

R-11436

RT 929

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Departamento de Fisiología y Biología Animal



**ESTUDIO DE LA ABSORCION
INTESTINAL DE ZINC Y ACIDO FOLICO
EN RATAS LACTANTES. EFECTOS DEL
ETANOL.**

Eva Tavares Vázquez

Sevilla, 1996

LOS 775893

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al número 231 número 47 del libro
correspondiente.
Sevilla, 31.01.96

El Jefe del Negociado de Tesis,

Rufo Lafuente



Dña. Olimpia Carreras Sánchez y Dña. María Luisa Murillo Taravillo del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado Estudio de la absorción intestinal de zinc y ácido fólico en ratas lactantes. Efectos del etanol, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla por Dña. Eva Tavares Vázquez para optar al grado de *Doctor en Farmacia*. Hallándose concluido y reuniendo a su juicio las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste expiden y firman la presente certificación en Sevilla a 30 de Enero de 1.996

[Signature]

Fdo: M^a Luisa Murillo Taravillo

Olimpia Carreras

Fdo: Olimpia Carreras Sanchez

En esta página quiero manifestar mi agradecimiento a todas las personas que han permitido la realización de este trabajo.

A *Olimpia Carreras*, directora de esta Tesis, por su dedicación a mí durante estos años, por su paciencia y por su apoyo y comprensión.

A *M^a Luisa Murillo*, directora de esta Tesis, por su amistad, por sus oportunos consejos y entrega personal.

A mi compañera de fatigas *Ana Gómez*, por su apoyo y ayuda a lo largo de nuestro arduo y penoso camino a la conquista de este Título.

A *Octavio Fernández*, por su compañía y amistad.

A *Antonio Ayala* y *José Antonio Rodríguez*, por su envidiable heroicidad en el sacrificio de los animales.

A *Luis Bravo* por su amistad, amabilidad y simpatía.

A *Antonio Luis Vázquez Murillo*, por la minuciosidad con que ha revisado este trabajo y por sus consejos.

A *Claudia Herce* y *Ana Cameán*, por su amable colaboración en las determinaciones de zinc.

A *Todos los Miembros de este Departamento*, mi sincero reconocimiento.

A *Miguel Angel Muñoz Alfonso*, por sus orientaciones y ayudas con el ordenador, así como, por el exquisito gusto con que ha diseñado este trabajo.

A *Toda mi Familia*, a *Gonzalo*, *Amparo*, *Beatriz*, *Moisés* y *Miguel Angel* y a *Todos mis Amigos*, pues sobre sus hombros he llorado incontables veces mis penas y he vivido todas mis alegrías.

A las *454 sacrificadas ratitas* sin cuya desinteresada colaboración hubiera sido imposible la realización de esta Tesis Doctoral.

Gracias a todos.

Parte de los resultados de la presente Memoria han sido presentados en los siguientes congresos:

1st. Meeting of Mediterranean Physiologists. XXVI Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. Palma de Mallorca, 4-8 de Abril de 1994.

XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Clínica. Salamanca, 13-15 de Octubre 1994.

3^{er} Congreso Iberoamericano de Toxicología. XI Jornadas Toxicológicas Españolas. Tenerife. 25-28 de Septiembre 1995.

Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences in conjunction with the Physiological Society. Salamanca. 2-5 de Octubre 1995.

VI International Congress on Automation and New Technology in Clinical Laboratory. XI International Conference on Computing in Clinical Laboratories. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Sitges, Barcelona 2-4 de Noviembre 1995.

A Gonzalo, Amparo, Beatriz y Moisés.

A Miguel Ángel.

índice

I. INTRODUCCION BIBLIOGRAFICA	1
1.- El Alcohol y el Feto	1
2.- Estado Nutricional y Alcohol	5
2.1.- Malnutrición Fetal Asociada al Consumo Materno de Alcohol	5
2.2.- Efectos del Consumo Materno de Etanol en el Período de Lactancia	6
3.- Metabolismo del Etanol	9
3.1.- Sistema de Alcoholdehidrogenasa (ADH)	10
3.2.- Sistema Microsomal Oxidativo del Etanol (SMOE)	15
3.3.- Sistema Catalasa	16
3.4.- Metabolismo no Oxidativo del Etanol	17
4.- Alcohol y Tracto Gastrointestinal	18
4.1.- Cambios Estructurales	20
4.2.- Alteraciones Funcionales	21
4.2.1.- Permeabilidad	21
4.2.2.- Motilidad	22
4.2.3.- Efectos sobre los Enzimas de la Mucosa	23
4.2.4.- Secreción de Electrolitos	26
4.2.5.- Flora Bacteriana	26
4.2.6.- Efectos sobre la Absorción	27
5.- Zinc	30
5.1.- Bioquímica y Funciones Metabólicas	30
5.2.- Requerimientos	32
5.3.- Fisiología del Zinc	33

5.4.- Absorción Intestinal	34
5.4.1.- Mecanismos de Absorción de Zinc	35
5.4.2.- Ligandos de Unión	37
5.4.3.- Proteína Intestinal Rica en Cisteína: CRIP	40
5.4.4.- Metalotioneína	41
5.4.5.- Regulación Homeostática del Balance de Zinc	41
5.5.- Excreción	44
5.6.- Deficiencias de Zinc	45
5.6.1.- Efectos del Etanol sobre los Niveles de Zinc	46
5.6.2.- Efectos del Etanol sobre los Niveles de Zinc y su Repercusión en la Gestación	49
5.7.- Metaloenzima Dependiente de Zinc: Alcoholdehidrogenasa	54
6.- Acido Fólico	58
6.1.- Bioquímica y Funciones Metabólicas	58
6.2.- Requerimientos	61
6.3.- Absorción Intestinal	61
6.3.1.- Mecanismos de Transporte	62
6.3.2.- Factores que Alteran los Niveles de Folatos	70
6.4.- Deficiencias de Folatos	73
6.4.1.- Folatos y Embarazo	73
6.4.1.1.- Metabolismo de los Folatos Durante el Embarazo	74
6.4.1.2.- Causas del Déficit de Folatos	75
6.4.2.- Acido Fólico y Alcohol	80
6.4.2.1.- Efectos del Alcohol sobre el Metabolismo del Folato	80
6.4.2.2.- Efectos del Etanol sobre los Niveles de Folatos y su Repercusión en la Gestación	85

II.- OBJETO	89
III.- MATERIALES Y METODOS	93
1.- Diseño Experimental	93
2.- Animales de Experimentación	93
3.- Dietas Utilizadas	94
4.- Técnicas Analíticas	97
4.1.- Técnica de Absorción “in vivo”	97
4.2.- Descripción del Dispositivo Experimental	97
4.3.- Realización de los Experimentos	98
4.4.- Determinación de Acido Fólico “in vivo”	99
4.5.- Determinación de Zinc “in vivo”	102
4.6.- Estudios en Leche Materna	103
4.6.1.- Determinación de Acido Fólico	104
4.6.2.- Determinación de Zinc	104
4.7.- Estudios en Suero	105
4.7.1.- Determinación de Acido Fólico	105
4.7.2.- Determinación de Zinc	105
4.8.- Determinación de la Actividad Alcoholdehidrogenasa	106
4.9.- Determinación de Proteínas Totales	106
4.10.- Determinación de Parámetros Bioquímicos	108
5.- Tratamiento Estadístico	109
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	111
1.- Parámetros Macroscópicos	111
1.1.- Parámetros Macromorfológicos a los 21 Días Postparto	111
1.2.- Parámetros Intestinales	116
2.- Estudio Nutricional en las Madres Durante la Lactancia	119

2.1.- Dieta Sólida	119
2.2.- Dieta Líquida	121
2.3.- Estudio de la Ingesta Calórica	122
3.- Pesos Corporales de la Crías y de las Madres Durante el Período de Lactancia	126
4. Estudios Séricos en Madres y Crías	134
4.1.- Niveles de Zinc	134
4.2.- Niveles de Acido Fólico	136
5.- Estudio Nutricional en las Crías	139
5.1.- Niveles de Zinc en Leche Materna	139
5.2.- Niveles de Acido Fólico en Leche Materna	141
6.- Enzimas Hepáticas y Bioquímica Sérica	143
6.1.- Valoración de la Actividad Alcoholdehidrogenasa Hepática en Crías Lactantes	143
6.2.- Parámetros Bioquímicos Séricos	147
7.- Estudio de Absorción Intestinal "in vivo"	149
7.1.- Niveles de pH Intestinal tras la Perfusión	149
7.2.- Absorción de Zinc en Yeyuno	151
7.3.- Absorción de Zinc en Ileon	156
7.4.- Absorción de Acido Fólico en Yeyuno	161
7.5.- Absorción de Acido Fólico en Ileon	167
V.- CONCLUSIONES	171
VI.- BIBLIOGRAFÍA	175

No ignoro que el recurso de beber para huir es un viejo truco pero ¿conoces tú alguno más eficaz para escapar de ti mismo?. Una copa acartona el recuerdo, pero, al propio tiempo, convierte la onerosa gravedad de tu cuerpo en una suerte de porosidad flotante. Algo parecido a la fiebre. Pasado el trance, sobreviene el decaimiento, pero hay un medio para evitarlo: mantener en sangre una dosis de alcohol que te imbuya la impresión de que participas en la vida, de que te pudres sin advertir que existes. Esta forma de energía suele identificarse con la alegría, aunque, por supuesto, no es la alegría. A lo sumo, una energía inferiorimproductiva en caso contrario, yo trabajaría.

MIGUEL DELIBES.

I.- INTRODUCCION BIBLIOGRAFICA.

1.- EL ALCOHOL Y EL FETO.

El alcohol es la droga de mayor consumo en los países industrializados. España es el cuarto país en consumo de alcohol por habitante del mundo. En la última década ha disminuido el consumo de alcohol en grandes dosis durante el embarazo; sin embargo, el llamado consumo social ha aumentado, como reflejo del incremento experimentado en la población general (Serdula y cols., 1991). Se estima que el 60% de las embarazadas son abstemias, un 1% consume más de 40 g de alcohol absoluto al día, un 2% consume diariamente esta dosis, un 17% bebe moderadamente (entre 20 y 40 g/día) y un 20% consume ocasionalmente dosis pequeñas (menos de 20 g) (Carreras 1988).

La primera preocupación sobre el consumo de alcohol durante el embarazo es el efecto potencial adverso que pueda producir en el desarrollo fetal. Se debe tener en cuenta que el consumo de alcohol durante el embarazo es la causa no genética más frecuente de retraso mental (Schorling 1993). El consumo de alcohol es un problema complejo, en el que intervienen factores biológicos, psicológicos y socioculturales; y su tratamiento debe reconocer la potencial contribución de cada uno de estos factores. Los programas de tratamiento de gestantes con abuso de tóxicos han conseguido una reducción de la morbilidad perinatal. Se ha documentado que una disminución en el consumo de alcohol, incluso en la semana 24 a 26 de gestación, se asocia a una mejoría de los resultados perinatales (Kaye y Chasnoff 1993).

Jones y Smith describieron en 1973 el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF), consistente en la presencia de retraso del crecimiento pre o postnatal, disfunción del sistema nervioso central y dismorfia facial característica. El SAF puede pasar sin ser reconocido hasta que el retraso del crecimiento y desarrollo postnatal son más aparente a la edad de 1 a 2 años. Se cree que se debe a

un crecimiento celular disarmónico más pronunciado en unos tejidos que en otros y representa el extremo final de un espectro de problemas referidos al efecto del alcohol durante el embarazo (Jacobson y cols., 1993).

Con el consumo de más de 4 bebidas alcohólicas al día el riesgo de SAF se sitúa entre un 40 y un 50 %. El SAF se asocia a malformaciones en el 10-30 % de los casos, principalmente cardíacas y renales. Se estima que entre los recién nacidos de mujeres alcohólicas un tercio desarrollará el SAF, un tercio padecerá estigmas derivados de la exposición a tóxicos (efectos fetales del alcohol) (Caruso y Ten-Bensel 1993) y un tercio serán normales.

Es razonable suponer que sustancias que atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica (como el alcohol, los opiáceos, la cocaína, los sedantes y los hipnóticos) atraviesen la barrera placentaria ejerciendo su efecto sobre el feto. El bajo peso molecular y la liposolubilidad de estas sustancias facilitan el paso trasplacentario. El paso del alcohol a través de la placenta se produce por simple difusión y a pesar de la rápida distribución del alcohol en el feto, las concentraciones del mismo suelen ser menores que en la circulación materna. La eliminación fetal de sustancias tóxicas se realiza principalmente mediante biotransformación hepática y excreción renal, aunque se debe tener en cuenta la inmadurez de estas funciones en el feto (McGregor y Chasnoff 1993).

Los efectos embriotóxicos o teratógenos del alcohol se pueden traducir en muerte, cambios dismórficos y/o cambios del comportamiento (Brien y Smith 1991). El alcohol es la principal causa identificable de teratogénesis por tóxicos (Wheeler 1993). Como el resto de teratógenos cumple los siguientes principios:

a) Momento de actuación, la actuación durante la organogénesis se traduce en malformaciones anatómicas; durante el período de crecimiento celular produce retraso en el crecimiento y/o falta de diferenciación de algún órgano.

b) Efecto-dosis respuesta, referido a la posibilidad de establecer una relación entre la magnitud del daño y la dosis del tóxico.

c) Umbral de efecto, referido a la dosis de exposición a partir de la cual se produce el daño.

d) Variabilidad genética, que determina diferencias en la absorción materna y fetal, el metabolismo y el transporte placentario (McGregor y Chasnoff 1993).

No se conoce con exactitud el mecanismo teratógeno del alcohol (Pietrantonio y Knuppel 1991). Se especula que el acetaldehído, principal metabolito, es el causante del daño fetal (Niemela y cols., 1991). Altas concentraciones de acetaldehído y ácido láctico han sido descritos en fetos expuestos al alcohol. El alcohol y/o sus metabolitos pueden producir un efecto tóxico celular directo o bien interferir en la síntesis proteica, resultando un retraso en el crecimiento celular. Otros factores que pueden contribuir a los efectos adversos del alcohol son (Verp y Lin 1993) :

- La interferencia en el metabolismo hidrocarbonado
- Las deficiencias nutricionales
- Los contaminantes incluidos en las bebidas alcohólicas
- La predisposición genética .

La gestante con abuso de alcohol y otras sustancias tóxicas requiere una mayor atención perinatal, ya que presenta frecuentes complicaciones medicas: como enfermedades infecciosas

graves, malnutrición (en particular carencia de ácido fólico y tiamina), mielosupresión, tensiones psicosociales (Lee 1989) y obstétricas como aborto espontáneo, parto pretérmino, desprendimiento de placenta, anomalías congénitas y retraso del crecimiento intrauterino (Wynn 1992). La meta debe ser el nacimiento de un recién nacido sano, a término, con el peso adecuado para la edad gestacional y libre de los efectos del alcohol.

La mayoría de los problemas de recién nacidos, de gestantes con abuso de alcohol, deriva del crecimiento intrauterino retardado y/o de la prematuridad. Las complicaciones neonatales más frecuentes incluyen: síndrome de distrés respiratorio, hipoglucemia, hiperbilirrubinemia y hemorragia intraventricular (McGregor y Chasnoff 1993). Los recién nacidos de madres con abuso de consumo de alcohol durante el embarazo pueden presentar un Síndrome de Abstinencia Neonatal (SAN) en las primeras 72 horas de vida. La presentación clínica es variable, incluyendo signos neurológicos centrales, signos de disfunción autonómica, disfunción gastrointestinal y anomalías respiratorias. Por lo general, la gravedad del SAN está en relación con la cantidad y cronicidad del consumo de alcohol (Coles 1993).

2.- ESTADO NUTRICIONAL Y ALCOHOL.

Actualmente se desconoce con detalle el mecanismo por el cual el etanol causa efectos teratógenos; pero sí está claro que en los alcohólicos crónicos existe una deficiencia nutricional (Lin y Maddatu 1980; Morgan 1982; Zidenberg-Cherr y cols., 1988). Por esta razón, se establece como hipótesis que la función teratógena del etanol, puede ser debida, en parte, a la deficiencia nutricional materna inducida por el etanol, afectando al proceso de nutrición del embrión/feto (Hurley 1979; Kumar 1982).

El consumo de alcohol aumenta el contenido calórico, por lo que se puede ver disminuida la ingesta total de alimento en las mujeres embarazadas, dando como resultado una reducción de los nutrientes esenciales, que podría contribuir a la teratogenicidad del etanol. Otra posibilidad, es que el etanol o sus metabolitos, pueden interferir en el metabolismo de nutrientes específicos, afectando tanto su absorción como su distribución por los tejidos y posterior eliminación (Lin y Maddatu 1980; Morgan 1982; Zidenberg-Cherr y cols., 1988). Dentro de estos nutrientes estarían el ácido fólico y el zinc, objeto de nuestro estudio.

2.1.- Malnutrición fetal asociada al consumo materno de etanol.

La ingesta materna de etanol puede causar lesiones fetales, a nivel de crecimiento corporal y cerebral, al menos por dos mecanismos:

- a) Mecanismo indirecto; por producir lesión en la placenta y malnutrición fetal selectiva.
- b) Mecanismo directo; por la fetotoxicidad del etanol y/o sus metabolitos.

El estado nutricional de los alcohólicos es frecuentemente pobre y en un estado nutricional materno descuidado, el alcohol y/o acetaldehído pueden ser placentotóxico, empeorando la transferencia de nutrientes esenciales hacia el feto como aminoácidos, zinc, glucosa y ácido fólico.

2.2.- Efectos del consumo materno de etanol en el período de lactancia.

Es en el período de reproducción y concretamente durante la lactancia, cuando las mamas alcanzan mayor desarrollo. La supervivencia y el óptimo crecimiento de los mamíferos neonatos, dependen de una producción adecuada de leche.

Numerosas investigaciones (Grosvenor y Whitworth 1974; Subramanian y Reece 1975; Howie y cols., 1980; Battin y cols., 1985), mostraron que la acción de mamar afecta a la secreción de prolactina en suero. Durante la lactancia se mantiene la liberación de prolactina inducida por la acción de mamar, siendo esencial para una producción de leche adecuada (Short 1984; Neill 1988; Yen 1991).

Estudios realizados en animales en los que se les administra etanol durante la preñez y lactancia, demostraron que se afecta adversamente los aparatos secretores (Steven y cols., 1989; Vilaro y cols., 1989) y el transporte de aminoácidos en las células epiteliales mamarias (Vinas y cols., 1987). Además, el consumo de alcohol por parte de la madre reduce la ingesta de leche de las crías (Mennella y Beauchamp 1991; 1993).

La ingesta de etanol por la madre durante la preñez, disminuye la habilidad de mamar por parte de las crías, en las que la capacidad de succión es pobre y se encuentran cansadas y

descuidadas durante la lactancia (Ouellette y cols., 1977; Martin y cols., 1979; Van Dyke y cols., 1982).

Las crías expuestas a la acción del etanol, pasan más tiempo pegadas al pezón de la madre (Chen y cols., 1982) y son incapaces de ejercer una adecuada presión al mamar, presentando una reducción en el número de ritmos de succión por minutos mientras están mamando (Rockwood y Riley 1985).

El efecto inhibitorio sobre la producción de leche después de la administración aguda de etanol fue evidente después de un período de 60 minutos en el que las crías se encontraban mamando (Subramanian y Abel 1988), y desapareció a las 3 horas (Subramanian y cols., 1990).

El alcohol es un factor de inhibición en la vía de liberación de oxitocina, disminuyendo la secreción de leche por las glándulas mamarias (Wagner y Fuchs 1968; Cobo y Quintero 1969; Gibbens y Chad 1976).

En las mujeres lactantes, que consumen alcohol, la concentración de alcohol en leche es similar a la alcanzada en sangre; y la cantidad de alcohol que reciben las crías al mamar puede causar algunos efectos adversos (Kesaniemi 1974; Lawton 1985). Little y cols. (1989), observaron que las crías expuestas regularmente al etanol por la leche, tienen alteraciones en el desarrollo motor.

La ingesta de etanol en la dieta líquida al destete (Singletary y McNary 1992) y durante la preñez (Steven y cols., 1989) o la administración de etanol en el agua de bebida durante la lactancia (Jones y Stewart 1984), no afecta al peso corporal de las madres. Sin embargo, la administración de etanol de forma crónica (Subramanian 1995) disminuye el peso de las crías por reducir el consumo de la leche.

En 1990 Subramanian y cols., mostraron que en las ratas que no amamantaban el alcohol administrado de forma aguda no alteraba los niveles basales de prolactina. Sin embargo, al mamar se inhibe la liberación de prolactina cuando se ha administrado previamente etanol de forma aguda (Subramanian y Abel 1988; Subramanian y cols., 1990; 1991a).

Recientemente Subramanian (1995) en ratas, observó el efecto de la administración crónica de etanol sobre la lactancia. En este estudio se administra etanol durante 8 días, desde el día 5-12 de lactancia; los niveles de alcohol en sangre se mantienen 4 horas al día y los resultados obtenidos mostraron, que la administración crónica de etanol disminuye el consumo de leche y el crecimiento de las crías y afecta a la liberación de prolactina inducida por la acción de mamar.

3.- METABOLISMO DEL ETANOL.

El etanol es una sustancia hidrosoluble y liposoluble, y por ello difunde rápidamente por las membranas celulares. Un 20% del etanol ingerido es absorbido a nivel gástrico, mientras que el 80% restante lo hace con rapidez a lo largo del intestino proximal. Otras formas de absorción, aunque menos frecuentes, son el pulmón y la piel (niños friccionados con alcohol como antitérmico).

El etanol absorbido se distribuye rápidamente por el organismo (Fig. 1), dependiendo de la velocidad de difusión y del contenido en agua de los diferentes órganos y tejidos, por esta razón existe una mayor concentración en sangre y cerebro y menor en tejido adiposo y músculo (Abbot 1994).

Una vez absorbido es conducido por la vena porta hasta el hígado, donde se metaboliza más del 80% del etanol ingerido y sólo entre un 2-20% se elimina sin biotransformar por excreción urinaria, respiración y sudor.

El etanol metabolizado por el hombre es normalmente de origen exógeno pero también puede ser endógeno. Se ha demostrado que los microorganismos coliformes aislados en el intestino de pacientes con esprue tropical producen etanol (Baraona y cols., 1986), al igual que las levaduras que crecen en la boca, pudiendo producir incluso falsos positivos al detectar alcohol en el aire espirado.

La eliminación orgánica del etanol depende del índice metabólico del hígado. El hepatocito contiene 3 vías principales para metabolizar el etanol, localizadas en diferentes compartimentos subcelulares :

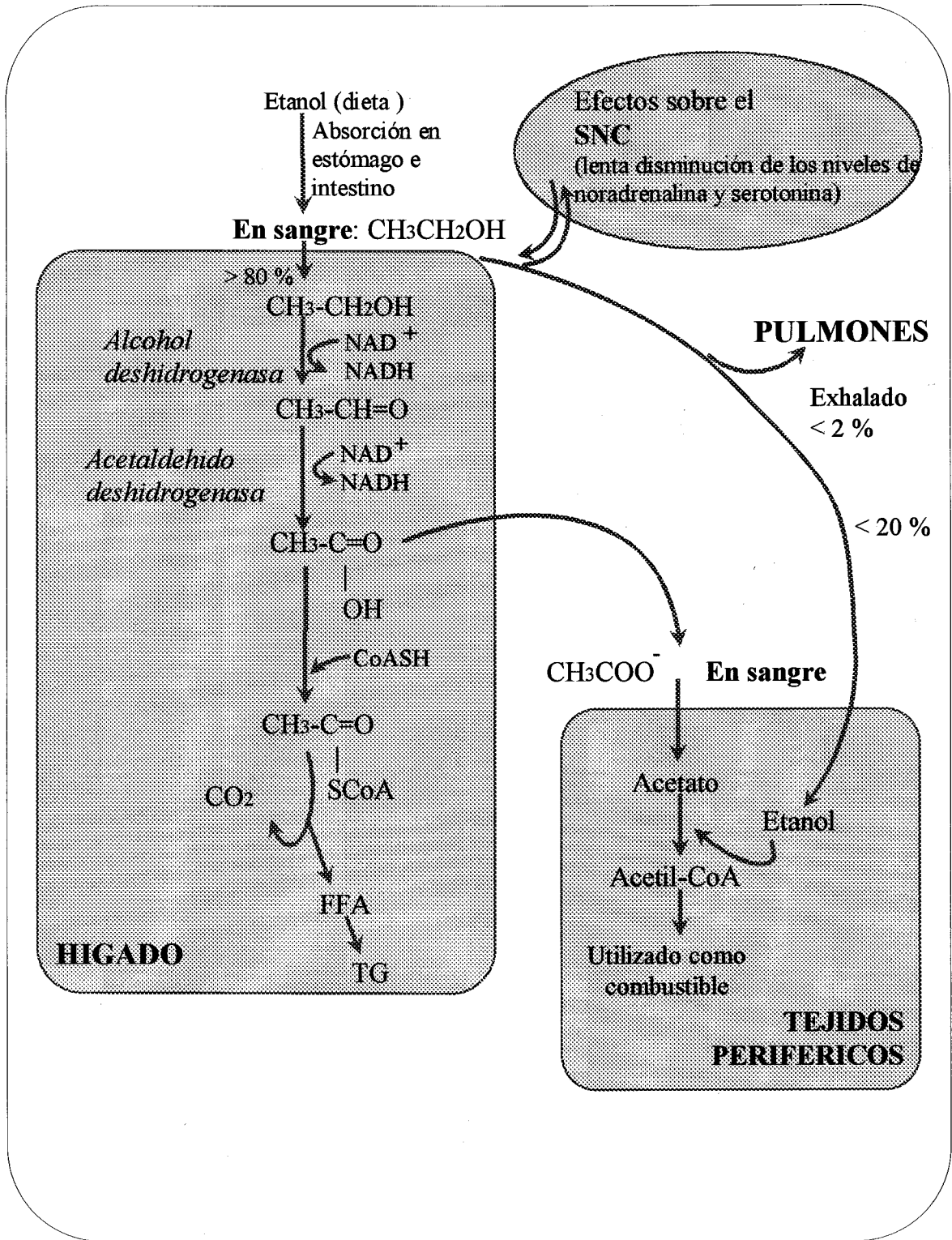
- Sistema de la Alcoholdehidrogenasa (ADH) del Citosol.
- Sistema Microsomal Oxidativo del Etanol (SMOE) en el Retículo Endoplásmico.
- Sistema Catalasa de los Peroxisomas.

3.1.- Sistema de la Alcoholdehidrogenasa (ADH) del citosol.

Es la principal vía de degradación del etanol. Esta enzima tiene como sustrato no sólo al etanol sino que actúa en la deshidrogenación de los esteroides, oxidación de los glicoles, en el metabolismo de la norepinefrina y en la oxidación omega de los ácidos grasos (Krebs y Perkins 1970).

Se ha podido demostrar que la ADH humana presenta un amplio polimorfismo. Los estudios llevados a cabo durante los últimos 15 años sobre la estructura molecular de la ADH hepática humana han revelado la existencia de una gran variedad de isoenzimas que no se presentan en los animales inferiores. La ADH humana es una metaloenzima dimerica que posee Zn en su molécula. Las isoenzimas de la ADH humana se han agrupado en tres clases (I, II, III) de acuerdo con sus propiedades funcionales y fisicoquímicas (Vallee y Bazzone 1983), formadas por la combinación de 8 subunidades distintas: $\alpha, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \gamma_1, \gamma_2, \pi$ y χ que son codificadas por 5 locus, desde ADH1 hasta ADH5 (Bosron y Li 1987), siendo los locus ADH2 y ADH3, que codifican las subunidades β y γ , los responsables del polimorfismo.

Fig. 1.- METABOLISMO DEL ETANOL.



Las isoenzimas de la clase I derivan de al menos 3 locus y están formadas por 3 subunidades: subunidad α (la forma mayoritaria en el hígado fetal), diferentes subunidades β (β_1 común en la población caucasiana, β_2 común en la población oriental y β -Indianapolis encontrada en algunas poblaciones de Africa), y dos alelos de la subunidad γ (γ_1 y γ_2). En 1965, Von Wartburg y cols. diferenciaron la ADH típica (pH óptimo 10.5), de la llamada ADH atípica (pH óptimo 8.8) que presenta una actividad mucho mayor. La principal ADH humana hepática contiene la subunidad β_1 , mientras que la forma atípica contiene la subunidad β_2 ; ambas codificadas por el locus ADH2. Se ha observado que la ADH atípica se presenta en la población de Mongolia con una frecuencia superior al 90% mientras que en Europa la frecuencia oscila entre un 5 y un 20% de la población.

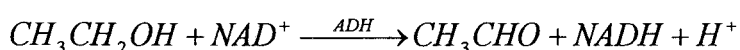
En 1986, Duester y cols. estudiaron la estructura de las subunidades de las isoenzimas de la ADH de las clases II y III. Las isoenzimas de la clase II (o π) tienen una K_m mayor que las de la clase I; mientras que las de la clase III (o χ) no intervienen en la oxidación hepática del etanol debido a su baja afinidad por el sustrato.

En la rata, se han separado 3 isoenzimas de la ADH que se diferencian por sus características cinéticas y en su distribución tisular; pero presentan cierta analogía con las isoenzimas humanas (Juliá y cols., 1987). La isoenzima ADH-1 (clase II humana) posee una $K_m=5M$ y se encuentra principalmente en los órganos externos como mucosa auditiva, nasal y bucal, cornea, esófago, estómago, recto, pene y vagina. La isoenzima ADH-2 (clase III humana) está presente en todos los órganos pero es poco activa en el metabolismo del etanol, quizás desempeñe su actividad en el metabolismo endógeno de los alcoholes de larga cadena y en el de los aldehidos. La isoenzima ADH-3 (clase I humana) con una $K_m=1.4$ mM es la isoenzima principal del hígado, aunque también está presente en el pulmón, intestino, riñón y órganos sexuales (testículos, epididimo y útero). Por tanto, se piensa que las isoenzimas ADH-1 y ADH-3 gracias a su localización, pueden actuar como barrera metabólica del alcohol externo o actuar como mecanismo protector contra derivados tóxicos

producidos por la peroxidación lipídica (Esterbauer y cols., 1985). Recientemente se ha detectado por técnicas bioquímicas e histológicas la presencia de ADH en tejido adiposo pardo (BAT) de ratas, aunque no se ha podido medir su actividad en el tejido adiposo blanco (Kortelainen y cols., 1991).

Aunque la mayor parte del metabolismo del etanol se lleva a cabo en el hígado, también se ha observado un metabolismo extrahepático. Así cuando el etanol se administra a dosis bajas, se ha observado un efecto de primer paso a nivel gástrico debido a la existencia de una ADH gástrica. Este metabolismo afecta a un 20% del etanol administrado y actúa como una barrera de protección modulando su paso a la vía sistémica. Esta barrera disminuye cuando el etanol se consume a grandes dosis o tras la ingesta de comida debido, en parte, a una disminución de la actividad de la ADH gástrica (Lieber 1988a).

En la oxidación del etanol mediada por ADH, el hidrógeno es transferido del sustrato al cofactor nicotín-adenín dinucleótido (NAD), que se transforma a su forma reducida (NADH) con producción de acetaldehído.



Los dos productos principales de esta reacción, acetaldehído y NADH, parecen ser los responsables de la mayoría de las lesiones que el alcohol produce a nivel celular, bien por la acción tóxica directa del acetaldehído, particularmente sobre la mitocondria, o bien, por el desequilibrio del estado redox que se origina al aumentar el cociente $NADH/NAD^+$ al cual se responsabiliza, al menos en parte, de la hiperlactacidemia, hiperuricemia, acidosis, así como de ciertos trastornos en el metabolismo de los principios inmediatos (Peters 1982).

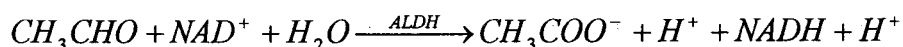
El NADH puede ser transferido a la mitocondria y transformarse en donador de electrones a la cadena respiratoria, disminuyendo las necesidades de NADH del ciclo del ácido cítrico y de la β -oxidación de los ácidos grasos. Por tanto, los ácidos grasos que en estado normal actúan como fuente de energía para el hígado, son sustituidos por el etanol.

El incremento del cociente NADH/NAD^+ también aumenta la concentración de α -glicerolfosfato que favorece la acumulación de triglicéridos hepáticos por atrapamiento de ácidos grasos. Además, los equivalentes reductores pueden pasar de NADH a NADPH, los cuales pueden ser utilizados en la vía de síntesis de ácidos grasos (Lieber y Pignon 1989). Esta respuesta hiperlipémica se desarrolla progresivamente y va acompañada de un aumento en la actividad enzimática del retículo endoplásmico involucrado en la producción de lipoproteínas.

En la ingesta aguda de etanol se produce una hipoglucemia severa, debida en parte al bloqueo de la gluconeogénesis hepática como consecuencia del aumento en la relación NADH/NAD^+ en sujetos en los que el almacenamiento de glucosa está disminuido por el ayuno o por la existencia de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono. Actualmente se ha descrito hiperglucemia asociada al alcoholismo pero su mecanismo no está claro. Esta intolerancia puede ser debida, en parte, a la disminución de la utilización periférica de la glucosa posiblemente secundaria a la cetosis inducida por el etanol (Gordon y Lieber 1992).

El acetaldehído también puede ser sintetizado endógenamente por la deoxipentosafofatoaldol (Lionetti y cols., 1964), piruvato deshidrogenasa (McManus y cols., 1966) y fosforilfosfoetanolamina fosforilasa (Fleishood y Pitot 1970).

Más del 90% del acetaldehído formado en el hígado es oxidado por este órgano hasta acetato utilizando como cofactor NAD^+ .



La enzima responsable de la oxidación del acetaldehído es la aldehído deshidrogenasa (ALDH). Esta enzima ha sido aislada en los microsomas hepáticos, citosol, membrana externa mitocondrial y matriz mitocondrial; siendo en esta última en donde se produce la mayor parte de la oxidación del acetaldehído.

Esta enzima presenta polimorfismo. Las dos isoenzimas hepáticas principales son ALDH I Y ALDH II que se encuentran localizadas en la mitocondria y en el citosol respectivamente de los hepatocitos periportales y centrolobulillares; existen otras dos isoenzimas, ALDH III y ALDH IV, que con una Km para el acetaldehído del rango de milimolar son poco importantes en el metabolismo del acetaldehído (Maeda 1988). Se ha demostrado que un 50% de la población oriental no posee de forma congénita la isoenzima ALDH I, lo cual origina un aumento de los niveles de acetaldehído en sangre tras la ingesta de etanol. Esta disminución de la ALDH parece tener un importante papel en la sensibilidad al alcohol y en la fisiopatología del alcoholismo (Topel 1985).

Se ha puesto de manifiesto que la ingesta crónica de etanol disminuye la capacidad de la mitocondria para oxidar el acetaldehído; esto asociado al mantenimiento e incluso al aumento de la velocidad de oxidación del etanol, provoca un desequilibrio entre producción y eliminación del acetaldehído observándose unos niveles elevados de acetaldehído en ratas (Koivula y Lindros 1975) y humanos (DiPadova y cols., 1987) tras el consumo crónico de etanol.

El acetaldehído acumulado puede afectar a muchos tejidos, principalmente al hígado. Parece ser que interfiere en el metabolismo del piridoxal fosfato desplazándolo de su unión a las proteínas y promoviendo la degradación de la vitamina B₆ (Veitch y cols., 1975). También se une

covalentemente a las proteínas circulantes y proteínas del citoesqueleto (tubulina) formando complejos proteicos que inducen la producción de anticuerpos y provocan una reacción citotóxica (Israel y cols., 1994); produce depleción del glutatión (Shaw y cols., 1981), peroxidación lipídica (DiLuzio y col., 1977), inactivación enzimática; estimula la producción de colágeno por los lipocitos y miofibroblastos hepáticos promoviendo fibrosis hepática (Lieber 1991) y altera la síntesis de proteínas cardíacas. El acetaldehído también puede provocar cambios morfológicos en el eritrocito ya que se ha demostrado que se une a la hemoglobina (Peterson y col., 1987) y a las proteínas de membrana del hematíe como espectrina y actina (Gaines y cols., 1977). Esta unión reversible del acetaldehído a los eritrocitos actúa como un mecanismo de transporte y puede mediar la toxicidad extrahepática del acetaldehído (Baraona y cols., 1987).

El papel del acetato es menos conocido que el del acetaldehído. Se ha encontrado que el acetato aumenta el gasto cardíaco, la contractibilidad miocárdica y el riego sanguíneo coronario (Liang y Lowenstein 1978). En el tejido adiposo inhibe la lipólisis (Nilson y Belfrage 1978) y se descubrió que era la causa, por lo menos en parte, de la menor producción de ácidos grasos libres y del descenso de éstos en la circulación (Crouse y cols., 1968). Recientemente, se ha demostrado un efecto inhibitor sobre el aparato locomotor (Israel y cols., 1994) y un aumento del flujo sanguíneo portal (Carmichael y cols., 1988).

3.2.- Sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) en el retículo endoplásmico.

La segunda vía de degradación del alcohol es el sistema microsomal oxidativo que tiene lugar a nivel del retículo endoplásmico liso del hepatocito, según la reacción descrita por Lieber y De Carli que utiliza como cofactor el NADPH (Lieber y DeCarli 1970) y es dependiente del citocromo P450, concretamente del citocromo P450 inducible por el etanol P450III_{E1} (Nebert y cols., 1987).



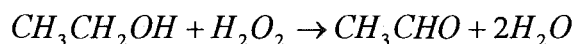
Se ha demostrado que el consumo crónico de etanol aumenta la capacidad oxidativa de este sistema, observándose una proliferación de todos los componentes del sistema retículo endoplásmico liso incluyendo un incremento del citocromo P450IIE1 (Lieber y cols., 1988). También se ha observado inducción del P450IIE1 en tejidos extrahepáticos (Shimizu y cols., 1990) pero los mecanismos que interviene en su regulación están todavía sin dilucidar. Esta inducción es importante en el proceso de destoxificación acelerada de las drogas tras la ingesta crónica de etanol; por esta misma razón el SMOE puede ser inducido por ciertas drogas (barbitúricos, tolbutamida) con lo que se acelera el aclaramiento del etanol.

Además, tanto el SMOE como los sistemas microsomales que metabolizan las drogas tienen elementos comunes como NADPH, O₂, citocromo P450IIE1 y otros citocromos P450, lo que explicaría la existencia de un gran número de interacciones farmacológicas (Lieber 1988b).

Por otro lado, el citocromo P-450 inducible por etanol no sólo está implicado en el metabolismo y tolerancia del etanol sino también en la activación de algunos xenobióticos y sustancias carcinógenas (Lieber 1991).

3.3.- Sistema catalasa de los peroxisomas.

El sistema catalasa se localiza en los peroxisomas del hepatocito. En condiciones normales, desempeña un papel insignificante en el metabolismo "in vivo" del etanol (2%) y depende de los niveles de peróxido de hidrógeno existentes (Lieber y DeCarli 1972).



3.4.- Metabolismo no oxidativo del etanol.

Recientemente, Laposata y cols. (1986; 1989), en estudios realizados en biopsias de tejidos postmortem de individuos con ingesta aguda o crónica de etanol observaron la presencia de los esteres etílicos de los ácidos grasos (EEFA) en los órganos dañados más frecuentemente por el etanol; principalmente hígado, páncreas y tejido adiposo; y en menor medida en cerebro y corazón.

Estos compuestos son metabolitos del etanol formados por la esterificación del etanol con los ácidos grasos mediante la acción de la enzima EEFA sintasa presente en alta concentración en estos tejidos; por tanto, se piensa que estos metabolitos pueden ser, al menos en parte, responsables de los efectos patológicos del etanol (Doyle 1994).

Doyle y cols. (1994) han detectado la presencia de estos compuestos en suero tras la ingesta de etanol. Actualmente se está estudiando la utilización de estos compuestos y de la enzima EEFA sintasa del tejido adiposo como marcadores a largo plazo de la ingesta de etanol aprovechando la larga vida media de estos compuestos en el tejido adiposo ($t_{1/2}=16-24h$) (Laposata y cols., 1989; Björntorp y cols., 1990; DePergola y cols., 1991; Doyle y cols., 1994).

4.- ALCOHOL Y TRACTO GASTROINTESTINAL.

El consumo excesivo de alcohol, a menudo, se ha asociado con síntomas gastrointestinales como diarrea, dispepsia y náuseas. El estado nutricional de los alcohólicos crónicos es frecuentemente pobre, sin embargo, esta malnutrición varía dependiendo de la intensidad y duración del abuso del consumo de alcohol (Persson 1991).

El tracto gastrointestinal en alcohólicos, está expuesto a altas concentraciones de alcohol, desde el lumen intestinal, y desde la corriente sanguínea por el alcohol recientemente absorbido. La malnutrición "per se" puede causar disturbios en las funciones del intestino delgado. La malnutrición y el efecto directo del alcohol pueden ser ambos factores importantes en la patogénesis de la malabsorción en alcohólicos (Persson 1991).

En humanos se han realizado numerosos estudios sobre los factores físicos, fisiológicos y anomalías en el desarrollo, que aumentan la mortalidad postnatal en las crías de madres alcohólicas (Clarren y Smith, 1978; Kaminski y cols., 1978). Sin embargo, las alteraciones gastrointestinales han sido poco estudiadas, a pesar de que según Corring y cols. (1982), los factores que intervienen en el desarrollo dependen de un estado nutricional adecuado; en el que se incluye la ingesta de alimento y la capacidad gastrointestinal.

La ingesta de etanol produce una gran cantidad de alteraciones gastrointestinales en los mamíferos adultos (Barona y cols., 1974; Perlow y cols., 1977; Beck y Dinda, 1981; Raul y cols., 1982); pero es difícil extrapolar estos efectos a los encontrados en los fetos de madres alcohólicas. El daño fetal podría ser producido directa o indirectamente por los cambios fisiológicos que en la prole produce la ingesta de etanol (López-Tejero y cols., 1989).

Los efectos del etanol en las funciones biológicas están relacionados con sus propiedades físicas. Estas propiedades son el resultado de un balance entre la contribución relativa del grupo hidroxilo y del grupo alifático. Cuando una molécula de etanol se sitúa en un sistema agua/lípido, la contribución del grupo hidroxilo predomina sobre la del grupo alifático. El grupo hidroxilo forma puentes de hidrógeno con el agua y le proporciona infinita solubilidad en el agua a la molécula (Wilson y Hoyumpa 1979).

Por otra parte, parece ser que los efectos biológicos del etanol se atribuyen más a la porción hidrófoba que a la hidrófila. Así el etanol tiene relativamente menos hidrofobicidad y produce menores efectos biológicos, en condiciones equimoleculares, que los miembros de cadena mayor de la serie de alcoholes alifáticos. La potencia de los efectos biológicos en membranas, de los alcoholes alifáticos de cadena corta, aumenta tres veces por cada grupo $-CH_2-$ añadido a la cadena hidrocarbonada (Kalant 1971).

El sitio donde se produce la interacción del etanol con la membrana de borde en cepillo, probablemente sea la porción no polar de las moléculas lipídicas, o proteínas de membranas que sufran un cambio conformacional al unirse al etanol (Wilson y Hoyumpa 1979).

El etanol puede afectar diversos aspectos de la fisiología y la histología del intestino, como son:

1.- Cambios estructurales.

2.- Alteraciones funcionales en:

- permeabilidad
- motilidad
- enzimas
- secreción de electrolitos
- flora bacteriana
- absorción

4.1.- Cambios estructurales.

Existen controversias acerca del daño producido por la ingestión crónica de etanol en la mucosa intestinal (Mazzanti y Jenkins 1987a).

Tras un período de intensa exposición al alcohol, los pacientes alcohólicos crónicos mostraron, mediante microscopía óptica, una histología normal en las muestras de biopsia duodenal y yeyunal (Bjarnason y cols., 1984).

Mediante métodos morfométricos y observación por microscopía electrónica, se ha demostrado que la ingestión crónica de etanol afecta a la mucosa intestinal. En nuestro laboratorio Pérez Santos (1986) realizó un estudio en yeyuno de ratas con ingesta crónica de alcohol observando cambios ultraestructurales, incluyendo anormalidades mitocondriales y dilatación del retículo endoplásmico. Bode y cols. (1982) detectaron una reducción de la altura de las vellosidades, en alcohólicos crónicos, comparado con los controles. Además observaron el doble de células mononucleares interepiteliales en los alcohólicos. En mucosa duodenal también se ha observado una disminución en la altura de las vellosidades tras el consumo crónico de alcohol (Seitz y cols, 1985). En resumen, parece que la ingesta crónica de etanol produce cambios histológicos en la mucosa intestinal del hombre.

Una constante observada en los últimos trabajos, es una reducción en la renovación de los enterocitos, causada por una inhibición de la mitosis (Mazzanti y Jenkins 1987a; Landsdown y Dayan 1987). Se ha especulado que pérdidas continuas de células de las vellosidades por procesos naturales, acompañado de una reducción en la actividad mitótica, conducirá eventualmente a una disminución de la altura de las vellosidades y finalmente a una atrofia parcial de las vellosidades (Landsdown y Dayan 1987). Se ha observado un caso de

atrofia parcial de las vellosidades probablemente causada por ingestión crónica de alcohol (Sjölund y cols., 1989).

Existe una relación entre la deficiencia de la lactasa y el grado del daño encontrado en la mucosa intestinal (Rossi y cols., 1980). La lesión de la mucosa gastrointestinal al nacer, podría dar como resultado diarreas peligrosas en los lactantes, debido a la intolerancia a la lactosa (Rossi y Lebenthal 1985). Las células epiteliales del intestino de neonatos de madres tratadas con etanol durante la gestación, mostraron pequeños cambios al compararlo con los controles; así como una importante reducción en la densidad de la membrana del borde en cepillo (López-Tejero y cols., 1989).

Análisis por microscopía electrónica de la mucosa del yeyuno a los 5, 10 y 15 días postparto, en crías de madres tratadas con etanol al 25 % a las que se les retiró el etanol en el momento del nacimiento; reveló que las crías expuestas al etanol difieren de las controles en el aspecto prematuro de los enterocitos; esta característica persistió hasta el día 15 postparto. Los cambios desaparecieron al destete y a los 25 días la ultraestructura fue similar a las controles (Buts y cols., 1992).

4.2.- Alteraciones funcionales.

4.2.1.- Permeabilidad.

En animales de experimentación, tras la ingesta crónica de etanol, se ha observado en la mucosa intestinal, un aumento de la permeabilidad para las macromoléculas. También se ha observado este aumento de permeabilidad en pacientes alcohólicos sin cirrosis hepática (Bjarnason y cols., 1984; 1985).

El deterioro de la barrera de la mucosa intestinal en el hombre, tras una prolongada ingesta crónica de etanol puede tener consecuencias importantes para la salud. El aumento de la permeabilidad puede conducir a un aumento de pérdidas de sustancias desde el torrente sanguíneo al lumen intestinal.

La interrupción de la barrera intestinal puede también promover la absorción de pequeños compuestos tóxicos, normalmente no absorbibles, y su consiguiente entrada en la circulación sistémica (Bjarnason y cols., 1984). El aumento de la absorción de sustancias antigénicas puede conducir a reacciones inmunes patológicas, que pueden dar como resultado posteriores daños al tejido gastrointestinal (Stern y cols., 1986).

No obstante, en la salud humana está aún por determinar, el papel concreto del efecto de los cambios de la permeabilidad.

4.2.2.- Motilidad.

En ratas, tras la administración crónica de etanol, se ha observado una inhibición de la síntesis de las proteínas contráctiles del músculo liso intestinal (Preedy y Peters 1990).

