

R. 11369

T 884

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

**ABSORCIÓN DE FOLATOS, CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA Y ALCOHOL**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por la  
Universidad de Sevilla por:

Octavio Fernández Borrachero

DIRECTORAS:

Dra. M<sup>a</sup> Luisa Murillo Taravillo

Dra. Olimpia Carreras Sánchez

Octavio B

Dña. M<sup>a</sup> Luisa Murillo Taravillo y Dña. Olimpia Carreras Sánchez,  
Profesoras Titulares de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que Don Octavio Fernández Borrachero, Licenciado en Farmacia, ha  
realizado, bajo su dirección en el departamento de Fisiología y Biología  
Animal de la Universidad de Sevilla, la Tesis que lleva por título:  
ABSORCIÓN DE FOLATOS, CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA Y ALCOHOL, para optar  
al título de Doctor.

Para que conste donde proceda se expide el presente certificado en  
Sevilla a 25 de septiembre de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo.: M<sup>a</sup> Luisa Murillo Taravillo

Luisa Murillo

Fdo.: Olimpia Carreras Sánchez

Olimpia Carreras

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 76 número 106 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 13 DIC. 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Ángeles Raffalli*

Este trabajo ha sido realizado con una ayuda de Consolidación de Grupos de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Andalucía, n° 3148: "Toxicología alcohólica. Alcohol como factor de riesgo".

Deseo expresar mi agradecimiento, a todas las personas que han contribuido a que esta Tesis pudiera llevarse a cabo:

Al Dr. D. José Bolufer González, Director del Departamento de Fisiología Animal, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Memoria.

A la Dras. Dña M<sup>a</sup> Luisa Murillo Taravillo y Olimpia Carreras Sánchez, por su inestimable y cariñosa labor directiva, sin la cual no hubiera sido posible el planteamiento y la realización de esta Tesis.

A mis compañeros del Departamento y a Antonio Ayala del Departamento de Bioquímica, por su colaboración y estímulos ofrecidos en todo momento.

Al Dr. D. Felipe García Pesquera, del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por su ayuda en la determinación de los folatos basales en suero y bilis.

Al Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Virgen del Rocío por apoyarme en la realización de esta tesis



A toda mi familia.

A M.J.

## ABREVIATURAS:

GGT: Gamma-glutamyl transferasa

ADH: Alcohol deshidrogenasa

MEOS: Sistema microsomal oxidativo

THF: Tetrahidrofolato

5MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

FiGlu: Ácido formiminoglutámico

PteGlu: Ácido fólico o pteroil glutámico

DHF: Dihidrofolato

FPG: Folilpoliglutamato

IC-FC: Conjugasa intracelular

BB-FC: Conjugasa de la membrana de borde en cepillo

SASP: Salicilosulfapiridina

DIDS: Ácido 4,4'-Diisotiociano-2,2'-disulfónicoestilbeno-sal disódica

# ÍNDICE

1.-OBJETO	1
2.-SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1.-ALCOHOL	5
2.1.1.-ALCOHOLISMO	5
2.1.2.-ABSORCIÓN DE ETANOL	8
2.1.3.-ALCOHOL E INTESTINO	10
2.1.3.1.-Cambios estructurales	11
2.1.3.2.-Alteraciones funcionales	12
2.1.4.-METABOLISMO DEL ETANOL	19
2.1.4.1.-Alcohol deshidrogenasa	20
2.1.4.2.-Sistema microsomal oxidativo	22
2.1.4.3.-Sistema de la catalasa	23
2.1.4.4.-Acetaldehido y acetato	23
2.2.-ÁCIDO FÓLICO	25
2.2.1.-INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	25
2.2.2.-QUÍMICA FUNCIONAL	28
2.2.3.-APORTE ALIMENTICIO	33
2.2.4.-HIDRÓLISIS INTESTINAL	35
2.2.4.1.-Factores que pueden influir en la actividad conjugasa intestinal	37
2.2.5.-ABSORCIÓN INTESTINAL	39
2.2.5.1.-Mecanismo de transporte	43
2.2.5.2.-Factores que alteran la absorción intestinal	47
2.2.6.-REDUCCIÓN INTESTINAL	56
2.2.7.-CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA (CEH)	62
2.2.7.1.-Papel de la CEH en el mantenimiento de la homeostasis del folato	65
2.2.7.2.-Efecto del alcohol en la CEH	67
2.2.8.-DISTRIBUCIÓN DE FOLATOS A LOS TEJIDOS	70
2.2.8.1.-Alteraciones que influyen en la distribución tisular	71
2.2.8.2.-Efecto del alcohol	72

2.2.9.-PROTEINAS LIGANDO DE FOLATO	73
2.2.10.-ALMACENAMIENTO TISULAR DE FOLATOS	82
2.2.11.-EXCRECIÓN URINARIA	88
2.2.11.1.-Efecto del alcohol	91
2.2.12.-CLASIFICACIÓN DE LOS DÉFICIT DE ÁCIDO FOLICO	95
2.2.13.-PATOLOGÍA: ANEMIA MEGALOBLÁSTICA	98
2.2.13.1.-Efecto del alcohol	99
3.-MATERIAL Y MÉTODOS	103
3.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL	104
3.2.-ANIMALES	104
3.3.-DIETAS	105
3.4.-COMPOSICIÓN DE LOS LÍQUIDOS DE PERFUSIÓN	105
3.5.-COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL LÍQUIDO DE CENTELLEO	106
3.6.-COMPOSICIÓN DEL ENEMA	106
3.7.-TÉCNICA DE ABSORCIÓN "IN VIVO"	106
3.8.-DESCRIPCIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	107
3.9.-REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS	108
3.10.-DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS DE ABSORCIÓN DE YEYUNO Y CIEGO	110
3.11.-ABSORCIÓN EN SUPERFICIE INTESTINAL TOTAL	111
3.12.-CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE FOLATO ABSORBIDA	113
3.13.-DETERMINACIÓN DE FOLATOS EN SUERO Y BILIS EN CONDICIONES BASALES	114
3.14.-MEDIDA DEL pH INTESTINAL	115
3.15.-ESTADÍSTICA	115
4.-RESULTADOS	116
5.-DISCUSIÓN	170
5.1.-ESTADO NUTRICIONAL	171
5.2.-EFECTO DEL ALCOHOL EN EL pH INTESTINAL	177
5.3.-EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL VOLUMEN DE BILIS	179
5.4.-FOLATO BASAL EN SUERO Y BILIS	181
5.5.-ABSORCIÓN EN YEYUNO	184
5.6.-ABSORCIÓN EN CIEGO	188
5.7.-COMPARACIÓN DE ABSORCIÓN DE 5MTHF Y ÁCIDO FÓLICO	192
5.8.-ABSORCIÓN DE FOLATOS EN SUPERFICIE TOTAL DE INTESTINO	193

5.9.-ABSORCIÓN EN INTESTINO COMPLETO. INFLUENCIA DE LA CANULACIÓN DEL CONDUCTO BILIAR	196
6.-CONCLUSIONES	203
7.-BIBLIOGRAFÍA	207

**OBJETO**

## 1.-OBJETO DE LA TESIS

Los folatos son necesarios para la síntesis de las bases púricas y pirimidínicas que constituyen los ácidos nucleicos de las células, por tanto abunda a nivel de los tejidos de rápida multiplicación celular.

La ingesta crónica de etanol es una de las causas más frecuentes de carencia de folatos y los mecanismos involucrados son:

a) Una insuficiencia del aporte debido a la anorexia inherente al alcohol, lo que provoca una disminución de las reservas. Inicialmente se pensaba que ésta era la única causa. Sin embargo cuando se asocia una dieta baja en folato a la ingesta crónica de etanol, los pacientes desarrollan una anemia megaloblástica (por déficit de folato) dos o tres veces superior a los controles que sólo ingieren una dieta pobre en folato. Para valorar este efecto indirecto del alcohol sobre las reservas de folato, en nuestros experimentos mantenemos a los animales con una ingesta "ad libitum", pero cuantificando posteriormente la ingesta de fólico.

b) Trastornos de la absorción: debido a la inactivación de las conjugasas y por tanto bloqueo de la transformación de los poliglutamatos alimentarios en monoglutamatos o bien por alteración directa de los mecanismos implicados en la absorción. Esta malabsorción provoca una carencia nutricional que agrava más aún la malabsorción alterando la mucosa intestinal, produciendo fundamentalmente una megaloblastosis del epitelio críptico.



Los problemas inherentes a las conjugadas, los hemos obviado realizando el estudio con fólico o metiltetrahidrofólico que no necesitan la actuación previa de la conjugada.

Existe un gran número de trabajos en los que se estudia, por distintos métodos y en distintos segmentos intestinales, los efectos del alcohol sobre la absorción de ácido fólico. Pero no hemos encontrado ninguno que estudie por técnicas "in vivo" la absorción de ácido fólico en el ciego, o la absorción total que englobe el intestino delgado y el intestino grueso, ya que casi todos los trabajos están realizados en el yeyuno que es la zona de máxima absorción.

En las técnicas "in vivo" se obtienen los resultados de absorción por la diferencia entre la concentración inicial y final de fólico en el líquido de perfusión. Pero en estos datos no se tiene en cuenta que parte del fólico absorbido se excreta de nuevo por la bilis y pasa al intestino, con lo que la concentración de fólico en el fluido intestinal sería mayor, y por tanto la diferencia entre la concentración inicial y final, menor. Por este motivo nos ha parecido importante estudiar la absorción total en ratas alcohólicas y patrones, con el conducto biliar canulado y sin canular. Ya que en las canuladas el ácido fólico marcado y absorbido no regresa al intestino y nos permitirá cuantificar exactamente el fólico absorbido, que lógicamente debe ser mayor que en las ratas sin canular, debido a estar interrumpida la circulación enterohepática de folatos.

c) Modificación del almacenamiento hepático, por alterarse la capacidad de depósito del hígado, perturbando el circuito enterohepático y la excreción biliar de folatos. En nuestros experimentos la bilis que se recoge por canulación del conducto hepático es posteriormente analizada, para determinar su volumen y radiactividad, lo que en definitiva nos informará sobre las posibles modificaciones en el almacenamiento hepático y en la circulación enterohepática de folatos, producida por la ingesta crónica de alcohol.

## SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2.1.-ALCOHOL

### 2.1.1.-ALCOHOLISMO

Hace unas pocas décadas, los casos clínicos relacionados con la enfermedad del alcoholismo crónico no eran extensamente estudiados, porque la toxicidad intrínseca del alcohol no era totalmente apreciada y el alcoholismo era considerado principalmente un problema social. Sin embargo la prevalencia de un problema médico, la cirrosis hepática, ha alcanzado una magnitud tal, que esta complicación del alcoholismo representa un problema importante de salud pública. Así se ha establecido que en áreas urbanas extensas, la cirrosis hepática ha llegado a convertirse en la cuarta causa de muerte en las personas de 25 a 65 años, y la mayoría de los pacientes con esta enfermedad son sujetos alcohólicos.

La O.M.S. ha establecido que el alcoholismo es una enfermedad; y ha definido a los alcohólicos como aquellos individuos que beben en exceso y en los que la dependencia del alcohol es tal que presentan trastornos detectables o manifestaciones que afectan a su salud física y mental, a sus relaciones con los demás y a su comportamiento social y económico.

Previamente al desarrollo de enfermedades, la exposición crónica al alcohol resulta en cambios bioquímicos y morfológicos profundos. Consecuentemente, un alcohólico no responde normalmente al alcohol y a otras drogas y agentes tóxicos.

Debido a su extenso impacto, los trastornos de salud asociados con el alcoholismo representan uno de los más importantes problemas de salud pública con que se enfrenta nuestra sociedad.

En Andalucía, a lo largo de las dos últimas décadas el consumo de alcohol ha ido experimentando una serie de importantes cambios en los patrones de acceso y uso: se ha pasado de las bebidas de baja graduación, como el vino a las destiladas de alto contenido alcohólico; los mayores bebedores han llegado a ser los jóvenes; también la mujer bebe en mayor proporción que antes. Igualmente en los centros de tratamiento de alcohólicos, han visto modificadas profundamente sus estadísticas con un significativo descenso en las edades medias de los pacientes.

Los resultados obtenidos sobre el consumo de alcohol en la población, a partir de encuestas, realizadas por el Comisionado para la droga de la Junta de Andalucía, son los siguientes:

Primeramente se divide la población según el grado de consumo de alcohol, expresado como ml de alcohol/persona/día:

<u>Tipología</u>	<u>ml de alcohol</u>	<u>%</u>
Abstinentes	0	54,3
Ligeros	1 a 25	19,8
Moderados	26 a 75	16,4
Altos	76 a 100	3,9
Excesivos	101 a 150	2,7
Gran riesgo	Más de 150	2,9

Estos dos últimos porcentajes, debido a que se trata en muchos casos de alcoholismo efectivo, los vamos a reflejar en el conjunto de la población andaluza, y se corresponden con 210.045 personas de consumo excesivo de alcohol, y con 302.400 bebedores de gran riesgo

Si analizamos el consumo de alcohol, según el sexo encontramos que entre las mujeres el 64,4 % no beben alcohol, mientras que entre los hombres son abstinentes tan sólo un 43,6. De los bebedores de más de 75 ml (alto + excesivo y gran riesgo) los hombres suman un 16,4 % y las mujeres solamente el 3,2 %, siendo la ingesta media de aquellos de 36,54 ml y la de éstas 12,3 ml.

En una encuesta realizada entre la población de 12 a 44 años, se ha encontrado que por edades, los que menos beben son los de 12-13 años, con un 96,5 % de abstemios. Entre los más bebedores (más de 75 ml) están los de 21 a 24 años con un 17,3 %, los de 25-34 con el 13,4 % y los de 35-44 con el 13,6 %; estos tres grupos de edad alcanzan la máxima ingesta de alcohol con una media en ml, de 38,64, 34,35 y 29,43, con un consumo máximo en viernes y sábados en los grupos de 16-20 y 21-24 años (68,06 ml y 76,75, respectivamente).

El consumo de alcohol, por otra parte, se da tanto en niveles educativos, ocupacionales y sociales bajos, como medios y altos; así como en las distintas ideologías políticas. El alcohol es sin duda una droga social y culturalmente integrada, de uso común entre todo tipo de personas y grupos sociales. El consumo excesivo puede ser reforzado por determinadas situaciones de frustración o de conflicto, pero también en situaciones de normalidad debido a las costumbres sociales, los roles de sexo y edad, la publicidad, etc.

### 2.1.2.-ABSORCIÓN DEL ETANOL

El etanol es una sustancia hidrosoluble y liposoluble, y por ello difunde rápidamente por las membranas celulares. Se absorbe de forma pasiva y sin alterar su constitución original, prácticamente en su totalidad en el estómago e intestino proximal. Así Broitman y cols.(1976) demostraron in vivo, que la absorción aumenta directamente con la concentración en el medio de perfusión. De acuerdo con las leyes de difusión simple, la absorción dependería del gradiente de concentración del etanol en el lumen intestinal sobre las células epiteliales, de la red de capilares y vasos linfáticos de la zona y por último, de la concentración de etanol en la vena porta.

En el hombre, tras ingestión oral de etanol, se alcanza durante los primeros 45 minutos un pico de concentración de etanol en duodeno y yeyuno proximal. Paralelamente se produce un moderado aumento de concentración de etanol, en el íleon y en el suero. (Halsted y cols.1973).

El etanol retrasa el vaciamiento del estómago si es ingerido en gran cantidad, lo que retarda su propia absorción, aunque algunas bebidas de baja graduación, como la cerveza, aceleran el vaciamiento gástrico de forma significativa (Pfeiffer y cols.1992). La ingestión de alimentos previa al consumo de alcohol, retrasa el vaciamiento gástrico y reduce la absorción de alcohol.

Broitman y cols.(1976) encontraron que la presencia de pequeñas

cantidades de glucosa y otros carbohidratos en la luz yeyunal, aumentaban la absorción del alcohol "arrastrado" por el efecto osmótico de aquellos, pero posteriormente se ha comprobado que la reducción en la absorción de alcohol, producida por la ingesta de alimentos, es incluso mayor si la ingesta se realiza simultáneamente al consumo de alcohol (Wedel y cols, 1991).

Otro factores que influyen en la absorción intestinal han sido recogidos por Perez-Santos (1986). Drogas como la cafeína y la codeína retrasan el vaciamiento gástrico, y con ello la absorción de etanol. Los enfermos con cirrosis muestran una absorción más rápida, probablemente por el shunt portacava que existe, y también se acelera la absorción de alcohol, en los enfermos que han sufrido gastrectomía parcial o vagotomía, debido a una mayor rapidez del vaciamiento gástrico.

### 2.1.3.-ALCOHOL E INTESTINO

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

El tracto gastrointestinal en alcohólicos, es 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).

Los efectos del etanol en las funciones biológicas están relacionadas 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 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:
  - a)permeabilidad
  - b)motilidad
  - c)enzimas
  - d)secreción de electrolitos
  - e)flora bacteriana
  - f)absorción

#### 2.1.3.1.-CAMBIOS ESTRUCTURALES

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

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

Mediante métodos morfométricos y observación por microscopio

electrónico, se ha demostrado que la ingestión crónica de etanol afecta a la mucosa intestinal. Pérez Santos (1986) observó cambios ultraestructurales, incluyendo anormalidades mitocondriales y dilatación del retículo endoplásmico, en yeyuno de ratas con ingesta crónica de alcohol. Bode y cols. (1982) detectaron una reducción de la altura de las vellosidades, en alcohólicos crónicos, comparado con controles. Además observó un aumento mayor del doble en el número de células mononucleares interepiteliales. En mucosa duodenal también se ha observado una disminución en la altura de las vellosidades tras 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, 1987) (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).

#### 2.1.3.2.-ALTERACIONES FUNCIONALES

##### 2.1.3.2.a) Permeabilidad

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

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 resultar en posteriores daños al tejido gastrointestinal (Stern y cols, 1986).

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

#### 2.1.3.2.b) 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 se ha comprobado en ratas, que tanto el etanol como 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 (Preedy y cols, 1993).

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 sin dilucidar (Keshavarzian y cols, 1985).

#### 2.1.3.2.c) Enzimas

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. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio se ha encontrado una disminución de la actividad maltasa, lactasa y sacarasa en el íleon de ratas con ingesta crónica de alcohol (Rodríguez and López-Nuevo, 1995)

Gamma-glutamyltransferasa ( $\gamma$ -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 muestran que la actividad GGT en vasos linfáticos mesentéricos en ratas alimentadas con etanol, aumenta en un 83 % con respecto a las controles, lo que sugiere que el aumento de GGT encontrado en suero tras una elevada ingesta de etanol, podría estar originado en parte, por el aumento de la GGT intestinal (Ishii y cols, 1988).

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa: Esta enzima es importante para el mantenimiento del equilibrio iónico en las células intestinales y está implicado 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).

#### 2.1.3.2.d) Secreción de electrolitos

El alcohol se ha observado que induce la secreción intestinal de agua y electrolitos, probablemente de forma dosis dependiente, y se atribuye a los efectos del etanol sobre el sistema AMPc (Kuo y Shanbour, 1978).

Posteriormente se ha descubierto otro mecanismo: el etanol causa una neta secreción de sodio y fluido, este efecto parece 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).

#### 2.1.3.2.e) 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 B<sub>12</sub> y ácido fólico. Este sobrecrecimiento puede conducir también a cambios morfológicos en la mucosa intestinal (Persson, 1991).

Además, una considerable cantidad de etanol puede ser oxidado por esta superpoblación bacteriana, liberando alta concentración de

acetaldehído a la sangre portal y al lumen, que podrían ejercer efectos tóxicos en la mucosa gastrointestinal (Baraona y cols, 1986).

#### 2.1.3.2.f) Absorción

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

**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. En cambio no se han observado cambios significativos en el transporte de D-galactosa (Carreras y cols, 1991).

**AMINOACIDOS:** La exposición crónica de etanol no altera de forma significativa el transporte de L-aminoácidos, como la L-leucina, en animales de experimentación (Carreras y cols, 1991).

**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).

**CALCIO:** En un estudio se han detectado bajos niveles de calcio en un 26 % de alcohólicos hospitalizados (Björneboe y cols, 1988), 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 en orina, y pérdidas intestinales por vómitos o diarrea (Kalbfleisch y cols, 1963).

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).

ZINC: En ratas la ingesta crónica de etanol está asociada con una disminución de la absorción ileal, pero no de la absorción duodenal de zinc (Antonsson DL y cols, 1978).

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 claro aún. En algunos trabajos se han recogido datos de disminución, pero en otro ensayo más reciente, con pacientes alcohólicos, no se observó cambio alguno en esta absorción (Breen y cols, 1985).

RIBOFLAVINA Y PIRIDOXINA: No se ha detectado un efecto perjudicial del alcohol sobre su absorción intestinal.

VITAMINA B<sub>12</sub>: 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<sup>+</sup>-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).



#### 2.1.4. METABOLISMO DEL ETANOL

Aunque el etanol puede ser encontrado en los mamíferos gracias a la fermentación bacteriana en el intestino (Krebs y Perkins, 1970), generalmente tiene un origen exógeno.

El alcohol se absorbe en el tracto gastrointestinal. Sólomente de un 2 a un 10 % del etanol absorbido es eliminado a través de los riñones y pulmones; el resto es oxidado en el organismo, principalmente en el hígado, y una pequeña fracción en el estómago (Lamboeuf y cols, 1983).

Esta relativa especificidad hacia el hígado probablemente explica los acusados desequilibrios que aparecen en este órgano como consecuencia de la ingesta de etanol. Estos efectos son agravados debido a la carencia de mecanismos de retroalimentación para ajustar la tasa de oxidación de etanol al estado metabólico del hepatocito y la incapacidad del etanol, al contrario que otras fuentes de calorías, para ser almacenado en el hígado o ser almacenado o metabolizado de forma importante en tejidos periféricos (Lieber, 1992).

El hepatocito contiene tres vías para el metabolismo del etanol:

- Sistema de la alcohol deshidrogenasa (ADH) del citosol
- Sistema microsomal oxidativo (MEOS) en el retículo endoplásmico liso.
- Sistema de la catalasa localizado en los peroxisomas.

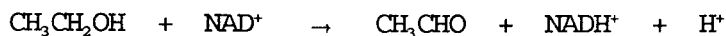
#### 2.1.4.1.-ALCOHOL DESHIDROGENASA

Es la principal vía de degradación del etanol. La alcohol deshidrogenasa humana es un enzima dimerico, del que se han distinguido tres clases: I, II y III. Existen tres tipos de subunidades de la clase I: subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  es la principal en el hígado fetal; existen diferentes subunidades  $\beta$ :  $\beta_1$  común en poblaciones caucasicas,  $\beta_2$  común en pueblos orientales y  $\beta$ -Indianápolis encontrada en sujetos africanos; también existen dos tipos alélicos de subunidad  $\gamma$ . Von Wartburg y cols. en 1965 diferenciaron entre la ADH normal del hígado humano (pH óptimo de 10,5) y una ADH "atípica" (pH óptimo de 8,8) que muestra una actividad varias veces mayor. La ADH normal tiene sólo la subunidad  $\beta_1$ , mientras que la "atípica" tiene también la  $\beta_2$ .

La ADH clase II tiene una elevada afinidad por el etanol. La ADH de la clase III no participa en la oxidación del etanol en el hígado debido a su baja afinidad por el sustrato (Pares y Vallee, 1981).

En la rata (Julia y cols, 1987) se han caracterizado isoenzimas de la ADH que exhiben muchas analogías con las ADH humanas de las clases I-III.

En la oxidación del alcohol mediada por la ADH, el hidrógeno es transferido desde el sustrato al cofactor nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) reduciéndolo, y produciendo acetaldehído:



La disociación del complejo NADH-enzima es la etapa limitante de esta reacción. Como resultado neto se genera un exceso de equivalentes de reducción en el citosol, principalmente en forma de NADH. El estado de oxidación alterado es responsable de una variedad de anomalías metabólicas, porque parte del exceso de  $\text{H}^+$  que aparecen en la célula

hepática son transferidos desde el citosol al interior de la mitocondria, y allí inhiben el ciclo del ácido cítrico y con ello disminuye la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos que proceden de la dieta. La célula hepática deriva el exceso de  $H^+$  hacia otros sustratos y acumula lactato, formando  $\alpha$ -glicerofosfato y favoreciendo la formación de nuevos ácidos grasos. Además interfiere el metabolismo de la galactosa, la serotonina y otras aminas (Lieber, 1968). El aumento en la biodisponibilidad de NADH resulta en una alteración del metabolismo hepático de esteroides (Admirand y cols, 1970).

El aumento del cociente NADH/NAD provocado por una ingesta aguda de etanol puede producir una hipoglucemia severa, debido al bloqueo de la gluconeogenesis, 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.

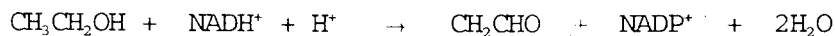
En ratas que ingieren alcohol, se ha observado un marcado cambio en el potencial redox del citosol, medido por cambios en la relación lactato/piruvato, que es responsable de anormalidades metabólicas (Domschke y cols, 1974).

El principal factor limitante en el metabolismo del etanol, en la vía de la alcohol deshidrogenasa, parece ser la capacidad del hígado para reoxidar el NADH<sup>+</sup> producido por la reducción del NAD<sup>+</sup>. Así, en células aisladas de hígado se observó que la oxidación del etanol estaba limitada por la tasa de transferencia de equivalentes de reducción desde el citosol a la mitocondria (Cederbaum y cols, 1977).

Se ha puesto de manifiesto (Kalant y cols, 1975), que el consumo crónico de etanol no aumenta la actividad de la ADH. Además el alcohol puede metabolizarse por oxidación no mediada por ADH, y la proporción varía según la concentración de alcohol ingerida: si se administra al 20-25 %, puede representar más de la mitad del metabolismo del alcohol (Matsuzaki y cols, 1981)

#### 2.1.4.2.-SISTEMA MICROSOMAL OXIDATIVO (MEOS)

La segunda vía de degradación del etanol es el sistema microsomal oxidativo, que tiene lugar a nivel del retículo endoplásmico liso (REL) del hepatocito, según la reacción descrita por Lieber y de Carli (1968)



El sistema requiere como cofactor el NADPH y  $\text{O}_2$  y es insensible a la inhibición de la catalasa. Se ha demostrado que se vuelve a iniciar la actividad oxidativa del etanol, al restaurar de nuevo cada uno de los componentes microsomales: citocromo P450, NADPH, citocromo C reductasa y lecitina (Omishi y Lieber, 1977).

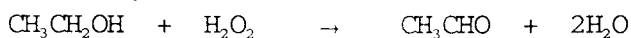
En una nueva nomenclatura para citocromos P450, se ha propuesto que la forma inducible por el etanol se designe como P450IIE1 (Nebert y cols, 1987). Se ha demostrado que el consumo crónico de etanol aumenta la capacidad oxidativa de este sistema, observándose una proliferación del REL, incluyendo un incremento del citocromo P450IIE1 (Lieber, 1988).

Esta segunda vía es común para el metabolismo de ciertas drogas, como tolbutamida y barbitúricos, presentando elementos comunes, como NADPH,  $\text{O}_2$ , citocromo P450IIE1 y otros citocromos P450, lo que explicaría la existencia de un gran número de interacciones farmacológicas (Lieber y cols, 1988).

Se ha observado que la actividad de la MEOS aumenta de forma significativa tras la ingesta crónica de etanol (Lieber y DeCarli, 1970). Este incremento está asociado con un aumento de fosfolípidos, citocromo P-450 reductasa, y citocromo P-450.

#### 2.1.4.3.-SISTEMA DE LA CATALASA

Este enzima se localiza en los peroxisomas del hepatocito y cataliza la reacción siguiente:

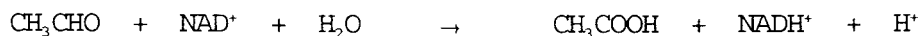


Se acepta que la peroxidación del etanol por la catalasa está limitada más por la proporción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente, que por la cantidad de catalasa.

La oxidación por la catalasa representa aproximadamente un 2 % del total del metabolismo del etanol (Lieber y DeCarli, 1972). Por tanto, bajo condiciones fisiológicas, la catalasa no parece tener mucha importancia. Se ha observado cierto aumento de la actividad catalasa con el consumo crónico de etanol.

#### 2.1.4.4.-ACETALDEHIDO Y ACETATO

Todas las vías de oxidación del etanol en el hígado llevan a la producción de acetaldehído, el cual es a su vez metabolizado en acetato, según la reacción de Racker (1949):



El enzima responsable de la oxidación del acetaldehido es la acetaldehido deshidrogenasa.

El acetaldehído puede afectar a muchos tejidos. Parece que interfiere con el metabolismo del piridoxal fosfato, favoreciendo su degradación (Veitch y cols, 1975). Otro efecto es disminuir la síntesis de proteínas del miocardio (Schreiber y cols, 1974), lo que puede contribuir al desarrollo de la miocardiopatía alcohólica.

Los efectos más destacados del acetaldehído se producen en el hígado. El acetaldehído se une a la membrana del retículo endoplásmico y del citoplasma de los hepatocitos. Esta unión se incrementa tras la ingesta crónica de etanol, y puede contribuir al papel de la vía no dependiente de ADH en el desarrollo de la enfermedad hepática (Takada y cols, 1986).

El efecto del acetato es menos claro. Se ha encontrado que el acetato aumenta la contractilidad cardíaca y el flujo sanguíneo coronario. En el tejido adiposo inhibe la lipólisis y se ha encontrado que disminuye la concentración de ácidos grasos libres en circulación (Liang y Lowenstein, 1978)

Una vez convertido en acetato, éste en la mitocondria puede convertirse en acetilCoa e ingresar en el ciclo de Krebs.

