



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

NOMBRE DE LA TESIS

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS RELACIONADAS CON EL PROCESO
DE INFLAMACIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON EL CONSUMO DE ALCOHOL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

NORMA PATRICIA MORALES ROCHLIN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

**COMITÉ TUTORAL: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Dr. Guillermo Robles Díaz**

MÉXICO, D.F.

Junio del 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MORALES ROCHLIN NORMA PATRICIA** con número de cuenta **509014986** con la tesis titulada: **"POLIMORFISMOS DE CITOCINAS RELACIONADAS CON EL PROCESO DE INFLAMACIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON EL CONSUMO DEL ALCOHOL"** realizada bajo la dirección de : **DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIÉRREZ REYES.**

Presidente: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Vocal: DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ
Secretario: DRA. ESPERANZA GABRIELA GUTIÉRREZ REYES
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA
Suplente: DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de junio de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo brindado durante estos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado con número de registro 220338.

Al laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, en el Hospital General de México.

A los miembros del Comité Tutoral: Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes, a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y al Dr. Guillermo Robles Díaz.

A mis revisores de tesis: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza

AGRADECIMIENTOS

A mis padres a quienes debo todo, pues a pesar de saber que el tiempo apremia me han brindado todo su apoyo en su afán de educarnos y formarnos como hijos de provecho.

A mi directora de tesis: Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes por su empeño en mi formación académica y profesional a lo largo de todos estos años, por sus enseñanzas, sugerencias, críticas y correcciones, por la confianza y estímulo brindados para seguir creciendo intelectualmente.

A mis tíos y primos por acompañarme siempre en las etapas más importantes de mi vida y considerar mis logros como suyos también. A mis sobrinos, por hacer mi vida muy amena y llena de alegría y de los cuales me gustaría ser una fuente de inspiración para que lleguen más lejos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio quienes recorrimos juntos este camino apoyándonos y contribuyendo cada quien con algo de sí para lograr nuestro objetivo.

A aquellas personas que me acompañaron durante esta etapa y tuvieron que partir ante las vicisitudes de la vida, por su disposición en aclarar mis dudas, por sus substanciales sugerencias, por su amistad y por ayudarme en mi crecimiento espiritual, físico y mental.

Y por último “a mí misma por no dejarme vencer, pues en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno mismo...”

*A mis padres por su generosidad, paciencia y por
inculcarme el valor del amor, el cual nos
incita a seguir los demás valores...*

ÍNDICE

	pág.
1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	(8)
2. RESUMEN.....	(10)
3. INTRODUCCIÓN.....	(12)
3.1 El consumo de alcohol a nivel mundial.....	(12)
3.2 El consumo de alcohol en México.....	(13)
3.3 El consumo de alcohol en jóvenes universitarios.....	(14)
3.4 Efectos del alcohol sobre las funciones cognitivas en los jóvenes.....	(18)
3.5 Hígado y alcohol.....	(19)
3.5.1 Estructura hepática.....	(20)
3.5.2 Funciones del hígado.....	(21)
3.5.3 Pruebas de Función Hepática.....	(23)
3.5.4 Marcadores de alcoholismo.....	(27)
3.5.5 Metabolismo del etanol.....	(28)
3.5.6 Patrones del consumo de etanol.....	(31)
3.6 Respuesta inmune celular en el hígado.....	(36)
3.6.1 Células de Kupffer.....	(36)
3.6.2 Células Dendríticas.....	(37)
3.6.3 Células Natural Killer.....	(37)
3.6.4 Linfocitos B.....	(38)
3.6.5 Linfocitos T.....	(38)
3.7 Respuesta inmune molecular.....	(39)
3.7.1 Citocinas y quimiocinas.....	(39)

4. ANTECEDENTES.....	(41)
4.1 Modelos Experimentales.....	(41)
4.2 Polimorfismos genéticos de citocinas.....	(43)
5. HIPÓTESIS.....	(49)
6. OBJETIVO GENERAL.....	(50)
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	(50)
8. METODOLOGÍA.....	(51)
8.1 Casos y controles.....	(51)
8.2 Toma de muestras	(51)
8.3 Extracción de ADN genómico.....	(52)
8.4 Cuantificación y pureza del ADN.....	(52)
8.5 Integridad del ADN.....	(53)
8.6 Genotipificación.....	(53)
8.7 Análisis en gel de agarosa.....	(55)
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	(56)
10. RESULTADOS.....	(57)
11. DISCUSIÓN.....	(66)
12. CONCLUSIONES.....	(71)
13. ANEXOS.....	(72)
14. BIBLIOGRAFÍA.....	(77)

ABREVIATURAS

A: Adenina

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ALC: Cirrosis hepática por alcohol

ALD: Enfermedad hepática por alcohol

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

ALT: Alanina aminotransferasas

AP-1: Proteína 1 del activador

APC: Célula presentadora de antígeno

AST: Aspartato aminotransferasas

AUD: Desórdenes por el uso de alcohol

AUDIT: Test de identificación de desórdenes derivados por el consumo de alcohol

AWLD: Alcoholismo sin enfermedad hepática

BAC: Concentración de alcohol en sangre

C: Citosina

CDT: Transferrina deficiente de carbohidratos

CIDI: Entrevista diagnóstica internacional compuesta

CRDA: Consumo riesgoso y potencialmente dañino

CYP2E1: Citocromo P4502E1

DA: Dopamina

DCs: Células dendríticas

DSM-IV: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

EE: Error estándar

EMCA: Escala multidimensional de Craving de Alcohol

ENA: Encuesta Nacional de Adicciones

FasL: Ligando de Fas

G: Guanina

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GGT: Gamaglutamiltransferasa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias

HCM: Hemoglobina corpuscular media

HLA: Antígeno leucocitario humano

IFN: Interferón

IL: Interleucina

KCs: Célula de Kupffer

LDH: Deshidrogenasa láctica

LPS: Lipopolisacárido

LTc: Linfocitos T citotóxicos

LTh: Linfocitos T colaboradores

MEOS: Sistema microsomal oxidativo del etanol

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MIP: Proteína inflamatoria de los macrófagos

NAc: Núcleo accumbens

NF- κ B: Factor nuclear Kappa B

NIAAA: Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo

NKs: Células natural killer

NKT: Células natural killer T

OMS: Organización Mundial de la Salud

PC: Pancreatitis crónica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor activador de plaquetas

PFC: Corteza prefrontal

PFH: Pruebas de función hepática

SNPs: Polimorfismos de nucleótido simple

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

T: Timina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TLR: Receptor tipo toll

TNFR2: Receptor 2 de TNF

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VGM: Volumen corpuscular medio de eritrocitos

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VTA: Área ventral tegmental

RESUMEN

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS RELACIONADAS CON EL PROCESO DE INFLAMACIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON EL CONSUMO DE ALCOHOL

INTRODUCCIÓN: En México, el consumo de alcohol riesgoso y potencialmente dañino (CRDA) es frecuente entre los estudiantes de primer ingreso a la licenciatura. El consumo de alcohol agudo y crónico produce efectos diferenciales en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias a nivel sistémico. Polimorfismos en las regiones reguladoras de los genes de estas citocinas pueden favorecer o disminuir su expresión. **OBJETIVOS.** Determinar las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los genes: TNF alfa en las regiones -238G/A y -308G/A, IL10 en -1082G/A, -819C/T y -592C/A y TGF beta en -509 C/T y +869 C/T y determinar su posible asociación con el consumo excesivo de alcohol en una población mexicana de jóvenes universitarios. **MATERIALES Y MÉTODOS.** A 140 estudiantes voluntarios se les tomaron medidas antropométricas, y se les aplicaron los cuestionarios AUDIT, Craving y CIDI para definir su consumo de alcohol. Se obtuvieron 97 controles y 43 consumidores que se clasificaron en abuso y dependencia y de los cuales se extrajeron 20 mL de sangre periférica para biometría hemática y extracción de ADN de leucocitos, la genotipificación se realizó por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **RESULTADOS.** En la población consumidora de alcohol como en la no consumidora se encontró el polimorfismo que genera el productor intermedio de IL10, TNF alfa y TGF beta. Entre los consumidores, el alelo A (bajo productor) de -1082G/A de IL10 fue más frecuente en los sujetos con abuso, al igual que el alelo G (bajo productor) de TNF alfa de -308G/A. No hubo ninguna asociación de los haplotipos con el consumo excesivo de alcohol. **CONCLUSIONES.** Los polimorfismos en los genes que regulan IL-10, TNF alfa y TGF beta parecen no tener una asociación clara con el consumo excesivo de alcohol, posiblemente la influencia de otros factores podrían ejercer un papel en la segregación de alelos que podrían enmascarar la identificación de polimorfismos en nuestra población.

PALABRAS CLAVE: Alcohol, Polimorfismos, Citocinas.

ABSTRACT

CYTOKINE POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE INFLAMMATION PROCESS AND ALCOHOL CONSUMPTION

INTRODUCTION: In Mexico, risky alcohol consumption and potentially harmful (CRDA) is common among the freshmen to graduate. Acute and chronic alcohol consumption causes several effects on pro and anti-inflammatory cytokines production at systemic level. Polymorphisms in the regulatory regions of these genes can enhance or decrease their expression. **OBJECTIVES:** Determine the genotypic, allelic and haplotypic frequencies of TNF alpha (-238G/A and -308G/A regions), IL10 (-1082G/A,-819C/T and -592C/A) and TGF beta (-509C/T and +869C/T) and determine their possible association with excessive alcohol consumption in a mexican population of young students. **MATERIALS AND METHODS:** Anthropometric measurements were taken from a total of 140 volunteers students, and questionnaires AUDIT, CIDI and Craving were applied to define the alcohol consumption. 97 Controls were obtained and 43 consumers which were classified as abuse and dependence, 20 mL of peripheral blood were taken from all participants for hematic biometry and leukocyte DNA extraction, genotyping was performed by polymerase chain reaction technique (PCR). **RESULTS:** In the drinkers population and non drinkers we found the polymorphism that gives origin to the intermediate producer of IL10, TNF alpha and TGF beta. Among consumers, the A allele (low producer) of -1082G/A IL10 was more frequent in subjects with abuse, also the G allele (low producer) of TNF alpha of -308G/A. There was no association of haplotypes with excessive consumption of alcohol. **CONCLUSIONS:** Polymorphisms in genes that regulate IL10, TNF alpha and TGF beta seem to have no clear association with excessive alcohol consumption, possibly other factors may play a role in the segregation of alleles that could mask the identification of polymorphisms in our population.

KEY WORDS: Alcohol, Polymorphisms, Cytokines.

INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol a nivel mundial

Históricamente el consumo de alcohol forma parte integral de la vida diaria de muchas sociedades. En 2002, la Organización Mundial de la Salud reportó que el alcohol constituye uno de los 10 factores de riesgo más importantes para la salud en países desarrollados y en vías de desarrollo, junto con el tabaco, la presión sanguínea, el colesterol, la obesidad, baja ingesta de frutas y vegetales, inactividad física, drogas ilícitas, sexo inseguro y deficiencia de hierro, siendo el consumo de alcohol el responsable de aproximadamente 9.2% de la reducción de años de vida saludable en naciones al noreste de Europa, Centro y Sur de América y países del Este Asiático (Tsukamoto 2007, Spanagel 2009). La ingesta de alcohol *per capita* es alta en algunos países europeos (10 litros de etanol puro al año) en comparación con Norte América donde en la última década el promedio fue 8.5 litros por año y México de 3-5 litros por año (Spanagel 2009).

El Consejo Nacional de Alcoholismo y Dependencia de Drogas de Estados Unidos y la Sociedad Americana en Medicina Adictiva han definido al *alcoholismo* como una enfermedad crónica compleja en la que interactúan factores genéticos, psicosociales y ambientales que influyen su desarrollo y manifestaciones. Se caracteriza por la pérdida de control sobre la ingesta de alcohol a pesar de las consecuencias negativas, distorsión del pensamiento y de manera notable la negación de la ingesta. Cada uno de estos síntomas puede tener un curso continuo o periódico. Es una enfermedad grave, que puede ser progresiva y llevar a la muerte (NIAAA).

En los Estados Unidos el impacto socioeconómico y en la salud del consumo de alcohol se estima en 185 mil millones de dólares anuales, costo que incluye tratamiento, enfermedades asociadas con la ingesta excesiva, comorbilidades, crímenes, abuso maternal, cuidado perinatal, apoyo federal en alimentos y pérdida de tiempo laboral. Otros costos económicos que no se han podido estimar son los relacionados con la violencia doméstica, el abuso infantil o la pérdida de vida productiva (Harwood 2000).

El consumo de alcohol y sus complicaciones entre los estudiantes de educación superior ha sido identificado por el gobierno federal como un problema de salud pública mayor, que aqueja a las universidades (US Department of Health and Human Services). Se ha estimado que el consumo de bebidas alcohólicas en las instituciones de educación superior de ese país puede relacionarse anualmente con la muerte de 1,400 estudiantes, 500,000 lesiones, 600,000 agresiones físicas y 70,000 agresiones sexuales (Hingston *et al.* 2002). Debido a que se ha observado que la prevalencia del consumo de alcohol y problemas relacionados es generalmente mayor en los estudiantes universitarios que entre los jóvenes de la misma edad que no son estudiantes (Johnston *et al.* 2003, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Slutske 2004), se ha sugerido que la población estudiantil de estos centros de educación superior es un grupo de mayor riesgo para el desarrollo de problemas asociados al consumo de alcohol (Slutske 2004, Brower 2002).

El consumo de alcohol en México

En México, la investigación científica sobre los patrones de consumo y el alcoholismo como tal es muy reciente, aún cuando estos constituyen graves problemas de salud pública en casi todos los países del mundo lo anterior se agrava en aquellos donde sus efectos se conjugan

con graves retrasos económicos y sociales como es el caso de nuestro país donde se calcula que en la actualidad, el alcoholismo representa el 11.3% de la carga total de enfermedades (SSA-INEGI ENA 2003). El 49 % de los suicidios y 38 % de los homicidios en el país se cometen bajo los efectos de las bebidas alcohólicas, además el 38 % de los casos de lesiones ocurren como resultado del consumo excesivo de bebidas embriagantes, particularmente entre jóvenes de 15 y 25 años de edad, etapa de la vida en la que los accidentes ocupan la primera causa de mortalidad. Los jóvenes entre 15 y 19 años de edad, sufren accidentes automovilísticos relacionados con el consumo excesivo de alcohol que constituyen la primera causa de defunción concentrando el 15% de las muertes, los homicidios son el 14.6% y los suicidios el 6% de los fallecimientos (SSA-INEGI ENA 2003) .

El consumo de alcohol en jóvenes universitarios de la Ciudad de México

En México el alcohol es una sustancia potencialmente adictiva que se utiliza con mayor frecuencia por los jóvenes, especialmente entre aquellos en edad de recibir una educación universitaria o superior. Según la ENA del 2008, el 71.3 % de los jóvenes entre 18-29 años ha consumido bebidas alcohólicas al menos una vez en su vida, mientras que el 52.5 % lo ha hecho al menos una vez durante el último mes.

Durante los últimos años en México, la edad en la cual los hombres han consumido con mayor frecuencia e intensidad bebidas alcohólicas se ha reducido de manera alarmante, después de situarse entre los 30-49 años de edad en 1988, disminuyó hasta encontrarse entre los 18-29 años a partir de 1998, rango de edad en el que los adultos jóvenes en México asisten a los centros de educación superior (Medina-Mora *et al.* 2003, Medina-Mora *et al.* 2001, Medina-Mora *et al.* 2007).