Más recientemente Preedy y cols. (1993) han comprobado, que el etanol y el acetaldehído son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas y pueden contribuir a la génesis de una miopatía intestinal, que posiblemente contribuya a producir trastornos de la motilidad y malabsorción.

En el hombre, la diarrea y la aceleración del tránsito intestinal observadas en alcohólicos se han asociado a muy diversas causas, pero esta cuestión permanece aún sin dilucidar (Keshavarzian y cols., 1986).

4.2.3.- Efectos del alcohol sobre los enzimas de la mucosa.

Disacaridasas: Aunque trabajos anteriores habían mostrado una disminución de las disacaridasas intestinales, trabajos más recientes como el de Mazzanti y cols. (1987) han encontrado que la ingestión crónica de etanol puede aumentar la actividad de estas enzimas.

Las ratas tratadas con etanol al 30 % durante la gestación y lactancia, no modificaron la actividad enzimática durante el desarrollo de la prole; pero presentaron un aumento significativo en la actividad de la maltasa y sacarasa en la 3ª semana. Estos efectos fueron más pronunciados en el intestino proximal y medio (Andrés y cols., 1986).

Recientemente en nuestro laboratorio Rodríguez-Castilla y cols. (1995) han determinado las actividades enzimáticas de la maltasa, lactasa y sacarasa, en la mucosa del íleon de ratas sometidas a la ingesta de etanol al 30 % durante 3 y 5 meses. Después de tres meses de tratamiento con etanol, el contenido de proteínas de la mucosa fue similar al grupo control; la actividad específica (U/g proteínas) en todos los enzimas estudiados, fue significativamente menor en los animales que ingieren etanol al compararlo con sus controles. Sin embargo, después de un período de cinco meses consumiendo etanol, el contenido proteico disminuyó y no aparecieron diferencias entre las actividades específicas de maltasa, lactasa y sacarasa, al compararlas con sus controles.

Fosfatasa alcalina: Se han encontrado resultados contradictorios acerca del efecto del alcohol en esta enzima (Wisniewska y cols., 1985; Mazzanti y cols., 1987).

Gamma-glutamyltransferasa (GGT): Se ha demostrado que la ingesta crónica de etanol aumenta la GGT en animales de experimentación (Seitz y cols., 1982) y en el hombre (Seitz y cols., 1985). Estudios posteriores mostraron, que en las ratas alimentadas con etanol, la actividad GGT en los vasos linfáticos mesentéricos aumenta en un 83 % con respecto a las controles, lo que sugiere, que el aumento de GGT encontrado en suero tras una ingesta elevada de etanol, podría estar originado, en parte, por el aumento de la GGT intestinal (Ishii y cols., 1988).

Na⁺-K⁺-ATPasa: Esta enzima es importante para el mantenimiento del equilibrio iónico en las células intestinales y está implicada en el mecanismo de transporte activo de glucosa y aminoácidos. La administración aguda de etanol inhibe el efecto de la Na-K-ATPasa, en la membrana de borde en cepillo y en la basolateral (Kalant 1971).

Adenilato-ciclasa: Se ha observado que el etanol aumenta la actividad de la adenilato ciclasa (Bode 1980). Esto podría tener un cierto efecto, aumentando la secreción intestinal de sodio y agua.

Guanilato-ciclasa: Se ha encontrado una inhibición, con la consiguiente disminución de GMPc, lo que puede reducir el transporte de sodio (Bode 1980).

Las enzimas ligadas al metabolismo productor de energía se afectan de forma variable, la actividad de las enzimas mitocondriales parece disminuir, mientras que la de las enzimas microsomales parece ser que aumenta (Bode 1980).

Hidrolasas: Raul y cols. (1987), examinaron la evolución postnatal de la actividad hidrolasa en la prole de ratas que habían sido expuestas crónicamente al etanol durante la gestación. Comprobando que la exposición prenatal al etanol, no perturbó la maduración intestinal de la actividad sacarasa y la normal disminución en la lactasa.

La actividad intestinal de la glucoamilasa en las crías, no mostró cambios en los grupos que habían sido tratados con etanol durante la gestación (Raul y cols., 1987).

La aminopeptidasa mostró valores de actividad significativamente más bajos durante el período de lactancia en la prole expuesta prenatalmente al etanol. Estos resultados indicaron que la exposición al etanol durante la gestación, causó una disminución en la capacidad intestinal de los neonatos para digerir las proteínas (Raul y cols., 1987).

López-Tejero y cols. (1989), encontraron que las crías de madres tratadas con etanol presentaban a los 30 días postparto una disminución en la actividad de la lactasa tanto al expresarlo por g de peso corporal, como por longitud total intestinal, g de peso intestinal y mg de proteínas.

Después de la exposición prenatal al etanol, la actividad de la lactasa y maltasa disminuyó en el día 5 postparto; mientras la aminopeptidasa aumentó. Estas actividades no difieren significativamente de los controles en el día 10. La decadencia ontogénica de la lactasa ocurrió al destete, tanto en los controles como en las crías expuestas al etanol. La actividad de la sacarasa, quedó ausente durante la lactancia, y la subida ocurrió al destete con la misma cronología que en los controles. La maduración postnatal del intestino delgado en la prole expuesta al etanol fue menor al comenzar el período de lactancia. Sin embargo, en el yeyuno e

íleon, los niveles alcanzados por el enzima fue 50 % menor en el grupo tratado con etanol, alcanzándose la misma actividad que el grupo control a los 35 días postparto (Buts y cols., 1992).

4.2.4.- Secreción de electrolitos.

Se ha observado que el alcohol induce la secreción intestinal de agua y electrolitos, probablemente de forma dosis dependiente, que se atribuyó a los efectos del etanol sobre el sistema AMPc (Kuo y Shanbour 1978); pero posteriormente se ha determinado que este efecto parece ser reversible y estar mediado por un mecanismo nervioso, en el que el etanol luminal induce una reacción tóxica y/o inflamatoria, produciendo una estimulación del nervio aferente de un reflejo nervioso secretor (Hallbäck y cols., 1990).

4.2.5.- Flora bacteriana.

Se ha encontrado que la microflora intestinal en alcohólicos difiere cualitativa y cuantitativamente del grupo control (Bode y cols., 1984). El número de coliformes y anaerobios Gram (-) fue mayor en los aspirados de pacientes alcohólicos.

Se han observado algunos trastornos nutricionales en intestino delgado con sobrecrecimiento bacteriano como la malabsorción de lípidos, de carbohidratos, proteínas, vitamina B₁₂ y ácido fólico. Este sobrecrecimiento puede conducir a cambios morfológicos en la mucosa intestinal (Persson 1991). Además, una considerable cantidad de etanol puede ser oxidado por esta superpoblación bacteriana, liberando una alta concentración de acetaldehído a la sangre portal y al lumen, que podrían ejercer efectos tóxicos en la mucosa gastrointestinal (Baraona y cols., 1986).

4.2.6.- Efectos sobre la absorción.

El etanol puede afectar la absorción de nutrientes, agua y electrolitos, vitaminas y minerales.

Nutrientes:

Azúcares: Se ha asociado la exposición crónica al etanol con un mayor transporte de glucosa (Thomson 1984), posiblemente debido a un aumento de la difusión pasiva.

Carreras y cols., (1991) en estudios realizados en nuestro laboratorio concluyeron que en ratas tratadas con etanol al 30% aparecía un ligero aumento en la absorción de D-galactosa expresado por superficie de intestino.

Aminoácidos: La exposición crónica de etanol al 30% no altera de forma significativa el transporte de L-aminoácidos, como la L-leucina, en animales de experimentación (Carreras y cols., 1993).

Lípidos: Se han obtenido resultados contradictorios acerca del efecto de ingestión crónica de etanol en la absorción de lípidos. No existen evidencias de que el etanol directamente interfiera con el transporte de lípidos a través de las membranas, aunque se ha observado ligera malabsorción de lípidos y esteatorrea transitoria en un 60 % de los pacientes alcohólicos (Roggin y cols., 1972).

Agua y electrolitos: Se ha observado en pacientes alcohólicos una reducción de la absorción de agua, sodio y cloro. Estos resultados se han puesto de manifiesto, tras dos semanas de consumo de alcohol y tras exposición aguda o crónica al etanol (Krasner y cols., 1976).

Elementos traza:

Calcio: En un estudio realizado por Björneboe y cols. (1988), se han detectado bajos niveles de calcio en un 26 % de alcohólicos hospitalizados y aunque posiblemente existan otros factores más importantes que determinen esta alteración, el alcohol "per se" también inhibe la absorción duodenal de calcio (Persson 1991).

Magnesio: No se han observado efectos en la absorción de magnesio tras la ingestión de alcohol. Los bajos niveles de magnesio observados en alcohólicos se deben a la combinación de causas dietéticas, pérdidas urinarias, y pérdidas intestinales por vómitos o diarrea (Abbott y cols., 1994).

Hierro: En individuos alcohólicos es frecuente una elevada reserva de hierro. El efecto de la ingesta crónica de etanol en la absorción intestinal de hierro permanece aún sin dilucidar (Bode 1980).

Vitaminas:

Tiamina: La tiamina a bajas concentraciones se absorbe por transporte activo, y a altas concentraciones por difusión pasiva (Hoyumpa 1986). El efecto de la ingesta crónica de etanol en la absorción de tiamina no está aún aclarado. Algunos autores (Roggin y cols., 1969;

Thomson y cols., 1970; Tomasulo y cols., 1980) han observado alteraciones en la absorción; sin embargo Breen y cols., (1985) no detectaron cambios significativos en la absorción en pacientes alcohólicos.

Riboflavina y piridoxina: No se ha detectado un efecto perjudicial del alcohol sobre la absorción intestinal de estas vitaminas (Hoyumpa 1986).

Vitamina B₁₂: Se ha observado malabsorción de esta vitamina tras la ingesta crónica de etanol (Lindenbaum 1980).

Vitamina C: La absorción de vitamina C disminuye cuando se ingiere simultáneamente con alcohol (Fazio y cols., 1981), posiblemente por el efecto del alcohol en el sistema de transporte Na⁺-dependiente.

Vitaminas liposolubles: La absorción de vitaminas liposolubles es un proceso saturable, pero no dependiente de energía. No existen evidencias de que el consumo de alcohol interfiera directamente con la absorción de estas vitaminas (Persson 1991).

5.- ZINC.

5.1.- Bioquímica y funciones metabólicas.

Un alto porcentaje de zinc sanguíneo se encuentra en el interior del eritrocito, como constituyente de la anhidrasa carbónica, una de las enzimas más abundantes en el organismo, responsable del mantenimiento del equilibrio acidobásico de los líquidos corporales; y como estabilizador de la membrana del eritrocito. Razón por la cual, la deficiencia de zinc disminuye la habilidad del eritrocito a resistir la hemólisis "in vitro"(Bettger y O'Dell 1981).

Se ha visto que la deficiencia de zinc afecta a la composición de los aminoácidos en el eritrocito (Bettger 1989) y altera el esqueleto proteico de la membrana eritrocitaria (Avery y Bettger 1992).

El zinc en el leucocito forma parte del sitio activo de la fosfatasa alcalina que en muchos trabajos ha sido utilizado para reflejar el estado del metal en el organismo (Everett y Apgar 1987; Thompson 1991). Así, en conejos en crecimiento, la actividad de la fosfatasa alcalina en suero y riñones está significativamente relacionada con el estado de deficiencia del metal en estos animales (Schwarz y Pallauf 1989).

Las carboxipeptidasas A y B, de importancia en la digestión de proteínas, contiene 1 átomo-gramo de zinc por mol de enzima. La actividad de la carboxipeptidasa A y B se ve muy afectada por los factores que pueden disminuir la absorción de zinc como es el tipo de la proteína dietaria (Berger y Schneeman 1988).

Las lactato, malato, alcohol y glutamato deshidrogenasa, que poseen distintos contenidos molares de zinc, han demostrado tener actividades prácticamente refractarias a la deficiencia de zinc (Kirchgessner y cols., 1976) hecho enfatizado por Bettger y O'Dell (1981) al sugerir que la función del zinc en la estructura de la membrana es superior a la descrita para las metaloproteínas.

El papel del zinc en los procesos de desarrollo, división y diferenciación celular se explica por:

- La coincidencia de su deficiencia con altas alteraciones en el crecimiento.
- Su participación en procesos de replicación, transcripción (Wu y Wu 1987).
- Su papel decisivo en la metafase cromosómica: la deficiencia de micronutrientes entre ellos el zinc, causa fragilidad e incluso ruptura de la estructura cromosómica.

Además de todas estas funciones, se han descrito en numerosos trabajos la intervención del metal en la estimulación de la función inmune del organismo (Bogden y cols., 1987). Los animales deficientes en zinc son más susceptibles a infecciones vírales y bacterianas (Keen y Gershwin 1990).

A nivel genético, en situaciones en las cuales se detectó el efecto de un elemento traza sobre la regulación de la expresión genética, se demostró que el zinc es uno de los más importantes reguladores de esta expresión genética (Chesters 1991).

5.2.- Requerimientos.

El papel del zinc como micronutriente esencial está bien establecido para las plantas, animales y seres humanos (Hambidge y col., 1986). Es un elemento traza ampliamente distribuido por todas las células y tejidos, está relacionado con la actividad de numerosos enzimas que actúan en todas las áreas del metabolismo (Prasad 1991). Su implicación en el funcionamiento de las enzimas relacionadas con la expresión de los genes explica el efecto inmediato de la deficiencia del metal sobre el crecimiento y la reaparición de las células.

Además, el organismo no dispone de grandes depósitos de zinc, lo que justifica la aparición precoz de signos de deficiencia en los animales de laboratorio.

El balance de zinc está sometido a una fuerte regulación homeostática, por lo que se logra mantener una situación de equilibrio cuando el aporte de zinc es moderadamente bajo (King y Turnlund 1989).

Debido a esta regulación tan eficaz, el requerimiento de zinc de una persona normal, depende sobre todo del estado del nutriente o de las reservas corporales de zinc movilizables. Como no hay evidencia de un depósito de zinc, el requerimiento fisiológico absoluto es dependiente de la captación del metal. Y como la biodisponibilidad mínima del zinc a partir de la dieta total es probablemente de 20 a 30 %, se recomienda de 8 a 12 mg de zinc/día (Según International Life Sciences Institute, I.L.S.I. 1990).

Con respecto a la biodisponibilidad del metal, el zinc de origen animal, en carne, hígado, huevos, mariscos, especialmente las ostras, es más disponible que el zinc procedente de alimentos vegetales (Linder 1988; R.D.A. 1991).

5.3.- Fisiología del zinc.

En el organismo humano existe una cantidad total de zinc de 2-3 g. El zinc se encuentra en todos los tejidos humanos, variando su cantidad entre 10-200 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo. La mayoría de los órganos, incluyendo el páncreas, contiene de 20-30 $\mu\text{g/g}$, mientras que el hígado, músculo voluntario y hueso contienen 60-180 $\mu\text{g/g}$. Se encuentran cantidades superiores en los tejidos oculares, en particular en el iris, retina y coroides. El zinc no es acumulado de forma preferente por ningún tejido, aunque la próstata, secreciones prostáticas y espermatozoides poseen un contenido en zinc muy elevado (860 $\mu\text{g/g}$ en la próstata normal humana), lo que no explicaría su contenido en anhidrasa carbónica ni en fosfatasa alcalina (enzimas Zn-dependientes) (Li y Vallee 1987).

La sangre total humana contiene aproximadamente 900 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. La concentración normal de zinc en el suero es de 121 ± 19 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. Los eritrocitos normales contienen 1,4 $\mu\text{g}/100$ ml de concentrado de hematíes. El 3% de todo el Zn contenido en la sangre se encuentra en los leucocitos, que contienen $3,2 \cdot 10^{-3}$ g de zinc por millón de células, aproximadamente 25 veces más de lo que se halla en número comparable de hematíes. Las concentraciones de zinc en la sangre no están sometidas a variaciones estacionales o circadianas y no existe diferencia entre sexos (Li y Vallee 1987).

El ion divalente es la forma biológicamente importante del zinc. No existe evidencia de ningún otro estado de oxidación y el ion no sufre reacción de oxidación-reducción (O'Dell y Campbell 1970). Los iones de zinc en solución acuosa a pH elevado normalmente forman un precipitado hidroxilado, a no ser que sustancias complejantes tales como aminoácidos, péptidos, proteínas o queladores orgánicos estén presentes (O'dell y campbell 1970).

5.4.- Absorción intestinal.

Los mecanismos implicados en la absorción de zinc no están bien definidos. Sin embargo, el concepto de la regulación homeostática de la absorción intestinal del zinc fue desarrollada por primera vez por Cotzias y Papavasiliou (1964). El control homeostático regula la capacidad de absorción intestinal (Smith y Cousins 1980; Hoadley y Cousins 1988), y la excreción endógena (Weigand y Kirchgessner 1980). Así, muchos trabajos en humanos (King y Turnlund 1989) y en animales demostraron el mantenimiento de un equilibrio entre la cantidad absorbida y excretada del metal (Solomons y Cousins 1984; Cousins 1985).

Las experiencias realizadas con animales y los estudios clínicos con humanos sugirieron que la absorción del zinc es regulada homeostáticamente. Wada y cols. (1985) estudiaron la absorción del zinc y sus balances en 6 jóvenes alimentados con dietas que contenían niveles bajos del metal, y encontraron que los niveles de zinc en suero y orina no cambiaron de forma considerable durante un período de 8 semanas. Por tanto, se puede decir que la absorción del Zn responde a los cambios de Zn dietético y que una ingesta de 5,5 mg de Zn/día durante dicho período no causa disminución en el nivel sérico ni urinario.

La absorción de Zn se produce fundamentalmente en la segunda porción del duodeno (Methfessel y Spencer 1973). El Zn oral también se absorbe por otras zonas en intestino delgado y grueso. Antonson y cols. (1979) demostraron en ratas una mayor absorción del Zn en los segmentos duodenales en los que los conductos biliares y pancreáticos se habían excluido. Se basaban en el hecho de que en dichas secreciones podía existir una proteína a la cual se uniera el Zn, provocando dicha unión una disminución en la absorción duodenal del metal.

Sin embargo, Evans y cols. (1975) demostraron la presencia de un pequeño ligando peptídico en las secreciones pancreáticas que aumentaba la absorción del Zn en el duodeno de ratas, actuando como un transportador.

Vanderhoff y cols. (1983) dedujeron que las secreciones pancreáticas no parecían ser necesarias para una absorción adecuada de Zn mediante experiencias en humanos.

Finalmente, Naveh y cols. (1988) a partir de experiencias con perros dedujeron que el duodeno posee la mayor capacidad de absorción del Zn, seguido del íleon distal y yeyuno proximal, y que las secreciones pancreáticas no parecen ser necesarias para obtener una absorción adecuada de Zn en el duodeno de perro.

En humanos según, Lee y cols. (1989), la absorción de zinc se realiza en todo el intestino delgado, pero con más intensidad en el yeyuno.

5.4.1.- Mecanismos de absorción de zinc.

El proceso de absorción de zinc a nivel intestinal parece implicar dos mecanismos: uno saturable que requiere un transportador y otro no saturable (pasivo) sin transportador inmediato (Steel y Cousins 1985; Hoadley y Cousins 1988), hecho confirmado por muchos investigadores (Menard y Cousins 1983a; Oestreicher y Cousins 1989).

Varios trabajos han descrito la naturaleza biofísica de la captación del zinc (Sahagian y cols., 1967; Lombeck y cols., 1975). Smith y Cousins (1980) observaron dos fases en la absorción de zinc en función de su concentración intraluminal. Una fase rápida a través de la membrana de borde en

cepillo, que implica la saturabilidad de los sitios de unión al zinc seguida de una fase más lenta que probablemente implica el transporte de zinc a través de la membrana basolateral.

Altas concentraciones del metal pueden dañar la membrana, aumentando su permeabilidad y permitiendo la entrada de zinc a la célula que se une no específicamente a proteínas y otros ligandos de unión (Cousins 1985).

Menard y Cousins (1983a) estudiaron la captación de zinc por vesículas aisladas de membrana de borde en cepillo de intestino de rata mediante una técnica de filtración rápida. La captación era saturable a 0,2 mM de zinc extravascular. A partir de una concentración de 1 mM se expresa el mecanismo no saturable. A nivel de la membrana basolateral, la captación no se ve estimulada ni con ATP ni con sodio.

La necesidad de un transporte activo en alguna fase de captación de zinc fue mencionada en muchos trabajos. Kowarski y cols. (1974) encontraron, en experiencias de intestino evertido que el 2,4 dinitrofenol disminuye el flujo de zinc en la dirección serosa-mucosa (secreción) sugiriendo que la absorción y/o la secreción, en mucosa yeyunal de rata es un fenómeno dependiente de energía.

En 1983 Menard y Cousins, no detectaron ningún transporte activo de zinc, por lo menos a nivel de la membrana del borde en cepillo, pero si demostraron una alta regulación homeostática de la captación del metal. La velocidad de captación de zinc por vesículas de membrana de borde en cepillo aumenta significativamente cuando las vesículas provienen de ratas deficientes en zinc, comparadas con vesículas de ratas controles ($J=12$ Vs $5,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ y mg de proteína, pero la K_m (0,4) no cambia) (Menard y Cousins 1983a).

Experiencias realizadas por Menard y cols. (1983) sobre el transporte del zinc en vesículas de membrana del borde en cepillo de células intestinales de ratas, establecieron que la velocidad de transporte del elemento es función inversa al estatus dietético de zinc, por lo que a nivel de membrana parece ser activado un mecanismo homeostático debido a un mínimo suplemento de zinc en la dieta. El ATP no estimula el transporte, por lo que se sugiere el transporte por difusión pasiva.

5.4.2.- Ligandos de unión.

No está claro si el zinc atraviesa el borde en cepillo de la membrana y/o la subestructura membranosa de los enterocitos como ion libre o como complejo quelato. Los hechos tienden a mantener la segunda opción. Evans y Johnson (1978) sugirieron la absorción del zinc como quelatos intactos. Por ejemplo, se demostró que el EDTA tiene una influencia estimulante en la absorción del zinc. Suso y Edwards (1971, 1972) propusieron un transporte desde el lumen intestinal a la circulación porta del complejo Zn-EDTA intacto, hecho confirmado más tarde por Oestreicher y Cousins (1982).

Se cree que el zinc de la leche humana es más biodisponible que el de la leche de vaca, enfocándose la atención a los ligandos de unión del zinc de bajo peso molecular (ZLB) como explicación de esta desigual biodisponibilidad. Se han sugerido ligandos de unión tales como el ácido cítrico (Lonnerdal y col., 1980b) y el ácido picolínico, como metabolito del triptófano (Evans y Johnson 1980a) pero ambas sugerencias arrastraron críticas. Holt (1981) indica que la unión de grandes cantidades de Ca y Mg a las caseínas de la leche compromete la cantidad de zinc que puede estar unida a otros ligandos. La consecuencia de ello, es que el factor principal que influye, es la unión de los metales a las proteínas de la leche y no a la presencia de ligandos específicos de bajo peso molecular.

Cousins y Smith (1980) propusieron la idea de que la biodisponibilidad del zinc en la leche de distintas especies depende del tipo de proteína de la leche, de su digestibilidad relativa y de la cantidad de zinc potencialmente disponible de entrar libre o como quelato de bajo peso molecular. En la leche existe un sustancial contenido de aminoácidos libres y así, el ácido glutámico (Martin y col., 1981), la lisina, la cisteína y la glicina (Giroux y Prakash 1977) podrían ser ligandos de unión del zinc en la absorción.

Se ha visto que la restricción de proteína reduce la absorción del zinc, y una alta ingesta proteica en la dieta parece aumentarla (Van Capen y House 1974) además de sugerir el enlace entre aminoácidos como ligando para el zinc en el lumen intestinal.

También se ha sugerido la existencia de ligandos de unión metálicos en el intestino de ratas que pueden influir en el transporte del zinc a través del epitelio intestinal (Hahn y Evans 1973; Kowarsky y cols., 1974; Evans 1975).

Starcher y cols. (1980) estudiaron la relación entre la absorción del zinc y la metalotionina intestinal en ratón. Sus resultados indicaron que la absorción del zinc era directamente proporcional a los niveles de metalotionina intestinal.

Estudios en ratas dedujeron una disminución de la absorción del zinc relacionada con un incremento agudo en la síntesis de metalotionina (Smith y Cousins 1980; Menard y cols., 1981). Esto está de acuerdo con la relación inversa que existe entre los valores de expresión genética de metalotionina y los de absorción del zinc en ratas (Menard y cols., 1981; Cousins 1985).

Kirchgeßner y cols. (1976) mostraron el siguiente orden decreciente de eficacia metabólica al estudiar la utilización del zinc cuando está unido a distintos componentes: Zn-Alanina > Zn -

EDTA > Zn-Glicina > Zn-Cisteína > Zn-Histidina > ZnSO₄ > Zn-fitato > Zn-S > ZnCO₃, por lo que el zinc estará más disponible al provenir de quelatos de aminoácidos y menos al formar parte de sales inorgánicas insolubles y de complejos orgánicos muy estables.

El tracto gastrointestinal puede producir ligandos de unión endógenos que influyen en la absorción del zinc, hecho que arranca principalmente de la observación de que el zinc se une a extractos celulares de tejidos de la mucosa intestinal y/o páncreas. Experiencias en diversos laboratorios han mostrado que el zinc podía comigrar con especies de bajo peso molecular cuando fueron fraccionadas por cromatografía de filtración de gel (Van Campen y Kowarski 1971; Suso y Edwards 1972; Hanh y Evans 1973) llegando a observarse que la absorción parecía estar directamente relacionada con la unión (Richards y Cousins 1975b; Evans y cols., 1975). Así, aminoácidos (Evans y col., 1973), polipéptidos (Schriker y Forbes 1978), prostaglandina E₂ (Song y Adham 1978) y ácido picolínico (Evans y Johnson 1980b) se sugirieron como ligandos.

Sin embargo, Cousins y cols. (1976, 1983) demostraron que en las preparaciones de células intestinales cuando no se ejerce un cuidado extremo en el manejo del tejido y en la cromatografía, se producían separaciones desiguales, y la degradación proteica es la primera responsable de generar especies de bajo peso molecular que se unen al zinc y separables por cromatografía, (Lonnerdal y cols., 1980a). También se ha visto que el contenido de zinc de las células intestinales y/o lumbales estaba alterado, por lo que la interpretación de estos hechos debe ser muy justificada (Solomons y Cousins 1983).

Se sabe que las secreciones pancreáticas y biliares contienen zinc. Los ligandos de unión al zinc en las secreciones pancreáticas parecen ser de peso molecular relativamente alto, mientras que en bilis el zinc se une fundamentalmente a componentes de bajo peso molecular, como el glutatión (Pekas 1971; Casey y cols., 1979; Lonnerdal y cols., 1980a; Alexander y cols., 1981).

5.4.3.- Proteína intestinal rica en cisteína: CRIP.

El paso más importante para entender el mecanismo de absorción del zinc se ha dado cuando se identificó una proteína de unión al zinc de bajo peso molecular en la fracción soluble de la mucosa intestinal de rata, a la cual se le ha atribuido el papel de transportar el zinc intracelular (Hempe y Cousins 1991).

Esta proteína no ha sido detectada ni en el hígado ni en páncreas, sugiriendo que su papel en el metabolismo del zinc es concretamente a nivel de absorción intestinal (Birkenmeir y Gordon 1986; Hempe y Cousins 1991).

Se trata de una proteína intestinal rica en cisteína: CRIP. Con una secuencia de aminoácidos con residuos de histidina y cisteína. Su unión al zinc presenta el carácter saturable como cabe esperar de una proteína transportadora. El gen que codifica la síntesis de ésta proteína está poco expresado en el nacimiento, su expresión alcanza los niveles del adulto durante el período de lactancia (Birkenmeir y Gordon 1986).

El número de sitios de unión al zinc en la CRIP no está bien determinado pero según la posición de los residuos de histidina y cisteína en la estructura primaria de la proteína, existen tres configuraciones que permiten a la molécula de CRIP unir por lo menos 2 ó 3 átomos del zinc (Hampe y Cousins 1992). La secuencia conservada de los residuos de histidina y cisteína llamada "LIM motif", según Hempe y Cousins (1991), confiere a la CRIP la propiedad de unirse al zinc. Se ha sugerido que este "LIM motif" está implicado en la transferencia de zinc de la CRIP a la proteína transportadora del zinc de la membrana basolateral (Freyd y cols., 1990), y la probable interacción entre las dos proteínas.

5.4.4.- Metalotioneina (MT).

Proteína de unión al zinc presente en todas las líneas celulares. Su papel en el metabolismo del zinc es parecido al de la ferritina en el metabolismo del hierro. Regula la homeostasis del zinc y previene la absorción de excesiva cantidad del metal (Hoadley y cols., 1988). Su síntesis está controlada homeostáticamente por los niveles de zinc en la célula (Cousins 1985).

5.4.5.- Regulación homeostática del balance del zinc.

El destino del zinc una vez captado por el enterocito está altamente regulado. Así, el zinc intestinal puede ser utilizado localmente para procesos nutricionales de la célula; puede continuar a través del enterocito su trayecto, unido a la CRIP, hacia la circulación, o bien puede ser capturado y unido firmemente a la metalotioneina hasta su eliminación por descamación celular.

Existe una relación inversa entre la eficacia de la absorción intestinal de zinc en ratas y la unión del metal a la metalotioneina (MT) intestinal (Richards y Cousins, 1976; Menard y cols., 1981; Cousins 1985). En animales deficientes en zinc en los cuales la absorción del metal es altamente eficaz, la concentración de metalotioneina en mucosa intestinal es muy baja. Sin embargo, en animales con sobrecarga de zinc, se detectaron altos niveles de metalotioneina en la mucosa intestinal que se unen al zinc limitando su absorción. En estos experimentos la sobrecarga de zinc en ratas se debe a una alta dosis del metal administrado por vía parenteral, lo que limita la significación fisiológica de la hipótesis (Bremner y Beattie 1990). Hoadley y cols. (1988) en trabajos de perfusión intestinal con ratas deficientes en zinc, ratas con zinc adecuado en la dieta y ratas en ayuno, demostraron que la tasa de absorción de zinc está relacionada inversamente con los niveles de metalotioneina intestinal.

Hempe y Cousins, (1992) demostraron que ratas alimentadas con una dieta baja en zinc, la mayoría del zinc captado por la célula intestinal fue unido a la CRIP (40 Vs 14%) y muy poca cantidad se encontraba en la metalotioneina (4 Vs 52-59 %) en comparación con ratas normales. Además de esto, estos autores observaron también que cuando los niveles del zinc van aumentando en el lumen intestinal de 5 a 300 $\mu\text{mol/l}$, la CRIP transporta cada vez menos cantidad de zinc (de 42 a 25 %). Este zinc que sobra por saturación de la CRIP se une inespecíficamente a los demás componentes de unión al metal (Hempe y Cousins 1992).

Así, la regulación homeostática del balance de zinc está controlada por la concentración del metal: el zinc dietario controla su misma absorción mediante la regulación de la concentración de la metalotioneina intestinal (Cousins 1985) que a su vez modula competitivamente, la unión del zinc a la CRIP (Hempe y Cousins 1992) (Fig. 2).

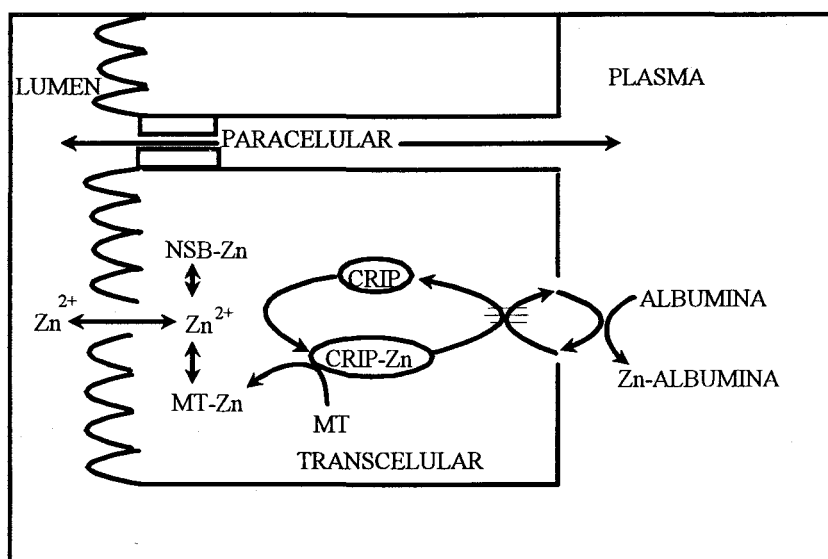


Fig. 2.- Modelo hipotético para el mecanismo de absorción del zinc transcelular por los eritrocitos. Demuestra el papel propuesto para la proteína intestinal rica en cisteína (CRIP), la metalotioneína (MT) y constituyentes de unión al zinc no específicos (NSB). En este modelo, la CRIP funciona como una proteína de transporte de zinc intracelular difusible, que une el zinc después de captarlo a la superficie de la membrana de borde en cepillo; para transportarlo a través de la célula intestinal hacia la membrana basoteral. La proteína intestinal, rica en cisteína o CRIP, puede competir con los NSB por el zinc. La posible implicación de una molécula aceptora/transportadora del metal en la membrana basoteral está indicada por (=). La metalotioneína inhibe la absorción del zinc limitando su unión a la CRIP. Este modelo indica que la absorción del zinc transcelular puede estar regulada por factores dietarios o fisiológicos que alteran la expresión del gen de la CRIP o de la MT (Hepe y Cousins, 1992).

5.5.- Excreción.

Aproximadamente el 10 % del zinc total administrado se elimina a través del jugo pancreático durante los primeros días. Los estudios de balance del zinc no son indicadores válidos del metabolismo del elemento, ya que la excreción del zinc se produce casi totalmente por vía intestinal (por heces se excretan 1-2 mg/día). Además, los datos indicadores de una alta absorción pueden también ser interpretados como indicadores de una baja excreción, y viceversa (Sandstead 1973).

Se ha demostrado experimentalmente que cuando una dieta aporta altas cantidades de proteínas, el zinc está ligera pero significativamente incrementado en orina (en hombre adulto), por lo que la absorción mineral aparente y el balance se modifica (Mahalko y cols., 1983).

En condiciones normales, el zinc no varía apreciablemente a causa del contenido de la dieta, pero en condiciones patológicas, como en los estados de nefrosis, cirrosis hepática postalcohólica, porfiria hepática, albuminuria, inanición total e hipertensión, aumenta la excreción urinaria del zinc (Underwood 1977). En casos deficientes de zinc las concentraciones urinarias del zinc disminuyen a 0.1-0.15 mg de zinc/día (Sandstead 1978).

Las secreciones pancreáticas y biliares contienen zinc. Este complemento de zinc supone parte del zinc fecal endógeno (Methfessel y Spencer 1974).

El zinc se elimina principalmente a través de las secreciones pancreáticas y gastrointestinales. La orina contiene alrededor de 0.5 mg/día, cantidad aparentemente independiente de la ingesta y del

volumen de orina. El zinc urinario pasa a través de los glomérulos renales y una vez filtrado, se excreta principalmente unido a aminoácidos y a porfirinas (Tasman-Jones y cols., 1978).

Sólo pequeñas cantidades son secretadas a la bilis, ciego y colon. La capacidad de excreción de zinc en riñones sanos es limitada, quizás a causa de la unión de éste a la albúmina sérica (Li y Vallee 1987).

En algunas situaciones, por ejemplo, en nutrición parenteral total, la toma de alta dosis de cisteína e histidina por niños mantenidos con este tipo de nutrición conlleva una excreción urinaria del metal significativamente alta (Zlotkin 1989). Muchos casos de deficiencia de zinc se observaron en nutrición parenteral infantil por excesiva excreción urinaria de zinc. La histidina, treonina y lisina aumentan la filtración del zinc renal (Zlotkin y Buchanan 1988).

Otras vías de excreción de zinc son por pérdida de pelo, descamación de la piel, menstruación, semen, fluido prostático (Li y valle 1987). Y evidentemente, en situaciones de embarazo o lactancia, cantidades importantes del metal se transfieren diariamente de la madre al feto o al lactante (Linder 1988).

5.6.- Deficiencias de zinc.

La deficiencia de zinc es un síndrome clínico en el hombre que ocurre cuando el contenido de la dieta es bajo o poco disponible, a causa de un error genético hereditario (acrodermatitis enterohéptica), o se produce condicionada a distintos estados patológicos del individuo (Buxaderas y Farré 1985).

Como hemos visto, la absorción de zinc puede verse impedida por numerosos factores y componentes dietéticos (Hazell 1985). Este hecho, así como una mala absorción intestinal, una nutrición parenteral total crónica o una ingesta dietética deficiente, podrían llevar a largo plazo y en condiciones fisiológicas, a una deficiencia de zinc en el organismo. Van Campen y House (1974), indicaron que una posible causa de la deficiencia de zinc es la deplección proteica o la ingesta de dietas bajas en proteínas.

Partiendo de que el zinc es un componente integral de varios metaloenzimas y de que puede activar a una gran variedad de enzimas, parece lógico afirmar que el síndrome de la deficiencia de zinc es debido a una disminución en la actividad de los enzimas que poseen zinc.

5.6.1.- Efectos del etanol sobre los niveles de zinc.

Otro factor que influye en el metabolismo del zinc es el alcoholismo. Así, McClain y Su (1983), demostraron que una ingesta excesiva de alcohol altera la absorción del zinc y aumenta su excreción por vía urinaria, pudiendo, por consiguiente, causar deficiencia en dicho elemento. Das y cols. (1984) observaron que el aclaramiento de alcohol en la sangre se alteraba en ratas sometidas a una deficiencia de zinc severa. Esto está relacionado con la disminución de actividad en la enzima Alcoholdehidrogenasa hepática (ADH) (enzima zinc-dependiente).

En los alcohólicos se observa frecuentemente hipozinquemia e hiperzincuria, pero hay controversias sobre si estos efectos son debidos al alcohol o si son secundarios a una enfermedad hepática severa puesto que, de un total de 42 sujetos alcohólicos estudiados sólo en tres se observó hipozinquemia mientras que en el grupo de alcohólicos que presentaban bajas incidencias de anomalías hepáticas, la disminución de los valores de zinc en suero no fue significativa (Helwig y cols., 1966; Lieber 1988).

Milne y cols. (1987), durante los estudios realizados a un grupo de mujeres postmenopausicas alcohólicas de 50-63 años, observaron que el zinc y la actividad de los enzimas del zinc en tejidos, pueden estar disminuidos antes de observarse cambios en los niveles circulantes del metal. Los índices funcionales de la bioquímica del zinc, como el metabolismo del etanol, pueden ser indicadores más sensibles de los niveles de zinc en el organismo, que el propio zinc circulante.

Zidenberg-Cherr (1988b) en estudios realizados en ratas en el día 14 de gestación, han confirmado la hipótesis de que el consumo de etanol durante la gestación produce una alteración en la transferencia materno-fetal del zinc y reduce el crecimiento fetal.

La cirrosis hepática cursa con una alteración en el metabolismo del zinc, presentándose un contenido bajo de zinc sérico y hepático e hiperzincuria. El alcohol también produce hipercinuria por si mismo por efecto directo sobre los túbulos renales. Se considera que algunas de las manifestaciones clínicas que se presentan en esta enfermedad, pueden estar relacionadas con un efecto secundario de la deficiencia de zinc (Prasad 1979; Sandstead y cols., 1979).

Sargent y cols. (1974) al estudiar los efectos de la administración aguda de etanol; no observaron modificaciones en la excreción de zinc en orina y en suero. Por el contrario, Hartoma y cols. (1977) encontraron que aumentaban los niveles de zinc en suero en alcohólicos con hígados normales o grasos. Mientras que pacientes con enfermedades hepáticas tales como cirrosis o hepatitis, tenían disminuidos los niveles de zinc en suero (Smith y cols., 1975; Hartoma y cols., 1977). Estos datos coinciden con los de Sullivan y cols. (1979) quienes hallaron que los niveles de zinc en suero de pacientes con cirrosis estaban disminuidos, y seguían presentando hiperzincuria a pesar de la administración de zinc.

Cuando se administra crónicamente etanol a las ratas controlando la cantidad de zinc en dietas líquidas, no se ve alteraciones en el zinc hepático total (Leo y cols., 1988) sin embargo la administración aguda de etanol aumenta el zinc en suero y la metalotionina hepática en ratones (Bracken y Klaassen 1987).

En sujetos alcohólicos con cirrosis hepática disminuyó la absorción de zinc, pero no en los individuos cirróticos no alcohólicos. La concentración hepática de zinc disminuyó en pacientes con enfermedad hepática por consumo de alcohol, al contrario de lo que sucede con los pacientes no alcohólicos con daño hepático (Kiilerich y cols., 1980).

En sujetos con cirrosis alcohólica con suplementos diarios de sulfato de zinc aumentó la respuesta al test de hipersensibilidad cutánea retardada, sugiriendo que la deficiencia de zinc puede, al menos parcialmente, ser responsable de disfunciones inmunológicas de la cirrosis alcohólica (Labadie y cols., 1986).

McClain y cols. (1986) han postulado, que la hipozinquemia que se produce por consumo de alcohol podría estar mediada por un aumento de interleukinas.

Antonson y cols. (1978), estudiaron en ratas adultas, los efectos agudos y crónicos de la ingesta de etanol sobre la absorción de zinc, para determinar si la malabsorción de zinc contribuía a las deficiencias observadas durante la ingesta crónica de etanol. Por ello determinaron la absorción de zinc mediante una perfusión "in vivo" en un segmento de 10 cm de duodeno y de íleon, en seis ratas que ingieren etanol durante un mes y en sus pair-fed controles. Los segmentos fueron perfundidos durante 2 horas en circuito cerrado y con una velocidad de 1 ml/min. con 20 ml de solución salina isotónica que contenía 200 µg de zinc. Estos autores hallaron que la ingesta crónica de etanol empeora la absorción de zinc en el íleon, mientras a nivel de duodeno permaneció

inalterada; no observando efectos sobre la absorción de zinc, entre las ratas que ingieren etanol crónicamente y las controles cuando se añadió a la perfusión un 3 % de etanol. Este estudio sugiere que la absorción de zinc alterada en el íleon puede contribuir a las deficiencias de zinc asociadas con la ingesta crónica de etanol.

5.6.2.- Efectos del etanol sobre los niveles de zinc y su repercusión en la gestación.

Estudios realizados en mujeres adultas que no estaban embarazadas, mostraron que después de la ingesta crónica de etanol los niveles de zinc en suero estaban disminuidos (Henderson y cols., 1980; Gordon y cols., 1981; Flynn y cols., 1981). Según Wilson y Hoyumpa (1979) la disminución de zinc en suero podía ser debida a una disminución en la absorción intestinal o a un aumento del zinc eliminado por orina o bien a ambas cosas.

El etanol puede ejercer un efecto específico sobre el sistema de transporte del zinc, o alternativamente inducir daños no específicos sobre las células de la mucosa; lo cual daría como resultado una disminución en la absorción de zinc (Wilson y Hoyumpa 1979).

El aumento en la pérdida urinaria puede deberse a un aumento en la cantidad de zinc en suero, un cambio en los ligandos de unión al zinc, o a un efecto sobre la reabsorción tubular renal (Zidenberg-Cherr y cols., 1988).

En el caso de mujeres embarazadas se ha observado que si el etanol se administra de forma crónica durante el embarazo, disminuye la utilización de determinados nutrientes, pudiendo contribuir estas deficiencias al retardo en el crecimiento, siendo éste uno de los caracteres del SAF, lo que evidencia que el alcohol ejerce efectos adversos sobre la regulación homeostática del zinc. En

1981 Flynn y cols. dedujeron la existencia de una relación inversa entre la concentración de zinc plasmático materno y la expresión del Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) en humanos.

Assadi y Ziai (1986) encontraron bajos niveles plasmáticos de zinc e hiperzincuria en niños afectados de dicho síndrome. También se sabía que una deficiencia de zinc en la madre puede causar un desarrollo anormal en el niño (Keen y Hurley 1987). Debido a las características similares entre el SAF y la teratogenicidad causada por la deficiencia de zinc, se ha sugerido que un mecanismo esencial del SAF es una deficiencia de zinc fetal etanol-inducida (Cavdar 1983; Zidenberg-Cherr y cols., 1988a).

Zidenberg-Cherr y cols. (1988), estudiaron el papel del zinc como nutriente sobre la teratogenicidad del etanol; debido a que existen alteraciones similares en el SAF y en casos de deficiencia de zinc. Para ello administraron a las ratas dietas líquidas que contenían zinc en las siguientes cantidades: 2 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$. Las ratas con dietas bajas en zinc disminuyeron su ingesta de comida durante los dos últimos días de gestación. La ingesta de zinc en la dieta líquida con bajo contenido del mineral (2 $\mu\text{g/ml}$ dieta) fue aproximadamente de 200 $\mu\text{g/día}$.

Rogers y cols. (1985), en estudios anteriores, concluyeron que había una reducción en el consumo de calorías en los tres últimos días de gestación. En este período, la permeabilidad de la placenta al zinc es máxima y los fetos acumulan este mineral rápidamente; siendo captado el 80 % del zinc total contenido en el feto.

Las investigaciones realizadas por Masters y cols. (1983) ponen de manifiesto que una cantidad alta de zinc pasa a los fetos durante los dos últimos días de gestación. Además, observaron que cuando se consumía etanol se originaba una disminución en el crecimiento fetal, siendo el efecto independiente de la ingesta dietaria de zinc consumido por la madre durante la gestación. Este efecto

del etanol sobre el crecimiento fetal coincide con los resultados aportados por otros autores (Ghisham y cols., 1982; Weinberg 1985; Fisher y cols., 1985; Zidenberg-Cherr y cols., 1988) y según habían demostrado previamente Hurley y cols. (1971), una fugaz disminución de zinc en el período crítico de desarrollo fetal puede inducir anomalías fetales, crecimiento retardado y malformaciones congénitas.

En la prole de madres que ingieren crónicamente grandes cantidades de etanol durante la gestación, es frecuente encontrar un crecimiento intrauterino retardado (Clarren y Smith 1978). En contraposición con el peso fetal, el peso de la placenta fue mayor en las crías de madres tratadas con etanol que en sus controles (Zidenberg-Cherr cols., 1988). Esto no lo pudieron explicar por un cambio en la retención de fluidos de la placenta porque el % de peso seco fue similar en ambos grupos.

Gordon y cols. (1981), previamente encontraron que el aumento de peso en la placenta en ratas tratadas con etanol, es debido a una hiperplasia y sugieren que esto puede ser un mecanismo compensatorio para mantener una función placentaria normal, o bien, atenuar alguno de los efectos adversos del etanol sobre la función placentaria.

Jones y cols. (1981), en un estudio de absorción "in vitro" de zinc, folato, glucosa y aminoácidos en ratas expuestas al etanol, dedujeron que el flujo de sangre en la placenta se reduce en las ratas que ingieren etanol antes y durante la gestación.

La ingesta aguda y crónica de etanol en ratas preñadas puede dar como resultado una reducción en el transporte de zinc a través de placenta y una disminución en los niveles de zinc fetales (Ghishan y cols., 1982; Suh y Firek 1982).

Ghishan y Greene (1983), en un estudio posterior encontraron que la suplementación con zinc en la dieta no corrige el defecto en el transporte placentario; sin embargo, los niveles empleados solo fueron ligeramente superior a los considerados adecuados para el óptimo crecimiento y desarrollo (Rogers y cols., 1985).

