcial de las cejas, labios cortados y piel seca y enrojecida y descamación cutánea. Aparecen posteriormente cefaleas severas, incremento de la presión cerebral y flojedad. Son comunes, sobretodo en los niños, engrosamiento óseo y dolor articular. El hígado, el bazo y los riñones pueden verse agrandados. Se ha descrito, además, que la administración de ácido 13-*cis*-retinoico para el tratamiento del acné, parece tener efectos en el ojo, algunos de los cuales no revierten incluso después de acabar el tratamiento, tales como el ojo seco y la disminución de la adaptación de la visión a la oscuridad (Lerman, 1992). Debe mencionarse que la hipervitaminosis en modelos animales de rata, ha demostrado afectar al epitelio pigmentado y los niveles de alcohol deshidrogenasa (Amemiya, 2000). Cabe destacar, finalmente, la teratogenia y los defectos en el nacimiento, detectados por una ingesta en exceso de vitamina A, por tratamiento con ácido 13-*cis*-retinoico o por dietas enriquecidas en vitamina A durante el embarazo, tal y como muestran numerosos estudios epidemiológicos (Ross y col., 2000). Los tejidos más susceptibles al exceso de vitamina A durante el desarrollo son el corazón, cráneo, esqueleto, extremidades, ojos y las estructuras craneofaciales (Ross y col., 2000).

2.4 Eliminación de productos de la peroxidación lipídica por la ADH

La peroxidación lipídica es un fenómeno por el cual son oxidados los lípidos poliinsaturados. Las membranas que delimitan las células y orgánulos subcelulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, potencialmente peroxidables y susceptibles de sufrir deterioro. La peroxidación genera una gran cantidad de compuestos que incluyen alcanales, 2-alquenes y 4-hidroxi-2-nonenales, muchos de los cuales exhiben citotoxicidad, actividad inhibidora del crecimiento y genotoxicidad (Comporti, 1998). Se conocen varios mecanismos de desintoxicación para estos aldehídos, como la conjugación con el glutatión (espontánea o catalizada

por la glutatión transferasa), la oxidación por la aldehído deshidrogenasa y la reducción por la alcohol deshidrogenasa y la aldehído reductasa. La contribución relativa de cada vía es todavía objeto de una activa investigación (Canuto y col., 1994; Comporti, 1998).

Los formas enzimáticas ADH1, ADH2 y ADH4 presentan capacidad para reducir compuestos generados durante la peroxidación lipídica, tales como el 4-hidroxinonanal, hexanal y 2-hexenal, a sus correspondientes alcoholes. Las constantes cinéticas apoyan el papel de ADH1 en la reducción de estos aldehídos, de forma similar en rata (Boleda y col., 1993) y en humano (Sellin y col., 1991). ADH4 presenta una elevada actividad aunque con unos valores de K_m superiores a las concentraciones fisiológicas de estos aldehídos, que se mueven en un rango micromolar (Allali-Hassani y col., 1998; Boleda y col., 1993). Sin embargo, la concentración intracelular puede llegar a ser mucho mayor en determinados estados patológicos.

La contribución de la ADH en la desintoxicación de estos aldehídos dependerá en último término de la cantidad y la clase de ADH presente en el tejido, y de la presencia de otros sistemas involucrados en esta función. Un gran número de trabajos han demostrado que, en el hígado y en hepatocitos en cultivo, la glutatión transferasa y la ADH son los sistemas predominantes (Canuto y col., 1994; Lindahl, 1992). En otros órganos ricos en ADH1 y/o ADH4, como ojo, pulmón, estómago, o piel, existe cierta información sobre los niveles de peroxidación lipídica y los sistemas de defensa implicados (Babizhayer y Costa, 1994; Mufti y col., 1993; Salas y col., 1999; Verdejo y col., 1999; Veriac y col. 1993). La mayoría de estos órganos presentan ALDH3 (Algar y col., 1989; Hsu y Yoshida, 1993; Lindahl y Peterson, 1991; King y col. 1999), que es la ALDH que juega un papel complementario en la eliminación oxidativa de los aldehídos citotóxicos.