En cuanto al consumo de alcohol que excede los niveles seguros para la salud (≥ 2 bebidas estándar al día en las mujeres o ≥ 3 bebidas estándar al día en los hombres), el Observatorio Mexicano de Alcohol y Drogas describió que en el año 2003 el consumo de cinco copas o más por ocasión afectó más frecuentemente a los hombres (32 %) que a las mujeres (20.8%) (Quiroga *et al.* 2003). Posteriormente, Mora-Ríos *et al.* reportaron una prevalencia mayor de dicho consumo 68 % para los hombres y 39 % para las mujeres es decir, tres de cada cinco hombres y a una de cada cinco mujeres (Mora-Ríos *et al.* 2005). Aunque problemas metodológicos y sesgos de selección en estas encuestas dificultan su interpretación, sus resultados sugieren que el consumo de alcohol, particularmente el Consumo Riesgoso y Potencialmente Dañino (CRDA) es común entre los estudiantes universitarios de la ciudad de México (Mora-Ríos *et al.* 2005, Díaz *et al.* 2008).

El CRDA se define como un patrón de consumo de bebidas embriagantes que colocan al sujeto en riesgo de desarrollar problemas de salud y/o que desemboca en complicaciones físicas y/o psicológicas (accidentes, victimización, violencia, dependencia al alcohol, cirrosis hepática, etc.). De acuerdo a un estudio realizado por el Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el 2008 (Díaz *et al.* 2008), en el cual se estudió a una población de 24,921 estudiantes aceptados al primer año de la licenciatura en las diferentes facultades de la UNAM en el área metropolitana de la Ciudad de México, el cual empleó como instrumento de tamizaje del CRDA el AUDIT con un punto de corte en 8 y otro en 6, se encontró que el CRDA es frecuente entre los estudiantes de primer ingreso a la licenciatura, especialmente entre los hombres de 20 a 25 años de edad. Se estimó la prevalencia de CRDA de acuerdo a las variables socio demográficas y familiares (edad, estado civil, persona(s) con las que el estudiante residía, estatus laboral,

ingreso familiar mensual y nivel escolar del padre y la madre). Se encontró que cuando el CRDA se definió por un puntaje en el AUDIT igual o mayor a 8 puntos, afectó a poco más de uno de cada 10 estudiantes, cuando se utilizó igual o mayor de 6 puntos el CRDA se encontró en uno de cada cinco estudiantes (Díaz *et al.* 2008).

Se observó que en los estudiantes de ambos sexos, el trabajar incrementó el riesgo de ser afectado por el consumo de alcohol, particularmente aquellos que trabajaban un mayor número de horas, posiblemente debido a los efectos benéficos que confiere el trabajar como incrementar el autoestima, la autonomía y la responsabilidad personal, además de estar en contacto con compañeros quizás de mayor edad y que posiblemente consumen niveles elevados de alcohol. Un mayor ingreso familiar también incrementó el riesgo en ambos sexos quizá dada la mayor disponibilidad monetaria destinada a la compra de estas sustancias. En las mujeres pero no en los hombres un mayor nivel educativo tanto en el padre como en la madre se relacionó con un incremento en el CRDA, hallazgo que podría ser explicado por el hecho de que en las familias con mayores niveles educativos, las normas que regulan el consumo de alcohol serían menos tradicionales y más tolerantes del consumo de alcohol entre las mujeres jóvenes (Díaz *et al.* 2008).

Contrariamente el riesgo de ser afectado por este problema fue menor en los hombres y mujeres que reportaron ser casados y en los y las estudiantes de mayor edad, quizá porque estos se exponen con menos frecuencia a actividades de alto riesgo. Finalmente no se observó influencia del parentesco o de la relación de las personas con quien los estudiantes residían. Otro dato importante fue que el CRDA se incrementó en los estudiantes de ambos sexos después de los 19 años de edad, alcanzando su mayor frecuencia en aquellos de entre

20 y 25 años para posteriormente disminuir y alcanzar su nivel más bajo en los estudiantes de 29 o más años de edad (Díaz *et al.* 2008).

Esta relación curvilínea entre la edad y la prevalencia de CRDA sugiere la presencia de un fenómeno de “maduración” conocido como “alcoholismo limitado por el desarrollo”, el cual consiste que cuando los estudiantes maduran biológica y psicológicamente, al mismo tiempo que adquieren más responsabilidades (escolares, familiares y/o profesionales), el consumo problemático de alcohol declina (Zucker 1987) y solamente en el caso de un subgrupo de estudiantes genética y ambientalmente predispuestos, el consumo de alcohol en niveles excesivos persistiría durante el resto de la vida adulta (Díaz *et al.* 2008, Zucker 1987).

En los estudios que ha evaluado el consumo de alcohol en los estudiantes universitarios de ambos sexos, consistentemente se ha descrito que en comparación con las mujeres, los hombres beben con mayor frecuencia e intensidad, experimentando más frecuentemente sus consecuencias negativas y sus complicaciones. En la mayoría de los estudios se ha considerado el hecho de que las mujeres al tener más tejido adiposo, menos agua, menor cantidad de sangre en proporción a su distribución corporal y menor capacidad para metabolizar el alcohol, bebiendo menos alcanzan niveles sanguíneos de alcohol y de intoxicación similares a los de los hombres (Haseba *et al.* 2010), y que en general los hombres tienden a experimentar con más frecuencia consecuencias relacionadas con conductas antisociales (discusiones, violencia, accidentes, daño a propiedad ajena, problemas legales y vandalismo) que afectarían al individuo e importantemente a las personas en su entorno, mientras que en las mujeres es más común observar consecuencias en el ámbito privado y personal (desempeño académico deficiente, actividad sexual no

consentida, lagunas mentales, pérdida de la memoria, lesiones autoinflingidas, etc.) (Díaz *et al.* 2008).

Efectos del alcohol sobre las funciones cognitivas en los jóvenes.

El consumo de alcohol durante la adolescencia incrementa la probabilidad de desarrollar desórdenes por el uso de alcohol (AUD), debido a que los adolescentes responden a los efectos del alcohol de manera distinta a los adultos, de tal manera que el cerebro de los adolescentes exhibe una mayor sensibilidad a los efectos positivos del alcohol, (por ejemplo, la facilitación social, la búsqueda de la novedad, el impulso de explorar, la toma de riesgos), los cuales refuerzan o promueven la ingesta excesiva de esta sustancia, además de hacerlos más susceptibles a efectos neurodegenerativos de estructuras que regulan los sistemas de control del comportamiento y la adicción (Nixon *et al.* 2010).

Las bases neurobiológicas responsables de esta sensibilidad incrementada involucran al sistema de motivación y recompensa mesocorticolímbico y la corteza prefrontal (PFC), también llamado circuito límbico-motor (Nixon *et al.* 2010). Hasta ahora se sabe que los reforzadores positivos naturales (comida, agua, sexo) y artificiales (drogas) promueven la liberación de dopamina (efecto que es pronunciado durante la adolescencia) desde uno de los núcleos del tallo cerebral denominado área ventral tegmental (VTA), el cual tiene proyecciones hacia otro núcleo localizado en la parte basal y anterior del cerebro denominado núcleo accumbens (NAc), y cuyas estructuras fueron identificadas en 1954 por James Olds y Peter Milner como “los centros del placer”. Esta DA activa los receptores D1 de dopamina del NAc, los cuales son esencialmente excitadores, y tras un período, el D2 que es inhibitor, regresa al NAc al estado anterior a la excitación (Corinne *et al.* 2005). En el

caso contrario, una baja liberación de dopamina e incrementada expresión de los receptores D2 puede crear un estado hipodopaminérgico, el cual reduce los efectos recompensantes del alcohol y enciende circuitos cerebrales relacionados con la inhibición del comportamiento ante la presencia de alcohol. Dicho de otra manera, los receptores D2 modulan la motivación a beber alcohol, por lo que se ha pensado que el aumento de estos receptores podría jugar un papel importante en los tratamientos contra el alcoholismo (Corinne *et al.* 2005).

Por el otro lado, así como los adolescentes son más sensibles a los efectos positivos del alcohol, también son menos sensibles a los efectos negativos de dicha sustancia tales como los efectos intoxicantes que produce, deterioro motor, al “hangover” (cruda), y sedación la cual recae sobre la neurotransmisión GABAérgica, y los receptores GABA_A. Las variaciones en las respuestas de los adolescentes dependen de distintos factores como el género, la edad, absorción y metabolismo (Nixon *et al.* 2010).

Por último se ha visto que los adolescentes que reúnen criterios diagnósticos para AUD, presentan una reducción importante en el volumen de la CPF y área hipocampal, a pesar de pocos años de consumo excesivo, áreas que regulan el comportamiento impulsivo y la toma de decisiones. Además de inducir neurodegeneración, el alcohol agudo también puede inhibir la neurogénesis adulta reduciendo la proliferación de células tallo neurales y reduciendo la sobrevivencia de neuronas recién nacidas (Crews *et al.* 2009).

Hígado y alcohol

Además de las implicaciones sociales, el consumo crónico de alcohol puede afectar de manera importante a otros órganos. En el hígado puede provocar enfermedad hepática por alcohol (ALD), la cual comprende una serie amplia de manifestaciones que abarca un

amplio espectro, desde esteatosis o hígado graso, el 35% de los bebedores crónicos llegan a desarrollar hepatitis alcohólica y entre 10 y 20 % cirrosis hepática, siendo el alcohol la principal causa de cirrosis hepática en México (Méndez *et al.* 2009, Mendez-Sanchez *et al.* 2004).

Estructura Hepática

El hígado es uno de los primeros órganos que se forman en el embrión, proviene del endodermo (de la parte anterior del tubo digestivo) (Si-Tayeb *et al.* 2010). Ocupa el hipocondrio derecho, el epigastrio y una pequeña porción del hipocondrio izquierdo, en el hombre adulto pesa alrededor de 1,500 g y en la mujer 1,300 g, el hígado de un recién nacido pesa menos de 80 g, su coloración es rojo oscuro (Aguirre *et al.* 1988, Stephen *et al.* 1995). El hígado humano está cubierto por una cápsula fibrosa de tejido conectivo (cápsula de Glisson), consta de dos lóbulos principales de tamaño semejante, el derecho y el izquierdo, cada lóbulo tiene cuatro segmentos que se designan con números romanos. En el lóbulo izquierdo se encuentran los segmentos I a IV y en el derecho los segmentos V a VIII (Aguirre *et al.* 1988).

El tejido hepático está compuesto de parénquima y estroma, el parénquima hepático está formado por células epiteliales de origen endodérmico llamadas hepatocitos, en tanto que el segundo es tejido conectivo de origen mesenquimatoso (Aguirre *et al.* 1988, Stephen *et al.* 1995).

A nivel histológico, de acuerdo a la descripción hecha por Kiernan desde 1833, el hígado está constituido por formaciones diminutas que reciben el nombre de lobulillos y están separados entre sí por tejido conectivo; en la periferia también se encuentran los espacios

porta, que contienen cada uno un conducto biliar, una rama de la vena porta y otra de la arteria hepática (triadas portales). Estos lobulillos tienen forma hexagonal; están compuestos por una columna de hepatocitos dispuestas de forma radial alrededor de la vena centrolobulillar, rodeadas por canales diminutos, conocidos como canalículos biliares (Aguirre *et al.* 1988).

El hígado es el único órgano que recibe sangre de dos fuentes: el 15 % de la arteria hepática que es portadora de sangre oxigenada y que se bifurca de la aorta y el 85 % de la vena porta que drena la sangre del intestino la cual transporta sangre desoxigenada y cargada de nutrientes. Las ramificaciones de estos dos vasos transportan la sangre a los capilares o sinusoides hepáticos, donde los hepatocitos extraen el oxígeno, la mayoría de los nutrientes y algunas toxinas. Los hepatocitos producen la bilis la cual contiene esencialmente agua, ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol y pigmentos biliares, y la secretan en pequeños canales llamados canalículos biliares que se unen y recogen la bilis para almacenarla en la vesícula biliar, posteriormente durante y después de las comidas, la vesícula se contrae para expulsar la bilis que entra al conducto cístico y luego al conducto principal o colédoco para llegar al duodeno y ayudar a la digestión de las grasas (Stephen *et al.* 1995).

Funciones del Hígado

Se han identificado más de 5000 funciones vitales relacionadas con el hígado (Stephen *et al.* 1995) entre las más conocidas se incluyen las siguientes:

- a) La producción de bilis, que ayuda a la digestión de las grasas en el intestino delgado.

- b) Síntesis de proteínas plasmáticas (proteínas de fase aguda, albúmina, proteínas de unión a esteroides), factores de coagulación (fibrinógeno, protrombina, proconvertina), lipoproteínas.
- c) Metabolismo de carbohidratos: conversión del exceso de glucosa en glucógeno de almacenamiento (glucogénesis) que luego puede ser convertido nuevamente en glucosa (glucogenólisis) para la obtención de energía.
- d) Metabolismo de lípidos: síntesis de colesterol, producción de triglicéridos.
- e) Procesamiento de la hemoglobina para utilizar su contenido de hierro (el hígado almacena hierro).
- f) La destoxificación de la sangre de compuestos xenobióticos como fármacos, alcohol, nicotina, insecticidas, disolventes, etc.
- g) Conversión de amoníaco tóxico en urea (producto final del metabolismo proteico que se excreta en la orina).
- h) Regulación de los niveles sanguíneos de aminoácidos y otros compuestos químicos.
- i) Depósito de múltiples sustancias, como: glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, vitamina D, vitamina K, retinol, hierro, cobre.
- j) Resistencia a infecciones mediante la producción de factores de inmunidad (citocinas proinflamatorias, quimiocinas) y la eliminación de bacterias del torrente sanguíneo.
- k) Durante el primer trimestre del embarazo, es el principal órgano de producción de glóbulos rojos en el feto. A partir de la semana 12 de la gestación, la médula ósea asume esta función.

Pruebas de Función Hepática (PFH)

El consumo crónico de alcohol puede generar un desbalance e interferir con los procesos metabólicos de proteínas, grasas y carbohidratos y causar enfermedad hepática alcohólica. La evaluación de la función hepática se realiza mediante la utilización de métodos directos e indirectos que permiten identificar alteraciones en los procesos fisiológicos que tienen lugar en el hígado. Dentro de estas pruebas de funcionamiento hepático (PFH) se encuentran aquellas que reflejan i) lesión de los hepatocitos o conductos biliares, ii) aquellas que miden la función sintética del hígado, y iii) las que evalúan la capacidad del hígado para transportar aniones orgánicos y depurar sustancias endógenas y exógenas de la circulación (Méndez *et al.* 2009).

i) **Marcadores enzimáticos de daño hepatocelular:** Dentro de este grupo se encuentran las aminotransferasas (ALT y AST), deshidrogenasa láctica (LDH), isocitrato deshidrogenasa, sorbitol reductasa y glutamato deshidrogenasa.

a) Aminotransferasas

La enzima alanina aminotransferasa (ALT o TGP) y la aspartato aminotransferasa (AST o TGO) son los indicadores de lesión hepática más utilizados y representan marcadores de necrosis hepatocelular. La enzima AST se encuentra como isoenzima mitocondrial y citosólica en varios tejidos como hígado, corazón, músculo, riñón, cerebro, páncreas, pulmones, células sanguíneas, desde los cuales se libera a la circulación cuando alguno de los mismos sufre daño, razón por la cual también aumenta su concentración si hay lesiones cardíacas o musculares o ambas. De aquí se deduce que no constituye un indicador específico de lesión hepática. Por el contrario, la enzima hepática ALT se localiza en el

citósol de las células hepáticas y se encuentra en forma normal en el hígado en altas concentraciones y se libera a la circulación como respuesta al daño hepático, por lo que representa un fiel indicador del mismo (Méndez *et al.* 2009).

Las aminotransferasas se presentan en altas concentraciones dentro de los hepatocitos, donde catalizan la transferencia del grupo alfa amino desde sus respectivos aminoácidos hacia el ácido alfa cetoglutarato, lo cual da como resultado la formación de ácido alfa cetoglutarato y piruvato más glutamato.