Estudios posteriores realizados en roedores, (Zidenberg-Cherr y cols., 1988), confirmaron que había una disminución en el transporte de zinc hacia el feto, cuando la madre ingería etanol, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Zidenberg-Cherr y cols. (1988), observaron que cuando las ratas ingieren una dieta con alto o bajo contenido en zinc se produce tanto en los fetos de madres tratadas con etanol, como en los de madres que no ingieren etanol, una menor calcificación de la columna vertebral y de las falanges, al compararlos con sus controles que no ingirieron etanol y tienen una dieta equilibrada en zinc; las falanges posteriores fueron las que se afectaron más severamente, posiblemente debido a que su osificación progresiva es más lenta que en las falanges anteriores. Cuestionándose si el retraso observado en la maduración del esqueleto podría ser superado durante el desarrollo postnatal; ya que este hecho sería una solución para corregir los defectos del esqueleto asociados al SAF y que persisten hasta la adolescencia.

El etanol administrado crónicamente durante el embarazo disminuye la utilización de aminoácidos sulfurados y de zinc, pudiendo esta deficiencia contribuir al retardo en el crecimiento fetal. Harris (1990) determinó si la administración crónica de etanol a las ratas preñadas altera las cantidades de glutatión, metalotioneína y zinc, en los tejidos de las madres y los fetos. Las ratas fueron alimentadas desde el día 5 al 19 de gestación con dieta control "ad libitum", etanol "ad libitum" y "pair-fed" controles.

En el día 19 de gestación la glutatión hepática disminuyó significativamente en los grupos tratados con etanol y en los pair-fed al compararlos con las madres controles. Los contenidos de metalotioneina hepática fueron similares en los grupos controles y tratados con etanol, siendo significativamente mayor en los pair-fed en comparación con los otros dos. Los tres grupos no difieren en cuanto al contenido de zinc hepático de las madres y de los fetos.

Keppen y Cannon (1990), estudiaron el efecto que ejercía el contenido de zinc de la dieta sobre la severidad del SAF; para ello, administraron una dieta líquida que contenía un 15 % de etanol, viendo el posible cambio en la ingesta de zinc sobre las crías. La mortalidad prenatal fue mayor cuando las madres consumían alcohol con una ingesta de zinc inadecuada, debido a que el etanol ejerce efectos adversos sobre la regulación homeostática del zinc y porque la deficiencia de zinc potencia las embriopatías del alcohol. A un grupo les administraron una suplementación de zinc cuatro veces superior a las recomendadas, comprobándose que no fueron protectoras y manifestaron tener un efecto adverso sobre el peso fetal y la mortalidad prenatal.

Estos resultados llevaron a sugerir, que la ingesta de zinc podría ser buena durante el embarazo, pero la suplementación por encima de las recomendaciones dietarias, no reducen la incidencia y severidad del SAF.

Los niveles de zinc consumidos por la madre en la dieta, no están influidos por los niveles de etanol en sangre. La concentración de zinc en plasma, refleja la ingesta de zinc materna, no encontrándose efectos del consumo de etanol; aunque en las madres que ingieren dietas con alto contenido en zinc, el consumo de etanol tiende a disminuir las concentraciones de zinc en plasma (Zidenberg-Cherr y cols., 1988).

Beer y cols. (1992), estudiaron el transporte normal de zinc en la placenta humana y el efecto del etanol sobre estos procesos; observando que el zinc es transferido lentamente a la placenta por difusión simple. La transferencia es bidireccional y nunca se produce en contra de gradiente.

Los ligandos de unión, influyen en la captación de zinc por la placenta, sin embargo un aumento de los ligandos de zinc, no aumenta el gradiente hacia el compartimento fetal; siendo la transferencia normal de zinc lenta, bidireccional y dependiente de los ligandos de unión.

Taubeneck y cols. (1994), estudiaron la deficiencia de zinc embrio/fetal (en el día 12 de gestación), secundaria a los cambios inducidos en el metabolismo de zinc materno debidos al consumo de etanol. La retención de zinc hepático en la madre fue mayor, debido a una reducción en la ingesta de pienso; mientras la distribución de zinc a los fetos disminuyó. Estos resultados soportan la hipótesis de que se puede producir un desarrollo embriotóxico, debido a una alteración materna en el metabolismo del zinc.

5.7.- Metaloenzima dependiente de zinc: Alcoholdehidrogenasa.

El mecanismo específico por el que el feto metaboliza el etanol, aún no se conoce. La enzima Alcoholdehidrogenasa (ADH), es una metaloenzima dependiente de zinc que interviene en el metabolismo del etanol, convirtiendo el etanol en acetaldehído (Lieber 1977). La deficiencia de zinc disminuye la actividad de la ADH y de este modo retarda la eliminación del etanol (través y Lopez-Tejero 1993).

Las diferentes condiciones generales que se utilizan para cuantificar la actividad de la ADH: pH, temperatura y concentración de sustrato, así como el modelo de alcoholización crónica, pueden

originar controversia en los resultados (Koivula y Lindros 1975; Guerri y Grisolia 1982; Messiha y Varma 1983; Rechamin y cols., 1985; Card y Brien 1989).

Través y López-Tejero (1993), estudiaron la actividad específica de la ADH en el estómago y en el hígado, observando que la ADH gástrica fue mayor que la hepática tanto en ratas preñadas como en ratas vírgenes. Sin embargo, no se detectó actividad ADH en el hígado del feto hasta los 20 días, no apareciendo dicha actividad en el estómago. La ingesta de alcohol disminuye la actividad específica de la ADH en el hígado en las ratas que ingieren alcohol respecto a las controles, encontrándose una disminución significativa en la ADH de las ratas preñadas que ingieren alcohol respecto a las vírgenes. Por el contrario la actividad de la ADH aumenta en el estómago de las que ingieren etanol respecto a las controles; todos estos experimentos se realizaron a pH 8.8. Cuando el pH utilizado fue de 7.5, las diferencias entre la ADH gástrica y hepática disminuyeron (Barona y cols., 1987).

En diferentes modelos de hígado y estómago, especialmente en animales preñados se ha encontrado una disminución en la actividad de ADH en hígado y un aumento en estómago (Koivula y Lindros 1975; Guerri y Grisolia 1982; Zorzano y cols., 1989).

Una ingesta crónica de etanol aunque no esté asociada con malnutrición (Card y Brien, 1989; Boleda y cols., 1992; Través y cols., 1993), puede dar cambios en la actividad de la ADH.

Como la actividad de ADH en tejidos fetales es baja en hígado y/o ausente en estómago (Sjöblom y cols., 1978; Sanchis y Guerri 1986), la desintoxicación del etanol en los embriones en desarrollo, puede depender de los enzimas del hígado materno o de otros sistemas enzimáticos; lo cual fue descrito por Lieber y DeCarli (1970), aportando otro camino para la metabolización del

etanol: el Sistema Microsomal Oxidativo (MEOS), capaz de oxidar el etanol en presencia de NADPH y oxígeno. La actividad de MEOS se incrementa después del consumo crónico de etanol.

Cunningham y cols. (1989), describieron una baja actividad del MEOS, tanto en ratas controles como en las tratadas con etanol (6 y 9 nmol de etanol /min/mg proteína microsomal, respectivamente). Esto también ha sido descrito por otros autores (Johansson y cols., 1988; Adachi y cols., 1991). Usando los datos sobre la actividad de ADH y MEOS encontrados por Cunningham y cols. (1989) y Través y López-Tejero (1993), se puede asumir que la oxidación microsomal del etanol representa el 4 % de la actividad de la ADH en ratas vírgenes.

Través y López-Tejero (1993), en el estudio realizado sobre la eliminación de etanol en ratas preñadas, sugirieron que en las ratas el primer paso para metabolizar el etanol no depende exclusivamente de la actividad de la ADH gástrica, sino que tal vez intervienen una serie de factores físicos y químicos, los cuales pueden ser alterados durante la gestación y/o alcoholismo crónico.

El desarrollo de una tolerancia metabólica a la ingesta de etanol, así como un aumento en la eliminación del mismo han sido aportado en distintos estudios realizados en humanos y en animales (Israel y cols., 1979; Tabakoff 1980; Britton y cols., 1984; Lindros y cols., 1984; Wilson y cols., 1984; Sancho-Tello y cols., 1988). Los resultados de estos estudios mostraron, que la tasa de eliminación después de una administración intragástrica e intraperitoneal, es mayor en el grupo de los alcohólicos.

Cuando se expresa la eliminación de etanol por peso corporal, así como por tasa metabólica, la tolerancia al etanol se mostró solo en las ratas no preñadas tratadas con etanol, independientemente de la vía de administración aguda de etanol. En el cálculo de la tasa metabólica, fue necesario determinar el volumen teórico de etanol distribuido por el cuerpo. En las ratas

preñadas tratadas con etanol, no se encontró tolerancia aunque la baja extensión en la distribución del etanol (en los animales preñados la distribución del volumen teórico de etanol es un 40 % menor que en otros grupos), podría enmascarar la verdadera tolerancia en los animales preñados tratados (Través y Lopez-Tejero 1993).

6.- ACIDO FOLICO.

6.1.- Bioquímica y funciones metabólicas.

Todas las células del organismo deben su supervivencia, la posibilidad de diferenciarse y de cumplir sus funciones específicas, al aporte continuo de folatos exógenos (Periti 1983); puesto que son necesarios para el metabolismo intracelular de purina, pirimidina, síntesis de ADN y replicación celular (Blakely 1969; Chanarin 1979).

La fórmula estructural del ácido fólico conocido también como ácido pteroilglutámico (PteGlu₁) se presenta en la figura 3. Las partes más importantes de la molécula son un ciclo pteridina unido por un puente metileno al ácido paraaminobenzoico, que a su vez está unido mediante un enlace amida al ácido glutámico. Si bien, el ácido pteroilglutámico es la forma farmacéutica común del ácido fólico, no es el principal congénere del folato en los alimentos, ni la coenzima activa en el metabolismo intracelular. Después de su absorción, el PteGlu₁ es reducido rápidamente en las posiciones 5,6,7 y 8 a ácido tetrahidrofólico (H₄PteGlu₁), que actuará como aceptor de diversas unidades con un solo carbono. Estas unidades se fijan en las posiciones 5 ó 10 del ciclo pteridina o forman un puente entre estos átomos dando origen a un nuevo ciclo de cinco miembros. Las formas más importantes de la coenzima sintetizada de este modo se muestra en la fig. 3. Cada una desempeña una función específica en el metabolismo intracelular, que puede resumirse como sigue (Fig. 4):

1.- *Conversión de homocisteína en metionina.* Esta reacción requiere metiltetrahidrofolato (CH₃H₄PteGlu) como dador de metilo y emplea vitamina B₁₂ como cofactor.

2.- *Formación de glicina a partir de serina.* Esta reacción requiere tetrahidrofolato como aceptor de un grupo metileno de la serina y utiliza fosfato de piridoxal como cofactor. Se forma 5,10-metilentetrahidrofolato ($5,10\text{-CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$), un coenzima esencial para la síntesis de timidilato.

3.- *Síntesis de timidilato.* El $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}$ dona un grupo metilo al desoxiuridilato para la síntesis de timidilato, un paso limitante en la síntesis del DNA.

4.- *Metabolismo de la histidina.* El $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}$ también actúa como aceptor de un grupo formimino en la conversión de ácido formiminoglutámico en ácido glutámico.

5.- *Síntesis de purinas.* Dos pasos de la síntesis de los nucleótidos de purina requieren la participación de derivados del ácido fólico. El glicinamida ribonucleótido es formilado por el $5,10\text{-CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ y el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido, por el 10-formiltetrahidrofolato ($10\text{-CHOH}_4\text{PteGlu}$). Mediante estas reacciones, los átomos de carbono en las posiciones 8 y 2, respectivamente, son incorporados al ciclo de purina en formación.

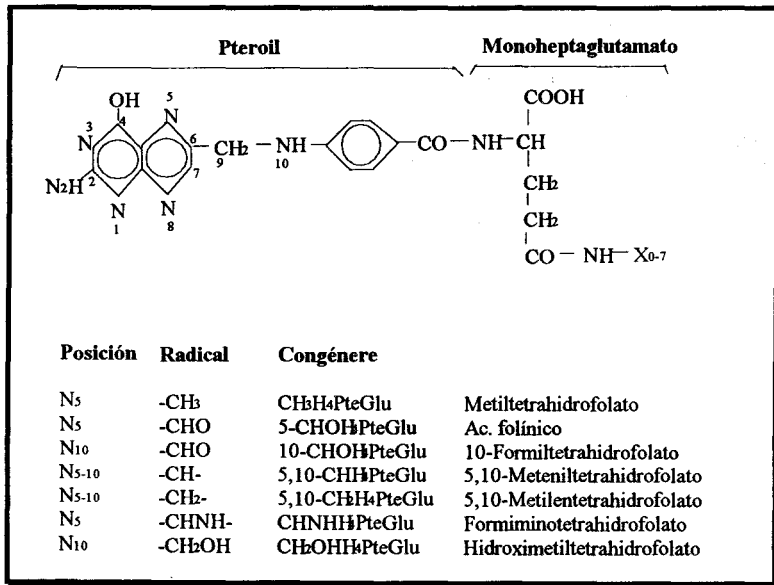


Fig. 3.- Estructuras y nomenclatura del ácido pteroilglutámico (ácido fólico) y sus congéneres.

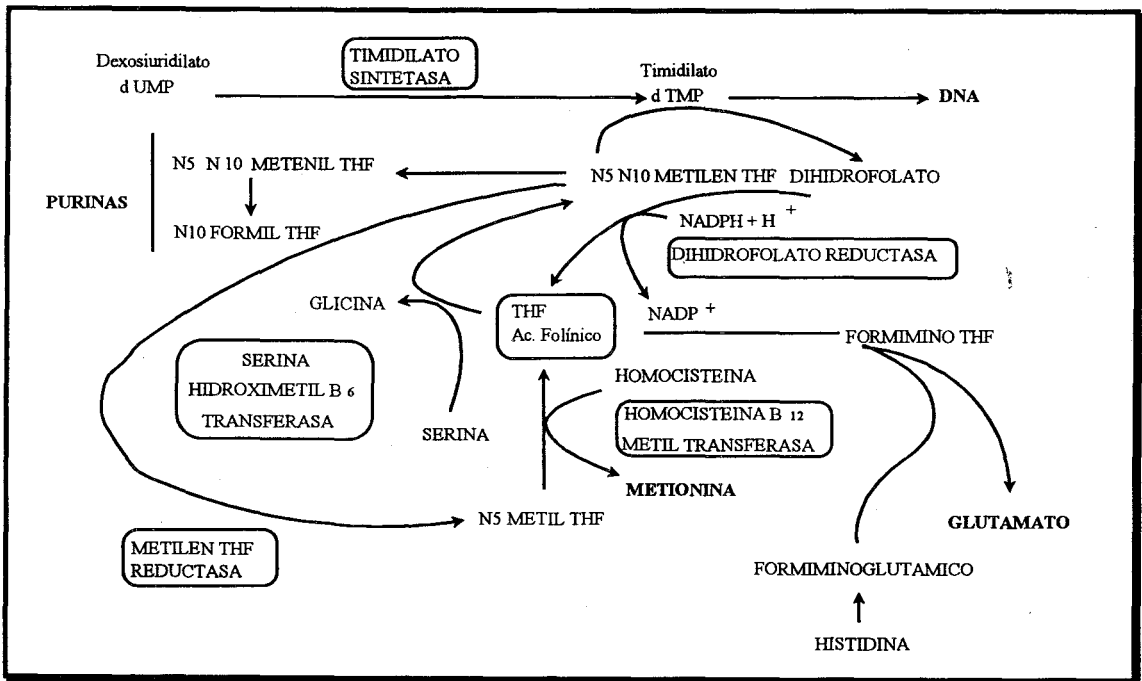


Fig. 4.- Funciones metabólicas de los folatos.

6.2.- Requerimientos.

Prácticamente todos los alimentos son ricos en folatos, en especial los vegetales frescos, hígado, levadura y algunas frutas. Sin embargo, la cocción prolongada destruye el 90% del contenido de folatos de esos alimentos (Herbert 1973).

Los folatos gobiernan la síntesis de los precursores del ADN-ácidos nucleicos, por ello las necesidades de folatos del organismo están relacionadas con la reproducción celular que tiene lugar en cada momento.

Los requerimientos mínimos diarios en adultos son 50-100 μg , que son proporcionados por el folato de la dieta en forma de metiltetrahidrofolato y otros poliglutamatos. La mujer gestante o en período de lactancia y pacientes con alto índice de renovación celular (ej: pacientes con anemia hemolítica), pueden requerir 100-200 μg o más por día. Durante la gestación, el crecimiento tisular incrementa enormemente. En nueve meses, un embrión de dos células se transforma en un feto de dos billones de células, hay una rápida proliferación de diversos tejidos maternos, incluyendo el músculo uterino y el sistema hematopoyético, así como el tejido placentario y fetal. En consecuencia, las demandas de folatos son excepcionales durante el embarazo (Hibbard 1964).

6.3.- Absorción intestinal.

La absorción de los folatos tiene lugar, fundamentalmente a nivel del intestino delgado proximal -yeyunal- según un mecanismo de transporte activo y por lo tanto, incluso contra gradiente de concentración, existiendo también difusión pasiva, que predomina a altas concentraciones (dosis

farmacológicas). La absorción puede verse afectada por la acción de algunos medicamentos y por patologías en el tubo digestivo.

En el transcurso de la absorción de los folatos, interviene en primer lugar la enzima folato conjugasa que se encuentra presente en plasma y en la mayoría de los tejidos del organismo, existiendo en grandes concentraciones en la luz intestinal y, sobre todo, en la superficie de la mucosa yeyunal; esta enzima es pH dependiente y presenta su máxima actividad a pH ácido. Su acción consiste en hidrolizar y transformar en formas más sencillas (monoglutamatos) del 50 al 60 % de los folatos alimentarios. El siguiente paso es la reducción por la enzima folato-reductasa de los monoglutamatos absorbidos, dando lugar al ácidodihidrofólico (DHF) el cual, posteriormente por intervención de la dihidrofolato reductasa, es convertido en ácido tetrahidrofólico (THF). Estas enzimas pueden verse alteradas en determinadas enfermedades o por el consumo de fármacos.

6.3.1.- Mecanismos de transporte.

El transporte por difusión pasiva es semejante en todo el intestino, no es saturable, ni pH dependiente; su magnitud puede variar hasta cuatro veces de una persona a otra (Zettner y cols., 1981).

El transporte de folatos es máximo en yeyuno, tanto en hombre como en ratas y en el íleon es del orden de 5 a 10 veces menor (Said y cols., 1987); sin embargo, los cerdos tienen un transporte semejante en yeyuno e íleon (Reisenauer y cols., 1989).

En 1988 Said comprobó que en el íleon de ratas, el transporte de ácido fólico no se afectó por inhibidores del transporte o por la presencia de 5-MTHF, lo que indica que se realiza por un mecanismo pasivo o poco saturable. En cambio en ratas con el yeyuno resecaado, el transporte de

ácido fólico en íleon podía ser inhibido y era saturable; por todo esto Said concluyó que el transporte en íleon en estas circunstancias era semejante al del yeyuno, debido a un mecanismo de adaptación intestinal.

Reisenauer y cols. (1986), anteriormente, habían encontrado una adaptación semejante en la conjugasa que hidroliza los glutamatos en íleon. Debido a estos mecanismos apenas se produce disminución en la biodisponibilidad de folatos en las ratas resecaadas o sometidas a un by-pass intestinal.

Este mismo grupo detectó otro sistema de transporte activo que era saturable, formaba parte de los sistemas de proteínas-ligando del folato y existía a lo largo de todo el intestino delgado. La constante de afinidad de esta proteína por el folato era de 80 nM, y esta afinidad era mayor para el ácido fólico que para 5MTHF, y aumentaba por la presencia de Zn, Mg ó Mn.

Posteriormente Reisenauer (1990), constató que una proteína-ligando también estaba presente en cerdos.

Cuando los valores de pH están alejados del óptimo, cercano a 6, la absorción es similar en todo el intestino y cursa mayoritariamente por difusión facilitada, y si se tiene un pH óptimo cercano a 6, al alejarse de este valor se pierde su eficacia. Esto fue comprobado por Zimmerman en 1990 quien estudió el transporte de ácido fólico a pH 7,5, observando que es semejante en yeyuno y en ciego y no era transportado en contra de gradiente. En cambio si disminuimos el pH hasta 5.5 si existen diferencias entre las dos porciones del intestino, en el yeyuno se producía el transporte en contra de gradiente mientras que en el ciego no.

Estas diferencias entre intestino delgado y grueso ya las habían observado anteriormente Strugala y cols. (1985), cuando verificaron que el flujo neto de folato era de mucosa a serosa en duodeno, yeyuno e íleon, en cambio en el colon apenas existía diferencia entre los flujos netos del folato de mucosa a serosa y serosa a mucosa.

En lo que se refiere al transporte de los distintos compuestos relacionados de folato: ácido fólico, 5-metilTHF y 10-formilTHF, no se han encontrado diferencias significativas en su transporte intestinal a largo plazo (Bhandari y Gregory 1992). Además Selhub y cols. (1984) comprobaron tanto "in vivo" como "in vitro" que el ácido fólico, 5-metilTHF y metotrexato inhibían entre ellos sus transportes cuando se encontraban simultáneamente en el intestino y más recientemente Schron y cols. (1988), han verificado esta inhibición competitiva entre ácido fólico, 5-metilTHF, 5-formilTHF y metotrexato, lo que indicaría que utilizan un mismo transportador.

Los estudios realizados en intestino sugieren la existencia de un único sistema de transporte activo para el pteroilglutamato y sus análogos reducidos o sustituidos (Bhandari y Gregory 1992). Para este sistema sería necesario el anillo de pteridina, el paraaminobenzoico y al menos un glutamato, pero no se transportaría ni el ácido pterico, ni la tetrahidrobiopterina, una pteridina natural que carece de p-aminobenzoilglutamato sin significado para el intestino.

El folato para poder alcanzar el torrente circulatorio desde el lumen intestinal debe atravesar la membrana de borde en cepillo y la membrana basolateral del enterocito, y parece ser que el mecanismo de transporte en ambas membranas es semejante. El transporte a través de la membrana de borde en cepillo (BBM) ha sido el más estudiado hasta ahora (Said y cols., 1987).

Parece ser que el transporte activo de folatos es un mecanismo dependiente del pH del medio, y hasta hace poco se creía que el transporte se afectaba directamente por la concentración de Na^+ existente en el medio (Eilam y cols., 1981). Pero Zimmerman y cols. (1986), demostraron lo erróneo de esta hipótesis, aunque posteriormente Said y cols. (1987) sugirieron una posible influencia indirecta del Na^+ por modificación del pH del medio.

El pH del interior del lumen 6.5-7 no es el ideal para el transporte de folatos, pero en el hombre y en la rata en las proximidades de la membrana de borde en cepillo existe un microclima ácido con un pH cercano a 5.5, que es el óptimo para el transporte. Said y cols. (1984a) trabajando con ratas "in vivo" observaron que el pH óptimo del transporte de 5-metilTHF era de 6-6.3 y Selhub y cols. (1984) trabajando con sacos evertidos de rata, obtuvieron un pH óptimo de 6; en cambio en vesículas de membrana del borde en cepillo de rata era de 5-5.5 (Gregory 1989). Estas diferencias entre vesículas e intestino intacto refleja el papel de la capa inmóvil en controlar el pH en la proximidad de la superficie intestinal. Este microclima ácido ya existe desde la lactancia.

Eilam y cols. (1981), comprobaron que el ácido fólico se acumulaba en las células epiteliales hasta 3 ó 4 veces del nivel de equilibrio, y que la inhibición del metabolismo aeróbico producía una disminución en la acumulación tisular del folato y en la transferencia desde la mucosa a la capa serosa; basándose en los estudios previos de Blair y Matty 1974, sugirieron que este efecto se producía no directamente sobre el transporte de la molécula de ácido fólico, sino indirectamente a través de la interferencia con el mecanismo responsable del mantenimiento del microclima ácido en la proximidad de la mucosa.

Posteriormente, Selhub y cols. (1984) detectaron también un efecto semejante, producido por los inhibidores metabólicos, en el transporte de 5-metilTHF. En este trabajo, Selhub postuló un mecanismo de transporte con una cinética de dos etapas: una rápida, durante la cual se producía la

unión de la molécula de folato a una proteína de membrana; y otra lenta, durante la cual transcurriría el transporte.

Zimmerman y cols. (1986), sugirieron que el transporte de folato ocurría por un mecanismo que implicaba a una especie de folato cargada negativamente y a un catión, y las características de permeabilidad de ese catión afectaban al transporte.

Said y cols. (1987), utilizando vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) de seres humanos sugirieron que el efecto producido por el pH sobre el transporte de folato podía ser debido bien a un efecto directo en el transportador (cambiando su estado de ionización), pues este transporte existía en ausencia de gradiente de pH y era mayor a pH 5 que a pH 7, o bien, debido a la existencia de un intercambiador folato/OH⁻ ó folato/H⁺

Schron y cols. (1988), comprobaron que un mecanismo de intercambio folato/OH⁻ yeyunal mediaba el transporte de salida y entrada de ácido fólico del enterocito, y sugirió que este mismo mecanismo era responsable del transporte de metilTHF y formilTHF. Trabajando con BBMV de conejo observaron que en presencia de gradiente de pH, los folatos se transportaban en su mayoría por un mecanismo sensible al ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónicoestilbeno-sal disódica (DIDS), inhibidor del transporte de aniones, y que el pequeño porcentaje de transporte insensible a DIDS podía ser un mecanismo de transporte pasivo.

Más recientemente, Schron (1991) trabajando también con BBMV de conejos, observó una serie de fenómenos, que le llevaron a postular un modelo de mecanismo de transporte de folatos, en el que era necesario un gradiente de OH⁻ hacia fuera del enterocito, para acumular folatos en contra de gradiente. Determinó el pH dentro y fuera de la vesícula (BBMV) siendo los valores

aproximados de 6.5 y 5.5 respectivamente y en estas condiciones el folato se encuentra como anión, existiendo un intercambio folato/OH.

Para Schron un mecanismo que conste de intercambio de folato/OH puede explicar los efectos del pH en el transporte, además los datos obtenidos por este autor excluyen una posible competencia entre el OH y el folato por un mismo sitio de unión al transportador y añade argumentos para un transporte electroneutral de folatos a través de la membrana de borde en cepillo.

La mayoría de los investigadores llegan a la conclusión de asignar un valor aproximado de 5 μ M, para la Km del transporte activo de folatos en la membrana de borde en cepillo, en ratas y en el hombre. A concentraciones por debajo de esta Km, el transporte saturable predomina sobre la difusión pasiva (Bhandari y Gregory 1992).

Blakeborough y Salter (1988) encontraron valores de Km más elevados en cabras recién nacidas, para el 5-metilTHF que para el ácido fólico. Asimismo observaron que, incluso a valores de concentración por debajo del valor de saturación, el transporte seguía una cinética de saturación con el tiempo, registrándose dos fases en la representación transporte/tiempo, una rápida y lineal en los primeros 2 a 5 minutos, y un estado estacionario desde los 10 a los 30 minutos.

Una vez que el folato ha atravesado la membrana de borde en cepillo y está dentro del enterocito, pueden ocurrir dos fenómenos distintos, dependiendo del compuesto de folato (Fig. 5), así el 5-metilTHF será transportado intacto por la membrana basolateral y el ácido fólico puede transportarse por la membrana basolateral directamente, o sufrir una reducción y metilación a 5MTHF y entonces transportarse.

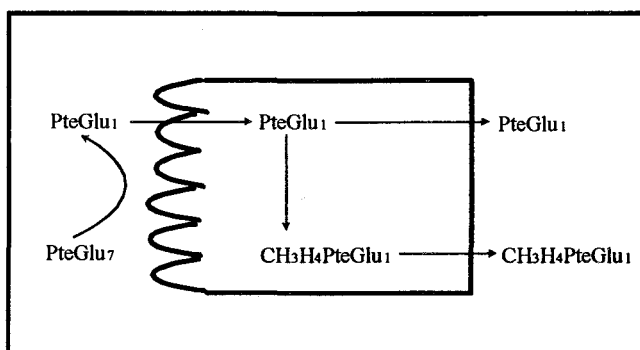


Fig. 5.- *Transporte y reducción intestinal del ácido fólico.*

El transporte de folatos a través de la membrana basolateral fue estudiado por Said y Redha (1987) y observaron que es saturable con un valor aproximado de K_m de $0.6 \mu M$, es decir nueve veces menor que la K_m del transporte por la membrana de borde en cepillo; es inhibido por inhibidores de transporte de aniones (DIDS) y es electroneutral.

Estas características les llevaron a la conclusión de que el mecanismo de transporte por la membrana basolateral era semejante al que sucede en la otra membrana del enterocito (BBM).

En neonatos se ha descubierto otro tipo de transporte intestinal de folatos, distinto a los anteriores y que está mediado por endocitosis. Las reservas de folatos en el neonato son limitadas y dependen mucho del aporte materno, además las funciones absorbivas están inmaduras en el neonato, aunque existen mecanismos que lo compensan; la absorción de 5MTHF está fuertemente favorecida por proteínas-ligando de folato existentes en la leche y Salter y Blakeborough (1988), han

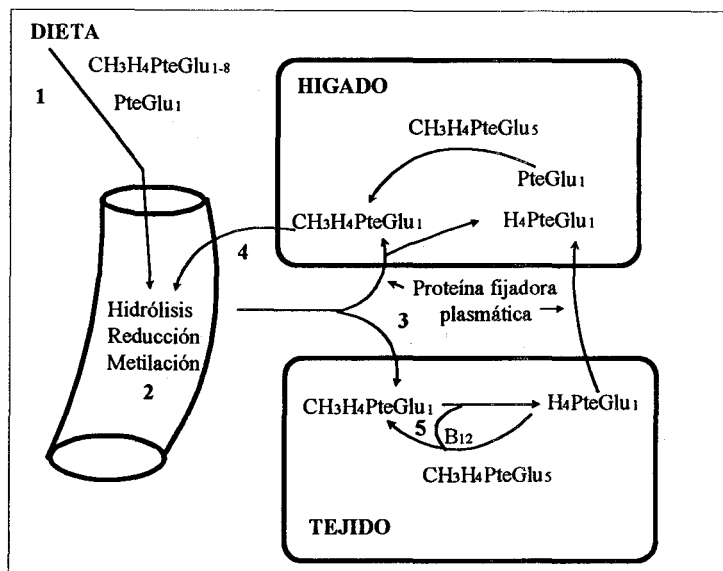
comprobado que estas proteínas aumentan la proporción inicial y la cantidad total del transporte intestinal de folato.

Estos investigadores han propuesto, que el mecanismo de absorción en neonatos es semejante al de los adultos y las proteínas-ligando actuarían secuestrando los folatos en el lumen y presentándolos a la mucosa para ser transportados. La liberación del folato del complejo es favorecida por el microclima ácido adyacente a la mucosa, ya que en el lumen debido al pH más elevado, el folato está fuertemente ligado a la proteína (Salter y Blakeborough 1988).

En la leche de mamíferos los folatos se encuentran unidos a proteínas de un 60 al 100 % y se ha demostrado que esta unión proteína-folato apenas se disocia a su paso por el estómago. Al parecer las proteínas-ligando de la leche podrían defender al folato de una posible degradación por las bacterias intestinales. El posible mecanismo por el que se absorbería el folato, en estas condiciones, implicaría que este complejo folato-proteína fuera absorbido de forma intacta en el íleon por endocitosis, y su lisis en el enterocito liberara el folato libre a la circulación sanguínea (Mason y Selhub 1988; Henderson 1990). Después del destete esta endocitosis dejaría de actuar. En la rata neonata, la absorción del complejo folato-proteína ocurre con mayor avidez en íleon, ya que la endocitosis en los neonatos es mucho mayor en íleon que en yeyuno (Tani y cols., 1983; Mason y Selhub 1988).

6.3.2.- Factores que alteran los niveles de folatos.

El diagnóstico y el manejo de las deficiencias de ácido fólico dependen del conocimiento de las vías de transporte y del metabolismo intracelular de la vitamina (Fig. 6).



Durante el transporte gastrointestinal, las fuentes dietéticas de poliglutamatos del folato son hidrolizadas a monoglutamato, reducidas y metiladas, dando $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$. En general, la deficiencia de folato se debe a 1) provisión inadecuada de la dieta y 2) enfermedad del intestino delgado.

En pacientes con uremia, alcoholismo o hepatopatías pueden existir defectos en 3) la concentración plasmática de proteínas fijadoras de folato y 4) el flujo de $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ en la bilis para su reabsorción y transporte a los tejidos (ciclo enterohepático del folato). Finalmente, 5) la deficiencia de vitamina B_{12} , "atrapará" el folato como $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$, reduciendo en consecuencia la disponibilidad de $\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ para la síntesis de purinas y pirimidinas que es su función esencial.

Fig. 6.- Absorción y distribución de los derivados del folato.

Las causas del déficit de folato según Ricomena y cols. (1986) se puede resumir según la tabla I:

Tabla I: Causas del déficit de folatos.

1.- Aumento de las necesidades

- *Fisiológico*
 - Embarazo
 - Lactancia
 - Infancia y adolescencia

- *Patológico*
 - Enfermedades hematológicas
 - Enfermedades neoplásicas
 - Cuadros inflamatorios crónicos
 - Enfermedades metabólicas

2.- Aporte dietético inadecuado

- *Dieta pobre*
- *Exceso de cocción en los alimentos*
- *Alcoholismo*
- *Náuseas y vómitos*

3.- Absorción defectuosa

- *Enteropatías*
 - Resección intestinal
 - Esteatorrea
 - Esprue tropical
 - Enfermedad celíaca
 - Enfermedad intestinal intrínseca

- *Inhibición de las conjugasas intestinales*
 - Anticonceptivos orales
 - Anticonvulsivantes
 - Otros fármacos antifólicos

- *Alcoholismo*

4.- Aumento de las pérdidas

- *Diálisis peritoneal*
- *Hemodiálisis*
- *Exceso de excreción por vía renal*

5.- Utilización deficiente

- *Déficit inducido por fármacos antagonistas del ácido fólico*
 - Metotrexato
 - Aminopterina
 - Trimterene
 - Trimetoprim (etc.)

- *Trastornos enzimáticos*
 - Hepatopatías
 - Alcoholismo

6.- Condiciones experimentales

- *Flujo de la perfusión*
 - *Temperatura*
 - *Inhibidores*
 - *Oxido nitroso*
 - *Fármacos*
-

6.4.- Deficiencias de folatos.

6.4.1.- Folatos y embarazo.

El déficit de folatos se manifiesta frecuentemente en determinados grupos de población, como son las mujeres embarazadas, las que toman anticonceptivos orales, los ancianos y los alcohólicos.

Durante la gestación el feto agota los folatos de la circulación materna para satisfacer sus propias necesidades metabólicas lo que hace que las mujeres embarazadas tengan un alto riesgo de ser deficitarias en folatos.

El diagnóstico de la deficiencia de folato es más difícil en las mujeres embarazadas que en otros individuos y los resultados son a menudo equívocos. Aunque este déficit durante la gestación se debe, en su mayor parte, a las demandas cada vez mayores del feto y al aporte inadecuado de folatos a través de la dieta, también contribuyen factores externos, tales como el alcohol y la terapia con fármacos antifólicos (hidantoínas, trimetopím, consumo previo de anticonceptivos orales, etc.).

Por otra parte, no todos los casos de déficit de folatos van a dar como primer síntoma una alteración megaloblástica periférica, sino que en principio se producirán cambios megaloblásticos medulares (únicamente objetivables por medio de una punción de la médula ósea), y dichos cambios generalmente no se aprecian hasta bien avanzado el parto, los casos asintomáticos a menudo pasan inadvertidos durante la gestación. A pesar de los medios que existen para prevenir las alteraciones asociadas al déficit de folatos, éste sigue siendo uno de los déficits nutricionales más comunes.

Teniendo en cuenta el papel fundamental de los folatos en la replicación y supervivencia celular, es muy importante destacar que el déficit durante la gestación, está relacionado con ciertas complicaciones, entre las que se encuentran "abruptio placentae", crecimiento intrauterino retardado, fetos prematuros, recién nacidos de bajo peso y malformaciones congénitas, incluyendo los defectos del tubo neural.

6.4.1.1.- Metabolismo de los folatos durante el embarazo (Fig. 7).

Durante la gestación, hay una disminución de los niveles séricos de folatos, incluso cuando la ingesta de estos nutrientes a través de la dieta es buena. Este descenso se produce como consecuencia de varios factores (Shojania, 1984)(Tabla II):

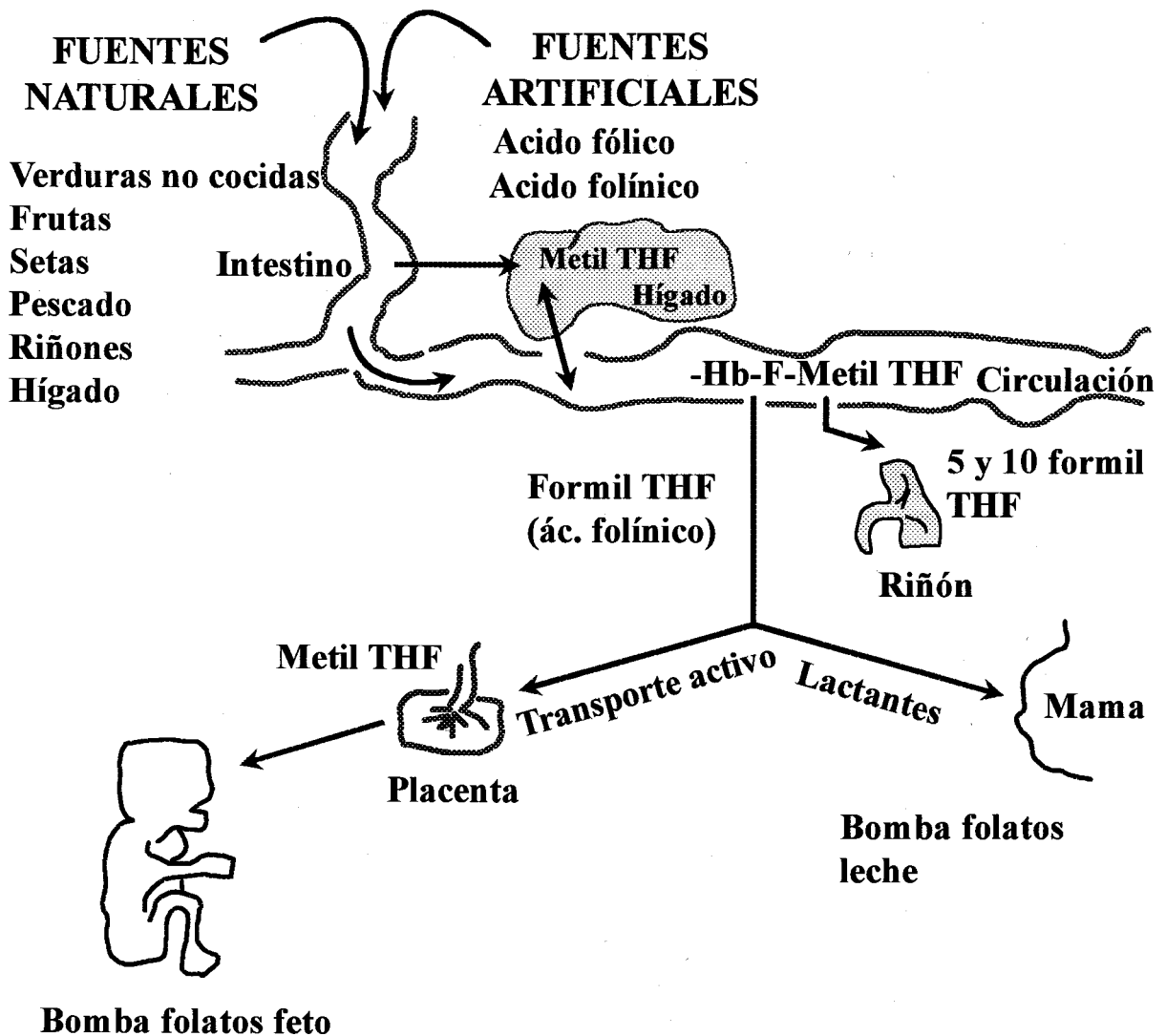
Tabla II. *Factores metabólicos que contribuyen al déficit de folatos en el embarazo.*

- Incremento del aclaramiento plasmático de los folatos.
- Exceso de excreción urinaria de los folatos.
- Transferencia de folatos al feto.
- Hemodilución.
- Efectos hormonales.

También existe un descenso concomitante de folatos eritrocitarios en el embarazo, aunque la depleción no es tan pronunciada como en el caso de los folatos séricos.

Como los folatos que penetran en la circulación fetal no pueden volver a la circulación materna, se produce un acúmulo de folatos a nivel placentario. Además los folatos se excretan por la

Fig. 7.- METABOLISMO DE LOS FOLATOS DURANTE EL EMBARAZO.



leche materna (Quist y cols., 1986), lo cual influye negativamente sobre la folatemia sérica de la madre durante el postparto.

6.4.1.2.- Causas del déficit de folatos.

Por todo lo citado anteriormente (Tabla II), el embarazo constituye la condición fisiológica en la que se instaura más fácilmente una carencia de folatos, siendo ésta más notoria conforme avanza la gestación.

El déficit se puede presentar como consecuencia de una amplia variedad de factores, que por separado o en conjunto, puede desencadenar el estado deficitario. Pero fundamentalmente los déficits se deben a:

- a) *Un aumento de las necesidades.*
- b) *Una ingesta inadecuada.*
- c) *Una absorción defectuosa.*

a) Aumento de las necesidades.

La gestación es un estado fisiológico en el que las necesidades de folatos aumentan de forma considerable (Bolis y cols., 1985a; 1985b; Botella LLusia 1986; Montoneri y cols., 1988), fundamentalmente por la rápida proliferación celular del trofoblasto, del embrión, del feto, del útero y del tejido hematopoyético (Fig. 8). Es importante destacar que los tejidos embrionarios, en general, y el trofoblasto en particular, con una proliferación muy activa, pueden afectarse por el déficit de folatos más precozmente y más intensamente que el tejido hematopoyético (Bolis y cols., 1985b).

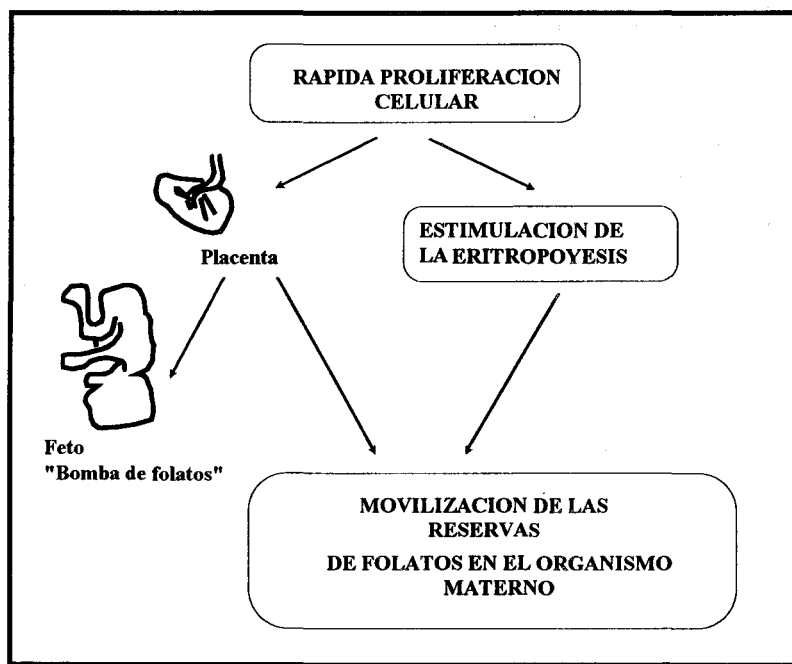


Fig.8.- Principales causas que conducen a un aumento de las necesidades de folatos en la embarazada.

El embarazo representa para la madre un incremento de las necesidades de folatos al producirse una estimulación de la eritropoyesis (Bolis y cols., 1985a).

El feto para su correcto desarrollo necesita los folatos maternos, y se comporta en relación con la madre como un "parásito privilegiado" (Ek 1980; Bolis y cols., 1985a). El paso de los folatos a través de la placenta se realiza mediante un mecanismo de transporte activo, comportándose el feto como una verdadera bomba de folatos. La placenta desempeña un papel de reservorio de folatos, capaz de proteger parcialmente al feto de una deficiencia grave.

A nivel del cordón umbilical, la concentración de folatos es tres veces superior a la presente en la sangre materna, los índices son aún más altos en el recién nacido (concentraciones séricas 6 a 8 veces superiores) y eritrocitarias (2 veces superiores respecto a sus madres), para luego disminuir progresivamente en el primer año de vida (Ek 1980; Holmy cols., 1980; Baker y cols., 1981; Bolis y cols., 1985a; Botella LLusia 1986; Moggian y cols., 1986); este hecho confirma la gran transferencia de folatos que tiene lugar de la madre hacia el feto.

Es importante señalar que en el curso del embarazo se produce un déficit de folatos, que aumenta progresivamente con una rápida movilización de las reservas, siendo indispensable administrar un suplemento de folatos, lo que es particularmente destacable en los casos de (Bolis y cols., 1985a; Moggian y cols., 1986; Gonzalez de Agüero y cols., 1990):

- Gestaciones múltiples
- Gestaciones muy seguidas
- Adolescentes embarazadas
- Anemia con déficit de hierro
- Anemia hemolítica crónica
- Enfermedades neoplásicas
- Cuadros inflamatorios crónicos
- La lactancia

b) Aporte dietético inadecuado

La alimentación de la madre durante el embarazo es uno de los factores extrínsecos que tiene mayor influencia sobre el crecimiento y desarrollo del feto (González de Agüero y cols., 1990). Existe una dependencia del aporte exógeno de folatos (a través de la dieta), ya que el organismo es incapaz de sintetizarlos.

Una dieta adecuada y un buen estado nutricional antes y después de la concepción, son esenciales para una reproducción óptima (Wickham y cols., 1983). Hibbard en 1964 señala que en las mujeres que tienen déficits dietéticos subclínicos antes del embarazo, las reservas de folatos se consumen rápidamente cuando sobreviene la gestación.

Bower y cols. (1985) señalan la hipótesis de que un déficit de folatos al comienzo del embarazo está asociado con una mayor incidencia de niños con defectos del tubo neural.

c) Absorción defectuosa

Todas aquellas afecciones que pueden alterar el normal funcionamiento del intestino delgado y las resecciones intestinales, cursan siempre con un déficit de folatos. Este déficit puede deberse bien a que la absorción de los folatos esté disminuida (malabsorción intestinal) o bien a alteraciones en la utilización de los mismos.

La absorción de los folatos es el índice más sensible para conocer la función de la absorción intestinal (Chanari y Bennett 1962). Alteraciones pequeñas en la absorción combinadas con el

aumento de las necesidades del embarazo, conduce a un balance negativo de folatos. Dichas alteraciones forman parte de un círculo vicioso, ya que un déficit primario de folatos causa alteraciones en el desarrollo y función de la mucosa intestinal, los cuales a su vez limitan la absorción y agravan el estado deficitario (Ricomena y cols., 1986).



Durante la gestación, la absorción intestinal de folatos está disminuida (Hibbard y cols., 1970; Karlin y cols., 1977; Bolis y cols., 1985a; Navarrete y cols., 1990) debido a que se origina un edema de la mucosa intestinal, como consecuencia de las altas concentraciones de progesterona sanguínea.

6.4.2.- Acido fólico y alcohol.

6.4.2.1.- Efectos del alcohol sobre el metabolismo del folato.

La ingesta de alcohol ejerce numerosos efectos tóxicos sobre el metabolismo celular, que con el tiempo pueden causar daños en la proliferación rápida de los órganos, en los tejidos y en los huesos, dando como resultado defectos en la morfología y replicación celular. Esto se manifiesta clínicamente por macrocitosis, megaloblastosis, anomalías mitocondriales y alteración de la hematopoyesis hasta el punto de producir anemia, neutropenia y trombocitopenia.