2.5 Metabolismo de las monoaminas

El catabolismo de las catecolaminas, dopamina y noradrenalina, y de la serotonina (o 5-HT) es catalizado en su primera etapa por la monoamina oxidasa, para formar aldehídos intermediarios, 5-hidroxiindol-3-acetaldehído (5-HIAL), 3,4-dihidroxiandaldehído y el 3,4-dihidroxiifenilacetaldehído. Normalmente, éstos y otros aldehídos son principalmente oxidados a sus correspondientes ácidos carboxílicos y excretados por la orina. La reducción de estos aldehídos es otra vía aunque minoritaria, que resulta en la formación de metabolitos tales como el 3,4-dihidroxiifeniletanol, 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) y el 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol. ADH1 cataliza la oxidorreducción *in vitro* de los metabolitos derivados de la dopamina y la oxidación del 5-HOTL (Consalvi y col., 1986; Mårdh y col., 1985; 1986).

3 PATOLOGÍA ALCOHÓLICA

El alcoholismo, con el consecuente consumo excesivo y crónico del alcohol, se asocia a una amplia variedad de procesos inflamatorios y/o degenerativos que afectan a una amplia variedad de órganos y sistemas del organismo, entre los que destacan el sistema digestivo que incluye el hígado, el tracto gastrointestinal y el páncreas, el sistema vascular y el sistema nervioso central y periférico.

3.1 Lesiones hepáticas

El hígado es el órgano que más padece la toxicidad por consumo de alcohol, debido a su activo metabolismo con la consecuente generación de acetaldehído, potencial reductor (NADH) y radicales libres. Los pacientes alcohólicos o modelos animales de alcoholismo presentan un amplio espectro de lesiones hepáticas, algunas de ellas conocidas desde hace mucho tiempo, como son la esteatosis, la hepatitis alcohólica y la cirrosis. Otras son menos frecuentes y reconocidas desde hace menos tiempo, como la esteatosis microvesicular, la esclerosis perivenular y la hepatitis crónica alcohólica (Lieber, 1994; 1997; Stauber y col., 1995).

El metabolismo del etanol genera un incremento de la concentración de NADH en el citoplasma celular (Lieber, 1994; 1997). Junto con la disociación del complejo ADH-NADH, la regeneración del NAD^+ a partir del NADH parece ser el paso limitante del metabolismo del etanol (Bosron y col., 1983; Cronholm, 1985). En el citosol hepático, la relación de $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ se ve disminuida del orden de 10 veces debido al metabolismo de dosis agudas de etanol. El cambio del potencial redox podría explicar las perturbaciones causadas por el etanol en el metabolismo hepático de ciertos esteroides, aminas biógenas y retinoides (Lieber, 1994).

3.2 Alteraciones en el sistema vascular

El consumo de alcohol en exceso, sobretodo crónico, afecta al sistema vascular con la aparición de desordenes tales como el aumento de la presión sanguínea, hematomas debidos a la rotura de vasos sanguíneos, ciertas alteraciones del ritmo cardiaco, enfermedad coronaria y el infarto (Stoschitzky, 2000).

3.3 Manifestaciones gastrointestinales del alcoholismo

El alcohol se absorbe en el estómago y, sobretodo en la primera porción del intestino delgado, por lo que la concentración alcanzada en las primeras porciones del tracto gastrointestinal es muy alta. En consecuencia, aunque el alcohol está asociado a alteraciones en todo el aparato digestivo, el desarrollo de lesiones a este nivel se ven favorecidas. Tanto el consumo crónico como la ingestión aguda de etanol causa una amplia variedad de síntomas gastrointestinales (Tabla 6).