## 2.2.-ÁCIDO FÓLICO

### 2.2.1.-INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

El estudio del ácido fólico comienza a finales del siglo XIX con el estudio de los tintes y pigmentos de las alas de las mariposas por Sir Gowland Hopkins. En 1931 el Dr. Wills describe un "nuevo factor hematopoyético" en levaduras, que cura la anemia macrocítica tropical en la India. Esta sustancia desconocida fue descrita como el factor de Wills por Watson y Castle en 1932 cuando confirmaron que un nuevo principio hematopoyético había sido encontrado en diferentes fracciones de extracto hepático y que curaba la anemia perniciosa. Otros factores fueron descritos durante los años 30, cuando todavía era posible aspirar a la identificación de una nueva vitamina, factores que eran activos frente a la pancitopenia de origen nutricional en monos, o fueran requeridos como factores de crecimiento o antianémicos en pollos. Debido a que esas sustancias eran impuras y su identificación con el factor de Wills no podía ser ni deducida, ni probada adecuadamente, recibieron una gran variedad de denominaciones, desde vitamina M para los monos, hasta vitamina B<sub>9</sub> para los pollos.

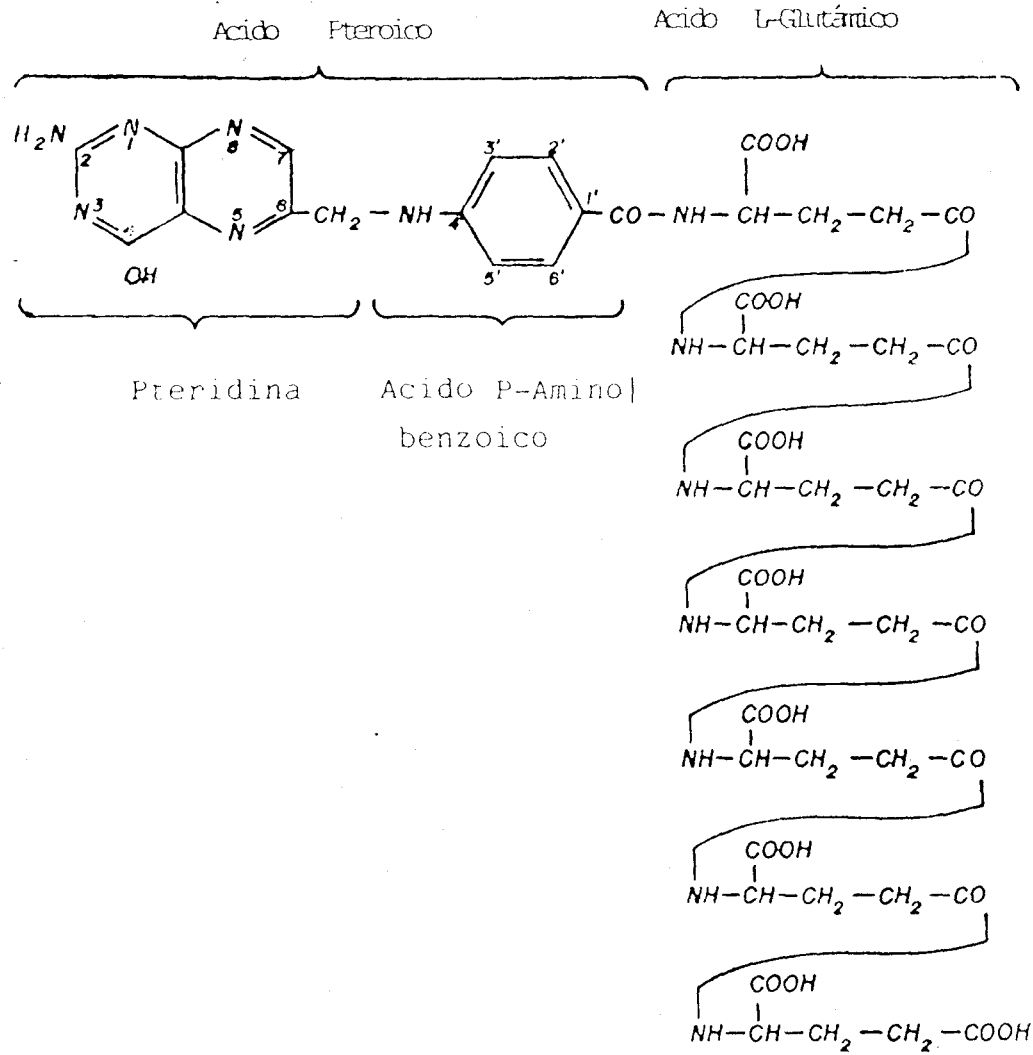
Otra etapa crítica en el camino hacia el aislamiento e identificación de estos factores fue el descubrimiento en la Universidad de Wisconsin de que un factor aislado de las levaduras, servía como factor de crecimiento para *Lactobacillus casei*. Más tarde cuando el factor activo en *L. casei* y la vitamina B<sub>9</sub> fueron descritos como antianémicos, una sorprendente contradicción apareció: algunos extractos de levadura, que eran eficaces en la anemia macrocítica en monos y

pollos, no eran capaces de sostener el crecimiento de *L.casei*. Así parecía que el ensayo con pollos y el ensayo con *L.casei* no detectaban el mismo principio. Esta aparente paradoja fue clarificada por Bird y su grupo, que mostraron que el principio antianémico de las levaduras, podía sostener el crecimiento de *L.casei* si el extracto de levaduras era previamente digerido con homogenados de tejido crudo de origen animal. Ellos denominaron como conjugado B<sub>6</sub> al complejo antianémico ya conocido como vitamina B<sub>6</sub>, y denominaron como conjugasas los enzimas que liberaban la vitamina B<sub>6</sub> del complejo. La identificación química de la vitamina aislada fue efectuada por el equipo de Stokstad en 1943 y fue seguida rápidamente por la síntesis química del ácido fólico en 1945. Pfiffner y un grupo de investigadores utilizaron conjugasas y métodos microbiológicos, para llevar a cabo el aislamiento e identificación definitivos de la vitamina, en su forma conjugada en hígado en 1943 y un poco más tarde (1945) en levaduras (Rosenberg, 1989)



ESQUEMA 1

ESQUEMA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO FÓLICO



Acido Pteroilglutámico  
P. M. 441

Acido Pteroilheptaglutámico  
P. M. 1.215

### 1.2.2.-QUÍMICA FUNCIONAL

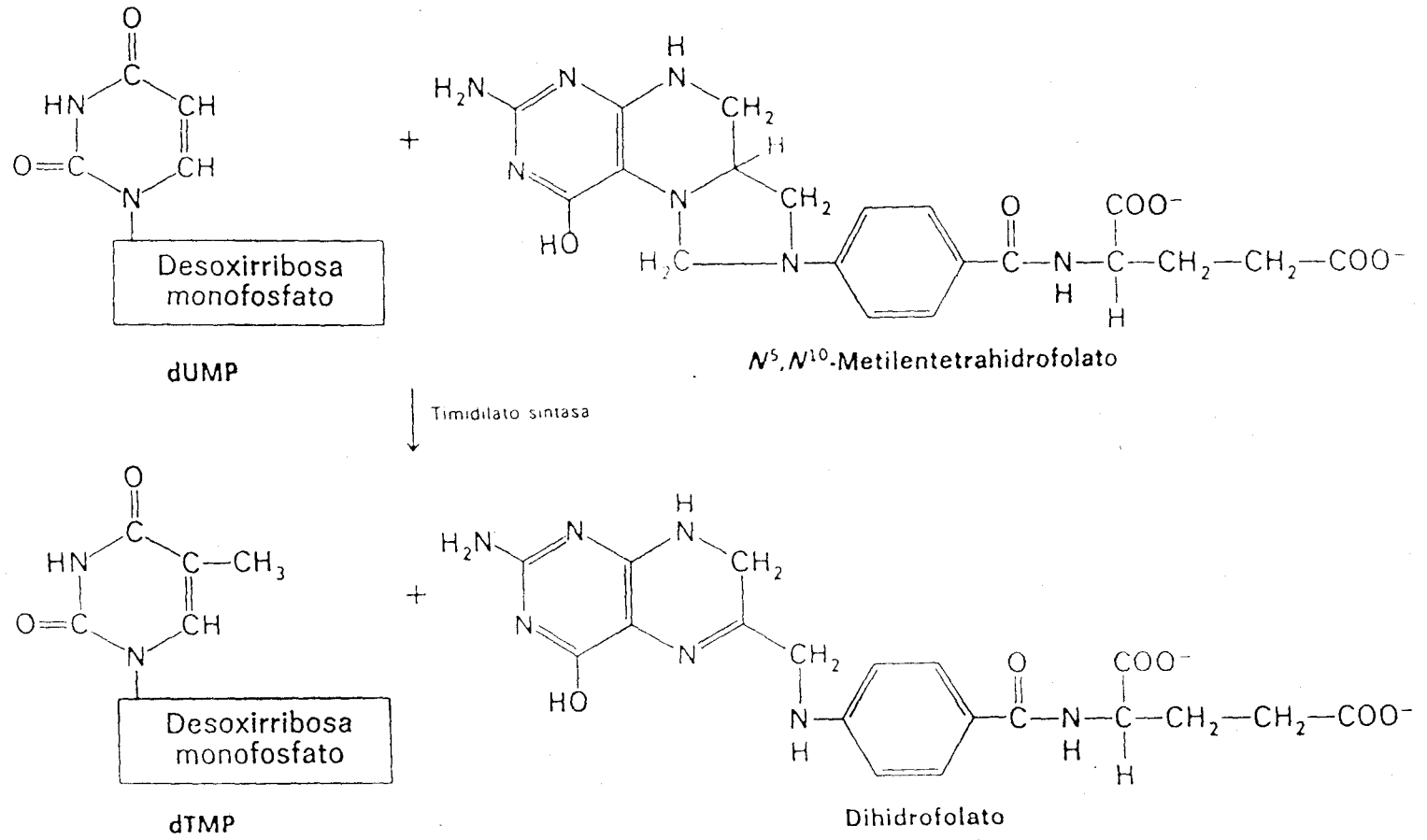
El ácido fólico conocido también como pteroilglutámico (pGlu), contiene tres estructuras en su molécula: una pteina sustituida, el ácido para-aminobenzoico y una unidad de ácido L-glutámico. Además se puede presentar con una cadena múltiple de glutamatos (Lehninger, 1972) (ESQUEMA 1).

El ácido fólico que se encuentra de forma natural en la dieta, suele ser una mezcla compleja de pteroilglutamatos de cadena de longitud variable y con varios sustituyentes en el anillo de pteridina. Más del 90 % de los folatos de la dieta se encuentran en forma de 5-metilTHF con cadena múltiple de glutamatos (Stokstad y cols, 1977).

En su forma conjugada, los glutamatos están unidos por un enlace gamma, y esta estructura es prácticamente única en la naturaleza. Sólo algunas bacterias son capaces de producir poliglutamatos, como el *Bacillus subtilis* que sintetiza la unión gamma de los eslabones del polipéptido de ácido L-glutámico, como describieron Thorne y Leonard en 1958. Esta particularidad es la causa de que los enzimas que se requieran para hidrolizar el péptido deben ser específicos, ya que las peptidasas y proteasas habituales son ineficaces.

En cuanto a los grupos disociables de la molécula de folato, también nos van a dar las características de su comportamiento en el medio fisiológico. Los grupos gamma y alfa del grupo glutamato tienen un pKa de 3,5 y 4,8 respectivamente y el nitrógeno N-1 un pka de 2,38. Así dentro del pH fisiológico de la luz intestinal, el pteroilglutámico tiene una carga negativa neta que se multiplica grandemente cuando lo

ESQUEMA 2: PAPEL DE LOS FOLATOS EN LA SÍNTESIS DE TIMINA



que tenemos es el heptaglutamato (la forma conjugada más importante en la naturaleza); esto hace aumentar notablemente su hidrosolubilidad y dificulta bastante, por otro lado el paso a través de las células intestinales en los animales, y hasta en las bacterias (Rosenberg, 1981)

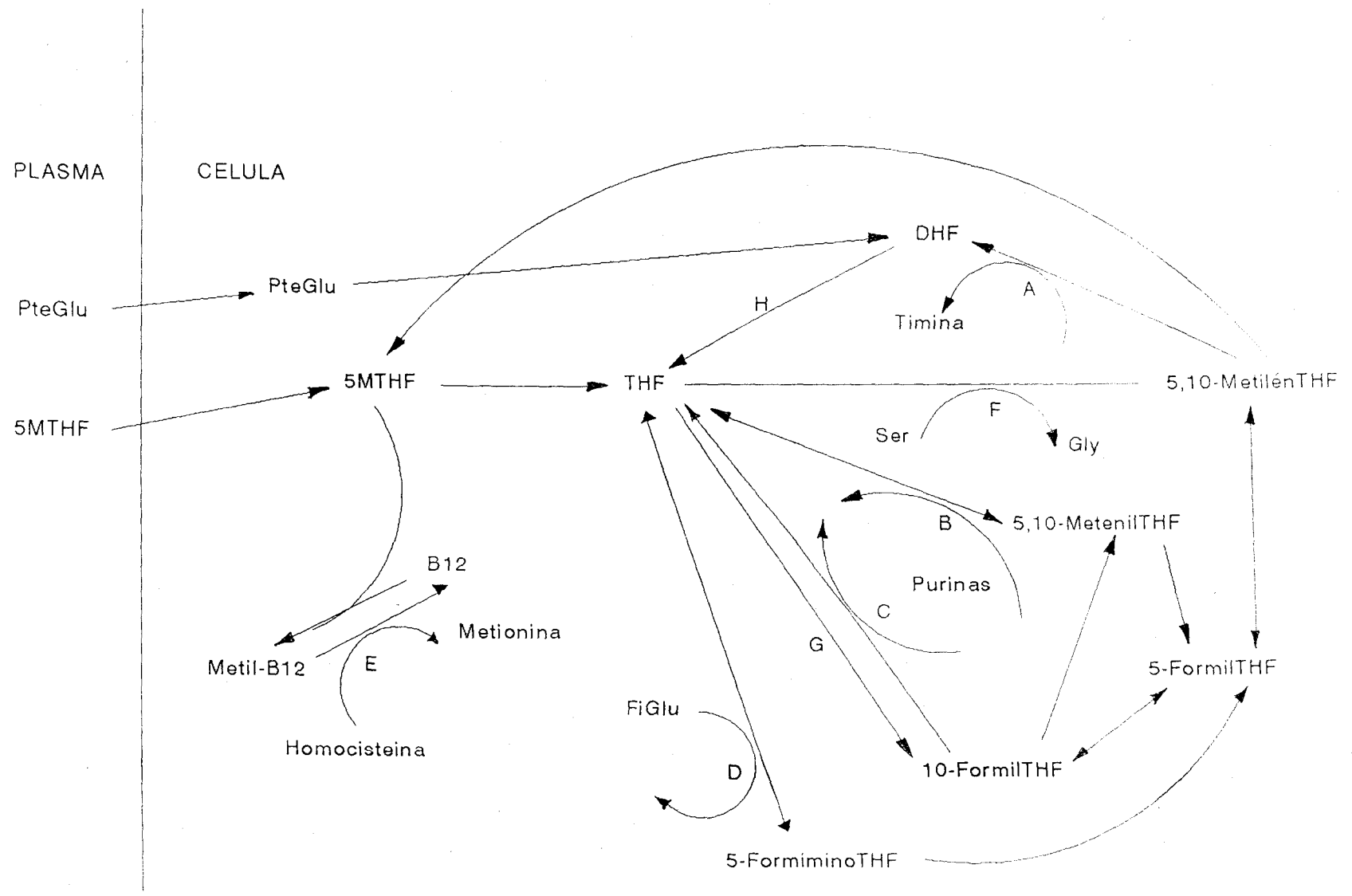
Los dobles enlaces entre las posiciones 5-6 y 7-8 en el anillo de pteridina no se encuentran generalmente en los folatos naturales. Si se une además un carbono en N5 o en la posición N10, tendremos la estructura de los coenzimas como el 10-formilTHF, el 5,10-metenilTHF o el 5,10-metilénTHF. A pesar de la presencia de sustituyentes en el anillo de pteridina, y por tanto de saturarse el doble enlace 5-6 con un sólo hidrógeno, el prefijo indicando reducción (dihidro- o tetrahidro-) por conveniencia se considera intocable (Blakley, 1987).

En la forma tetrahidro, los folatos actúan como coenzimas para procesos en los que hay transferencia de una unidad de carbono, como la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina (Esquema 2) y pirimidina, conversiones de aminoácidos como histidina en ácido glutámico a través del ácido formiminoglutámico y generación y uso de formato (Esquema 3).

a) **Interviene en la síntesis de ácido timidílico:** La timidina es necesaria para la síntesis del ADN. Esta reacción explica fácilmente la existencia de grandes anomalías en esta síntesis, y la consiguiente alteración de la mitosis, en las anemias producidas por carencia de folatos. El donador de metilos es el 5,10-metilénTHF, que pierde un grupo metilén (posteriormente la molécula de folato deshidrogeniza el anillo de pteridina para hidrogenar el N10 y para integrarse en el grupo metilo de la deoxitimidina) y transforma la deoxiuridina monofosfato en deoxitimidina monofosfato.

b) **Interviene en la síntesis de los nucleótidos de purinas,** incorporando el átomo de carbono n° 2: El grupo alfa-amino terminal de la glicinamida ribonucleótido se formila por el 5,10-metenilTHF dando lugar al formilglicinamida ribonucleótido.

ESQUEMA 3: METABOLISMO DEL RADICAL MONOCARBONADO DEL ÁCIDO FOLICO



c) Interviene en la síntesis de purinas, de nuevo, mediante la incorporación del carbono n° 8. El grupo 5-amino terminal del 5-Amino-4-imidazol carboxamida ribonucleótido que mediante deshidratación da lugar al inosinato.

d) Juega un papel en el catabolismo de la histidina, permitiendo la transformación del ácido formimino-L-glutámico (FiGlu) en glutámico, lo que no acontece en estados carenciales de folato, por lo que se acumula FiGlu en la orina.

E) **Síntesis de metionina:** Esta reacción requiere 5-metilTHF como dador del grupo metilo, que lo cede a la cianocobalamina (B<sub>12</sub>), dando lugar a la metilcobalamina, este último transfiere el grupo metilo a la homocisteína para dar lugar a la metionina. Esta reacción requiere S-adenosilmetionina como cofactor. La metionina sintetizada puede convertirse a su vez en S-adenosilmetionina

f) **Conversión de L-serina en L-glicina:** Esta reacción requiere tetrahidrofolato como aceptor de un grupo metileno de la serina y utiliza fosfato de piridoxal como cofactor.

g) **Utilización o generación de formato:** Esta reacción reversible utiliza tetrahidrofolato y 10-formilTHF

h) **Dihidrofolato reductasa:** Este enzima resulta muy notable porque es inhibido específicamente y de forma competitiva por determinados análogos estructurales de su sustrato, concretamente por sustancias sintéticas como la aminopterina y la ametopterina. La afinidad del enzima por estos análogos es tan grande que no son fácilmente desplazables por las concentraciones intracelulares normales del sustrato, y así se puede impedir la síntesis normal de los coenzimas derivados de tetrahidrofolato. Se les llama agentes antifólicos y son efectivos en clínica para detener el crecimiento de células cancerosas.

### 2.2.3.-APORTE ALIMENTICIO

Las fuentes de ácido fólico son r y diversas. Las verduras, y sobre todo las verduras de hojas oscuras, son una de las fuentes principales; sin embargo, otros muchos alimentos también los contienen:

Las mayoría de las frutas, las distintas carnes y el pescado azul contienen de 5 a 10 ng/100 g. Los tomates, nabos, zanahorias, apios, cebollas, patatas y rábanos también contienen de 5 a 10 ng/100 g.

Las remolachas, coles rojas, lechugas, champiñones, perejil, puerros y guisantes contienen de 10 a 20 ng/100 g.

Finalmente, las coles lombardas, coles de bruselas, hinojo, berros, espinacas, espárragos, ostras, el pescado blanco, y los hígados de ternera, de buey y de cerdo contienen de 50 a 300 ng/100g.

También debemos destacar: que la leche de mujer contiene de 4 a 6 ng/100ml, la leche de vaca contiene 2 ng/100 ml y la de cabra 6 ng/100 ml.

Esta vitamina es sensible a la luz, las condiciones aeróbicas, pH extremos y el calor, así la excesiva cocción, particularmente con grandes cantidades de agua, puede eliminar o destruir una gran parte de los folatos de los alimentos (Gregory, 1989).

Los compuestos mayoritarios en los alimentos son folatos reducidos en forma de poliglutamatos y las necesidades cotidianas son, según Herbert (1987) las siguientes:

Ingesta diaria recomendada en adultos:

3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso (6,8 nmol/Kg)

Ingesta diaria recomendada durante el embarazo:

500  $\mu\text{g}/\text{día}$  (1130 nmol/día)

Ingesta diaria recomendada durante la lactancia:

3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  + 100  $\mu\text{g}$  (227 nmoles)

Ingesta diaria recomendada en la infancia:

3,6  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (8,2 nmol/Kg) hasta los 2 años

3,3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (7,5 nmol/Kg) desde los 2 a los 10 años



#### 2.2.4.-HIDRÓLISIS INTESTINAL:

El ácido fólico y demás compuestos relacionados, cuando se encuentran en los alimentos, poseen en su molécula una cadena de poliglutamatos, generalmente de 7 unidades, aunque también se encuentran de menor número de glutamatos.

Estos residuos de glutámico son enlazados por su grupo gamma-carboxilo. Este enlace protege de la hidrólisis las proteasas ordinarias que se encuentran en la naturaleza.

La folilpoliglutamato-hidrolasa (FPG-hidrolasa) es una conjugasa específica (Beck, 1986). Esta enzima se encuentra en el intestino de los mamíferos, y es responsable de la desconjugación de los folilpoliglutamatos (FPG) de la dieta, sin la cual no podrían llegar a absorberse las moléculas de folato a través de la membrana del borde en cepillo.

En ratas (Kesavan y Noronha, 1983) se ha calculado una constante de hidrólisis intestinal de folilpoliglutamatos de 5 a 10 veces mayor que la constante de transporte, y la tasa de hidrólisis es al menos el doble que la de absorción.

La actividad de la desconjugación de folatos en el hombre también excede la capacidad de transporte intestinal, por lo que no es la etapa limitante en la absorción de los folatos de la dieta, pero un trastorno en la desconjugación puede alterar la biodisponibilidad (Gregory, 1989), ya que el folilpoliglutamato es absorbido con una eficacia de un 10 a 30 % menor que el folilmonoglutamato (Rosenberg, 1981).

La actividad hidrolítica en el intestino puede proceder de la enzima que se encuentre en la membrana del intestino, o de las que se hallen en el jugo pancreático o la secreción biliar.

En el hombre se ha encontrado 100 veces mayor cantidad de la FPG-hidrolasa en la mucosa del intestino, que en las secreciones gástricas o pancreático-biliares (Halsted y cols, 1989). Por otro lado se ha encontrado que la conjugasa del intestino tiene 1000 veces más actividad que la procedente de la bilis o jugo pancreático (Halsted, 1986). Por lo tanto se puede deducir que en el hombre la desconjugación de los folilpoliglutamatos se produce principalmente por la enzima de la mucosa intestinal, siendo la acción de la otra enzima despreciable (Gregory, 1989).

Existen diferencias interespecíficas en la actividad conjugasa: Kesavan y Noronha (1983), trabajando con ratas observaron que tras la ingestión de folilpoliglutamatos, se producía un gran aumento de la actividad conjugasa en el lumen intestinal, llegando a ser 2 a 3 veces mayor que la actividad conjugasa de la mucosa, probablemente debido al aumento en 2 a 3 veces de la actividad de la conjugasa pancreática, sin aumento paralelo de la actividad conjugasa de la mucosa; además al aumentar la conjugasa pancreática, se producía simultáneamente un incremento de los folatos en suero. En ratas de edad avanzada observaron que se producía una inducción de la conjugasa pancreática por los folilpoliglutamatos 4 a 5 veces menor, esto podría producir un retraso en la hidrólisis y una disminución de la absorción, lo que explicaría la disminución de folatos observada en suero. De lo que se deduce que la FPG-hidrolasa pancreática juega un papel fundamental en la rata.

En otros animales como el mono (Wang y cols, 1985) o el perro (Baugh y cols, 1975), también se ha encontrado poca o nula actividad conjugasa ligada a la membrana de borde en cepillo, pero se ha encontrado una importante actividad conjugasa en la fracción soluble o lisosomal del enterocito. Esta conjugasa intracelular no podría jugar

ningún papel en la absorción de los folatos de la dieta, puesto que el folato antes de entrar en el enterocito debe perder la cadena de poliglutamatos, y probablemente el papel de esta enzima sea el de hidrolizar los folatos almacenados en la célula en forma de poliglutamatos.

En el hombre y en el cerdo se ha encontrado una importante actividad conjugasa en la membrana de borde en cepillo, además de la actividad conjugasa intracelular (Gregory, 1989). En el hombre y en el cerdo se han observado diferencias entre estas enzimas:

La actividad de la conjugasa intracelular (IC-FC) o endopeptidasa, tiene un pH óptimo de 4,5 y la actividad de la conjugasa de la membrana de borde en cepillo (BB-FC) o exopeptidasa, tiene un pH óptimo de 6,5. Además la actividad endopeptidasa es similar en todo el intestino, y la exopeptidasa es mayoritaria en duodeno y primera porción del yeyuno (Halsted, 1989).

La BB-FC, con actividad exopeptidasa, origina productos de cadena intermedia: hexaglutamatos, pentaglutamatos, tetraglutamatos, triglutamatos y diglutamatos, que tienen similar afinidad por la enzima.

En cerdos se ha comprobado la existencia de una actividad conjugasa en el jugo pancreático, con la suficiente actividad para iniciar la desconjugación de los folatos, y es estimulada por la ingesta de alimentos (Gregory, 1989).

#### 2.2.4.1.-Factores que pueden influir en la actividad conjugasa intestinal:

##### **a) Enfermedades intestinales:**

Las enfermedades intestinales afectan a los dos tipos de conjugasa de forma diferente: la conjugasa de la membrana de borde en cepillo,

disminuye significativamente en muchos pacientes con diarrea de origen desconocido (DUO) y la intracelular no (Halsted, 1989).

En pacientes sometidos a by-pass, en la porción de intestino en continuidad, aumentan la BB-FC y la sacarasa y en la porción bypassada disminuyen. Esto sugiere que la BB-FC puede ser regulada por exposición al sustrato dietético. Este aumento en la actividad de la BB-FC se puede producir a través de un aumento en la cantidad de células intestinales, o de un aumento en la cantidad de enzimas por célula, y parece que ambos mecanismos actúan a la vez; en el yeyuno en continuidad se ha observado una hiperplasia de las células de la mucosa, con aumento de la altura y el número de vellosidades y del número de células crípticas, lo que implica un aumento en la masa total de enzimas (Reisenauer y cols, 1985).

También en pacientes con esprue no tropical, en los que disminuye significativamente la BB-FC, se ha observado una adaptación de la porción de intestino no dañada, el íleon, que aumenta su tasa de absorción de folatos. Tanto la hidrólisis como la absorción mejoran con una dieta libre de gluten.

#### **b) Fármacos:**

Se ha observado en ratas (Darcy-Vrillon y cols, 1988), "in vitro" e "in vivo", una inhibición de la actividad conjugasa intracelular, con la administración de heparina, pero "in vivo" la concentración de heparina tenía que ser el doble, posiblemente debido al elevado peso molecular de la heparina y su retraso en atravesar las membranas celulares. Además el salicilato de sulfapiridina (SASP), inhibía la conjugasa de la membrana de borde en cepillo, pero no la intracelular.

En la colitis ulcerosa, que afecta al intestino grueso, no disminuye la biodisponibilidad y lo mismo ocurre en la enfermedad de Chron, pero en estas enfermedades se utiliza como tratamiento la

salicilosulfapiridina (SASP), que perjudica la desconjugación intestinal, y por tanto la absorción de folatos.

c) Zinc:

Se han realizado estudios en el hombre (Tamura y cols, 1978), sobre la influencia de la deficiencia de zinc en la desconjugación y se ha comprobado que tiene un efecto negativo. Además la actividad BB-FC era activada por la presencia de zinc.

En la rata Tamura y Kaiser (1991) han observado que la conjugasa intracelular no es dependiente de zinc, pero en cambio encontraron una disminución de la conjugasa pancreática en el jugo pancreático y en el lavado intestinal de ratas sometidas a una dieta deficiente de zinc. También comprobaron cierta influencia del zinc en el metabolismo del folato, en su distribución tisular y en las actividades de los enzimas que intervienen en la transferencia de fragmentos monocarbonados.

d) Dieta:

La desconjugación intestinal también puede afectarse por los alimentos de la dieta: Bandhari y Gregory (1990), estudiaron el efecto de los alimentos en la desconjugación intestinal "in vitro", en el hombre y en el cerdo, y observaron que la BB-FC es inhibida en un 20 a 35 % por alubias, plátanos y espinacas; en un 46 % por tomates; y en un 80 % por zumo de naranja. El patrón de inhibición por los distintos alimentos fue similar en el hombre y en el cerdo. La inhibición aumentó al aumentar la concentración del alimento. Según estos autores, la inhibición no podía deberse a un efecto del alimento en el pH intestinal puesto que habían sido neutralizados previamente y tampoco se debía a una interacción directa de algún elemento presente en el alimento, con la conjugasa de la membrana. En el caso del tomate y el zumo de naranja, ricos en citrato, este citrato podía quelar el zinc, y podría afectar la actividad de la conjugasa de forma indirecta.

**e) Edad:**

La edad del individuo no parece influir en la actividad de la folilpoliglutamato-hidrolasa (Gregory, 1989).

**f) Etanol:**

No se ha observado efecto alguno de la ingesta crónica de etanol, en la desconjugación intestinal de folatos, en el mono (Romero y cols, 1981).