El rango de normalidad en suero para AST se ubica entre 5 y 40 UI/L y entre 7 y 56 UI/L en el caso de ALT. A pesar de esto, es importante recalcar que la interpretación de los valores elevados de las mismas debe ir estrechamente ligada al cuadro clínico, ya que los valores de dichas enzimas no reflejan la gravedad de las lesiones (Méndez *et al.* 2009).

La ALT puede llegar a ser normal en el 50 % de los enfermos de cirrosis alcohólica y la AST es normal en 25 % de los casos. La relación en suero de AST/ALT puede ser útil para el diagnóstico diferencial. En las hepatitis alcohólicas (con necrosis) este índice es generalmente >1 , mientras que en las hepatitis virales es generalmente <1 (Méndez *et al.* 2009).

En la mayor parte de los casos de daño hepático agudo, la relación es menor o igual a 1. Una relación mayor a 2 con ALT < 300 U/L es indicio de hepatitis alcohólica, y una relación > 3 señala de manera categórica enfermedad hepática. Este índice elevado puede resultar en parte por la deficiencia de piridoxina, lo cual se presenta con frecuencia en pacientes con alcoholismo crónico

b) Deshidrogenasa Láctica (LDH)

Tiene poca especificidad diagnóstica de padecimientos hepáticos; posee una amplia distribución tisular y se observan concentraciones séricas elevadas en casos de lesión en músculo cardíaco o esquelético, hemólisis, choque, infarto renal y daño hepático agudo o crónico. A menudo resultan aumentos moderados cuando hay trastornos hepatocelulares como hepatitis vírica y cirrosis (Méndez *et al.* 2009).

c) Isocitrato Deshidrogenasa

Son enzimas citoplasmáticas específicas del hígado, y los cambios en sus concentraciones se asemejan a los que manifiestan las aminotransferasas aunque con menor sensibilidad (Méndez *et al.* 2009).

d) Glutamato Deshidrogenasa

Es una enzima mitocondrial que se localiza en hepatocitos centrolobulillares. Tiene mayor sensibilidad para señalar hepatitis alcohólica que las AST, pero no es útil para diferenciar entre un hígado graso y una hepatitis alcohólica (Méndez *et al.* 2009).

Entre los marcadores enzimáticos de colestasis se encuentran: la fosfatasa alcalina, gammaglutamiltranspeptidasa (GGT), nucleotidasa 5' y aminopeptidasa de leucina (Méndez *et al.* 2009).

ii) **Pruebas que miden la función sintética del hígado:**

a) Albúmina

Es la proteína más importante que sintetiza el hígado en el plasma, su vida media en suero es de casi 20 días. La concentración sérica de esta proteína no es un indicador confiable de la síntesis proteica ante enfermedad hepática aguda, ya que la concentración sérica refleja una variedad de factores extrahepáticos como estado nutricional, integridad vascular, factores hormonales, pérdida por la orina y por las heces. A pesar de sus limitaciones la albúmina se relaciona en forma directa con el pronóstico de la enfermedad hepática crónica. Una albúmina < 3 g/dl, una vez excluidas las pérdidas o carencias, indica insuficiencia hepatocelular (Méndez *et al.* 2009).

b) Tiempo de Protrombina (TP) y factores de coagulación

El hígado sintetiza los factores de coagulación I (fibrinógeno), II (protrombina), V, VII, IX, y X. El TP se usa como valor pronóstico en los casos de sobredosis con acetaminofen y en hepatitis alcohólica aguda (Méndez *et al.* 2009).

iii) **Pruebas que evalúan la capacidad del hígado para transportar aniones orgánicos y depurar sustancias endógenas y exógenas de la circulación:**

a) Bilirrubina (0.0-1.0 mg/dL)

La bilirrubina es un anión inorgánico que procede del catabolismo de la hemoglobina. La cuantificación de esta en el suero es importante para evaluar la función hepática. Consiste en dos formas principales, una soluble en agua, conjugada o directa, y una soluble en lípidos, no conjugada o indirecta. Si los valores de la bilirrubina directa en bilirrubina total son < 20 % directa, señalan daño constitucional (enfermedad de Gilbert o síndrome de Crigler-Najjar) o bien estado hemolítico. Si la relación es de 20 a 40 % directa entonces hay enfermedad

hepatocelular. Si la relación es 40 a 60 % directa, entonces hay tanto enfermedad de tipo hepatocelular como obstrucción extrahepática. Cuando la relación es 50 % directa hay indicios de obstrucción extrahepática en lugar de enfermedad hepatocelular (Méndez *et al.* 2009).

La concentración de bilirrubina es significativamente más alta en el género masculino que en el femenino, pero no es un indicador sensible de disfunción hepática. Para producir ictericia clínica debe haber una concentración igual o mayor a 2.5 mg/dL (Méndez *et al.* 2009).

Marcadores de alcoholismo

Los marcadores de alteración de la función hepática son útiles para señalar la causa de la enfermedad hepática, valorar la gravedad del daño, formular el pronóstico y evaluar la eficiencia del tratamiento, sin embargo estos presentan algunas desventajas debido a que presentan baja sensibilidad, especificidad y poder pronóstico, ya que pueden resultar anormales en algunos trastornos que no se correlacionan con daño hepático (ej. insuficiencia cardíaca, sepsis, infecciones como brucelosis, entre otros), por lo que no son específicos de alcoholismo, por esta razón se ha tratado de encontrar biomarcadores más sensibles y específicos comúnmente usados de la ingesta de alcohol como: transferrina deficiente de carbohidratos (CDT), la combinación de GGT y CDT, volumen corpuscular medio de eritrocitos (VGM) y el cociente AST/ALT (Das *et al.* 2008). Entre los nuevos biomarcadores no usados todavía en la práctica clínica están: fosfatidiletanol, ester de ácidos grasos, etil glucuronido, ácido siálico y aductos de acetaldehído, el 5-hidroxitryptophol, etil sulfato, AST mitocondrial, beta hexosaminidasa, existen otros menos

conocidos como acetato, metanol, ácido alfa amino butírico, dolicol (Waszkiewicz *et al.* 2010).

- Relación AST/ALT: En la enfermedad hepática alcohólica habitualmente hay una elevación desproporcionada de AST en relación a la ALT, con una relación habitualmente mayor a 2 (Méndez *et al.* 2009).
- GGT: Los niveles normales de GGT se encuentran entre 8-78 U/L. Frecuentemente hay elevaciones de la GGT en las personas que beben alcohol en exceso, sin embargo, este hallazgo no es específico, ya que otras enfermedades hepáticas pueden producir elevaciones de la GGT (en particular las enfermedades colestásicas), al igual que el consumo de muchos medicamentos (Méndez *et al.* 2009).
- Volumen corpuscular medio (VCM): La macrocitosis, expresada como aumento de los eritrocitos es otro marcador de ingesta excesiva de alcohol cuando se encuentra por arriba de las 99 micras, sin embargo su sensibilidad es baja (40%) (Méndez *et al.* 2009).

Metabolismo del Etanol

El etanol o alcohol etílico es el constituyente fundamental de las bebidas alcohólicas las cuales son básicamente de dos tipos: Bebidas fermentadas: Son las obtenidas por el proceso de fermentación a partir de un mosto abundante en azúcares, ejemplo, sidra, cava, vino, cerveza, y su grado de alcohol puede oscilar entre 5 y 15 grados. Bebidas destiladas: Se obtienen mediante un proceso artificial de destilación, lo que aumenta su concentración de alcohol puro. Ejemplo, ginebra, ron, whisky, vodka, anís, cognac, aguardiente, licores afrutados. Su grado de alcohol oscila entre 17 y 45 grados.

El grado de alcohol o graduación alcohólica de una bebida está indicado en su etiqueta y representa la concentración o porcentaje (%) de etanol que contiene. Cuando se habla de que un vino tiene 12° de alcohol, lo que quiere decir es que en un litro de ese vino hay 120 ml de alcohol puro.

Aunque la mayoría de las personas consume alcohol en alguna cantidad, sólo algunas llegan a desarrollar daño en el hígado. Al ingerir alcohol, este pasa a lo largo del esófago, llega al estómago, ahí se absorbe una pequeña parte y luego ingresa al intestino delgado, donde la mayoría del alcohol entra al torrente sanguíneo. La sangre lo distribuye a todas las partes del cuerpo y se absorbe en los tejidos en proporción a su contenido de agua, afectando de forma especial al cerebro (y por tanto al comportamiento de las personas) y al hígado.

El nivel máximo de alcohol en sangre se alcanza entre los 30 y 90 minutos desde que se ingiere la bebida. Su eliminación cuesta más tiempo, aproximadamente 8-10 horas, pudiendo mantenerse hasta 18 horas después de haber sido ingerido. Entre el 2 y el 10 % se elimina sin sufrir modificaciones en la orina, las lágrimas, el sudor y especialmente por el aire expirado, constituyendo la base de la utilización de los etilómetros o alcoholímetros (la concentración de alcohol en el aire expirado es proporcional y constante a la concentración presente en la sangre). Más del 90% del etanol ingerido se elimina por el metabolismo hepático a través de tres sistemas enzimáticos: en primer lugar por la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) presente en el citosol de los hepatocitos (Haseba *et al.* 2010, Köhnke 2008, Konishi *et al.* 2003), posteriormente el sistema oxidativo microsomal (MEOS) presente en los microsomas hepáticos y que comprende al citocromo P450 (CYP2E1) y la catalasa presente en los peroxisomas, estos tres sistemas convierten el etanol

en acetaldehído, el cual es un metabolito reactivo que por si mismo puede producir daño hepático (Savolainen *et al.* 1997, Konishi *et al.* 2003).

Por último la enzima Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) convierte el acetaldehído en acetato el cual pasa al torrente sanguíneo y a los tejidos donde se incorpora al ciclo de Krebs en forma de acetyl coenzima A y es metabolizado a dióxido de carbono y agua y puede más fácilmente ser eliminado por la orina o se convierte en productos intermedios como cuerpos cetónicos y ácidos grasos (Agarwal *et al.* 1989, Zintzaras *et al.* 2006) (Figura. 1).

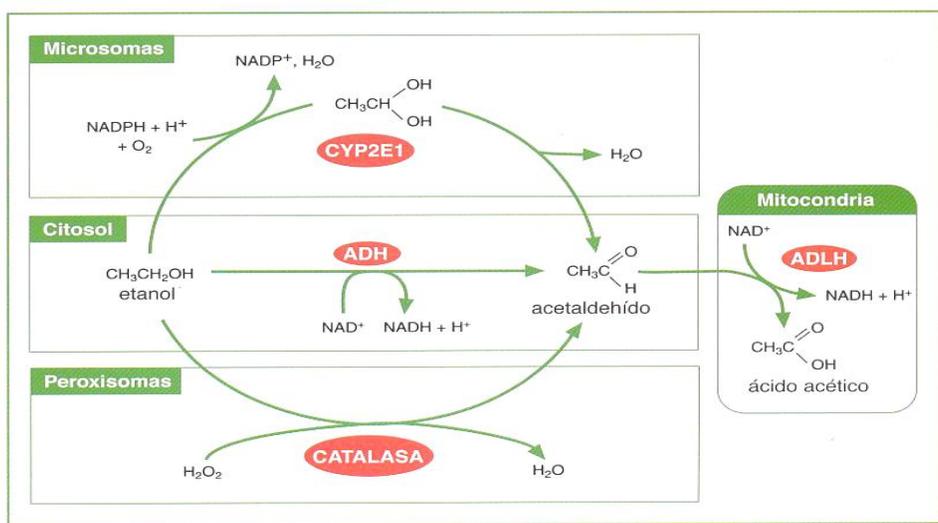


Figura. 1. Metabolismo hepático del etanol a través de tres sistemas enzimáticos que convierten el etanol a acetaldehído y el sistema de la ALDH que lo convierte a acetato.

Se ha estimado que la capacidad del hígado para metabolizar alcohol es de aproximadamente 120-150 mg/Kg/hora, o sea 200 a 240 g/ día para una persona de 70 kg, y se ha calculado que puede llegar a ser hasta 370 g/día en individuos alcohólicos crónicos. El factor limitante en la oxidación es la conversión de etanol en acetaldehído por la ADH que tiene una constante de Michaelis-Menten (Km) baja de 0.05-0.1 g/L (Norberg *et al.* 2003).

Las diferencias en la capacidad del metabolismo del etanol dependen en cierta medida de la cantidad de enzimas metabolizadoras presentes en el hígado que varía entre las personas, el género, la composición corporal, el vaciamiento gástrico y variaciones en la proporción de agua y grasa de cada persona (Haseba *et al.* 2010, Norberg *et al.* 2003).

Cuando la cantidad de alcohol ingerida es excesiva, la velocidad con que el hígado puede metabolizarlo es superada, entonces el nivel de alcohol se eleva en la sangre produciendo diversos efectos en el organismo dependiendo de su concentración en este fluido (Tabla 1).

Concentración de alcohol en sangre (g/dl)	Efecto que produce en el organismo
0.05	Desinhibición y facilita las interacciones sociales.
0.10	Dificultades al hablar
0.20	Euforia y deterioro motriz
0.30	Confusión
0.40	Letargo
0.50	Coma
0.60	Parálisis respiratoria y la muerte, por ser un depresor del Sistema Nervioso Central, deprime el ritmo respiratorio, el ritmo cardíaco y los mecanismos de control del cerebro.

Tabla 1. Concentración de alcohol en sangre y sus efectos asociados.

Patrones del consumo de etanol

Los estudios epidemiológicos han determinado que se requiere de una cantidad mínima de ingesta de alcohol para el desarrollo de enfermedad hepática alcohólica. Por tal motivo, en la literatura se han tratado de establecer algunos conceptos para delimitar lo que es un consumo moderado, excesivo, dependencia y abuso a fin de lograr identificar un patrón de consumo.

El Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) define una *ingesta moderada de alcohol* como el número promedio de bebidas consumidas diariamente que pone a la persona en un riesgo bajo para presentar problemas relacionados con el alcohol. El número de bebidas al día que define una ingesta moderada es de por lo menos tres para hombres y dos para mujeres; en personas mayores de 65 años la cantidad es menos de dos bebidas diarias (Courtney *et al.* 2009).

También define una *ingesta excesiva* como aquella persona en riesgo de desarrollar algún problema relacionado con el alcohol. Con base en el número de bebidas, se considera una ingesta abundante el consumo de cuatro bebidas por ocasión o más de catorce bebidas a la semana en hombres y más de tres bebidas por ocasión o más de siete a la semana en mujeres (Courtney *et al.* 2009).

El “*binge drinking*” se caracteriza por ser un tipo de consumo en el que se ingieren grandes cantidades de alcohol en un período de tiempo muy corto, en el 2009 el NIAAA lo definió como un patrón de consumo de alcohol con el que se alcanza un concentración de alcohol en sangre (BAC) de 0.08 g % o más, equivalente a consumir 5 bebidas para hombres y 4 para mujeres en 2 horas, ocurriendo más de una vez dentro de un período de 6 meses (Courtney *et al.* 2009).

De acuerdo a las definiciones de abuso de alcohol y dependencia que establecen el Manual Estadístico y Diagnóstico de Desórdenes Mentales, 4^a. ed. (DSM-IV) y a lo establecido por el NIAAA:

Abuso se caracteriza por un trastorno desadaptativo del uso de la sustancia que conduce a un deterioro o alteración clínicamente significativa ocurridas dentro de un período de 12 meses y que se manifiesta por una o más de las siguientes características:

- 1) Falla en cumplir con las obligaciones principales en el trabajo, escuela, casa (por ejemplo repetidas ausencias o bajo rendimiento laboral, suspensiones, expulsiones).
 - 2) Consumo recurrente en situaciones de peligro físico, (por ejemplo conducir un automóvil u operar una máquina cuando el uso de la sustancia causa un deterioro).
 - 3) Problemas legales en relación al uso de la sustancia (arrestos por desórdenes conductuales).
 - 4) Uso continuo a pesar de presentar problemas sociales o interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia (peleas físicas a consecuencia de la intoxicación).
 - 5) Los síntomas nunca reúnen los criterios para dependencia de la sustancia.
- (Courtney *et al.* 2009, DSM-IV).