Experimentos realizados en humanos y en animales, sugieren que en los estudios de la toxicidad aguda del alcohol sobre el metabolismo del folato, es primordial mencionar el impacto sobre la circulación enterohepática (CEHF). El alcohol bloquea la liberación de folato desde el hepatocito y de este modo destruye el suministro a los tejidos produciendo rápidamente un defecto en la replicación celular (Hillman y Steinberg 1982).

Blocker y cols. (1987), trabajando con 2 grupos de primates no humanos, sometidos ambos a una dieta libre de folato hasta el extremo de producir anemia megaloblástica, tras la administración intragástrica de ácido fólico radiactivo, encontraron que en el grupo que había estado recibiendo un 30 % de las calorías de la dieta en forma de etanol, se producía un aumento de la radiactividad en heces y una reducción en la excreción urinaria del isótopo. La retención corporal (medida por los niveles en plasma, eritrocitos e hígado) apenas se afectó por la ingesta de alcohol. Los autores concluyeron que la reducción en la radiactividad en orina podía ser debida a varias causas como malabsorción intestinal, un defecto en la circulación enterohepática, aumento de la retención por tejidos deficientes o fallo en la excreción renal. Por otra parte, el aumento de la excreción fecal de

ácido fólico, implicaba un fallo en la absorción intestinal o en la circulación enterohepática; sin embargo la medida de la absorción del isótopo mostró resultados parecidos en los monos alcoholizados y en los controles, por lo que sugieren que el trastorno podría estar en la circulación enterohepática.

Con frecuencia los alcohólicos presentan una disminución en la ingesta de folato, bien porque comen menos o porque disminuyen la cantidad de folato contenido en la dieta, lo cual produce una incidencia elevada de anemia, leucopenia y trombocitopenia (Eichner y cols., 1971a).

Halsted y cols. (1971), observaron que en pacientes alcohólicos malnutridos, folato deficientes, la absorción de ácido fólico estaba disminuida, pero se normalizó tras dos semanas de abstinencia de alcohol y recuperación nutricional.

Más tarde en 1973, este mismo grupo observó que en pacientes alcohólicos se producía una disminución del transporte intestinal de ácido fólico, que venía acompañada de una deficiencia de folato, producida por una combinación de dieta pobre en folatos unido a la ingesta de alcohol (Halsted y cols., 1973b).

Estudios clínicos posteriores han demostrado que el alcoholismo está asociado con diarrea y malabsorción de varias vitaminas hidrosolubles, incluyendo el ácido fólico (Mezey y Halsted 1979)

En 1980 Halsted (1980a) comprobó que la absorción de ácido fólico disminuía en pacientes alcohólicos que tenían una alimentación inadecuada, y sugirió que la deficiencia de determinados factores dietéticos limitaba la actividad metabólica requerida para el transporte yeyunal de ácido fólico, cuando éste se encuentra a concentraciones fisiológicas.

Una dieta adecuada y/o suplementada con folato, puede prevenir la mayoría de los efectos clínicos del alcohol sobre la hematopoyesis; pero el alcohol tiene efectos sobre el metabolismo del folato "in vivo" que no se explica simplemente por una disminución de folato en la ingesta dietaria. Esto fue sugerido por Sullivan y Herbert (1964), quienes demostraron, que el alcohol podía interferir en la respuesta hematológica tras la terapia oral y parenteral de ácido fólico en pacientes alcohólicos folato-deficientes con anemia megaloblástica. Lo que indicaría, que el alcohol inhibe competitivamente algunos pasos metabólicos.

Pero el alcohol además de producir una disminución en la ingesta dietaria afecta al balance de folato por otros mecanismos como demostraron Eichner y cols. (1971b, 1973) al tratar a individuos normales con una dieta deficiente en folato, observando una caída gradual del folato en suero después de un período de 3-4 semanas pero cuando a estos mismos individuos se les administraba etanol hasta alcanzar niveles de alcohol en sangre de 50-100mg/100ml, sus niveles de folato en suero disminuyeron rápidamente a valores tan bajos como 4ng/ml en 48-72 horas. Esto sucedía permaneciendo normal el almacenamiento de folato en hígado y no se asoció con daño urinario de metiltetrahidrofolato (Eichner 1973; Paine 1973).

Por el contrario, Lane y cols., (1976) estudiaron el aclaramiento plasmático de los congéneres de folato marcados, demostrando un rápido aclaramiento en individuos alcohólicos con $t_{1/2}$ comparable al que se vio en los sujetos tratados con una dieta deficiente en folato.

Hillman y Steinberg realizaron en 1982 un estudio en un individuo normal, alimentándolo primero con una dieta deficiente en folato y después con la misma dieta suplementada con alcohol y comprobaron que aparecía una correlación, entre la disminución de los valores de folato en suero y el escaso suministro a los tejidos; por lo que un período de tres semanas con una dieta folato deficiente originó una afección medular y la suplementación con etanol precipitó la eritropoyesis

megaloblástica a los 7 y 10 días. Cuando se retiró el alcohol los niveles de folato en suero aumentaron rápidamente. Según estos autores, el alcohol ingerido podría interferir en algún paso del transporte de folato, desde los tejidos donde se encuentra almacenado hacia las células medulares.

Se ha descrito en los sujetos alcohólicos un aumento en la proteína de unión al ácido fólico en suero (Hines 1975), pero no existen evidencias de que este aumento afecte a la liberación de metiltetrahidrofolato hacia órganos diana como la médula ósea. La distribución de folato a varios órganos y especialmente la captación de folato por el hígado, no se modificaron durante los períodos de ingesta aguda de etanol (Steinberg y cols., 1980; 1981).

Mc Martin y cols. (1989) en un estudio sobre la distribución tisular, en ratas con dietas adecuadas, concluyeron que el alcoholismo crónico no altera la deplección tisular de folatos y sólo parece haber un cierto efecto del alcohol sobre los niveles plasmáticos.

En monos mantenidos con una dieta suplementada con folato y tratamiento con etanol durante 12 y 24 meses, una inyección intramuscular de (^3H) PteGlu₁ disminuye la retención hepática de folato y aumenta la excreción urinaria y fecal (Halsted 1979). La absorción intestinal de (^3H) PteGlu₁ en estos animales no fue normal. El aumento en la pérdida fecal podría ser el resultado de un aumento en la excreción, o bien, de una disminución en la reabsorción biliar de folato (Romero 1981). El incremento en la pérdida urinaria podría ser debido a la gran cantidad de (^3H) PteGlu₁ administrada por vía intramuscular. Mientras que en el hombre la ingesta aguda de etanol no tiene aparentemente efectos sobre la distribución de (^3H) PteGlu₁ a los tejidos. Lane y cols. (1976) en estudios comparativos entre individuos normales, folato-deficientes y que ingieren etanol, encontraron en los individuos tratados con etanol un incremento en la tendencia de almacenar $^{14}\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$. Estos resultados llevaron a estudios posteriores sobre la utilización de folato por los tejidos, especialmente sobre el impacto del etanol en la circulación enterohepática. Para ello,

debido a la similitud entre la toxicidad aguda del alcohol en las ratas y la observada en el hombre; se utilizó un modelo de rata que permitió medir exactamente la captación, almacenamiento, liberación y transporte biliar. La administración de una solución de etanol al 10 % (100 ml/Kg), dio un valor promedio en sangre de 150-200 mg/100 ml disminuyendo rápidamente hasta dar en suero niveles deficientes de folato a las 48-72 horas (Hillman y cols, 1977). Los niveles de folato biliar también descienden a pesar del aclaramiento de folato en hígado (McGuffin y cols., 1975).

Previamente Johns y cols. (1961), determinaron la capacidad con que el alcohol interfiere en la liberación del folato marcado desde el hígado a la bilis, encontrando que el alcohol altera el transporte biliar de MTHF marcado mientras que aumentó significativamente la retención hepática de folato marcado. Estos experimentos sugieren el efecto tóxico del alcohol, sobre el transporte de MTHF desde el hepatocito a la bilis. El aumento del pool intracelular de poliglutamato marcado podría representar un efecto secundario.

Hillman y cols. (1977), estudiaron la cinética del folato utilizando varios isótopos, y determinaron el impacto que el etanol ejerce sobre la captación hepática de folatos, grado de reducción y metilación de los congéneres oxidados, síntesis de poliglutamatos y la liberación del metiltetrahydrofolato almacenado y transportado por la bilis. Los resultados mostraban que el etanol no tiene efectos aparentes sobre la captación por el hígado de folatos, ni sobre las tasas de metilación y reducción, pues la captación hepática y el transporte de $^{14}\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ desde el hepatocito por vía biliar fue normal en los animales tratados con etanol.

Horne y cols. (1978) usando hepatocitos aislados demostraron que el etanol marcado estimula la acumulación de MTHF, por lo que postularon que el principal efecto del alcohol, podría ser una inhibición en el flujo de folato desde el hepatocito. Esta hipótesis fue demostrada unos años más tarde por Steinberg y cols. (1981).

En 1986 Said y Strum, trabajando con ratas a las que sometía a ingesta crónica o aguda de etanol, llegaron a la siguiente conclusión: el etanol inhibe la absorción de folatos en el yeyuno de ratas cuando se encuentra en contacto con la mucosa intestinal en el momento del transporte, y el grado de inhibición es proporcional a la concentración de alcohol. Este efecto inhibitorio no es específico del transporte de folatos, y se ejerce a través de varios mecanismos: perturbación fisiológica de la membrana del enterocito, inhibición del metabolismo celular y/o alcalinización del "microclima ácido" de la mucosa. Estos resultados demuestran que para que en ratas sometidas a ingesta crónica de etanol, se produzca inhibición del transporte de folatos, debe existir exposición simultánea o muy reciente de la mucosa intestinal al etanol.

Más recientemente Collins y cols. (1992), trabajaron con ratas alimentadas con dietas deficientes en folato y con alcohol, durante un período prolongado y observaron, que en las ratas con dieta deficiente en folato y con ingesta de etanol, los valores de retención corporal y los niveles plasmáticos estaban disminuidos. El consumo de etanol aumenta la incorporación del folato marcado en cerebro y riñón, pero no tuvo ningún efecto en otros tejidos. En las ratas que continuaron bebiendo etanol, pero se les cambió la dieta por otra equilibrada, los niveles de folato se recuperaron en cuatro semanas mientras que las ratas que dejaron de ingerir alcohol pero no se les varió la dieta, no recobraron los niveles de folatos en cuatro semanas. Esto sugiere que el etanol puede tener ciertos efectos en la retención de folatos por el organismo, pero son de poca importancia cuando el organismo recibe una dieta adecuada de folato.

6.4.2.2.- Efectos del etanol sobre los niveles de folato y su repercusión en la gestación.

En los alcohólicos es frecuente encontrar deficiencias vitamínicas; siendo la más común la deficiencia de ácido fólico (Leevy y cols., 1976). En diversos estudios, se ha podido

comprobar que el 30-50% de los pacientes alcohólicos crónicos presentaron disminuidos los niveles de folato en suero (Eichner y Hillman 1971; Wu y cols., 1975). Numerosos estudios han mostrado que el etanol interfiere en la absorción y metabolismo del folato (Halsted 1971; Hillman y Steinberg 1982; Lin y Lester 1985). Por todo esto el grupo de los alcohólicos crónicos es el más propenso a presentar deficiencias de folato y es razonable asumir que esta deficiencia será altísima en las mujeres alcohólicas embarazadas. Además, los requerimientos de nutrientes aumentan generalmente durante el embarazo para mantener el organismo y el crecimiento fetal; pero el requerimiento de ácido fólico durante la gestación excede a los de otros nutrientes y si a esto, unimos que la ingesta dietaria puede no proveer la cantidad adecuada de esta vitamina, será frecuente observar una deficiencia durante el embarazo.

Las mujeres gestantes que ingieren etanol en grandes cantidades, corren un gran riesgo de que los hijos presenten crecimiento retardado, conociéndose esto como Síndrome Alcohólico Fetal (Jones y Smith 1973). Experimentos realizados posteriormente indicaron que el alcohol es un agente teratógeno (Randall 1977; Abel 1984), pero el mecanismo por el cual ejerce sus efectos sobre el desarrollo fetal aún no está muy claro.

Durante la deficiencia de folato, el etanol perturba el metabolismo y la distribución de folato, por lo que disminuye la actividad de uno o más enzimas durante el período de organogénesis lo que podría dar como resultado la muerte fetal (Hillman y Steinberg 1982; Halsted y Heise 1987).

Lin y Lester (1985) en estudios realizados en placenta de ratas, llegaron a la conclusión de que el consumo de etanol durante el embarazo altera la retención de metiltetrahidrofolato y sus congéneres desde 50:50 a 70:30; mientras que los folatos totales permanecieron inalterados. Esto sugiere un aumento de N⁵-metiltetrahidrofolato a expensas de nonmetiltetrahidrofolato.

Posteriormente, Lin en 1988, observó la interacción entre la deficiencia de folato y la ingesta aguda de etanol sobre el desarrollo fetal; (Lin 1988; 1991b) para ello utilizó ratas deficientes y suficientes en folato, administrándoles etanol por vía intragástrica en el día 11 de gestación (%g/kg en dos dosis cada 4 horas). Las ratas se sacrificaron a los 21 días de gestación para examinar el resultado sobre el embarazo y los niveles de folato en los tejidos, encontrándose que en el plasma materno, en el hígado y en la placenta, así como, en el hígado y cerebro fetal, hay una deplección en los valores totales de folato, en los grupos folato-suficientes; sin embargo, el tratamiento con etanol no afectó los niveles de folato en los tejidos.

En los grupos folato-deficientes el tratamiento con etanol produce tres veces más muerte fetal que en los grupos mantenidos con una dieta folato-suficiente en los que el tratamiento con etanol no tiene efectos sobre el resultado fetal. Según este autor existe una relación entre el grado de deficiencia de folato y el efecto del etanol; siendo lo más severo el efecto tóxico del etanol sobre el feto.

Por todo esto concluyeron, que una nutrición pobre en folato unido a un consumo moderado de etanol en un período crítico de organogénesis puede empeorar severamente el desarrollo fetal.

Hasta 1991 se tenía la teoría, de que la ingesta aguda de etanol durante el desarrollo embrionario empeora temporalmente el transporte de folato placentario, lo que puede llevar a los tejidos embrionarios a un período transitorio deficiente en folato, pudiendo producir muerte fetal. Es lógico esperar que una deficiencia de folato unido a la ingesta de etanol puede disminuir la absorción de folato por el tejido feto-placentario; pero los estudios realizados por Lin en 1991 no apoyaron esta hipótesis (Lin 1991a).

Lin en 1991 estudió el efecto que ejerce el tratamiento agudo del etanol unido a una dieta deficiente en folato sobre la transferencia de folato materno-fetal, para explicar la hipótesis de que el efecto tóxico del etanol sobre el feto durante períodos deficientes en folato empeora la transferencia; para ello las ratas fueron alimentadas con dietas deficiente en folato (0.2 mg/Kg) y dietas con suficiente folato (2mg/Kg) durante las 11 semanas anteriores a la gestación y hasta el día 11, donde fueron sacrificadas.

En el día 11 de gestación un grupo de ratas fueron tratadas con etanol (2.5 g/Kg de peso corporal) y el otro con una solución isocalórica de sacarosa, seguidamente se les administró ³H-folato (2 μ Ci/100 g de peso corporal) a los 120 min. Pasados 90 min, se extrae la sangre materna y los tejidos feto-placenta. Los niveles de folatos y el tratamiento con etanol no tuvieron efectos sobre la distribución de ³H-folato en la circulación materna. Sin embargo, contrariamente a la hipótesis sostenida hasta el presente estudio, se incrementó la captación de ³H-folato por los tejidos feto-placenta en las ratas deficientes en folato y tratadas con etanol, indicando que la transferencia placentaria de folatos no se empeora por el tratamiento con etanol. Debido a que para mantener surtido al embrión de una cantidad suficiente de folato la placenta debe trabajar más eficientemente en la dirección de transferencia al feto para igualar la reducción de los niveles de folato circulantes. De este modo parece razonable asumir, que en los tejidos feto-placenta folato-deficientes encontremos un aumento en la absorción de ³H-folato y el tratamiento con etanol hace que la captación de ³H-folato por el tejido feto-placenta sea menor en los grupos folato-suficiente que en los folato deficientes.

II.- OBJETO.

Los hijos de madres alcohólicas nacen con una serie de anomalías debidas a los efectos negativos que el etanol ejerce sobre el desarrollo fetal y postnatal, definido por Jones y Smith en 1973 como Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) y que se manifiesta por una disfunción del SNC, dismorfia craneofacial y crecimiento retardado.

Diversos experimentos realizados en animales y hombre indican que el etanol es un importante teratógeno, pero el mecanismo por el cual ejerce sus efectos sobre el desarrollo fetal aún no está muy claro.

Una de las posibles causas de este síndrome es el estado nutricional, ya que la ingesta de etanol durante la gestación puede afectar al estado nutricional materno, influyendo en la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para el feto, entre los que estarían incluidos el zinc y el ácido fólico. De hecho, algunos autores afirman que el etanol disminuye los receptores placentarios para el ácido fólico, lo que afectaría negativamente en la transferencia placentaria del mismo desde la madre al feto y otros autores constatan, que la ingesta aguda o crónica de etanol en ratas preñadas, puede dar como resultado, una reducción en el transporte de zinc a través de la placenta y una disminución en los niveles de zinc fetales.

El zinc y el ácido fólico son cofactores esenciales que intervienen en la síntesis de ADN y RNA y en la división celular, por lo que la deficiencia transitoria de zinc y/o ácido fólico durante el período crítico de embriogénesis impide el desarrollo y produce malformaciones fetales.

Existen numerosos estudios acerca de las alteraciones que produce la ingesta crónica de alcohol durante el embarazo sobre el crecimiento, desarrollo y nivel de mortandad postnatal en los hijos de madres alcohólicas (Clarren y Smith 1981; Kaminski y cols., 1987) y en las crías de animales de distintas especies (Abel 1980; Randall y Riley 1981, López-Tejero y cols., 1989). Sin embargo, son muy pocos los estudios que describen las alteraciones gastrointestinales, a pesar de que un buen estado nutricional, que incluye la ingesta de alimentos y la capacidad gastrointestinal sea fundamental para el desarrollo postnatal. Actualmente se sabe que la ingesta de etanol produce alteraciones gastrointestinales en mamíferos adultos (Barona y cols., 1974; Perlow y cols., 1977; Beck y Dinda 1981; Raul y cols., 1982), pero esto es difícil extrapolarlo a fetos o crías de madres que ingieren etanol.

La última fase del período prenatal, es crítica y vulnerable para el feto y en ella se detecta un programa genético encargado de que aparezcan las diferentes enzimas del intestino delgado (Baley y cols., 1964; Corring y cols., 1982; Hamosh 1982) lo que será determinante para el desarrollo de la función digestiva, que es claramente necesaria para la alimentación y supervivencia postnatal.

Recientemente se ha comprobado que la ingesta de alcohol durante la lactancia produce en las madres una disminución en la producción y eyección de leche y en las crías disminuye la intensidad, frecuencia y duración al mamar, lo que ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo postnatal.

Por todo ello nos propusimos estudiar en primer lugar, algunas anomalías macroscópicas en las crías, indicativas del efecto del alcohol sobre el crecimiento, como son: el peso corporal, peso del cerebro, peso del hígado y longitud intestinal.

En segundo lugar, con la finalidad de observar los efectos que la ingesta de etanol produce sobre la biodisponibilidad de zinc y ácido fólico, determinamos los niveles de estos nutrientes en leche y en suero materno y de las crías. Así, como la ingesta calórica sólida y líquida y la evolución de los pesos en las madres y las crías durante la lactancia.

En tercer lugar, determinamos la absorción de zinc y ácido fólico en yeyuno e íleon en las crías a los 21 días del nacimiento.

En cuarto lugar, valoramos la actividad del enzima Alcoholdehidrogenasa hepática.

Por último, hemos querido determinar, si la suplementación de la dieta con ácido fólico y aminoácidos durante el embarazo y la lactancia unido a la ingesta de etanol, modifica los parámetros citados anteriormente.

III.- MATERIALES Y METODOS.

1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental utilizado en animales que ingieren etanol se muestra en la figura 9 y en la figura 10 se muestra el diseño experimental utilizado en los animales que ingieren etanol y una dieta suplementada.

2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales de experimentación utilizados han sido ratas blancas machos y hembras (raza Wistar albina), con un peso medio inicial de 250 g, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Los animales se distribuyen en grupos de cinco en jaulas de plástico que se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada a 21°C con fotoperíodos controlados de 12 horas.

Partiendo de los grupos iniciales, indicados anteriormente, se procede a realizar la técnica de alcoholización siguiendo el método descrito por Hajjar y cols. (1981), que consiste en un período de inducción durante cuatro semanas sucesivas en las que se mezcla etanol en el agua de bebida a diferentes concentraciones desde el 5%, 10%, 15% y 20%, manteniéndolas con el 20% durante un mes. El 20% es el porcentaje máximo con el que hemos comprobado que la reproducción se produce con relativa normalidad.

Posteriormente los animales fueron apareados, para obtener las crías hijas de padres alcohólicos. Después del apareamiento, las madres preñadas se alojan en jaulas individuales,

mantiéndolas así durante el período de lactancia (21 días). Durante todo este tiempo las madres ingieren etanol al 20% (Fig. 9). El mismo proceso se realizó con los grupos de madres que ingieren etanol a las que se les suplementa la dieta con diversos nutrientes, desde el apareamiento hasta el final de la lactancia (Fig. 10).

Todos los animales fueron pesados semanalmente; así mismo se les controló la cantidad de pienso y la bebida consumida durante el tiempo que duró el experimento.

3.- DIETAS UTILIZADAS.

Se ha utilizado pienso comercial (Dieta de mantenimiento Rata-Ratón IPM-R20 LETICA, S.A), elaborado de acuerdo con la composición de la Tabla III. Esta dieta fue administrada al grupo control y al grupo tratado con etanol.

Tabla III.-

Análisis químico:

Vitaminas mg/kg:

Humedad máxima	9 %	Vitamina A (UI/Kg)	9.000
Proteína bruta	16 %	Vitamina D ₃ (UI/Kg)	1.000
Grasa bruta, mínimo.	3 %	Vitamina E, X-tocoferol.	50
Fibra bruta, máximo.	5 %	Vitamina K ₃ , menadiona.	1.2
Cenizas, máxima.	5 %	Vitamina B ₁ , tiamina	7.5
Calcio, mínimo.	0.80 %	Vitamina B ₂ , riboflabina.	6.0
Lisina, mínima.	0.70 %	Vitamina B ₆ , piridoxina.	5.0
Meteonina + cisteína, máxima.	0.50 %	Vitamina B ₁₂ , cianocobalamina.	25.0
Fósforo, mínimo.	0.65 %	Vitamina PP, ác. nicotínico.	30.0
Cloruros, máximo.	0.60 %	Acido pantoteico.	15.0
Energía metabolizable (Kcal/kg)	2900	Colina	750
		Acido fólico	2

Oligoelementos mg/Kg:

Manganeso	40
Zinc	30
Hierro	25
Cobre	10
Iodo	0.76
Cobalto	0.44

Al tercer grupo experimental se le ha administrado una dieta suplementada con L-aminoácidos definidos y ácido fólico de la casa comercial DYETS. INC. (Tabla IV).

Tabla IV.-

Aminoácidos g/Kg

L-Alanina	3.5	L-Histidina	3.3	L-Serina	3.5
L-Arginina	11.2	L-Isoleucina	8.2	L-Treonina	8.2
L-Asparagina	6	L-Leucina	11.1	L-Triptófano	1.74
L-Acido aspártico	3.5	L-Lisina HCl	14.4	L-Tirosina	3.5
L-Cistina	3.5	L-Metionina	8.2	L-Valina	8.2
L-Acido glutámico	35	L-Fenilalanina	11.6	Total L-Aminoácidos	171.44
Glicina	23.3	L-Prolina	3.5	Energía metabolizable (Kcal/Kg)	3900

Sales minerales mg/Kg :

Vitaminas mg/Kg:

Carbonato cálcico	14.6	Vitamina B ₁ , tiamina	6
Fosfato cálcico, bibásico	0.2	Vitamina B ₂ , riboflavina	6
Cloruro sódico	12.4	Vitamina B ₆ , piridoxina	7
Fosfato potásico, bibásico	17.2	Niacina	30
Sulfato magnésico, anhídrido	2.4	Pantotenato cálcico	16
Sulfato magnésico, monohidratado	0.2	Acido fólico	8
Citrato férrico	0.6	Vitamina B ₁₂	50
Zinc	30	Vitamina A (UI/Kg)	9.000
Cobre	27.7	Vitamina D ₃ (UI/Kg)	1.000
Iodo	0.4	Vitamina E	50
Selenio	0.4	Menadiona	0.8
Fluor	1	Biotina	0.02

Fig. 9.- DISEÑO EXPERIMENTAL EN ANIMALES QUE INGIEREN ETANOL.

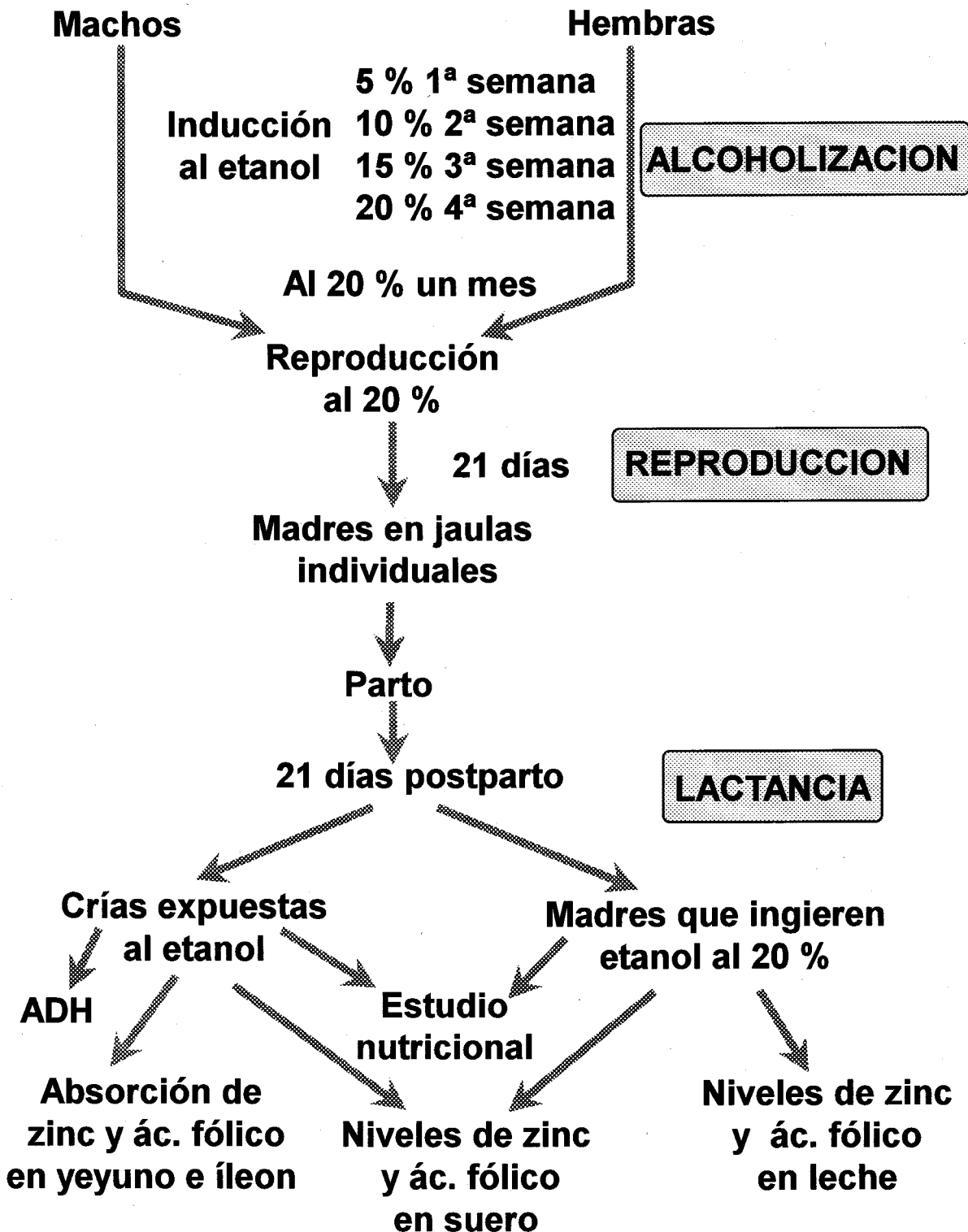
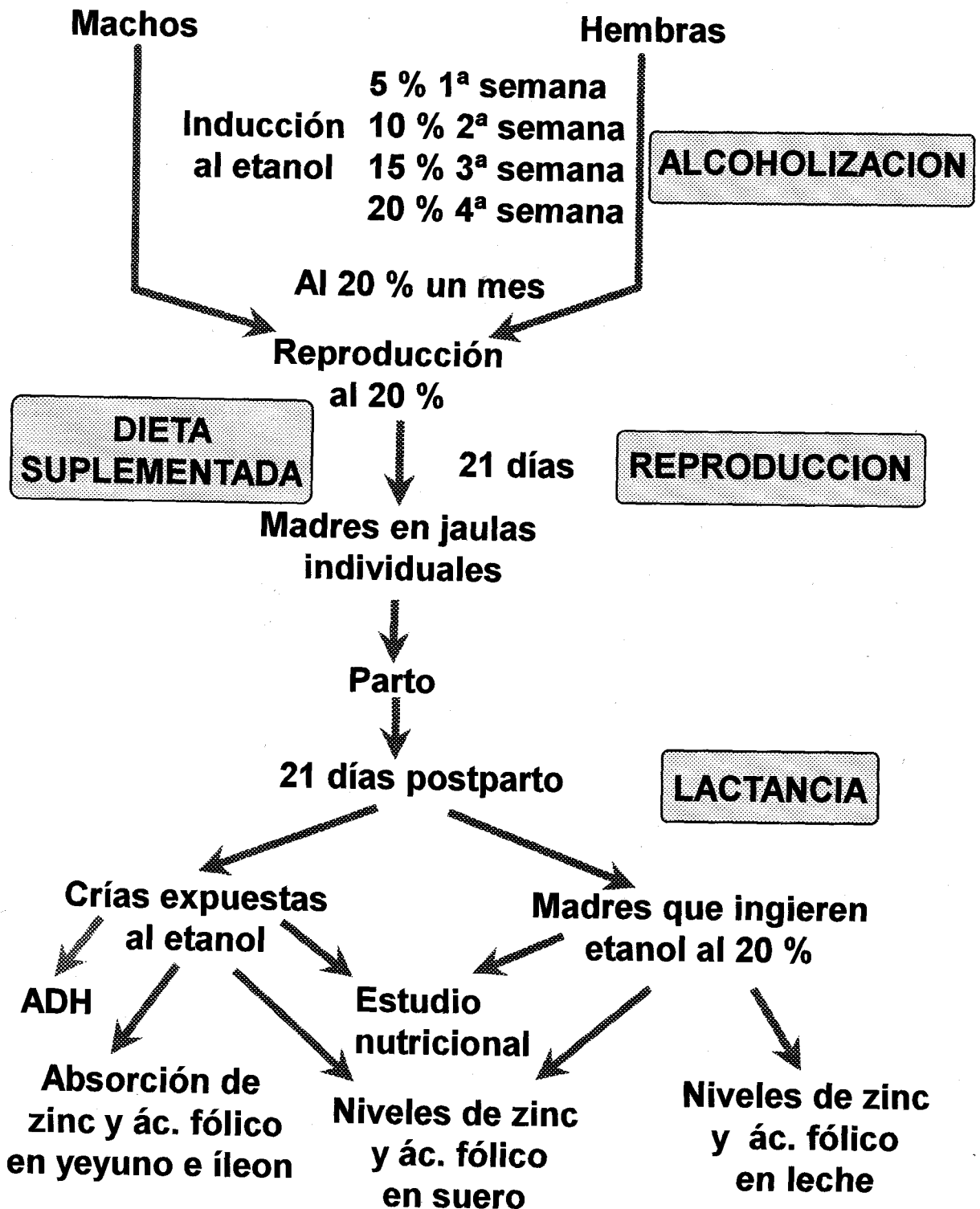


Fig. 10.- DISEÑO EXPERIMENTAL EN ANIMALES QUE INGIEREN ETANOL Y UNA DIETA SUPLEMENTADA.



4.- TECNICAS ANALITICAS.

4.1.- Técnica de absorción "in vivo".

La absorción intestinal se ha medido mediante la técnica de absorción "in vivo" descrita por Ponz y cols. (1979), en la que se estudia la absorción en un segmento del intestino delgado, aislado por cánulas conectadas a un sistema de perfusión que bombea la solución a absorber, mediante una bomba peristáltica, a lo largo del asa intestinal. La zona donde se ha realizado la perfusión ha sido el yeyuno e íleon distal.

La cantidad de sustrato absorbido se calcula por diferencia entre la cantidad contenida en el líquido a la entrada del intestino y la contenida en el líquido efluente, referida al tiempo de absorción, al peso de tejido fresco, al peso de tejido seco y a la superficie de absorción elegida.

4.2.- Descripción del dispositivo experimental.

El trabajo se ha realizado en una vitrina mantenida a temperatura aproximada de 28-30 °C, mediante un sistema de calefacción regulable; en el interior de la misma se encuentra una camilla calentada por una manta eléctrica, para evitar el descenso de temperatura corporal provocado por la anestesia.

El sistema de perfusión consta de los siguientes elementos, según se muestra en las figuras 11 y 12:

- Reservorios que contiene la solución a perfundir.
- Tubos de plástico flexible por el que circulan los líquidos.

- Bomba peristáltica (GILSON Mod. Minipuls 2) que impulsa el líquido a una velocidad constante de 3 ml/min.
- Baño termostático ajustado a la temperatura adecuada para que el líquido penetre en el intestino a temperatura fisiológica.
- Cánulas de entrada y salida de líquido, ligadas a cada uno de los segmentos del intestino delgado a perfundir.

4.3.- Realización de los experimentos.

Transcurrido el período de lactancia (21 días desde el nacimiento), los animales se anestesian con uretano al 10%, mediante inyección subcutánea a razón de 1 ml por cada 100 g de peso. El grado de anestesia se controla por la observación de los reflejos corneales y óculo-parpebrales. Tras laparotomía media mediante la que se seccionan los diversos planos musculares se penetra en la cavidad abdominal. Se ligan los vasos sanguíneos del mesenterio que irrigan la zona donde va a realizarse el corte. Se introducen a través de un pequeño corte en la pared intestinal las cánulas de entrada y salida del líquido de perfusión.

La canulación se ha realizado según los siguientes esquemas:

- Perfusión del yeyuno (Fig. 11); la cánula de entrada A está situada a 2 cm del asa de Treitz, y la de salida B a 14 cm de A.
- Perfusión del íleon distal (Fig. 12); la cánula de entrada A está a 14 cm de la de salida B que se encuentra al final del íleon.

**Fig. 11.- ESQUEMA DE
PERFUSION EN YEYUNO**

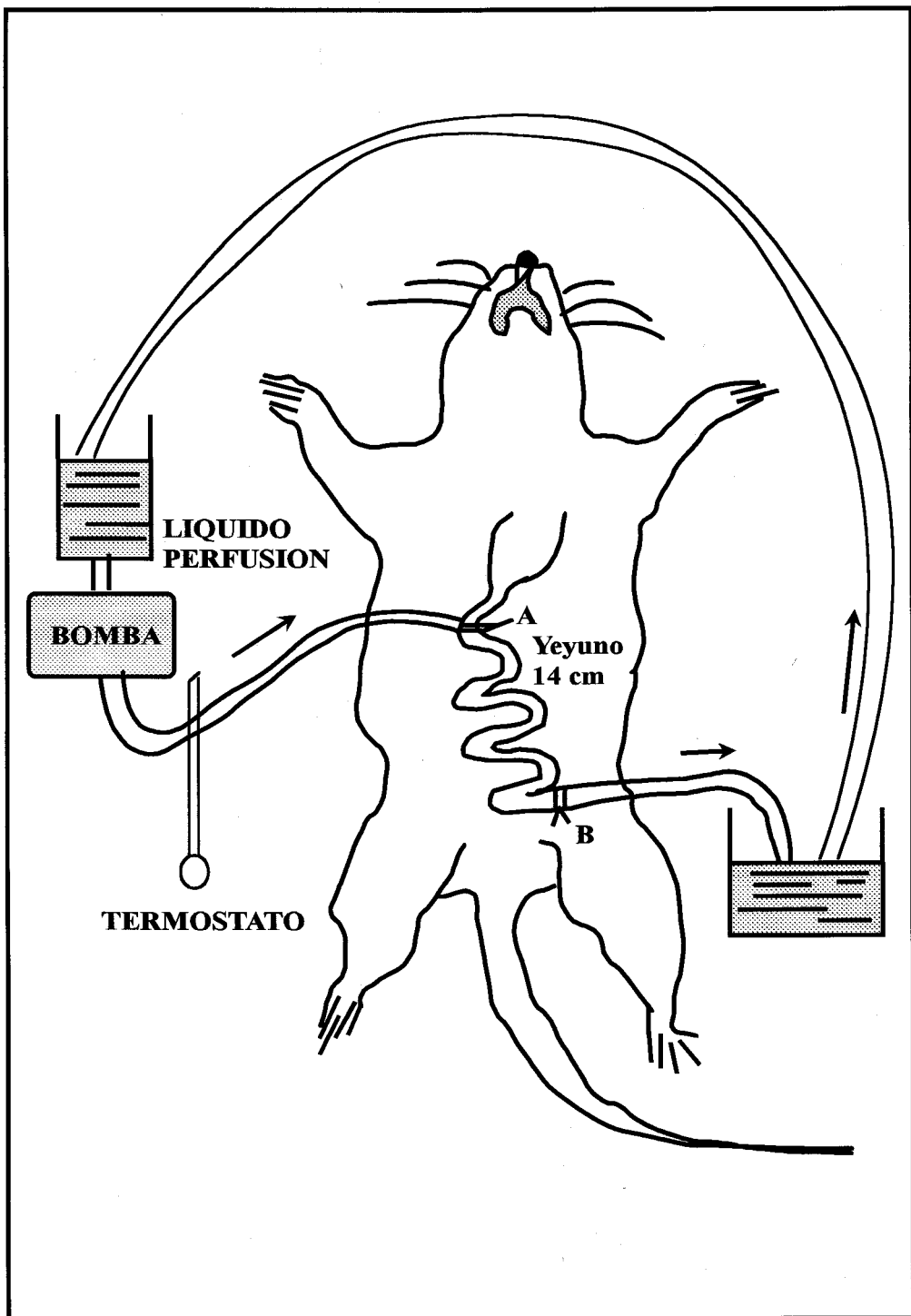
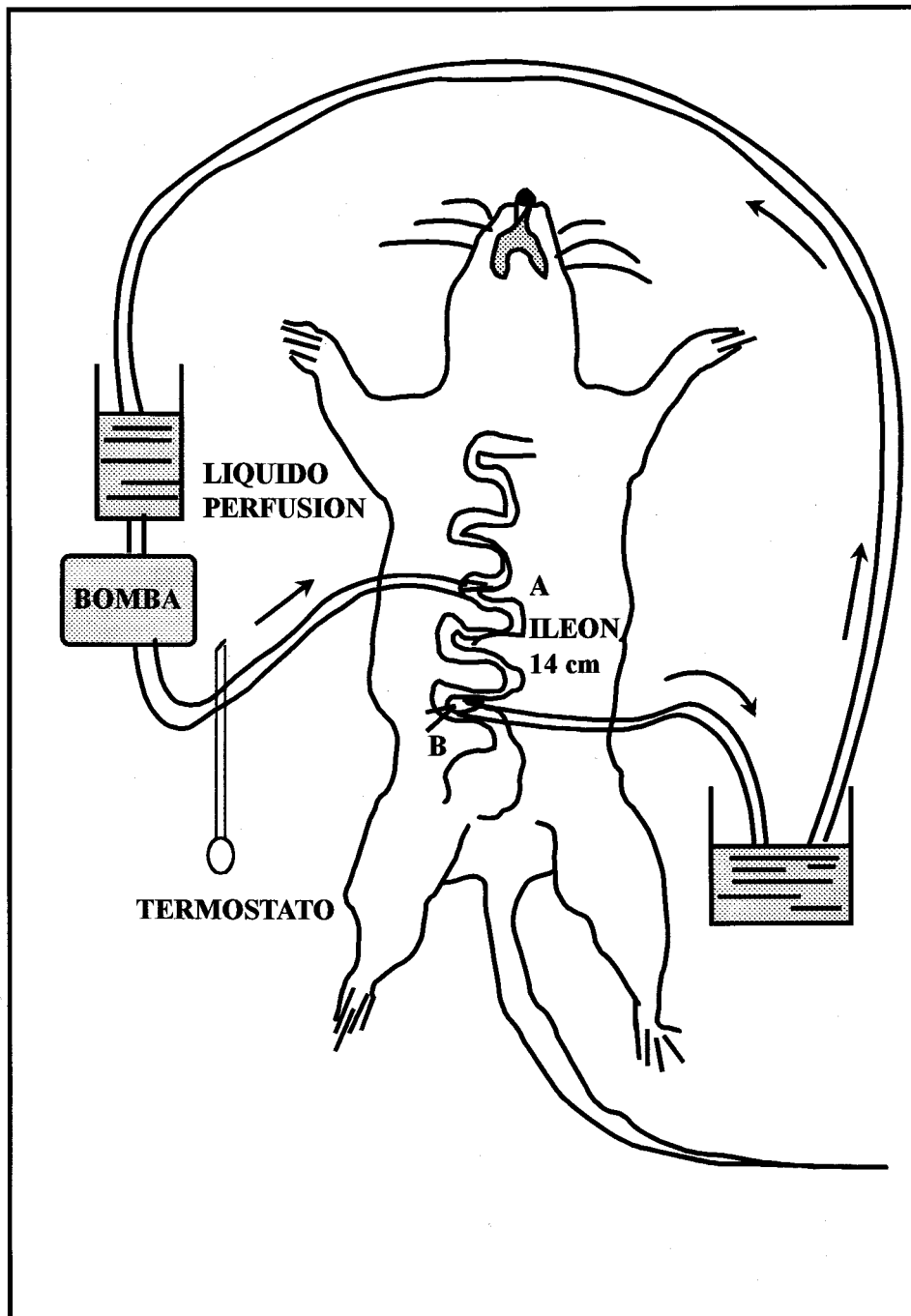


Fig. 12.- ESQUEMA DE PERFUSION EN ILEON DISTAL.



Se reintroduce el asa intestinal en la cavidad abdominal y se conectan las dos cánulas al sistema de perfusión. Posteriormente, se procede a lavar el intestino con suero fisiológico durante 10 minutos, hasta que el líquido recogido aparezca claro y transparente.

Seguidamente procedemos a la perfusión en circuito cerrado de las soluciones en estudio durante 5 minutos cada una, siendo la velocidad de perfusión 3 ml/min, tomando como tiempo cero cuando la solución a perfundir sale de manera continua.

Transcurrido este tiempo se interrumpe la perfusión de la solución y se recoge todo el líquido contenido en el sistema mediante paso de aire. El volumen inicial de solución perfundida fue de 10 ml y se comprobó por pesada tanto el volumen inicial como el final, siendo la diferencia entre ambos equivalente al volumen de solución absorbida.

La temperatura rectal del animal se mantiene con un valor constante de 37-38°C, durante todo el proceso experimental.

4.4.- Determinación de ácido fólico "in vivo".

Se ha utilizado como líquido de perfusión una solución de NaCl 0.9 % con ácido fólico a diferentes concentraciones. El líquido de perfusión contenía el ácido fólico marcado con ácido fólico frío en cantidad adecuada para obtener las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5 μM y una cantidad de radiactividad de 10 μCi .

En el mismo animal, realizamos absorciones sucesivas de 5 minutos cada una. Se trabajó con perfusión en circuito cerrado, siendo la velocidad de 3 ml/min. y con recogida total del líquido de perfusión al final de cada periodo de absorción.

La longitud de intestino perfundida es aproximadamente 14 cm y el protocolo de trabajo que se ha seguido en todos los casos ha sido idéntico, perfundiendo siempre de menor a mayor concentración de ácido fólico.

Después de cada absorción, se deja un intervalo de 5 minutos pasar solución salina fisiológica (SSF) por el asa intestinal con el fin de eliminar los restos de líquido de la perfusión anterior.

En los experimentos realizados con ácido fólico, la pauta de perfusión fue la siguiente:

- 1.- Acido fólico 0.25 μM con un tiempo de perfusión de 5 minutos.
- 2.- Vaciado del asa, con paso de SSF durante 5 minutos.
- 3.- Acido fólico 0.5 μM con una perfusión de 5 minutos.
- 4.- Vaciado del asa, con paso de SSF durante 5 minutos.

Así sucesivamente para todas las concentraciones ensayadas, en orden creciente de concentraciones.

Durante todas las perfusiones se controló la temperatura del líquido a la entrada de las asas intestinales, que fue de 37 °C, mediante un baño termostático interpuesto en el circuito, que se reguló a una temperatura aproximada de 45 °C.

El volumen inicial en cada perfusión fue de 10 ml, comprobando por pesada tanto el volumen inicial como el final. Una vez terminada la perfusión, se determina el perímetro intestinal; colocando un hilo en forma de anillo sobre el asa intestinal mientras se hace pasar SSF y midiendo

posteriormente la longitud de éste hilo. A continuación se sacrifica al animal, se extrae el asa intestinal y se determina por pesada en fresco el tejido intestinal correspondiente al segmento perfundido; después se introduce en una estufa a 100 °C y a las 24 horas se vuelve a pesar obteniéndose el peso seco.

Los líquidos de perfusión contenían el ácido fólico marcado con el ácido fólico inerte, en la cantidad adecuada para obtener la concentración y radiactividad deseadas en la solución de perfusión.

La concentración final del sustrato en el líquido efluyente, se determinó tomando alícuotas de la solución y comparando las desintegraciones por minuto finales en relación con las iniciales-patrón:

$$C_f = C_i \frac{dpm - problema}{dmp - patrón}$$

Siendo:

C_f = Concentración final.

C_i = Concentración inicial.

dpm = Desintegraciones por minuto.

Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado en un contador β de centelleo líquido Betamatic I (Kontron) y en un intervalo de tiempo de 2-6 horas, para evitar los problemas de quimioluminiscencia.

4.5.- Determinación de zinc "in vivo".

Se han ensayado para el cálculo de la absorción intestinal distintas concentraciones de una solución Tyrode que contenía ClZn : 25, 50, 75, 150, 500 μ M.

El protocolo de trabajo seguido ha sido idéntico al citado anteriormente para la absorción de ácido fólico "in vivo", se ha utilizado la misma velocidad de perfusión y las mismas condiciones experimentales, excepto la solución a perfundir cuya composición se indica en la Tabla V:

Tabla V.- Composición de la solución Tyrode g/l.

Cloruro sódico	7.36
Cloruro potásico	0.2
Cloruro cálcico dihidratado	1.36
Glucosa	1.36
Hepes ácido	2.4
Hepes básico	1.3
Cloruro de zinc	0.068

Obtenido el líquido de perfusión se determina la cantidad de zinc por Espectroscopía de Absorción Atómica (Perkin Elmer, modelo 3100).