En el hombre, se ha observado "in vitro" (Reisenauer y Halsted, 1981), que el etanol no inhibe de forma significativa la actividad de la conjugasa de la membrana de borde en cepillo.

Naughton y cols (1989), en experimentos realizados "in vitro" en el cerdo, demuestran que la ingesta crónica de etanol no afecta la fluidez de la membrana intestinal del borde en cepillo, pero sí la ingesta aguda o los cambios de temperatura. En los cerdos sometidos a ingesta crónica de alcohol, se ha encontrado una disminución de más del 50 % de la actividad de la conjugasa de la membrana intestinal, con respecto al grupo control. La disminución en la actividad de la enzima BB-FC puede reflejar una alteración en el "turnover" del enzima, en su síntesis o en su degradación. A pesar de esta alteración, los cerdos no desarrollaron una deficiencia de folatos tras 11 meses de ingesta de alcohol.

Reisenauer y cols.(1989) trabajando "in vivo" con cerdos, encontraron una disminución del 35 % de la desconjugación de los folilpoliglutamatos en los animales sometidos a ingesta diaria de alcohol durante 11 meses, con respecto a los controles.

### 2.2.5.-ABSORCIÓN INTESTINAL

La absorción intestinal de folatos se realiza por dos mecanismos: difusión pasiva, que predomina a altas concentraciones (dosis farmacológicas), y transporte mediado, para las concentraciones normales de folatos en alimentos (condiciones fisiológicas).

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).

Los estudios realizados en intestino sugieren la existencia de un único sistema de transporte activo para el pteroilglutamico 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 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). En cerdos es semejante en yeyuno e íleon (Reisenauer y cols, 1989).

Said (1988) comprobó que en el íleon de ratas el transporte de ácido fólico no era afectado 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 íleon de ratas, con el yeyuno

resecaado, el transporte de ácido fólico 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.

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.

Este mismo grupo detectó otro sistema de transporte activo que existía a lo largo de todo el intestino delgado; este sistema de transporte era saturable, y formaba parte de los sistemas de proteínas-ligando del folato. 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), trabajando de nuevo con cerdos, constató que una proteína-ligando era responsable del transporte, ya que utilizando un inhibidor (NHS-PteGlu) se inhibían la unión a la proteína-ligando y el transporte de folato en el mismo grado, y además el orden de afinidad de las distintas especies de folatos por la unión a la proteína y por el transportador era el mismo.

La relación existente entre los datos obtenidos en cerdos, sobre la presencia de un sistema de transporte saturable a lo largo de todo el intestino delgado, incluyendo el íleon, y lo observado por Said en ratas permanece aún sin dilucidar.

Otras condiciones bajo las cuales la absorción es similar en todo el intestino y cursa mayoritariamente por difusión facilitada, es cuando los valores de pH están alejados del óptimo para el transportador, debido a que el transportador tiene un pH óptimo cercano a 6, y al



alejarse de este valor pierde su eficacia.

Esto fue comprobado por Zimmerman (1990) : a pH 7,5 el transporte de ácido fólico es semejante en yeyuno y en ciego y no era transportado en contra de gradiente. En cambio a pH 5,5 si existen diferencias entre las dos porciones del intestino: en el yeyuno se producía el transporte en contra de gradiente pero en ciego no.

Estas diferencias entre intestino delgado y grueso ya las habían observado anteriormente Strugala y cols. (1985): 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 mucosa a serosa y serosa a mucosa, del folato.

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) habían comprobado 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.

#### 2.2.5.1.-Mecanismo de transporte:

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:

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 era también afectado directamente por la concentración de Na<sup>+</sup> en el medio (Eilam y cols, 1981). Pero Zimmerman y cols.(1986) demostraron lo erróneo de esta hipótesis, aunque Said y cols.(1987) sugirieron una posible influencia indirecta del Na<sup>+</sup> 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 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 en el hombre y en la rata. 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.

En cabras se ha determinado que el pH óptimo de transporte intestinal de folatos es 5 (Blakeborough y Salter, 1988)

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 y la transferencia desde la mucosa a la capa serosa, del folato. Ellos, basándose en estudios previos (Blair y Matty, 1974), sugirieron que este efecto se producía no directamente en 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.

Más tarde, 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 de folato.

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:

a)debido 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

b)debido a la existencia de un intercambiador folato/OH<sup>-</sup> ó folato/H<sup>+</sup>

Schron y cols.(1988) comprobaron que un mecanismo de intercambio folato/OH<sup>-</sup> 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'-disulfónicoestilbena-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 adelante (1991), Schron 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  $\text{OH}^-$  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/ $\text{OH}^-$ .

Para Schron un mecanismo que conste de intercambio de folato/ $\text{OH}^-$  puede explicar los efectos del pH en el transporte, además los datos obtenidos por él excluyen una competición entre el  $\text{OH}^-$  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.

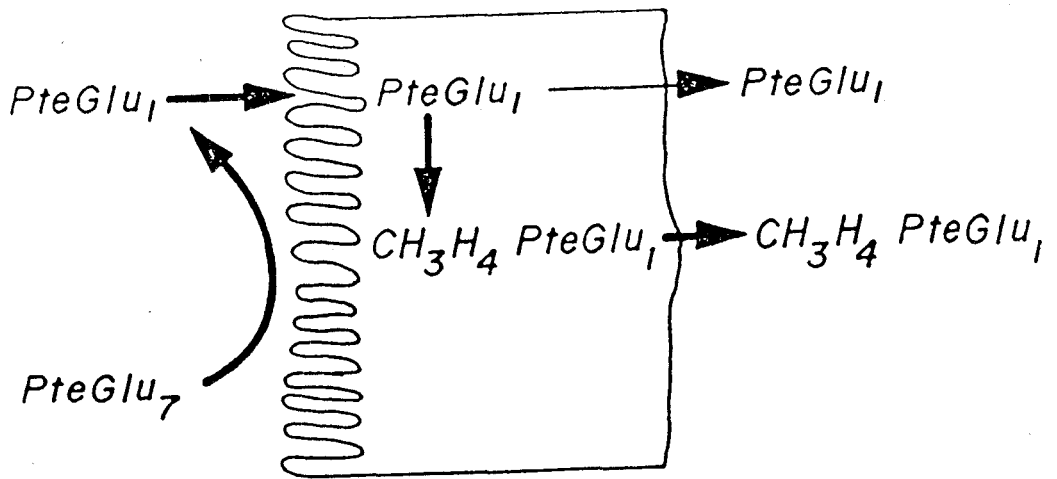
Parece que existe acuerdo entre la mayoría de los investigadores en dar un valor aproximado de  $5 \mu\text{M}$ , para la  $K_m$  del transporte activo de folatos en la membrana de borde en cepillo, en ratas y en hombre. A concentraciones por debajo de esta  $K_m$ , el transporte saturable predomina sobre la difusión pasiva (Bhandari y Gregory, 1992).

Blakeborough y Salter (1988) encontraron valores de  $K_m$  más elevados en cabras recién nacidas, para el 5-metilTHF que para el ácido fólico. También encontraron que el transporte, incluso a valores de concentración por debajo del valor de saturación, seguía una cinética de saturación con el tiempo, observándose dos fases en la representación transporte/tiempo: una rápida y lineal hasta 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 (ESQUEMA 4):

a) si se trata de 5-metilTHF, será transportado intacto por la membrana basolateral

b) si se trata de ácido fólico, puede transportarse por la membrana basolateral directamente, o sufrir una reducción y metilación a 5MTHF



ESQUEMA 4: TRANSPORTE Y REDUCCIÓN INTESTINAL DEL ÁCIDO FÓLICO

y entonces transportarse

El transporte de folatos a través de la membrana basolateral fue estudiado por Said y Redha (1987) y observaron las siguientes características:

- a) 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
- b) es inhibido por inhibidores de transporte de aniones (DIDS)
- c) es electroneutral

Estas características le hicieron concluir que el mecanismo de transporte por la membrana basolateral era semejante al que sucede en la otra membrana del enterocito (BBM).

Se ha descubierto en neonatos 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 absorptivas 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. Se ha comprobado que estas proteínas aumentan la proporción inicial y la cantidad total del transporte intestinal de folato (Salter y Blakeborough, 1988).

En la leche de mamíferos los folatos se encuentran de un 60 al 100 % unidos a proteínas y se ha demostrado que esta unión proteína-folato apenas se disocia a su paso por el estómago: parece ser que las proteínas-ligando de la leche podrían rescatar al folato de la 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 (Henderson, 1990) (Mason y Selhub, 1988). 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).

Otros investigadores han propuesto, que el mecanismo de absorción en neonatos es semejante al de los adultos y entonces 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).

#### 2.2.5.2.-Factores que alteran la absorción intestinal de folatos

##### A) Flujo de perfusión

La absorción de folatos aumenta al aumentar el flujo de perfusión, permaneciendo constante la absorción del disolvente o fluido. La capa inmóvil adyacente a la membrana hace de barrera difusional que impide la difusión de solutos del lumen a la mucosa, y esta barrera es particularmente importante a bajas concentraciones. Se ha observado que aumentando el flujo, disminuye la capa "inmóvil", lo que favorece el contacto del folato con la mucosa y por tanto su absorción (Said y cols, 1984a).

##### B) Temperatura

Se ha observado que la transferencia del ácido fólico, en la dirección mucosa a serosa es dependiente de la temperatura, aunque esto no ocurre en la dirección serosa a mucosa. Esta dependencia de la temperatura, añade argumentos a la existencia de un transporte

intestinal de folatos dependiente de energía (Strugala y cols, 1985).

Said y cols.(1985) observaron que el transporte de 5-metilTHF también era dificultado por bajas temperaturas.

### C) Inhibidores

Inhibidores metabólicos como 2,4-dinitrofenol, NaCN o anaerobiosis, disminuyen el transporte de folatos.

### D) Óxido nitroso

El transporte de 5MTHF disminuye tras siete días de exposición a éste compuesto, aunque no se sabe con exactitud si este efecto está relacionado o no con la inhibición del metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub> (Perry y cols, 1983).

### E) Fármacos

Metotrexato, aminopterina, pirimetamina, salicilato de sulfapiridina (SASP), difenilhidantoína, trimetoprim (Zimmerman y cols, 1987). Triamtereno, sulfasalazina (Beck, 1986). Todos estos fármacos disminuyen el transporte de folatos, y por este motivo a los pacientes que los toman es conveniente que se les administre un suplemento de ácido fólico.

### F) Alimentos

a) Las legumbres y alubias ejercen un débil efecto inhibitorio (Gregory, 1989).

b) Fibra bruta: La incorporación de fibra bruta en fórmulas enterales se ha visto que disminuye la absorción intestinal de Zn y ácido fólico. Diferentes tipos de fibras producen diferentes efectos en



la absorción, debido a su distinta composición química (Cosack y Rojhani, 1992).

También se han recogido datos de inhibición de la absorción de folatos por ciertas fibras, que actuarían impidiendo la difusión de los folatos hacia la superficie de la mucosa (Gregory, 1989)

### G) Ácidos biliares

Los ácidos biliares no conjugados, son potentes inhibidores del transporte de 5MTHF, por una inhibición competitiva. Los ácidos biliares conjugados (así se encuentran en condiciones fisiológicas), no inhiben el transporte.

En ciertas enfermedades infecciosas intestinales, puede estar aumentada la desconjugación de las sales biliares. También puede existir esta alteración en pacientes con cálculos biliares sometidos a tratamiento con ácidos biliares desconjugados (Said y cols, 1984b).

### H) pH del medio

Como se indicó anteriormente el transporte intestinal de folatos tiene un pH óptimo entre 5,5 y 6,5, y fuera de este intervalo el transporte activo apenas se produce. Estudios sobre el particular han revelado que el ácido fólico (PteGlu), es una molécula apolar en un rango de pH del medio entre 6 y 6,5 (Poe, 1977).

Russel y cols. (1979) observaron que a igualdad de pH, la variación en el medio de los iones bicarbonato por fosfato no modificaba la absorción, por lo tanto los distintos iones tienen el mismo efecto.

Entre los factores que pueden alterar el pH intestinal y por lo tanto la absorción intestinal, se encuentran:

#### H.a) Antiácidos.

H.b) Gastritis atrófica: se ha demostrado que el pH del intestino proximal, es significativamente mayor en pacientes con gastritis atrófica que en controles (aproximadamente 0,4 unidades de pH). Por otra parte, la población de bacterias en el fluido del intestino proximal es marcadamente mayor en pacientes con gastritis atrófica, y estas bacterias se ha observado que son capaces de producir folatos "in vitro". Como ninguno de estos pacientes tienen bajos niveles séricos de folato; podría ser que la síntesis bacteriana mantenga los niveles de folato normales (Russel, 1986).

c) En la insuficiencia pancreática se produce un aumento de absorción de folatos debido, probablemente, a un incremento en la acidez en el lumen intestinal provocado por la disminución en la secreción de bicarbonato del páncreas. Esta fluctuación en la secreción de bicarbonato en el páncreas es mayor que la que se produce debido al alcoholismo (Russell y cols, 1979).

#### I) Edad

No parece ejercer ningún efecto sobre la absorción de folatos. Así Said y Hollander (1984), trabajando con ratas, no observaron variación aparente, en los valores de absorción de 5MIHF en ratas jóvenes y viejas.

Posteriormente, trabajando en ancianos (Gregory, 1989), tampoco ha constatado alteraciones en la absorción intestinal de folatos.

#### J) Alteraciones patológicas

##### J.a) SIDA:

En un estudio prospectivo, controlado con pacientes de SIDA y

sanos, se observó que los pacientes de SIDA muestran una significativa reducción de su capacidad de absorción de ácido fólico, en las fases temprana y tardía de la enfermedad. Se ha sugerido que el virus del SIDA pueda producir directamente una enteropatía. Este problema tiene gran trascendencia en pacientes sometidos a altas dosis de metotrexato (afectados por linfoma secundario al SIDA), en los que hay que utilizar el "rescate" de ácido folínico (Revel y cols, 1991)

#### J.b) Enfermedad de Chron:

En pacientes que padecían esta enfermedad se ha comprobado que presentan una deficiencia de folato, sobre todo si incluían sulfasalazina en su tratamiento (Rosenberg, 1990), aunque la cuestión de si está alterada la absorción está por dilucidar.

#### J.c) Diabetes:

En ratas diabéticas se ha observado un aumento del transporte de 5MTHF (Said y cols, 1986a).

#### J.d) Esprue:

El esprue tropical y el no tropical están caracterizados por una malabsorción generalizada y la presentación clínica común de anemia megaloblástica debida a una deficiencia de folato.

El esprue no tropical se da en el intestino proximal, se produce atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las células crípticas, con pérdida parcial de la superficie absorptiva del intestino y que se normaliza con la exclusión del gluten de la dieta. Se ha sugerido que en esta enfermedad se produce una adaptación en la porción de intestino sano, aumentando el transporte de folatos (Halsted, 1980).

El esprue tropical cursa con atrofia de las vellosidades, con

disminución de la mitosis y aumento de los núcleos de las células crípticas. Se ha detectado disminución de la absorción de folatos en un 38 a 75 % de los pacientes estudiados (Chanarin, 1979).

#### **J.e) Malabsorción congénita:**

Se han detectado varios casos de malabsorción congénita de folatos (Urbach y cols, 1987). Esta malabsorción que causa anemia megaloblástica en la infancia temprana, puede corregirse mediante la administración de dosis masivas de ácido fólico por vía parenteral.

#### **J.f) Otras patologías que disminuyen la absorción de folatos:**

Enteritis regional; infiltraciones linfomatosas o leucémicas del intestino delgado; enfermedad de Whipple; esclerodermia y amiloidosis.

#### **K) Deficiencia de folatos**

La deficiencia severa de ácido fólico afecta la histología yeyunal, produciendo megaloblastosis reversible del epitelio críptico (Hermos y cols, 1972). Sin embargo Badcock y cols (1978) han sugerido que en la deficiencia dietética de folatos, el gran tamaño del enterocito, junto con la gran especificidad de las proteínas absorptivas, limitan la malabsorción que podría esperarse debido a la atrofia intestinal.

#### **L) Malnutrición**

La malnutrición crónica es sabido que tiene efectos generalizados en la estructura y función intestinal (Herskovic, 1969).

Sin embargo, estudios en ratas no detectaron ningún efecto perjudicial de la deficiencia proteica en la absorción de ácido fólico (Halsted y cols, 1974). Además Salomons y cols. (1975) incluso

encontraron un aumento del transporte de folatos en ratas sometidas a ayuno parcial.

#### M) ETANOL

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

Más tarde (1973b), 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 y el efecto del alcohol.

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)

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.

Romero y cols. (1981), trabajando en monos con ácido fólico radiactivo por vía oral, observaron que la ingestión crónica de alcohol producía en estos, un aumento de la excreción fecal del ácido fólico, una disminución de la excreción urinaria, y un aumento de la retención corporal del isótopo. Este autor sugiere que se produce una malabsorción intestinal de folato en el mono, a pesar de una dieta adecuada.

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. El autor concluyó 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. También detectó una pérdida de peso en monos deficientes en folato, con ingesta crónica de alcohol o no.

Reisenauer y cols.(1989) trabajando con cerdos, en los que perfundían ácido fólico marcado en intestino proximal y distal, llegaron a la conclusión de que la absorción de ácido fólico era semejante en cerdos controles y en cerdos sometidos a exposición aguda o crónica de etanol, en el yeyuno y en íleon.

Estos últimos datos se correlacionan con lo observado por Naughton y cols (1989), en BBMV de intestino de cerdo. La exposición aguda a etanol, produjo un cambio en la fluidez de membrana del intestino, que no se tradujo en alteración del transporte de ácido fólico. La exposición crónica al etanol, no modificó la fluidez de la membrana intestinal, ni alteró la absorción de ácido fólico. Estos mismos resultados se obtuvieron en yeyuno y en íleon.

Said y Strum (1986) 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.

### 2.2.6.-REDUCCIÓN INTESTINAL

El ácido fólico (PteGlu o PGA) puede sufrir una serie de procesos en la mucosa intestinal, antes de su incorporación al torrente sanguíneo. Primeramente puede reducirse de PteGlu a dihidrofolato y éste a tetrahidrofolato, posteriormente el tetrahidrofolato (THF) formado puede transformarse en 5-metiltetrahidrofolato (5MTHF).

Cada una de estas "especies" de folatos puede ser transportado al torrente sanguíneo, a través de la membrana basolateral. Estos compuestos, sin embargo, también pueden ser utilizados por el enterocito en la mitosis, para el proceso de división celular y regeneración de la mucosa intestinal,

Nixon y Bertino (1972), administrando a pacientes 5-formilTHF marcado por vía oral, observaron que el 90 % del isótopo entra en la circulación sanguínea en forma de 5-metilTHF en los primeros 75 minutos; por otra parte si administraba vía intravenosa el 5-formilTHF, el 40 % de la cantidad de isótopo marcado permanecía inalterado hasta los 90 minutos. Por ello dedujo que se producía un proceso de reducción intestinal en la mucosa intestinal.

Perry y Chanarin (1973), trabajando con ratas, llegaron a la conclusión de que el THF no acepta grupos metilo directamente, pero sí una unidad de carbono en el estado de oxidación de formato o formaldehído, y después se reduce pasando a 5-metilTHF, ya que el 5-formilTHF aparece en el fluido seroso, lo que indica que puede existir formilación del THF en ausencia de metilación.



También se ha estudiado el proceso de reducción desde ácido fólico a tetrahidrofolato, y se ha comprobado (Selhub y cols, 1973) que es un proceso saturable con una  $K_m$  de  $1,55 \mu M$ , varias veces menor que la  $K_m$  del transporte por la membrana de borde en cepillo, luego se satura con concentraciones menores, lo que podría explicar el hecho de que parte del PteGlu que entra en el enterocito, pase al torrente sanguíneo a través de la membrana basolateral, inalterado.

Olinger y cols.(1973) observaron en ratas, que no existían diferencias entre el 5-metilTHF que aparecía, después de aportar PteGlu, en yeyuno o en íleon. También comprobaron que la actividad metiladora y de la dihidrofolato reductasa, eran mayores en yeyuno que en íleon. Estos resultados dispares, podrían estar justificados por la retención del 5-metilTHF formado "de novo" en el enterocito. Olinger y su grupo comprobaron que tanto el flujo a través de la célula como la incorporación a través de la membrana de borde en cepillo, de los folatos, eran mayores en yeyuno que en íleon, pero el transporte a través de la membrana basolateral era mayor en íleon que en yeyuno. Estos resultados sugieren que, en yeyuno, la mayor parte del PteGlu que penetra en el enterocito, es convertido en 5-metilTHF y es retenido en la mucosa; en el íleon el gran flujo a través de la membrana basolateral, asociado a la pequeña incorporación a través de la membrana de borde en cepillo, sugiere que poca proporción del PteGlu que penetra en el enterocito y pasa a 5-metilTHF es retenido en la célula intestinal.

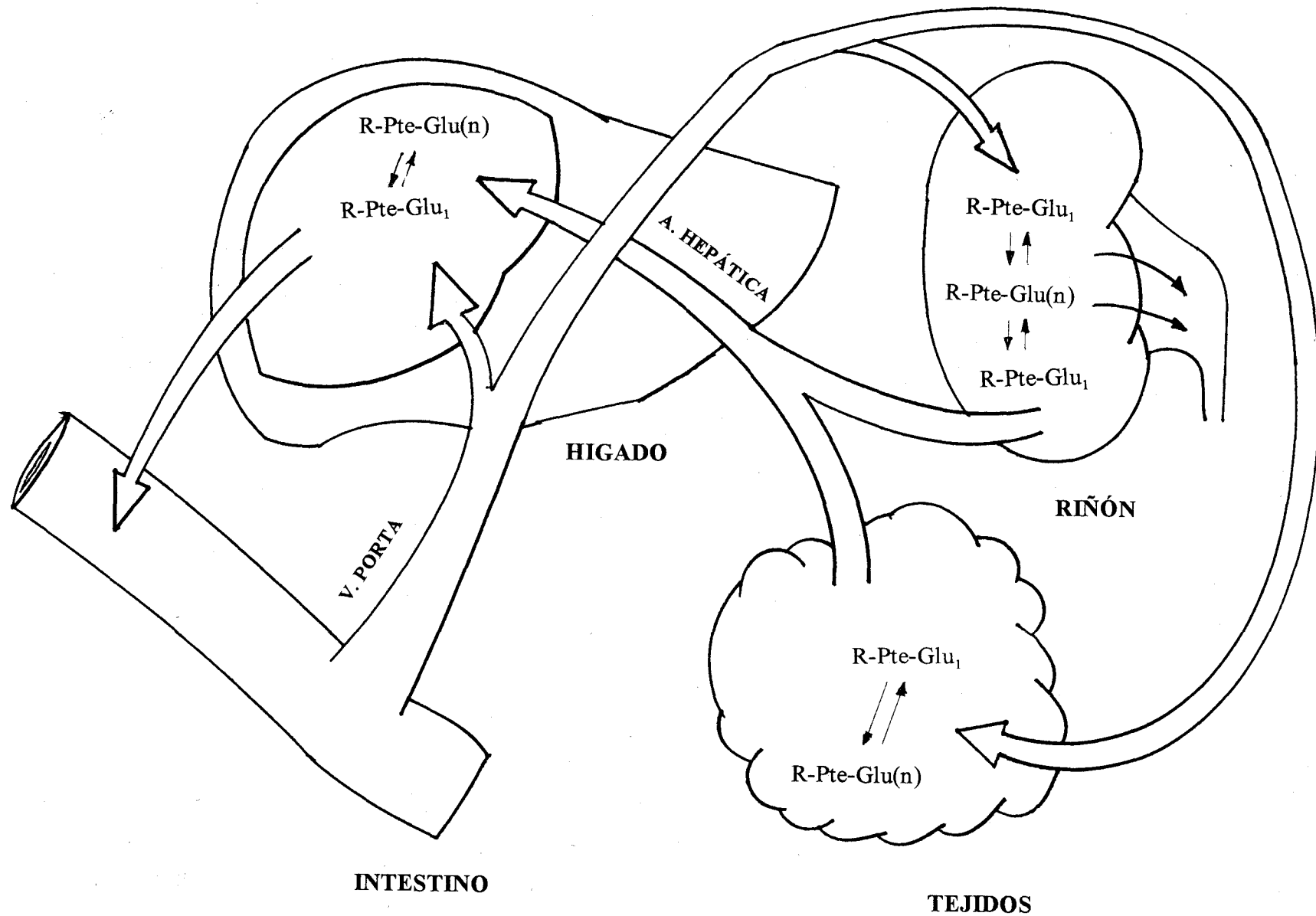
Se ha comprobado en la rata, que la dihidrofolato reductasa del intestino, probablemente la enzima limitante del paso de PteGlu a 5MTHF, es dependiente del pH del medio, y tiene un pH óptimo ácido, siendo más activa a pH 5,4 que a pH 7,4 (Strum, 1979).

Olinger y cols.(1973), calcularon en ratas, que se producía un 2 % de conversión de PteGlu a 5MTHF a una concentración de  $2 \mu M$  y un 20 % a una concentración de 20 nM. Por otra parte, Tani e Iwai (1983)

obtuvieron un 88 % de reducción de PteGlu a la concentración de 0,1 nM y un 52 % a la concentración 1 nM. Estos datos podrían sugerir, que la  $k_m$  real podría ser menor que la calculada por Selhub y cols.(1973), también en ratas.

Koshasi y cols.(1987) sugieren que el proceso de metilación, podría ser más activo en la porción media del intestino delgado. No obstante este dato está en contradicción con lo obtenido anteriormente por Olinger y cols.(1973).

ESQUEMA 5: HOMEOSTASIS DEL FOLIATO



### 2.2.7.-CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA (CEH)

Los folatos de la dieta absorbidos en el intestino, pasan a la circulación portal, y por ésta al hígado.

En el hígado los folatos pueden seguir dos caminos. (ESQUEMA 5):

a) ser captado por las células hepáticas; y una vez en éstas puede ser almacenado, o pasar a la secreción biliar (constituyendo la circulación enterohepática)

b) no ser transportado al interior del hepatocito, y seguir por la circulación general

Se han realizado estudios sobre el transporte de diversos folatos hacia el hígado y de todos el mejor estudiado es el 5-metilTHF. Así Weir en 1985 realizó una revisión sobre la circulación enterohepática de folatos, destacando un trabajo realizado por Strum y Liem (1980) con ratas, en el que se había comprobado que el 5MTHF es transportado desde la sangre portal por un sistema dependiente de energía, concentrando el folato en el hepatocito de 5 a 10 veces la concentración del líquido de perfusión, y excretado en bilis a concentración 15 a 19 veces mayor a la de dicho líquido.

Horne (1990) observó en hepatocitos aislados, que el transporte de 5MTHF es un transporte mediado, pH dependiente y sodio independiente. Sin embargo aunque la concentración de sodio no varía el transporte de 5MTHF, la preincubación de los hepatocitos sin sodio, aumentaba el pH, lo que disminuía el transporte; este efecto es similar al observado en el transporte intestinal de ácido fólico. Horne determinó la  $k_m$  del

transporte, siendo de 2,45  $\mu\text{M}$  a pH 5,5 y de 0,93  $\mu\text{M}$  a pH 7,4; la velocidad máxima también aumenta al disminuir el pH. Las tasas iniciales de transporte fueron mayores a pH 5,5 que a pH 7,4, sin embargo, en el transcurso de una hora, las velocidades de absorción a cada pH alcanzan valores semejantes, luego el pH no influye en la acumulación final. Este autor descarta la endocitosis como sistema de transporte de folatos en hepatocitos, y sugiere un sistema de transporte mediado por una translocación de protones en la membrana, que estaría favorecido por un gradiente de pH, y sería similar al transporte en el intestino.

Henderson (1990) estudiando las distintas proteínas ligando de folato, llegó a la conclusión de que existían dos sistemas de transporte de folatos en hígado, uno no saturable, y el otro saturable, con una  $K_m$  de 0,9  $\mu\text{M}$ ; además los folatos recibidos de la circulación por el hígado, son convertidos en 5MTHF previamente a su paso a la secreción biliar.

Parece ser que el hígado tiene sistemas independientes para el transporte de PteGlu y 5MTHF. Así Hoppner y Lampi (1992), observaron que la biodisponibilidad hepática de 5MTHF al ser ingerido incluido en levadura, disminuyó con la administración de nitrito, por lo que sugiere que el nitrito podría inhibir su transporte, en cambio la biodisponibilidad hepática de PteGlu no se modificó.

Además se ha constatado un comportamiento diferente de PteGlu y de 5MTHF a su paso por el hígado. Así Hillman y cols. (1977), observaron en ratas, que después de la administración intravenosa de PteGlu marcado, o de 5MTHF marcado, el 50 % del isótopo aparecía en el hígado en 10 a 15 minutos. De este folato hepático marcado, aparecía en bilis a las 6 horas, más del 80 % en el caso del PteGlu, y más del 90 % en el caso del 5MTHF.