Dependencia: Un trastorno desadaptativo del uso de la sustancia, llevando a un deterioro clínicamente significativo, manifestado por tres o más de los siguientes puntos ocurridos en cualquier tiempo en el mismo período de 12 meses:

- 1) Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes: a) una necesidad por incrementar la cantidad de la sustancia para alcanzar conseguir el efecto deseado. b) efecto marcadamente disminuido con el uso continuado de la misma cantidad de sustancia.
- 2) Abstinencia o síndrome de supresión.

- 3) Consumo en grandes cantidades o por un período más largo del que se pretendía.
- 4) Un deseo persistente o esfuerzos fracasados por reducir o controlar el uso de la sustancia.
- 5) Gastar gran parte del tiempo en actividades para obtener la sustancia o recobrase de sus efectos.
- 6) Abandonar o reducir actividades sociales, ocupacionales o recreacionales importantes por el uso de la sustancia.
- 7) Uso continuo de la sustancia a pesar de saber que se tienen problemas psicológicos o físicos recurrentes causados o exacerbados por la sustancia (Courtney *et al.* 2009, DSM-IV).

Según la Encuesta Nacional de Adicciones del 2008, se consideran bebedores altos a aquellas personas que por lo menos alguna vez en su vida han consumido cinco copas o más en una sola ocasión para los hombres, o cuatro copas o más en una sola ocasión para las mujeres. Como abuso/dependencia al alcohol cuando existe la presencia de distintos problemas en el área interpersonal, social, laboral, además de algunas manifestaciones físicas, cognoscitivas y del comportamiento que llevan al individuo a un malestar significativo. El criterio de abuso/dependencia se cumple si al menos tres o más de los síntomas de dependencia, o al menos uno de abuso, están presentes en algún momento repetitivamente dentro de los últimos 12 meses (ENA 2008).

Para efectos de establecer el patrón de consumo per cápita, el NIAAA define una bebida estándar como cualquier bebida que contiene aproximadamente 14 g de alcohol puro (aproximadamente 0.6 onzas líquidas o 1.2 cucharadas) (NIAAA) (Figura 2).



Figura 2. Equivalentes de una bebida estándar según el NIAAA

Para conocer la cantidad de alcohol que se consume en las bebidas de manera habitual se utiliza la siguiente operación matemática:

$$\text{Gramos de etanol} = (G^\circ \times \text{ml} \times 0,8) / 100$$

Donde:

- G° : La graduación alcohólica de la bebida, la cual suele visualizarse en la etiqueta de la misma.
- ml: La cantidad de bebida consumida, expresada en mililitros.
- 0,8: El peso específico del etanol (es decir, el peso de 1 gramo de alcohol puro es de 0,8 g).

La OMS considera algunos límites como seguros para personas adultas, estos son: Hombres sanos, no superar los 30 g de alcohol puro al día y mujeres no superar los 20 g de alcohol puro al día. Sin embargo, considera que el único límite que es seguro para todos es la abstinencia, ya que cada persona y cada circunstancia son únicas, por lo que ha divulgado el mensaje de: “alcohol, cuanto menos mejor.”

Respuesta inmune en el hígado

La inmunidad hepática innata está mediada principalmente por elementos moleculares y celulares: macrófagos o células de Kupffer (KCs), células dendríticas (DCs), células natural killer (NKs), y natural killer T (NKT), citocinas inflamatorias, componentes del complemento, proteínas de fase aguda y quimiocinas (Abbas *et al.* 2004, Cliona *et al.* 2003).

a) Células de Kupffer (KC)

Representan la población más grande de macrófagos residentes en el cuerpo, forman parte de la pared de los sinusoides hepáticos, desempeñan un papel significativo en la remoción de partículas, células así como de sustancias tóxicas y elementos infecciosos de origen intestinal principalmente y que llegan a través de la sangre portal. Estas células son productoras de diversos mediadores involucrados en mecanismos de defensa como eicosanoides, radicales libres, citocinas proinflamatorias como factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 β), e interferón alfa (IFN- α), factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), factor activador de plaquetas (PDGF) y quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos alfa (MIP- α) y (RANTES) (Cliona *et al.* 2003, McCuskey 2000). La superficie de las KC es muy irregular debido a la presencia de microvellosidades, se encuentran ancladas a la superficie luminal

del endotelio sinusoidal y por lo tanto están expuestas al flujo sanguíneo. Parte de sus prolongaciones entran al espacio de Disse, donde entran en contacto con células estelares y ocasionalmente hepatocitos (Arii *et al.* 2000).

Entre las funciones que desempeñan están la de fagocitosis, pinocitosis, captación y metabolismo de lípidos, eliminación de eritrocitos seniles, degradación de hemoglobina, y almacenamiento de hierro (Cliona *et al.* 2003). Expresan de manera constitutiva moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y moléculas coestimuladoras, por lo que pueden ser potenciales células presentadoras de antígeno (APC). En el área periportal se presentan en mayor proporción, tamaño y capacidad fagocítica en comparación con el área centrolobulillar donde estas producen gran cantidad de citocinas (Arii *et al.* 2000).

b) Células Dendíticas (DCs)

Son células fagocíticas y células presentadoras de antígeno (APCs) por excelencia. Morfológicamente muestran proyecciones de membrana muy delgadas. Después de capturar antígenos, las DCs comienzan a madurar y transportar los antígenos a los nódulos linfoides para iniciar una respuesta inmune adaptativa. El fenotipo inmaduro expresa bajos niveles de MHC II y coestimuladores CD80 y CD86 (Cliona *et al.* 2003).

c) Células Asesinas Naturales (NK)

Las células asesinas naturales ó natural killer constituyen más del 50 % del total del pool linfoide en el hígado sano. En el hígado se localizan en el espacio de Disse y su función es eliminar de forma espontánea células tumorales y células infectadas por diferentes patógenos como virus, bacterias, parásitos y células transformadas. El fenotipo característico

de una célula NK es $CD16^+$, $CD56^+$ y $CD3^+$. El elevado número de células NK en el hígado comparado con la sangre es reflejo de los altos niveles de actividad citotóxica hepática de las NK. Sus actividades son controladas por receptores que median activación o inhibición a través de unión de moléculas superficie sobre células blanco (Cliona *et al.* 2003).

La inmunidad adaptativa describe la defensa hospedera mediada por factores humorales celulares como los linfocitos B y linfocitos T los cuales a su vez constituyen un subgrupo de linfocitos denominados linfocitos $TCD8^+$ o citotóxicos (LTc) y $TCD4^+$ o cooperadores (LTh) (Cliona *et al.* 2003, Abbas *et al.* 2004).

Respuesta inmune celular:

a) Linfocitos B

Comparados con las células T se sabe poco sobre su papel en el hígado o en enfermedades hepáticas. Se encuentran en menor número en el hígado sano y pueden ser encontradas tanto en el tracto portal y en el parénquima. Participan en la erradicación de infecciones virales a través de la producción y secreción de anticuerpos (Cliona *et al.* 2003).

b) Linfocitos $TCD4^+$

Las células $TCD4^+$ efectoras reconocen péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y producen una gran variedad de citocinas. Tradicionalmente han sido clasificadas en dos subgrupos (Th1 y Th2), sin embargo hallazgos mas recientes sugieren la existencia de otros subgrupos como las Treg y las Th17 y que las citocinas IL-12 e IL-4 influyen la diferenciación de células T naïve hacia células Th1 y Th2 efectoras, respectivamente (Cliona *et al.* 2003).

c) **Linfocitos TCD8⁺**

Son importantes para la eliminación de patógenos intracelulares, particularmente virus. Las células CD8⁺ efectoras reconocen péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) e inducen muerte por medio de diferentes mecanismos como apoptosis a través de Fas ligando (FasL), a través de la inserción de perforinas a las células blanco, creando agujeros usados para el depósito de granzimas, resultando en la destrucción estas células. Estos linfocitos T citotóxicos (CTLs) pueden eliminar también virus hepatotrópicos como el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) a través de la liberación de citocinas como IFN- γ o TNF- α interviniendo en su replicación (Cliona *et al.* 2003).

Respuesta inmune molecular: Citocinas y Quimiocinas

Las citocinas son proteínas solubles con acciones pleiotrópicas que actúan como reguladores humorales a muy bajas concentraciones (pg/ml), mediando muchas de las funciones celulares. Modulan la comunicación y activación celular, intervienen como mediadores de la respuesta inmunológica e inflamatoria, como factores de crecimiento y diferenciación, participan en la apoptosis. Son secretadas por diversos tipos celulares y sus acciones pueden ser locales o sistémicas (Cliona *et al.* 2003). De acuerdo al subtipo de linfocitos TCD4 (Th) que las secreta, clásicamente se les ha clasificado en citocinas tipo Th1 y tipo Th2. Entre las tipo Th1 están las interleucinas IL-2, IL-1 β , IL-12, interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Entre las de tipo Th2 principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 (Abbas *et al.* 2004, Cliona *et al.* 2003).

IL-10

IL-10 es una proteína de 35-kDa, ha sido descrita principalmente como una citocina anti-inflamatoria, Es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por macrófagos, linfocitos B, y otros tipos celulares. Es una citocina inmunosupresora que inhibe la síntesis de otras citocinas como IFN- γ e IL-2 por parte de los LTh1 y NK, y la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- α por parte de los Macrófagos (Abbas *et al.* 2004, Cliona *et al.* 2003).

TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una proteína secretoria de 17 kDa, formada por 185 aminoácidos, que procede de un propéptido formado por 212 aminoácidos. Posee 2 receptores de transmembrana, uno de 55 kDa (TNFR1 ó p55R ó CD120a) y otro de 75 kDa (TNFR2 ó p75R ó CD120b), que regulan los niveles circulantes de esta citocina. Es una citocina pro-inflamatoria, producida principalmente por macrófagos y células NK en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS (Qin *et al.* 2007), también puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Junto con otras citocinas como IL-1 β e IL-6 estimula la respuesta de fase aguda en los procesos inflamatorios derivados de procesos infecciosos elevando la temperatura corporal y produciendo cansancio y sueño al actuar sobre el sistema nervioso central. Es un agente clave en la inmunidad del huésped, con actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana. En individuos sanos, sus niveles son variables, fluctuando entre 50 pg/ml y no detectables (Abbas *et al.* 2004, Cliona *et al.* 2003, Qin *et al.* 2007).

TGF- β

El TGF- β es miembro de una familia de factores de crecimiento celular importantes en los procesos de apoptosis, proliferación celular, diferenciación, inflamación y reparación de tejidos ejerciendo sus efectos a través de las proteínas Smad, que constituyen la vía canónica de señalización del TGF- β (Vázquez *et al.* 2007). Ha sido descrito como una citocina anti inflamatoria, regula la respuesta inmune al suprimir la proliferación y diferenciación de células B, T y NKs antagonizando los efectos de IL-1 β y TNF- α que participan en la inflamación. Estimula la fibrogénesis ya que induce la activación de células estelares a miofibroblastos y estimula la producción de proteínas de matriz extracelular contribuyendo al desarrollo de fibrosis hepática y pancreática (Cliona *et al.* 2003). El TGF- β es sintetizado por muchas estirpes celulares como linfocitos, macrófagos y células dendríticas (Abbas *et al.* 2004).

ANTECEDENTES

El consumo de alcohol agudo y crónico se ha relacionado a un deterioro de la respuesta inmune innata y adaptativa provocando una mayor susceptibilidad a infecciones como neumonías bacterianas, infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Brown *et al.* 2006). Szabo y col. 2004, observaron que los monocitos de sujetos voluntarios abstemios que bajo experimentación consumieron niveles de alcohol moderado (2 ml de vodka/kg de peso en 300 ml de jugo de naranja, equivalentes a 25 mM o 0.1 g/dL de alcohol en sangre) ingerido en un período de 30 minutos (período agudo) mostraron una baja capacidad aloestimuladora de linfocitos T en respuesta a antígenos específicos como el *toxoides tetánico* (TT), comparados con los

monocitos controles de los mismos voluntarios antes de la ingesta de alcohol, así como una disminución en la capacidad de presentación de antígenos por monocitos y células dendríticas (DCs) (Szabo *et al.* 2004, Lau *et al.* 2009), además de mostrar una baja expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en DCs, y una baja secreción de IL-12 por estas células, sugiriendo que el etanol afecta la diferenciación de monocitos a DCs (Mandrekar *et al.* 2004).

Además de alterar la respuesta inmune, el etanol produce efectos diferenciales en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias a nivel sistémico principalmente en monocitos humanos, y este efecto varía dependiendo del tiempo de exposición al alcohol (agudo o crónico) y la activación de diferentes receptores de citocinas (Crews *et al.* 2006). Szabo y col. 1993, demostraron que la administración etanol agudo (25mM) *in vitro* puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α en monocitos humanos (Verma *et al.* 1993), a través de la inhibición del factor nuclear Kappa B (NF- κ B) (Mandrekar *et al.* 2006) inducido por lipopolisacárido (LPS), IL-1 β e IL-6 y un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Mandrekar *et al.* 1996, Szabo *et al.* 1996) a través de la activación de factores de transcripción como STAT3, AP-1 y Sp-1 por la vía de la familia de Src cinasas (Norkina *et al.* 2007) y TGF- β (Szabo *et al.* 1996); mientras que el consumo crónico está asociado con activación de NF- κ B incrementando la expresión de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y MCP-1 (proteína quimio atrayente de monocitos) inducidas por estimulación del Toll-like receptor-4 (TLR-4) sobre los monocitos, además de una disminución de CREB, y una disminución de IL-10 en suero (Crews *et al.* 2006).

Polimorfismos genéticos de citocinas

En los últimos años se ha estudiado la presencia de diversos polimorfismos de citocinas pro y anti-inflamatorias como TNF- α , IL-10 y TGF- β , que al estar presentes en las regiones reguladoras de estos genes pueden influir en su expresión. Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de ADN que se producen entre los individuos de una población debido a las posibles formas alternativas que puede tener un gen (alelos), estos se presentan con una frecuencia mayor al 1% en la población y se sabe que pueden afectar la respuesta de los individuos a ciertas enfermedades al producir cambios importantes en la estructura de las proteínas o en la regulación de su expresión. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), producen la sustitución de una base nitrogenada (por ej. la sustitución de una Adenina por una Citosina), este tipo de polimorfismos constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 100 a 300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano (Benjamin 2008). Estos SNPs pueden afectar a la secuencia codificante o a la secuencia reguladora (promotora), los que se localizan dentro de la secuencia codificante pueden modificar o no la secuencia de aminoácidos, los que no la modifican se denominan mutaciones silenciosas, por su parte, los que se encuentran en las regiones no codificantes (reguladoras) pueden tener efectos en el proceso de traducción, el proceso de splicing o la unión de factores de transcripción.

Polimorfismos en el gen de IL-10

El gen de IL-10 se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (q31-q32) y es altamente polimórfico. En la región promotora del gen se han descrito al menos 11 polimorfismos de nucleótido simple o (SNPs). Los más estudiados se encuentran ubicados en las posiciones -

1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A) (Koss *et al.* 2000, Turner *et al.* 1997, Moreno *et al.* 2007, Schneider *et al.* 2004^a, Grove *et al.* 2000). Estos se encuentran en fuerte desequilibrio de unión y generan los tres haplotipos: GCC (G en la posición -1082, C en la posición -819 y C en la posición -592), ACC y ATA. De los cuales GCC/GCC está considerado como altamente productor de IL-10, GCC/ACC y GCC/ATA está considerados como productores intermedios y ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA, están asociados a una baja producción de IL-10 (Lim *et al.* 1998, Moreno *et al.* 2007).