Tabla VI.- Parámetros instrumentales:

Longitud de onda	213.9
Slit	0.7
Llama	aire-acetileno
Intensidad lámpara	10 mA
Rango lineal	0.0-1.0 mg/l

Durante todo el experimento se utilizó agua purificada en Milli-Q (Millipore-corporation). Para realizar la preparación de la disolución estándar 1g/l de Zn (Perkin-Elmer, 1993) se disuelve zinc metal en CIH concentrado y se diluye con CIH 1 % (V/V). A partir de esta disolución estándar, se preparan por dilución diferentes disoluciones de concentraciones de zinc perfectamente conocidas: 0.005, 0.10, 0.20, 0.50, 0.70, y 1.00 mg/l.

Una vez medida las absorbancias de las mismas, el método es totalmente lineal, obteniéndose la siguiente recta de calibrado:

$$y = 0.0028 (\pm 0.00152) + 0.1296x (\pm 0.00279) \quad r = 0.9991$$

El límite de detección, definido como la concentración del elemento igual a la serie del blanco más tres veces la desviación estándar del mismo, puede calcularse según el método de Miller y Miller (1993). Para ello la desviación estándar de la regresión se iguala a la desviación estándar del blanco y la ordenada se toma como serial del blanco. El límite de detección para el zinc es de 0.0352 p.p.b. Para determinar las ppm de zinc en los líquidos de la perfusión, se diluyen y se cuantifican por calibración externa.

4.6.- Estudios en la leche materna.

Sobre el día 21 de lactancia las crías fueron retiradas de la madre durante un período de 180 min. Para obtener el máximo contenido de leche sin modificar las condiciones fisiológicas con anestesia y hormonas, la madre fue decapitada y posteriormente por una técnica manual con masaje alrededor del área de la glándula mamaria se procede a la obtención de leche (Llopis y cols., 1989).

4.6.1.- Determinación de ácido fólico en leche.

Se determina mediante un autoanizador de quimioluminiscencia (ACS) usando un método competitivo en el cual la muestra compete con el ácido fólico unido al éster de acridinio (sustancia luminiscente) por la unión a un anticuerpo acoplado covalentemente a partículas paramagnéticas. Una vez completada la reacción inmunológica se procede a la separación de las fases mediante un imán utilizando como fase sólida partículas paramagnéticas. A continuación el éster de acridinio reacciona con H_2O y $NaOH$ produciendo energía lumínica que se mide en unidades relativas de luz (RLU) y es inversamente proporcional a la concentración de ácido fólico de la muestra (Enguix y cols., 1992).

4.6.2.- Determinación de zinc en leche.

Para realizar la determinación analítica utilizamos el método de Villa y cols. (1990) modificado por nuestro grupo.

Partimos de un extracto de leche y añadimos 1 ml. de ácido nítrico al 60 % (para destruir la materia orgánica). Calentamos las muestras a 50 °C durante 45 min. y las dejamos a temperatura ambiente 2 días hasta proceder a su análisis. Las muestras se diluyen 1/5 en H_2O desionizada y se determinaron por Espectroscopía de Absorción Atómica.

4.7.- Estudios realizados en suero.

4.7.1.- Determinación de ácido fólico en suero

A los 21 días del nacimiento las crías fueron pesadas y anestesiadas con uretano al 10% a razón de 1 ml por cada 100 g de peso. La sangre se extrae por punción cardiaca y se toma un "pool" debido al escaso volumen obtenido. Una vez extraída, se obtiene el suero, para lo cual se deja retraer el coágulo durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se lleva a una centrífuga (Hettich EDA 35) durante 5 min. y 2027 r.p.m.. A continuación se separa el suero con una pipeta Pasteur y se determina la cantidad de ácido fólico por Inmunoquimioluminiscencia.

El suero de la madre se obtiene de la sangre procedente de la decapitación mediante el mismo protocolo descrito anteriormente.

4.7.2.- Determinación de zinc en suero

Una vez obtenido el suero por el método anteriormente citado, se determina la cantidad de zinc por Espectroscopía de Absorción Atómica (Perkin Elmer, modelo 3100) modalidad de llama.

Las muestras se diluyen 1/5, según el método convencional de Miller y Miller (1993), para la determinación de zinc en muestra de suero humana y se cuantifican por calibración externa.

4.8.- Determinación de la actividad Alcoholdehidrogenasa (ADH).

Se ha determinado la actividad de la Alcoholdehidrogenasa en hígado de crías lactantes hijas de padres que ingieren etanol, según la técnica de Repeto y cols. (1985) modificada por nuestro grupo. Los tejidos se homogeneizan con tampón glicina-NaOH 100 mM pH=10. El homogenado se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 15 min. a 40 ° C. La actividad de ADH se determinó en el sobrenadante, utilizando como sustrato alcohol etílico 24.6 nM y NAD 0.5 mM como cofactor. Los extractos se someten a 50 ° C durante 10 min. La actividad enzimática se midió por espectrofotometría, evaluando la producción de NAD reducido a 340 nm cada minuto durante 3 minutos.

Los resultados se expresan en U/g de tejido y como actividad específica (U/mg de proteínas).

4.9.- Determinación de proteínas totales.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry mediante una curva estándar de albúmina.

El método de Lowry para la determinación de proteínas totales, se basa en la reacción de dichas proteínas con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un complejo coloreado. El color se forma debido a la reacción del Cu^{2+} con la proteína en medio alcalino, y por la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presente en la proteína. La intensidad del color depende de la cantidad de estos aminoácidos aromáticos.

Como productos se han utilizado el sulfato de cobre pentahidratado, tartrato sódico potásico, hidróxido sódico, carbonato sódico, reactivo de Folin y albúmina.

Como reactivo se preparan las siguientes disoluciones:

Disolución A: CO_3Na_2 al 2 % en NaOH 0.1 N

Disolución B: $\text{SO}_4\text{Cu } 5 \text{ H}_2\text{O}$ al 1 %

Disolución C: Tartrato sódico potásico al 2.7 %

Disolución D: 0.5 mlB + 0.5 mlC en 50 ml del A

Disolución E: Reactivo de Folin al 50 % en H_2O destilada

El reactivo de Folin es una disolución de tungstato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y ácido clorhídrico.

Curva patrón de albúmina.- A partir de una disolución 1 mg/ml de albúmina, preparamos otra de 0.1 mg/ml. Y a partir de ésta se preparan una serie de soluciones de concentración conocida entre 0 y 0.7 mg/ml. La disolución realizada a las muestras del homogenado ha sido 1/40.

Para el ensayo se procede de la siguiente manera:

- 1.- Preparamos la disolución D y E inmediatamente antes del uso.
- 2.- A 1ml de cada una de las muestras (patrón y problema) se le añade 5 ml de la disolución D. Se mezcla y se deja durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Añadimos 0.5 ml de la disolución E y agitamos.
- 4.- Esperamos 30 minutos y leemos a 750 nm.

Para calcular las concentraciones de proteína problema interpolamos en una gráfica, que previamente hemos realizado representando concentraciones patrones frente a densidades ópticas.

4.10.- Determinación de parámetros bioquímicos.

La determinación plasmática de glucosa, proteínas totales y bilirrubina total, se realizó en un analizador automático modelo HITACHI 737.

Determinación de glucosa: Se determinó por el método de Schmidt (1961). La enzima hexoquinasa fosforila a la glucosa formando glucosa-6-fosfato, la cual por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que utiliza como cofactor el NADP^+ , se oxida hasta gluconato-6-fosfato. Se cuantifica midiendo la presencia de NADPH a 340 nm.

Determinación de proteínas totales: Se determina por el método de Biuret (Weichselbaum, 1946); en solución alcalina, las proteínas forman con los iones de cobre (Cu^{2+}) un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 546 nm.

Determinación de aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1): Se determina por el "método standard optimado" de la Deutsche Gesellschaft para química clínica (1972). La AST (GOT) cataliza la transferencia de un grupo amino entre L-aspartato y α -cetoglutarato, formando oxalacetato y L-glutamato. Su determinación se realiza acoplando posteriormente la reacción enzimática de la malato deshidrogenasa que convierte oxalacetato, NADH y H^+ en L-malato y NAD^+ , valorándose a 340nm la desaparición de NADH.

Determinación de alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2): Se determina por el "método standard optimado" de la Deutsche Gesellschaft para química clínica (1972). La ALT (GPT) cataliza la transferencia de un grupo amino desde el aminoácido L-alanina hasta el α -cetoglutarato, formando piruvato y L-glutamato. Su determinación se realiza acoplando la reacción enzimática catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que convierte piruvato, NADH y H^+ en lactato y NAD^+ , valorándose la desaparición de NADH a 340 nm.

Determinación de bilirrubina total: Se determina por el método descrito por Walhfeld (1972). La bilirrubina reacciona con un compuesto de diazonio para dar la correspondiente azobilirrubina. La bilirrubina indirecta es liberada por el detergente.

5.- TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Los resultados se presentan como valores medios \pm el error estándar de la media. La significación de las diferencias entre medias se valoró mediante el test de la t de Student, considerándose estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

La placenta es un órgano multifuncional que realiza funciones análogas al sistema respiratorio, riñones, tracto gastrointestinal y sistema endocrino; su misión es mantener el desarrollo normal del embrión/feto. El consumo materno de etanol durante la gestación puede afectar a la función placentaria y, por tanto, al desarrollo fetal; ya que el alcohol y/o su metabolito, el acetaldehído, pueden llegar al embrión a través de la placenta durante la gestación y después del nacimiento por la leche materna.

1.- PARAMETROS MACROSCOPICOS.

1.1.- Parámetros macromorfológicos a los 21 días postparto.

Los resultados obtenidos indican que a los 21 días del parto, las crías de madres tratadas con etanol al 20 % (TE), presentan una disminución con respecto al grupo control (GC), en la longitud intestinal total, peso corporal y hepático. Cuando a las ratas TE les administramos una dieta suplementada (FE) estos valores aumentan significativamente respecto al grupo TE, aunque el peso corporal sigue siendo significativamente inferior y la longitud intestinal y los pesos de hígados no muestran variación significativa respecto a los controles (Tabla 1). Sin embargo, cuando se expresa la longitud intestinal referida al peso corporal, éste es significativamente mayor en las TE ($p < 0.001$) y en la FE ($p < 0.05$).

Tabla 1. Estudio macromorfológico de diversos parámetros en ratas lactantes a los 21 días postparto. Efectos del etanol y de la suplementación de la dieta con diversos nutrientes.

<i>Parámetros</i>	CONTOLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
Nº de crías por camada	12±0.8 n=14	9±0.7** n=14	9±0.8# n=14
Peso corporal (g)	39.7±2.4 n=9	18.1±0.52*,b n=9	26.7±2.3** n=9
Peso cerebro (g)	1.2±0.04 n=9	1.1±0.03b n=9	1.005±0.01* n=9
Peso cerebro / Peso corporal (mg/g)	30.7±0.8 n=9	56.54±1.3*,a n=9	38.65±2.2** n=9
Long. intestino (cm)	49.57±0.7 n=14	40.25±0.9*,a n=14	48.3±0.9 n=14
Long. intest. / Peso corporal (cm/g)	1.79±0.02 n=14	2.44±0.04*,a n=14	1.95±0.07*** n=14
Peso hígado (g)	0.857±0.02 n=14	0.634±0.03*,b n=14	0.852±0.06 n=14
Peso hígado / Peso corporal (mg/g)	31.31±0.06 n=14	39.55±1.2*,a n=14	32.41±0.6 n=14

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 ** ; p< 0.05 ***; p< 0.02 #

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a ; p< 0.01 b

López-Tejero y cols. (1989) estudiaron los efectos que el consumo materno de etanol al 25 %, durante el embarazo, ejerce sobre las crías en el momento del nacimiento y a los 30 días, observando que los neonatos de madres expuestas al etanol, mostraban al nacer un retardo en el desarrollo de los parámetros intestinales (longitud y espesor), así como una disminución en la actividad total de la lactasa y en el contenido de somatostatina. Sin embargo, cuando realizaron el mismo estudio a los 30 días del nacimiento, los parámetros fueron similares en los tres grupos, excepto la longitud intestinal que fue mayor que en los controles; esto sugiere una respuesta adaptativa por parte de las crías, que les podría permitir conseguir pesos corporales similares a los controles al finalizar el período de lactancia, en ausencia de etanol.

En nuestros experimentos, el peso del cerebro es menor aunque carece de significación estadística, en los lactantes de madres que ingieren etanol respecto a las controles. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por Winick y cols. en 1973 y por Stein y Susser en 1975, quienes observaron que los neonatos de madres malnutridas inducidas por el etanol presentan una disminución proporcional, no solo en el peso del cerebro y circunferencia de la cabeza, sino también en el peso y longitud corporal. También otros autores (Lemoine y cols., 1968; Jones y Smith 1973; Ovellette y cols., 1977; Henderson y cols., 1979; Weinberg 1984) han comprobado que los niños nacidos con Síndrome Alcohólico Fetal presentan una disminución en la talla del cerebro y en la circunferencia de la cabeza, pero esta disminución es proporcionalmente menor, a la disminución en el peso al nacer.

Posteriormente Little y cols. en 1984 y Warren y Larason en 1987, comprobaron que la exposición al etanol durante el tercer trimestre del embarazo está asociada a una disminución en el peso del cerebro al nacer y en 1988 Bonthius y cols. han demostrado, que la incidencia de

microcefalia, que es indicativa de una disminución del peso cerebral, es un efecto dosis-dependiente de los niveles de alcohol en sangre.

Nuestros resultados indican que cuando a las ratas que ingieren etanol se les administra una dieta suplementada, no solo no se normaliza el peso cerebral, sino que incluso se hace menor, siendo significativamente inferior que en las controles ($p < 0.001$). Esto coincide, en parte, con los estudios realizados en ratas por Weinberg en 1984, quien observó que a pesar de administrar a la madre una dieta adecuada había una deplección en el peso corporal y del cerebro en las crías al nacer, cuando las calorías que provenían del etanol eran iguales o superiores al 30 % del total de calorías. En nuestro caso, a pesar de la suplementación dietética las calorías que provienen del etanol en este grupo son aproximadamente el 38 % durante el período experimental y se sigue manteniendo un menor peso al nacer y una desproporción en el peso corporal y del cerebro a los 21 días postparto (Tabla 1).

Al expresar el peso del cerebro en relación al peso corporal (mg/g), encontramos un aumento significativo en el grupo TE respecto al GC y FE. Sin embargo, cuando administramos una suplementación dietética junto con el consumo de etanol, la relación aunque no se iguala, disminuye bastante, hasta acercarse a los valores del grupo control (Tabla 1).

En las crías de madres tratadas con etanol, el peso del hígado (g) disminuye al compararlas con GC y FE; sin embargo, en este último aparece una recuperación total en el peso del hígado; pero cuando expresamos el peso del hígado en proporción al peso corporal (mg/g), observamos una evolución similar a la encontrada en el cerebro, ya que hay un aumento en el grupo TE respecto al GC y FE y unos valores similares entre el grupo FE y GC (Tabla 1).

El desarrollo embrión/feto es más vulnerable al efecto tóxico del etanol cuando existe una disminución de ácido fólico, como se evidencia por un aumento en la reabsorción de fetos y una disminución en el número de fetos viables, por el tratamiento con alcohol (Lin y Lester 1985). El mecanismo es desconocido, pero parece ser, que el alcohol tuviera un efecto antagónico sobre el transporte de folato a la placenta. En nuestro estudio, al determinar el número de crías nacidas vivas por madre (Tabla 1), se observa que en el grupo tratado con etanol hay una disminución en el número de crías de un 25 % respecto a las controles. Este descenso persiste aunque se suplemente la dieta materna con ácido fólico, lo que indicaría que el etanol, en este caso, actuaría como antagonista en el tratamiento de folato, evitando que el incremento de ácido fólico en la dieta, ejerza un efecto beneficioso durante la gestación sobre los fetos ya que nacen el mismo número de crías y con el mismo peso (Tabla 1) (Fig. I)

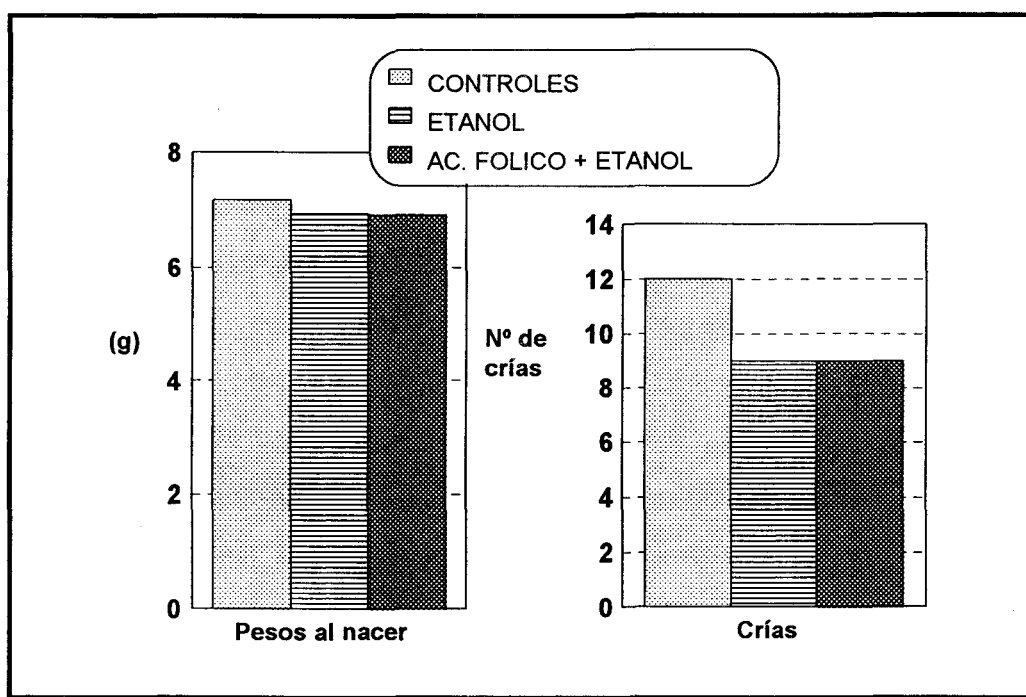


Fig. I.- Número de crías que nacen vivas y sus pesos al nacer.

1.2.- Parámetros intestinales.

Al realizar el estudio de diversos parámetros intestinales, en una longitud de 14 cm de yeyuno (Tabla 2), observamos que el perímetro, la superficie, la relación peso fresco/superficie y peso seco/superficie, son siempre significativamente menor en el grupo TE que en GC. Ricomana y cols. (1986), afirman que un déficit primario de folato causa alteraciones en el desarrollo y funciones de la mucosa intestinal, y en nuestros experimentos, los valores séricos de ácido fólico son menores en las

crías del grupo TE (Tabla 14). Sin embargo, al comparar el grupo FE y TE nos encontramos con que los parámetros anteriormente expuestos son aún menores en las crías del grupo FE, a pesar de tener unos niveles de ácido fólico en suero 4 veces superiores al grupo TE y GC, lo que indicaría, que el menor desarrollo del yeyuno no se puede explicar por los resultados de Ricomena y cols. expuestos anteriormente.

Tabla 2. *Parámetros intestinales en 14 cm de yeyuno.*

<i>Parámetros</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FÓLICO + ETANOL (FE) n=10
Perímetro (cm)	1.4±0.04	1.16±0.08 ***	1.1±0.03 *
Superficie (cm ²)	19.6±0.5	16.3±1.1 ***	15.2±0.4 *
Peso fresco (g)	0.48±0.02	0.34±0.03 **	0.28±0.01 *
Peso seco (g)	0.081±3.23 10 ⁻³	0.061±5.2 10 ⁻³ **	0.052±2.4 10 ⁻³ *
Peso fresco/superf. (g/cm ²)	0.024±6.3 10 ⁻⁴	0.021±1.2 10 ⁻³ #,a	0.017±5.9 10 ⁻⁴ *
Peso seco/superf. (g/cm ²)	0.0042±1.1 10 ⁻⁴	0.0038±1.8 10 ⁻⁴ #,b	0.0032±10 ⁻⁴ *
ml H ₂ O/g tejido.	0.83±4 10 ⁻³	0.82±4 10 ⁻³	0.82±5 10 ⁻³

Los resultados se expresan como la media ± SEM

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.01 **, p< 0.02 ***, p< 0.05 #

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 a; p< 0.02 b

Al realizar el mismo estudio en 14 cm del íleon distal (Tabla 3), el perímetro, la superficie, la relación peso fresco/superficie y peso seco/superficie, son menores en las crías que ingieren etanol que en las controles y sin embargo, a diferencia de lo que pasa en el yeyuno, estos valores son algo mayores, aunque no estadísticamente significativo, en el grupo FE que en el TE.

Tabla 3. *Parámetros intestinales en 14 cm de íleon.*

<i>Parámetros</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FÓLICO + ETANOL (FE) n=10
Perímetro (cm)	1.34±0.05	1.05±0.02 *	1.13±0.05 **
Superficie (cm ²)	18.8±0.7	15±0.5 *	16±0.37 *
Peso fresco (g)	0.38±0.01	0.28±0.02 *	0.35±0.04
Peso seco (g)	0.062±2.6 10 ⁻³	0.044±1.2 10 ⁻³ *	0.049±5.4 10 ⁻³ ***
Peso fresco/superf. (g/cm ²)	0.02±9.1 10 ⁻⁴	0.018±7.5 10 ⁻³	0.02±1.6 10 ⁻³
Peso seco/superf. (g/cm ²)	0.0033±7.3 10 ⁻⁵	0.0029±7.1 10 ⁻⁵ **	0.0029±1.2 10 ⁻⁴ #
ml H ₂ O/g tejido	0.83±6.2 10 ⁻³	0.84±8.7 10 ⁻³	0.84±3.6 10 ⁻³

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *; p< 0.01 **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 *; p< 0.01 **; p< 0.05 ***; p< 0.02 #

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: N.S.

2.- ESTUDIO NUTRICIONAL EN LAS MADRES DURANTE LA LACTANCIA.

2.1.- Dieta sólida.

Las madres del grupo TE consumen significativamente menos pienso por día que las del grupo control, y la comida ingerida por la madre (Tabla 4) durante el período de lactancia es significativamente menor en el grupo FE ($p < 0.001$) que en GC y TE. El hecho de que consuman menos pienso puede ser debido a que la dieta que ingieren presenta distinta composición y está enriquecida en L-aminoácidos y ácido fólico y, sobre todo, contiene un mayor aporte calórico, 3.9 Cal/g, mientras que en los otros dos grupos la dieta presenta una energía metabolizable de 2.9 Cal/g.

Tabla 4. Comida ingerida (g/día) por las madres durante el período de lactancia.

	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FÓLICO + ETANOL (FE) n=10
1ª Semana	39.73±4	20.5±1.24 *,c	14.8±1.9 *
2ª Semana	47.7±3.7	25.72±0.67 *,b	17.7±2.4 *
3ª Semana	74.54±6.3	36.28±2.6 *,a	20.5±1 *

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ *

Control vs Ac. Fólico+Etano: $p < 0.001$ *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a ; $p < 0.01$ b ; $p < 0.05$ c

Cuando estudiamos la variación en la ingesta de ácido fólico (Tabla 5), observamos que en los tres grupos la ingesta aumenta a lo largo de la lactancia, siendo significativamente menor en el grupo TE con respecto a los otros dos y significativamente mayor en el FE respecto al TE. Se observa que los suplementados con ácido fólico en las dos primeras semanas ingieren significativamente más ácido fólico que las controles y, por supuesto, que las del grupo tratado con etanol. Sin embargo, en la tercera semana la ingesta de ácido fólico en el grupo FE, aunque sea mayor que en los controles, no tiene significación estadística.

Tabla 5. Consumo de ácido fólico contenido en la dieta materna expresada en mg de ác. fólico/día.

	CONTROL (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FÓLICO + ETANOL (FE) n=10
1ª Semana	0.079±0.008	0.041±0.0025 *,a	0.118±0.015 **
2ª Semana	0.095±0.0074	0.051±0.0013 *,a	0.142±0.019 **
3ª Semana	0.149±0.013	0.072±0.0052 *,a	0.164±0.008

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.05 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a

Al estudiar la ingesta de zinc (Tabla 6), observamos que en los tres grupos, la ingesta aumenta a lo largo de la lactancia, siendo significativamente menor en los grupos tratados con etanol respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo FE presenta valores significativamente inferiores al grupo

TE y GC debido a que los tres grupos ingieren la misma proporción de zinc en la dieta, pero sin embargo, el grupo FE consume menos pienso durante la lactancia que el grupo TE, y por supuesto que el GC.

Tabla 6. Consumo de zinc contenido en la dieta materna expresado en mg de zinc/día.

	CONTROL (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FOLICO+ETANOL (FE) n=10
1ª Semana	1.2±0.12	0.6±0.04 *,b	0.4±0.06 *
2ª Semana	1.4±0.1	0.7±0.02 *,a	0.5±0.07 *
3ª Semana	2.3±0.2	1.1±0.08 *,a	0.6±0.03 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a; $p < 0.05$ b

2.2.-Dieta líquida.

La cantidad de bebida ingerida (expresada en ml) (Tabla 7) durante la 1ª semana de lactancia es mayor en las ratas del grupo FE que en las TE, pero siempre menor que en las controles. Sin embargo, en la 2ª y 3ª semana, las ratas que ingieren la dieta suplementada (FE), beben menos que las del grupo TE, y el grupo control es el que ingiere mayor cantidad de bebida. La relación entre ingesta sólida (Tabla 4) y líquida (Tabla 7) durante las 3 semanas es prácticamente igual (1.5) en las ratas controles y TE. Sin embargo, la proporción aumenta en

las ratas del grupo FE (2.13), quizás debido a que la dieta suplementada produciría un aumento en la osmolaridad plasmática y por tanto se estimularía el centro de la sed.

Tabla 7. *Bebida ingerida (ml/día) por la madre durante la lactancia.*

	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FÓLICO +ETANOL (FE) n=10
1ª Semana	62.6±3.2	23.89±3.1*,b	31.9±2 *
2ª Semana	75.9±3.7	46.24±6.7 **	40.8±1.2 *
3ª Semana	104.6±9.7	59.43±5.42 *,a	40±2.8 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 a ; p< 0.05 b

2.3.-Estudio de la ingesta calórica.

Durante la lactancia las ratas del grupo FE, ingieren menos calorías en la dieta sólida que las que consumen etanol, siendo estas diferencias significativas en la 3ª semana. Las que consumen etanol van aumentando la ingesta sólida a medida que avanza la lactancia, pero siempre, es significativamente menor que las controles (Tabla 8).

Tabla 8. Consumo materno de calorías (cal/día) derivado de la ingesta de comida sólida.

	CONTROL (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
1ª Semana	115.21±11.62	59.49±3.6 *	57.72±7.41 *
2ª Semana	138.23±10.89	74.58±1.9 *	69.03±9.36 *
3ª Semana	216.17±18.2	102.97±7.3 *,a	79.95±3.9 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.02 a

Tabla 9. Consumo calórico por días derivado de la ingesta materna de etanol al 20 %.

	ETANOL (TE)	AC. FOLICO+ETANOL (FE)
	n=10	n=10
1ª Semana	26.69±3.45 a	35.86±2.23
2ª Semana	46.15±5.49	46.22±1.34
3ª Semana	67.54±3.65 b	45.02±3.09

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.05 a; p< 0.001 b

Tabla 10. *Calorías totales por día consumidas por la madre derivadas de la ingesta de comida sólida y líquida.*

	CONTROL (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
1ª Semana	115.21±11.62	86.18±7 *	93.58±9.6
2ª Semana	138.23±10.89	120.73±7.4	115.25±10.7
3ª Semana	216.17±18.2	170.5±11 *,a	124.97±7 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol y Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.05$ *

Control vs Ac Fólico+Etanol: $p < 0.001$ **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.01$ a

Las calorías aportadas por la ingesta de comida sólida (Tabla 8) en los grupos tratados con etanol representan el 64 y 62 % de las calorías totales ingeridas en el grupo TE y FE respectivamente. En estos dos grupos, el aporte calórico que proviene del etanol (Tabla 9) son respectivamente el 36 % y 38 % del total de las calorías ingeridas. A pesar del suplemento calórico que resulta de la ingesta de etanol, el aporte calórico total (derivado de la ingesta de comida y bebida) en los 21 días (Tabla 10) es un 20 y 25 % menor en los grupos tratados con etanol que en los controles. Esto repercutirá en el peso de las madres durante la lactancia

(Tabla 12) que viene a disminuir un 8 % en el grupo TE y un 12 % en el grupo FE, respecto a los controles. En la 1ª semana el consumo de calorías totales es algo mayor en el grupo FE que en el TE, sin embargo, en la 3ª semana esta ingesta es significativamente menor en las madres del grupo FE respecto a las del grupo TE.

El hecho de que la madre no tenga una dieta adecuada juega un importante papel en el desarrollo del Síndrome Alcohólico Fetal (Abel y cols., 1980; 1982; 1984; 1989; 1995; Weinberg 1985; Goad 1984). Weinberg en 1985 había comprobado que a pesar de administrar a la madre una dieta adecuada, aparecía una disminución en el peso corporal y del cerebro de las crías al nacer cuando las calorías que provenían del etanol eran igual o superior al 30 % de las calorías totales. Otros autores (Weiner y cols. 1981; Gordon y cols. 1985), sugirieron que cuando las calorías que provienen del etanol eran menores que el 30 % del total, los pesos fetales de los animales en el momento del nacimiento no disminuyen significativamente, pero el peso de la placenta aumenta; sin embargo, cuando el etanol aporta más del 30 % de las calorías totales ingeridas, se afecta tanto el peso de la placenta como el crecimiento fetal (Henderson y cols. 1982; Ghishan y cols., 1982; Weinberg 1985; Fisher y cols., 1985; Lin 1988). Esto coincide con nuestros resultados, ya que la ingesta calórica que proviene del etanol en la madre es superior al 30 % en los dos grupos y en ambos disminuye el peso de las crías en el momento del nacimiento en un 3.6 %, con respecto al grupo control (Tabla 11).

3.- PESOS CORPORALES DE LAS CRIAS Y DE LAS MADRES DURANTE EL PERIODO DE LACTANCIA.

En los estudios epidemiológicos, se utiliza el peso al nacer como posible indicador del retardo en el crecimiento intrauterino para ver la asociación entre el consumo de alcohol y las lesiones fetales (Little 1989). Según nuestros resultados, en el momento del nacimiento (Tabla 11) no existen diferencias significativas entre el peso de las crías de madres que ingieren etanol o etanol con dieta suplementada, respecto a las controles. Estos resultados no coinciden con los de Little (1980; 1984) y Weiner y Larson (1987), quienes afirmaron que el alcohol administrado durante el tercer trimestre de embarazo disminuye el peso de las crías al nacer. Según Streissguth y cols. (1980), Buts (1992), los bajos pesos al nacer y el retardo en el crecimiento postnatal, son las características más documentadas de la exposición prenatal al etanol.

Tabla 11. *Pesos corporales (g) de las crías desde el día 1 al 21 de lactancia.*

	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
Día 1	7.16±0.4	6.93±0.2	6.9±0.2
Día 7	14.44±1.1	11.28±0.46 ***,c	13.7±0.8
Día 14	22.43±1.3	15.53±0.62 *,b	21±1.6
Día 21	39.7±2.4	18.1±0.52 *,a	26.7±2.3 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.02 ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a ; p< 0.01 b ; p< 0.02 c

Durante el período de lactancia, cada vez se observan más las diferencias en el peso entre los lactantes del grupo TE y los controles (Tabla 11). Al nacer las diferencias no son significativas, pero el nivel de significación aumenta desde la 1ª semana ($p < 0.02$), a la 2ª ($p < 0.01$) y a la 3ª ($p < 0.001$). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Subramanian (1995), que encontró una disminución en el crecimiento de las crías de madres expuestas crónicamente al etanol durante los días 5-12 de lactancia.

La ingesta crónica de etanol produce alteraciones gastrointestinales en mamíferos adultos (Barona y cols., 1974; Perlow y cols., 1977; Becker y Dinda 1981; Raul y cols., 1982), pero esto es difícil extrapolarlo a fetos o a crías de madres que ingieren etanol.

La última fase del período prenatal es crítica y vulnerable para el feto, y en ella se detecta el programa genético encargado de que aparezcan las diferentes enzimas del intestino delgado (Corring y cols., 1982; Hamosh 1982).

La exposición prenatal al etanol durante la gestación, disminuye la capacidad intestinal de los neonatos para digerir las proteínas (Raul y cols., 1987) y disminuye la actividad de la aminopeptidasa durante el período de lactancia, en las crías de ratas que habían sido expuestas crónicamente al etanol durante la gestación y en las que se retiró el alcohol en el momento del nacimiento, pudiendo esto contribuir al bajo peso de las crías lactantes, que en nuestro caso, estaría potenciado por el efecto del etanol durante la lactancia.

Los lactantes del grupo FE, tienen unos pesos significativamente mayores que los del grupo TE y prácticamente iguales a los controles, excepto al final del período de lactancia (3ª semana) que son significativamente inferiores al GC (Fig. II). El aumento significativo del peso a partir del día 7, en las crías FE respecto a las tratadas solo con etanol, es debido al efecto positivo que ejerce la suplementación con ácido fólico y aminoácidos. Estos resultados coinciden con los aportados por Gutjahr y Schmitt (1984), quienes comprobaron que en el estudio de enfermedades gastrointestinales que acompañan al Síndrome Alcohólico Fetal existía una recuperación en el crecimiento, a lo largo de un periodo en el que se ingiere una dieta suplementada.

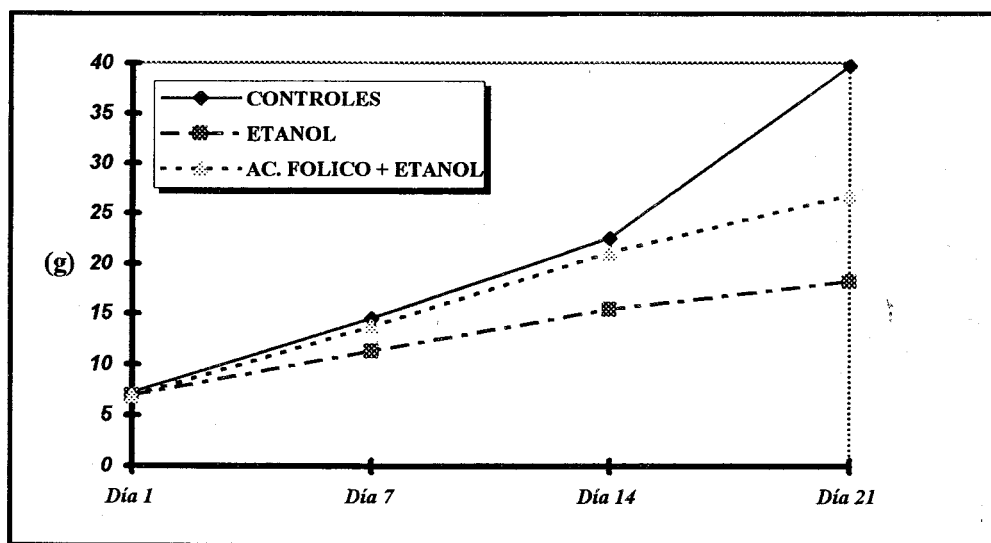
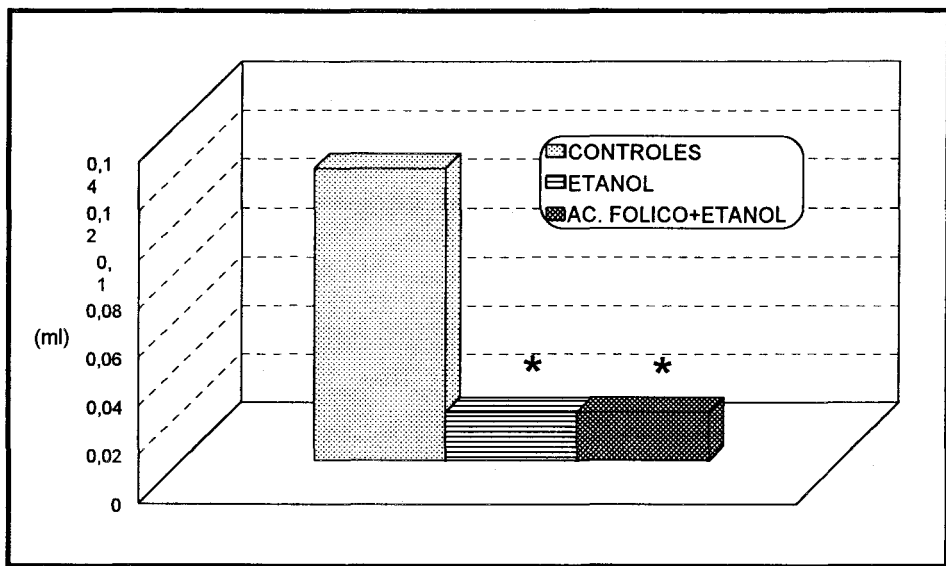


Fig. II.- Pesos corporales (g) de las crías desde el día 1 al 21 de lactancia.

Middagh y Boggan en 1991 concluyen, que a bajas dosis de etanol, los pesos de las ratas expuestas prenatalmente al etanol, son comparables a los de los controles, desde el nacimiento hasta el destete; sin embargo, al aumentar la dosis, manifiestan quedarse permanentemente más pequeños que los controles. Esto coincide con nuestros resultados, ya que estamos administrando una dosis relativamente alta, el 20 %, y el peso de las crías disminuye desde el día 7 de nacimiento hasta el 21 en los dos grupos TE y FE, aunque en este último, la disminución no es significativa.

Todos los resultados obtenidos indicarían, que respecto al peso corporal, el etanol podría ejercer un efecto más negativo durante la lactancia que durante el embarazo, ya que en el momento del nacimiento no hay variación significativa entre los tres grupos estudiados. Este efecto, puede ser debido a los efectos tóxicos directos del alcohol y/o sus metabolitos y también por la disminución en el volumen de leche ingerido por los lactantes, ya que según varios autores (Ovellette y Rosette, 1977; Martin y cols, 1979; Van Dyke y cols., 1982; Subramania 1995), estas crías tienen disminuida la habilidad para mamar, presentando una menor frecuencia e intensidad de succión y son incapaces de ejercer una presión adecuada al mamar (Chen y cols., 1982; Rockwood y Riley, 1986).

Nuestros resultados indican una disminución en la producción de leche en los grupos tratados con etanol durante un período de 180 min. en el que las crías permanecieron retiradas de las madres (Fig. III).



Control vs Etanol: $p < 0.01$ *

Control vs Ac. Fólico + Etanol: $p < 0.01$ *

Fig. III.- Leche producida (ml) por las madres durante 180 minutos.

Además de estos efectos sobre el lactante, en las madres que ingieren alcohol, se ha comprobado que se inhibe, en parte, el reflejo de secreción de prolactina en respuesta a la succión del pezón (Surbramianiam 1995) y también está inhibida la secreción de oxitocina (Cobo y Quintero, 1969; Gibbens y Chard, 1976; Wagner y Fuchs, 1978). Como consecuencia de estas dos acciones del etanol, la hembra produce y segrega menos leche. Recientemente Subramianiam (1995) ha observado que la leche consumida por las crías, durante un período de 30 minutos en el que estaban mamando, era menor en el grupo cuyas madres ingerían etanol a

elevadas dosis. Este efecto inhibitor del etanol sobre la producción de leche, es evidente durante un período de 60 minutos cuando se administra alcohol de forma aguda, pero no más de 3 horas. La causa parece ser debida a que el alcohol inhibe la liberación de oxitocina afectando la eyección de leche por las glándulas mamarias. Además, a los 30 minutos de mamar, los niveles plasmáticos de prolactina en ratas que consumían alcohol, estaban disminuidos respecto a los controles.

Todos estos efectos del etanol hacen que lleguen menos sustancias nutritivas al lactante y lógicamente trae como consecuencia una disminución del crecimiento de las crías, cuyas madres ingieren etanol durante la lactancia respecto a los controles, haciéndose mayores las diferencias desde el momento de nacer hasta el final del periodo experimental (Fig. II), y se refleja en el peso corporal de las madres durante la lactancia (Tabla 12), pues mientras en GC y FE pierden paulatinamente peso, las tratadas con etanol prácticamente pesan lo mismo al comienzo de la lactancia que al final (Fig IV), lo que indicaría un menor paso de sustancias nutritivas de la madre a las crías a través de la leche. Así se puede observar, que en el día 1 las madres de menor peso son las del grupo TE y en el día 21 sucede lo contrario.

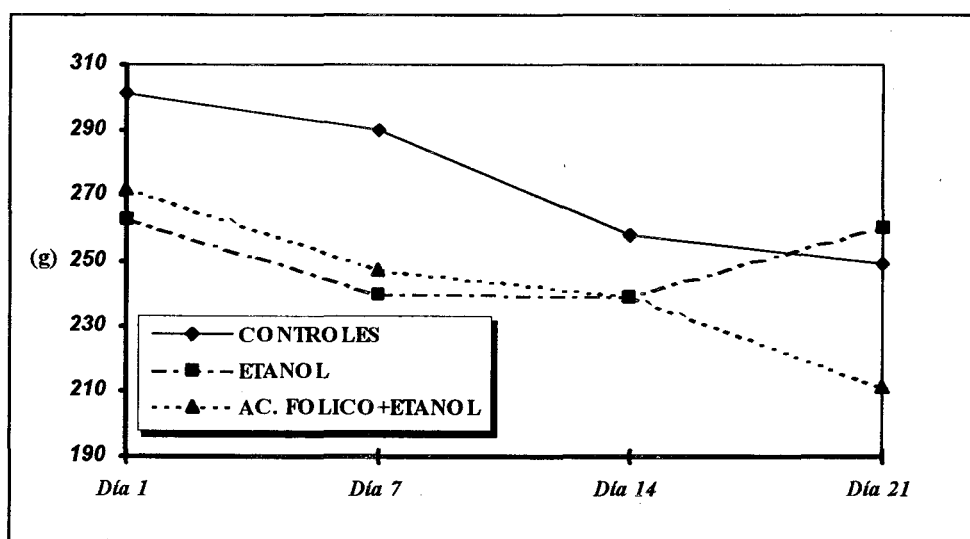


Fig. IV.- Pesos corporales (g) de las madres durante el periodo de lactancia.

La mayor disminución en el peso de las madres tratadas con FE se refleja en un aumento en el peso de las crías, pero en el grupo TE la disminución de pesos de las madres es menor y el aumento en las crías es también menor.

Tabla 12. Pesos corporales (g) de las madres durante el período de lactancia.

	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
Día 1	301±13.7	263±7.3 ***	272±16.1
Día 7	290±13.2	240±7.7 *	247±7.7 *
Día 14	258±12.4	239±8.3	239±11.3
Día 21	249±5.02	260±7.4 a	211±9.6 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.02 * ; p< 0.05 ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.02 * ; p< 0.01 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 a

López-Tejero y cols. (1989) y Través y Lopéz-Tejero (1993) han comprobado que la ingesta crónica de etanol antes y durante la preñez produce, en general, una disminución en el peso corporal de las madres y los fetos, mientras que en las ratas vírgenes, aunque la ingesta calórica sea similar, el efecto es menor. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Wiener y cols., 1981; Sanchís y cols., 1986; 1986a; Terstar y cols., 1986; 1988).

4.- ESTUDIOS SERICOS EN MADRES Y CRIAS.

4.1.- Niveles de zinc en suero.

Al comparar los valores de zinc en suero de las madres y lactantes (Tabla 13) nos encontramos que en el grupo control el zinc es significativamente mayor en las lactantes que en las madres (Fig. V). En el grupo que ingiere etanol, es mayor aunque no significativamente, en las madres que en las crías y en el grupo FE es prácticamente igual en madres y crías; ya que en situaciones de embarazo o lactancia, cantidades importantes del metal se transfieren diariamente de la madre al feto o al lactante (Linder 1988). Como en el grupo que ingiere etanol el zinc en suero es menor en las crías, pensamos que el etanol de alguna forma debe disminuir el transporte de zinc por la placenta y/o leche y al pasar menos; los valores séricos de zinc son mayores en las madres del grupo TE que en las controles.

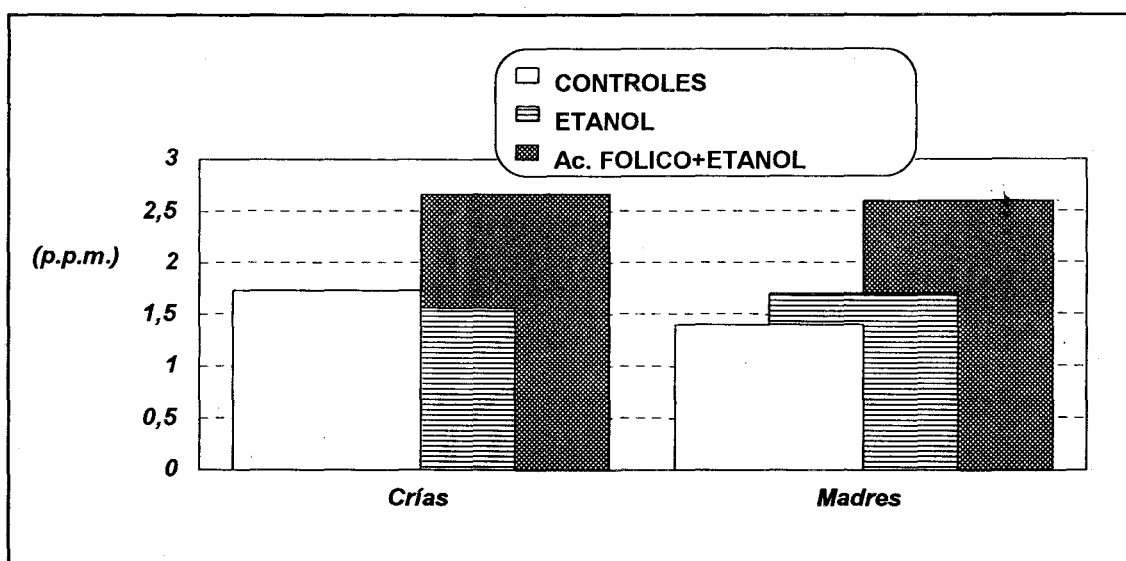


Fig. V.- Niveles de zinc (p.p.m.) en el suero de las madres y de las crías a los 21 días postparto

Tabla 13. Niveles de zinc (ppm) en el suero de las madres y de las crías a los 21 días postparto.

	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
<i>Zinc en suero</i>	n=14	n=14	n=14
Crías	1.73±0.04	1.56±0.09 b	2.66±0.29 **
Madres	1.4±0.07	1.7±0.1*,a	2.6±0.16 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.05 *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a ; p< 0.01 b

Flynn en 1981 ya había demostrado que los niveles de zinc en el plasma materno y umbilical del feto eran más bajos en las mujeres alcohólicas. Y diversos autores (Pantwardham y cols., 1981, Lin 1981a; 1982b Ghisham y cols. 1982; Snyder y cols., 1986) han comprobado que las ratas alimentadas con un porcentaje de alcohol entre el 30 y 36 % del total de las calorías consumidas, reducen los niveles "in vivo" de transferencia placentaria de glucosa, zinc y otros nutrientes. Sin embargo, estos resultados son al final del embarazo y los nuestros al final de la lactancia.

Ghishan y Greene en 1983, afirmaron que la suplementación en zinc no revierte el déficit en la transferencia placentaria de este mineral. Según nuestros resultados la suplementación de la dieta con diversos nutrientes, aumenta los niveles de zinc en suero de madres y crías haciéndolos superiores a las controles. Pero la transferencia es menor, porque los valores de

zinc en las crías son solo iguales pero no superiores a los de las madres como sucede en las controles (Tabla 13).

4.2.- Niveles de ácido fólico en suero.