Steimberg y cols. (1979) también observaron diferencias al administrar 5MTHF o PteGlu. Al administrar ( $^3\text{H}$ )PteGlu marcado por vía intravenosa, el isótopo aparece en bilis rápidamente en forma de

$(^3\text{H})5\text{MTHF}$ , pero su concentración disminuye con el tiempo, posiblemente debido a una saturación del sistema, aunque la mayoría del isótopo se reduce y metila, pero no aparece en bilis. Cuando el  $(^{14}\text{C})5\text{MTHF}$  se administra por vía intravenosa, más del 90 % del isótopo fue aclarado por otros tejidos distintos del hígado en 3 minutos, y el isótopo que aparecía en hígado se correspondía en su totalidad con la molécula administrada. Cuando se introducía el isótopo en el lumen intestinal, en el caso del  $5\text{MTHF}$  era rápida y cuantitativamente aclarado en bilis a las 6 horas, permaneciendo en el hígado menos del 3 % del isótopo; en cambio si se administraba  $(^3\text{H})\text{PteGlu}$ , el 15 a 20 % del isótopo permanecía en el hígado, sin excretarse en bilis. Estos resultados estarían de acuerdo con un modelo en el que el  $\text{PteGlu}$  antes de su paso a la bilis, tendría que convertirse en  $5\text{MTHF}$ , la principal forma de folato existente en la bilis

Luego en otro ensayo distinto, utilizaron dos isótopos diferentes de 5-metilTHF, y comprobaron que tras una dosis entérica de  $(^3\text{H})5\text{MTHF}$ , el 50 % aparecía en bilis a las 4 horas, en cambio al administrar  $(^{14}\text{C})5\text{MTHF}$ , sólo el 25 % es recuperado en bilis en el mismo tiempo, luego esto demostraba que el  $5\text{MTHF}$  al entrar en el enterocito en parte pierde su grupo metilo, lo que es inapreciable al administrar  $(^3\text{H})5\text{MTHF}$ . De estos resultados se podría deducir que no todo el  $5\text{MTHF}$  que aparece en bilis procedente de la dosis entérica, aparece en forma marcada por lo que no podría detectarse en forma de radiactividad.

Por otra parte, Lumb y cols. (1981) comprobaron que la inactivación de la vitamina  $\text{B}_{12}$ , resultado de la exposición a nitrito, disminuía la captación hepática de folatos y la formación de folilpoliglutamatos y aumentaba la excreción biliar. Estos hechos lo explicaban por un impedimento de la desmetilación del  $5\text{MTHF}$ , principal folato existente en la bilis.

Cichowicz y Shane (1987) obtuvieron unos resultados que apoyaban lo anterior, pues al calcular la rapidez catalítica de los distintos

folatos con respecto a la folilpoliglutamato sintetasa, observaron que PteGlu y 5MTHF producían una reacción mucho mas lenta que los otros folatos, por lo que estaría menos favorecida su formación, y facilitada su paso al conducto biliar.

El contenido hepático de folilpoliglutamatos está relacionado con la dieta y con los niveles séricos de folatos. Los folatos hepáticos están constituidos en su mayoría por folilpoliglutamatos, ya que la capacidad del hígado para retener folatos depende de su capacidad para convertirlos en estas formas poliglutámicas. Sólo una pequeña porción de la reserva hepática de 5MTHF es convertida en poliglutamato, esto explica que el principal folato que aparece en bilis sea el 5MTHF (Weir y cols, 1985).

#### 2.2.7.1.-Papel de la CEH en el mantenimiento de la homeostasis del folato

La cantidad de folato que aparece en bilis es proporcional al nivel sérico, y puede ser algo mayor de 1  $\mu\text{g}$  de folato por hora (Steinberg, 1984). Por ello, la circulación enterohepática supone sólo un pequeño porcentaje del folato total del organismo (1 mg), aunque la incompleta reabsorción intestinal de los folatos de la bilis podría ser causa de pérdidas de folatos.

Para mantener la homeostasis del folato, el organismo debe recuperar el folato de las células muertas o de los eritrocitos no viables. En el caso de los eritrocitos, debido a su destrucción se liberan 10  $\mu\text{g}$  al día, de un total de 1 mg de folato de reserva, y en situaciones en que se aumenta esta destrucción celular, el folato liberado puede exceder a la cantidad de folato ingerida en una dieta equilibrada. En experimentos realizados por Hillman y cols. (1982), comprobaron que en un período de dos horas, casi un 25 % del folato liberado por las células inviables era detectado en hígado y/o secreción biliar.

En períodos de carencias dietéticas de folatos, la circulación enterohepática (CEH) podría desempeñar un importante papel en el restablecimiento de la homeostasis del folato. Para asignar al hígado (a través de la circulación enterohepática) el papel de regulador de los niveles de folato en el organismo en estados carenciales, el hígado debería disminuir la captación hepática de folatos plasmáticos en dichos estados carenciales, o bien liberar los folatos almacenados en sus células, y para esto último previamente los folatos deben carecer de la cadena de poliglutamatos, que les impide atravesar la membrana celular.

McGuffin y cols. (1975) comprobaron previamente, que cuando se inducía en ratas, un estado carencial de folatos progresivamente, los pools hepáticos de la vitamina eran movilizados, de forma paralela, a la disminución de niveles séricos y eritrocíticos de folatos. Así el hígado jugaría un papel fundamental en la regulación del aporte de folato, cuando los niveles plasmáticos de folatos son insuficientes.

Por el contrario Hillman y cols. (1982) habían observado que en ratas con deficiencia establecida de folatos, aumenta la captación hepática de folato marcado y disminuyen la excreción biliar y los folilpoliglutamatos del hígado, con respecto a los controles. Esto implica que los folatos son retenidos en el hígado aunque no esten en forma de folilpoliglutamatos (forma normal de almacenamiento tisular de los folatos).

Steinberg y cols. (1982), al administrar por vía intravenosa ácido fólico marcado, observaron que la aparición de radiactividad en bilis fue menor en ratas sometidas a dieta deficiente en folato. Estos autores muestran que perfundir el intestino con 5MTHF marcado, la radiactividad en bilis fue también menor en ratas sometidas a la dieta carencial. En estas ratas sometidas a dieta carencial, la relación Glu1/Glu5 fue el doble, luego también existía disminución de los folatos con cadena larga de glutamatos.



Steinberg en una revisión publicada en 1984 estableció un modelo según el cual en períodos cortos de privación de folatos en la dieta, la circulación enterohepática mantendría los niveles séricos, debido a la elevada proporción de folatos en la bilis, comparada con el suero, en cambio en estados carenciales prolongados, serían los folatos tisulares los que mantendrían los niveles séricos liberando folatos al suero, aunque esto último no se ha comprobado.

Eisenga y cols.(1992), pusieron de manifiesto que en ratas sometidas a estado carencial de folatos, la incorporación de folato marcado aumentaba en todos los tejidos excepto en el hígado, y en la mayoría de los tejidos observaron una relación inversa entre folatos endógenos y marcados, excepto en hígado, donde existía una proporción directa, es decir en el hígado aumentaba la incorporación del folato marcado cuando el pool hepático era mayor.

Por todo lo anterior, no se ha establecido con seguridad, si el hígado (con la circulación enterohepática) desempeña o no el papel de reservorio de folatos, para su liberación en estados carenciales.

#### 2.2.7.2.-Efecto del alcohol en la CEH

El alcohol podría producir algún trastorno en la circulación enterohepática mediante la alteración en alguna de las siguientes fases:

- a) la captación hepática de folatos
- b) el almacenamiento hepático o
- c) la secreción biliar de folatos

En lo que respecta al transporte hacia las células hepáticas, Home y cols.(1979), trabajando en hepatocitos aislados de rata, comprobaron que el alcohol estimulaba la acumulación de 5MTHF, y este efecto era máximo de los 40 a 60 minutos, concluyendo que el alcohol aumenta la acumulación hepática de 5MTHF, por estimulación de la entrada del folato desde el plasma, sin afectar su salida del

hepatocito.

Por otra parte, Brown y cols.(1973), habían comprobado que la síntesis de folilpoliglutamatos disminuía en ratas sometidas a alcoholización previa.

Hillman y cols.(1977), trabajando con ratas sometidas a ingesta crónica de alcohol analizaron la incorporación en hígado y bilis de PteGlu marcado e introducido por vía i.v., comprobando que los folilmonoglutamatos y los folilpentaglutamatos hepáticos aumentaban, y en cambio en bilis disminuían. Sin embargo al administrar por vía intravenosa 5MTHF, no obtenían diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

Steimberg y cols.(1981), también observaron en ratas sometidas a dieta deficiente en folato a las que se les administraba PteGlu marcado, que el alcohol ingerido de forma crónica, aumentaba la formación de folilpoliglutamatos y la retención del isótopo en hígado. Este grupo basándose en estos datos y en otros trabajos dedujeron que el principal efecto del alcohol se producía en el transporte de los folatos hacia el conducto biliar.

Wilkinson y Shane (1982), trabajando con ratas de 2ª generación de alcoholización crónica y con ratas controles sometidas a períodos cortos de alcoholización, observaron que las ratas de 2ª generación de ingesta de alcohol metabolizaban folatos a folilpoliglutamatos más rápidamente que las controles, esto podría explicar los siguientes efectos en la captación hepática: un ligero aumento en las ratas alcoholizadas crónicamente y el gran incremento en las ratas sometidas a exposición aguda al alcohol. Por otra parte, la disminución de la ingesta de folatos en las ratas alcoholizadas puede explicar el hecho de que no aumenten sus niveles hepáticos de folatos.

Tamura y cols.(1981) trabajando con monos sometidos a una ingesta

prolongada de alcohol, observaron que al administrar PteGlu marcado, disminuía la retención hepática y aumentaba la eliminación en heces y orina de los folatos, con respecto a los animales controles.

Tamura y Halsted (1983), trabajando con monos, observaron que en los individuos a los que se les administraba un 50 % de las calorías de la dieta en forma de alcohol, disminuían los niveles hepáticos de folato, al parecer debido a la disminución de la retención de folatos en este órgano, aunque no detectó alteración alguna en la síntesis hepática de folilpentaglutamatos. En cambio no existían diferencias entre los alcoholizados y los controles en la capacidad de convertir PteGlu a 5MTHF, siendo esta última la forma mayoritaria de folato excretada en bilis.

En cambio Blocker y Thenen (1987), trabajando con monos sometidos a dieta libre de folatos, no encontraron diferencia significativa en los niveles hepáticos entre el grupo control y el grupo con ingesta crónica de alcohol, aunque sí encontraron diferencia significativa en la excreción fecal, lo que podría deberse, según ellos, a una alteración en la circulación enterohepática de folatos.

Hillman y Steinberg (1982) hicieron una recopilación de trabajos de otros autores, en los cuales no se habían observado cambios en la captación hepática ni en la excreción biliar de folatos, en pacientes sometidos a la ingesta de alcohol durante períodos cortos de tiempo.

Weir y cols. (1985) recopilaron trabajos realizados en ratas, sobre el efecto de la ingesta aguda de alcohol en la incorporación de folatos dentro del hígado, encontrando aumento, disminución o inalteración del parámetro.

### 2.2.8.-DISTRIBUCIÓN DE FOLATOS A LOS TEJIDOS:

Una vez que los folatos se encuentran en la circulación general, se distribuyen por todo el organismo, principalmente hacia tejidos de rápida división celular, como las células de la médula ósea y de la mucosa gastrointestinal, pues necesitan el folato para la síntesis de ADN. El folato en el plasma se encuentra mayoritariamente en forma de 5-metiltetrahydrofolato, y éste cuando se transporta al interior de la células, es retenido en forma de folilpoliglutamatos.

Hillman y Steinberg (1982) habían deducido que ciertos órganos tenían cierta facilidad para acumular folatos (hígado, riñón, placenta y plexo coroideo).

Steinberg y cols.(1983) habían afirmado que el determinante principal del pool de folatos en los tejidos es la división celular, y una vez formado, este pool no está en equilibrio con el folato extracelular, o sea que es prácticamente constante.

Steinberg (1984) en una revisión llegó a la conclusión de que en estados carenciales de folato, el folato disponible tendría poco éxito en abastecer las necesidades de tejidos críticos, si se distribuyeran por igual a todos los tejidos, por esto deben existir mecanismos que puedan dirigir los folatos a estos tejidos: proteínas-ligando asociadas a membrana y el almacenamiento en forma de folilpoliglutamatos.

Más tarde, Bhandari y Gregory (1992) observan que existen diferencias en la incorporación de PteGlu y 5MTHF en ciertos tejidos

como plexo coroideo, túbulos renales y placenta, presentando el primero mayor afinidad. En cambio no observan diferencias en la biodisponibilidad entre PteGlu, 5MIHF y 5-formilTHF.

#### 2.2.8.1.-Alteraciones que influyen en la distribución tisular

Whitehead y cols.(1968), habían observado en pacientes sometidos a hemodiálisis lo siguiente: tras una rápida caída de folatos séricos, se producía una lenta salida de los folatos intracelulares, que no era suficiente para llevar los niveles séricos a su estado primitivo, por lo que este pool intracelular no tiene capacidad reguladora de la homeostasis de folatos cuando se producen cambios bruscos en los niveles séricos.

Tisman y Herbert (1973), trabajando en cultivos celulares de médula ósea de pacientes con una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, observaron una disminución del transporte de 5MIHF hacia los tejidos, con respecto a pacientes sin esta deficiencia. Estas células recuperaban su capacidad de transporte cuando se añadía vitamina B<sub>12</sub> al medio de cultivo, por lo que dedujeron que la vitamina B<sub>12</sub> desempeñaba un papel importante en la captación celular de folatos.

Hillman y cols.(1977) comprobaron, en ratas, que se produce una caída de folatos séricos de hasta un 30 % a las 6 a 8 horas de someterla a un drenaje de la secreción biliar; pero después de 40 horas de drenaje esta caída se amortigua, lo que sugiere que podría existir liberación de folatos desde los tejidos al plasma.

El efecto de un exceso de folatos en la dieta fue estudiado por Zettner y cols.(1981), que usando dosis masivas de PteGlu observaron que los niveles tisulares aumentaban, pero no había evidencias de que se acumularan en los tejidos, ya que a los cuatro meses de una dieta normal, los niveles tisulares vuelven a la normalidad, debido a un aumento de la excreción renal de folatos. Así observó correlación entre

la proporción de folatos excretados en orina con los niveles encontrados en suero, aunque no correlacionaban con los niveles en eritrocitos.

Steinberg y cols.(1982) trabajando con ratones a los que se les había inducido hepatomas, observaron que la restricción de folatos en la dieta producía un aumento en la longitud de las cadenas de folilpoliglutamatos.

Eisenga y cols.(1992), trabajando en ratas obtuvieron los siguientes resultados: al someter a las ratas a dieta deficiente en folatos, se produce una depleción de los folatos intracelulares. Disminución que se observa en orina en menos de dos semanas, en hígado y riñón de 2 a 4 meses y en cerebro tarda en aparecer más de un año; esto parece indicar que ciertos tejidos son más vulnerables a la depleción que otros. La resistencia del cerebro a la depleción se ha sugerido que es debida a un aumento de la incorporación del folato disponible en suero, aunque otros tejidos estén mas deplecionados. Paralelamente observó que existían ciertos mecanismos que intentaban contrarrestar la pérdida de folatos, como era la disminución de la excreción urinaria de folatos.

Este autor también llegó a la conclusión de que la incorporación de los folatos a los tejidos dependía de dos procesos: a) transporte a través de la membrana plasmática de las células, que estaría mediado por proteínas-ligando de folato b) retención en las células mediante la formación de folilpoliglutamatos. Ambos procesos son estudiados detenidamente en otros apartados

#### 2.2.8.2.-Efecto del alcohol:

Lane y cols.(1976) trabajando con pacientes normales y con pacientes que ingerían alcohol de forma habitual, al administrarles PteGlu o 5MTHF marcados, no observaron diferencia en las tasas de aclaramiento tisular, suministrando (a ambos lotes) dieta normal o dieta

deficiente en folatos. Tampoco encontró evidencias de que la ingesta de alcohol afectara la captación de folatos por los tejidos, ni a la proporción de PteGlu marcado almacenado. Parece en cambio que el alcohol pudiera retardar la liberación de 5MTHF de tejidos a plasma y un bloqueo parcial de esta tasa de liberación del 5MTHF de tejidos a plasma, podría ser un posible mecanismo de rápida disminución de niveles séricos de folatos en alcohólicos y de temprano desarrollo de anemia observado tras la ingesta de alcohol.

Hillman y cols. (1982) trabajando sobre el efecto que el alcohol producía en ratas con deficiencia de folato, encontraron un aumento en la tendencia a almacenar folatos en los tejidos, pues en los animales sometidos a dieta deficiente, los niveles séricos caían en un intervalo de 3 a 4 semanas, y si se les administraba alcohol la caída se producía en 48 a 72 horas.

Blocker y Thenen (1987) observaron en pacientes con dietas deficientes en folatos, que la ingesta de alcohol aumentaba la excreción renal de FiGlu, síntoma de disminución de folatos.

En un trabajo de McMartin y cols. (1989), concluyen que el alcoholismo crónico no altera la depleción tisular de folatos, en ratas con dietas adecuadas, sólo en los niveles plasmáticos parece haber un cierto efecto del alcohol.

Everman y Koblin (1992), observaron en ratas de edad avanzada, que el alcohol administrado durante 7 semanas aumentaba la excreción de FiGlu 3 veces y la de formato 2 veces, sin embargo en ratas jóvenes el etanol no aumentaba el FiGlu en orina y los niveles de folato en suero, hígado y riñón apenas se afectaron.

Collins y cols. (1992), trabajaron con ratas alimentadas durante un período prolongado, con dietas deficientes en folato y con alcohol y observaron lo siguiente: a) en ratas con dieta deficiente en folato

y con ingesta de alcohol, los valores de retención corporal y los niveles plasmáticos estaban disminuidos b) el consumo de alcohol aumentó la incorporación del folato marcado en cerebro y riñón, pero no tuvo ningún efecto en otros tejidos c) en las ratas que siguieron ingiriendo alcohol pero se le cambió la dieta por otra equilibrada, los niveles normales de folato se recuperaron en 4 semanas d) en las ratas que dejaron de ingerir alcohol pero no se les varió la dieta, no recobraron los niveles de folatos normales en 4 semanas. Estos resultados sugieren que el alcohol puede tener cierto efecto en la retención de folatos por el organismo, pero son de poca importancia cuando el organismo recibe una dieta adecuada de folatos.

Al igual que en el apartado anterior, de la circulación enterohepática, no existe un completo acuerdo sobre el efecto del alcohol en la distribución de los folatos en el organismo. Pero sea cual sea el efecto neto, una adecuada ingesta de la vitamina minimiza estos posibles efectos, incluso aunque se haya producido ya un estado de deficiencia de folatos en el organismo.



### 2.2.9.-PROTEINAS LIGANDO DE FOLATOS

Existen una serie de proteínas en el organismo, llamadas "protein-binding" o proteínas ligando, que tienen afinidad por los folatos, y cuya función aún no se ha establecido con seguridad.

Fernandes-Costa y Metz (1979) estudiaron las proteínas existentes en el SUERO, y observaron que los sitios de unión a las proteínas-ligando del 5MTHF estaban normalmente saturados, y además la capacidad de las proteínas-ligando de captar folatos representaba sólo del 5 al 10 % del folato total en suero. Estas proteínas eran de alta afinidad para los folatos. El PteGlu tenía mayor afinidad por la proteína que el 5MTHF, y esto era debido a la presencia en la proteína de sitios disponibles para el PteGlu que no servían para el 5MTHF. La proteína separada de su ligando puede adoptar distintas configuraciones dependiendo que se una a PteGlu o a 5MTHF, lo que indicaría que existe un único tipo de proteína-ligando de alta afinidad en el suero.

Más tarde Rubinoff y cols.(1981), estudiando estas proteínas, encontraron que prolongaban transitoriamente la retención de folatos en el plasma. La proteína ligando al unirse con mayor afinidad al PteGlu que al 5MTHF, facilita la captación hepática del primero, y se cree que es el mecanismo por el cual facilita la reducción de los folatos y su recuperación por la circulación enterohepática.

Steimberg en una revisión realizada en 1984, llegó a la conclusión de que dos terceras partes del folato en suero se encuentra unido a proteínas, una porción de estos folatos lo hace no específicamente, y

con baja afinidad a proteínas como albúmina y alfa-2-macroglobulina. El resto del folato conjugado se encuentra unido a proteínas-ligando de alta afinidad, que se han encontrado además en hepatocitos, células del túbulo renal, células leucémicas, placenta y eritrocitos.

Zamierowski y Wagner (1977) habían estudiado las proteínas-ligando en HÍGADO describiendo cuatro tipos de proteínas que se unían a folatos en las células hepáticas: tres en citosol y una en mitocondria. Tras la administración intraperitoneal de ácido fólico marcado, la radiactividad en el citosol del hepatocito es máxima, pero la radiactividad ligada a proteína era mínima, y se encuentra en la fracción microsomal, que contienen membrana plasmática, por lo que sugirieron que en ésta podría existir un sistema de transporte de folatos.

Da Costa y Rothenberg (1988) también estudiaron las proteínas-ligando de folato en hígado de ratas y encontraron que la proteína más abundante se encuentra asociada a membranas, pero no identificaron ninguna proteína-ligando de alta afinidad por folato en el citosol. Las proteínas que se encontraban unidas al folato en el citosol eran enzimas como la glicin-N-metiltransferasa, las proteínas de la mitocondria también eran enzimas. Las proteínas de alta afinidad por folato del hígado de rata eran semejantes a las encontradas en otros tejidos, como el epitelio del intestino, el riñón, placenta y cultivos celulares, y presentan mayor afinidad por los folatos oxidados que por los reducidos. La localización de estas proteínas-ligando en la membrana sugiere que su función sea la de transporte de folatos, aunque también podrían tener cierto papel en la biosíntesis de los folilpoliglutamatos.

Hjelle y cols. (1991) encontraron gran cantidad de proteínas-ligando en la membrana de borde en cepillo de la CORTEZA RENAL. La afinidad de estas proteínas por los distintos folatos está relacionada directamente con la capacidad de transportarlos, y la unión a los folatos es 100 veces más rápida, que el tránsito a través de la membrana de los folatos. Se ha sugerido que el mecanismo de transporte de estos

folatos es por vía endocítica; las proteínas-ligando se localizan en la membrana de borde en cepillo, pero no en la membrana basolateral y se han encontrado proteínas-ligando en estructuras endocíticas como invaginaciones, vacuolas y en túbulos densos apicales de las células del túbulo proximal. El transporte de folatos en el túbulo renal es saturable y capaz de regeneración, lo que está de acuerdo con un modelo en el que las proteínas-ligando reciclan entre la membrana de borde en cepillo y las vacuolas endocíticas, y a través de los túbulos vuelve a la membrana. En las vacuolas endocíticas el folato se disocia de las proteínas, posiblemente debido al bajo pH existente, después de la disociación el folato pasa a través de la membrana basolateral a la sangre, y la proteína-ligando regresa a la membrana luminal de borde en cepillo.

Holm y cols.(1992), llegaron a conclusiones parecidas a las anteriores, así estudiando el riñón en rata y conejo, observaron que la mitad de las proteínas-ligando se encuentran asociadas a la membrana de borde en cepillo, y el resto localizadas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. En orina también aparecían algunas proteínas-ligando con características de alta afinidad por folatos. Estos autores señalan que las proteínas-ligando de la orina proceden de la membrana de borde en cepillo, y aparecen en cantidades crecientes en estados patológicos acompañados de daño tisular renal.

En CULTIVOS CELULARES se han estudiado estas proteínas-ligando de folato.

Antony y cols.(1985) estudiaron estas proteínas en células KB (células de carcinoma epidermoide) y comprobaron que las proteínas-ligando de estas células estaban relacionadas con las encontradas en placenta y leche. Las células KB captan 5MIHF por un sistema de transporte que es dependiente de la temperatura y de la concentración, y está relacionado con las proteínas-ligando. Las proteínas-ligando de estas células están orientadas en gran proporción hacia el exterior.

Sadasivan y cols. (1986) estudiando células leucémicas, encontraron dos tipos diferentes de proteínas ligando de folato, y ambas tienen mayor afinidad por los folatos oxidados que por los reducidos y metotrexato. Una fue aislada de la fracción no soluble de la célula y la otra, aislada de la fracción soluble, tenía composición aminoacídica similar a las proteínas-ligando de la leche y la placenta.

Kamen y Capdevilla (1986) estudiando células MA104 (células procedentes del epitelio del riñón de mono) comprobaron que en estas células existía una afinidad que las hacía capaz de unirse a PteGlu, 5MTHF y metotrexato; la unión a 5MTHF estaba regulada por las concentraciones celulares de este folato. Usando concentraciones nanomolares de folato, observaron que la célula introduce una cantidad de folatos 3 a 4 veces mayor que la que puede unirse a las proteínas-ligando de la cara externa de la membrana, lo que implica que el transportador recicla. El camino seguido para introducir los folatos en la célula parece ser: 1° unión del folato al receptor de la superficie 2° introducción a la célula mediante endocitocis y 3° liberación en el endosoma ácido. Algunas de estas células fueron saturadas de folatos, y la km de transporte medida entonces fue aproximadamente de 1  $\mu\text{M}$ , lo que está dentro del rango de concentraciones de folatos del transportador dependiente de pH, y en esas condiciones disminuye la síntesis de proteínas-ligando de membrana.

En 1988, Kamen y cols., estudiando también las células MA104 de mono, concluyeron que las proteínas-ligando de membrana son posibles candidatos como receptores que medien el transporte de folato dentro de la célula a concentraciones fisiológicas. Sugieren que la membrana contiene dos poblaciones de receptores: el 50 % expuestas al espacio extracelular y el otro 50 % al interior de la célula, pudiendo intercambiarse. El PteGlu o 5MTHF pueden unirse a la población externa, entonces el complejo formado se mueve dentro de la célula en un compartimento vesicular, de pH ácido, libera el folato y la proteína regresa al exterior de la célula. La relación entre la introducción de

folatos a la célula mediada por proteínas-ligando, y la introducción mediada por el intercambiador de iones OH está por clarificar, aunque ambos pueden darse al mismo tiempo.

Henderson y cols. (1988) estudiando una sublínea de células L1210 leucémicas, observaron que crecían con requerimientos de folatos 200 veces menores que las células progenitoras, esta mayor eficacia ocurría paralelamente con un aumento en 10 veces de la producción de proteínas-ligando de alta afinidad. La afinidad de la proteína-ligando por el PteGlu fue mayor que por 5MTHF. En este estudio Henderson comprueba que las células progenitoras transportan folato sólo mediante el mecanismo de intercambio de aniones que se inhibe por metotrexato, y las células adaptadas a bajas concentraciones de folatos tienen dos sistemas, el anterior y otro mediado por proteínas-ligando que no se inhibe por metotrexato. Por todo ello sugiere un posible mecanismo de aumento de la síntesis o de disminución de la degradación de las proteínas-ligando de la membrana celular como respuesta a una disminución de la concentración extracelular de folatos.

Henderson publicó en 1990 una revisión sobre las proteínas a las que se podían unir los folatos, concluyendo que estas proteínas se pueden clasificar en tres grupos:

1.-Proteínas-ligando de alta afinidad: son las que se encuentran en mayor proporción, se unen con mayor preferencia a PteGlu que a 5MTHF, la  $K_m$  es del orden nanomolar y el metotrexato apenas compite. Se dividen en proteínas de membrana (mFBP) y proteínas solubles (sFBP).

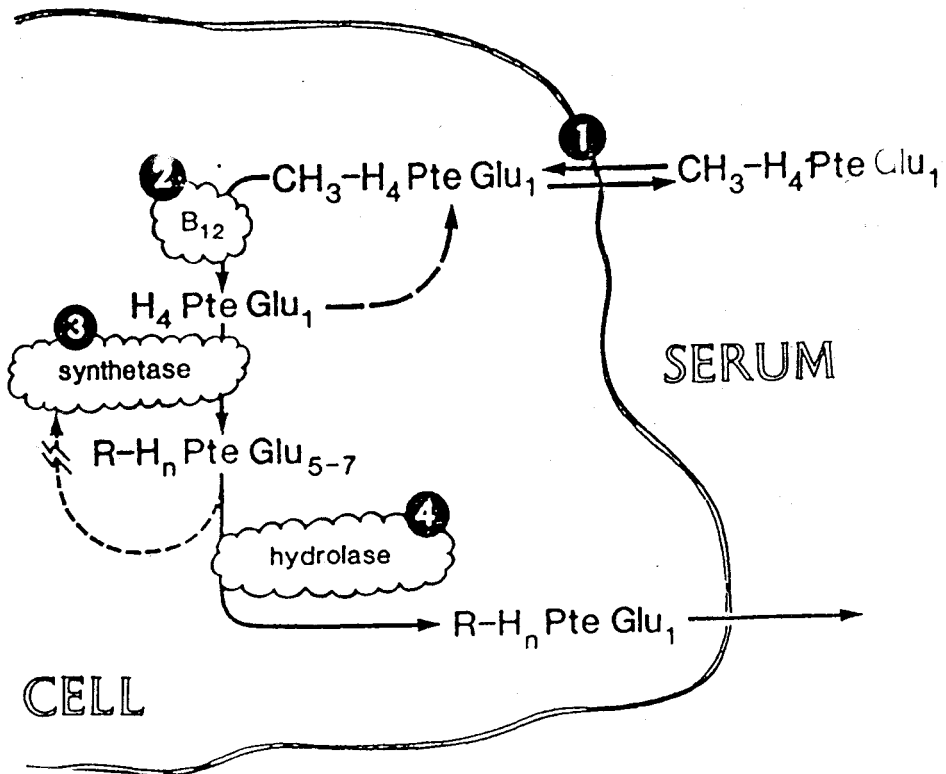
Las mFBP se han encontrado en placenta, túbulo proximal renal, plexo coroideo, intestino delgado e hígado. Las sFBP se han encontrado en suero, leche y suero del cordón umbilical y presentan mayor afinidad por los folatos a pH 7,4 que a pH ácido. Ambos tipos de FBP están estructural e inmunológicamente relacionadas.

Las células del epitelio mamario producen mFBP que pasan a sFBP. Estas sFBP de la leche tienen como función concentrar folatos en la leche y proteger de la oxidación a los folatos (principalmente en forma de 5MTHF); esta unión FBP-folato resiste la acción gastrointestinal.

Las sFBP del suero posiblemente sirvan para aclarar el PteGlu y otros folatos oxidados del suero.

2.-Proteínas que se unen a folato, asociadas a membrana: no están relacionadas con las FBP ni estructural ni inmunológicamente. Tienen la función de transporte a través de membranas. La  $K_m$  es del orden micromolar y se unen preferentemente a folatos reducidos.