Polimorfismos en el gen de TNF- α

El gen que codifica TNF- α está ubicado en la región central del MHC, entre los *loci* HLA-B y HLA-D, en el brazo corto del cromosoma 6, en el segmento correspondiente a las moléculas MHC de clase III. El *locus* de TNF- α posee una variedad de sitios polimórficos, tanto en la región codificante como en su vecindad. Dentro de las primeras variantes polimórficas se encuentran los SNPs, que representan cambios de un nucleótido, pudiendo detectarse estos en cualquier lugar del DNA, ya sea en las secuencias regulatorias en el extremo 5' (promotor) o después de la región codificante (región no transcrita del extremo 3'), o bien, dentro del DNA que codifica la proteína.

Al respecto se han identificado dos polimorfismos en la región promotora del gen de TNF- α , uno en la posición -238 G>A que se localiza dentro de una región reguladora, y donde el alelo G ha sido relacionado con una expresión incrementada de TNF- α y -308 G>A, donde se da una transición G/A (Kroeger *et al.* 1997). Este polimorfismo define los alelos TNF1 (G/G) y TNF2 (A/A). El alelo TNF2, se ha descrito como el más importante en la regulación de la producción de TNF- α . Estudios *in vitro* en células estimuladas con lipopolisacárido,

indican que las de genotipo TNF2 presentan una mayor sobreexpresión de la citocina que las de genotipo TNF1.

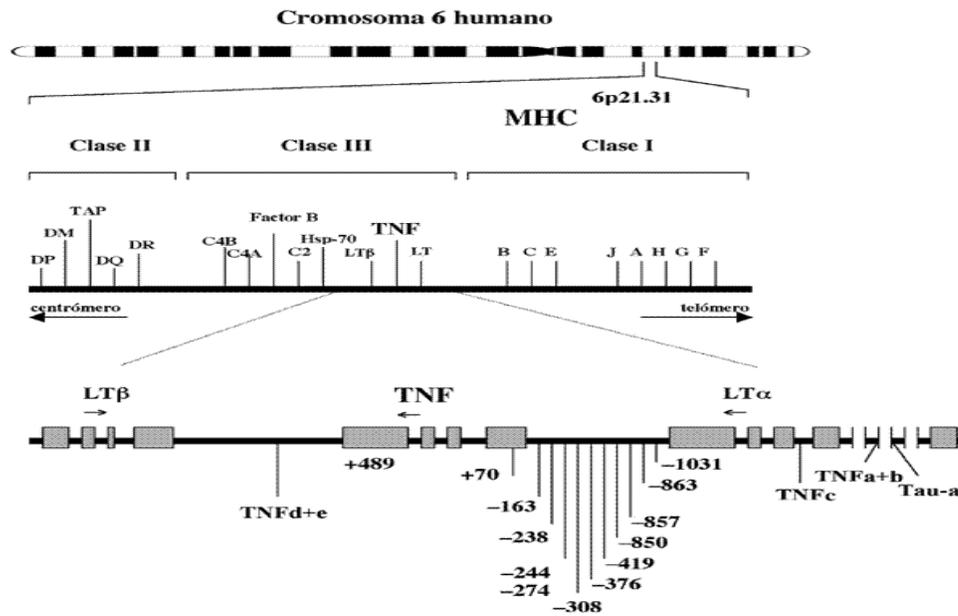


Figura 3: Localización y organización del gen de TNF α . Ubicado en el MHC clase III, en el brazo corto del cromosoma 6 humano. Los cuadrados representan exones. Los polimorfismos del TNF α descritos están incluidos en el mapa genético: la inserción de una C en la posición +70, las transiciones G/A en las posiciones +489, -163, -238, -244, -274, -308 y -376, C/T en las posiciones -850 y -863, T/C en la posición -1031.

La segunda variante polimórfica es el DNA microsatélite, que se distribuye en todos los cromosomas a través del genoma. Estas son secuencias repetitivas de DNA (generalmente C y T), no transcritas y de longitud variable, que se ubican en regiones no codificantes. Aun cuando no se transcriben a RNA mensajeros, la inserción de microsatélites puede alterar el plegamiento del DNA, afectando la unión de proteínas y enzimas al DNA y por

consecuencia el nivel transcripcional. El análisis del *locus* de TNF- α ha revelado la presencia de los microsatélites TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe y Tau-a (Figura 3).

Polimorfismos en el gen de TGF- β

Al igual que otras citocinas, los mecanismos y niveles de regulación de la expresión génica del TGF- β 1 son complejos (Suárez *et al.* 2003). Uno de los primeros niveles de regulación del TGF- β 1 es el transcripcional, donde su expresión génica puede ser mediada por las interacciones de los factores transcripcionales con los diferentes elementos reguladores descritos en el promotor (Figura 4).

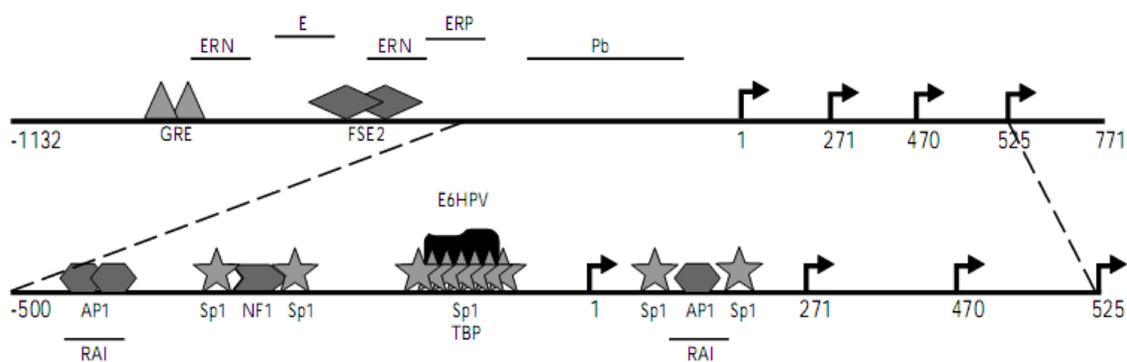


Figura 4: Esquema del promotor del gen de TGF- β ₁ humano. Se indican los factores transcripcionales, los elementos reguladores y los cuatro sitios de inicio de la transcripción identificados: E, Enhancer; ERN, región reguladora negativa; ERP, Región reguladora positiva; PB, Promotor Basal; RAI, Región de autoinducción.

Se han descrito dos polimorfismos en los codones 10 (CTG>CCG) en posición -509 (C>T), +869 (C>T) y 25 (CGG>CCG) en posición +915 que implican un cambio de aminoácido (C>G). Estos polimorfismos se han asociado con diversas enfermedades como hipertensión arterial, pancreatitis crónica (Schneider *et al.* 2004^a, Schneider *et al.* 2004^b), fibrosis pancreática (Bendicho *et al.* 2005) y ALD (Oliver *et al.* 2005).

Se ha sugerido que la combinación de los genotipos -509 T/T con +869 T/T (que codifican para leu/leu) en el codón 10 y +915 G/G (arg/arg) del codón 25 de TGF- β podrían incrementar la secreción de esta citocina. Al respecto Powell y sus colaboradores encontraron una asociación del genotipo G/G en +915 en pacientes con estados avanzados de fibrosis hepática que se potencia con un segundo polimorfismo en el gen de angiotensina (Powell *et al.* 2000), y otro grupo encontró una asociación del polimorfismo alto productor del codón 10 del gen de TGF- β_1 con presencia de fibrosis en pacientes con PC (Bendicho *et al.* 2005). Otros grupos en cambio, no han detectado ninguna relación entre los polimorfismos de TGF- β y el estado fibrótico en PC o HCC.

La siguiente tabla muestra los SNPs de TNF- α , IL-10 y TGF- β estudiados en diferentes poblaciones y sus asociaciones con cirrosis hepática por alcohol (ALC), enfermedad hepática por alcohol (ALD), alcoholismo sin enfermedad hepática (AWLD) y pancreatitis crónica (PC) (Tabla 2). Solamente se ha reportado un estudio analizando las frecuencias de los polimorfismos de IL-10 en consumidores excesivos de alcohol sin daño orgánico y en sujetos con ALC inducido por alcohol, en donde se encontró que la presencia del alelo A en la región -592 A/C no está relacionada con el riesgo de ALC, pero sí con alcoholismo (Marcos *et al.* 2008).

En un estudio hecho en población española, se reportó que la presencia del alelo A del polimorfismo en la región -238 de TNF- α está asociado con un elevado riesgo a desarrollar cirrosis hepática por alcohol (ALC), pero no encontraron ninguna asociación de la región -308 G/A del mismo gen entre alcohólicos y no alcohólicos, ni entre alcohólicos con cirrosis y alcohólicos sin enfermedad hepática (Pastor *et al.* 2005) (Tabla 2).

SNPs	PAPEL DESCRITO	ASOCIACIONES
-238 (G>A) TNF-a TNF-G = G TNF-A =A	A/A: Bajo productor A/G: Intermedio productor G/G: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • Alelo A; Esteatohepatitis alcohólica, cirrosis hepática por hepatitis B y C, hepatitis autoinmune, en caucásicos. • Alelo A; ALC, en población española. (Pastor <i>et al.</i> 2005) • No asociación con PC por OH (Schneider <i>et al.</i> 2004b)
-308 (G>A) TNF-a TNF1 = G TNF2 = A	G/G: Bajo productor G/A: Intermedio productor A/A: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • No asociación entre alcohólicos y no alcohólicos, ni entre ALC y AWLD, en población española. (Pastor <i>et al.</i> 2005) • No asociación con PC por OH (Schneider <i>et al.</i> 2004b)
-1082 (G>A) IL-10	A/A: Bajo productor G/A: Intermedio productor G/G: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • No asociación con PC por OH (Schneider <i>et al.</i> 2004b), ni PC hereditaria, familiar y esporádica (Schneider <i>et al.</i> 2004a)
-819 (C>T) IL-10	T/T: Bajo productor T/C: Intermedio productor C/C: Alto productor	
-592 (C>A) IL-10	A/A: Bajo productor A/C: Intermedio productor C/C: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • Alelo A; No relación con enfermedad hepática por alcohol (ALC), pero sí con alcoholismo en AWLD, en población española. (Marcos <i>et al.</i> 2008)
-1082 (G>A) IL-10	Haplotipo GCC: Alta producción	
-819 (C>T) IL-10	Haplotipo ATA: Baja producción	
-592 (C>A) IL-10		
TGF-β codón 10 -509 (C>T) +869 (C>T)	Alelo C: Bajo productor Alelo T: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • No asociación con PC por OH (Schneider <i>et al.</i> 2004b), ni PC hereditaria, familiar y esporádica (Schneider <i>et al.</i> 2004a) • No relacionados con ALD. (Oliver <i>et al.</i> 2005) • Alelo T; con fibrogénesis en PC (Bendicho <i>et al.</i> 2005)

TGF-β codón 25 +915 (C>G)	Alelo C: Bajo productor Alelo G: Alto productor	<ul style="list-style-type: none"> • No asociación con PC por OH (Schneider <i>et al.</i> 2004b), ni PC hereditaria, familiar y esporádica. (Schneider <i>et al.</i> 2004a) • No relacionados con ALD (Oliver <i>et al.</i> 2005) • Alelo G; en fibrosis hepática avanzada. (Powell <i>et al.</i> 2000) • No Asociación con fibrogénesis en PC. (Bendicho <i>et al.</i> 2005)
TGF-β codones 10 y 25 -509 (C>T) +869 (C>T) +915 (C>G)	Haplotipo TTG: Incrementan la producción de TGF-β.	

Tabla 2: SNPs de TNF-α, IL-10 y TGF-β estudiados en diferentes poblaciones y sus posibles asociaciones con ALC = Cirrosis hepática por alcohol, ALD= Enfermedad hepática por alcohol, AWLD= Alcohólicos sin enfermedad hepática, PC= pancreatitis crónica.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos de genes de citocinas relacionadas con la inflamación como TNF-α, IL-10 y TGF-β, pueden estar asociadas con el consumo de alcohol en población mestiza mexicana joven universitaria

OBJETIVO GENERAL

Determinar las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los genes: TNF- α , IL-10 y TGF- β y determinar su posible asociación con el consumo excesivo de alcohol en una población mexicana de jóvenes universitarios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen de TNF- α en la región -308 G/A y determinar su posible asociación con el consumo excesivo de alcohol en una población mexicana de jóvenes universitarios.
2. Determinar las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas del gen de IL-10 en las regiones -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A y determinar su posible asociación con el consumo excesivo de alcohol en una población mexicana de jóvenes universitarios.
3. Determinar las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas del gen de TGF- β en las regiones -509 C/T, +869 C/T (codón 10) y determinar su posible asociación con el consumo excesivo de alcohol en una población mexicana de jóvenes universitarios.

METODOLOGÍA

Casos y controles

El tamaño de la muestra se determinó con base en la fórmula propuesta por Torgerson & Miles (Torgerson *et al.* 2007), con base en esta se incluyeron 140 estudiantes universitarios voluntarios de la ciudad de México, que no hubiesen consumido alcohol 48 horas antes de su participación en el estudio y los cuales firmaron un consentimiento informado. A cada uno se les tomaron medidas antropométricas, y se les aplicaron los cuestionarios AUDIT (Sáiz *et al.* 2002), Craving (Guardia *et al.* 2004) y CIDI (Sáiz *et al.* 2002, Medina-Mora *et al.* 2005) validados en población mexicana para definir su consumo de alcohol y se calculó el consumo de alcohol en gramos/día (VER ANEXOS).

De acuerdo a los resultados obtenidos de los cuestionarios se clasificaron en: controles a aquellos que tuvieron un puntaje de AUDIT < 8 y que no consumieron alcohol o consumían menos de 10g/día (n= 97), y consumidores a aquellos con AUDIT ≥ 8 y un consumo de alcohol mayor a 10g/día (n= 43), y que hubieran dejado de consumir alcohol 48 horas antes de la toma de muestra. De acuerdo al CIDI, los consumidores se clasificaron en abuso (n= 13) y dependencia (n= 30).

Toma de muestras

Se extrajeron 20 ml de sangre periférica de cada sujeto en tubos con EDTA como anticoagulante. Se tomó una alícuota de 2 ml y se almacenó a -70° C para hacer la extracción del ADN y los polimorfismos genéticos de las citocinas, el resto de la sangre se utilizó para realizar estudios de biometría hemática de cada uno de los sujetos.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, la sangre se trató con una solución de lisis de hematíes que contenía 50 mM de NaCl y 5 mM MgCl₂ en un tampón 10 mM Tris-Cl pH 7,6 y posteriormente se utilizó la técnica de *salting out* con el Kit “BDtract™ ADN genómico” descrito por Miller (Miller *et al.* 1988). Se separó 1ml de sangre total en dos tubos de 500 µl, a cada tubo se le adicionaron 500 µL de buffer de fosfatos (PBS 1X). Se adicionaron 500 uL de la solución BD1 10mM Tris-Cl pH 7,6, 10 mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA) y 50 mM NaCl, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), Se mezcló bien por inversión. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se retiró lentamente el sobrenadante y se enjuago el botón nuclear. Se lavo el botón con 500 µl de solución de BD2, se centrifugó a 3000rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet con 120 µl de solución BD3 y se pipeteo varias veces. Se incubó a 65 °C por 15 min. Lo siguiente fue agregar 50 µl de solución de BD4 y se mezcló bien. Se centrifugó a 13000rpm por 10 minutos y se colectó cuidadosamente el sobrenadante en un tubo de eppendorf de 1.5 ml evitando el pellet. Se adiciono 600 µl de isopropanol al sobrenadante. Se mezcló bien la muestra por inversión (40-50 veces) hasta hacer precipitar las hebras de ADN. Se descartó el sobrenadante y se la lavó la hebra de ADN con 1 ml de etanol al 70% frio. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante y se secó el pellet y se adicionaron de 300 a 500 µl (de acuerdo al tamaño del botón) de H₂O estéril. Por último se calentó el tubo a 65 °C por 20 minutos.