En los tres grupos estudiados los valores de ácido fólico en suero (Tabla 14) son siempre significativamente superiores en las madres que en los lactantes. Siendo siempre menores en las madres y crías del grupo tratado solo con etanol, que en las controles y los valores mayores se encuentran en el grupo FE. Lo que indicaría la importancia, en estos casos, del suplemento de ácido fólico en la dieta (Fig. VI).

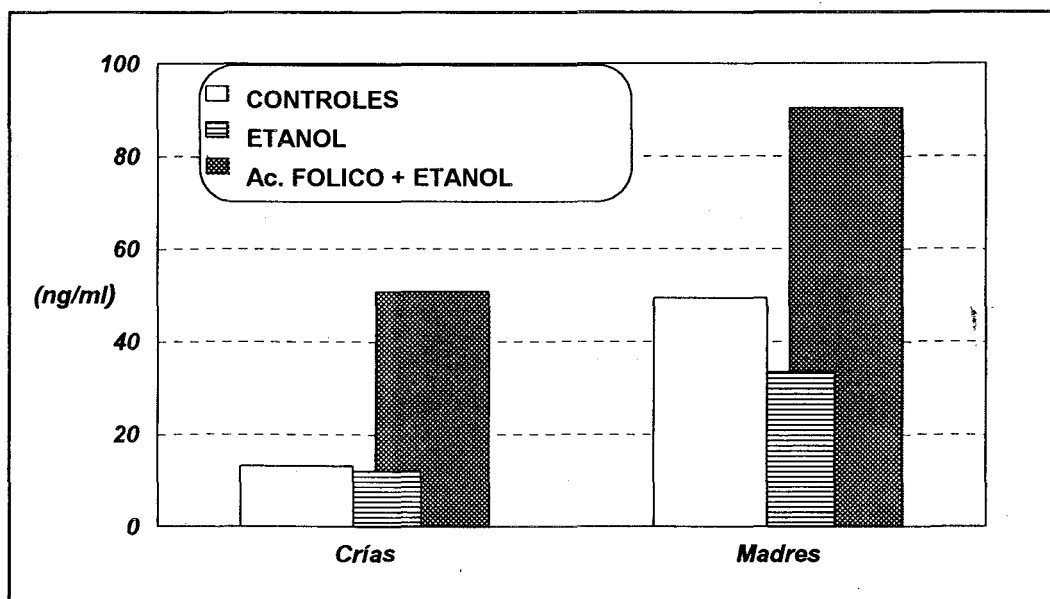


Fig. VI.- Valores de ácido fólico (ng/ml) en el suero de las madres y las crías a los 21 días postparto.

Tabla 14. *Valores de ác. fólico (ng/ml) en el suero de las madres y las crías a los 21 días postparto.*

	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
<i>Ac. Fólico en suero</i>	n=14	n=14	n=14
Crías	13.3±0.8	12.16±0.6 a	50.9±5.2 **
Madres	49.44±6.6	33.6±1.42 *,a	90.39±6 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p<0.05 *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p<0.001 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p<0.001 a

Goldenberg y cols. (1992), estudiaron en mujeres gestantes a las que se les había suplementado con folato, la relación entre los niveles séricos materno y crecimiento fetal a las 30 semanas de gestación, encontrando que había una relación significativa entre la disminución de los niveles séricos y el retardo en el crecimiento fetal. Sin embargo, el suplemento con ácido fólico, incrementaba el peso al nacer. Nuestros resultados, no coinciden con los de este autor, debido a que las crías del grupo FE pesan igual que las del TE en el momento del nacimiento (Tabla 11), posiblemente por el efecto del etanol.

Sin embargo, durante la lactancia, el suplemento con ácido fólico hace que aumenten los niveles séricos en las crías, haciéndose incluso superiores a las controles (Tabla 14), y de alguna forma este suplemento debe influir en el incremento de peso corporal (Tabla 11) que se encuentra en el grupo FE respecto al grupo tratado solo con etanol, pero sigue siendo

significativamente inferior a los controles, lo que indicaría, que la suplementación tiene un efecto beneficioso sobre el peso, pero no suficiente, debido posiblemente a la interacción con el etanol.

De hecho Fisher y cols. (1985), en un estudio realizado en ratas, observaron que el tratamiento crónico con etanol durante el embarazo, disminuía los receptores de la placenta para el ácido fólico sugiriendo menor transferencia de este nutriente. Sin embargo, posteriormente en 1991 Lin (1991a) concluyó que el etanol no tendrá su efecto tóxico por disminuir el transporte de folato por la placenta sino que posiblemente su efecto es debido, a que interfiere en el metabolismo del ácido fólico, inhibiendo distintas enzimas.

5.- ESTUDIO NUTRICIONAL EN LAS CRIAS.

5.1.- Niveles de zinc en la leche materna.

El zinc contenido en la leche (Tabla 15), es mayor en los grupos que consumen etanol que en los controles, siendo estos valores paralelos a los niveles de zinc detectados en los sueros maternos en los tres grupos estudiados.

Tabla 15.- Niveles de zinc (p.p.m.) en leche a los 21 días postparto.

	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10	AC. FOLICO+ETANOL (FE) n=10
Zinc	57±8	77.5±15	97.6±9

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: N.S.

Control vs Ac. Fólico+Etanol: N.S.

Etanol vs. Ac. Fólico+Etanol: N.S.

Sin embargo, la relación entre los niveles lácteos y séricos de las crías es mayor en el grupo que ingiere etanol (49.7) que en el grupo FE (36.7) y que en las controles (32.9). Estos resultados indican que las crías de madres tratadas con etanol captan más zinc que las controles

y que las del grupo FE; aunque en las crías del grupo TE la cantidad de zinc en el suero es menor que en el grupo control y que en el FE.

La relación entre los niveles séricos y el contenido de zinc en la leche materna, indican que las madres del grupo TE concentran algo más de zinc en leche (45.6) que las controles (40.7), pero sobre todo la relación es más pequeña en el grupo FE. Todo parece indicar que en el grupo FE disminuyen el porcentaje de transferencia de zinc del suero materno hacia las crías.

La biodisponibilidad del zinc en la leche de distintas especies depende del tipo de proteína de la leche, de su digestibilidad relativa y de la cantidad de zinc potencialmente disponible de entrar como quelato de bajo peso molecular.

En la leche existe un sustancial contenido de ácidos libres que pueden actuar como ligandos de unión del zinc en la absorción (Cousins y Smith 1980; Martin y cols., 1981).

A las ratas del grupo FE se les suministra una dieta suplementada en aminoácidos y Kirchgessner y cols., (1976) demostraron que la disponibilidad del zinc aumentaba cuando provenía de quelatos de aminoácidos; pero la biodisponibilidad será mayor en el grupo FE que en TE y en grupo control, debido a que el aumento en la proteína dietética, hace que los enlaces entre aminoácidos actúen como ligandos para el zinc en el lumen intestinal, aumentando la absorción en el grupo FE y por tanto aumenta significativamente la cantidad de zinc en el suero de las crías (Tabla 15).

5.2.- Niveles de ácido fólico en leche materna.

El ácido fólico contenido en leche (Tabla 16) es significativamente menor en las ratas que consumen alcohol que en las controles y significativamente mayor en el grupo FE; o sea, guarda un alto paralelismo con los datos de ácido fólico encontrados en los sueros maternos o de las crías en los tres grupos estudiados (Tablas 16).

Tabla 16. Niveles de ácido fólico (ng/ml) en leche a los 21 días postparto.

	CONTROLES (GC) n=14	ETANOL (TE) n=14	AC. FOLICO+ETANOL (FE) n=14
Acido Fólico	97.33±7	72±16.7 a	145±9 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: N.S.

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p<0.01 *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 a

Sin embargo, la relación entre los niveles lácteos y séricos de las crías es mayor en las controles (7.4) que en el grupo que ingiere etanol (6) y que en el grupo FE (3). Estos resultados indican que las crías de madres que ingieren etanol captan proporcionalmente menos el ácido fólico de la leche que las controles y sobre todo, pone de manifiesto, la baja proporción en el grupo FE. La relación entre los niveles séricos y los niveles lácteos de los distintos grupos

de madres, indican que las que ingieren etanol concentran algo más de ácido fólico en leche que las controles 2.1 y 1.9 respectivamente; pero sobre todo, la relación es más pequeña en el grupo FE (1.6).

Todo esto parece indicar que en el grupo FE, la suplementación es tan alta que incluso suele disminuir el porcentaje de transferencias de ácido fólico del suero materno hasta las crías, bien por disminuir el porcentaje de ácido fólico que pasa del suero a la leche, o bien, por una menor utilización del ácido fólico contenido en la leche.

6.- ENZIMAS HEPATICAS Y BIOQUIMICA SERICA.

6.1.- Valoración de la actividad Alcoholdehidrogenasa (ADH) hepática en crías lactantes.

El enzima citosólico Alcoholdehidrogenasa (ADH), cataliza la conversión de etanol en acetaldehído, siendo esta vía mayoritaria para la eliminación del alcohol (Lieber 1977).

En la oxidación del etanol mediada por ADH, el H^+ es transferido del sustrato al cofactor NAD^+ , que se transforma en NADH, produciendo acetaldehído. Los productos resultantes de la oxidación del etanol en el hígado (acetaldehído y NADH) parecen ser los responsables de la mayoría de las lesiones producidas por el alcohol a nivel celular, bien por la acción tóxica directa del acetaldehído o bien por el aumento del cociente $NADH/NAD^+$ que modifica el estado redox produciendo trastornos en el metabolismo de los principios inmediatos, hipoglucemia, aumento de los niveles de lactato y juega un importante papel en el desarrollo de afecciones hepáticas en pacientes alcohólicos (Lieber 1977).

El mecanismo específico por el que el feto metaboliza el etanol, aún no se conoce. En los embriones en desarrollo, la desintoxicación del etanol, puede depender de los enzimas del hígado materno o de otros sistemas enzimáticos como Sistema Microsomal Oxidativo (MEOS) capaz de oxidar el etanol en presencia de NADH y oxígeno (Lieber y DeCarli 1970; Través y López-Tejero 1993). La actividad de la ADH hepática en los fetos de ratas no se ha detectado hasta el día 20 de gestación (Través y López-Tejero 1993).

Existen controversias en los resultados para cuantificar la actividad de la ADH, ya que dependerá de las condiciones generales de temperatura, pH y concentración de sustrato; así como del modelo de alcoholización crónico (Koirula y Lindros 1975; Guerri y Grisolia 1982; Messiha y Varma 1983; Card y Brien 1989).

Hawkins y cols., (1966;1972) observaron un aumento en la actividad de la ADH después del consumo crónico de etanol; por el contrario otros autores (Kalant y cols., 1975; Videla y cols., 1973; Raskin y Sokoloff 1972; DeSaint-Blanquat y cols., 1972; Siegers y cols., 1977) encontraron que la actividad de ADH no aumentaba después de la administración de etanol; en algunos estudios en realidad hubo una disminución en la actividad hepática de ADH después de la ingesta crónica de etanol (Brighenti y Pancaldi 1970; Lieber y De Carli 1970; Salaspuro y cols., 1981).

En animales preñados se ha detectado una disminución en la actividad ADH hepática (Koivula y Lindros 1975; Guerri y Grisolia 1982; Zurzano y cols., 1989), al igual que en ratas preñadas que ingieren etanol, respecto a ratas vírgenes.

Los resultados que hemos obtenido al determinar la actividad específica de ADH hepática (U/mg proteínas) en las crías a los 21 días del nacimiento (Tabla 17), indican una disminución significativa en la actividad ADH en las crías de madres tratadas con etanol respecto al GC y FE. Sin embargo, en el grupo FE observamos un aumento significativo en la actividad del enzima respecto al GC y TE.

Tabla 17. *Actividad enzimática de la Alcoholdehidrogenasa (ADH) hepática en las crías a los 21 días postparto.*

	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
<i>Parámetros</i>	n=14	n=14	n=14
Peso de hígado (g)	0.86±0.02	0.65±0.035 *,b	0.89±0.08
mg proteína/ml	27.97±2.48	39.34±3.27 **,a	16.06±1.24 *
U/mg proteína	0.065±0.007	0.047±0.004***,a	0.103±0.006 *
U/g hígado	2.04±0.06	2.46±0.22 c	1.89±0.17
Peso híg./peso corp (mg/g)	31.31±0.06	39.55±1.2 *,a	32.41±0.6

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.02 ** ; p< 0.05 ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a ; p< 0.02 b ; p< 0.05 c

Este comportamiento contradictorio entre los dos grupos tratados con etanol se podría explicar teniendo en cuenta en primer lugar, que las crías del grupo TE presentan un aumento significativo en la cantidad de proteínas (mg/ml) respecto al grupo GC y FE; y en segundo lugar, al aumento encontrado en la relación peso hígado/peso corporal, en el grupo TE respecto al GC; no existiendo variación entre GC y FE (Tabla 17).

Los depósitos de grasas son una de las manifestaciones más tempranas y notable del daño hepático producido por el alcohol, junto con el crecimiento hepático, esta patología se atribuía tradicionalmente a la acumulación de lípidos. Sin embargo, en animales alimentados con dieta que contenía alcohol, correspondió a los lípidos solo el 50 % del aumento del peso hepático (Lieber y cols., 1965) y el 50 % restante correspondería al aumento de las proteínas (Baraona y cols., 1975), posiblemente secundario a los trastornos producidos por el acetaldehído. Esta podría ser una de las posibles causas del incremento de proteínas encontrado en el grupo TE, debido a que presentan un incremento significativo en la relación peso de hígado/peso corporal, que no aparece en el grupo FE.

Además de todo esto, tendremos que tener en cuenta, que la Alcoholdehidrogenasa es una metaloenzima dependiente de zinc; según Bettger y O'Dell (1981) una disminución en el contenido de zinc, disminuiría la actividad de la ADH y de este modo retardaría la eliminación del etanol. En nuestro estudio, las crías de madres tratadas con etanol presentan disminuida aunque no significativamente, los niveles de zinc séricos (Tabla 13) con respecto al grupo control, por lo que es razonable, que presenten disminuido la actividad específica de ADH hepática (Tabla 17); sin embargo, el grupo FE tiene aumentado significativamente los niveles de zinc sérico respecto al grupo TE y GC, siendo los valores significativamente superiores a los controles, lo que implicaría un aumento en la actividad específica, incluso superior, al grupo control (Fig. VII).

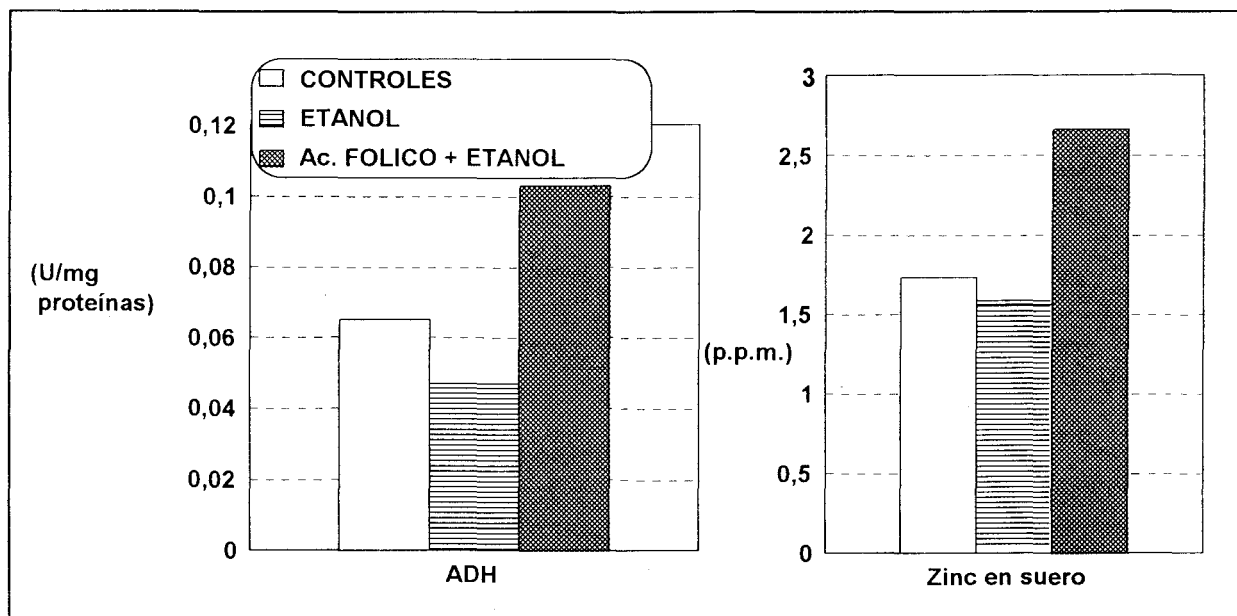


Fig. VII.- Actividad enzimática Alcoholdehidrogenasa hepática y valores de zinc en suero de crías lactantes a los 21 postparto.

6.2.- Parámetros bioquímicos séricos.

Al estudiar diversos parámetros bioquímicos séricos en las crías a los 21 días (Tabla 18), se observa que las proteínas (g/dl) prácticamente no varían en los tres grupos estudiados. Sin embargo, los grupos tratados con etanol presentan una ligera hipoglucemia. Además se advierte un aumento de la bilirrubina y de las enzimas séricas en los grupos tratados con etanol.

Tabla 18. *Parámetros bioquímicos en el suero de las crías a los 21 días postparto.*

<i>Parámetros</i>	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=14	n=14	n=14
Proteínas (g/dl)	4.27±0.05	4.2±0.11	4.44±0.09
Glucosa (mg/dl)	127±4.63	106±10.5	111±4.24 *
Bilirrubina total (mg/dl)	0.07±0.01	0.09±0.01	0.15±0.025 *
GOT (U/l)	167±8.1	182±3.4	192±19.9
GPT (U/l)	8±0.09	18±0.9 **	19±1.21 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.02 *; p < 0.001 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: N.S.

Teschke y cols., (1977) estudió el síndrome de hepatitis alcohólica y observó que a menudo cursa con hiperbilirrubinemia y aumento de GOT (AST), a diferencia de las hepatitis vírales, en la que aumenta la GPT. También son frecuentes cambios hematológicos que incluyen anemia, leucopenia y ligera trombocitopenia, que suele guardar relación con la lesión hepática o quizás se expliquen por factores nutricionales como deficiencia de ácido fólico o por el efecto tóxico del alcohol (Solberg y cols., 1975).

7.- ESTUDIOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL "IN VIVO".

7.1- Niveles de pH intestinal tras la perfusión.

Los valores de pH tras realizar la perfusión en yeyuno (Tabla 19) e íleon distal (Tablas 20), son significativamente más ácidos para casi todas las concentraciones en las crías cuyas madres ingieren etanol que en las controles. En principio se podría pensar, que la causa fuera un aumento en la secreción ácida del estómago y/o una disminución en la secreción pancreática alcalina, sin embargo, como solo perfundimos segmentos aislados a los que no llega la secreción gástrica ni pancreática; la causa debe ser alguna alteración en el intercambio electrolítico a nivel de la mucosa intestinal producido por el etanol y que se mantiene a pesar de que la dieta esté suplementada; ya en 1978 Kuo y Shanbour habían observado que el etanol induce la secreción intestinal de agua y electrolitos, de forma dosis dependiente, debido a los efectos del etanol sobre el sistema AMPc.

Tabla 19. *Valores de pH tras perfusión en yeyuno en las crías a los 21 días postparto.*

<i>Concentraciones.</i>	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 µM	7.15±0.02	7.10±0.04	7.18±0.03
50 µM	7.25±0.01	7.15±0.03 **	7.15±0.03 **
75 µM	7.32±0.01	7.19±0.02 *	7.16±0.03 *
150 µM	7.45±0.01	7.27±0.02 *,a	7.16±0.03 *
500 µM	7.58±0.009	7.37±0.03 *,a	7.23±0.03 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.01 a

Tabla 20. *Valores de pH tras perfusión en ileon distal en crías a los 21 días postparto.*

<i>Concentraciones</i>	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 µM	7.35±0.02	7.05±0.007 *	7.1±0.08 **
50 µM	7.38±0.01	7.12±0.02 *	7.11±0.07 **
75 µM	7.42±0.01	7.17±0.02 *	7.11±0.08 **
150 µM	7.49±0.009	7.23±0.02 *	7.21±0.05 *
500 µM	7.6±0.006	7.31±0.02 *,a	7.42±0.006 *

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 * ; p< 0.01 **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: p< 0.001 a

7.2.- Absorción de zinc en yeyuno.

El proceso de absorción de zinc a nivel intestinal parece implicar dos mecanismos, uno saturable que requiere un transportador y otro, no saturable (pasivo) sin transportador inmediato (Menard y Cousins 1983a; Steel y Cousins 1985; Hoadley y Cousins 1988; Oestreicher y Cousins 1989); por lo que podemos asumir dos fases en la absorción de zinc en función de la concentración intraluminal del metal. Una fase rápida a través de la membrana de borde en cepillo, que implicaría la saturabilidad de los sitios de unión al zinc, seguida de una fase más lenta que probablemente implica el transporte de zinc a través de la membrana basolateral (Smith y Cousins 1980).

Cuando estudiamos la absorción de zinc a nivel de yeyuno en las crías a los 21 días postparto expresado en $\mu\text{mol}/5\text{min.}$, observamos que a la concentración de 25 μM y 50 μM , no existe variación significativa entre el grupo TE y GC, pero cuando aumenta la concentración de la solución a perfundir, la absorción es significativamente mayor en el grupo control que en el TE. En el grupo FE la absorción no presenta variación significativa con respecto al GC a 25, 50 y 75 μM , aunque al aumentar las concentraciones 150 y 500 μM , se hace significativamente mayor (Tabla 21).

Tabla 21. Absorción de zinc en yeyuno de crías a los 21 días postparto expresado en $\mu\text{mol}/5\text{min}$.

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	0.16 \pm 0.005	0.16 \pm 0.003 c	0.15 \pm 0.003
50 μM	0.20 \pm 0.006	0.18 \pm 0.003 #,a	0.24 \pm 0.01
75 μM	0.23 \pm 0.009	0.19 \pm 0.006 *	0.25 \pm 0.03
150 μM	0.31 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02 *,a	0.36 \pm 0.02 ***
500 μM	0.77 \pm 0.03	0.46 \pm 0.04 **,b	0.99 \pm 0.08 ***

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.01$ *; $p < 0.001$ **; $p < 0.02$ #

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.01$ *; $p < 0.05$ ***

Etanol vs ác. fólico+Etanol : $p < 0.01$ a; $p < 0.001$ b; $p < 0.05$ c

Sin embargo, al expresar los valores de absorción por peso de tejido húmedo (Tabla 22) y peso de tejido seco (Tabla 23) ($\mu\text{mol}/\text{g}$), la absorción en general, es mayor en los grupos tratados con etanol que en los controles; pero a 500 μM no existe variación significativa entre TE y GC. La absorción es significativamente mayor en el grupo FE que en el TE, excepto para la menor concentración (25 μM) donde no aparece variación significativa. Las diferencias en la absorción entre el grupo TE y el GC al referir la absorción en distintas unidades, $\mu\text{mol}/5\text{min}$. o en $\mu\text{mol}/\text{g}$, es debida a la disminución en el peso fresco y peso seco del tejido perfundido en el grupo TE al compararlo con GC (Tabla 2), parámetros que no se tenían en cuenta al expresar la absorción en $\mu\text{mol}/5$ min.

Tabla 22. Absorción de zinc en yeyuno de crías a los 21 días postparto expresado por g de tejido fresco ($\mu\text{mol/g}$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	0.33 \pm 0.01	0.49 \pm 0.04 **	0.54 \pm 0.02 *
50 μM	0.38 \pm 0.005	0.54 \pm 0.05 **,a	0.87 \pm 0.04 *
75 μM	0.46 \pm 0.02	0.58 \pm 0.03 **,b	0.9 \pm 0.08 *
150 μM	0.61 \pm 0.03	0.75 \pm 0.05 ***,a	1.52 \pm 0.12 *
500 μM	1.67 \pm 0.1	1.52 \pm 0.2 a	3.54 \pm 0.3 *

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a; $p < 0.01$ b

Tabla 23. Absorción de zinc en yeyuno de crías a los 21 días postparto expresado por peso seco de tejido ($\mu\text{mol/g}$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	1.97 \pm 0.09	2.98 \pm 0.26 ***	2.92 \pm 0.12 *
50 μM	2.49 \pm 0.17	3.34 \pm 0.31 **,b	4.64 \pm 0.14 *
75 μM	2.64 \pm 0.23	3.33 \pm 0.21 **,b	4.82 \pm 0.36 *
150 μM	3.58 \pm 0.16	3.98 \pm 0.22 a	7.99 \pm 0.29 *
500 μM	9.68 \pm 0.57	8.53 \pm 0.42 a	19.3 \pm 1.46 *

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a; $p < 0.01$ b

Los valores más representativos de la absorción de zinc en yeyuno vendrían dados al expresar la absorción en función de la superficie del tejido perfundido ($\mu\text{mol/cm}^2$) (Tabla 24). En general, no aparece variación significativa entre el GC y el TE, excepto para las concentraciones de 25 y 500 μM . El grupo FE tiene unos valores de absorción mayores que el grupo TE y GC.

Tabla 24. Absorción de zinc en yeyuno de crías a los 21 días postparto expresado por superficie de tejido perfundido ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	$8.3 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$10.8 \cdot 10^{-3} \pm 8.8 \cdot 10^{-4}$ ***	$9.7 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$ **
50 μM	$10 \cdot 10^{-3} \pm 5.6 \cdot 10^{-4}$	$12.1 \cdot 10^{-3} \pm 10^{-4}$ c	$14.7 \cdot 10^{-3} \pm 5.6 \cdot 10^{-4}$ *
75 μM	$11 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-4}$	$11.5 \cdot 10^{-3} \pm 3.2 \cdot 10^{-4}$ b	$15 \cdot 10^{-3} \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$ ***
150 μM	$16 \cdot 10^{-3} \pm 5.1 \cdot 10^{-4}$	$14.9 \cdot 10^{-3} \pm 9.2 \cdot 10^{-4}$ a	$25.4 \cdot 10^{-3} \pm 1.9 \cdot 10^{-3}$ *
500 μM	$40 \cdot 10^{-3} \pm 2.1 \cdot 10^{-3}$	$29.8 \cdot 10^{-3} \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$ *,a	$64.4 \cdot 10^{-3} \pm 5.8 \cdot 10^{-3}$ **

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ *; $p < 0.02$ ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.02$ ***

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a; $p < 0.02$ b; $p < 0.05$ c

El transporte de zinc, según nuestros resultados, parece indicar que en yeyuno predomina una captación saturable en los tres grupos, que se alcanza a 50 μM . Después de este proceso, se expresa un mecanismo no saturable a partir de 75 μM en los tres grupos (Fig. VIII).

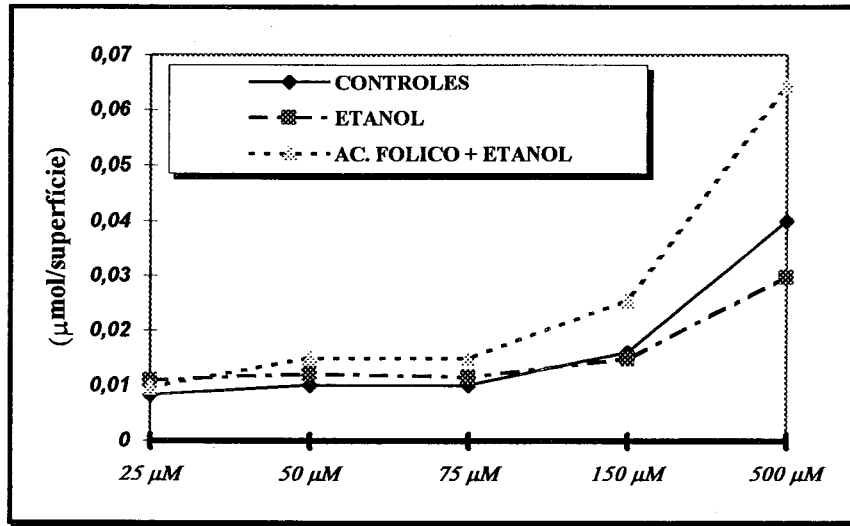


Fig. VIII.- Absorción de zinc en yeyuno de crías a los 21 días postparto por superficie de tejido perfundido ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

7.3.- Absorción de zinc en íleon.

El estudio de la absorción de zinc en íleon de crías a los 21 días postparto, muestra una disminución significativa en el grupo TE comparado con sus controles al expresar la absorción en $\mu\text{mol}/5\text{min.}$, $\mu\text{mol}/\text{g}$ tejido seco, $\mu\text{mol}/\text{g}$ tejido fresco y $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Sin embargo, en el grupo FE al compararlo con el GC, observamos un aumento significativo en la absorción, al expresarlo en función de todas las formas citadas anteriormente (Tablas 25,26,27,28).

Tabla 25. Absorción de zinc en íleon ($\mu\text{mol}/5\text{min}$) de crías a los 21 días postparto.

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	0.13 \pm 3.1 10^{-3}	0.08 \pm 7.1 10^{-3} *,a	0.12 \pm 2 10^{-3} **
50 μM	0.17 \pm 4 10^{-3}	0.08 \pm 7.4 10^{-3} *,a	0.19 \pm 13 10^{-3}
75 μM	0.18 \pm 4 10^{-3}	0.09 \pm 7.6 10^{-3} *,a	0.20 \pm 15 10^{-3}
150 μM	0.31 \pm 7 10^{-3}	0.19 \pm 0.01 *,a	0.36 \pm 30 10^{-3}
500 μM	0.76 \pm 20 10^{-3}	0.22 \pm 0.05 *,a	0.77 \pm 16 10^{-3}

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ *

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.02$ **

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a

Tabla 26. Absorción de zinc en íleon de crías a los 21 días postparto expresado por peso de tejido fresco ($\mu\text{mol}/\text{g}$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	0.35 \pm 0.007	0.28 \pm 0.03 ***,b	0.39 \pm 0.04
50 μM	0.45 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03 **,a	0.6 \pm 0.06 ***
75 μM	0.5 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04 *,a	0.63 \pm 0.03 *
150 μM	0.8 \pm 0.02	0.66 \pm 0.05 #,a	1.11 \pm 0.07 **
500 μM	2.06 \pm 0.06	0.49 \pm 0.04 **,a	2.90 \pm 0.3 *

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.01$ * ; $p < 0.001$ ** ; $p < 0.05$ ***; $p < 0.02$ #

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.01$ * ; $p < 0.001$ ** ; $p < 0.05$ ***

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a ; $p < 0.05$ b

Tabla 27. Absorción de zinc en ileon de crías a los 21 días postparto expresado por peso seco de tejido ($\mu\text{mol/g}$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	2.34 \pm 0.15	1.77 \pm 0.2 ***,b	2.55 \pm 0.24
50 μM	2.82 \pm 0.09	1.86 \pm 0.16 **,a	3.88 \pm 0.35 *
75 μM	3.04 \pm 0.15	2.03 \pm 0.17 **,a	4.05 \pm 0.21 *
150 μM	5.33 \pm 0.28	4.32 \pm 0.31 ***,a	7.15 \pm 0.48 *
500 μM	12.65 \pm 0.65	3.26 \pm 0.34 **,a	18.75 \pm 1.89 *

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ ** ; $p < 0.05$ ***

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.01$ *

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a ; $p < 0.02$ b

Tabla 28. Absorción de zinc en ileon de crías a los 21 días postparto expresado por superficie de tejido ($\mu\text{mol/cm}^2$).

Concentración	CONTROLES (GC)	ETANOL (TE)	AC. FÓLICO + ETANOL (FE)
	n=10	n=10	n=10
25 μM	6.8 10^{-3} \pm 2.2 10^{-4}	5.3 10^{-3} \pm 4.1 10^{-4} **,a	8.03 10^{-3} \pm 2.1 10^{-4} *
50 μM	8.6 10^{-3} \pm 1.8 10^{-4}	5.4 10^{-3} \pm 6.1 10^{-4} *,a	12.2 10^{-3} \pm 8.9 10^{-4} **
75 μM	8.9 10^{-3} \pm 3.3 10^{-4}	6.12 10^{-3} \pm 5.6 10^{-4} *,a	12.97 10^{-3} \pm 5.7 10^{-4} *
150 μM	15.7 10^{-3} \pm 4.9 10^{-4}	10 10^{-3} \pm 1.7 10^{-4} *,a	22.65 10^{-3} \pm 15 10^{-4} ***
500 μM	42 10^{-3} \pm 20 10^{-4}	8.9 10^{-3} \pm 7.1 10^{-4} *,a	58.17 10^{-3} \pm 43 10^{-4} **

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: $p < 0.001$ * ; $p < 0.01$ **

Control vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ * ; $p < 0.01$ ** ; $p < 0.02$ ***

Etanol vs Ac. Fólico+Etanol: $p < 0.001$ a

En el transporte de zinc en íleon distal, al igual que en yeyuno, parece ser que predomina una captación saturable en los tres grupos. Sin embargo, se diferencia del yeyuno porque la saturación no se alcanza para los tres grupos a la misma concentración. En el grupo TE se alcanza a 25 μM , mientras que en el GC y FE se alcanza a 50 μM . A partir de una concentración 75 μM , en los tres grupos estudiados se expresa el mecanismo no saturable (Fig. IX).

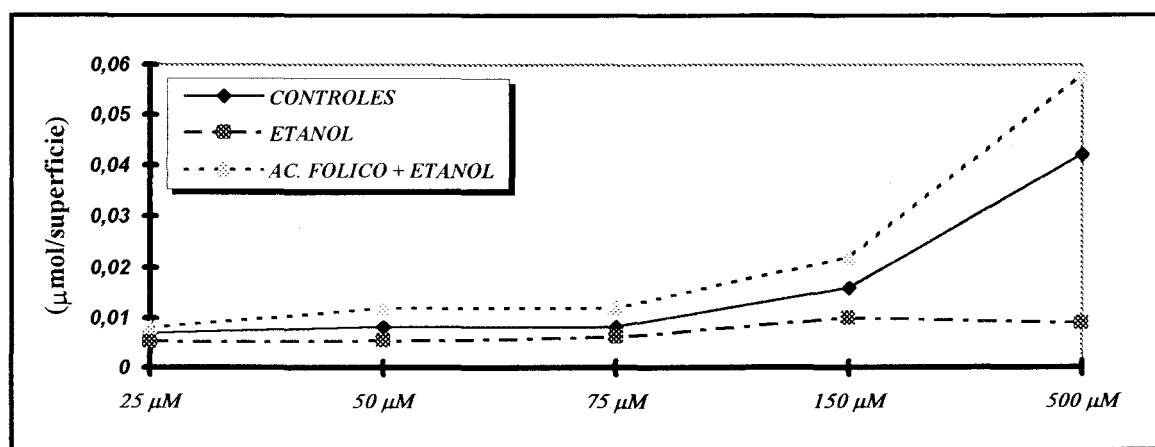


Fig. IX.- Absorción de zinc en íleon de crías a los 21 días postparto expresado por superficie de tejido perfundido ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

Estos resultados coinciden, en parte, con los obtenidos por Menard y Cousins (1983a) en el estudio para la captación de zinc por vesículas aisladas de membrana de borde en cepillo de intestino de ratas adultas, donde observaron que la captación era saturable a 200 μM y a partir de una concentración 1000 μM se expresa el mecanismo no saturable.

Igual que sucede en el yeyuno, las crías de madres TE presentan una absorción en el íleon significativamente menor que las del grupo FE, estas diferencias encontradas entre los dos grupos que ingieren etanol, podrían ser debidas a que las madres del grupo TE, ingieren menos proteínas que las del grupo FE; según Van Capen y House (1974), Wapnir y cols., (1983; 1985; 1986) y Jaeger (1990) una restricción proteica disminuye la absorción de zinc y un incremento en la proteína dietética parece aumentarla, debido a que el aporte proteico hace que la leche presente un contenido sustancial de aminoácidos libres que pueden actuar como ligandos de unión del zinc en el lumen intestinal (Cousins y Smith 1980; Martin y cols. 1981), lo que implicaría que esta suplementación podría contribuir a las diferencias en la absorción entre los dos grupos que ingieren etanol y la absorción en el grupo FE, se hace incluso mayor que en el GC que no recibe este aporte.

Nuestros resultados indican una mejor absorción en el yeyuno que en el íleon distal en las crías al finalizar el período de lactancia, en todos los grupos y para todas las concentraciones ($\mu\text{mol}/5\text{min.}$, $\mu\text{mol}/\text{g}$, $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) Sin embargo, Naveh y cols. (1988) estudiando la absorción de zinc en perros, demostraron que el duodeno posee la mayor capacidad de absorción de zinc, seguida del íleon distal y yeyuno proximal. Estas discrepancias con nuestros datos podrían deberse a las diferencias propias de la especie, ya que según un estudio realizado por Lee y cols. (1989) en humanos, la absorción de zinc ocurre en todo el intestino delgado pero con más intensidad en el yeyuno. En las ratas, la absorción de zinc se produce fundamentalmente en la segunda porción del duodeno (Methfessel y Spencer 1973), aunque el zinc oral también se absorbe en otras zonas del intestino delgado y grueso.

Cuando estudiamos la relación en las crías entre la absorción de zinc en íleon y yeyuno, en los resultados expresados en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$; se observan valores semejantes entre el GC y FE de

1.1 y 1.1 respectivamente, mientras que el grupo TE presenta un valor de 2.2. Es evidente que la ingesta crónica de etanol empeora la absorción de zinc en íleon más que en yeyuno en el grupo TE, mientras que en el grupo FE no varía la relación al compararlo con el GC.

Todos los resultados obtenidos indican que el etanol empeora la absorción de zinc durante la lactancia en las crías de madres tratadas con etanol. Antonson y cols. en 1978 habían estudiado en ratas adultas, los efectos agudos y crónicos de la ingesta de etanol sobre la absorción de zinc, mediante una perfusión "in vivo" en duodeno y en íleon, encontrando que la ingesta crónica de etanol empeora la absorción de zinc en íleon, mientras a nivel de duodeno permaneció inalterada. Posteriormente en 1979 Wilson y Hoyumpa concluyeron que el etanol podría ejercer un efecto específico sobre el sistema de transporte del zinc o alternativamente inducir daños no específicos sobre las células de la mucosa, dando como resultado una disminución en la absorción de zinc.

7. 4.- Absorción de ácido fólico en yeyuno.

La absorción de folatos tiene lugar a nivel del intestino delgado proximal -yeyunal- según un mecanismo de transporte activo, y por tanto, incluso contra gradiente de concentración. Existe también un mecanismo de difusión pasiva, que predomina a elevadas concentraciones, semejante en todo el intestino, no saturable, ni pH dependiente (Zettner y cols., 1981).

En neonatos se ha descrito otro tipo de transporte intestinal de folatos, distinto a los anteriores y que está mediado por endocitosis. Las reservas de folatos en el neonato son limitadas, dependen mucho del aporte materno y además las funciones absorptivas están aún inmaduras en el neonato, aunque existen mecanismos que lo compensan. En este sentido, la absorción de 5MTHF está fuertemente favorecida por proteínas-ligando de folato existentes en

la leche y Salter y Blakeborough, (1988) han comprobado que estas proteínas aumentan la proporción inicial y la cantidad total del transporte intestinal de folato.

Estos investigadores han propuesto, que el mecanismo de absorción en neonatos es semejante al de los adultos y las proteínas-ligando actuarían secuestrando los folatos en el lumen y presentándolos a la mucosa para ser transportados. La liberación del folato del complejo es favorecida por el microclima ácido adyacente a la mucosa, ya que en el lumen debido al pH más elevado, el folato está fuertemente ligado a la proteína (Salter y Blakeborough, 1988).

En nuestro estudio la absorción en yeyuno de ácido fólico libre expresada en nmol/5min., es mayor en las crías expuestas al etanol durante la gestación y lactancia; siendo significativamente mayor a bajas concentraciones 0.25 μ M y 0.5 μ M (Tabla 29).

Tabla 29. Absorción de ácido fólico en yeyuno (nmol/5 min). Efectos del etanol.

<i>Concentraciones</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10
0.25 μ M	0.21 \pm 0.02	0.28 \pm 0.009 **
0.5 μ M	0.30 \pm 0.01	0.45 \pm 0.04 *
1 μ M	0.75 \pm 0.05	0.78 \pm 0.04
1.5 μ M	1.17 \pm 0.06	1.27 \pm 0.06
2.5 μ M	1.66 \pm 0.08	1.85 \pm 0.08

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *; p< 0.01**

Tabla 30. Absorción de ácido fólico en yeyuno de crías a los 21 días postparto, expresado por superficie de tejido (nmol/cm²). Efectos del etanol.

<i>Concentraciones</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10
0.25 µM	10 10 ⁻³ ±1.1 10 ⁻³	15 10 ⁻³ ±8.6 10 ⁻³
0.5 µM	15 10 ⁻³ ±10 ⁻³	27 10 ⁻³ ±2.04 10 ⁻³ *
1 µM	40 10 ⁻³ ±6.8 10 ⁻³	47 10 ⁻³ ±3.5 10 ⁻³
1.5 µM	53 10 ⁻³ ±4.4 10 ⁻³	78 10 ⁻³ ±4.4 10 ⁻³ *
2.5 µM	76 10 ⁻³ ±6.3 10 ⁻³	110 10 ⁻³ ±8.8 10 ⁻³ **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *; p< 0.01**

Sin embargo, cuando expresamos la absorción por superficie de intestino perfundida (nmol/cm²) (Tabla 30), observamos que en el GC y TE la absorción es semejante cuando perfundimos la solución de menor concentración 0.25 µM y aumenta en el grupo TE a medida que se incrementa la concentración desde 0.5 µM a 2.5 µM; pero a una concentración intermedia 1µM, entre las dos citadas anteriormente, no existe variación significativa entre los dos grupos. Este aumento en valores de absorción al expresarlo por superficie perfundida, puede ser debido a que en el grupo TE la superficie intestinal en yeyuno (Tabla 2) es significativamente menor que en los grupos controles (Fig.X).

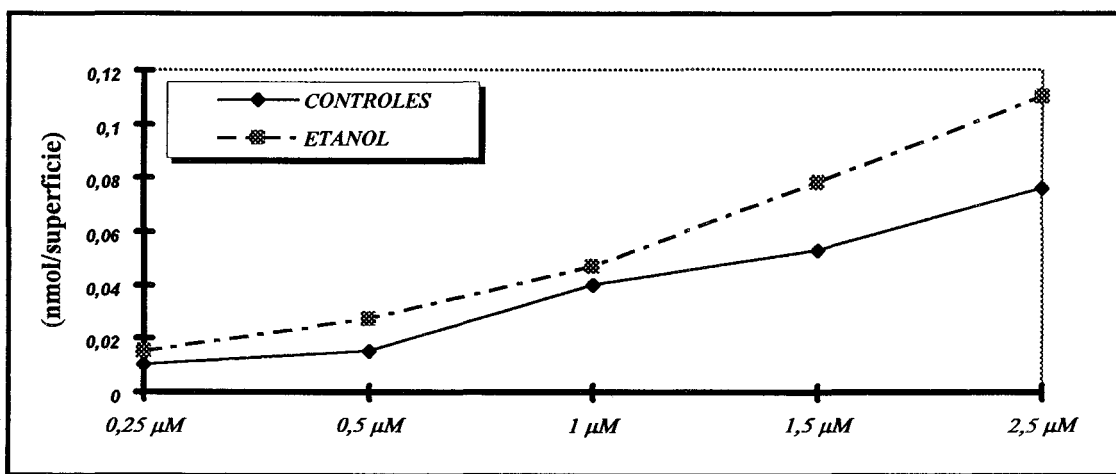


Fig. X.- Absorción de Ac. Fólico en yeyuno de crías a los 21 días postparto expresado por superficie de tejido (nmol/cm^2).

Un comportamiento similar se observa al expresar la absorción por peso de tejido fresco (Tabla 31) y por peso de tejido seco (Tabla 32). En el grupo TE se aprecia una mayor absorción a bajas concentraciones $0,25 \mu\text{M}$ y $0,5 \mu\text{M}$ y a concentraciones más elevadas $1,5$ y $2,5 \mu\text{M}$, mientras que en un valor intermedio $1 \mu\text{M}$ no existen diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 31 y 32). El aumento en la absorción al expresarlo por peso fresco y peso seco de tejido, en parte, puede ser debido a que en el grupo TE el peso fresco y el peso seco son significativamente menor que en GC ($p < 0,01$) (Tabla 2).

Tabla 31. *Absorción de ácido fólico en yeyuno de crías a los 21 días postparto, expresado por peso fresco de tejido (nmol/g). Efectos del etanol.*

<i>Concentraciones</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10
0.25 µM	0.4±0.04	0.5±0.03 *
0.5 µM	0.6±0.02	1±0.09 ***
1 µM	1.4±0.09	1.7±0.1
1.5 µM	2.1±0.1	2.5±0.2
2.5 µM	2.9±0.2	3.9±0.3**

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etano: p< 0.01 *; p< 0.02 **, p< 0.001 ***

Tabla 32. *Absorción de ácido fólico en yeyuno de crías a los 21 días postparto, expresado por peso seco de tejido (nmol/g). Efectos del etanol.*

<i>Concentraciones</i>	CONTROLES (GC) n=10	ETANOL (TE) n=10
0.25 µM	2.4±0.2	3.3±0.2 **
0.5 µM	3.4±0.1	6±0.5 *
1 µM	9.2±0.9	10.4±0.65
1.5 µM	11.9±0.5	16.3±0.5 *
2.5 µM	17.8±1.1	22.6±1.1 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM.

El número de muestras analizadas en cada grupo se representa por n.

Control vs Etanol: p< 0.001 *; p< 0.01 **

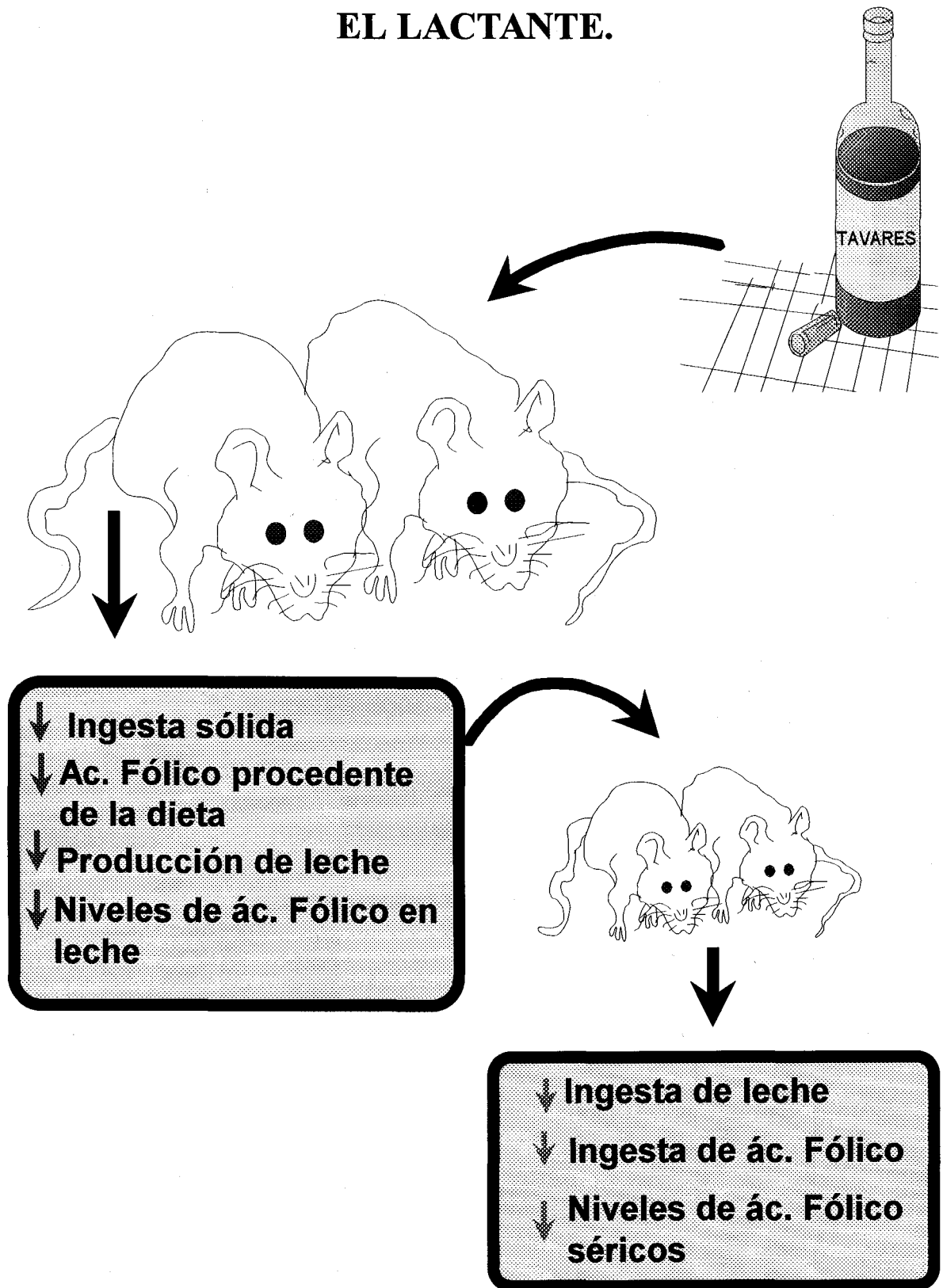
La absorción de ácido fólico es pH dependiente y tiene máximas actividades a pH ácido. En nuestro estudio hemos apreciado que los valores de pH tras realizar la perfusión en yeyuno (Tabla 17) son algo más ácidos en las crías cuyas madres ingieren etanol que en las controles, lo cual, podría contribuir a este aumento en la absorción.