3.-Proteínas que se unen a folatos citoplasmáticos: poseen alta afinidad por los folatos reducidos y son fundamentalmente enzimas.



**ESQUEMA 6: REGULACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE POLIGLUTAMATOS:**

- 1) Control del transporte de monoglutamatos a través de la membrana celular
- 2) Provisión de un sustrato adecuado para la poliglutamil-sintetasa por la conversión (dependiente de vitamina B12) de 5-metilTHF en THF
- 3) Actividad poliglutamil sintetasa, sujeta a retroalimentación por los folilpoliglutamatos
- 4) Actividad folilpoliglutamato hidrolasa (Steinberg, 1984)

#### 2.2.10.-ALMACENAMIENTO TISULAR DE FOLATOS

La prolongación de la cadena de glutamatos de los folatos dando lugar a los folilpoliglutamatos (FPG) permite la retención de estos folatos en la célula, ya que en esta forma no pueden atravesar las membranas celulares. Además la cadena de poliglutamatos también tiene cierto efecto en el metabolismo de moléculas monocarbonadas dependiente de folato.

Steimberg en 1984 realizó una revisión sobre la homeostasis del folato y recopiló trabajos sobre los folilpoliglutamatos, concluyendo que el mecanismo más importante para mantener el suplemento de folato necesario, para los tejidos que lo necesiten en situaciones críticas, parece ser la utilización de los folatos procedentes de otros tejidos que actuarían como almacenes de folatos. La cantidad de folatos en tejidos podría regularse por la captación de folatos a través de las membranas (por las proteínas-ligando) y por la formación de folilpoliglutamatos. Parece ser que las células tienen una capacidad limitada de captación de folatos y la inhibición de la folilpoliglutamato (FPG) sintetasa por exceso de producto es el mecanismo que regula la formación de folilpoliglutamatos en la célula (ESQUEMA 6).

Mientras este grado de inhibición por producto, parece ser similar en una variedad de líneas celulares, las variaciones entre tejidos del contenido en folatos parece depender de las diferencias en una razón fija de intercambio (turnover). Los tejidos de intercambio rápido son: hígado y riñón, y un tejido de intercambio lento sería los eritrocitos.



Aunque la razón de intercambio sea fija, puede cambiar en determinadas situaciones: embarazo, alteraciones patológicas como el cáncer, o el abuso del alcohol.

Se ha determinado la proporción de folilpoliglutamatos en algunos tejidos. Así Whitehead y cols. (1968) cifraron en un 85 % la proporción de folatos en forma de FPG en el hígado humano. Cichowicz y Shane (1987) dieron un valor general de un 95 % de la proporción de folilpoliglutamatos en las células.

McGuire y Bertino (1981) estudiaron los folilpoliglutamatos en células de mamíferos y comprobaron que se encontraban predominantemente en forma de pentaglutamatos. Ellos concluyeron que los FPG no sólo cumplen una función de almacenamiento de folatos, sino que además son los sustratos preferidos por las enzimas del metabolismo de unidades de carbono. Además comprobaron que bajas concentraciones de folatos extracelulares alargaban la cadena de poliglutamatos y altas concentraciones de folatos la acortaban. Estos investigadores estudiaron la enzima FPG sintetasa, y determinaron un pH óptimo de ésta de 8,2 a 8,6 y una temperatura óptima de 37 a 41,5 °C; tiene una amplia especificidad para los distintos folatos, siendo el orden de reactividad de éstos: DHF > THF; 5FTHF >>> PteGlu; además establecieron que la FPG sintetasa no era estereoespecífica para el THF, 5FTHF y 10FTHF, teniendo los dos diastereoisómeros de cada compuesto aproximadamente la misma afinidad por el enzima.

Foo y Shane (1982) concluyeron que las diferencias en la distribución de folilpoliglutamatos bajo distintas condiciones nutricionales son el resultado de modificaciones en las distintas moléculas de folato que intervienen en el metabolismo de 1 C, ya que poseen distinta afinidad por la FPG sintetasa. Esas diferencias en la distribución son por tanto una consecuencia de la regulación del metabolismo de moléculas monocarbonadas (1 C), realizado por los enzimas pertinentes. De forma inversa, los cambios en la longitud de la cadena

de poliglutamatos puede afectar significativamente el flujo de los folatos a través de alguno de los ciclos del metabolismo de 1 C y juegan un papel importante en la regulación de este metabolismo. Por tanto, se produce una regulación recíproca entre los distintos folilpoliglutamatos y los distintos congéneres de folato.

Weir y cols. (1985) realizan una revisión sobre el metabolismo del folato llegando a las siguientes conclusiones sobre los folilpoliglutamatos:

- a) no atraviesan la membrana plasmática y por ello son retenidos en las células
- b) son más efectivos que los monoglutamatos en el metabolismo de moléculas monocarbonadas
- c) son acompañadas por enzimas multifactoriales
- d) inhiben enzimas que no participan en el metabolismo de moléculas monocarbonadas

Doig y cols. (1985) trabajando con hígado de ratón llegaron a conclusiones parecidas: los folatos intracelulares están prácticamente en su totalidad en forma de folilpoliglutamatos, lo que altera la reactividad de los cofactores dependientes de folato. Otros autores también habían encontrado que el flujo del folato a través de la reacción de la síntesis de timidina, aumentaba cuando el folilhexaglutamato cambiaba a penta o heptaglutamato.

Cook y cols. (1987) comprobaron que la retención de folatos en la célula requiere su conversión en derivados con cadena larga de glutamatos. Así observaron que los folilmono y diglutamatos eran liberados por la células rápidamente, mientras que los foliltriglutamatos apenas se pierden y los de cadena de cuatro glutamatos prácticamente nada. También estudiaron a fondo esta relación entre folatos y glutamatos y llegaron a la conclusión de que el factor que determina la forma de folilpoliglutamato predominante en la célula es la especificidad del sustrato (folato) por la enzima FPG sintetasa.

Al parecer sólo pequeños niveles de la FPG sintetasa eran requeridos para retener los folatos en los tejidos, pero son necesarios niveles superiores del enzima para generar los derivados de cadena más larga de glutamatos. Los folatos de cadena corta y media (de glutamatos) compiten con los de cadena larga por la FPG sintetasa, por lo que el aumento de folatos recién incorporados en la célula puede disminuir la cantidad de folatos con cadena larga de glutamatos. Cook y su grupo observaron en las células hepáticas, que en las mismas condiciones, el THF forma penta y hexaglutamatos, el DHF tetra y pentaglutamatos, el 10FTHF forma tri y tetraglutamatos y el 5MTHF diglutamatos. Esto sugiere que la retención de folatos por los tejidos podría regularse por factores que afectaran la proporción de folatos en forma de THF. Un incremento en la proporción de DHF y 10-formilTHF también tendría un efecto significativo en la acumulación de folatos ya que el 10-formilTHF parece ser un importante sustrato para la FPG sintetasa, aunque el THF tenga mayor facilidad para formar derivados de cadena larga. También observaron que en condiciones fisiológicas, la interconversión entre las diferentes formas de folatos ocurre a mayor velocidad que la adición de glutamatos a los folatos. Además sugirieron un importante papel de la concentración de glutamatos en la célula en los niveles de folilpoliglutamatos, ya que observaron que la concentración de glutamatos en el hígado y otros tejidos era semejante a la  $K_m$  del glutamato (en la reacción de la FPG sintetasa).

Cichowicz y Shane en 1987 estudiaron detalladamente la cinética de las reacciones de la FPG sintetasa con los distintos folatos y ordenaron éstos según la rapidez para reaccionar con los glutamatos obteniendo un orden semejante al obtenido por McGuire, pero no coincide con el orden establecido por Cook según la capacidad para incorporar cadenas largas de glutamatos. Según Cichowicz, la reacción catalizada por la FPG sintetasa precisaba la presencia de Mg y ATP. La rapidez de la reacción de incorporación de glutamatos al folato disminuye a medida que aumenta la cadena de folatos incorporados, debido a una inhibición por producto. Los folatos de cadena larga compiten con los folilmonoglutamatos por la enzima, y consecuentemente actúan regulando

la cantidad de folatos almacenados como folilpoliglutamatos.

La hidrólisis o ruptura de la cadena de poliglutamatos fue estudiada por Priest y cols. (1982) en varios tejidos de ratón y llegaron a las siguientes conclusiones: a) la FPG hidrolasa tiene un origen lisosomal b) la limitación en la longitud de la cadena de glutamatos puede adscribirse a la especificidad de la FPG sintetasa, ya que la FPG hidrolasa pasa los FPG directamente a folilmonoglutamatos, sin intermediarios de cadenas medias. Un bajo nivel de FPG hidrolasa ayuda en el atrapamiento de folatos en tejidos con gran requerimiento de síntesis de ADN: así en músculo, donde las concentraciones de folatos son bajas, la actividad FPG hidrolasa es mínima; el cerebro tiene una actividad FPG hidrolasa mínima también; el riñón posee gran actividad FPG hidrolasa para remover los folatos y los glutamatos innecesarios; en hígado la FPG hidrolasa tiene también una actividad hidrolasa importante.

También se ha estudiado el efecto de la composición de la dieta en la formación de poliglutamatos. Así Ward y Nixon (1990) realizaron una serie de experimentos aumentando o disminuyendo drásticamente los folatos de la dieta suministrada a varios lotes de ratas y obtuvieron los siguientes resultados: a) dietas con exceso de folato (150 veces mayor de lo normal) producen un aumento de las reservas de folato en todos los tejidos, hasta un valor del 122 % b) dietas pobres en folato (1000 veces menor a lo normal) dan lugar a un contenido de folatos en tejidos del 77 % del normal. La excreción urinaria de folatos disminuye cuando se administran dietas pobres en folato, lo que ayuda en parte a restablecer el equilibrio. Las mayores concentraciones de folatos las encontraron en hígado y médula ósea, y probablemente por su mayor utilización, son los órganos que más acusan el efecto de la restricción dietética de folatos. Cuando se administran dietas deficientes en folatos, aumenta la longitud de la cadena de poliglutamatos de aquellos; y cuando se administran dietas enriquecidas en folatos aumentan los folilpoliglutamatos de cadena corta, pero disminuyen los

folilpoliglutamatos de cadena larga.

Valera y Selhub (1992) realizaron un experimento similar al anterior, pero las ratas fueron sometidas a dieta deficiente de folato por un período aún más prolongado (25 semanas). Ellos observaron que el hígado, riñón y bazo de las ratas sometidas a dieta deficiente, tenían un contenido en folatos del 60 % con respecto a las ratas sometidas a dieta suplementada con folato. La diferencia que encontraron con respecto al trabajo anteriormente nombrado es que la elongación de la cadena de glutamatos de folato era mayor a la encontrada por Ward, llegando a detectar cadenas de hasta 8 residuos de glutamatos.

### 2.2.11.-EXCRECIÓN URINARIA

La excreción urinaria es importante en el mantenimiento de los niveles tisulares y plasmáticos de folatos en el organismo, ya que un exceso de pérdidas en orina puede contribuir a la aparición de un estado carencial de folatos.

En el riñón los folatos sufren los tres procesos renales: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción. Williams y Huang (1982) comprobaron que la porción para-aminobenzoato glutámico era necesaria para su secreción y la porción pteridina para la reabsorción tubular.

Bhandari y Gregory (1988) estudiaron de forma detallada los procesos que sufre el folato en el riñón, desarrollando un modelo sobre los mecanismos que intervienen en la excreción de folato y sugiere que el folato una vez filtrado de forma pasiva, es reabsorbido mediante transporte activo, demostrando: a) que el transporte de PteGlu está de acuerdo con un sistema saturable b) que la unión a membrana y el transporte tienen características similares de pH óptimo (aproximadamente 5,5) y dependencia de la concentración y c) la unión del folato a membrana y el transporte son saturables con una  $K_m$  aproximada de  $1 \mu M$ , estos valores se corresponden con los valores de folatos en suero y en el filtrado glomerular; entonces establecieron que el componente de unión a membrana podía estar asociado funcionalmente al transporte. Una posible explicación de que el pH óptimo sea ácido es que esté mediado por un intercambio folato/ $OH^-$ , aunque por las investigaciones realizadas acerca de las proteínas-ligando en el riñón

parece que son éstas las responsables del transporte activo, y por otro mecanismo distinto (véase proteínas-ligando).

Eisenga y cols. (1989b) observaron en los análisis de orina, que el principal folato era el 5MTHF. El folato es filtrado y reabsorbido y cuando se alcanzan concentraciones elevadas en suero, existe secreción. Ellos comprobaron que el aclaramiento renal de folatos es inversamente proporcional a la afinidad de las proteínas ligando del túbulo renal por las distintas moléculas de folato.

Este mismo grupo (Eisenga y cols, 1989a) trabajando con ratas encontró que la forma mayoritaria de folato endógeno en el riñón es el 5MTHF (> 70 %), en cambio al administrar  $^3\text{H}$ -5MTHF por infusión intravenosa, los folatos marcados que aparecen en mayor proporción son el 5-formiminoTHF, el 5-formilTHF y el 10-formilTHF, y en menor proporción el 5MTHF; además casi un 50 % del isótopo hallado en riñón no eran moléculas de folato, lo que sugiere que el 5MTHF es en su mayor parte reabsorbido en el túbulo renal y metabolizado a otros compuestos. Esta presencia selectiva de determinados folatos en la orina, parece debida a la mayor afinidad de las proteínas de la membrana de borde en cepillo por el 5MTHF. El 5-formiminoTHF, que se encuentra en la orina no se encuentra en el plasma, y posiblemente se forme por el mismo mecanismo que se forman los metabolitos marcados encontrados en la orina. El THF participa en la ruptura de la histidina, removiendo el grupo formimino del formiminoglutámico (FiGlu) dando lugar al 5-formiminoTHF, la enzima que cataliza esta reacción, la formiminotransferasa ha sido identificada en el riñón de rata, y la disminución de la actividad de esta enzima en estados carenciales de folato, produce un aumento de aparición de FiGlu en orina. Eisenga y cols. cuantificaron la diferencia en el comportamiento de los distintos folatos en el riñón, mediante el cálculo de la fracción de excreción (o cantidad de sustancia excretada del total de cantidad filtrada). Así con el 5MTHF obtiene un valor de 0,05, luego la mayoría se reabsorbe; en cambio otros compuestos como el 5-formil y el 10-formilTHF tienen una

fracción mayor de 1, luego no sólo se reabsorben en poca proporción, sino que además debe existir un proceso de secreción.

Muldoon y cols. (1992) también estudiaron los procesos que sufren los folatos en el riñón. Ellos establecieron dos mecanismos por los que los folatos del filtrado glomerular eran reabsorbidos en el túbulo renal: a) un mecanismo no saturable, que sugiere un proceso de difusión pasiva b) otro mecanismo saturable, mediado por proteínas-ligando. Estos autores trabajando con riñón de rata perfundido con (<sup>3</sup>H) 5MTHF encontraron también metabolitos marcados que no eran moléculas de folato, y además encontraron las mismas moléculas que Eisenga y cols.: formilTHF, 5-formiminoTHF y THF.

Varios investigadores han estudiado la cinética de la excreción de folatos, tras la administración de folatos marcados: a) Krimdeck y cols. (1978) establecieron una fase rápida de 31,5 días y otra lenta de 100 días, en la excreción renal de folatos b) Tamura y Halsted (1983) encontraron una fase rápida de 1,8 días y otra lenta de 119 días c) Van der Porten y cols. (1992), una rápida de 1 día y otra lenta de 18,7 días d) Bhandari y Gregory (1992) una lenta de 13 a 16 días. De todos estos datos se extrae que existe acuerdo en que la fase rápida de la excreción renal de folatos dura aproximadamente un día, pero por otra parte no existe acuerdo sobre la duración de la fase lenta.

Eisenga y cols. (1992) administraron ácido fólico marcado vía intravenosa a ratas con restricción de folatos en la dieta, y obtuvieron los siguientes resultados: en las ratas controles aparecía un 15,5 % de la dosis de folato marcado en orina, y en ratas con dieta restringida un 12 % de la dosis, luego parece que existe una mayor retención corporal de folatos en estados carenciales. Con respecto a las distintas moléculas de folato que aparecen en orina, en las ratas con dieta restringida se produce un aumento en la proporción de PteGlu, THF, 5-formil y 10-formilTHF, y una disminución en 5MTHF y 5-formiminoTHF.



#### 2.2.11.a.-Efecto del alcohol:

Romero y cols.(1981) trabajando con monos sometidos a ingesta crónica de alcohol, observaron un aumento de la excreción de folatos endógenos con respecto a los controles, y al administrar a ambos lotes ácido fólico radiactivo también observaron un aumento en la radiactividad aparecida en orina, en el grupo expuesto al alcohol.

Weir y cols. en 1985 realizan una revisión sobre los folatos encontrando que la ingesta de alcohol, en general, aumenta la excreción urinaria de folatos, y al parecer era responsable de una disminución de los niveles séricos, concluyendo entonces que el aumento en la excreción de folatos era un importante factor causante de la deficiencia de folatos observada en sujetos alcohólicos crónicos.

McMartin y cols.(1986a) recogen en su trabajo observaciones que indicaban que la ingestión aguda de alcohol en ratas, la ingestión de forma subaguda en hombre y la ingesta crónica en monos producían un incremento de la excreción urinaria de folatos, en grado suficiente como para producir una disminución en los niveles plasmáticos de folatos. McMartin y cols. dedujeron de sus observaciones que el incremento de la excreción urinaria de folatos provocada por el alcohol, en ratas bien nutridas y sometidas a ayuno, se debía a dos factores: a) aumento en el volumen de orina a las 2 a 4 horas de la exposición al alcohol y b) aumento de la concentración urinaria de folatos a las 8 a 12 horas. Observaron que en ratas sometidas a ayuno, los folatos urinarios aumentaban unas 6 veces con el alcohol, y las ratas bien nutridas aumentaban en 2 a 3 veces; esta diferencia podría deberse a dos efectos: los niveles de folato en orina de las ratas bien nutridas son mayores y entonces la diferencia relativa sería menor, y por otra parte las ratas bien nutridas tienen niveles de alcohol en orina menores, por lo que el efecto sería menor.

Este grupo de investigadores, en cambio, no encontraron fenómenos

de adaptación en el efecto del alcohol. La pérdida de folatos en orina provocada por el alcohol fue de 18 nmoles en 4 días, y estaba relacionada con una disminución en los niveles plasmáticos, lo que puede tener gran importancia fisiológica, ya que los folatos almacenados en hígado son del orden de 250 a 600 nmoles. Por tanto, se establece que el exceso de excreción urinaria de folatos es el efecto principal del alcohol en la homeostasis del folato en el organismo. El mecanismo de este efecto podría estar en una disminución de la proporción de folatos unidos a proteínas del plasma, como se ha visto en pacientes cirróticos (Colman y Herbert, 1976). El alcohol altera la estructuras de membrana, y podría alterar la unión de los folatos a las proteínas-ligando, responsable al parecer de la reabsorción tubular de folatos, siendo este efecto proporcional a los niveles plasmáticos del alcohol (McMartin y cols, 1986).

McMartin y otro grupo en ese mismo año (1986b), comprobaron que el incremento de la excreción urinaria de folatos en ratas, es proporcional a la dosis de etanol administrada, y que los escasos efectos del alcohol observados en el hombre se deben a la utilización de dosis pequeñas, del orden de 1g/kg. En sujetos humanos sometidos a ingesta de alcohol, observa que en las primeras horas, la concentración de folatos en orina disminuye como consecuencia del aumento de la diuresis provocada por el alcohol, que diluye los folatos. Después de 8 horas, los niveles urinarios de folatos comienzan a aumentar, pero no existe un aumento relativo de folatos, de forma significativa, con respecto al volumen total de orina excretada, ni tampoco con respecto al aclaramiento de creatinina.

Blocker y Thenen (1987) trabajando con monos observaron un efecto contrario del alcohol: la dieta pobre en folatos y el alcohol producían una reducción en la excreción de folatos en orina. Aunque también se producía un aumento de la excreción fecal y un aumento de la retención tisular de los folatos que podrían explicar los menores niveles de folato en orina.

Eisenga y cols.(1988) trabajando con ratas, al someterlas a exposición aguda de alcohol, observaron un aumento significativo en la excreción urinaria de 5MTHF endógeno, en cambio apenas se alteró la excreción de los folatos mayoritarios en orina, 5-formiminoTHF y 5/10-formilTHF; estos resultados pueden explicarse por la diferencia de afinidades de las proteínas-ligando por los folatos; así el 5MTHF que es el principal folato reabsorbido por las proteínas-ligando es el que más acusa el efecto del alcohol. El alcohol podría alterar la reabsorción tubular de folatos por varios mecanismos: inhibición competitiva de la unión de la proteína-ligando al folato, cambiando la configuración de la membrana y como consecuencia su afinidad por los folatos, o provocando un trastorno en la estructura de la membrana. En estas mismas ratas, al administrar PteGlu marcado, observaron un aumento no significativo de la excreción de 5MTHF radiactivo, en cambio la excreción de 5-formimino y formilTHF marcados no fue alterada por el alcohol. La ausencia de efecto del alcohol en la excreción de 5MTHF marcado, parece deberse al metabolismo que sufre en el riñón antes de su secreción al lumen del túbulo renal, ya que la mayoría de los compuestos radiactivos detectados en orina no son moléculas de folato.

McMartin y cols.(1989) observaron que la ingestión crónica de etanol aumentaba la excreción urinaria de folatos en ratas con ingesta apropiada de folatos, pero no en ratas con dietas deficitarias en folatos. El aumento de las pérdidas de folatos en orina no puede llegar a establecer una deplección tisular de folatos, ya que el incremento es pequeño comparado con los folatos disponibles en la dieta. En ratas con dietas pobres en folatos, en las que se produce una disminución de la excreción urinaria de folatos, al administrar alcohol de forma crónica, que produce el efecto contrario, el resultado de la conjunción de ambos factores es prácticamente nulo.

McMartin y cols.(1990) concluyeron que el aumento de la excreción de folatos provocada por el alcohol es la principal causa de pérdidas de folatos corporales, en sujetos alcohólicos crónicos. Este grupo

sugiere que el principal efecto del alcohol se produce en el metabolismo renal de los folatos.

## 2.2.12.-CLASIFICACIÓN DE LOS DÉFICIT DE ÁCIDO FÓLICO

### 2.2.12.a.-Ingesta inadecuada de folatos.

La mayoría de estos casos tienen una causa subyacente y factores predisponentes como la edad avanzada, la pobreza, el alcoholismo, trastornos psiquiátricos, etc... que impiden una alimentación adecuada. En la actualidad se estima que aproximadamente un 20 % de los ancianos presentan una carencia de folatos y en los ancianos hospitalizados la proporción aumenta hasta el 40 % (Boles y cols, 1982).

Debido a la relativa pobreza de las reservas de folatos, el déficit de folatos aparece rápidamente en individuos con dieta inadecuada. Esto ocurre sobre todo en niveles bajos de la sociedad e incluye los clásicos casos de personas que viven solas y no se preocupan de la alimentación, alcohólicos crónicos, etc...También suelen darse casos en niños que no toman suficientes verduras, que consumen leches sintéticas por padecer enfermedades metabólicas congénitas, o con dieta exclusiva de leche en polvo.

Además los folatos son termolábiles, por lo que la ebullición prolongada de los alimentos, la esterilización, la congelación y la liofilización reducen considerablemente su contenido en folatos.

### 2.2.12.b.-Absorción inadecuada de folatos

La administración oral de determinados fármacos o determinadas

enfermedades como el esprue tropical pueden producir una deficiencia de folatos en el organismo, por un trastorno en la absorción. Además existen otros muchos factores que pueden alterar la absorción intestinal de los folatos, como alteraciones del pH intestinal, etc...

#### **2.2.12.c.-Utilización inadecuada de folatos**

Es bastante rara, pero se puede dar en determinados casos. Los antagonistas del ácido fólico, como el metotrexato, bloquean el metabolismo del ácido fólico, por lo que se emplean en el tratamiento de algunas neoplasias malignas. Además de inhibir el crecimiento del tumor, producen también una eritropoyesis megaloblástica.

Algunos anticonvulsivantes, como la difenilhidantoína, o la pirimetamina (que se emplea también en el tratamiento del paludismo) tienen efectos antifólicos.

#### **2.2.12.d.-Aumento de la demanda de folatos**

##### **d.1.-Anemias hemolíticas**

El aumento en el recambio de las células que ocurre en una neoplasia o en la hematopoyesis muy estimulada que ocurre en las anemias hemolíticas, puede originar a veces una eritropoyesis megaloblástica. Esto se basa en un aumento de la demanda y en un suministro marginal de folatos.

##### **d.2.-Infancia**

En la infancia debido a su alta razón de crecimiento y por tanto de síntesis de ADN, puede producirse una deficiencia de folato, sobre todo en niños con poco peso, con períodos cortos de lactación o infecciones frecuentes (Olivares y cols, 1986). También ocurre en niños con malnutrición proteica, que durante su rehabilitación aceleran su

tasa de crecimiento, por lo que aumentan los requerimientos de folatos.

### d.3.-Embarazo

Es una de las causas más frecuentes de estados carenciales de folatos y afecta a un 50 a 75 % de mujeres a término (Landon y Oxley, 1971). En el embarazo existe un incremento considerable de la multiplicación celular tanto por el hecho del crecimiento fetal como por el aumento de la eritropoyesis materna (Tchernia y cols, 1982).

Por otra parte, se estima que el desplazamiento de la madre al feto multiplica las necesidades por 6 y agota las reservas en 2 a 3 meses. Numerosos estudios han mostrado que los niveles eritrocíticos y plasmáticos en la sangre del cordón umbilical son casi siempre superiores a los maternos, lo que demuestra que el paso de folatos a través de la placenta es un mecanismo de transporte activo. En este caso el feto se comporta 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. Sin embargo, este papel de protección no excluye el riesgo de malformaciones fetales en caso de carencia grave (Botezy cols, 1978)

Conjuntamente con esta causa fundamental, pueden invocarse otros factores como la disminución del aporte alimentario debido a los vómitos gravídicos, o el aumento en la eliminación urinaria (Landon y Hytten, 1991).

Por todo lo expuesto anteriormente, es frecuente en los hospitales maternos se les administra ácido fólico por vía oral a las embarazadas.

### 2.2.13.-PATOLOGÍA: ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

El trastorno más frecuente que se produce como consecuencia de una deficiencia de ácido fólico es la anemia megaloblástica.

Herbert en 1962 sometió a individuos voluntarios a una dieta deficiente en folatos durante un tiempo prolongado, y observó que aparecían los siguientes signos clínicos:

a) Aumento en el número de lóbulos de los leucocitos polimorfonucleares. La hipersegmentación aparece a las siete semanas de restricción de folatos de la dieta

b) Macroovalocitosis que aparece a partir de las 18 semanas

c) La médula no es claramente megaloblástica hasta las 19 semanas de restricción dietética, y se vuelve normoblástica a las 48 horas de terapia con ácido fólico

d) La anemia no aparece hasta los cuatro meses y medio y a partir de ese momento progresa rápidamente

e) No aparecen leucopenia ni trombocitopenia

f) Los aspirados gástricos son normales

g) Los test de malabsorción no reflejan anomalías

h) La biopsia yeyunal a las 17 semanas y media fue normal

Los niveles séricos se encuentran por debajo de 3 ng/ml a las 3 semanas de restricción dietética. Los niveles de vitamina B<sub>12</sub> permanecen constantes. El aumento en la excreción urinaria de FiGlu aparece a las 14 semanas. Los folatos eritrocitarios bajan a niveles por debajo de los fisiológicos, a los 120 días y esto se debe a la vida media de los eritrocitos formados antes de comenzar el experimento. A las 24 horas



de la administración de ácido fólico, el número de reticulocitos aumenta y alcanza un máximo a las 72 horas.

Eichner y cols. (1971) observaron que la disminución de los niveles séricos de folatos en el hombre se producía en dos etapas sucesivas:

a) una etapa rápida de 7 a 10 días, en la que los niveles séricos disminuyen en un 50 % del nivel basal, y en la que los folatos hepáticos no parecen estar apreciablemente deplecionados y

b) una segunda etapa más gradual, que ocurre entre los 10 y 30 días, y que parece reflejar la liberación de los folatos tisulares; una vez que los niveles séricos alcanzan unos valores de 1 a 1,5 ng/ml no bajan de este nivel, pero en cambio sigue la depleción tisular de folatos, y los eritrocitos van siendo sustituidos por eritrocitos pobres en folatos.

En esta segunda etapa aparecen las anomalías en la médula ósea. La megaloblastosis aparece en 5 a 10 semanas, mientras que en el trabajo de Herbert no aparece hasta las 10 semanas, y esto parece debido al estado en que se encuentran las reservas tisulares de folato antes del comienzo del experimento. Los cambios hematológicos observados son los siguientes: defectos nucleares en los últimos eritrocitos normoblásticos, aparición de múltiples cuerpos de Howell-Jolly y un progresivo cambio de la serie eritrocítica hacia formas más grandes y jóvenes. También aparición de leucocitos polimorfonucleares hipersegmentados.