Cuantificación y pureza del ADN

La concentración y pureza del ADN obtenido se valoraron mediante espectrofotometría con el sistema *Beckman DU800*. Para conocer la concentración se aplicó la siguiente formula:

- Concentración de ADN [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] = ($A_{260 \text{ nm}}$) (factor de dilución) (ADN de doble cadena).

Donde:

A_{260} = La absorbancia a 260 nm

Factor de dilución = 125

ADN de doble cadena = 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Para determinar la pureza:

- Pureza = $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = 1.6-2.0$

Todas las muestras fueron ajustadas a la misma concentración (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Determinación de la integridad del ADN

Para determinar la integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se corrieron a 120 V por 30 minutos, utilizando como buffer de carga el colorante blue orange 6X y la solución amortiguadora TBE 1X.

Genotipificación de las citocinas

La genotipificación e identificación de los polimorfismos para cada citocina se realizaron por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de dos brazos usando como controles internos el gen de β -actina, utilizando las secuencias iniciadoras descritas en la Tabla 4. Con 100 ng de ADN genómico y 1U de ADN polimerasa (Taq ADN polymerase; Bio Rad) en un volumen final de 25 μl . La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “*GeneAmp PCR system 2700*” (Applied Biosystems).

Genotipo	Iniciadores	Condiciones de amplificación	Tamaño de los fragmentos amplificados	Referencias
TNF -308 G/A TNF1 = G TNF2 = A	Genérico 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3' G 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3' A 5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'	95° C 20s, 61° C 50s, 72° C 50s: 25 ciclos	184 pb	Verjans <i>et al.</i> 1994.
IL-10 -1082 G/A	Genérico 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3' G 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3' A 5'-ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'	95° C 20s, 61° C 50s, 72° C 50s: 25 ciclos	258 pb	Crilly <i>et al.</i> 2003.
IL-10 -819 C/T	Genérico 5'-AGGATGTGTTCCAGGCTCCT-3' C 5'-CCCTTGACAGGTGATGTAAC-3' T 5'-ACCTTGACAGGTGATGTAAT-3'	95° C 20s, 59° C 50s, 72° C 50s: 25 ciclos	233 pb	Crilly <i>et al.</i> 2003.
IL-10 -592 C/A	Genérico 5'-AGGATGTGTTCCAGGCTCCT-3' C 5'-CCCTTGACAGGTGATGTAAC-3' A 5'-ACCTTGACAGGTGATGTAAT-3'	95° C 20s, 59° C 50s, 72° C 50s: 25 ciclos	233 pb	Crilly <i>et al.</i> 2003.
TGF-β codón 10 -509 (C/T) +869 (C/T)	Genérico 5'-TCCGTGGGATACTGAGACAC-3' C 5'-GCAGCGGTAGCAGCAGCG-3' T 5'-AGCAGCGGTAGCAGCAGCA-3'	95° C 20s, 59° C 50s, 72° C 50s: 25 ciclos	241 pb	Li <i>et al.</i> 2004.

Tabla 4. Secuencias de primers para cada uno de los polimorfismos. Condiciones de amplificación y tamaño del fragmento en pares de bases (pb).

Visualización en gel de agarosa

Para ver el resultado de la PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 120 V por 30 minutos, utilizando el buffer de carga blue orange 6X y la solución amortiguadora TBE 1X.

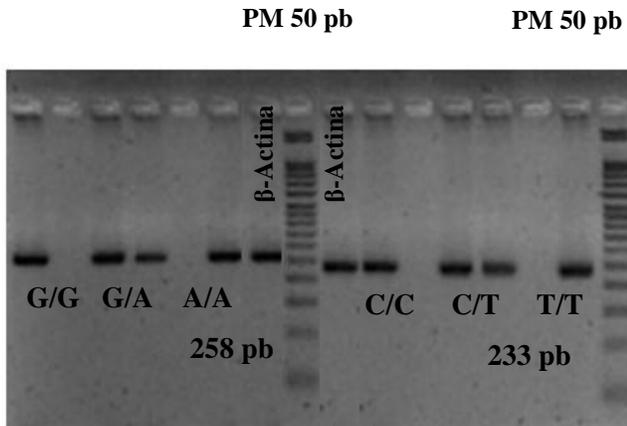


Figura. 5. Estandarización de la genotipificación de los polimorfismos del gen de IL-10. Lado izquierdo SNP -1082 G/A. G/G homocigoto del alelo G; A/A homocigoto del alelo A; G/A heterocigoto; Control de β -Actina, Peso Molecular (PM) 258 pb. Lado derecho SNP -819 C/T y -592 C/A. C/C homocigoto del alelo C; T/T homocigoto del alelo T; C/T heterocigoto,

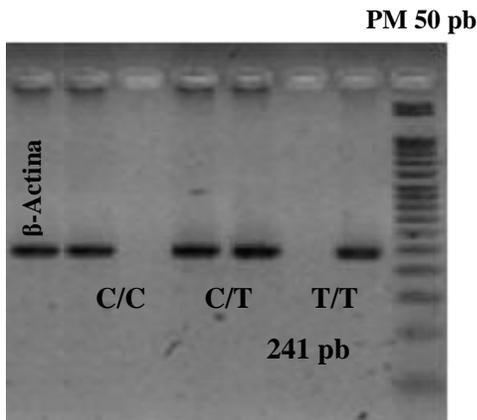


Figura. 6. Estandarización de la genotipificación de los polimorfismos de TGF- β . SNP del codón 10 -509 C/T y +869 C/T. Control de β -Actina, C/C homocigoto al alelo C; T/T homocigoto al alelo T; C/T heterocigoto; PM 241 pb.

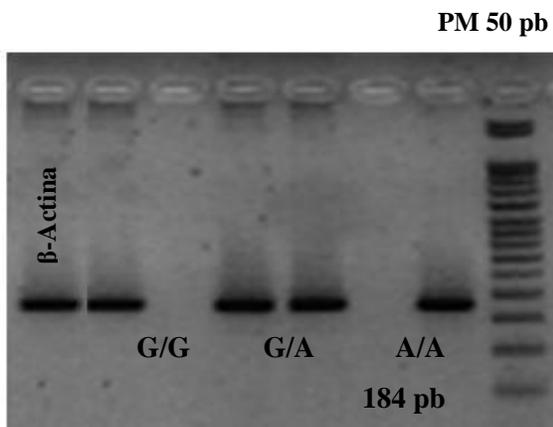


Figura. 7. Estandarización de la genotipificación de los polimorfismos de TNF- α . SNP-308 G/A. Control de β -Actina, G/G homocigoto del alelo G; A/A homocigoto del alelo A; G/A heterocigoto; PM 184 pb.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis comparativos se realizaron con el programa informático “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) versión 16.0 para Windows. Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas se determinaron por conteo directo. La comparación de las frecuencias de alelos, genotipos y haplotipos entre los grupos se realizó mediante la prueba de Chi cuadrada (χ^2) y mediante el uso de tablas de cotingencia. Las variables cuantitativas se analizaron mediante la prueba de T-student, y se resumieron en su media y error estándar (EE), considerando un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Los datos demográficos de los controles y los sujetos consumidores de alcohol se muestran en la tabla 5. El promedio de edad de los controles fue significativamente menor al de los consumidores (21 ± 0.2 vs. 22 ± 0.3 años respectivamente) ($p= 0.036$), con un IMC de 23 ± 0.4 y 24 ± 0.5 sin diferencia significativa.

El 60 % de los consumidores fueron hombres con un promedio de edad de 22 ± 0.5 años sin diferencias significativas en comparación con las mujeres consumidoras 21 ± 0.4 , ($p= 0.071$). El 63 % de los controles fueron mujeres con un IMC de 23 ± 0.5 y un promedio de edad de 20 ± 0.2 años, el cual mostró una diferencia en comparación con los hombres controles con 21 ± 0.5 años y IMC de 23 ± 0.5 ($p = 0.048$) (Tabla 5).

Tabla 5. Características demográficas de los sujetos con consumo de alcohol y el grupo control.

	Controles	Consumidores	p
n = 140	97	43	
Edad (años)	21 ± 0.2	22 ± 0.3	0.036
IMC (kg/m^2)	23 ± 0.4	24 ± 0.5	0.196
Proporción de sexos n F/M (%)	61/36 (63/37)	17/26 (40/60)	0.014
Edad F/M (años)	$20 \pm 0.2 / 21 \pm 0.5$	$21 \pm 0.4 / 22 \pm 0.5$	* 0.596 ** 0.071 + 0.355 ++ 0.048

Todos los datos se muestran en media \pm error estándar (EE); F/M: Femenino/Masculino; IMC: Índice de masa corporal. * Diferencia entre F consumidor vs. F Control. ** Entre F consumidor vs. M consumidor. + Entre M consumidor vs. M Control. ++ Entre F control vs. M control.

Los controles consumieron una cantidad de alcohol promedio de $1.6 \text{ g} \pm 0.2$ de alcohol puro por día, en tanto en los consumidores la ingesta fue de $25.9 \pm 4 \text{ g}$ de etanol puro (Tabla 6).

Aunque la cantidad de alcohol ingerida por el subgrupo de abuso fue menor en comparación con el de dependencia no se alcanzó una diferencia significativa mediante la prueba de t-student ($p= 0.668$), tampoco hubo diferencia entre estos dos subgrupos en cuanto al deseo por la bebida ni la falta de resistencia al consumo, pero si en el puntaje del AUDIT ($p=0.038$), (Tabla 7).

Tabla 6. Resultados de los cuestionarios del grupo control y los sujetos con consumo de alcohol.

	Controles n = 97	Consumidores n = 43
g OH/día	1,6 ± 0.2	25.9 ± 4
AUDIT	2 ± 0.1	15 ± 0.7
CIDI: Abuso/Dependencia n (%)	0	13 (30)/ 30 (70)
Craving Total	17 ± 0.5	32 ± 2
Deseo por la bebida	13 ± 0.4	26 ± 1
Desinhibición conductual	4 ± 0.2	6 ± 0.7

Todos los datos se muestran en media ± error estándar (EE).

Tabla 7. Características de los sujetos con consumo de alcohol clasificados de acuerdo al CIDI en Abuso y Dependencia

	Consumidores		p
	Abuso n= 13	Dependencia n=30	
Edad (años)	22 ± 0.6	21 ± 0.5	0.514
g OH/día	23 ± 3	27 ± 6	0.668
AUDIT	12 ± 0.6	16 ± 1	0.038*
Craving Total	32 ± 2	32 ± 3	0.875
Deseo por la bebida	26 ± 2	26 ± 2	0.940
Desinhibición conductual	5 ± 0.5	6 ± 1	0.571

Todos los datos se muestran en media ± error estándar (EE), * Estadísticamente significativos.

No hubo diferencias en el consumo de etanol/día, los puntajes de AUDIT ni Craving de acuerdo al género (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de los cuestionarios AUDIT, CIDI y Craving de acuerdo al género.

	Consumidores		P
	Mujeres n = 17	Hombres n = 26	
g OH/día	17 ± 2	32 ± 7	0.077
AUDIT	15 ± 1	15 ± 1	0.358
CIDI: Abuso/Dependencia n (%)	3/14 (18/82)	10/16 (38/62)	0.087
Craving Total	33 ± 2	31 ± 3	0.630
Deseo por la bebida	28 ± 2	25 ± 2	0.380
Desinhibición conductual	5 ± 0.4	6 ± 1	0.523

Todos los datos se muestran en media ± error estándar (EE).

Los resultados de las pruebas bioquímicas se compararon mediante la prueba de t-student, los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y AST se encontraron ligeramente elevados en los consumidores en comparación con los controles (Tabla 9), y particularmente AST en el grupo de dependencia (Tabla 10).

Tabla 9. Pruebas de laboratorio en sujetos con consumo de alcohol y el grupo control.

	Controles n= 97	Consumidores n= 43	p
Eritrocitos (10⁶)	5.1 ± 0.06	5.3 ± 0.07	0.048*
Hb (g/dl)	15.6 ± 0.1	16.3 ± 0.2	0.013*
Hto (%)	45.3 ± 0.6	48.4 ± 0.7	0.001*
VGM (µ)	88.4 ± 0.4	91 ± 0.6	0.007*
HCM (pg)	30.4 ± 0.2	30.6 ± 0.2	0.343
GGT (U/L)	25.4 ± 2.4	28 ± 3	0.573
AST (U/L)	30.6 ± 1	36.3 ± 3	0.046*
ALT (U/L)	30.6 ± 2	37 ± 5	0.056

Todos los datos se muestran en media ± error estándar (EE). Hb: hemoglobina; Hto: hematocrito; VGM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; ALT: alaninaaminotransferasa; AST: aspartatoaminotransferasa; GGT; gamma-glutamilttransferasa; EE: Error Estandar; U/L: Unidades por litro; g/dl: gramos por decilitro; pg: picogramos; µ: micras, * Estadísticamente significativos.

Tabla 10. Pruebas de laboratorio en sujetos con abuso y dependencia.

	Abuso n=13	Dependencia n= 30	p
Eritrocitos (10⁶)	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	0.505
Hb (g/dl)	16.9 ± 0.4	16.2 ± 0.3	0.153
Hto (%)	50.2 ± 1.3	47.9 ± 0.8	0.123
VGM (µ)	91.7 ± 0.9	90.4 ± 3.9	0.279
HCM (pg)	30.9 ± 0.4	30.5 ± 0.3	0.399
GGT (U/L)	24.9 ± 3.2	29.2 ± 4.4	0.443
AST (U/L)	29.7 ± 2.3	39.1 ± 4.1	0.055*
ALT (U/L)	32.8 ± 4.2	41.5 ± 6.7	0.280

Todos los datos se muestran en media ± error estándar (EE). Hb: hemoglobina; Hto: hematocrito; VGM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; ALT: alaninaaminotransferasa; AST: aspartatoaminotransferasa; GGT; gamaglutamiltransferasa; EE: Error Estandar; U/L: Unidades por litro; g/dl: gramos por decilitro; pg: picogramos; µ: micras, * Estadísticamente significativos.

La comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en el gen de IL-10 entre sujetos con consumo de alcohol y el grupo control se analizó mediante la prueba de Chi cuadrada (χ^2). No se encontraron diferencias entre estos grupos en las regiones -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A del gen (Tabla11).

Tabla 11. Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en el gen de IL-10, en sujetos controles y con consumo de alcohol.

SNPs	Controles (%)	Consumidores (%)	p
Alelos			
-1082 G	51	50	1.000
A	49	50	
-819 C	45	50	0.57
T	55	50	
Genotipos n (%)			
-1082 GG	13 (14)	4 (10)	0.683
AA	11(12)	4 (10)	
GA	67 (74)	33 (80)	
Total	91	41	
-819 CC	7 (8)	5 (11.5)	0.545
TT	16 (18)	5 (11.5)	
CT	66 (74)	33 (77)	
Total	89	43	
Haplotipos n (%)			
GCC/GCC***	0 (0)	1 (2)	0.187
GCC/ACC**			
GCC/ATA**	61 (69)	24 (59)	
ACC/ACC**			
ACC/ATA*	21 (23)	5 (12)	
ATA/ATA*			
GCC/GTA⁺	7 (8)	11 (27)	
GTA/ATA⁺			
Total	89	41	

Las frecuencias alélicas están expresadas en porcentaje. Las frecuencias genotípicas de -819 C/T son iguales a las de -592 C/A por ligamiento completo -819 C con -592 C y -819 T con -592 A. SNPs: polimorfismos de nucleótido simple. *** Alto productor, **Medio productor y *Bajo productor de IL-10. ⁺No descritos en la literatura.