La absorción de folatos es el índice más sensible para conocer la función de la absorción intestinal (Chanari y Bennett 1962). Ricomena y cols., (1986) comprobaron en mujeres embarazadas, que alteraciones pequeñas en la absorción combinadas con el aumento de las necesidades del embarazo, conduce a un balance negativo de folatos. Dichas alteraciones forman parte de un círculo vicioso, ya que un déficit primario de folatos causa alteraciones en el desarrollo y función de la mucosa intestinal, las cuales a su vez limitan la absorción y agravan el estado deficitario.

En las madres que ingieren etanol durante la gestación y lactancia, se encuentra disminuído el aporte de dieta sólida y por tanto del ácido fólico procedente de la misma, disminuyendo el ácido fólico en suero y en leche. Además, según Subramanian (1995) el alcohol inhibe el reflejo de secreción de prolactina en respuesta a la succión, por lo que la madre produce y segrega menos leche. Nuestros resultados indican una disminución en la producción de leche en las madres tratadas con etanol (Fig. III), por lo que las crías del grupo TE ingieren menos leche y con menor contenido en ácido fólico, y sus niveles séricos disminuyen, aunque esta disminución no es significativa (Fig. XI).

Como consecuencia de esta disminución en los niveles de folatos séricos, encontramos un aumento en la absorción de ácido fólico en yeyuno del grupo TE al perfundir las distintas soluciones.

Fig. XI.- EFECTOS DEL CONSUMO DE ETANOL DURANTE LA LACTANCIA SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL MATERNO Y SU REPERCUSION EN EL LACTANTE.



Solmons y cols. en 1975, demostraron un aumento en el transporte de monoglutamatos y poliglutamatos en ratas con ayuno parcial. Posteriormente, Racusen y Krawitt (1977) en un estudio "in vitro" en sacos evertidos de intestino observaron, que en ratas adultas con ingesta crónica de alcohol y con una menor ingesta de pienso, la absorción de ácido fólico aumentaba con respecto a las ratas alimentadas "ad libitum" y comprobaron que la restricción de folatos en la dieta no producía ningún efecto negativo.

No obstante, en las crías TE la relación entre el ácido fólico sérico de la madre y ácido fólico sérico de las crías (Tabla 14), y el ácido fólico de la leche y ácido fólico de las crías (Tablas 14 y 16), es menor 2.76 y 5.92 respectivamente al compararlo con el grupo control 3.71 y 7.31, lo que indicaría que en contra de los resultados obtenidos en la absorción y comentados anteriormente, el ácido fólico se aprovecha más en las crías controles que en las que ingieren etanol. Esto nos sugiere, que posiblemente el etanol contenido en la leche actuaría directamente a nivel luminal inhibiendo la absorción. Sin embargo, en nuestro experimento, no existe etanol en el líquido de perfusión, por lo que no puede ejercer ningún efecto a nivel luminal, lo que conlleva un aumento en la absorción al realizar la perfusión.

7.5.- Absorción de ácido fólico en íleon distal.

El transporte de folatos es máximo en yeyuno tanto en el hombre como en ratas y en íleon es del orden de 5 a 10 veces menor (Said y cols. 1987). Estos resultados coinciden con los nuestros, en crías de madres tratadas con etanol (TE), donde hemos encontrado unos valores de absorción en íleon del orden de 5 veces menor que en yeyuno. En la leche de mamíferos los folatos se encuentran unidos a proteínas de un 60 al 100 % y se ha demostrado que esta unión proteína-folato apenas se disocia a su paso por el estómago. Al parecer las

proteínas-ligando de la leche podrían defender al folato de una posible degradación por las bacterias intestinales. El mecanismo por el que se absorbería el folato, en estas condiciones, implicaría que este complejo folato-proteína fuera absorbido de forma intacta en el íleon, por endocitosis, y su lisis en el enterocito, liberara el folato libre a la circulación sanguínea (Henderson, 1990; Mason y Selhub, 1988). En los neonatos también existe un transporte intestinal de folatos mediado por endocitosis, que después del destete dejaría de actuar. En la rata neonata, la absorción del complejo folato-proteína ocurre con mayor avidez en íleon, ya que la endocitosis en los neonatos es mucho mayor en íleon que en yeyuno (Tani y cols, 1983; Mason y Selhub, 1988).

En nuestros experimentos, al estudiar la absorción de ácido fólico libre en íleon distal en las crías durante la lactancia, los valores obtenidos son nulos en el GC cuando la velocidad de perfusión fue de 3ml/min.. Los mismos resultados se obtienen al variar la velocidad de perfusión a 4ml/min. y a 6 ml/min.. Estos datos son debidos posiblemente, a que en las crías lactantes, la absorción de ácido fólico en el íleon se realiza exclusivamente por endocitosis, mediante la formación del complejo proteína-folato, no existiendo absorción de ácido fólico libre. En nuestro experimento solamente perfundimos ácido fólico, en ausencia de leche, por lo que no aparecen las proteínas-ligando necesarias para la absorción de folatos por endocitosis.

Sin embargo, al estudiar la absorción de ácido fólico en íleon de las crías del grupo TE, sí aparece absorción de ácido fólico libre (Tabla 33), lo que implicaría la existencia de otros sistemas de transporte, además de la endocitosis.

Tabla 33.- Efectos del etanol sobre la absorción de ácido fólico en el íleon distal de crías lactantes a los 21 días.

<i>Concentración de Ac. Fólico</i>	0.25 μ M	0.5 μ M	1 μ M	1.5 μ M	2.5 μ M
nmol/5 min.	0.06 \pm 0.001	0.12 \pm 0.003	0.16 \pm 0.02	0.18 \pm 0.003	0.45 \pm 0.02
nmol/g tej. fresco	0.2 \pm 0.01	0.44 \pm 0.04	0.56 \pm 0.03	0.63 \pm 0.05	1.62 \pm 0.2
nmol/g tej. seco	1.29 \pm 0.04	2.79 \pm 0.04	3.5 \pm 0.16	4.02 \pm 0.14	10.3 \pm 0.42
nmol/cm ²	4.3 $10^{-3}\pm 10^{-4}$	8.8 $10^{-3}\pm 3 \cdot 10^{-4}$	12 $10^{-3}\pm 5.4 \cdot 10^{-4}$	13 $10^{-3}\pm 3.2 \cdot 10^{-4}$	30 $10^{-3}\pm 2 \cdot 10^{-4}$

Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Estas diferencias en la absorción entre el GC y TE posiblemente son debidas a que en el GC todavía no están desarrollados los sistemas de transporte intestinal que presentan los adultos y que empezaran a aparecer después del destete, sin embargo, en el grupo TE sí aparece absorción, posiblemente debido a que el efecto del etanol hace que otros sistemas de transporte actúen durante la lactancia; ya que la absorción de ácido fólico que se detecta no está mediada por endocitosis, porque se perfunde ácido fólico libre en ausencia de proteínas-ligandos necesarias para la absorción de folatos por endocitosis. Estos sistemas de transporte podrían aparecer durante la lactancia para cubrir las deficiencias de folatos que aparecen en las crías del grupo TE. Quizás por este motivo no se ha encontrado una disminución tan significativa en los niveles de ácido fólico séricos en las crías expuestas al etanol, en las que hay una disminución pero no significativa respecto al GC, a pesar de disminuir la ingesta de leche y su contenido en ácido fólico.

V.- CONCLUSIONES.

1.- La ingesta materna de etanol disminuye el número de crías, la longitud intestinal, el peso corporal y hepático. Sin embargo, cuando estos parámetros se expresan en relación con el peso corporal aumentan significativamente respecto al grupo control. La suplementación dietética aumenta la longitud intestinal y el peso hepático hasta alcanzar valores similares a los controles, pero no modifica el número de crías y el peso del cerebro, que incluso se hacen inferiores a los del grupo control.

2.- En el yeyuno e íleon distal, los parámetros intestinales: perímetro, superficie, peso fresco/superficie, peso seco/superficie; son significativamente inferiores en las crías de los dos grupos tratados con etanol, respecto a los controles.

3.- En las madres de los grupos tratados con etanol, la ingesta sólida, de calorías totales y de líquido son significativamente inferiores a los del grupo control.

4.- En las madres de los grupos tratados con etanol, la producción de leche en 180 minutos es significativamente inferior a la de las madres del grupo control.

5.- En las madres del grupo control y del grupo con dieta suplementada e ingesta de etanol disminuye el peso a lo largo de la lactancia, siendo significativamente menor en este último. Sin embargo, en el grupo que ingiere sólo etanol, el peso es similar al principio y al final de la lactancia.

6.- En las crías, al nacer, no existen diferencias en los pesos entre los tres grupos, pero durante la lactancia las crías del grupo tratado sólo con etanol adquieren pesos significativamente inferiores a las controles. La suplementación hace que durante la lactancia aumente el peso respecto al grupo tratado con etanol, pero sigue siendo significativamente inferior a las controles al final del período de lactancia.

7.- La ingesta de zinc es mayor en las crías de los grupos tratados con etanol. En el grupo control el zinc sérico es mayor en las crías lactantes que en las madres. En el grupo tratado sólo con etanol es mayor en las madres que en las crías y en el grupo suplementado es prácticamente igual en las madres y crías. Las crías del grupo tratado con etanol presentan disminuidos los valores de zinc en suero respecto a las controles y por el contrario, en las madres es significativamente mayor.

8.- La ingesta de ácido fólico es menor en el grupo tratado con etanol que en las controles y significativamente mayor en el grupo tratado con etanol junto con un suplemento dietético. Los valores de ácido fólico séricos en las madres y en las crías, así como, los valores en la leche materna, son significativamente menor en el grupo tratado con etanol que en las controles y la suplementación dietética hace que aumente haciéndose superiores a los controles.

9.- La actividad específica de ADH hepática, en las crías a los 21 días del nacimiento, muestra una disminución significativa en las crías de madres tratadas con etanol, respecto al grupo control y al grupo con dieta suplementada. Sin embargo, en las crías cuyas madres ingieren una dieta suplementada junto con el etanol, se observa un aumento significativo en la actividad del enzima respecto a los otros dos grupos estudiados.

10.- Los parámetros bioquímicos séricos indican una ligera hipoglucemia, aumento de la bilirrubina y de los enzimas hepáticos GOT y GPT, en los dos grupos tratados con etanol.

11.- La absorción de zinc en el yeyuno de crías de madres tratadas con etanol, expresada por superficie, sólo aumentó con respecto al grupo control, a la concentración de 25 y disminuyó a la de 500 μM . Sin embargo, en el grupo que ingiere etanol junto con una dieta suplementada, la absorción de zinc en las crías aumenta significativamente con respecto al grupo control y al grupo tratado sólo con etanol.

12.- En las crías de madres tratadas con etanol, la absorción de zinc en el íleon distal, expresada por superficie intestinal, disminuye a todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, en el grupo que ingiere etanol con dieta suplementada, la absorción en las crías aumenta significativamente, al compararlo con el grupo control.

13.- Nuestros resultados indican una mejor absorción de zinc en el yeyuno que en el íleon distal, en las crías al finalizar la lactancia, en todos los grupos y para todas las concentraciones. Sin embargo, en el grupo tratado solo con etanol, estas diferencias son mayores.

14.- La absorción de ácido fólico en yeyuno, expresada por superficie intestinal, es mayor, en todas las concentraciones ensayadas, en las crías de madres tratadas con etanol que en las controles.

15.- En el íleon distal de las crías del grupo control, encontramos valores nulos en los resultados de absorción de ácido fólico, cuando la velocidad de perfusión fue 3, 4 y 6 ml/min.. Sin embargo, las crías de madres tratadas con etanol presentan absorción aunque cinco veces menor que en yeyuno.

CONCLUSION GENERAL. *Todos los resultados indican que la ingesta materna de etanol afecta negativamente a la mayoría de los parámetros estudiados en las crías a los 21 días postparto. Sin embargo, se observa una ligera recuperación de estos parámetros, excepto para las enzimas hepáticas, cuando además del etanol, a la madre se le suministra una dieta suplementada con diversos nutrientes.*

VI.- BIBLIOGRAFIA.

ABEL, E.L. "Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals". *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 2: 167-174, (1980).

ABEL, E.L. "Consumption of alcohol during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring". *Hum. Biol.* 54:421-453, (1982).

ABEL, E. "Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Effects". New York: Plenum Press: 183-205, (1984).

ABEL, E.L. "Paternal and maternal alcohol consumption: effects on offspring in two strains of rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13:533-541, (1989).

ABEL, E.L. "A surprising effect on prenatal alcohol treatment on rat fetuses". *Alcohol* Vol.12 No 1 pp:1-6, (1995).

ABBOT. "Monografía drogas de abuso". pp: 67, (1994).

ABBOT, L.; NADLER, J. and RUDE, R.K. "Magnesium deficiency in alcoholism: Possible contribution to osteoporosis and cardiovascular disease in alcoholics". *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, Vol. 18, No 5, 1076-1080, (1994).

ADACHI, K.; WAKABAYASHI, T. and POPINIGIS, J. "Effects of alkyl alcohols and related chemicals on rat liver structure and function". *Acta pathologica Japonica.* 41: 414-427, (1991).

ALEXANDER, J., AASETH, J. and REFSUIK, T. "Excretion of zinc in rat bile a role glutathione". *Acta Pharmacol.* 49:190-194, (1981).

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION "Report of the AIN Ad HOC Committee on standards for nutritional studies". *J. Nutr.* 107: 1340-1348, (1977).

ANDRÉS, M.D., GARCIA CASTRO, M.E., TABOADA, M.C. and REBOLLEDO, E. "Chronic prenatal ethanol exposure and its effects on disaccharidase intestinal activities in the offspring". *Med. Sci.* 14: 280-281, (1986).

ANTONSON, D.L., BARAK, A.J. and VANDERHOFF, J.A. "Determination of the site of zinc absorption in rat small intestine". *J. Nutr.* 9: 142-147, (1979).

ASSADI, F.K. and ZIAI, M. "Zinc status of infants with fetal alcohol syndrome". *Pediatr. Res.*, 20: 551-554, (1986).

AVERY, R.A. and BETTGER, W.J. "Zinc deficiency alters the protein composition of the membrane skeleton but not the extractability or oligomeric form of spectrin in rat erythrocyte membranes". *J. Nutr.* 122: 428-434, (1992).

BAHEY, D.J.; COOK, A.; McALLISTER, G. et al. "Structural and biochemical differentiation of the mammalian small intestine during foetal development". *J. Cell Sci.* 72: 195-212, (1964).

BAKER, H. y cols. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 792-796, (1981).

BARAONA, E.; PIROLA, R.C.; LIEBER, C.S. "Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat". *Gastroenterology.* 66:226-234, (1974).

BARAONA, E.; LEO, M.A. BOROWSKY, S.A., et al. "Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in liver". *Science*, 190:794-795, (1975).

BARAONA, E.; LEO, M.A.; BOROWSKY, S.A. and LIEBER, C.S. "Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver". *J. Clin. Inv.* 60: 546-554, (1977).

BARAONA, E., JUNLKUNEN, R., TANNENBAUM, L. and LIEBER, C.S. "Role of intestinal bacterial overgrowth on ethanol production and metabolism in rats". *Gastroenterology*, 90: 103-110, (1986).

BARAONA, E., DIPADOVA, C., TABASCO, X. and LIEBER, C.S. "Red blood cells: A new major modality for acetaldehyde transport from liver to other tissues". *Life. Sci.* 40: 253-258, (1987).

BATTIN, D.A.; MARRS, R.F.; FLEISS, P.M. and MISHELL, D.R. "Effect of suckling on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and estradiol during prolonged lactation". *Obstet. Gynecol.* 65:785-788, (1985).

BECK, I.T. and DINDA, P.K. "Acute exposure of small intestine to ethanol. Effects on morphology and function". *Dig. Dis Sci.* 26: 817-838, (1981).

BEER, W.H., JHONSON, R.F., GUENTZEL, M.N., LOZANO, J., HENDERSON, G.I. and SCHENKER, S. "Human placental transfer of zinc: normal characteristics and role of ethanol". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* Vol. 16 No 1:98-105, (1992).

BETTGER, W.J., and O'DELL, B.L. "A critical physiological role of zinc in the structure and fuction of biomembranes". *Life Sci.* 28, 1425-1438, (1981).

BERGER, J. and SCHNEEMAN, B.O. "Intestinal zinc and carboxypeptidase A and B activity in reponse to consumption of test meals containing various proteins by rats". *J. Nutr.* 118 (6): 723-728, (1988).

BETTGER, W.J. "The effects of dietary zinc deficiency on erythrocyte-free and membrane-bound aminoacids in the rat". *Nutrition Research*, 9 (8): 911-919, (1989).

BHANDARI, S.D. and GREGORY, III JF. "Folic acid, 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats". *J. Nutr.* 122:1847-1854, (1992).

BIRKENMEIER, E.H. and GORDON, J.I. "Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 2516-2520, (1986).

BJARNASON, I., SMETHURST, P., LEVI, A.J. and PETERS, T.J. "Intestinal permeability to ⁵¹Cr-EDTA in rats with experimentally induced enteropathy". *Gut*, 26: 579-585, (1985).

BJÖRNEBOE, G-E., BJÖRNEBOE, A., JOHNSEN, J., et al. "Calcium status and calcium-regulating hormones in alcoholics". *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 12: 229-232, (1988).

BJÖRNTORP, P., DEPERGOLA, G., SJÖBERG, C., PETTERSSON, P., HALLGREN, P., BOSTRÖM, K., HELANDER, K-G and SEIDELL, J. "Alcohol consumption and synthesis of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue". *J. Int. Med.* 228: 557-562, (1990).

BLAIR, J.A. and MATTY, A.J. "Acid microclimated in intestinal absorption." *Clin. Gastroenterol*, 3:183-197, (1974).

BLAKEBOROUGH, H. and SALTER, D.N. "Folate transport in enterocytes and brush-border-membrane vesicles isolated from the small intestine of the neonatal goat". *Brit. J. Nutr.*, 59:485-495, (1988).

BLAKELY, R.L. "The biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines". New York: Elsevier. (1969).

BLOCKER, D.E. and THENEN, S.W. "Intestinal absorption, liver uptake and excretion of 3H-folic acid in folic acid-deficient, alcohol-consuming nonhuman primates". *Am. J. Clin. Nutr.* 46:503-510, (1987).

BODE, J.C. "Alcohol and the gastrointestinal tract". *Adv. Intern. Med. Pediatr.*, 45: 1-77, (1980).

BODE, J.C.H., KNUPPEL, H., SCHWERK, W., LORENZ-MEYER, H. and DURR, H.K. "Quantitative histomorphometric study of the jejunal mucosa in chronic alcoholics". *Digestion*, 23: 265-270, (1982).

BODE, J.C., BODE, C., HEIDELBACH, R., DURR, H-K. and MARTINI, G.A. "Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse". *Hepatogastroenterol*, 31: 30-34, (1984).

BOGDEN, J.D., OLESKE, J.M., MUNVES, E.M., LAVENHAR, M.A., BRUENING, K.S., KEMP, F.W., HOLDING, K.J., DENNY, T.N. and LOURIA, D.B. "Zinc and immunocompetence in the elderly baseline data on zinc nutritive and immunity in unsupplemented subjects". *Am. J. Clin. Nutr.*, 46: 101-109, (1987).

BOLEDA, M.D.; FARRÉS, J.; GUERRI, C. and PERES, X. "Alcohol dehydrogenase isoenzymes in rat development: effect of maternal ethanol consumption". *Biochemical Pharmacology*. 43: 1555-1561, (1992).

BOLIS, P.F., RAVAGNI PROVIZER, M.F. *Vitaminología*, 1: 135-146, (1985b).

BOLIS, P.F. y cols. *Vitaminología*, 1:125-133, (1985a).

BONTHIUS, D.J.; GOODLETT, C.R. and WEST, J.R. "Blood alcohol concentration and severity of microcephaly in neonatal rats depend on the pattern of alcohol administration". *Alcohol* 5: 209-214, (1988).

BOSRON, W.F. and LI, T.-K. "Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes". *Enzyme*, 37: 19-28, (1987).

BOTELLA LLUSIA J. *Acta Ginecologica* XLII:427-440, (1986).

BOWER, C., STANLEY, F.J. *Med. J. Australia* 150: 613-619, (1989).

BRACKER, W.M. and KLAASSEN, C.D. *Toxicol Appl. Pharmacol* 87:257-263, (1987).

BREEN, K.J., BUTTIGIEG, R., IOSSIFIDIS, S., LOURENSZ, C. and WOOD, B. "Jejunal uptake of thiamin hydrochloride in man. Influence of alcoholism and alcohol". *Am. J. Clin. Nutr.*, 42: 121-126, (1985).

BREMNER, I. and BEATTIE, J.H. "Metallothionein and the trace minerals" *Ann. Rev. Nutr*, 10: 63-83, (1990).

BRIEN, J.F. and SMITH, G.N. "Effects of ethanol on the fetus". *J. Dev. Physiol.* 15: 21-32, (1991).

BRIGHENTI, L. and PANCALDI, G. "Effetto della somministrazione di alcool etilico su alcune attività enzimatiche del fegato di ratto". *Soc. Ital. Biol. Sperimentale*, 46:1-5, (1970).

BRITTON, R.S.; VIDELA, L.A.; RACHAMIN, G.; OKUNO, F. and ISRAEL, Y. "Effect of age on metabolic tolerance and hepatomegaly following chronic ethanol administration". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8: 528-534, (1984).

BUTS, J-P.; SOKAL, E.M. and Van HOOFF, F. "Prenatal exposure to ethanol in rats: Effects on postnatal maturation of the small intestine and liver". *Pediatric Research* Vol. 32, No 5, (1992).

BUXADERAS, S. y FERRÉ, R. "Importancia del zinc en la alimentación humana". *Nutrición Clínica*, (V) 4: 61-70, (1985).

CARD, D. and BRIEN, J.F. "Effect of chronic ethanol administration on the activity of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the near-term pregnant guinea pig" *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 67: 601-606, (1989).

CARMICHAEL, F.J., SALDIVIA, V., VARGHESE, G.A., ISRAEL, Y. and ORREGO, H. "Ethanol-induced increase in portal blood flow: Role of acetate and A₁ and A₂-adenosine receptors". *Am. J. Physiol.* 255: G417-423, (1988).

CARRERAS, J.M. "Madre alcohólica". En : *Protocolos de Obstetricia* (2^a ed.). Barcelona: Salvat, 420-423, (1988).

CARRERAS, O., VAZQUEZ, A.L., RUBIO, J.M., DELGADO, M.J. and MURILLO, M.L. "Effect of chronic ethanol on D-galactose absorption by the rat whole intestinal surface". *Alcohol*, Vol. 9:83-86, (1991).

CARRERAS, O., VAZQUEZ, A.L., RUBIO, J.M., DELGADO, M.J. and MURILLO, M.L. "The effect of ethanol on intestinal L-leucine absorption in rats" *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*, 101:13-16, (1993).

CARUSO, K. and TEN-BENSEL, R. "Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects". The University of Minnesota experience. *Minn. Med.*, 76: 25-29, (1993).

CASEY, C.E., HAMBIGDE, K.M. and WALRAVENS, P.A. "Zinc binding in human duodenal secretions". *J. Pediatr.*, 95: 1008-1010, (1979).

CAVDAR, A.O. "DiGeorge syndrome and fetal alcohol syndrome". *Am. J. Dis. Child.*, 137: 806 (lett.), (1983).

CLARREN, S.K. and SMITH, D.W. "The fetal alcohol syndrome". *N. Engl. J. Med.* 298: 1063-1069, (1987).

COBO, E. and QUINTERO C.A. "Milk-ejecting and anti-diuretic activities under neurohypophyseal inhibition with alcohol and water overload". *Am. J. Obstet. Gynecol.* 105: 877-887, (1969).

COLES, C.E. "Impact of prenatal alcohol exposure on the newborn and the child". *Cli. Obstet. Gynecol.*, 36: 255-266, (1993).

COLLINS, T.D., EISENGA, B.H., BHANDARI, S.D. and McMARTIN KE. "Effects of ethanol on the tissue folate incorporation and recovery from folate deficiency in rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16:757-763, (1992).

CORRING, T.; DURAND, G. and HENRY, J. "Some aspects of development and nutrition in the monogastric animal during postnatal life". In: Bourne, G.H. (ed); *World Rev. nutr. Diet.* Basel, Karger, pp: 124-190, (1982).

COTZIAS, G.C. and PAPAVALIIOU, P.S. "Specificity of zinc pathways through the body: homeostatic considerations". *Am. J. Physiol.* 206: 787-792, (1964).

COUSINS, R.J. "Zinc thionein and heritable diseases associated with aberrant zinc metabolism". *Lancet*, 2: 686-687, (1976).

COUSINS, R.J. and SMITH, K.T. "Zinc-binding properties of bovine and human milk in vitro: influence of changes in zinc content". *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 1083-1087, (1980).

COUSINS, R.J. "Metallothionein aspects related to copper and zinc metabolism". *J. Inher. Metab. Dis.*, 6, (1983).

COUSINS, R.J. "Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin". *Physiol. Rev.*, 65: 238-309, (1985).

CROUSE, J.R., GERSON, C.D., DE CARLI, L.M. "Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man". *J. Lipid Res.* 9: 509-512, (1968).

CUNNINGHAM, C.C.; KOURI, D.L.; BEERKER, K.R. and SPACH, I.P. "Comparison of effects of long term ethanol consumption on the heart and liver of the rat". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13: 58-65, (1989).

CHANARI, I. y BENNETT, M. *Brit. Med. J* 1:985, (1962).

CHANARIN, I. "The megaloblastic anemias". Oxford, UK: Blackwell, (1979).

CHEN, J.; DRISCOLL, C.D. and RILEY, E.P. "Ontogeny of suckling behavior in rat prenatally exposed to alcohol". *Teratology* 26: 145-153, (1982).

CHESTERS, J.K. "Trace element-gene interactions with particular reference to zinc". *Proceedings of The Nutrition Society*, 50 (2): 123-129, (1991).

DAS, I., BURCH, R.E. and HAHN, H.K.J. "Effects of zinc deficiency on ethanol metabolism and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities". *J. Lab. Clin. Med.*, 104: 610-617, (1984).

DEPERGOLA, G., KJELLSTRÖM, C., HOLM, C., CONRADI, N., PETTERSSON, P. and BJÖRNTORP. "The metabolism of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue of rats chronically exposed to ethanol". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15(2): 184-189, (1991).

DESAINT-BLANQUAT, G.; FRITSCH, P. and DERACHE, R. "Activité alcool deshydrogenasique de la muqueuse gastrique sous l'effet de differents traitemens ethanoliqes chez le rat". *Pathol. Biol.* 20: 249-254, (1972).

DILUZIO, N.R. and STEGE, T.E. "The role ethanol metabolites in hepatic lipid peroxidation. En "Alcohol and the liver". Fisher, M.M., Rankin, J.G.(eds). New York: Plenum, pp: 45- 62, (1977).

DIPADOVA, C., WORNER, T.M. and LIEBER, C.S. "The effect of abstinence on the blood acetaldehyde response to a test dose of alcohol in alcoholics". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 11: 559-561, (1987).

DOYLE, K.M., BIRD, D.A., AL-SALIHI, S., HALLAQ, Y., CLUETTE-BROWN, J.E., GOSS, K.A. and LAPOSATA, M. "Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion". *J. Lipid Res.* 35: 428-437, (1994).

DUESTER, G., SMITH, M., BILANCHONE, V. and HATFIELD, G.W. "Molecular analysis of the human class I alcohol dehydrogenase gene family and nucleotide sequence of the gene encoding the b subunit". *J. Bio. Chem.* 261: 2027-2033, (1986).

EICHNER, E.R. and HILLMAN, R.S. "The evolution of anemia in alcoholic patients". *Am. J. Med.*, 50:281-32, (1971).

EICHNER, E.R., BUCHANAN, B., SMITH, J. and HILLMAN, R.S. "Variation in the hematologic and medical status of alcoholics". *Am. J. Med. sci.*, 263: 35-42, (1971a).

EICHNER, E.R., PIERCE, I. and HILLMAN, R.S. "Folate balance in dietary induced megaloblastic anemia". *N. Engl. J. Med.*, 284: 933-938, (1971b).

EICHNER, E.R. and HILLMAN, R.S. "Effect of alcohol on serum folate level". *J. Clin. Invest.*, 52: 584-591, (1973).

EILAM, Y., ARIEL, M, JABLONSKA, M. and GROSSOWICZ. "On the mechanism of folate transport in isolated intestinal epithelial cells". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 240: G170-G175, (1981).

EK, J.J. *Pediatr.*, 97(2): 288-292, (1980).

ENGUIG, A.; GARCIA, L. y HERNANDEZ, M. "Inmunoquimioluminiscencia". *Rev. Diagn. Biol.* 41:403-406, (1992).

ESTERBAUER, H., ZOLLNER, H. and LANG, J. *Biochem. J.* 228: 363-373, (1985).

EVANS, G.W. and JOHNSON, P.E. "Copper and zinc binding ligands in the intestinal mucosa". *Kirchgesner, Trace element metabolism in man and animals.* 3, (1978).

EVANS, G.W., GRACE, C.I. and VOTAVA, H.J. "A proposed mechanism for zinc absorption in the rat". *Am. J. Physiol.* 228: 501-505. (1975).

EVANS, G.W. and JOHNSON, P.E. "Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk". *Pediatr. Res.*, 14: 876-880, (1980a).

EVANS, G.W. and JOHNSON, P.E. "Zinc absorption in rats fed a low-protein diet and a low-protein diet supplemented with tryptophan or picolinic acid". *J. Nutr.* 110: 1076-1080, (1980b).

EVERETT, G. and APGAR, J. "Enzymes as indicators of zinc status". *Trace element-Analytical chemistry in Medicine and Biology*, 4: 283-288, (1987).

FAZIO, V., FLINT, D.M. and WAHLQVIST, M.L. "Acute effects of alcohol on plasma ascorbic acid in healthy subjects". *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 2394-2396, (1981).

FISHER, S.E., INSELMAN, L.S., DUFFY, L., ATKINSON, M., SPENUR, H. and CHANG, B. "Ethanol and fetal nutrition: Effect of chronic ethanol exposure in rat placental growth and membrane associated folic acid receptor binding activity". *J. Pediatric. Gastroenterol. Nutr.* 4:645-649, (1985).

FLESHOOD, H.L. and PITOT, H.C. "The metabolism of O-phosphorylethanolamine in animal tissues". *J. Biol. Chem.* 245: 4414-4420, (1970).

- FREYD, G., KIM, S.K. and HORVITZ, H.R. "Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *caenorhabditis elegans* cell lineage gene *Lin-II*". *Nature*, 344: 876-879, (1990).
- GAINES, K.C., SALHANY, J.M., TUMA, D.J. and SORRELL, M.F. "Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins". *FEBS Lett.* 75: 115-119, (1977).
- GHISHAM, F.K., PATWARDHAN, R. and GREENE, H.L. "Fetal alcohol syndrome: inhibition of placental zinc transport as a potential mechanism for fetal growth retardation in the rat". *J Lab. Clin. Med.* 100:45-52, (1982).
- GHISHAM, F. and GREEN, H.L. "Fetal alcohol syndrome: Failure of zinc supplementation to reverse the effect of ethanol on placental transport of zinc". *Pediatr. Res.* 17:529-531, (1983).
- GIBBENS, G.L.D. and CHAD, T. "Observations on maternal oxytocin release during human labor and the effect of intravenous alcohol administration". *Am. J. Obstet. Gynecol.* 126: 243-246, (1976).
- GIROUX, E.L. and PRAKASH, N.J. "Influence of zinc-ligand mixtures on serum zinc levels in rats". *J. Pharm. Sci.*, 66: 391-392, (1977).
- GOAD, P.T. "The role of maternal diet in the development toxicology of ethanol". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73:256-267, (1984).
- GOLDENBERG, R.L.; TSUNENOBU TAMURA, MD.; CLIVER, B.A. et al. "Serum folate and fetal growth retardation: a matter of compliance?". *Obstetrics Gynecology* Vol. 79, No. 5, Part1, (1992).
- GONZALEZ DE AGÜERO, R. y cols. Simposio Internacional "Hierro y Folatos. Repercusiones en la madre y en el feto". Madrid (1990).
- GORDON, E.F., GORDON, R-C., PASSAL, D.B. "Zinc metabolism: basic clinical and behavioral aspects". *J. Pediatr.* 99:341-349, (1981).
- GORDON, B.H.J.; STREETER, M.L.; ROSSO, P. and WINIK, M. "Prenatal alcohol exposure: abnormalities in placental growth and fetal amino acid uptake in the rat". *Biol. Neonate* 47: 113-119, (1985).

GORDON, G.G. and LIEBER, C.S. "Alcohol, hormones and metabolism". In "Medical and nutritional complications of alcoholism: Mechanisms and management." Lieber, C.S. (ed). New York: Plenum., pp: 55-90, (1992).

GREGORY III JF. "Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates". Academic Press Inc. 1-101, (1989).

GROSVENOR, C.E. and WHITWORTH, N.S. "Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat". J. Dairy. Sci. 57: 900-904, (1974).

GUERRI, C. and GRISOLIA, S. "Effects of prenatal and postnatal exposure of rats to alcohol: Changes in (Na⁺,K⁺)". Pharmacology Biochemistry and Behavior 17:927-932, (1982).

HAHN, C. and EVANS, G.W. "Identification of a low molecular weight zinc complex in rat intestine". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 144:793-795, (1973).

HAJJAR, J.J., TOMICIC, T. and SCHEIG, R.L."Effect of chronic ethanol consumption on leucine absorption in the rat small intestine". Digestion, 22: 170-176, (1981).

HALSTED, C.H., ROBLES, E.A. and MEZEY, E. "Decreased jejunal uptake of labeled folic acid (3HPGA) in alcoholic patients: role of alcohol and nutrition". N. Engl. J. Med., 285:701-706, (1971).

HALSTED, C.H., ROBLES, E.A. and MEZEY, E. "Intestinal malabsorption in folate-deficient alcoholics". Gastroenterology, 64: 526-532, (1973).

HALSTED, C.H., ROMERO, J.J., TAMURA, T. et al. "Folate metabolism in the alcoholic monkey". Gastroenterology, 76: 1149, (1979).

HALSTED, C.H. "Folate deficiency in alcoholism". Am. J. Clin. Nutr., pp:2736-2740, (1980)

HALSTED, C.H. and HEISE, C. "Ethanol and vitamin metabolism". Pharmacol. Ther., 34: 453-464, (1987).

HALLBÄCK, D.A., ERIKSSON, M. and SJÖQUIST, A. "Nerve-mediated effect of ethanol on sodium and fluid transport in the jejunum of the rat". *Scand. J. Gastroenterol*, 25: 859-864, (1990).

HAMBIDGE, M.K.; CASEY, C.E. and KREBS, N.F. "Zinc". In : "Trace elements in human and animal nutrition". Vol. 2, 5th Ed. Mertz, W., ed. Academic Press, 1-138, (1986).

HAMOSH, M. "The development of the metabolic and transport function of the gastrointestinal system" In: Jones, C.T. (ed): *Biomedical Development of the fetus and Neonate*. Amsterdam, Elsevier. Biomed. Press. pp: 591-691, (1982).

HARRIS, J.E. "Hepatic glutathione, metallothionein and zinc in the rat on gestational day 19 during chronic ethanol administration.". *J. Nutr. Sep.* 120 (9) p 1080-1086, (1990).

HARTOMA, T.R., SOTANIEMI EA, PELKONEN, O. and AHLQUIST, J. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 12:147-151, (1977).

HAWKINS, R.D.; KALANT, H. and KHANNA, J.M. "Effects of chronic intake of ethanol on rate of ethanol metabolism". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44: 241-257, (1966).

HAWKINS, R.D. and KALANT, H. "The metabolism of ethanol and its metabolic effects". *Pharmacol. Rev.* 24: 67-157, (1972).

HAZELL, T. "Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability". *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 46: 1-123, (1985).

HELWIG, H.L., HOFFER, E.M., THIELEN, W.C., ALOCER, A.C., HOTELLING, D.R., ROGERS, W.H. and LENCH, J. *Am. J. Clin. Pathol* 45:156-159, (1966).

HEMPE, J.M. and COUSINS, R.J. "Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9671-9674, (1991).

HEMPE, J.M. and COUSINS, R.J. "Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats". *J. Nutr.* 122(1): 89-95, (1992).

HENDERSON, G.I.; HOYUMPA, A.M. MCCLAIN, C. and SCHENKER, S. "The effects of chronic and acute alcohol administration on fetal development in the rat". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 3: 99-105, (1979).

HENDERSON, G.I, HOYUMPA, A.M. and ROTHSCHID, M.A. Effect of ethanol-induced hypothermia on protein synthesis in pregnant and fetal rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4:165-177, (1980).

HENDERSON, G.I.; RASHMI, V.; PATWARDHAN, R.V.; MCLEROY, S. and SCHENKER, S. "Inhibition of placental amino acid uptake in rats following acute and chronic ethanol exposure". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 6:495-505, (1982).

HENDERSON, G.B. "Folate-binding proteins". *Annu. Rev. Nutr.*, 10:319-335, (1990).

HERBERT V."Folic acid and vitamin B₁₂". In *modern Nutrition in hearth and disease*. 5th ed. (Goodhart RS and Shils ME eds.) Lea & Febiger, Philadelphia pp: 221-244, (1973).

HIBBARD, M.B.J. *Obstet. Gy. Recol. Br. Commonw*, 71: 529-542, (1964).

HIBBARD, B.M. and HIBBARD, E.D. "Folate metabolism in pregnancy". *Scientific Foundations in Obstetrics and Gynecology* pp: 393-399. E.E. Philipp J, Barnes and M Newton eds. Londres, (1970).

HILLMAN, R.S., MCGUFFIN, R. and CAMPPELL, C. "Alcohol interference with the folate enterohepetic cycle". *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 90: 145-156, (1977).

HILLMAN, R.S. and STEINBERG, S.E. "The effects of alcohol on folate metabolism". *Annu. Rev. Med.*, 33: 345-354, (1982).

HINES, J.D. "Hematologic abnormalities involving vitamin B₁₂ and folate metabolism in alcoholic subjects". *Ann. NY Acad. Sci.*, 252: 316-327, (1975).

HOADLEY, J.E. and COUSINS, R.J. "Regulatory mechanisms for intestinal transport of copper and zinc". In: "Trace Elements Research in humans". Prasad, A.S. and Brewer, G.J., eds., pp. 141-155, Alan, R.Liss, NY. (1988).

HOADLEY, J.E., LEINART, A.S. and COUSINS, R.J. "Relationship of ⁶⁵Zn absorption kinetics to intestinal metallothionein in rats: Effects of zinc depletion and fasting". *J. Nutr.* 118: 497-502, (1988).

HOERNER, M., BEHRENS, U.J., WORNER, T. and LIEBER, C.S. "Humoral immune responses to acetaldehyde adducts in alcoholic patients. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 54: 3-12, (1986).

HOLM, J. y cols. *Biochim. Biophys. Acta*, 62: 359-365, (1980).

HOLT, C. "Zinc binding ligands in milk: both arguments seriously". *J. Nutr.*, 111: 2240-2242, (1981).

HORNE, D.W., BRIGGS, W.T. and WAGNER, C. "Ethanol stimulates 5-methyltetrahydrofolate accumulation in isolated rat liver cells". *Biochem. Pharmacol.*, 27: 2069-2074, (1978).

HOWIE, P.W.; MCNEILLY, A.S.; MCARDLE, T.; SMART, L. and HOUSTON, M. "The relationship between suckling-induced prolactin response and lactogenesis". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:670-673, (1980).

HOYUMPA, A.M. "Mechanism of vitamin deficiencies in alcoholism". *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 10: 573-581, (1986).

HORNE, D.W., BRIGGS, W.T. and WAGNER, C. "Ethanol stimulates 5-methyl-tetrahydrofolate accumulation in isolated rat liver cells". *Biochem. Pharmacol.*, 27: 2069-2074, (1978).

HURLEY, L.S., GOWAN, J. and SWENERTON, H. "Teratogenic effects of short term and transitory zinc deficiency in rats". *Teratology* 4:199-204, (1971).

HURLEY, L.S. "The fetal alcohol syndrome: Possible implications of nutrient deficiencies". In: Li T.K., Schenker, J., Lumeng, L. (eds): "Alcohol and nutrition". Rockville, M.D.: National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. pp:367-379, (1979).

INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE (I.L.S.I) EUROPE. "Recommended daily amounts of vitamins and minerals in Europe". *Nutrition Abstracts and Reviews (A)*, 60 (10): 827-842, (1990).

ISHII, H., WATANABE, Y., OKUNO, F. et al. "Alcohol-induced enhancement of intestinal gamma-glutamyl transpeptidase activity in rat and humans: a possible role in increased serum gamma glutamyl transpeptidase in alcoholics". *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 12: 111-115, (1988).

ISRAEL, Y.; KHANNA, J.M.; ORREGO, H.; RACHAMIN, G. ; WAHID, S.; BRITTON, R.; MACDONALD, A. and KALANT, H. "Studies on metabolic tolerance to alcohol, hepatomegaly and alcoholic liver disease". *Drug and Alcohol Dependence* 4: 109-118, (1979).

ISRAEL, Y., ORREGO, H. and CARMICHAEL, F.J. Acetate-mediated effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18(1): 144-148, (1994).

JACOBSON, J.L., JACOBSON, S.W., SOKOL, R.J., MARTIER, S.S., AGER, J.W. and KAPLAN, M.G. "Teratogenic effects of alcohol on infant development". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 174-183, (1993).

JAEGER, D.E. "Absorption interactions of zinc and cadmium in the isolated perfused rat intestine". *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.* Vol. 4, pp: 101-105, (1990).

JOHANSSON, I.; EKSTROM, G.; SCHOLTE, B.; PUZYCKI, D.; JORNVALL, H. and INGELMAN-SUNDBERG, M. "Ethanol -, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE genes subfamilies". *Biochemistry*, 27: 1925-1934, (1988).

JOHNS, D.G., SPERTI, S. and BURGEN, A.S.V. "The metabolism of tritiated folic acid in man". *J. Clin. Invest.*, 40: 1684-1695, (1961).

JONES, K.L. and SMITH, D.W. "Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy". *Lancet.*, 2: 999-1001, (1973).

JONES, W.L. and STEWART, D.B. "Effects of orally administered ethanol on mammary gland morphology and functional efficiency in lactating rat". *Exp. Pathol.* 25: 205-213, (1984).

JULIÁ, P., FARRES, J. and PARÉS, X. "Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties". *Eur. J. Biochem.* 162: 179-189, (1987).

KALANT, H. "Absorption, distribution, and elimination of ethanol: effects on biological membranes". In: Kissin, B., Begleiter, H., eds. *The biology of alcoholism*. Plenum. Press, New York, (Biochemistry: vol. 1), (1971).

KALANT, H.; KHANNA, J.M. and ENDRENYI, L. "Effect of pyrazole on ethanol metabolism in ethanol-tolerant rats". *Can. J. Pharmacol.* 53: 416-422, (1975).

KAMINISKI, M., RUMENAU, C. and SCHWARTZ, D. "Alcohol consumption in pregnant women and the outcome of pregnancy". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2: 155-163, (1978).

KARLIN, R. y cols. *J. Gynecol. Biol. Reprod.*, 6:489-495, (1977).

KAYE, M.E. and CHASNOFF, I.J. "Substance abuse in pregnancy". En: Knuppel, R.A., Drukker, J.E., editores. *High risk pregnancy a team approach* (2ª ed.). Filadelfia: Saunders, 163-179, (1993).

KEEN, C.L. and GERSHWIN, M.E. "Zinc deficiency and immune function". *Annu. Rev. Nutr.*, 10: 415-431, (1990).

KEPPEN, L.D., MOORE, D.J. and CANNON, D.J. "Zinc nutrition in fetal alcohol syndrome". *Neurotoxicology* 11 (2) p 375-380, (1990).

KESANIEMI, Y.A. "Ethanol and acetaldehyde in the milk and peripheral blood of lactating women after ethanol administration". *J. Obstet. Gynecol. Br. Commonwealth* 81: 84-86, (1974).

KESHAVARZIAN, A., IBER, F.L., DANGLEIS, M.D. and CORNISH, R. "Intestinal-transit and lactose intolerance in chronic alcoholics". *Am. J. Clin. Nutr.*, 44: 70-76, (1986).

KIILERICH, S., DIETRICHSON, O., LOUD, F.B., NAESTOFT, J., CHRISTIANSEN, C. *Scand. J. Gastroenterol* 15:363-367, (1980).

KING, J.C. and TURNLUND, J.R. "Human zinc requirements" In: "Zinc in human biology", Mills, C.F. ed. In Press, International Life Sciences Institute. London. (1989).

KIRCHGESSNER, M., ROTH, H.P. and WEIGAND, E. "Biochemical changes in zinc deficiency". Trace elements in human health and disease, 1: 189-225, (1976).

KLIN, Z. "Método standard optimado" de la Deutsche Gesells Chaftn für Kliniche Chemie. Chem. U. Klin. Biochem 8 (1970) 658, 10 (1972).

KOIVUALA, T. and LINDROS, K.D. "Effects on long-term ethanol treatment on acetaldehyde and alcohol deshydrogenase activities in rat liver". Pharmacology 24:1937-1942, (1975).

KORTELAJNEN, M-L., HUTTUNEN, P. and HIRVONEN, J. "Histochemical and biochemical detection of alcohol dehydrogenase in rat brown adipose tissue". Alcohol 8:151-154, (1991).

KOWARSKI, S., BLAIN-STANEK, C.S. and SCHACTER, D. "Active transport of zinc and identification of zinc-binding protein in rat jejunal mucosa". Am. J. Physiol. 226: 401-407, (1974).