#### 2.2.13.a.-Efecto del alcohol

Eichner y Hillman en 1971 estudian el desarrollo de la anemia en pacientes alcohólicos con dieta inadecuada. Encuentran que más del 75 % de pacientes ingresados en hospital con complicaciones de alcoholismo crónico presentaban alguna anomalía en la eritropoyesis, y esta anomalía era en un 40 % de los casos anemia megaloblástica debida a deficiencia de folatos. La evolución de la anemia en los pacientes

alcohólicos crónicos fue la siguiente:

a) Balance vitamínico negativo: esta primera etapa aparece pronto después de que el paciente disminuye la ingesta de alimentos y empieza una ingestión regular de alcohol. Se produce una caída de niveles séricos de folatos hasta por debajo de 3 ng/ml y la única anomalía medular observada son eritroblastos vacuolados, pero sin evidencia de megaloblastosis.

b) Conversión megaloblástica y producción inefectiva: puede ocurrir en menos de 3 semanas, por tanto considerablemente antes que en pacientes sometidos a dieta restringida de folatos, pero sin ingesta de alcohol; todavía es posible ver pacientes con características hematocriticas dentro de la normalidad

c) Conversión sideroblástica

d) Recuperación temprana cuando se abandona el alcohol, o la ingesta de folatos se normaliza; las anomalías medulares revierten rápidamente por una hiperplasia eritroidea no megaloblástica

e) Recuperación tardía: aproximadamente a los 10 días de abandono del alcohol o de dieta adecuada; la mayoría de los pacientes antes anémicos presentan hiperplasia eritroidea normoblástica y número elevado de reticulocitos

Wu y cols. (1975) comprueban que las anomalías hematológicas fueron extremadamente comunes entre pacientes que ingerían más de 80 g de alcohol al día y la anomalía más común es la macrocitosis. El 50 % de las médulas fueron anormales y el 25 % mostraron hematopoyesis megaloblástica. Los folatos eritrocíticos fueron bajos en un 35 % de los casos, los folatos hepáticos en un 31 % y los niveles séricos en un 28%. Wu llegó a la conclusión de que el principal factor que determina la deficiencia de folatos en alcohólicos es la dieta inadecuada. En gran parte de los pacientes la macrocitosis ocurre aunque no exista deficiencia de folatos, y revierte con el abandono del alcohol. Esto sugiere que el alcoholismo podría provocar macrocitosis por dos caminos: directamente por el efecto del alcohol, y también indirectamente a través de la deficiencia de folatos.

Posteriormente Craig y cols. (1985) estudian las deficiencias de vitamina B<sub>12</sub> y folatos en un hospital geriátrico y observan que casi la mitad de los pacientes con bajos niveles séricos de folatos o vitamina B<sub>12</sub> presentaban un VCM aproximado de 90 fl, aunque clásicamente se ha asociado un VCM elevado en pacientes con deficiencia de folatos o vitamina B<sub>12</sub>. Estos datos sugieren que no existe demasiada correlación entre los niveles séricos de folatos y la aparición de VCM elevado.

Lindenbaum y Roman (1989) también estudian la evolución de la anemia en pacientes alcohólicos y sugieren, que en vista de la confusión producida por la aparición de macrocitosis debida a otras causas en estos pacientes, el hallazgo de granulocitos con muchos lóbulos puede ser de particular ayuda, aunque no sea totalmente específico de la anemia megaloblástica. Los bajos niveles séricos de folatos es otro dato diagnóstico limitado: muchos pacientes alcohólicos tienen bajos niveles séricos, en ausencia de evidencias de deficiencia tisular de la vitamina.

Lindenbaum y Roman concluyen que la aparición de anemias es común en pacientes alcohólicos crónicos, la mayoría megaloblásticas o sideroblásticas, pero el alcohol "per se" probablemente no cause anemia. La combinación de dieta inadecuada y alcoholismo es la causa más común de anemia megaloblástica por deficiencia de folatos y la depleción de los folatos parece ser debida principalmente a la disminución de la ingesta de folatos unida a los trastornos de la homeostasis del folato producida por el alcohol. En pacientes ingresados, el abandono del alcohol y una alimentación adecuada producen la normalización de las alteraciones morfológicas de los eritrocitos, y la rapidez de la recuperación varía de paciente a paciente.

Link y cols. (1986) estudian los trastornos que se producen en pacientes que han sido sometidos a un trasplante de médula ósea, como tratamiento de leucemias y anemias aplásicas, observando a menudo cambios megaloblásticos. Los requerimientos de folatos después de un

trasplante de estas características son mayores, debido a la rápida proliferación de las células hematopoyéticas trasplantadas. La fase crítica parece que transcurre a las 3 semanas del trasplante. Un suplemento de ácido fólico parece vital para prevenir el debilitamiento de funciones tales como reacciones de inmunidad celular, fagocitosis, función bactericida de granulocitos y la eritropoyesis.

# MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trata de estudiar la absorción intestinal de ácido fólico y 5MTHF sobre un patrón experimental de alcoholismo.

El esquema general de los ensayos es el siguiente:

Estudio del estado nutricional

Determinación de la absorción de ácido fólico y 5MTHF en yeyuno.

Determinación de la absorción de ácido fólico y 5MTHF en ciego.

Determinación de la absorción de folatos en intestino completo.

Determinación de la absorción de folatos en intestino completo con el conducto biliar canulado.

Determinación de los parámetros anteriores en ratas patrones y en ratas con ingesta crónica de alcohol.

### 3.2.-ANIMALES

Hemos utilizado ratas blancas Wistar, machos, procedentes del Servicio de Animales de Investigación de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Los animales de investigación fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

- 1.-Ratas controles, que ingieren pienso y agua en la bebida
- 2.-Ratas con ingesta crónica de alcohol, a las que se ha añadido etanol al agua de bebida en un 30 %, previa inducción en semanas sucesivas, comenzando con un 5 %, luego un 10 %, 15 %, 20 % y por último 30 %, según la técnica de Hajjar y cols. (1981) modificada por nuestro grupo. El alcohol utilizado ha sido alcohol etílico de 96 % V/V.

Los animales fueron sometidos a la toma de etanol al alcanzar un peso de 300 a 350 g, es decir, cuando se consideran adultos, y permanecieron bajo este tratamiento durante 20 semanas. A los dos grupos experimentales, se les administró comida y bebida "ad libitum"

Los animales se distribuyeron en grupos de cinco en jaulas de plástico, en habitaciones mantenidas a temperatura controlada, con períodos alternativos de doce horas de luz y doce de oscuridad, pesándose una vez por semana durante el tiempo que duró el experimento; así mismo se les controló la cantidad de pienso y bebida consumida semanalmente por cada grupo.

### 3.3.-DIETAS

La dieta usada ha sido pienso comercial para ratas (A.04 Rata-ratón mantenimiento) de la casa Panlab, S.L. con la siguiente composición:

Humedad	12 %
Prótidos	17 %
Lípidos	3 %
Glúcidos	59 %
Celulosa	4 %

El restante 5 % son vitaminas y minerales. El contenido en ácido fólico fue de 0,5 mg/Kg de pienso.

### 3.4.-COMPOSICIÓN DE LOS LÍQUIDOS DE PERFUSIÓN

Todos los experimentos realizados en este trabajo han utilizado como líquido de perfusión una solución de NaCl al 0,9 % que contenía ácido fólico o metiltetrahidrofolato a diferentes concentraciones. El líquido de perfusión contenía el ácido fólico marcado con el ácido fólico frío, en la cantidad adecuada para obtener la concentración

idónea (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ) y la radiactividad deseadas (10  $\mu\text{Ci}$ ) en la solución de perfusión; lo mismo ocurre en el caso del metiltetrahidrofolato.

El ácido fólico y metiltetrahidrofolato fríos han sido suministrados por SIGMA. Sus correspondientes moléculas marcadas ( $^3\text{H}$ )ácido fólico y ( $^{14}\text{C}$ )5-metiltetrahidrofolato procedían ambas de Radiochemical Centre Amersham.

### 3.5.-COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL LÍQUIDO DE CENTELLEO

2,5-difeniloxazol (PPO)	15	g
tolueno	1,5	l
tritón X-100	1	l
agua	0,3	l

Se disuelve el PPO en 500 ml de tolueno, a la mezcla se incorpora la parte de tritón, y a continuación se completa con el tolueno restante. Este conjunto queda con aspecto turbio, por lo que se procede a añadir agua destilada hasta que la solución quede transparente.

### 3.6.-COMPOSICIÓN DEL ENEMA

Fosfato monosódico monohidratado	1,16	mol/L
Fosfato disódico dodecahidratado	0,23	mol/L
Agua		

### 3.7.-TÉCNICA DE ABSORCIÓN "IN VIVO"

Hemos utilizado la técnica de perfusión "in vivo", desarrollada por Ponz y cols (1979) ligeramente modificada por nuestro grupo (Carreras y cols, 1988) (Carreras y cols, 1989). Brevemente consiste en el estudio de la absorción en un segmento de intestino, aislado mediante cánulas conectadas a un sistema de perfusión que bombea la solución a



absorber, a lo largo del asa intestinal. En nuestro caso, en uno de los experimentos hemos realizado simultáneamente una doble perfusión en el mismo animal, una en la zona correspondiente al yeyuno y otra, en el ciego (ESQUEMA 7). En otra serie de experimentos, se realiza una técnica de perfusión total (Carreras y cols, 1989), en la que la primera cánula se introduce en la salida del estómago, y la segunda cánula al final del recto (ESQUEMA 8).

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 efluyente, referida al tiempo de absorción, al peso de tejido fresco, al peso de tejido seco y a la superficie de absorción correspondiente.

### 3.8.-DESCRIPCIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Se trabaja en una vitrina mantenida a una temperatura aproximada de 28°C a 30°C, mediante un sistema de calefacción regulable. En el interior de la misma se encuentra una camilla calentada con una manta eléctrica, para evitar el descenso de temperatura provocada por la anestesia.

El sistema de perfusión consta de los siguientes elementos acoplados:

- 1.-Reservorios que contengan las soluciones a perfundir
- 2.-Tubos de plástico flexibles por los que circulan los líquidos
- 3.-Bomba peristáltica (Gilson.Mod.Minipuls.2) que impulsa el líquido a una velocidad constante.
- 4.-Baño termostataado ajustado a la temperatura adecuada para que el líquido penetre en el intestino a 37 °C.
- 5.-Cánulas de vidrio de entrada y salida de líquidos, ligados a cada uno de los segmentos de intestino a perfundir

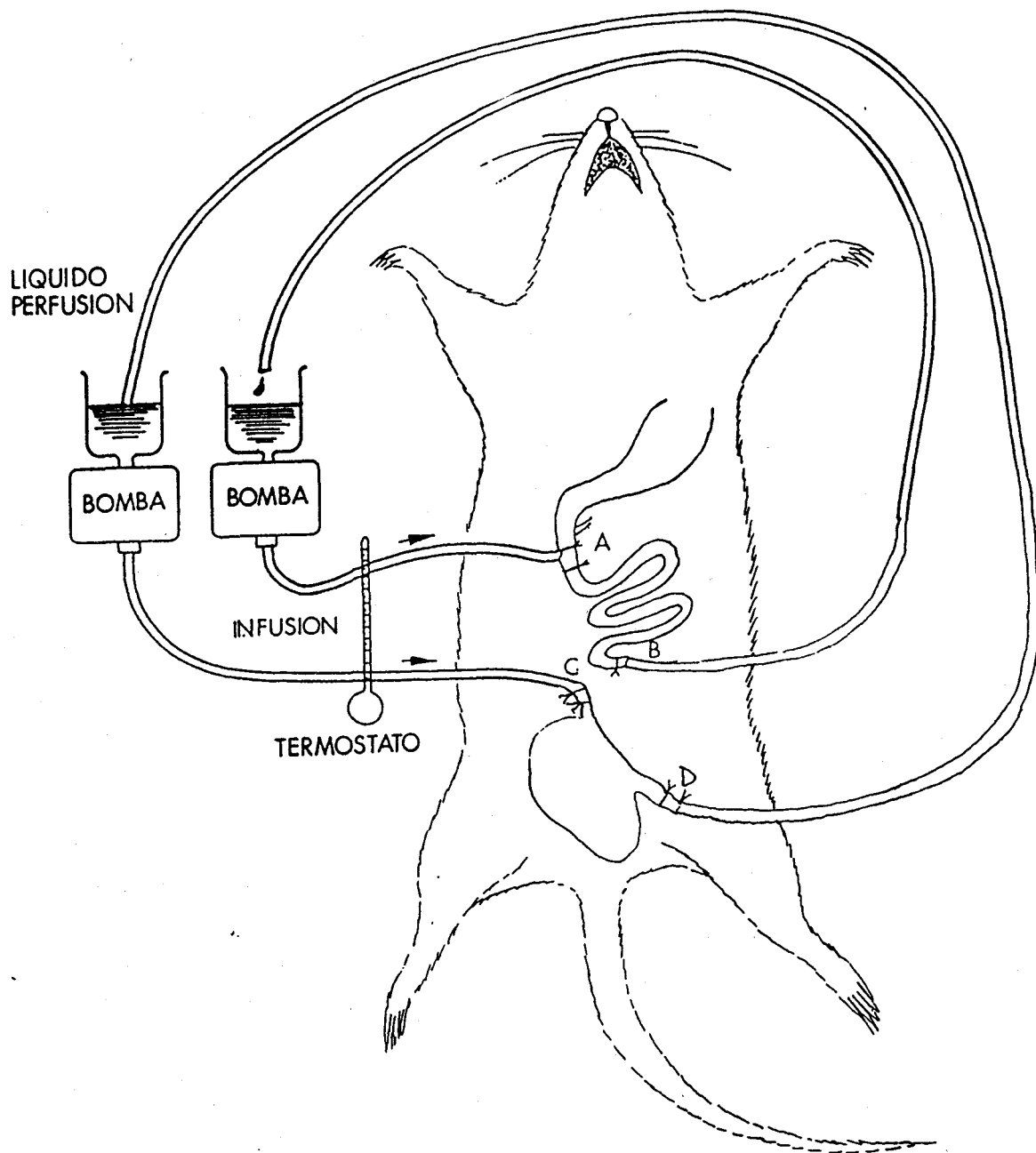
### 3.9.-REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Se mantienen los animales durante 24 horas en ayuno, permitiéndoles beber agua "ad libitum" y se anestesia con uretano al 12,5 % mediante inyección subcutánea a razón de 1 ml por cada 100 g de peso de la rata. El grado de anestesia se controla por la observación de los reflejos corneales y óculo-parpebrales. Posteriormente se les administra vía rectal 5 ml de enema para fluidificar las heces y facilitar su expulsión.

Tras laparotomía media, mediante la que se seccionan los diversos planos musculares, se penetra en la cavidad abdominal, y se realiza la canulación del conducto biliar, para recoger la bilis, cuando sea necesaria.

A continuación se ligan los vasos sanguíneos del mesenterio que irrigan la zona donde va a realizarse el corte. Para la doble perfusión se introducen las cánulas de vidrio de entrada y salida del líquido de perfusión, a través de un pequeño corte en la pared intestinal. La cánula de entrada (A) (ESQUEMA 7) de la primera asa está situada a 2 cm del asa de Treitz, y la de salida (B) a 20 cm de A. La cánula de entrada de la segunda asa (C) está situada en la entrada del ciego y a la salida de éste se coloca la otra cánula (D). Se reintroducen las dos asas intestinales en la cavidad abdominal y se conectan las cuatro cánulas al sistema de perfusión.

Seguidamente se procede a la perfusión en circuito cerrado, de las soluciones en estudio (0,5, 1 y 2,5  $\mu$ M), en el mismo animal, durante una hora cada una, siendo la velocidad de perfusión de 4,5 ml/min, y tomando como tiempo cero el momento en que la solución perfundida se vierte de una manera continua en el recipiente de partida; al final de cada perfusión se recoge todo el líquido del intestino perfundido. Transcurrido este tiempo se recoge todo el líquido contenido en el sistema mediante paso de aire. Se realiza un lavado con solución salina



ESQUEMA 7: PERFUSIÓN EN YEYUNO Y CIEGO

entre las perfusiones, a una velocidad de 6ml/min. El volumen inicial de solución perfundida fue aproximadamente de 20 ml, comprobando por pesada tanto el volumen inicial como el final, siendo la diferencia entre ambos equivalente al volumen de solución absorbida. 110

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

### 3.10.-DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS DE ABSORCIÓN DE YEYUNO Y CIEGO

1.-Canular el conducto biliar y colocar un eppendorf a la salida de la cánula, en los experimentos que sea necesario.

2.-Lavar el ciego y la porción de yeyuno a perfundir durante 30 minutos con solución salina. Vaciar mediante paso de aire

3.-Recoger bilis, en condiciones basales, y colocar un nuevo eppendorf.

4.-Pasar una solución de ácido fólico 0,5  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, tomando 2 muestras de 200  $\mu\text{l}$  cada 15 minutos. Vaciar mediante paso de aire.

5.-Lavar con solución salina durante 5 minutos. Vaciar mediante paso de aire.

6.-Retirar eppendorf con bilis y poner otro vacío.

7.-Pasar una solución de ácido fólico 0,5  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, tomando 2 muestras de 200  $\mu\text{l}$  cada 15 minutos. Vaciar mediante paso de aire.

8.-Lavar con solución salina durante 5 minutos. Vaciar mediante paso de aire.

9.-Retirar eppendorf con bilis y poner uno nuevo vacío.

A continuación se repitieron los pasos 4 a 9 utilizando soluciones de 1  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$  sucesivamente.

Durante todas las perfusiones se controló la temperatura del líquido a la entrada de las asas intestinales, que fué de 37 °C, mediante

baño termostático interpuesto en el circuito, que se reguló a una temperatura aproximada de 45 °C.

Los viales contienen 4 ml de líquido de centelleo, y 200  $\mu$ l de muestra de cada concentración a los distintos tiempos. A continuación se llevan a un contador  $\beta$  de centelleo líquido (Betamatic I Kontron).

De las muestras de bilis después de homogeneizar, se toman 2 muestras de 100  $\mu$ l por cada eppendorff, y se disuelve cada una en 4 ml de líquido de centelleo. Los viales se introducen en el contador de centelleo a las 24 horas, para evitar las interferencias debidas a quimioluminiscencia. El volumen de bilis se determinó por pesada.

Para el 5-metiltetrahidrofolato se ha seguido el protocolo anterior con las mismas condiciones de concentración, velocidad de perfusión, volumen y tiempo.

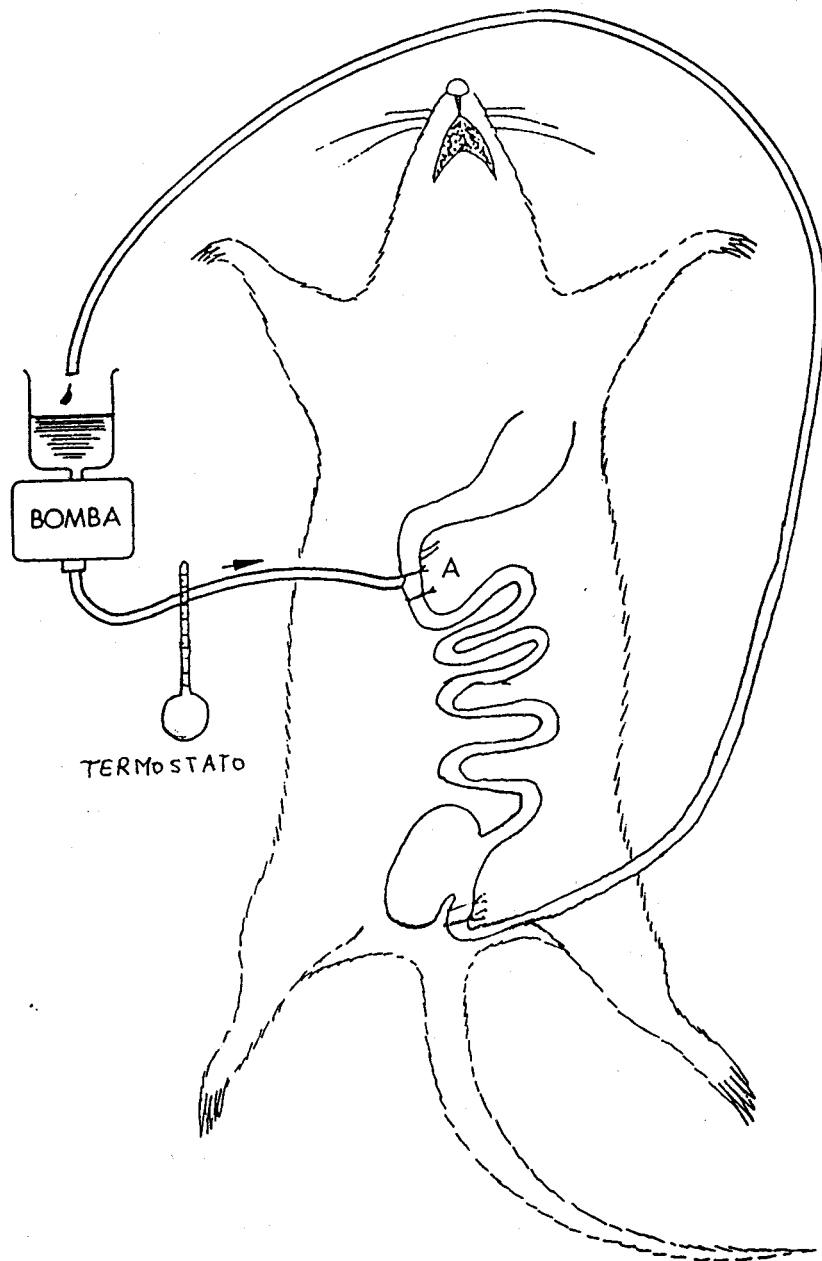
Una vez terminada la perfusión, se sacrifica el animal, se extraen el ciego y la porción de yeyuno perfundida. A continuación se mide la longitud de yeyuno perfundida y se dibuja el contorno del ciego, calculándose la superficie del ciego por un método de integración.

Se determina por pesada, en fresco, el tejido intestinal correspondiente al yeyuno y al ciego; después se introduce en una estufa a 100 °C, y a las 24 horas se vuelve a pesar.

### **3.11.-ABSORCIÓN EN SUPERFICIE INTESTINAL TOTAL**

El procedimiento es parecido al de la doble perfusión. Se utiliza una bomba idéntica, la mismas concentraciones y velocidades de perfusión y de lavado iguales.

Al igual que en el caso de la doble perfusión, se canula el conducto biliar (en los casos que sea necesario) y se recoge la bilis



ESQUEMA 8: PERFUSIÓN EN INTESTINO COMPLETO

en condiciones basales antes de empezar a perfundir. Una vez que se han realizado las dos perfusiones correspondientes a cada concentración se mide la bilis secretada.

En este caso (ESQUEMA 8) la primera cánula se introduce al comienzo del duodeno y se perfunde solución salina hasta que el intestino esté completamente limpio de heces y entonces se coloca la segunda cánula a la salida del recto. Se realizan las perfusiones contando el tiempo a partir de que empieza a caer solución de forma continua en el frasco de la solución, o sea cuando se cierra el circuito.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1.-Pasar una solución  $0,5 \mu\text{M}$  de ácido fólico durante 5 minutos. Vaciar mediante paso de aire.
- 2.-Lavar durante 5 minutos con solución salina. Vaciar.
- 3.-Pasar una solución  $0,5 \mu\text{M}$  de ácido fólico durante 5 minutos. Vaciar mediante paso de aire.
- 4.-Lavar durante 5 minutos con solución salina. Vaciar mediante paso de aire.113
- 5.-Retirar eppendorf con bilis y poner uno nuevo vacío.

A continuación se repiten los mismos pasos utilizando concentraciones  $1 \mu\text{M}$  y  $2,5 \mu\text{M}$  sucesivamente.

### 3.12.-CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE FOLATO ABSORBIDA

Los viales contienen las soluciones de las muestras, un blanco y un patrón, todas ellas por duplicado.

Para obtener la concentración final obtenida en el vial al término de la perfusión usamos la siguiente fórmula:

$$Cf = \frac{dpm(muestra) \cdot Ci}{dpm patrón}$$

Ci: concentración inicial  
Cf: concentración final

En la determinación de la absorción en yeyuno y ciego, el volumen absorbido en el intervalo de 15 minutos entre las tomas de muestra se calcula de la siguiente forma: al volumen final, medido por pesada del frasco de la solución perfundida, se le suma el volumen extraído al tomar las muestras, 4x200  $\mu$ l; el volumen obtenido se divide por 4 y este valor se considera el volumen absorbido cada 15 minutos.

Del producto de las concentraciones por los volúmenes obtenemos las cantidades iniciales y finales de folatos, y la diferencia es la cantidad absorbida.

Una vez calculada la cantidad de folato absorbida en ciego y en la porción de yeyuno, se expresan por peso del órgano fresco, por peso del órgano seco, por longitud de intestino perfundida y por superficie del ciego.

### 3.13.-DETERMINACIÓN DE FOLATOS EN SUERO Y BILIS EN CONDICIONES BASALES

Previamente a la realización de la perfusión, se procede a la extracción de sangre, que se obtiene directamente del rabo de la rata. Una vez extraída, se deja coagular la sangre a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lleva a una centrífuga (Hettich EDA 35) durante 5 minutos, (2027 r.p.m.). A continuación se toma el suero (teniendo la precaución de que no exista hemólisis) con una pipeta Pasteur y se determina el folato en suero en condiciones basales.

Para llevar a cabo la toma de muestra de bilis se introduce una cánula en el conducto biliar a través de una incisión y se recoge la bilis antes de la perfusión, y se determina el folato en condiciones



basales. También se toman muestras de la bilis recogida después de las perfusiones con folato radiactivo, y se determina la radiactividad aparecida en la secreción biliar.

La determinación de folatos basales se lleva a cabo por radioinmunoensayo (Chen y cols, 1982), con una técnica de dilución isotópica basada en la competición de los folatos de la muestra, y una cantidad fija de folato radiactivo ( $^{125}\text{I}$  ácido fólico), por muestras estandar de una proteína (lactoglobulina) que se une al folato. Para ello se utiliza un kit (Solid Phase No Boil Dualcount)

### 3.14.-MEDIDA DEL pH INTESTINAL

Se introduce el electrodo del pHmetro por una incisión efectuada al principio del duodeno, y se lleva a cabo la medición directa del pH.  
pHmetro: ERISON micro pH 2000

### 3.15.-ESTADÍSTICA

Los resultados se presentan como valores medios  $\pm$  el error estandard de la media, con respecto a la media poblacional. La significación de las diferencias entre medias se valoró mediante el test de la t de Student, considerándose estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

TABLA 1  
 PESO Y CONSUMO DE AGUA Y PIENSO EN RATAS PATRONES  
 (Consumo expresado por rata y por día)

TIEMPO	AGUA (ml)	COMIDA (g)	PESO DE RATA (g)
PRIMER MES	50,03 ± 6,7	21,07 ± 1,3	395 ± 11,5
SEGUNDO MES	46,32 ± 5,6	29 ± 1,4	470 ± 9,5
TERCER MES	48,99 ± 5,1	27,25 ± 1,7	514 ± 9,2
CUARTO MES	47,29 ± 4,7	27,25 ± 1,9	539 ± 8,5
QUINTO MES	45,08 ± 3,7	27,75 ± 1,7	552 ± 10

Valor medio ± Error estandard medio

Número de animales = 30

TABLA 2

PESO Y CONSUMO DE ETANOL, LÍQUIDO Y PIENSO: RATAS ALCOHÓLICAS  
(consumo expresado por rata y por día)

TIEMPO	g ETANOL	AGUA (30 % ALCOHOL) (ml)	COMIDA (g)	PESO RATAS (g)
PRIMER MES	8,46 ± 0,7	34,2 ± 3,4	14,2 ± 1,5 ***	397 ± 7,2
SEGUNDO MES	3,77 ± 0,2	15 ± 1,4 ***	13,4 ± 0,7 ***	368 ± 7,2 ***
TERCER MES	3,63 ± 0,3	14,7 ± 0,7 ***	15,1 ± 0,3 ***	371 ± 5,9 ***
CUARTO MES	4,42 ± 0,4	17,7 ± 1,5 ***	14,6 ± 0,6 ***	397 ± 0,8 ***
QUINTO MES	4,56 ± 0,5	18,2 ± 1,1 ***	14,1 ± 0,5 ***	406 ± 3,2 ***

Valor medio ± Error estandard medio

Número de animales = 30

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES:

\*\*\* P<0,001

**TABLA 3**  
**CONSUMO DE FOLATOS DEL PIENSO ( $\mu\text{g}/\text{rata.día}$ )**

TIEMPO	PATRONES	ALCOHÓLICAS
PRIMERA QUINCENA	14,2 $\pm$ 0,8	8,28 $\pm$ 0,35 ***
SEGUNDA QUINCENA	14,1 $\pm$ 0,7	5,58 $\pm$ 0,19 ***
TERCERA QUINCENA	15,1 $\pm$ 0,4	6,17 $\pm$ 0,24 ***
CUARTA QUINCENA	14,2 $\pm$ 1	6,57 $\pm$ 0,22 ***
QUINTA QUINCENA	13,5 $\pm$ 1,1	7,2 $\pm$ 0,31 ***
SEXTA QUINCENA	13,4 $\pm$ 0,9	7,72 $\pm$ 0,38 ***
SÉPTIMA QUINCENA	13,2 $\pm$ 1,2	7,54 $\pm$ 0,4 ***
OCTAVA QUINCENA	13,5 $\pm$ 0,9	7,71 $\pm$ 0,3 ***
NOVENA QUINCENA	14,1 $\pm$ 1,2	6,53 $\pm$ 0,4 ***
DÉCIMA QUINCENA	13,6 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,18 ***

Valor medio  $\pm$  Error estándar medio

Número de animales = 30

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES: \*\*\*  $P < 0,001$

TABLA 4  
 CONSUMO DE CALORIAS/RATA.DÍA EN RATAS PATRONES Y ALCOHOLICAS

TIEMPO	PATRONES	RATAS QUE INGIEREN 30 % DE ALCOHOL EN BEBIDA		
	CALORIAS TOTALES	CALORIAS TOTALES	CALORIAS ALCOHOL (30 % LIQ)	CALORIAS COMIDA
PRIMER MES	82,5 ± 3,7	99,25 ± 8	58,05 ± 5	41,2 ± 4
SEGUNDO MES	84 ± 4	64,77 ± 7 *	25,87 ± 3	38,9 ± 4
TERCER MES	78,75 ± 5	68,51 ± 6	24,89 ± 2	43,62 ± 3
CUARTO MES	78,75 ± 5	72,63 ± 8	30,34 ± 4	42,29 ± 4
QUINTO MES	80,25 ± 5	72,11 ± 7	31,27 ± 3	40,84 ± 5

Valor medio ± Error standard medio

Número de animales = 30

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P < 0,05

TABLA 5  
 VOLUMEN DE BILIS (ml/40 minutos)

TIEMPO	PATRONES	ALCOHOLICAS
0-40 min.	1,82 ± 0,05 (9)	1,52 ± 0,03 (6) ***
40-80 min.	1,71 ± 0,09 (7)	1,48 ± 0,05 (6) *
80-120 min	1,52 ± 0,10 (6)	1,32 ± 0,08 (6)

Valor medio ± Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 6 NIVELES SÉRICOS BASALES DE FOLATOS (nmol/l)

CONTROLES	ALCOHÓLICAS
29,40 ± 2,47 (6)	20,14 ± 1,1 (7) **

TABLA 7 NIVELES BILIARES BASALES DE FOLATOS (nmol/L)

CONTROLES	ALCOHÓLICAS
303 ± 18 (8)	264 ± 17 (8)

Valor medio ± Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/CONTROLES:

\*\* P<0,01



TABLA 8

pH INTESTINAL DETERMINADO A LA ENTRADA DEL DUODENO

CONTROLES	ALCOHÓLICAS
6,24 ± 0,18 (8)	6,21 ± 0,28 (9) n.s.