La distribución de las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en el gen de IL-10 en los subgrupos de abuso y dependencia se encuentran en la Tabla 12. Se encontró una diferencia en las frecuencias alélicas, aunque no en las genotípicas de -1082 G/A entre estos dos subgrupos, siendo el alelo A el predominante en el grupo de abuso, y el alelo G en dependencia (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en el gen de IL-10, en sujetos con abuso y dependencia de alcohol.

SNPs	Consumidores		
	Abuso n (%)	Dependencia n (%)	p
Alelos			
-1082 G	39	55	0.043
A	61	45	
-819 C	50	50	0.689
T	50	50	
Genotipos			
-1082 GG	0 (0)	4 (14)	0.140
AA	3 (23)	1 (4)	
GA	10 (77)	23 (82)	
Total	13	28	
-819 CC	2 (14)	3 (10)	0.575
TT	2 (14)	3 (10)	
CT	9 (72)	24 (80)	
Total	13	30	
Haplotipos			
GCC/GCC****	0 (0)	1 (4)	0.398
GCC/ACC**			
GCC/ATA**	5 (38)	19 (68)	
ACC/ACC**			
ACC/ATA*	3 (24)	2 (7)	
ATA/ATA*			
GCC/GTA⁺	5 (38)	6 (21)	
GTA/ATA⁺			
Total	13	28	

Las Frecuencias alélicas están expresadas en porcentaje. Las frecuencias genotípicas de -819 C/T son iguales a las de -592 C/A por ligamiento completo -819 C con -592 C y -819 T con -592 A. SNPs: polimorfismos de nucleótido simple. **** Alto productor, **Medio productor y *Bajo productor de IL-10.⁺No descritos en la literatura.

No se encontró alguna diferencia entre los haplotipos alto (GCC/GCC), medio (GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC) y bajo productor (ACC/ATA, ATA/ATA) de IL-10. En el caso de -819 C/T y -592 C/A no hubo diferencias en las frecuencias genotípicas ni alélicas (Tabla 12).

En el gen de TNF- α en -308 G/A, no se encontró diferencia significativa en las frecuencias y genotípicas y alélicas entre consumidores y controles (Tabla 13), pero sí entre los subgrupos de abuso y dependencia (Tabla 14).

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en el gen de TNF- α , en sujetos controles y con consumo de alcohol.

SNPs	Controles n (%)	Consumidores n (%)	p
Alelos			
TNF -308 G	66	65	1.000
A	34	35	
Genotipos			
G/G	10 (32)	3 (30)	0.610
A/A	0 (0)	0 (0)	
G/A	21 (68)	7(70)	
Total	31	10	

Las Frecuencias alélicas están expresadas en porcentaje. SNPs: polimorfismos de nucleótido simple.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en el gen de TNF- α , en sujetos con abuso y dependencia de alcohol.

SNPs	Consumidores		p
	Abuso n (%)	Dependencia n (%)	
Alelos			
TNF -308 G/A			0.0005
G	75	50	
A	25	50	
Genotipos			

G/G	3 (50)	0 (0)	0.058
A/A	0 (0)	0 (0)	
G/A	3 (50)	4 (100)	
Total	6	4	

Las Frecuencias alélicas están expresadas en porcentaje. SNPs: polimorfismos de nucleótido simple.

En el codón 10 del gen de TGF- β , el SNP de -509 (C/T) que se encuentra en unión con el +869 (C/T) se observa una tendencia del genotipo C/C en los controles, pero al calcular las frecuencias alélicas no hubo diferencias entre consumidores y controles (Tabla 15) ni entre abuso y dependencia (Tabla 16).

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en el gen de TGF- β , en sujetos controles y con consumo de alcohol.

SNPs	Controles n (%)	Consumidores n (%)	p
Alelos			
TGF-β codón 10 -509 C/T			
C	52	42	0.20
T	48	58	
Genotipos			
TGF-β codón 10 -509 C/T			
C/C	20 (21)	2 (5)	0.063
T/T	16 (16)	10 (26)	
C/T	61 (63)	27 (69)	
Total	97	39	

Las Frecuencias alélicas están expresadas en porcentaje. Las frecuencias genotípicas de TGF- β -509 son iguales a las de +869 por ligamiento completo de -509 con +869. SNPs: Polimorfismos de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphisms).

Tabla 16. Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en el gen de TGF- β , en sujetos con abuso y dependencia de alcohol.

SNPs	Consumidores		
	Abuso	Dependencia	p
Alelos			
TGF-β codón 10 -509 C/T			
C	38	41	0.203
T	62	59	
Genotipos			
TGF-β codón 10 -509 C/T			
C/C	0 (0)	2 (7)	0.614
T/T	3 (25)	7 (26)	
C/T	9 (75)	18 (67)	
Total	12	27	

DISCUSIÓN

A pesar de que se ha descrito que el alcoholismo constituye un problema grave de salud pública en el mundo, la mayoría de los estudios realizados sobre el tema se han hecho en población caucásica adulta y con enfermedad hepática por alcohol, sin embargo no se han realizado estudios en población mexicana particularmente joven, quienes constituyen la población más susceptible de consumo de alcohol que aun no tienen daño orgánico y en la cual se incrementa la probabilidad de desarrollar desórdenes por el uso de alcohol (AUD).

En nuestra investigación encontramos que nuestra población se localizó dentro del rango de edad en el cual se incrementa el consumo riesgoso y potencialmente dañino de alcohol reportado por Díaz *et. al.* 2008, ubicado entre los 20 a 25 años. Sumado a esto, los estudiantes consumidores de alcohol fueron mayores en cuanto a edad en comparación con los controles de manera significativa, con 22 ± 0.3 y 21 ± 0.2 años respectivamente (Tabla 5). Ambos grupos mostraron tener un peso normal y saludable de acuerdo al IMC establecido por la Organización Mundial de la Salud (20 a 25 kg/m^2), siendo de 24 ± 0.5 en el caso de los consumidores y 23 ± 0.4 en los controles (Tabla 5), disminuyendo las posibilidades de padecer enfermedades ligadas al sobrepeso como hipertensión, enfermedades cardíacas, diabetes, hígado graso, etc.

El promedio de alcohol ingerido de los controles fue de 1.6 ± 0.2 g de alcohol por día con un puntaje de AUDIT de 2 ± 0.1 , mientras que en los consumidores fue de 25.9 ± 4 g y un AUDIT de 15 ± 0.7 (Tabla 6). De acuerdo a la Escala Multidimensional de Craving de Alcohol (EMCA) (Guardia *et al.* 2004), los controles presentaron un deseo por beber leve, en tanto que los consumidores se encontraron en el nivel moderado, la desinhibición

conductual interpretada como falta de resistencia al consumo fue moderada en ambos grupos (Tabla 6).

Entre los consumidores, la cantidad de alcohol ingerida por el subgrupo de abuso fue menor en comparación con el de dependencia (23 ± 3 y 27 ± 6 g/día respectivamente), sin embargo no mostraron diferencia estadística, tampoco en cuanto a la edad ni al craving, siendo moderado en ambos subgrupos para los dos factores, en cambio, el AUDIT, sí mostró diferencia significativa siendo de 12 ± 0.6 para abuso y 16 ± 1 para dependencia (Tabla 7).

No se encontraron diferencias en los consumidores de acuerdo al género en: la edad (F: 21 ± 0.4 vs. 22 ± 0.5 años, $p=0.071$) (Tabla 5), la cantidad de alcohol ingerida (F: 17 ± 2 g/día vs. M: 32 ± 7 g/día) (Tabla 8), ni los puntajes de AUDIT siendo 15 para ambos, craving resultando moderado para ambos sexos, ni CIDI ya que tanto hombres como mujeres fueron en mayor porcentaje dependientes (Tabla 8).

Al analizar las pruebas de laboratorio entre controles y consumidores encontramos que en ambos los valores de eritrocitos, Hb, VGM, HCM, GGT y ALT se encontraron dentro del rango considerado como normal: (eritrocitos: $4.2-5.4 \times 10^6/\text{ml}$, Hb: 12.5-16.8 g/dl, VGM: 81-99 micras, HCM: 27.0- 33.0 pg, GGT: 8-78 U/L, ALT: 9-52 U/L), en tanto que hematocrito y AST sobrepasaron ligeramente este rango (Hto: 37.0- 47.0%, AST: 14-36 U/L). A pesar de esto, sí se encontraron diferencias estadísticas entre controles y consumidores en los valores de: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, VGM, el cual se eleva cuando hay un déficit de vitamina B12 o de ácido fólico, o cuando hay un consumo elevado de alcohol y AST, siendo mayores en los consumidores de esta sustancia (Tabla 9).

Entre los subgrupos de abuso o dependencia, únicamente se encontraron diferencias en los valores de AST: (abuso: 29.7 ± 2.3 U/L vs. dependencia: 39.1 ± 4.1 U/L, $p= 0.055$) (Tabla 10), sin embargo como se mencionó anteriormente una elevación en AST por sí solo no constituye un indicador específico de daño hepático dada su localización en otros órganos.

Se sabe que la IL-10 ejerce efectos sobre distintas poblaciones celulares y ejerce un efecto regulador sobre el sistema inmune. Entre los individuos existe una gran variación en la producción de IL-10, en estudios previos se ha descrito que la producción de esta citocina en monocitos de sangre periférica se ve favorecida en presencia del alelo G del polimorfismo -1082 G/A, y que este efecto se mantiene al adquirir el haplotipo GCC, en tanto que los genotipos ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA la producen en menor cantidad (Moreno *et al.* 2007). En nuestra investigación no encontramos una significancia estadística en las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas del SNP -1082 G/A del gen de IL-10 entre controles y consumidores, pero observamos un predominio del genotipo intermedio productor (G/A) en ambos grupos (Tabla 11), sin embargo al hacer la clasificación del grupo consumidor, encontramos que el alelo A (descrito como el bajo productor de IL-10) estuvo más relacionado con el grupo de abuso de manera significativa, mientras que el alelo G (alto productor) con el grupo de dependencia (Tabla 12), estos hallazgos contrastan con lo descrito anteriormente en la literatura, donde se propone que el etanol agudo puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en monocitos humanos a través de la inhibición del factor nuclear Kappa B (NF- κ B) y producir un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , mientras que el consumo crónico está asociado con activación de NF- κ B incrementando la expresión de genes de citocinas proinflamatorias y una disminución de IL-10 en suero.

Algunos estudios que analizaron la presencia del polimorfismo -592 C/A el cual se encuentra en fuerte equilibrio de unión con el -819 C/T no pudieron determinar una asociación de estas variaciones genéticas con pancreatitis crónica por alcohol, ni enfermedad hepática por alcohol, pero un estudio realizado por el grupo de Marcos *et al.* 2008, reportó una asociación del alelo A en -592 C/A con alcoholismo sin enfermedad hepática. Sin embargo, nosotros no encontramos alguna diferencia entre controles y consumidores, incluso los consumidores mostraron la misma proporción para ambos alelos: 50% para A de -592 C/A (ó T de -819 C/T) y 50% para C (Tabla 11), y tampoco hubo diferencias entre tener abuso o dependencia (Tabla 12). Al realizar el análisis de los haplotipos descritos para el gen de IL-10 (GCC: alto productor, ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA: bajos productores) tampoco encontramos una diferencia entre controles y consumidores ni entre los mismos consumidores (Tabla 11 y 12).

Posiblemente la discordancia entre los datos pueda ser un factor de etnicidad, tomando en cuenta que existen grandes variaciones en la distribución de los polimorfismos del promotor de IL-10 en las distintas poblaciones, lo que podría explicar los diferentes hallazgos. Se ha documentado que el alelo A de -1082 está presente en el 94 % de la población en el sur de China, en un 47 a 51 % en el norte de Europa y en un 66 % en nuestra población, fenómeno que se podría ver reflejado como un efecto de enmascaramiento en nuestra población.

Por otra parte, TNF α es una molécula pleiotrópica que tiene efectos pro-inflamatorios, es un agente clave en la inmunidad del huésped, con actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana. El alelo TNF2 de la región -308 G/A del TNF- α , se ha descrito como el más importante en la regulación de la producción de TNF- α (Kroeger *et al.* 1997). Estudios *in vitro* en células estimuladas con lipopolisacárido, indican que las de genotipo TNF2 (A/A)

presentan una mayor sobreexpresión de la citocina que las de genotipo TNF1 (G/G). Al hacer nuestros estudios de comparación, pudimos observar que el grupo heterocigoto (G/A) (intermedio productor) fue el que predominó en ambos grupos tanto control y consumidores, pero además que el genotipo A/A (alto productor) no estuvo presente en ninguno de estos dos grupos (Tabla 13). Al hacer la estratificación de acuerdo al CIDI, el grupo de abuso exhibió una mayor proporción del alelo G con una significancia estadística (Tabla 14), a diferencia del estudio realizado en población española donde no encontraron ninguna asociación de esta región entre alcohólicos y no alcohólicos, ni entre alcohólicos con cirrosis y alcohólicos sin enfermedad hepática (Pastor *et al.* 2005).

Al igual que las demás citocinas, la producción de TGF- β se encuentra sujeta al control genético de una forma compleja. A pesar de que el alelo T (alto productor de TGF- β) de -509 C/T y +869 C/T ha sido asociado con fibrogénesis pulmonar y pancreática (Bendicho *et al.* 2005), al analizar nuestros resultados, observamos que el genotipo que predominó fue el intermedio productor (C/T) en controles y en consumidores y al calcular las frecuencias alélicas, no se encontró una diferencia entre ellos (Tabla 15), ni entre abuso y dependencia (Tabla 16).

CONCLUSIONES

Este estudio es el primer trabajo realizado en una población joven en el aspecto demográfico como genético que analiza las frecuencias de los genes de IL-10, TNF- α y TGF- β . En los sujetos estudiados se encontró con mayor frecuencia el polimorfismo que da origen al productor intermedio de IL-10, determinado por los SNPs -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), de la misma manera que de TNF- α -308 (G/A) y TGF- β -509 (C/T) y +869 (C/T) tanto en la población consumidora de alcohol como en la no consumidora. A pesar de esto sí se encontraron diferencias marcadas entre los consumidores en el SNP de -1082 G/A de IL-10, siendo el alelo A (bajo productor) más frecuente en los sujetos con abuso clasificados de acuerdo a la entrevista diagnóstica (CIDI), pero estando presente también el alelo G (bajo productor de TNF- α) del SNP -308G/A en este mismo grupo, además de diferencias en los niveles de AST y en el test de identificación de desórdenes por el consumo de alcohol (AUDIT) entre ambos subgrupos. En relación a los haplotipos no hubo ninguna asociación de los polimorfismos con el consumo excesivo de alcohol, posiblemente la influencia de algunos factores de tipo ambientales, podrían ejercer un papel en la segregación de alelos que podrían enmascarar la identificación de polimorfismos en nuestra población.

ANEXOS

1. Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)

El AUDIT consiste en 10 preguntas que consideran los siguientes aspectos: Preguntas 1-3: La cantidad y frecuencia del consumo de alcohol, Preguntas 4-6: Examinan síntomas de dependencia al alcohol, Preguntas 7-10: Exploran las consecuencias negativas asociadas al consumo de alcohol. Cada pregunta tiene de tres a cinco posibles respuestas. Cada respuesta tiene un valor numérico que va de cero a cuatro puntos. La sumatoria de los puntos de cada respuesta da un puntaje total con un máximo de 40 puntos. En general se considera que en la población adulta mayor de 21 años de edad, un puntaje total de 0 a 7 puntos refleja niveles de consumo seguro de alcohol, mientras que puntajes de 8 o más puntos indican la presencia de consumo riesgoso y dañino (VER ANEXO 1).

ANEXO 1

Por favor teclea el número de la respuesta correcta para cada pregunta en el recuadro rosa.