KRASNER, N., COCHRAN, K.M., RUSSELL, R.I., CARMICHAEL, H.A. and THOMPSON, G.G. "Alcohol and absorption from the small intestine. I. Impairment of absorption from the small intestine in alcoholics". Gut, 17: 245-248, (1976).

KREBBS, H.A. and PERKINS, J.R. "The physiological role of liver alcohol deshydrogenase". Biochem. J. 118: 635-640, (1970).

KUMAR, S.P. "Fetal alcohol syndrome. Mechanisms of teratogenesis". Ann. Clin. Lab. Sci. 12: 254-257, (1982).

KUO, Y.J. and SHANBUR, L.L. "Effects of ethanol on sodium, 3-methyl glucose, and L-alanine transport in the jejunum". Am. J. Dig. Dis., 23: 51-55, (1978).

LABADIE, H., VERNEAU, A., TRINCHET, J.C. and BEAUGRAND, M. Gastroenterol Clin. Biol. 10: 799-803, (1986).

LANDSDOWN, A.B.G., and DAYAN, A.D. "Alterations in crypt cell populations in the small intestine as an early toxic response to sub-acute ethanol administration". Arch. Toxicol., 59: 448-452, (1987).

- LANE, F., GOFF, P. MCGUFFIN, R. and HILLMAN, R.S. "Folic acid metabolism in normal, folate deficient and alcoholic man". *Br. J. Haematol.*, 34: 489-501, (1976).
- LAPOSATA, E.A. and LANGE, L.G. "Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse". *Science*. 231: 497-499, (1986).
- LAPOSATA, E.A., SCHERRER, D.E. and LANGE, L.G. "Fatty acid ethyl esters in adipose tissue". *Arch. Pathol. lab. Med.* 113: 762-766, (1989).
- LAWTON, M.E. "Alcohol in breastmilk". *Aust. NZJ. Obstet. Gynecol.* 25: 71-73, (1985).
- LEE, H.H., PRASAD, A.S., BREWER, G.J. and OWYANG, C. "Zinc absorption in human small intestine". *Am.J.Physiol.*, 256 (1,I): G87-G91, (1989).
- LEE, R.V. "Abuso de drogas". En: Burrow, G.N., Ferris, T.F., editores. *Complicaciones médicas durante el embarazo (2ª ed.)*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, S.A., 583-590, (1989).
- LEEVY, C.M, CARDIL, FRANK, O., GELLENE, R. and BAKER, H. "Incidence and significance of hypovitaminemia in randomly selected municipal population". *Am. J. Clin. Nutr.*, 17:259-71, (1976).
- LEMOINE, P; HAURROUSSEAU, M.; BORTEYRU, J.P. and MENUET, J.C. "les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées: A propos de 127 cas". *Quest Med.* 21:476-482, (1968).
- LEO, M.A., KIM, C.I. and LIEBER, C.S. *Drug Nutr. Interact.* 6, (1988).
- LI, T-K. and VALLEE, B.L. "Papel bioquímico y nutricional de los oligoelementos". In: "Nutrición en la salud y en la enfermedad" edited by Goodhart, R.S. and Shills, M.E., pág. 386-394, Salvat, (1987).
- LIANG, C.S. and LOWENSTEIN, J.M." Metabolic control of the circulation". *J. Clin. Invest.* 62:029-1038, (1978).
- LIEBER, C.S.; JONES, D.P. and DeCARLI, L.M. "Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diet". *J. Clin. Invest.* 44: 1009-1020, (1965).

LIEBER, C.S. and DE CARLI, L.M. "Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptative properties in vivo". *Biol. Chem.* 245: 2505-2512, (1970).

LIEBER, C.S. and DECARLI, L.M. "The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181. 279-287, (1972).

LIEBER, C.S. "Metabolism of ethanol". In Lieber CS (ed): *Metabolic aspects of alcoholism.* Baltimore: University Park Press pp: 1-7, (1977).

LIEBER, C.S. "Alcoholic liver injury". *Gastroenterology*, 4: 406-419, (1988).

LIEBER, C.S. "The influence of alcohol on nutritional status". *Nutrition reviews* vol. 46 No 7, (1988a).

LIEBER, C.S. "Biochemical and molecular basis for alcohol-induced injury to liver and other tissues". *N. Engl. J. Med.* 319: 1639-1650, (1988b).

LIEBER, C.S., LASKER, J.M., DE CARLI, L.M., SAELI, J. and WOJTOWICZ T. "Role of acetone, dietary fat, and total energy intake in the induction of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 791-795, (1988).

LIEBER, C.S. and PIGNON, J.P. Ethanol and lipids. En "Human plasma lipoproteins: chemistry, physiology and pathology." Fruchart, J.C. and Sheperd, J. (eds). Berlin, New York: Walter De Gruyter and Co. pp: 245-280, (1989).

LIEBER, C.S. "Alcohol, liver and nutrition". *J. Am. College Nutrition*, 10(6): 602-632, (1991).

LIN, G.W.J. and MADDATU, A.P. "Effect of ethanol feeding during pregnancy on maternal-fetal transfer of alpha amino isobutyric acid in rat". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4: 222, (1980).

LIN, G.W.J. "Effect of ethanol feeding during pregnancy on placental transfer of alpha-amino isobutyric acid in the rat". *Life Sci.* 28:595-601, (1981a).

LIN, G.W.J. "Fetal malnutrition: A possible cause of the Fetal Alcohol Syndrome". *Prog. Biochem. Pharmacol.* 18:115-121, (1981b).

LIN, G.W.-J and LESTER, D. "Altered placental folate coenzyme distribution by ethanol consumption during pregnancy". *Nutr. Rep. Int.*, 31: 1375-83, (1985).

LIN, G.W.-J. "Folate deficiency and acute ethanol treatment on pregnancy outcome in the rat". *Nutr. Res.*, 8: 1151-1160, (1988).

LIN, G.W.-J. "Nutrition and alcohol teratogenicity". In: Watson, R.R., ed. *Biochemistry and physiology of substance abuse*. Vol. 2. Boca Raton, FL: CRC press: 221-243, (1990).

LIN, G.W.-J. "Maternal-fetal folate transfer: effect of ethanol and dietary folate deficiency". *Alcohol*, Vol. 8 pp. 169-172, (1991a).

LIN, G.W.-J. "The effect of dietary folic acid levels and gestational ethanol consumption on tissue folate contents and rat fetal development". *Nutr. Res.*, 11: 223-230, (1991b).

LINDENBAUM, J. and ROMAN, M.J. "Nutritional anemia in alcoholism". *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 2727-2735, (1980).

LINDER, M.C. "Nutrición y metabolismo de los elementos trazas". In: "Nutrición aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos". Ed. Eunsa ediciones universidad de Navarra, S.A. Pamplona. pág. 189-241, (1988).

LINDROS, K.O.; VÄÄNÄNEN, H.; SARVIHARJU, M. and HAATAJA, H. "A simple procedure using 4-methylpyrazole for developing tolerance and other chronic alcohol effects". *Alcohol* 1: 145-150, (1984).

LIONETTI, F.J., FORTIER, N.L. and JEDZINIAK, J.A. "Acetaldehyde, a product of deoxynucleoside metabolism in human erythrocyte ghosts". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116: 1080-1082, (1964).

LITTLE, R.E.; STREISSGUTH, A.P.; BARR, H.M. and HERMAN, C.S. "Decreased birth weight in infants of alcoholic women who abstained during pregnancy". *J. Pediatr.* 96: 974-977, (1980).

LITTLE, R.E.; YOUNG, A. and STREISSGUTH, A.P. "Preventing fetal alcohol effects: Effectiveness of a demonstration project". In: *Mechanisms of alcohol damage in utero* (CIBA Foundation Symposium No. 105), London, Pittman, pp: 254-274, (1984).

LITTLE, R.E.; ANDERSON, K.W.; ERVIN, C.H.; WORTHINGTON-ROBERTS, B. and CLARREN, S.K. "Maternal alcohol use during breast-feeding and infant mental and motor development at one year". *New Engl. J. Med.* 321: 425-430, (1989).

LOMBECK, I., SCHNIPPERING, H.G., RITZL, F., FEINENDEGEN, L.E. and BREMNER, H.J. "Absorption of zinc in acrodermatitis enteropathica". *Lancet*, 1:855, (1975).

LONNERDAL, B., SCHNEEMAN, B.O., KEEN, C.L. and HURLEY, L.S. "Molecular distribution of zinc in biliary and pancreatic secretions". *Biol. Trace Elem. Res.*, 2: 149-158, (1980a).

LONNERDAL, B., KEEN, C.L., SLOAN, M.V. and HURLEY, L.S. "Molecular localization of zinc in rat milk and neonatal intestine". *J. Nutr.*, 110: 2414-2419, (1980b).

LOPEZ-TEJERO, D; ARILLA, A.; COLAS, B.; LLOBERA, M. and HERRERA, E. "Low intestinal lactase activity in offspring from ethanol-treated mothers". *Biol. Neonate.* 55: 204-213, (1989).

LLOPIS, J.; LAMPREABE, A.; PERAN, F.; MATAIX, F.J.; URBANO, G. and MONTELLANO, M.A. "Influence of hydrocortisone acetate administered to the lactating rat on lipid composition of the milk and serum lipid levels in dams and pups". *Horm. Metabol. Res.* 21: 421-426, (1989).

MAEDA, M., HASUMURA, Y. and TAKEUCHI, J. "Localization of cytoplasmic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase isozymes in human liver. *Lab. Invest.* 59: 75-81, (1988).

MAHALKO, J.R., SANSTEAD, H.H., JOHNSON, L.A. and MILNE "Effect of a moderate increase in dietary protein on the retention and excretion of Ca, Cu, Fe, Mg, P and Zn by adult males". *Am. J. Clin. Nutr.*, 37: 8-14, (1983).

MARTIN, D.C.; MARTIN, J.C.; STREISSGUTH, A.P. and LUND, C.A. "Suckling frequency and amplitude in newborns as a function of maternal drinking and smoking". In: Galanter, M., ed. *Currents in alcoholism*. Vol. 5 New York: Grune and Stratton 359-366, (1979).

MARTIN, M.T., LICKLIDER, K.F., BRUSHMILLER, J.G. and JACOBS, F.A. "Detection of low molecular Weight-copper (II) and zinc (II) interactions following ethambutol administration". *Agents Actions*, 11: 296- 305, (1981).

MASON, J.B. and SELHUB, J. Folate-binding protein and the absorption of folic acid in the small intestine of the suckling rat". *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 620-625, (1988).

MASTERS, D.G., KEEN, C.L., LONNERDAL, B. and HURLEY, L.S. "Zinc deficiency teratogenicity: The protective role of maternal tissue catabolism". *J Nutr.* 113:905-912, (1983).

MAZZANTI, R., DEBNAM, E. and JENKINS, W.J. "Effect of chronic ethanol intake on lactase activity and active galactose absorption in rat small intestine". *Gut*, 28: 56-60, (1987).

MAZZANTI, R., and JENKINS, W.J. "Effect of chronic ethanol ingestion on enterocyte turnover in rat small intestine". *Gut*, 28: 52-55, (1987a).

Mc CLAIN, C.J. and SU, L.C. "Zinc deficiency in the alcoholic : a review". *Clin. Exptl. Res.*, 7: 5-10, (1983).

Mc CLAIN, C.J., ANTONOW, D.R., COHEN, D.A. and SHEDLOFSKY, S.I. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10:582-589, (1986).

Mc MARTIN KE, COLLINS TD, EISENGA BH, FORTNRY T, BATES WR and BAIRNSFATHER. "Effects of chronic ethanol and diet treatment on urinary folate excretion and development of folate deficiency in the rat". *J. Nutr.*, 119:1490-1497, (1989).

MCGREGOR, S.N. and CHASNOFF, I.J. "Substance abuse in pregnancy". En: Lin, C.H., Verp, M.S., Sabbagha, R.E., editores. Nueva York: Springer Verlag, 566-589, (1993).

MCGUFFIN, R., GOFF, P. and HILLMAN, R.S. "The effect of diet and alcohol on the development of folate deficiency in the rat". *Br. J. Haematol.*, 31: 185-192, (1975).

MCMANUS, I.R., BROSTKY, E. and OLSON, R.E. "The origin of ethanol in mammalian tissues". *J. Biol. Chem.* 241: 349- 363, (1966).

MENARD, M.P., MCCORMICK, C.C. and COUSINS, R.J. "Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc". *J. Nutr.*, 111, 1353-1361, (1981).

MENARD, M.P., OESTREICHER, P. and COUSINS, R.J. "Zinc transport by isolated, vascularly perfused rat intestine and border vesicles". In: Nutritional bioavailability of zinc", edited by Inglett, G.C., Washington, D.C. Am. Chem. Soc., pág. 233-246, (1983).

MENARD, M.P. and COUSINS, R.J. "Zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine". J.Nutr., 113: 1434-1442, (1983a).

MENNELLA, J.A.; BEAUCHAMP, G.A. "The transfer of alcohol to human milk". New Engl. J. Med. 325: 981-985, (1991).

MENNELLA, J.A.; BEAUCHAMP, G.A. "Beer, breast feeding and folklore". Dev. Psychobiol 26:459-466, (1993).

MESSIHA, F.S. and VARMA, S.K. "Metabolic aspect of fetal alcohol syndrome". Neurobehavioral Toxicology and Teratology 5:269-272, (1983).

METHFESSEL, A.H. and SPENCER, H. "Zinc metabolism in the rat. I. Intestinal absorption of zinc". J. Appl. Physiol. 34: 58-62. (1973).

METHFESSEL, A.H. and SPENCER, H. "Intestinal absorption and secretion of zinc in the rat". Trace element metabolism in animals, ed. W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Ganther, W. Merts, 2: 541-543, (1974).

MEZEY, E. and HALSTED, C.H. "Effect of alcohol on gastrointestinal and pancreatic, New York: Academic Press pp: 277-302, (1979). fuction". In: Fermented Food Beverages in Nutrition, edited by Gastineau C, Darby WJ and Turner

MILNE, D.B., CANFIELD, W.K., GALLAGER, S.K., HUNT, J.R. and KLEVAY, L.M. "Ethanol metabolism in postmenopausal women fed a diet marginal in zinc". Am. J. Clin. Nutr., 46: 688-693, (1987).

MILLER, J.C. and MILLER, J.N. "Statistics for analytical chemistry, Ellis Howood Limited, Chichester, United Kingdom 2^a Ed. (1993).

MOGGIAN, G. y cols. Rev. Ost. Gin. Peri., nº 4, (1986).

MONTONERI, C. y cols. LXV Congresso Naz. Soc. Ital. Ginecol. Ostet., Taormina 29 Maggio-2 giugno, (1988).

MORGAN, M.Y. "Ethanol and nutrition". Br. Med. Bull. 38: 21-29, (1982).

NAVARRETE, L. y cols. Simposio Internacional. "Hierro y Folatos. Repercusion en la madre y el feto". Madrid (1990).

NAVEH, Y., BENTUR, L. and DIAMOND, E. "Site of zinc absorption in dog small intestine". J.Nutr. 118: 61-64, (1988).

NEBERT, D. W., ADESNIK, M., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GONZALEZ, F.J., GUIENGERICH, P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.F., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, I.R., SATO, R. and WATERMAN, M.R. "The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature". DNA 6: 1-11, (1987).

NEILL, J.D. "Prolactin secretion and its control". In: Knobil, E.; Neill, J.D., eds. The physiology of reproduction". New York: Raven Press 1379-1386, (1988).

NIEMELA, O., HALMESMAKI, E. and YLIKORKALA, O. "Hemoglobin-acetaldehyde adducts are elevated in women carrying alcohol-damaged fetuses". Alcohol. Clin. Exp. Res., 15: 1007-1010, (1991).

NILSON, N.O. and BELFRAGE, P. "Effects of acetate, acetaldehyde and ethanol on lipolysis in isolated rat adipocytes". J. Lipid. Res. 19: 737-741, (1978).

O'DELL, B.L. and CAMPBELL, B.J. "Trace elements: metabolism and metabolic function". Florkin, Stolz, Metabolism of vitamins and trace elements". (1970).

OESTREICHER, P. and COUSINS, R.J. "Influence of intraluminal constituents on zinc absorption by isolated, vascularly perfused rat intestine". J. Nutr., 112: 1978-1982, (1982).

OESTREICHER, P. and COUSINS, R.J. "Zinc uptake by basolateral membrane vesicles from rat small intestine". J.Nutr. 119: 639-646, (1989).

OVELLETTE, E.M.; ROSE, H.; ROSMAN, N.P. and WEINER, L. "Adverse effects on offspring of maternal alcohol abuse during pregnancy". *New Engl. J. Med.* 297: 528-530, (1977).

PAINE, J.C., EICHNER, E.R. and DICKISON, V. "Concordance of radioassay and microbiological assay in the study of the ethanol-induced fall in serum folate level". *Am. J. Med. Sci.*, 266: 135-138, (1973).

PATWARDHAN, R.V.; SCHENKER, S.; HENDERSON, G.I.; ABOU-MOURAD, N.N. and HOYUMPA, A.M. "Short-term and long-term ethanol administration inhibits the placental uptake and transport of valine in rats". *J. Lab. Clin. Med.* 98:251-261, (1981).

PEKAS, J.C. "Pancreatic incorporation of zinc and histidine C into secreted proteins of the pig". *Am. J. Physiol.*, 220: 799-803, (1971).

PERITI, P. *Chemioterapia*, 2 (suppl 4), (1983).

PERKIN ELMER Co. "Analytical methods for Atomic Absorption Spectrophotometry". Perkin Elmer Norwalk Connecticut (1993).

PERLOW, BARONA, E. and Lieber, C.S. "Symptomatic intestinal disaccharidase deficiency in alcoholics". *Gastroenterology* 72: 680-684, (1977).

PERSSON, J. "Alcohol and the small intestine". *Scand. J. Gastroenterol*, 26:3-15, (1991).

PETERS, T.J. "Ethanol metabolism". *Br. Med. Bull.* 38: 17-20, (1982).

PETERSON, C.M. and POLIZZI, C.M. "Improved method for acetaldehyde in plasma and hemoglobin-associated acetaldehyde. Results in teetotalers and alcoholic reporting for treatment". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4: 477-480, (1987).

PIETRANTONI, M. and KNUPPEL, R.A. "Alcohol use in pregnancy". *Clin. Perinatol*, 18: 93-11, (1991).

PONZ, F., ILUNDAIN, A. and LLUCH, M. "Method for successive absorptions with intestinal perfusion in vivo". *Rev. Esp. Fisiol.*, 35: 97-104, (1979).

PRASAD, A.S. "Role of zinc in humans". *Ultratrace metal analysis in science and environment*, 172: 197-229, (1979).

PRASAD, A.S. "Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model". *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 403-412, (1991).

PREEDY, V.R. and PETERS, T.J. "Protein synthesis of muscle fractions from the small intestine in alcohol fed rats". *Gut*, 31: 305-310, (1990).

PREEDY, V.R., MARWAY, J.S., SIDDIQ, T., ANSARI, F.A., HASHIM, I.A. and PETERS, T.J. "Gastrointestinal protein turnover and alcohol misuse". *Drug. Alcohol. Depend.*, 34 (1): 1-10, (1993).

QUIST, I. y cols., *Act. Obstet. Gynecol. Scand.*, 65:15-22, (1986).

RACUSEN, L.C. and KRAWITT, E.L. "Effect of folate deficiency and ethanol ingestion on intestinal folate absorption". *Digestive Diseases*, 22: 915-920, (1977).

RANDALL, C.L. "Teratogenic effects of in utero ethanol exposure". In: Blum, K., Bard, D.L., Hamilton, M.G., ed. *Alcohol and opiates*, New York: Academic Press: 91-107, (1977).

RANDALL, C.L.; RILEY, E.P. "Prenatal alcohol exposure: current issues and the status of animal research". *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3: 111-115, (1981).

RASKIN, N.H. and SOKOLOFF, L. "Ethanol-induced adaptation of alcohol dehydrogenase activity in rat brain". *Nature*. 236:138-140, (1972).

RAUL, F., DOFFOEL, M., MARESCAUX, J., BOCKEL, R. and GLENIER, J.F. "Effects of prolonged alcohol administration and a high carbohydrate-low protein diet on the activities of the jejunal brush border enzymes in the rat". *Gut* 23: 962-967, (1982).

RAUL, F., LEDIG, M., GOSSE, F., GALLUSER, M. and DOFFOEL, M. "Prenatal exposure to alcohol in rat: Effect on intestinal enzymes in offspring". *Alcohol vol.* 4 pp: 405-408, (1987).

RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. "Oligoelementos". In "Raciones dietéticas recomendadas" 1ª edición española de la 10ª edición original, (1991).

REISENAUER, A.M., BUFFINGTON, T., VILLANUEVA, J.A. and HALSTED, C.H. "Folate binding and hidrolisis by pig intestinal brush-border membranes". *Am. J. Physiol.*, 251: G481-G486, (1986).

REISENAUER, A.M.; BUFFINGTON, T.; VILLANUEVA, J.A. and HALSTED, C.H. "Folate absorpton in alcoholic pigs: in vivo intestinal perfusion studies". *Am. J. Clin. Nutr.* 50: 1429-1435, (1989).

REISENAUER, A.M. "Affinity labelling of the folate-binding protein in pig intestine". *Biochem. J.* 267: 249-252, (1990).

REPPETO, M.; SANZ, P. y VILLAR, P. "La valoración de ADH como índice de afectación alcohólica: I Estudio experimental". *Drogalcohol* Vol. X No. 2 pp:73-77, (1985).

RICOMENA, F. y cols. *Ginecología y Obstetricia*, 13 (4), (1986).

RICHARDS, M.P. and COUSINS, R.J. "Influence of parenteral zinc and actinomycin D on tissue zinc uptake and the syntesis of a zinc-binding protein". *Bioinorgan. Chem.*, 4: 215-224, (1975b).

RICHARDS, M.P. and COUSINS, R.J. "Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in the rat". *J. Nutr.*, 106: 1591-1599, (1976).

ROCKWOOD, G.A. and RILEY, E.P. "Suckling deficits in rat pups exposed to alcohol in utero". *Teratology* 33: 145-151, (1985).

RODRIGUEZ-CASTILLA, J.; LOPEZ-NUEVO, M.; DELGADO, M.J.; MURILLO, M.L. and CARRERAS, O. *Alcohol and Alcoholism*. Vol 31 (1), (1995).

ROGERS, J.M., KEEN, C.L. and HURLEY, L.S. "Zinc deficiency in pregnant Long-Evans hooded rats:Teratogenicity and tissue trace elements". *Teratology* 31:89-100, (1985).

ROGGIN, G.M., IBER, F.L., KATER, R.M.H. and TOBON. "Malabsorption in the chronic alcoholic". *Johns Hopkins Med. J.* 125: 321-330, (1969).

ROGGIN, G.M, IBER, F.L. and LINSCHER, W.G. "Intraluminal fat digestion in the chronic alcoholic". *Gut*, "13: 107-111, (1972).

ROMERO, J.J., TAMURA, T. and HALSTED, C.H. "Intestinal absorption of (3H) folic acid in the chronic alcohol monkey". *Gastroenterology* 80: 90-102, (1981).

ROSSI, T.M., LEBENTHAL, E., NORD, K.S. et al. "Extent and duration of small intestinal mucosal injury in intractable diarrhea of infancy". *Pediatrics* 66: 635-730, (1980).

ROSSI, T.M. y LEBENTHAL, E. "Diarrea intratable del lactante". In Lebenthal E (ed): *Gastroenterología y Nutrición en pediatría*. Barcelona, Salvat pp:951-965, (1985).

SAHAGAIN, B.M., HARDING-BARLOW, I. and PERRY, H.M. "Transmural movements of zinc, manganese, cadmium and mercury by rat small intestine". *J.Nutr.* 93: 291-300, (1967).

SAID, H.M., HOLLANDER, D. and KATZ, D. "Absorption of 5-methyltetrahydrofolate in rat jejunum with intact blood and lymphatic vessels". *Biochem. Biophys. Acta.*, 775: 402-408, (1984a).

SAID, H.M. and STRUM, B.S. "Effect of ethanol and other aliphatic alcohols on the intestinal transport of folates". *Digestion*, 35:129-135, (1986).

SAID, H.M. and REDHA, R. "A carrier-mediated transport for folate in basolateral membrane vesicles of rat small intestine". *Biochem. J.* 247: 141-146, (1987).

SAID, H.M., REDHA, R., TIPTON, W. and NYLANDER, W. "Folate transport intestinal brush border-membrane vesicles following extensive resection of proximal and middle small intestine in the rat". *Am. J. Clin. Nutr.*, 47: 75-79, (1988).

SALASPURO, M.P.; SHAW, S.; JAYATILLEKE, E. et al. "Attenuation of ethanol-induced hepatic redox changes after chronic alcohol consumption: mechanism and metabolic consequences". *Hepatology*, 1: 33-38, (1981).

SALTER, D.N. and BLAKEBOROUGH, P. "Influence of goat's milk folate-binding protein on transport of 5-methyltetrahydrofolate in neonatal-goat small intestinal." *BBMV. Br. J. Nutr.*, 59:497-507, (1988).

SANCHIS, R.M.; SANCHO-TELLO, M. and GUERRI, C. "The effects of chronic alcohol consumption on pregnant rats and their offspring". *Alcohol* 21:295-305, (1986).

SANCHIS, R. and GUERRI, C. "Alcohol metabolizing enzymes in placenta and fetal liver: effect of chronic ethanol intake". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10: 39-44, (1986a).

SANCHO-TELLO, M.; SANCHIS, R. and GUERRI, C. "Effect of short and long-term ethanol feeding on the extent of metabolic tolerance in female rats". *Alcohol and Alcoholism* 23:483-490, (1988).

SANDSTEAD, H.H. "Zinc nutrition in the United States". *Am. J. Clin. Nutr.*, 26: 1251-1260, (1973).

SANDSTEAD, H.H. "The element in medical practice: zinc". *Physicians Guide Pract. Gastroenterol.*, 2: 27-28, (1978).

SANDSTEAD, H.H., KLEVAY, L.M., MUÑOZ, R.A., JACOB, G.M., LOGAN, S.J., RECK, F.R. and DINTZIS, G.E. "Zinc requirements". Thieme G. (ed), *Spurenelment Analytik, Umsatz, Bedarf Mangel and Toxikologie*, Verlag Stuttgart, 105-113, (1979).

SARGENT, W., SIMPSON, Jr. and BEARD, J.D. *J. Pharmacol Exp. ther.*, 190:507-514, (1974).

SCHMIDT, F.H., KLIN, WSCHR., *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 1244, (1961).

SCHORLING, J.B. "The prevention of prenatal alcohol use: a critical analysis of intervention studies". *J. Stud. Alcohol*, 54: 261-267, (1993).

SCHRICKER, B.R. and FORBES, "Studies on the chemical nature of a low molecular weight zinc binding ligand in rat intestine". *Nutr. Rep. Int.*, 18: 159-166, (1978).

SCHRON, C.M., WASHINGTON, C. and BLITZER, B.L. "Anion specificity of the yeyunal folate carrier: effects of reduced folate analogues on folate uptake and efflux". *J. Membrane Biol.*, 102: 175-183, (1988).

SCHRON, C.M. "pH modulation of the kinetics of rabbit jejunal, brush-border folate transport". *J. membrane. Biol.*, 120:192-200, (1991).

SCHWARZ, G. and PALLAUF, J. "Influence of dietary zinc deficiency on the activity of various zinc metalloenzymes in growing rabbits". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 61 (2-3): 129-138, (1989).

SEITZ, H.K., VELASQUEZ, D., CZYGAN, P., et al. "Effect of chronic ethanol consumption on duodenal gamma-glutamyl transpeptidase activity in man and in rats". *Scand. J. Gastroenterol*, 17 (suppl 78), 2214, (1982).

SEITZ, H.K., VELASQUEZ, D., WALDHERR, R. et al. "Duodenal gamma-glutamyltransferase activity in human biopsies: effect of chronic ethanol consumption and duodenal morphology". *Eur. J. Clin. Invest.*, 15: 192-196, (1985).

SELHUB, J., POWELL, G.M. and ROSENBERG, I.H. "Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate". *Am. J. Physiol.*, 246: G515-G520, (1984).

SERDULA, M., WILLIAMSON, D.F., KENDRICK, J.S., ANDA, R.F. and BYERS, T. "Trends in alcohol consumption by pregnant women. 1985 through 1988". *JAMA*, 265: 876-879, (1991).

SHAW, S., JAYATILLEKE, E. and LIEBER, C.S. "Hepatic lipid peroxidation: Potentiation by chronic alcohol feeding and attenuation by methionine". *J. Lab. Clin. Med.* 98: 417-425, (1981).

SHIMIZU, M., LASKER, J.M., TSUTSUMI, M. and LIEBER, C.S. "Immunohistochemical localization of ethanol-inducible P450IIE1 in the rat alimentary tract". *Gastroenterology*, 99: 1044-1053, (1990).

SHOJANIA, A.M. *Clin. Perinatol.*, 11(2):433-459, (1983).

SHORT, R. V. "Breast feeding". *Sci. Am.* 250: 35-41, (1984).

SIEGERS, C.P.; SCHUTT, A. and STRUBELT, O. "Influence of some hepatotoxic agents on hepatic glutathione levels in mice". *Proc. Eur. Soc. Toxicol.* 18: 160-162, (1977).

SINGLETONY, K.W. and McNARY, M.Q. "Effect of moderate ethanol consumption on mammary gland structural development and DNA synthesis in the female rat". *Alcohol* 9: 95-101, (1992).

SJOBLOM, M.; PILSTROM, L. and MORLAND, J. "Activity of alcohol dehydrogenase in the liver and placenta during the development". *Enzyme* 23: 108-115, (1978).

SJOLUND, K., PERSSON, J. and BERGMAN, L. "Can villus atrophy be induced by chronic alcohol consumption? A case report". *J. Int. Med.*, 226: 133-135, (1989).

SMITH, J.C., BROWN, E.D., WHITE, S.C. and FINKELSTEIN, J.D. *Lancet*, 1251-1252, (1975).

SMITH, K.T. and COUSINS, R.J. "Quantitative aspects of zinc absorption by isolate, vascularly perfused rat intestine". *J. Nutr.*, 110: 316-323, (1980).

SNYDER, A.K.; SINGH, S.P. and PULLEN, G.L. "Ethanol-induced intrauterine growth retardation: Correlation with placental glucose transfer". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10:167-170, (1986).

SOLBERG, H.E.; SKREDE, S. and BLOMHOF, J.P. "Diagnosis of liver diseases by laboratory results and discriminant analysis". *Scand. J. Clin. Lab. Inves.* 35: 713-719, (1975).

SOLMONS, N.W.; CHANG, H.; ROSENBERG, I.H. "Partial starvation enhances polyglutamyl and monoglutamyl folate absorption in the rat intestine". *Gastroenterology* 68: 1063, (1975).

SOLOMONS, N.W. and COUSINS, R.J. "Zinc. Absorption and malabsorption of mineral nutrients". *Am. J. Clin. Nutr.*, 34:475-481, (1983).

SOLOMONS, N.W. and COUSINS, R.J. "Zinc". In: "Absorption and malabsorption of mineral nutrients". Edited by Solomons, N.W. and Rosenberg, I.H. pag. 125-197, New York: Liss, (1984).

SONG, M.K. and ADHAM, N.F. "Role of Prostaglandin E₂ in zinc absorption in the rat". *Am. J. Physiol.*, 234: 99-105, (1978).

STARCHER, B.C., GLAUBER, J.G. and MADARAS, J.G. "Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothionein". *J. Nutr.* 110: 1391-1397, (1980).

STEEL, L. and COUSINS, R.J. "Kinetics of zinc absorption by luminally and vascularly perfused rat intestine". *Am.J. Physiol.* 248: G46-G53, (1985).

STEIN, M.B. and SUSSER, M. "The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. I. Effects on six indices at birth". *Pediatr. Res.* 9: 70-76, (1975).

STEINBERG, S.E., CAMPBELL, C.L. and HILLMAN, R.S. "The toxic effects of alcohol on folate metabolism". *Clin. Toxicol.*, 17: 3-4, (1980).

STEINBERG, S.E., CAMPBELL, C.L. and HILLMAN, R.S. "The effect of alcohol on hepatic secretion of methylfolate ($\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu1}$) into bile". *Biochem. Pharmacol.*, 30: 96-98, (1981).

STERN, M., CARTER, E.A. and WALKER, W.A. "Food proteins and gut mucosal barrier. IV. Effects of acute and chronic ethanol administration on handling and uptake of bovine serum albumine by rat small intestine". *Dig. Dis. Sci.*, 31: 1242-1248, (1986).

STEVEN, W.M.; BULLOCH, B.; SEELING, L.L. "A morphometric study of the effects of ethanol consumption lactating mammary glands of rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13: 209-212, (1989).

STREISSGUTH, A.P.; LANDESMAN-DWYER,S.;MARTIN,J.C. and SMITH, D.W. "Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals". *Science* 209:353-361, (1980).

STRUGALA, G.J., OVERHOFF, H. and FORTH, W. "Bidirectional transfer and tissue accumulation of folic acid by rat intestine in vitro". *Digestion*, 32: 255-266, (1985).

SUBRAMANIAN, M.G. and REECE, R.P. "Anterior pituitary and plasma-prolactin in rats after 2 to 90 minutes of suckling". *Proc. Soc. Exp-Biol. Med.* 149:754-756, (1975).

SUBRAMANIAN, M.G. and ABEL, E.L. "Alcohol inhibits suckling-induced prolactin release and milk yield". *Alcohol.* 5: 95-98, (1988).

SUBRAMANIAN, M.G.; CHEN, X.G. and BERGESKI, B.A. "Pattern and duration of the inhibitory effect of alcohol administered acutely on suckling-induced prolactin in lactating rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14: 191-194, (1990).

SUBRAMANIAN, M.G.; SAVOY-MOORE, R.T.; BERGESKI, B.A.; KRUGER, M.L. and ABEL, E.L. "Acute alcohol infusion does not alter plasma gonadotropins or prolactin in ovariectomized rats". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14: 191-194, (1990a).

SUBRAMANIAN, M.G.; BERESKI, B.A. "Inhibitory effect of alcohol (EtOH) on suckling-induced prolactin release in lactating rats: Site of action". *Biol. Reprod. Suppl* 44:102, (1991).

SUBRAMANIAN, M.G.; CHEN, X.G.; BERGESKI, B.A. AND SAVOY-MOORE, R.T. "Alcohol inhibition of suckling-induced prolactin release in lactating rats: Threshold evaluation". *Alcohol* 8: 203-206, (1991a).

SUBRAMANIAN, M.G. "Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat". *Alcohol* Vol. 12 No 2 pp 137-143, (1995).

SUH, S.M., FIREK, A.F. "Magnesium and zinc deficiency and growth retardation in offspring of alcoholic rats". *J. Am. College of Nutr.* 1:193-201, (1982).

SULLIVAN, I.W. and HERBERT, V. "Suppression of hematopoiesis by ethanol". *J. Cli. Invest.*, 43: 2048-2061, (1964).

SULLIVAN, J.F., WILLIAMS, R. V. and BURCH. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 3:235-239, (1979).

SUSO, F.A. and EDWARDS, H.M.Jr. "EDTA and zinc binding by intestinal digesta, intestinal mucosa and blood plasma". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138, 157-162, (1971).

SUSO, F.A. and EDWARDS, H.M.Jr. "Binding of EDTA, histidine and acetylsalicylic acid to zinc-protein complex in intestinal content, intestinal mucosa and blood plasma". *Nature*, 236, 230-232, (1972).

TABAKOFF, B. "Alcohol tolerance in humans and animals". In: *Animal Models in Alcohol Research*, Eriksson, k.; Sinclair, J.D. and Kiianmaa, K. eds, pp. 271-292. Academic Press, New York, (1980).

TANI, M., FUSHIKI, T. and IWAI, K. "Influence of folate-binding protein from bovine milk on the absorption of folate in gastrointestinal trac of rat". *Biochim. Biophys. Acta*, 757:274-281, (1983).

TASMAN-JONES, C., KAY, R.G. and LEE, S.P. "Zinc and copper deficiency with particular reference to parenteral nutrition". *Sug. Ann.*, 10: 23-52, (1978).

TAUBENECK, M.W.; DASTON, G.P.; ROGERS, J.M. and KEEN, C.L. "Altered maternal zinc metabolism following exposure to diverse developmental toxicants". *Reprod. Toxicol.* 8 (1), pp:25-40, (1994).

TESCHKE, R.; BRAND, A. and STROHMEYER, G. "Induction of hepatic microsomal gamma-glutamyl transferase activity following chronic alcohol consumption". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:718-724, (1977).

TESTAR, X. "Ethanol administration in the drinking fluid to pregnant rats as a model for the fetal alcohol syndrome". *Pharmacol Biochem Behav.* 24: 625-630, (1986).

TESTAR, X.; LLOBERA, M. and HERRERA, E. "Metabolic response to starvation at late gestation in chronically ethanol-treated and pair-fed undernourished rat". *Metabolism* 37: 1008-1014, (1988).

THOMSON, A.D., BAKEK, H. and LEEVY, C.M. "Pattern of ³⁵S-thiamin hydrochloride absorption in the malnourished alcoholic patients". *J. Lab. Clin. Med.* 76: 34-38, (1970).

THOMSON, A.B.R. "Effect of chronic ingestion of ethanol on in vitro uptake of lipids and glucose in the rabbit jejunum". *Am. J. Physiol.*, 246: 120-129, (1984).

THOMPSON, R.P.H. "Assessment of zinc status". *Proceeding of the nutrition society*, 50 (1): 19-28, (1991).

TOMASULO, P.A., KATER, R.M.H. and IBER, F.L. "Impairment of thiamine absorption in alcoholism". *Am. J. Clin. Nutr.* 21:1341, (1980).

TOPEL, H. "Biochemical basis of alcoholism: Statement and present". *Research. Alcohol*, 2(6): 711-788, (1985).

TRAVES, C. and LOPEZ-TEJERO, D. "Ethanol elimination in alcohol-treated pregnant rats". *Alcohol Alcoholism Vol. 29 No 4*; pp: 385-395, (1993).

UNDERWOOD, E.J. "Zinc". Elements in human and animal nutrition. 196-242, (1977).

VAN CAMPEN, D.R. and KOWALSKI, T.J. "Studies on zinc absorption zinc binding by homogenates of rat intestinal mucosa". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136: 294-297, (1971).

VAN CAMPEN, D.R. and HOUSE, W.A. "Effect of a low protein diet on retention of an oral dose of zinc and on tissue concentrations of zinc, iron and copper in rats". J. Nutr., 104:84-90, (1974).

VALLEE, B.L. and BAZZONE, T.J. "Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase isozymes". Curr. Top. Biol. Med. Res. 8: 219-244, (1983).

VAN DERHOFF, J.A., SCOPINARO, N., TUMA, D.J., GIANETTA, E. CIVARELLI, D. and ANTONSON, D.L. "Hair and plasma zinc levels following exclusion of biliopancreatic secretions from functioning gastrointestinal tract in humans". Dig. Sci., 28: 300-305, (1983).

VAN DYKE, D.C.; MCKAY, L. and ZIAYLEK, E.N. "Management of severe feeding dysfunction in children with fetal alcohol syndrome". Clin. Pediatr. 21: 336-339, (1982).

VEITCH, R.L., LUMENG, L. and LI, T.-K. "Vitamin B₆ metabolism in chronic alcohol abuse: The effect of ethanol oxidation on hepatic pyridoxal-5-phosphate metabolism". J. Clin. Invest. 55: 1026-1032, (1975).

VERP, M.S. "Environmental causes of pregnancy loss and malformations". En: Lin, C.H., Verp, M.S. Sabbagha, R.E., editores. The high risk fetus. Nueva york: Springer Verlag, 127-145, (1993).

VIDELA, L.; BERNSTEIN, J. and ISRAEL, Y. "Metabolic alterations produced in liver by chronic ethanol administration. Increased oxidative capacity". Biochem. J. 134: 507-514, (1973).

VILARO, S.; VINAS, O.; RENESAR, X. "Altered ultrastructure of lactating rat mammary epithelial cells induced by chronic ethanol ingestion". Alcohol. Clin. Exp. Res. 13: 128-136, (1989).

VILLA, I.; ARIZMENDIARRIETA, C. y MORAN, J. "Zinc y cobre importancia en nutrición infantil". Acta Pediátrica Española Vol. 48 No 6, (1990).

VINAS, O.; VILARO, S.; HERRERA, E.; RENESAR, X. "Effects of chronic ethanol treatment on amino acid uptake and enzyme activities in the lactating rat mammary gland". *Life Sci.* 40: 1745-1749, (1987).

WADA, L., TURNLUD, J.R. and KING, J.C. "Zinc-utilization in young men fed adequate and low zinc intakes". *J. Nutr.*, 115: 1345-1354, (1985).

WAGNER, G. and FUCHS, A.R. "Effect of ethanol on uterine activity during suckling in postpartum women". *Acta Endocrinol* 58: 133-141, (1978).

WAHLEFELD, A.W.G., HERZY, E., Bernt. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* Vol. 29, Suppl 126 Abstract 11-12, (1972).

WAPNIR, R.A.; KHANI, D.E.; BAYNE, M.A.; LIF-SHITZ. "Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other low-molecular-weight ligands". *J. Nutr.* 113:1346-1354, (1983).

WAPNIR, R.A.; GARCIA-ARANDA, J.A.; MEVORACH, D.E.K.; LIF-SHITZ, F. "Differential absorption of zinc and low-molecular-weight ligands in the rat gut in protein-energy malnutrition". *J. Nutr.* 115: 900-908, (1985).

WAPNIR, R.A. and STIEL, L. "Zinc intestinal absorption in rats: specificity of amino acids as ligands". *Am. Inst. Nutr.* pp: 2171-2179, (1986).

WEICHSELBAUM, T.E. *Am. J Clin. Path* 16:40, (1946).

WEIGAND, E. and KIRCHGESSNER, M. "Total true efficiency of zinc utilization: determination and homeostatic dependence upon the zinc supply status in young rats". *J. Nutr.*, 110: 469-480, (1980).

WEINBERG, J. "Nutritional issues in prenatal alcohol exposure." *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6: 261-269, (1984).

WEINBERG, J. "Effects of ethanol and maternal nutritional status on fetal development". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 9:49-53, (1985).

WEINER, C.P.; SABBAGHA, R.E.; TAMURA, R.K. and DALCOMPO, S. "Sonographic abdominal circumference: dynamic versus static imaging". *Am. J. Obstet. Gynecol.* 139:953-955, (1981).

WEINER, L. and LARSON, G. "Clinical prevention of fetal alcohol effects: A reality". *Alcohol Health Res. World* 11:60-94, (1987).

WHEELER, S.F. "Substance abuse during pregnancy". *Prim. Care.*, 20: 191-207, (1993).

WICKHLAM, C. y cols. *MRCI Newsletter*, 152 (8):295-299, (1983).

WILSON, F.A. and HOYUMPA, A.W. "Ethanol and small intestinal transport". *Gastroenterology* 76:388-403, (1979).

WILSON, J.R.; ERWIN, V.G. and McCLEARN, G.E. "Effects of ethanol: 1. Acute metabolism and ethnic differences". *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8:226-232, (1984).

WINICK, M.; BRASEL, J.A. and VELASCO, E.G. "Effects of prenatal nutrition upon pregnancy risk". *Clin. Obstet. Gynecol.* 16: 184-198, (1973).

WISNIEWSKA, I.R., GAWLIK, Z. and SASIONWSKA-MOTYL, M. "Effect of simultaneous administration of ibuprofen and ethanol on the alkaline phosphatase activity in the small intestine". *Folia Histochem Cytobiol.*, 23: 51-60, (1985).

WU, A., CHANARIN, I., SLAVIN, G. and LEVI, A.J. "Folate deficiency in the alcoholics-its relation ship to clinical and hematological abnormalities, liver disease and folate stores". *Brit. J. Hematol.*, 29: 469-78, (1975).

WU, F.Y-H. and WU, C-W. "Zinc in DNA replication and transcription". *Ann. Rev. Nutr.*, 7: 251-272, (1987).

WYNN, R.M. "Drugs in pregnancy". En *Obstetrics and Gynecology, the clinical core* (5^a ed.). Filadelfia: Lea & Feibiger, 65-66, (1992).

YEN, S.S.C. "Prolactin in human reproduction". In: Yen, S.S.C.; Jaffe, R.B., eds. *Reproductive endocrinology*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 357-388, (1991).

ZETTNER, A., BOSS, G.R. and SEEGMILLER, J.E. "A long-term study of the absorption of large oral dose of folic acid". *Am. Clin.Lab.Sci.*, 11:516-524, (1981).

ZIDENBERG-CHERR, S., PEGGY, A., BENAK, BS., HURLEY, L. and KEEN, C.L. "Altered mineral metabolism: A mechanism underlying the Fetal Alcohol Syndrome in rats". *Drug-Nutrient Interactions* 5:257-274, (1988).

ZIDENBERG-CHERR, S., ROSENBAUM, J. and KEEN, C.L. "Influence of ethanol consumption on maternal-fetal transfer of zinc in pregnant rats on day 14 of pregnancy". *J. Nutr.* 118:865-870, (1988a).

ZIDENBERG-CHERR, S., BENAK, P.A., HURLEY, L.S. and KEEN, C.L. "Altered mineral metabolism: a mechanism underlying the fetal alcohol syndrome in rats". *Drug Nutr. Interact.*, 5: 1-18, (1988b).

ZIMMERMAN, J., SELHUB, J. and ROSENBERG, I.H. "Role of sodium in transport of folic acid in the small intestine". *Am. J. Physiol.*, 251:G218-G222, (1986).

ZIMMERMAN, J. "Folic acid transport in organ-cultured mucosa of human intestine. Evidence for distinct carriers". *Gastroenterology*, 99: 964-972, (1990).

ZLOTKIN, S.H. and BUCHANAN, B.E. "Amino acid intake and urinary zinc excretion in newborn infants receiving total parenteral nutrition". *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 330-334, (1988).

ZLOTKIN, S.H. "Interacciones de nutrientes con nutrición parenteral total: efecto de toma de histidina y cisteina sobre la excreción urinaria". *J. Pediatric.*, 114 (5): 859-864, (1989).

ZURZANO, A.; RUIZ DEL ARBOL, L. and HERRERA, E. "Effect of liver disorders on ethanol elimination and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in liver and erythrocytes". *Clin. Sci.* 76; 51-57, (1989).

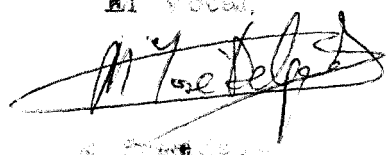
Bibliografía.

ZURZANO, A.; RUIZ DEL ARBOL, L. and HERRERA, E. "Effect of liver disorders on ethanol elimination and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in liver and erythrocytes". Clin. Sci. 76; 51-57, (1989).

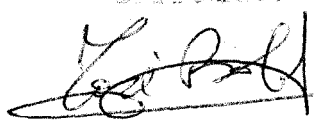
Reunido el Tribunal de...
de el día de la fecha, para juzgar a la Excmo. Sr.
EVA TAVARES VAZQUEL
titulada ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ZINC Y
ACIDO FOLICO EN RATAS LACTANTES. EFECTOS DEL ETANOL.
acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 15 de MARZO 1976

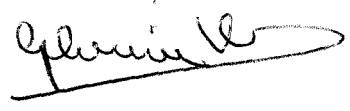
El Vocal,



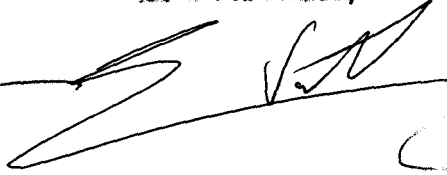
El Secretario,



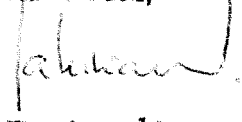
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Decretado,