Tabla 6. Efectos del alcohol sobre el tracto digestivo

Boca	Reducción de la secreción salivar y aumento de su viscosidad Sialoadenosis
Esófago	Alteraciones motoras y deterioro de la mucosa Disminución de la presión de los esfínteres esofágicos Esofagitis por reflujo Epitelio de Barret Ulceración y hemorragias Síndrome de Mallory-Weiss Cáncer de esófago
Estómago	Cambios en la secreción ácida Aparición de gastritis y úlcera péptica Deterioro y lesiones en la mucosa gástrica Retraso del vaciado gástrico
Intestino delgado	Alteraciones morfológicas de la mucosa duodenal y yeyunal Disminución de la actividad de los enzimas de la mucosa Alteración de los mecanismos de transporte Malabsorción Diarrea
Intestino grueso	Aumento del peristaltismo Alteraciones morfológicas de la mucosa Cáncer de colon y recto Hemorroides y varices colónicas

Baraona y col., 1975; Bujanda, 2000; Fanceschi y La Vecchia, 1994; Garro y Lieber, 1990; Kaufman y Kaye, 1978; 1979; Kelly y col., 1995; Kune y Vitteta; 1992; Lieber, 1995; 2000; Longnecker, 1995; Mazzanti y Jenkins, 1987; Rothman, 1980; Rubin y col., 1972; Seitz y col., 2001; Simanowski y col., 1994; 1995; Thomas, 1995; Tillotson y col., 1981.

La naturaleza y la magnitud de los cambios inducidos por el etanol dependerán del segmento del tubo, la dosis y la duración de la exposición al etanol, y en algunos casos del tipo de bebida alcohólica o la presencia de comida (Lieber, 1982). El abuso del alcohol se ha descrito como un factor de riesgo de cáncer en el sistema digestivo, con una asociación particularmente elevada en los cánceres relacionados con la parte superior: cavidad oral, orofaringe, laringe y esófago, así como con la región colorectal, tanto en humano como en modelos animales (Tabla 6; Garro y Lieber, 1990; Longnecker, 1995; Rothman, 1980; Seitz y col., 1990; 2001).

3.4 Efectos del consumo de alcohol en el SNC

Los desórdenes neurológicos son complicaciones comunes del abuso alcohólico agudo o crónico. A pesar de la elevada frecuencia con que los alcohólicos crónicos presentan alteraciones neurológicas, no se conoce del todo bien su etiología. Hasta hace poco, se consideraba que los efectos psíquicos y somáticos del alcohol eran el resultado de las propiedades fluidificantes no específicas de esta droga sobre las membranas celulares. Sin embargo, en los últimos 20 años se han identificado interacciones específicas y saturables entre el etanol y algunos sistemas neurotransmisores, como dopamina, serotonina, GABA, glutamato y opiáceos endógenos, así como sistemas de segundos mensajeros (Eckardt y col., 1998). Los efectos farmacológicos del alcohol parecen ser la suma de su interacción con estos múltiples sistemas. La contribución diferente de cada sistema de neurotransmisión, así como su diferente respuesta según la concentración o dosis de etanol, podrían constituir las bases neuroquímicas de los efectos conductuales del etanol. Así pues, los efectos estimuladores o euforizantes, sedantes o narcóticos, ansiolíticos y de refuerzo del etanol tienen lugar dentro de un rango relativamente estrecho de diferentes dosis de etanol, por lo que, a una cierta concentración, un sistema receptor específico puede ser más importante que otro en la contribución a un efecto conductual particular (Eckardt y col., 1998).

El consumo crónico de alcohol afecta a regiones muy específicas del SNC, tales como el cerebelo y determinadas regiones de la corteza cerebral (Bengochea y Gonzalo, 1990; Franke y col., 1997; Hunt y Nixon, 1993; Pentney, 1993; Walker y col., 1993). Estos cambios en las diferentes regiones cerebrales de los alcohólicos [p.e., reducción del volumen de la sustancia blanca cerebelosa, descenso en la densidad celular de las neuronas de Purkinje, atrofia de la capa molecular, etc (Karhunen y col., 1994; Pentney, 1993)] se pueden correlacionar con una sintomatología clínica específica recogida en la Tabla 7.