<i>Ítems</i>	<i>Criterios operativos de valoración</i>
1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?	0. Nunca 1. Una o menos veces al mes 2. De 2 a 4 veces al mes 3. De 2 a 3 veces a la semana 4. Cuatro o más veces a la semana
2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?	0. 1 o 2 1. 3 o 4 2. 5 o 6 3. De 7 a 9 4. 10 o más
3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en una sola ocasión de consumo?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
4. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
9. ¿Usted o alguna otra persona han resultado heridos porque usted había bebido?	0. No 2. Sí, pero no en el curso del último año 4. Sí, el último año
10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario ha mostrado preocupación por su consumo de bebidas alcohólicas o le ha sugerido que deje de beber?	0. No 2. Sí, pero no en el curso del último año 4. Sí, el último año

2. Craving

La Escala Multidimensional de Craving de Alcohol (EMCA) evalúa dos factores del craving: 1) Deseo intenso de beber o la necesidad imperiosa de autoadministrarse una determinada sustancia, 2) Desinhibición conductual o falta de resistencia al consumo. El cuestionario consiste en 12 preguntas y a cada una de las 5 posibles respuestas se les asigna un puntaje: Muy de acuerdo (5), Bastante de acuerdo (4), ni de acuerdo ni en desacuerdo (3), bastante en desacuerdo (2) y muy en desacuerdo (1) (VER ANEXO 2). De manera que la EMCA da lugar a dos puntuaciones parciales (una para cada factor) y una puntuación global, cuyos rangos son 10 a 50 para el deseo de beber, 2 a 10 para la desinhibición conductual y 12 a 60 para la puntuación bruta global. La puntuación bruta del factor de *deseo por beber* se obtiene acumulando las respuestas de los 10 ítems correspondientes, mientras que la puntuación para *desinhibición conductual* se calcula restando a 12 la suma de las respuestas a los ítems 4 y 12, por ejemplo si un paciente responde 1 en el ítem 4 y 2 en el ítem 12, la puntuación de desinhibición será $12 - (1+2) = 9$. La *puntuación bruta global* se obtiene sumando la puntuación obtenida en los dos factores. La interpretación de los puntajes se realizó de acuerdo a la tabla 17 (Guardia *et al.* 2004).

	Ausente	Leve	Moderado	Intenso
Deseo de beber	10	11-17	18-34	> 34
Desinhibición conductual	2	3	4-7	> 7
Puntuación global del craving	12	13-22	23-40	> 40

Tabla 17. Interpretación de los resultados de la escala y sus factores.

ANEXO 2

Por favor pon una X en el recuadro según sea tu respuesta

<i>Durante la última semana...</i>	<i>Muy de acuerdo</i>	<i>Bastante de acuerdo</i>	<i>Ni de acuerdo ni en desacuerdo</i>	<i>Bastante en desacuerdo</i>	<i>Muy en desacuerdo</i>
1. He tenido ansia de beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Habría hecho casi cualquier cosa por beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. He deseado beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. He podido controlar completamente mi deseo de beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Tomar una copa habría sido ideal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. He estado pensando la manera de ir a por una bebida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Beber hubiera sido maravilloso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. He tenido muy a menudo la mente ocupada con imágenes relacionadas con la bebida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Las ganas de beber han sido muy intensas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Me hubiera sentido mejor si hubiera podido beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. He experimentado una vez o más un intenso deseo de beber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Aunque hubiese tenido la oportunidad, no hubiera bebido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. Composite Internacional Diagnostic Interview (CIDI)

El CIDI es una entrevista diagnóstica desarrollada por la OMS para evaluar y clasificar desordenes mentales y problemas relacionados con el consumo de alcohol y otras drogas . El CIDI está basado en el ICD-10 y el DSM-IV. Existe una versión reducida denominada CIDI substance abuse module (CIDI-SAM), diseñada para realizar diagnóstico de abuso o dependencia, según criterios DSM-III R o CIE-10, de las siguientes sustancias: alcohol, tabaco, cannabinoides, cocaína, estimulantes, barbitúricos, sedantes, hipnóticos, alucinógenos, inhalantes y opioides, esta versión evalúa los síntomas típicos de la abstinencia de cada sustancia y las consecuencias físicas, sociales y psicológicas de su uso, con el fin de determinar la severidad del síndrome de dependencia (Saiz *et al.* 2002, Medina-Mora *et al.* 2005).

4. Consumo de alcohol en g/día

Adicionalmente se calculó el consumo de alcohol (g de OH/día) reconocido por los sujetos voluntarios de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Gramos de etanol} = (G^\circ \times \text{ml} \times 0,8) / 100$$

Donde:

- G° : La graduación alcohólica de la bebida, la cual suele visualizarse en la etiqueta de la misma.
- ml: La cantidad de bebida consumida, expresada en mililitros.
- 0,8: El peso específico del etanol (es decir, el peso de 1 gramo de alcohol puro es de 0,8 g).

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Lichtman A. (2004). Inmunología celular y molecular. 5ª ed. (66-79), Madrid, España: Elsevier España, S.A.
2. Agarwal DP, Goedde HW. Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. *Alcohol*. 1989; 6(6): 517-23.
3. Aguirre J, Valencia P. Estructura normal del hígado, *Rev Gastroenterol Méx*. 1988; 53: 133-142.
4. Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000; 7(1): 40-48.
5. Bendicho M, Guedes J, Silva N, et al. Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2005; 30(4): 333-6.
6. Benjamin L. (2008). El contenido del genoma, en Benjamin L. *Genes IX*. (55-60), México: Ed. Mc Graw-Hill.
7. Brower AM. Are college students alcoholics? *J Am Coll Health*. 2002; 50: 253-255.
8. Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, Wands JR, Kovacs EJ. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30(9): 1624-31.
9. Cliona O'Farrelly, Derek G. (2003). *Liver Immunology* (41-47, 83-90), Totowa, NJ: Humana Press Inc.
10. Corinne J, Montes R, Próspero G. El paraíso y el infierno en el cerebro: el sistema de la recompensa. *Liber Addictus*. 2005; 86(1): 3-7.

11. Courtney K., Polich J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychol Bull.* 2009; 135(1): 142-56.
12. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30(4): 720-30.
13. Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(2): 115-27.
14. Crilly A, Hamilton J, Clark C, A. Jardine A, Madhok R. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2003; 42:1295–1298.
15. Das SK, Dhanya L, Vasudevan DM. Biomarkers of alcoholism: an updated review. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008; 68(2): 81-92.
16. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) 4th ed. p.p.181-183. Washington, DC: American Psychiatric Association. 1994.
17. Díaz A., Díaz R., Hernández C., Narro J., Fernández H., Solís C. Prevalencia del consumo riesgoso y dañino de alcohol y factores de riesgo en estudiantes universitarios de primer ingreso. *Salud Ment.* 2008; 31(4): 271-282.
18. ENA 2008, DF.
19. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, et al. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut.* 2000; 46(4): 540-5.
20. Guardia J, Segura L, Gonzalvo B, Trujols J, Tejero A, Suárez A, Martí A. Estudio de validación de la Escala Multidimensional de Craving de Alcohol. *Med Clin (Barc).* 2004; 123(6): 211-6.

21. Harwood HJ. Updating estimates of the economic costs of alcohol abuse in the United States: estimates, updated methods, and data. Bethesda, Md., U.S. Department of Health and Human Services; National Institute on Alcohol Abuse and alcoholism, 2000.
22. Haseba T, Ohno Y. A new view of alcohol metabolism and alcoholism--role of the high-Km Class III alcohol dehydrogenase (ADH3). *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(3): 1076-92.
23. Hingston RW, Hereen T, Zakocs RC, Kopstein A, Wechsler H. Magnitude of alcohol-related mortality and morbidity among US college students ages 18-24. *J Stud Alcohol*. 2002; 63: 136-144.
24. Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG. Monitoring the future national survey results on drug use, 1975-2002, volume II: College students and adults ages 19-40. Bethesda: National Institute on Drug Abuse. 2003.
25. Köhnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75(1): 160-77.
26. Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Feng J, Lee T, *et al*. The *ADH3*2* y *CYP2E1 c2* alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Exp Mol Pathol*. 2003; 74: 183-89.
27. Koss K, Satsangi J, Fanning G, Welsh KI, Jewell D. Cytokine (TNF- α , LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun*. 2000; 1: 185-90.
28. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997; 34(5): 391-9.

29. Lau AH, Szabo G, Thomson AW. Antigen-presenting cells under the influence of alcohol. *Trends Immunol.* 2009; 30(1): 13-22.
30. Li Z, Habuchi T, Tsuchiya N, et al. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 237-40.
31. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes P. Haplotype associated with low interleukin 10 production in patients with severe asthma. *Lancet.* 1998; 352: 113.
32. Mandrekar P, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Szabo G. Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. *J Immunol.* 2004; 173(5): 3398-407.
33. Mandrekar P, Catalano D, Girouard L, Szabo G. Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. *Cytokine.* 1996; 8(7): 567-77.
34. Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30(1): 135-9.
35. Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ. Interleukin-10 gene polymorphism is associated with alcoholism but not with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2008; 43(5): 523-8.
36. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver.* 2000; 20(1): 3-7.
37. Medina- Mora M, Villalatoro J, Cravioto P, Fleiz C, Galván F. Uso y abuso de alcohol en México: Resultados de la Encuesta Nacional Contra las Adicciones. En: Consejo Nacional Contra las Adicciones. Observatorio mexicano en tabaco, alcohol y otras drogas. México: Consejo Nacional Contra las Adicciones. 2003: 49-61.

38. Medina- Mora ME. Mexicans and alcohol: patterns, problems and policies. *Addiction*. 2007; 102: 1041-45.
39. Medina-Mora M, Borges-Guimaraes G, Lara C, Ramos-Lira L, Zambrano J, Fleiz-Bautista C. Prevalencia de sucesos violentos y de trastorno por estrés postraumático en la población mexicana. *Salud Pública de México*. 2005; 47 (1): 8-22.
40. Medina-Mora ME, Villalatoro J, Caraveo J, Colmenares. Patterns of alcohol consumption and related problems in Mexico: Results of two general population surveys. En: Demers A, Room R, Bourgault (eds). *Surveys of drinking patterns and problems in seven developing countries*. Geneva: World Health Organization. 2001; 13-31.
41. Méndez N, Uribe M. (2009). Capítulo: Evaluación y diagnóstico del paciente con problemas de alcohol. *Pruebas de laboratorio e imagen en gastroenterología y hepatología 1ª ed, (257-258)*. México.
42. Mendez-Sanchez N, Aguilar-Ramirez J, Reyes A, Dehesa M, Juarez A, Castaneda B, Sanchez-Avila F, Poo J, Guevara L, Lizardi J, Valdovinos M, Uribe M, Contreras A, Tirado P, Aguirre J, Rivera-Benitez C, Santiago-Santiago R, Bosques-Padilla F, Munoz L, Guerrero A, Ramos M, Rodríguez-Herandez H, Jacobo-Karam J. Etiology of liver cirrosis in Mexico. *Ann Hepatol*. 2004; 3(1): 30-33.
43. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res*. 1988; 16: 1215.
44. Mora-Ríos J, Natera G, Juarez F. Expectativas relacionadas con el alcohol en la predicción del abuso en el consumo en jóvenes. *Salud Mental*. 2005; 28: 82-90.

45. Moreno O, González I, Saaibi D, Otero W, Badillo R, Martín J, Ramírez G. Polimorfismos de la región promotora del gen de la IL-10 y artritis reumatoide en una población colombiana. *Biomédica*. 2007; 27: 56-65.
46. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Task force on college drinking: High-risk drinking in college: What we know and what we need to learn. Bethesda 2002.
47. Nixon K, McClain JA. Adolescence as a critical window for developing an alcohol use disorder: current findings in neuroscience. *Curr Opin Psychiatry*. 2010; 23: 227-232.
48. Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet*. 2003; 42(1): 1-31.
49. Norkina O, Dolganiuc A, Shapiro T, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinases to promote IL-10 production in human monocytes. *Leukoc Biol*. 2007; 82(3): 752-62.
50. Oliver J, Agúndez JA, Morales S, et al. Polymorphisms in the transforming growth factor-beta gene (TGF-beta) and the risk of advanced alcoholic liver disease. *Liver Int*. 2005; 25(5): 935-9.
51. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, González-Sarmiento R. -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29(11): 1928-31.

52. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000; 31(4): 828-33.
53. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007. 55(5): 453-62.
54. Quiroga A, Mata M, Zepeda V, Cabrera A, Herrera R. Consumo de alcohol, tabaco y otras drogas en estudiantes universitarios. En: Consejo Nacional Contra las Adicciones. Observatorio mexicano en tabaco, alcohol y otras drogas. México: Consejo Nacional Contra las Adicciones. 2003; 85-89.
55. Sáiz P, Portilla G, Paredes M, Bascarán M, Bobes J. Instrumentos de evaluación en alcoholismo. *Adicciones*. 2002; 14(1): 387-403.
56. Savolainen VT, Pajarinen J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ. Polymorphism in the cytochrome *P4502E1* gene and the risk of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 1997. 26: 55- 63.
57. Schneider A, Barmada MM, Slivka A, Martin JA, Whitcomb DC^a. Transforming growth factor-beta1, interleukin-10 and interferon-gamma cytokine polymorphisms in patients with hereditary, familial and sporadic chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2004; 4(6): 490-4.
58. Schneider A, Barmada MM, Slivka A, Martin JA, Whitcomb DC^b. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta 1, interleukin-10, and interferon-gamma polymorphisms in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Alcohol*. 2004; 32(1): 19-24.

59. Si-Tayeb K, Lemaigre, Duncan S. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010; 18 (2): 175-89.
60. Slutske WS, Hunt-Carter EE, Nabors-Oberg RE. Do college students drink more than their non-college-attending peers? Evidence from a population-based longitudinal female twin study. *J Abnorm Psycho*. 2004; 113: 530-540.
61. Spanagel R Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev*. 2009; 89:649-705.
62. SSA-INEGI Encuesta Nacional de Adicciones 2003, México 2003.
63. Stephen D, Galtan J. *Physiology of the liver*. vol. 3, 5^a ed. Philadelphia, Penn. USA. 1995. 540-560.
64. Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*. 2003; 75: 711-7.
65. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Alcohol use and risks among young adults by college enrollment status. Rockville: Office of Applied studies; 2003.
66. Szabo G, Catalano D, White B, Mandrekar P. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004; 28(5): 824-8.
67. Szabo G, Mandrekar P, Girouard L, Catalano D. Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 20(5): 900-7.

68. Torgerson D, Miles J. Simple simple size calculation. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*. 2007; 13: 952-953.
69. Tsukamoto H. Conceptual importance of identifying alcoholic liver disease as a lifestyle disease. *J Gastroenterol*. 2007; 42: 603-609.
70. Turner D, Williams D, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott P, Hutchinson IV. An investigation of polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24: 1-8.
71. US Department of Health and Human Services. *Healthy people 2010*. Washington 2010; 26-29.
72. Vázquez G, Briones M, Sosa M, Caligaris C, González L, Macas M. Regulación diferencial de la expresión de los correpresores Ski y SnoN en células hepáticas. Departamento de Biologa Celular, Instituto de Fisiologa Celular, UNAM, México. 2007.
73. Verjans GM, Brinkman BM, Van Doornik CE, Kijlstra A, Verweij CL. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol*. 1994; 97:45-7.
74. Verma BK, Fogarasi M, Szabo G. Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. *J Clin Immunol*. 1993; 13(1): 8-22.
75. Waszkiewicz N, Popawska R, Konarzewska B, Szajda SD, Galinska B, Rutkowski P, Lesniak R, Szulc A. Biomarkers of alcohol abuse. Part II. New biomarkers and their interpretation. *Psychiatr Pol*. 2010; 44(1): 137-46.

76. Zintzaras E, Stefanidis I, Santos M, Vidal F. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? *Hepatology*. 2006; 43: 352-361.
77. Zucker RA. The four alcoholisms: A developmental account of the etiologic process. En: Rivers PC (ed). *Alcohol and addictive behavior*. Lincoln: University of Nebraska Press; 1987; 27-83.