3.5 Efectos del alcohol sobre la visión

Desde hace mucho tiempo se conoce que tanto la intoxicación alcohólica aguda como crónica alteran la función visual. La neuropatía óptica retroglobular es una de las patologías más frecuentes en el curso de la intoxicación alcohólica crónica que a pesar de suprimir el consumo puede conducir a atrofia óptica y ceguera irreversible (Pinazo-Durán y col., 1999; Shimozone y col., 1998). Por otra parte, se ha demostrado que la intoxicación alcohólica crónica durante el embarazo, provoca alteraciones ultraestructurales sobre la retina y nervio óptico que afectan a neuronas y sus axones, astrocitos, oligodendrocitos y mielina (Pinazo-Durán y col., 1993).

Tabla 7. Enfermedades neurológicas más comunes asociadas al alcoholismo

INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA AGUDA	Desinhibición Amnesias o lagunas alcohólicas Pérdida del equilibrio y coordinación motora Traumatismos y hematomas subdurales Infecciones Crisis de hipoglucemia
INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA CRÓNICA	
Síndrome de abstinencia enólica	Temblor Alucinaciones Convulsiones <i>Delirium tremens</i>
Relacionadas con la toxicidad del etanol	Encefalopatía y demencia Degeneración o atrofia cerebelosa alcohólica Enfermedad de Marchiafava-Bignani Polineuropatía alcohólica Disautonomía alcohólica Desórdenes motores y del sueño Disminución de la memoria y capacidad de aprendizaje
Asociadas a la malnutrición	Enfermedad de Wernicke-Korsakoff Pelagra Neuropatía por beriberi
Otras alteraciones	Ambliopía alcohol-tabaco Mielinosis pontina central Enfermedades vasculares cerebrales Hematomas cerebrales Hemorragias intracerebrales y subaracnoidales

Bengochea y Gonzalo, 1990; Eckart y col., 1998; Franke y col., 1997; Hunt y Nixon, 1993; 1996; Pentney, 1993; Rintala y col., 2000; Thomas y col., 1998; Walker y col., 1993.

4 INTERACCIÓN ENTRE ETANOL Y RETINOIDES

El etanol es un inhibidor competitivo de la oxidación del retinol catalizada por ADH1 de rata y humana ($K_i = 0,037-3,8$ mM, en función de la isoforma) y por ADH4 de rata ($K_i = 0,6$ M) y humana ($K_i = 6-11$ mM) (Allali-Hassani y col., 1998; Han y col., 1998; Julià y col., 1987b; Kedishvili y col., 1998; Martras, 1998). Concentraciones de etanol de 5-50 mM, alcanzables en el consumo social de etanol, son suficientes para inhibir la oxidación del retinol por los enzimas humanos (Han y col., 1998; Kedishvili y col., 1998). Así pues, el etanol podría actuar indirectamente a través de la inhibición de la formación del AR, generando el daño de los tejidos diana que lo requieren. Esta

hipótesis está apoyada por estudios mutacionales de los genes RAR (Ross y col., 2000) que, en animales modelo, han revelado un fenotipo que incluye severas anormalidades craneofaciales similares a las que se observan en el síndrome alcohólico fetal (FAS; Blakley y Scott, 1984; Streissguth y Martin, 1983) y, por tanto, evidencian la necesidad del AR para el correcto desarrollo craneofacial (Lohnes y col., 1995), especialmente vulnerable a la acción del etanol. Esta hipótesis propone que el etanol causa los defectos craneofaciales del FAS por la inhibición de la síntesis de retinoide, crucial para el desarrollo embrionario, catalizada en su primera etapa por la ADH (Fig. 4; Deltour y col., 1996; Duester, 1991; 1998; Zachman y Grummer, 1998).