Valor medio ± Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES n.s.: no significativa

TABLA 9

## ESTUDIO MACROSCÓPICO DEL CIEGO

SUPERFICIE TOTAL DEL CIEGO (cm <sup>2</sup> )	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHÓLICAS
21,42 ± 0,46 (32)	29,52 ± 0,9 (30) ***

PESO FRESCO DE CIEGO (g)	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHÓLICAS
3,05 ± 0,16 (33)	3,99 ± 1,5 (32) **

PESO SECO DE CIEGO (g)	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHOLICAS
0,62 ± 0,03 (36)	0,60 ± 0,01 (27)

DIFERENCIA PESO FRESCO - PESO SECO de CIEGO (g)	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHOLICAS
2,37 ± 0,11 (30)	3,29 ± 0,24 (31) ***

Valor medio ± Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\*\* P<0,01

\*\*\* P<0,001

TABLA 10

## ESTUDIO MACROSCÓPICO DEL YEYUNO

PESO FRESCO/LONGITUD DE INTESTINO PERFUNDIDO (mg/cm)	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHÓLICAS
72,3 ± 1,91 (31)	66,2 ± 1,35 (25) *

PESO SECO/LONGITUD DE INTESTINO PERFUNDIDO (mg/cm)	
RATAS PATRONES	RATAS ALCOHÓLICAS
20,1 ± 0,90 (30)	20,9 ± 1,12 (25)

Valor medio ± Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

TABLA 11  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/LONGITUD (pmol/cm)  
 EN YEYUNO DE RATAS CONTROLES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	64,9 $\pm$ 4,6 (15)	125 $\pm$ 9,4 (17)	284 $\pm$ 31 (14)
30 min.	73 $\pm$ 2,1 (14)	192 $\pm$ 11 (16)	418 $\pm$ 30 (13)
45 min.	99,3 $\pm$ 2,8 (16)	248 $\pm$ 11 (16)	632 $\pm$ 17 (15)
60 min.	121 $\pm$ 5,5 (17)	285 $\pm$ 9 (15)	665 $\pm$ 32 (13)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 12  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/LONGITUD (pmol/cm)  
 EN YEYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	83,3 $\pm$ 10,8 (15)	161 $\pm$ 9 (16)	390 $\pm$ 14 (14)
		*	**
30 min.	93 $\pm$ 6,6 (15)	222 $\pm$ 8 (14)	603 $\pm$ 26 (14)
	**	*	***
45 min.	112 $\pm$ 6,2 (15)	261 $\pm$ 11 (15)	596 $\pm$ 17 (13)
60 min.	133 $\pm$ 6,4 (15)	317 $\pm$ 8 (15)	669 $\pm$ 29 (12)
		*	

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\* P<0,01  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 13  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/LONGITUD (pmol/cm)  
 EN YEYUNO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	37,8 $\pm$ 2,2 (10) ###	78,2 $\pm$ 5,2 (12) ###	186 $\pm$ 14,2 (13) ###
30 min.	48,98 $\pm$ 3,24 (12) ###	97,08 $\pm$ 5 (13) ###	236 $\pm$ 13,3 (12) ###
45 min.	55,26 $\pm$ 3,3 (11) ###	116 $\pm$ 5 (11) ###	297 $\pm$ 13 (11) ###
60 min.	66,8 $\pm$ 3 (12) ###	136 $\pm$ 5,8 (10) ###	358 $\pm$ 11,4 (11) ###

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: MTHF patrones/fólico patrones

### P<0,001

TABLA 14  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/LONGITUD (pmol/cm)  
 EN YEYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	38,2 $\pm$ 3 (11) ###	82,8 $\pm$ 5,7 (11) ###	179 $\pm$ 13 (10) ###
30 min.	41,5 $\pm$ 4 (10) ###	100 $\pm$ 6 (13) ###	224 $\pm$ 16 (11) ###
45 min.	53,03 $\pm$ 1,4 (12) ###	112 $\pm$ 7,1 (12) ###	255 $\pm$ 61 (10) ###
60 min.	57,1 $\pm$ 4 (12) ###	128 $\pm$ 6,1 (12) ###	310 $\pm$ 20 (10) ###

Valor medio  $\pm$  Error estandar medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES  
 Diferencia no significativa para todos los valores

Significación estadística: MTHF alcohólicas/fólico alcohólicas

### P<0,001

TABLA 15  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS CONTROLES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	0,83 $\pm$ 0,03 (15)	1,68 $\pm$ 0,13 (17)	4,35 $\pm$ 0,5 (14)
30 min.	1,03 $\pm$ 0,06 (14)	2,64 $\pm$ 0,08 (16)	5,84 $\pm$ 0,2 (13)
45 min.	1,44 $\pm$ 0,1 (16)	3,21 $\pm$ 0,12 (16)	7,7 $\pm$ 0,3 (15)
60 min.	1,67 $\pm$ 0,08 (17)	3,84 $\pm$ 0,13 (15)	8,63 $\pm$ 0,2 (13)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos



TABLA 16  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0, - $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	1,1 $\pm$ 0,1 (15) *	2,38 $\pm$ 0,14 (16) ***	5,74 $\pm$ 0,2 (14) *
30 min.	1,47 $\pm$ 0,09 (15) ***	3,13 $\pm$ 0,16 (14) *	7,9 $\pm$ 0,2 (14) ***
45 min.	1,56 $\pm$ 0,07 (15)	3,56 $\pm$ 0,12 (13) *	9,08 $\pm$ 0,4 (13) *
60 min.	2,05 $\pm$ 0,12 (15) *	4,43 $\pm$ 0,2 (15) **	9,42 $\pm$ 0,2 (12) *

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\* P<0,01  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 17  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS CONTROLES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	0,5 $\pm$ 0,04 (10)	0,95 $\pm$ 0,07 (12)	2,35 $\pm$ 0,23 (11)
30 min.	0,59 $\pm$ 0,05 (12)	1,28 $\pm$ 0,05 (13)	2,93 $\pm$ 0,26 (12)
45 min.	0,77 $\pm$ 0,09 (11)	1,57 $\pm$ 0,05 (11)	3,67 $\pm$ 0,13 (11)
60 min.	0,89 $\pm$ 0,09 (12)	1,68 $\pm$ 0,12 (10)	5,0 $\pm$ 0,26 (11)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 18  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	0,56 $\pm$ 0,06 (11)	1,19 $\pm$ 0,08 (11) *	2,75 $\pm$ 0,2 (10)
30 min.	0,62 $\pm$ 0,05 (10)	1,53 $\pm$ 0,11 (13) *	3,39 $\pm$ 0,2 (11)
45 min.	0,76 $\pm$ 0,03 (12)	1,7 $\pm$ 0,12 (12)	3,84 $\pm$ 0,24 (10)
60 min.	0,91 $\pm$ 0,07 (12)	1,94 $\pm$ 0,11 (12)	4,7 $\pm$ 0,3 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES  
 \* P<0,05

TABLA 19  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS CONTROLES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	2,33 $\pm$ 0,18 (15)	5,4 $\pm$ 0,6 (17)	13,6 $\pm$ 2 (14)
30 min.	2,7 $\pm$ 0,2 (14)	8,6 $\pm$ 0,8 (16)	19,1 $\pm$ 1,9 (13)
45 min.	3,96 $\pm$ 0,3 (16)	10,6 $\pm$ 0,8 (16)	26,9 $\pm$ 2,2 (15)
60 min.	5,2 $\pm$ 0,4 (17)	11,9 $\pm$ 0,9 (15)	30,1 $\pm$ 2,6 (13)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 20  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	3,88 $\pm$ 0,3 (15) ***	8,4 $\pm$ 0,6 (16) ***	21,9 $\pm$ 1,5 (14) **
30 min.	5,4 $\pm$ 0,4 (15) ***	11,3 $\pm$ 0,7 (14) *	31,73 $\pm$ 1,8 (14) ***
45 min.	5,91 $\pm$ 0,4 (15) ***	13,8 $\pm$ 0,8 (15) *	29,8 $\pm$ 1,7 (13)
60 min.	6,68 $\pm$ 0,6 (15)	16,1 $\pm$ 0,8 (15) **	33,6 $\pm$ 1,5 (12)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\* P<0,01  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 21  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN YEYUNO DE RATAS CONTROLES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	2 $\pm$ 0,2 (10)	3,5 $\pm$ 0,3 (12)	9,46 $\pm$ 1,1 (13)
30 min.	2,13 $\pm$ 0,2 (12)	4,25 $\pm$ 0,4 (13)	11,6 $\pm$ 1,2 (12)
45 min.	2,6 $\pm$ 0,2 (11)	5,7 $\pm$ 0,52 (11)	14,7 $\pm$ 1,44 (11)
60 min.	3,24 $\pm$ 0,3 (12)	6,35 $\pm$ 0,5 (10)	17,2 $\pm$ 1,8 (11)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 22  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN YAYUNO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	1,97 $\pm$ 0,16 (11)	4,10 $\pm$ 0,24 (11)	9,3 $\pm$ 0,8 (10)
30 min.	2,26 $\pm$ 0,2 (10)	5,52 $\pm$ 0,4 (13) *	12 $\pm$ 0,72 (11)
45 min.	2,62 $\pm$ 0,08 (12)	6,39 $\pm$ 0,21 (12)	13,23 $\pm$ 0,9 (10)
60 min.	3,23 $\pm$ 0,3 (12)	7,04 $\pm$ 0,5 (12)	16,91 $\pm$ 1,39 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES  
 \*  $P < 0,05$

TABLA 23  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO (nmol)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	0,87 $\pm$ 0,13 (14)	1,88 $\pm$ 0,13 (11)	4,92 $\pm$ 0,49 (11)
30 min.	1,17 $\pm$ 0,13 (14)	3,07 $\pm$ 0,24 (16)	5,58 $\pm$ 0,51 (14)
45 min.	1,79 $\pm$ 0,2 (14)	3,60 $\pm$ 0,34 (15)	7,92 $\pm$ 0,63 (12)
60 min	1,93 $\pm$ 0,15 (16)	4,06 $\pm$ 0,45 (14)	8,88 $\pm$ 1,05 (10)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos



TABLA 24  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO (nmol)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	1,24 $\pm$ 0,13 (16)	2,15 $\pm$ 0,17 (11)	6,61 $\pm$ 0,56 (12) *
30 min.	1,49 $\pm$ 0,11 (13)	3,45 $\pm$ 0,18 (14)	6,70 $\pm$ 0,46 (11)
45 min.	1,79 $\pm$ 0,13 (14)	3,70 $\pm$ 0,21 (14)	7,97 $\pm$ 0,67 (12)
60 min.	1,82 $\pm$ 0,18 (14)	4,33 $\pm$ 0,24 (14)	8,08 $\pm$ 0,39 (10) ***

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 25  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO (nmol)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min	0,65 $\pm$ 0,05 (11)	1,34 $\pm$ 0,1 (12) ##	3,24 $\pm$ 0,24 (12) ##
30 min	0,87 $\pm$ 0,08 (12)	1,89 $\pm$ 0,1 (13) ###	3,71 $\pm$ 0,25 (11) ##
45 min	1,10 $\pm$ 0,12 (12) ##	2,05 $\pm$ 0,08 (12) ###	5,19 $\pm$ 0,38 (11) ##
60 min	1,25 $\pm$ 0,08 (10) ###	2,56 $\pm$ 0,17 (13) ##	5,79 $\pm$ 0,54 (12) #

Valor medio  $\pm$  Error estándar medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: MTHF patrones/fólico patrones

# P < 0,05  
 ## P < 0,01  
 ### P < 0,001

TABLA 26  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO (nmol)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	0,71 $\pm$ 0,04 (11) ###	1,56 $\pm$ 0,08 (11) ##	3,64 $\pm$ 0,14 (8) ###
30 min.	0,78 $\pm$ 0,04 (7) ###	1,88 $\pm$ 0,11 (12) ###	5,38 $\pm$ 0,39 (12) * #
45 min.	1,22 $\pm$ 0,08 (11) ##	2,32 $\pm$ 0,14 (12) ###	5,98 $\pm$ 0,5 (12) #
60 min.	1,27 $\pm$ 0,01 (12) ##	2,53 $\pm$ 0,13 (13) ###	6,34 $\pm$ 0,67 (12)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

Significación estadística: MTHF alcohólicas/fólico alcohólicas

# P<0,05

## P<0,01

### P<0,001

TABLA 27  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/SUPERFICIE (pmol/cm<sup>2</sup>)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	36 $\pm$ 6 (14)	92 $\pm$ 11 (11)	206 $\pm$ 30 (11)
30 min.	52 $\pm$ 6 (14)	141 $\pm$ 11 (16)	257 $\pm$ 27 (14)
45 min.	68 $\pm$ 9 (14)	148 $\pm$ 15 (15)	382 $\pm$ 48 (12)
60 min.	80 $\pm$ 9 (16)	166 $\pm$ 16 (14)	419 $\pm$ 51 (10)

Valor medio Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 28  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/SUPERFICIE (pmol/cm<sup>2</sup>)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	38 $\pm$ 3 (16)	84 $\pm$ 7 (11)	215 $\pm$ 18 (12)
30 min.	44 $\pm$ 3 (13)	104 $\pm$ 4 (14)	219 $\pm$ 12 (11)
45 min.	53 $\pm$ 6 (14)	123 $\pm$ 8 (14)	249 $\pm$ 17 (12)
60 min.	59 $\pm$ 5 (14)	142 $\pm$ 8 (14)	287 $\pm$ 13 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

\*\* P<0,01

TABLA 29  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/SUPERFICIE (pmol/cm<sup>2</sup>)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	33 $\pm$ 2 (11)	63 $\pm$ 4 (12)	144 $\pm$ 6 (12)
30 min.	40 $\pm$ 3 (12)	80 $\pm$ 5 (13)	184 $\pm$ 11 (11)
45 min.	49 $\pm$ 6 (12)	97 $\pm$ 5 (12)	230 $\pm$ 13 (11)
60 min.	62 $\pm$ 5 (10)	110 $\pm$ 6 (13)	249 $\pm$ 17 (12)

Valor medio Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 30  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/SUPERFICIE (pmol/cm<sup>2</sup>)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	27 $\pm$ 3 (11)	52 $\pm$ 3 (11)	112 $\pm$ 12 (8)
		**	**
30 min.	29 $\pm$ 2 (7)	75 $\pm$ 7 (12)	177 $\pm$ 21 (12)
	*		
45 min.	33 $\pm$ 3 (11)	84 $\pm$ 7 (12)	226 $\pm$ 30 (12)
	**		
60 min.	40 $\pm$ 2 (12)	96 $\pm$ 8 (13)	228 $\pm$ 30 (12)
	***		

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05  
 \*\* P<0,01  
 \*\*\* P<0,001

TABLA 31  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	0,25 $\pm$ 0,05 (14)	0,48 $\pm$ 0,06 (11)	1,25 $\pm$ 0,2 (11)
30 min.	0,31 $\pm$ 0,05 (14)	0,89 $\pm$ 0,06 (16)	1,9 $\pm$ 0,27 (14)
45 min.	0,6 $\pm$ 0,11 (14)	0,97 $\pm$ 0,11 (15)	2,64 $\pm$ 0,4 (12)
60 min.	0,46 $\pm$ 0,06 (16)	1,25 $\pm$ 0,16 (14)	2,9 $\pm$ 0,4 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos



TABLA 32  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACION		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	0,26 $\pm$ 0,03 (16)	0,52 $\pm$ 0,06 (11)	1,38 $\pm$ 0,12 (12)
30 min.	0,3 $\pm$ 0,03 (13)	0,75 $\pm$ 0,05 (14)	1,59 $\pm$ 0,16 (11)
45 min.	0,33 $\pm$ 0,04 (14) *	0,84 $\pm$ 0,08 (14)	1,81 $\pm$ 0,17 (12)
60 min.	0,36 $\pm$ 0,03 (14)	0,97 $\pm$ 0,08 (14)	2,08 $\pm$ 0,16 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

TABLA 33  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAFOLATO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	0,27 $\pm$ 0,03 (11)	0,44 $\pm$ 0,05 (12)	0,96 $\pm$ 0,06 (12)
30 min.	0,3 $\pm$ 0,03 (12)	0,6 $\pm$ 0,06 (13)	1,14 $\pm$ 0,08 (11)
45 min.	0,43 $\pm$ 0,06 (12)	0,68 $\pm$ 0,07 (12)	1,71 $\pm$ 0,17 (11)
60 min.	0,44 $\pm$ 0,66 (10)	0,72 $\pm$ 0,07 (13)	1,55 $\pm$ 0,16 (12)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 34  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO FRESCO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	0,21 $\pm$ 0,02 (11)	0,54 $\pm$ 0,08 (11)	0,7 $\pm$ 0,06 (8)
30 min.	0,3 $\pm$ 0,04 (7)	0,68 $\pm$ 0,09 (12)	1,76 $\pm$ 0,32 (12)
45 min.	0,28 $\pm$ 0,03 (11)	0,64 $\pm$ 0,06 (12)	1,44 $\pm$ 0,15 (12)
60 min.	0,38 $\pm$ 0,04 (12)	0,93 $\pm$ 0,13 (13)	1,29 $\pm$ 0,14 (12)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

Diferencia no significativa para todos los valores

TABLA 35  
 ABSORCIÓN ÁCIDO FÓLICO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	1,77 $\pm$ 0,18 (16)	3,49 $\pm$ 0,18 (11)	10,25 $\pm$ 1 (12)
30 min.	2,03 $\pm$ 0,21 (13)	5,37 $\pm$ 0,33 (14)	12,07 $\pm$ 1,39 (11)
45 min.	3,08 $\pm$ 0,4 (14)	5,71 $\pm$ 0,41 (14)	11,88 $\pm$ 1,04 (12)
60 min.	2,8 $\pm$ 0,32 (14)	6,72 $\pm$ 0,45 (14)	13,44 $\pm$ 0,82 (10)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

Diferencia no significativa para todos los valores

TABLA 36  
 ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
15 min.	1,22 $\pm$ 0,23 (14)	3,32 $\pm$ 0,4 (11)	7,4 $\pm$ 1,2 (11)
30 min.	1,56 $\pm$ 0,19 (14)	4,68 $\pm$ 0,5 (16)	9,11 $\pm$ 1,18 (14)
45 min.	2,89 $\pm$ 0,48 (14)	5,54 $\pm$ 0,7 (15)	13,92 $\pm$ 2,1 (12)
60 min.	2,23 $\pm$ 0,24 (16)	6,76 $\pm$ 0,87 (14)	14,36 $\pm$ 2,1 (10)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 37  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS PATRONES

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	1,55 $\pm$ 0,18 (11)	2,22 $\pm$ 0,16 (12)	6,28 $\pm$ 0,58 (12)
30 min.	2,05 $\pm$ 0,19 (12)	1,89 $\pm$ 0,13 (13)	6,59 $\pm$ 0,45 (11)
45 min.	2,16 $\pm$ 0,28 (12)	3,38 $\pm$ 0,26 (12)	5,19 $\pm$ 0,38 (11)
60 min.	2,10 $\pm$ 0,12 (10)	4,34 $\pm$ 0,29 (13)	9,5 $\pm$ 0,54 (12)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

TABLA 38  
 ABSORCIÓN DE METILTETRAHIDROFOLATO/PESO SECO (nmol/g)  
 EN CIEGO DE RATAS ALCOHÓLICAS

TIEMPO	CONCENTRACIÓN		
	0,5 $\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$
15 min.	1,22 $\pm$ 0,12 (11)	2,79 $\pm$ 0,26 (11)	5,9 $\pm$ 0,72 (8)
30 min.	1,45 $\pm$ 0,16 (7)	3,55 $\pm$ 0,27 (12)	9,23 $\pm$ 1,07 (12) *
45 min.	2,09 $\pm$ 0,28 (11)	4,39 $\pm$ 0,37 (12) *	9,61 $\pm$ 1,01 (12)
60 min.	2,45 $\pm$ 0,27 (12)	4,89 $\pm$ 0,47 (13)	10,76 $\pm$ 1,35 (12)

Valor medio  $\pm$  Error estandar medio  
 Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística: ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

TABLA 39  
 ABSORCIÓN TOTAL DE ÁCIDO FÓLICO (nmol/5 min)  
 RATAS CON CONDUCTO BILIAR INTACTO

CONCENTRACIÓN	PATRONES	ALCOHÓLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	6,43 $\pm$ 0,38 (8) ###	8,45 $\pm$ 0,74 (10) * ###
1 $\mu\text{M}$	12,45 $\pm$ 0,97 (8) ##	15 $\pm$ 0,91 (9) ###
2,5 $\mu\text{M}$	33,92 $\pm$ 2,74 (8) ##	31,68 $\pm$ 2,66 (11)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES:

\* P<0,05

FÓLICO/MTHF:

## P<0,01  
 ### P<0,001



TABLA 40  
 ABSORCIÓN TOTAL DE ÁCIDO FÓLICO (nmol/5 min)  
 RATAS CON CONDUCTO BILIAR CANULADO

CONCENTRACIÓN	PATRONES	ALCOHÓLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	11,98 $\pm$ 1,37 (10) ###	9,67 $\pm$ 1,17 (18) ###
1 $\mu\text{M}$	26,67 $\pm$ 1,37 (10) ###	18,11 $\pm$ 2,28 (12) ** ###
2,5 $\mu\text{M}$	57,13 $\pm$ 1,37 (9) ###	36,51 $\pm$ 3,83 (11) *** ###

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\*\* P<0,01  
 \*\*\* P<0,001

FÓLICO/FOLATO

### P<0,001

TABLA 41  
 ABSORCIÓN TOTAL DE METILTETRAHIDROFOLATO (nmol/5 min)  
 RATAS CON CONDUCTO BILIAR INTACTO

CONCENTRACIÓN	PATRONES	ALCOHÓLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	3,98 $\pm$ 0,31 (8)	4,01 $\pm$ 0,32 (7)
1 $\mu\text{M}$	7,75 $\pm$ 0,95 (8)	9,86 $\pm$ 0,57 (10)
2,5 $\mu\text{M}$	21,11 $\pm$ 2,90 (9)	27,38 $\pm$ 2,04 (10) *

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES: \* P<0,05

TABLA 42  
 ABSORCIÓN TOTAL DE METILTETRAHIDROFOLATO (nmol/5 min)  
 RATAS CON CONDUCTO BILIAR CANULADO

CONCENTRACIÓN	PATRONES	ALCOHOLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	7,45 $\pm$ 0,41 (17)	6,10 $\pm$ 0,63 (12)
1 $\mu\text{M}$	14,3 $\pm$ 0,96 (14)	11,22 $\pm$ 1,06 (12) *
2,5 $\mu\text{M}$	35,91 $\pm$ 2,02 (10)	41,39 $\pm$ 2,61 (8)

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

TABLA 43  
 CANTIDAD TOTAL DE RADIATIVIDAD EN BILIS (expresado en DPM)  
 PERFUSIÓN TOTAL DE INTESTINO COMPLETO CON ÁCIDO FÓLICO

CONCENTRACIÓN	PATRONES	ALCOHÓLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	4509 $\pm$ 2022 (4)	2885 $\pm$ 588 (6)
1 $\mu\text{M}$	9689 $\pm$ 1883 (3)	5539 $\pm$ 1431 (6)
2,5 $\mu\text{M}$	9685 $\pm$ 939 (3)	5450 $\pm$ 1465 (6) *

Valor medio  $\pm$  Error standard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

\* P<0,05

TABLA 44

CANTIDAD TOTAL DE RADIATIVIDAD EN BILIS (expresado en DPM)  
 PERFUSIÓN DE INTESTINO COMPLETO CON METILTETRAHIDROFOLATO

CONCENTRACIONES	PATRONES	ALCOHOLICAS
0,5 $\mu\text{M}$	1490 $\pm$ 289 (10)	1119 $\pm$ 188 (6)
1 $\mu\text{M}$	2424 $\pm$ 472 (7)	1873 $\pm$ 195 (6)
2,5 $\mu\text{M}$	3313 $\pm$ 683 (6)	2459 $\pm$ 390 (5)

Valor medio  $\pm$  Error estandard medio

Entre paréntesis el número de datos

Significación estadística:

ALCOHÓLICAS/PATRONES

Diferencia no significativa en todos los casos

# EVOLUCION DEL CONSUMO DE PIENSO

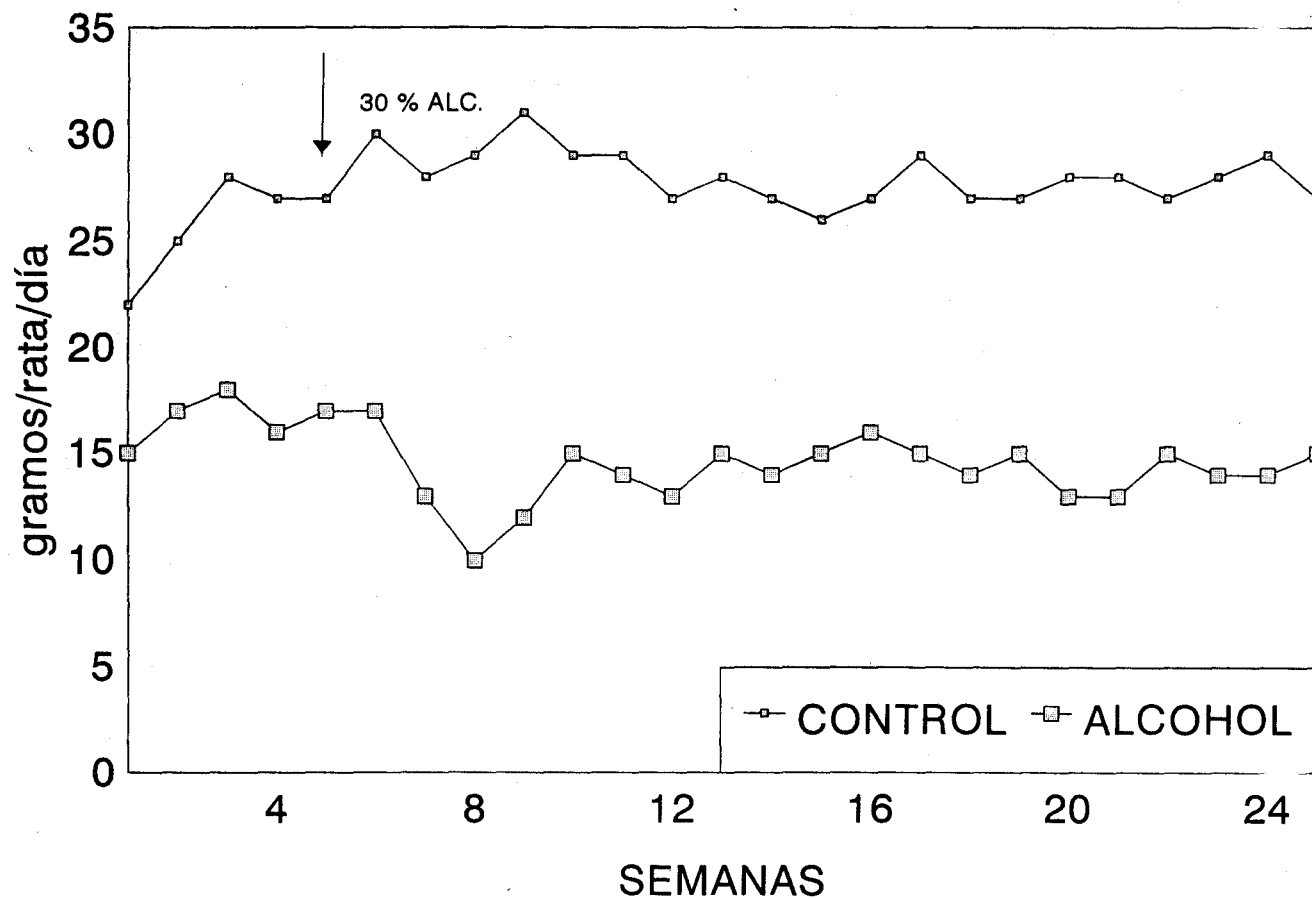


GRÁFICO 1

# EVOLUCION DEL CONSUMO DE BEBIDA

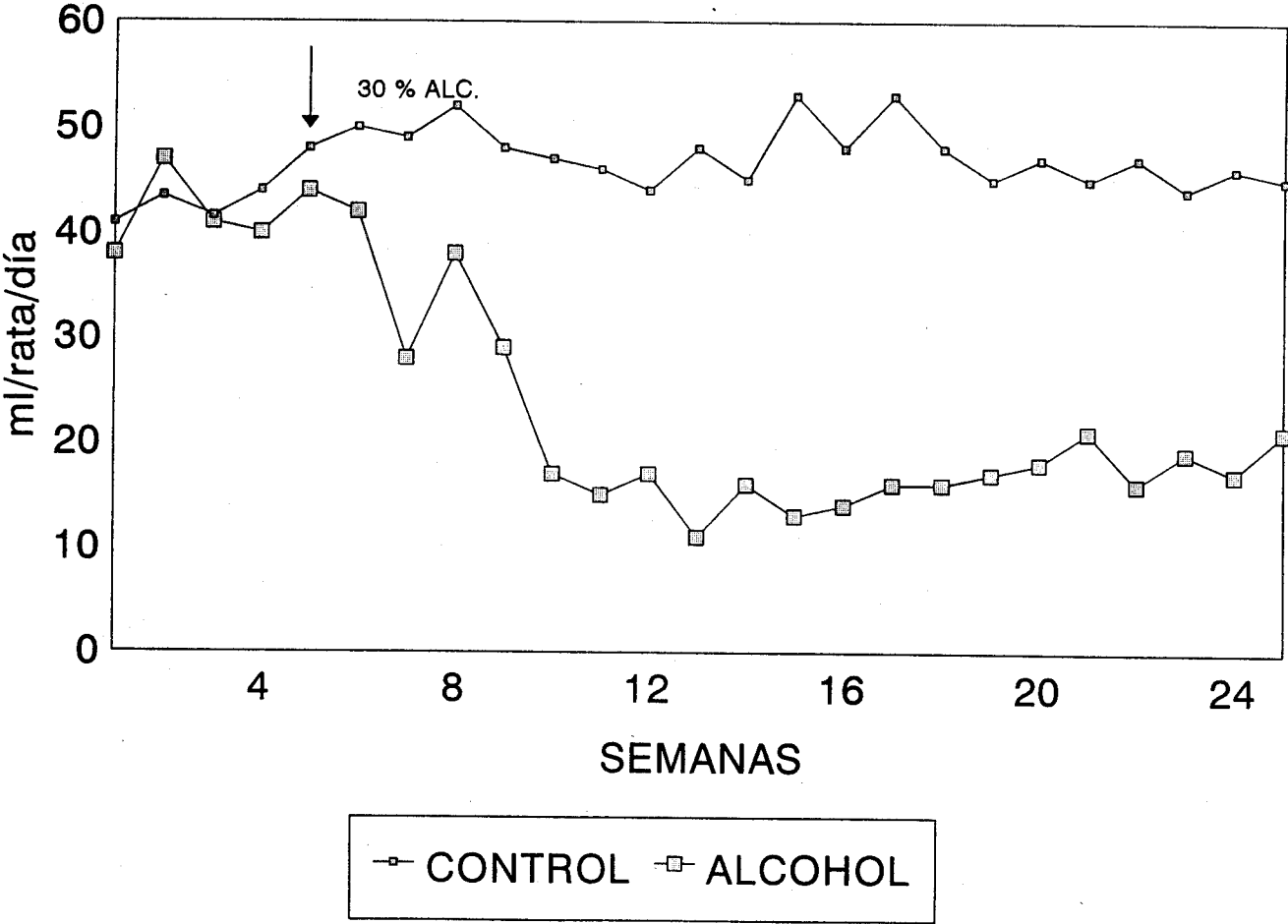


GRÁFICO 2

# EVOLUCION DEL CONSUMO DE CALORIAS TOTALES

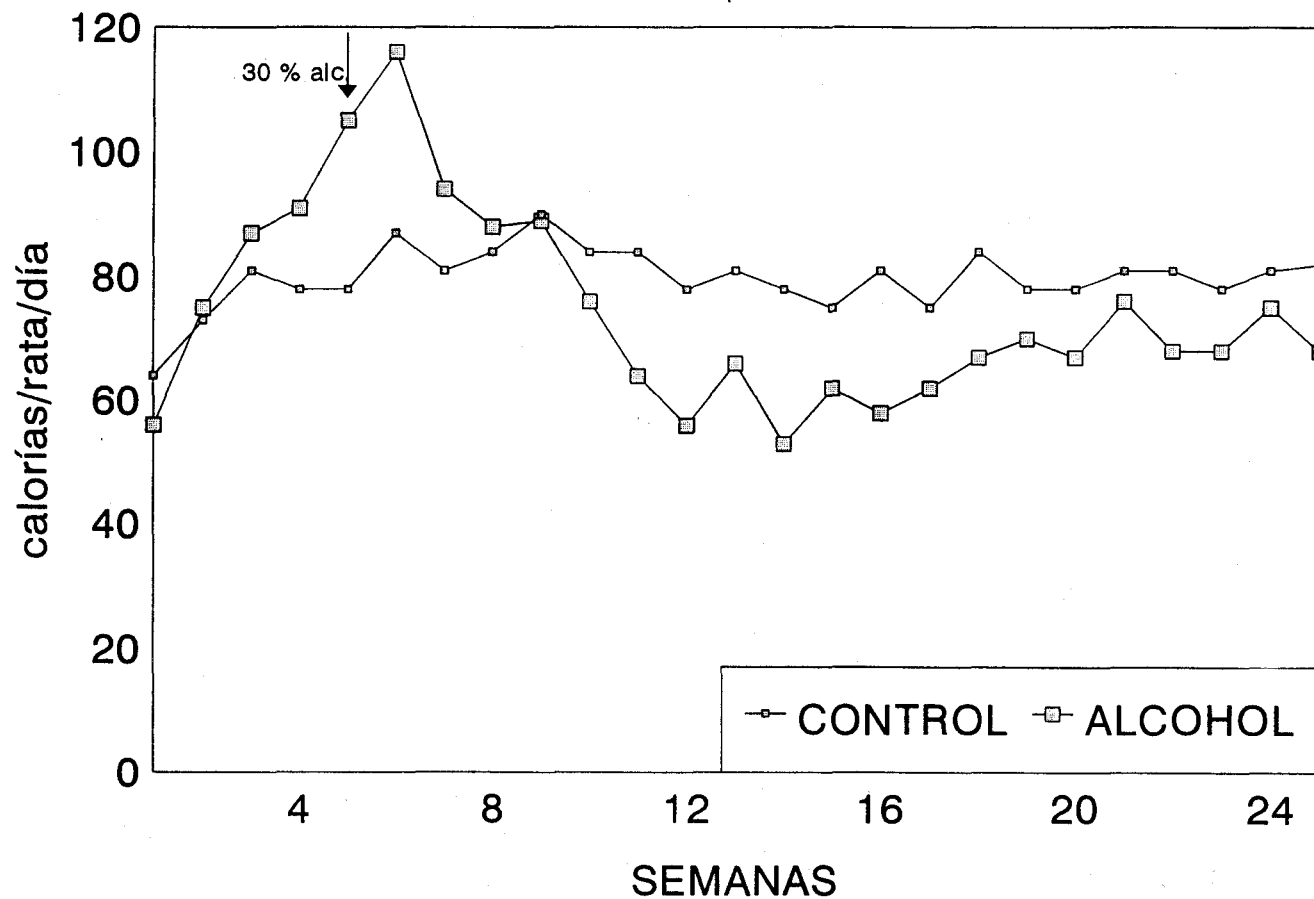


GRÁFICO 3



# EVOLUCION DEL PESO DE LAS RATAS

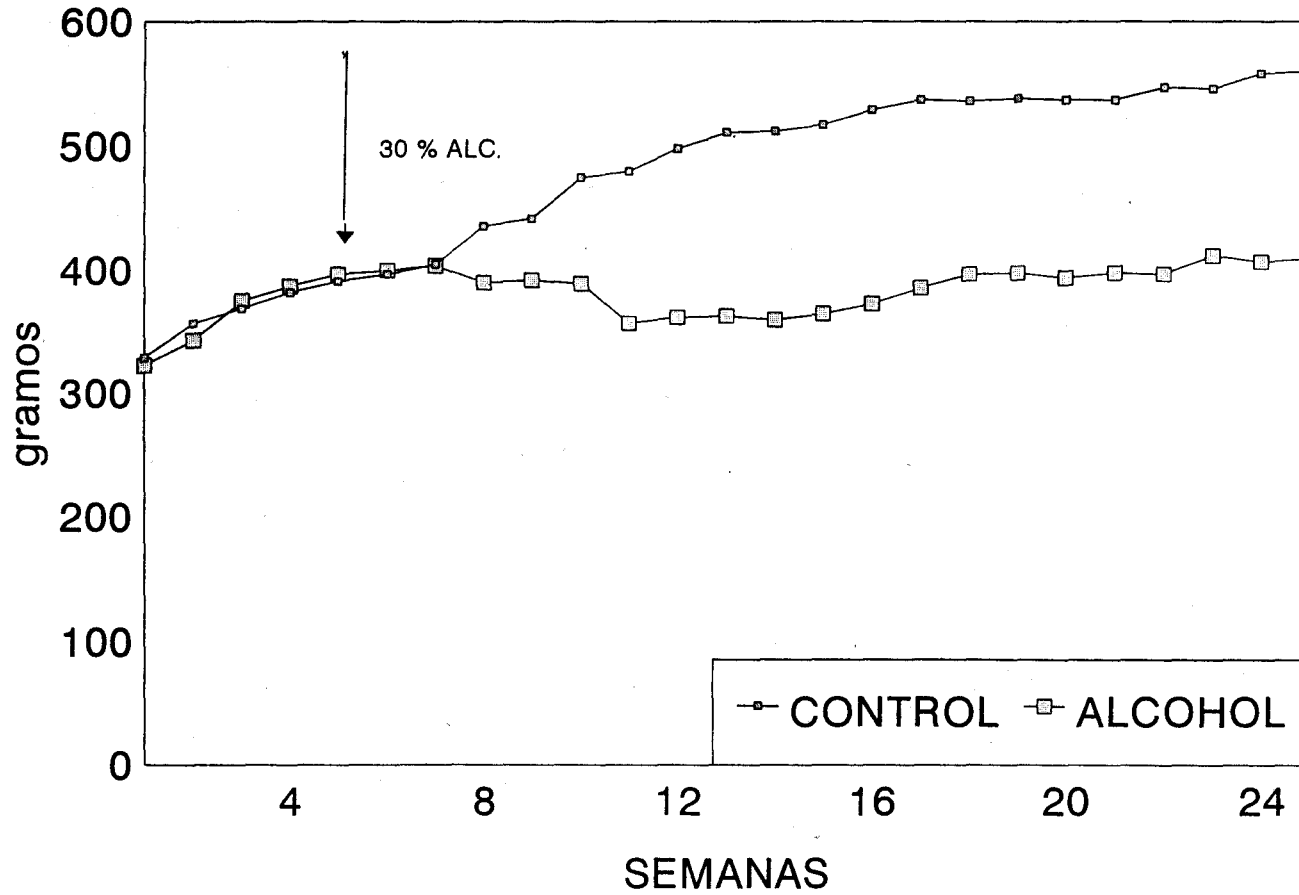


GRÁFICO 4

# ABSORCION TOTAL DE ACIDO FOLICO RATAS PATRONES

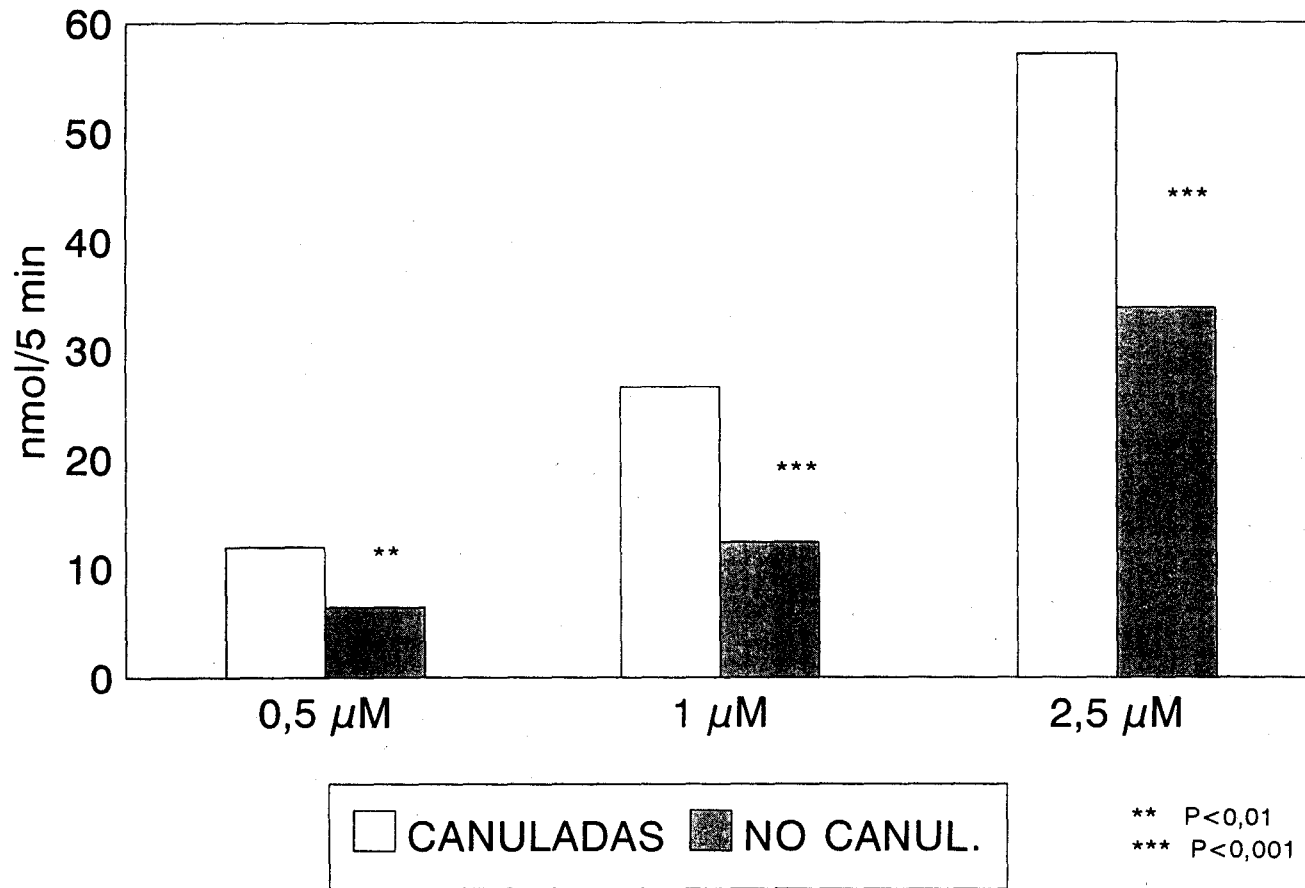


GRÁFICO 5

# ABSORCION TOTAL DE ACIDO FOLICO RATAS ALCOHOLICAS

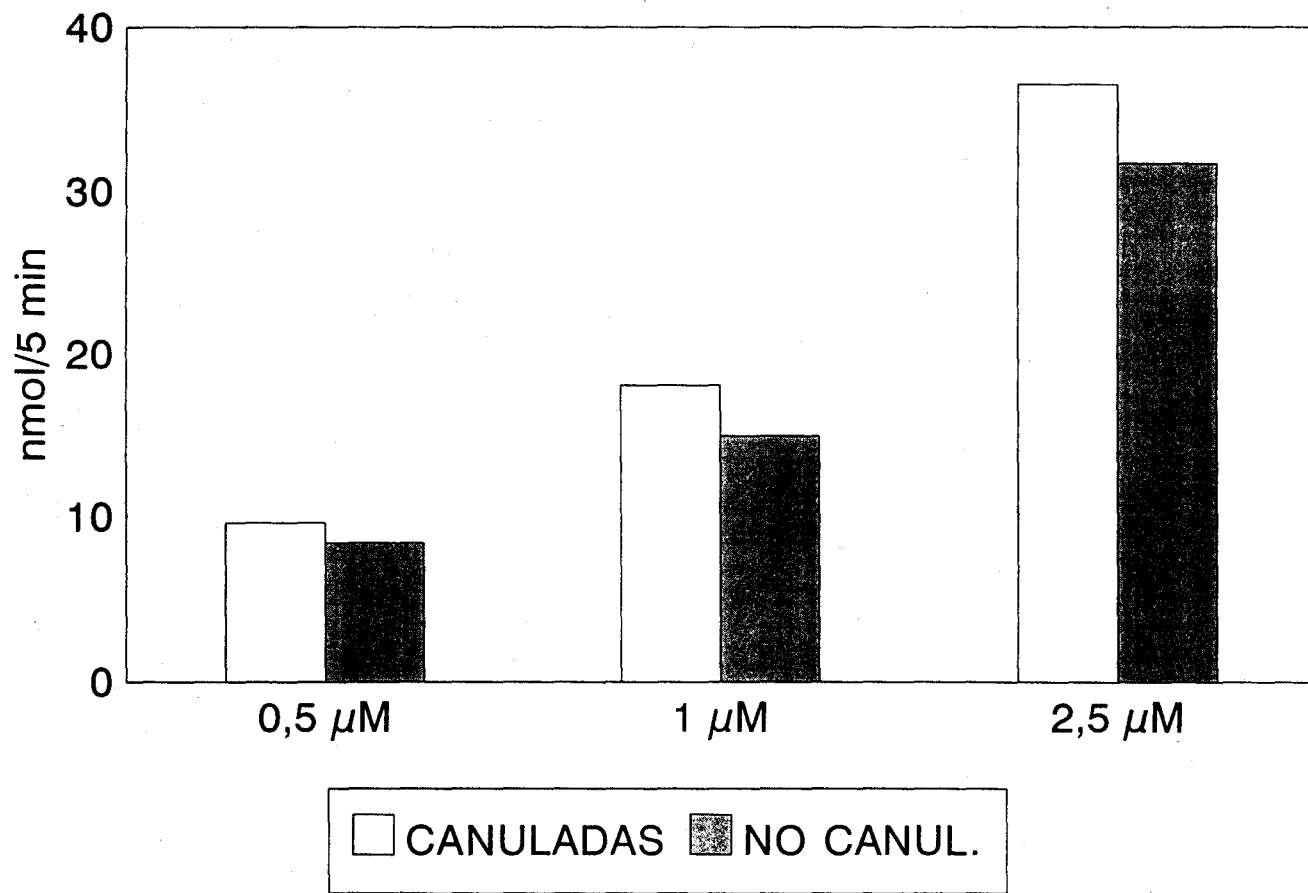


GRÁFICO 6

## PORCENTAJE DE RECIRCULACION DE ACIDO FOLICO ABSORBIDO

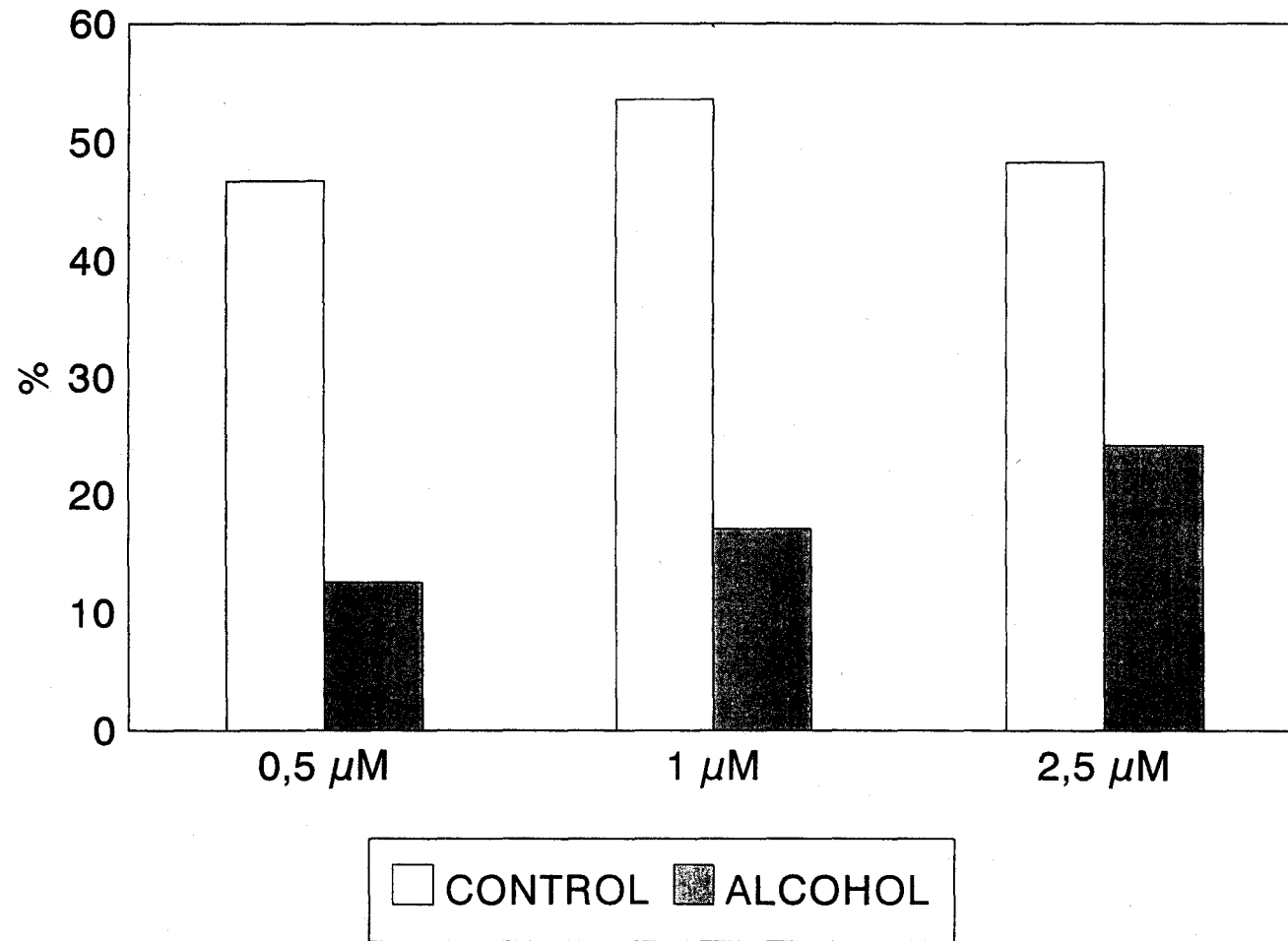


GRÁFICO 7

# ABSORCION TOTAL DE METILTETRAHIDROFOLATO RATAS PATRONES

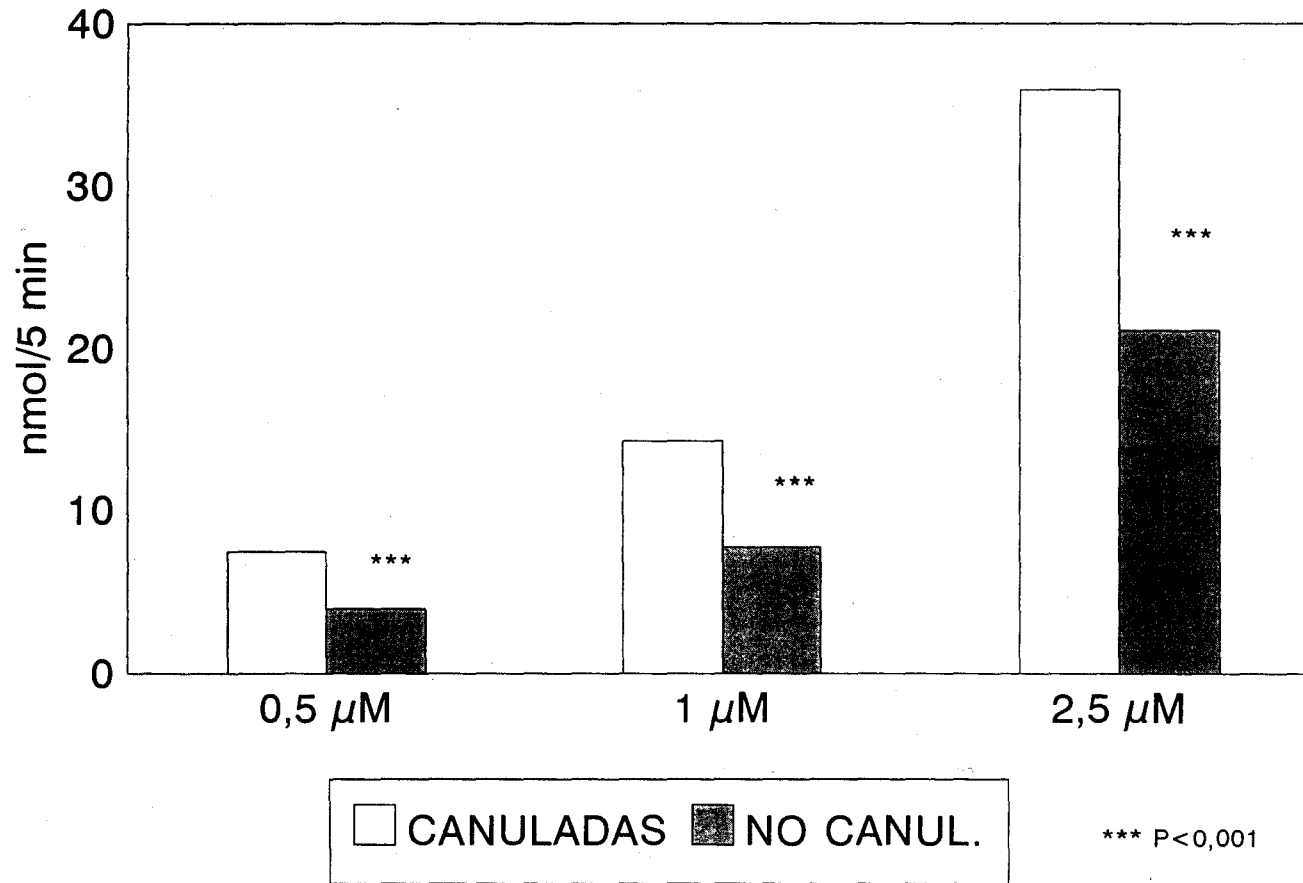


GRÁFICO 8

# ABSORCION TOTAL DE METILTETRAHIDROFOLATO RATAS ALCOHOLICAS

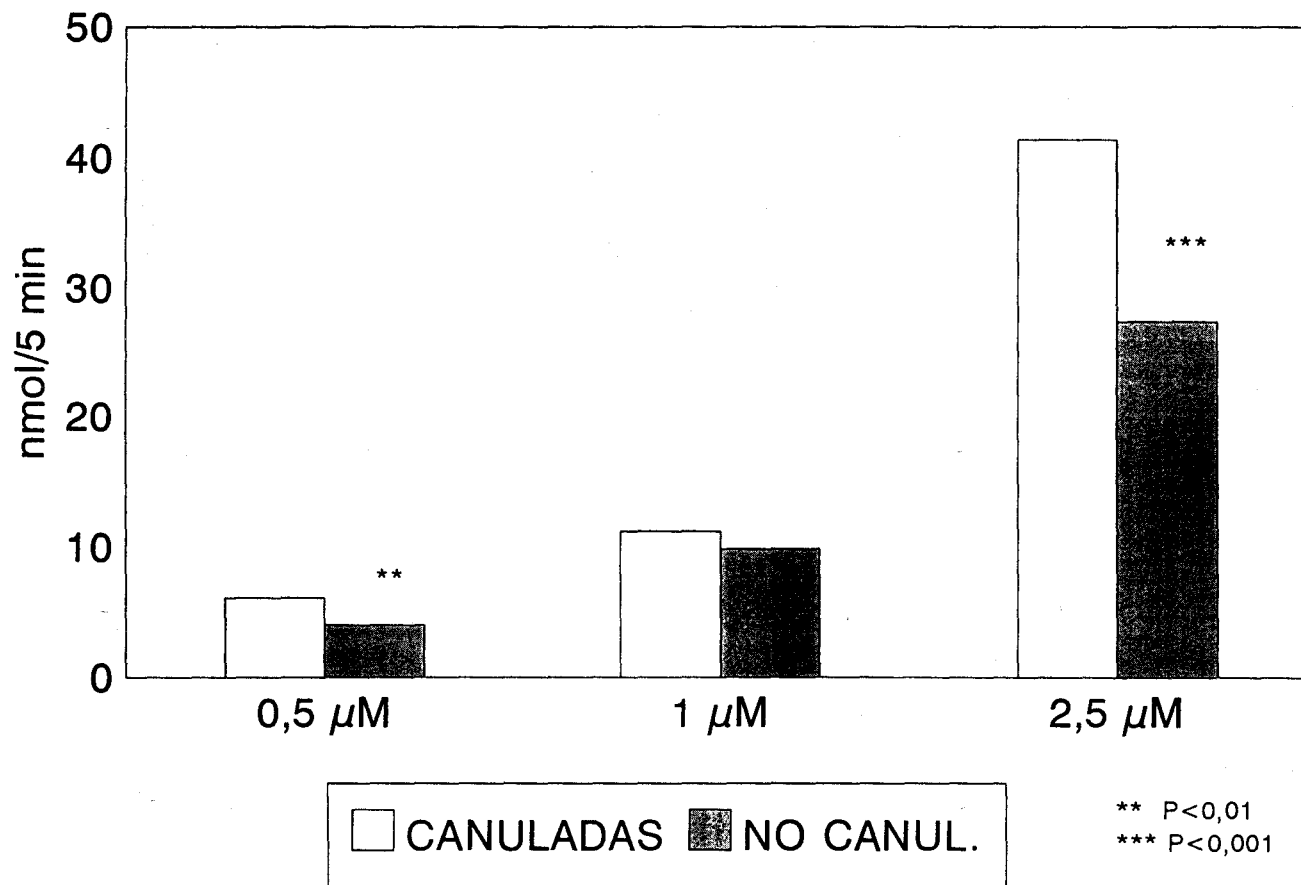


GRÁFICO 9

# PORCENTAJE DE RECIRCULACION DE 5MTHF ABSORBIDO

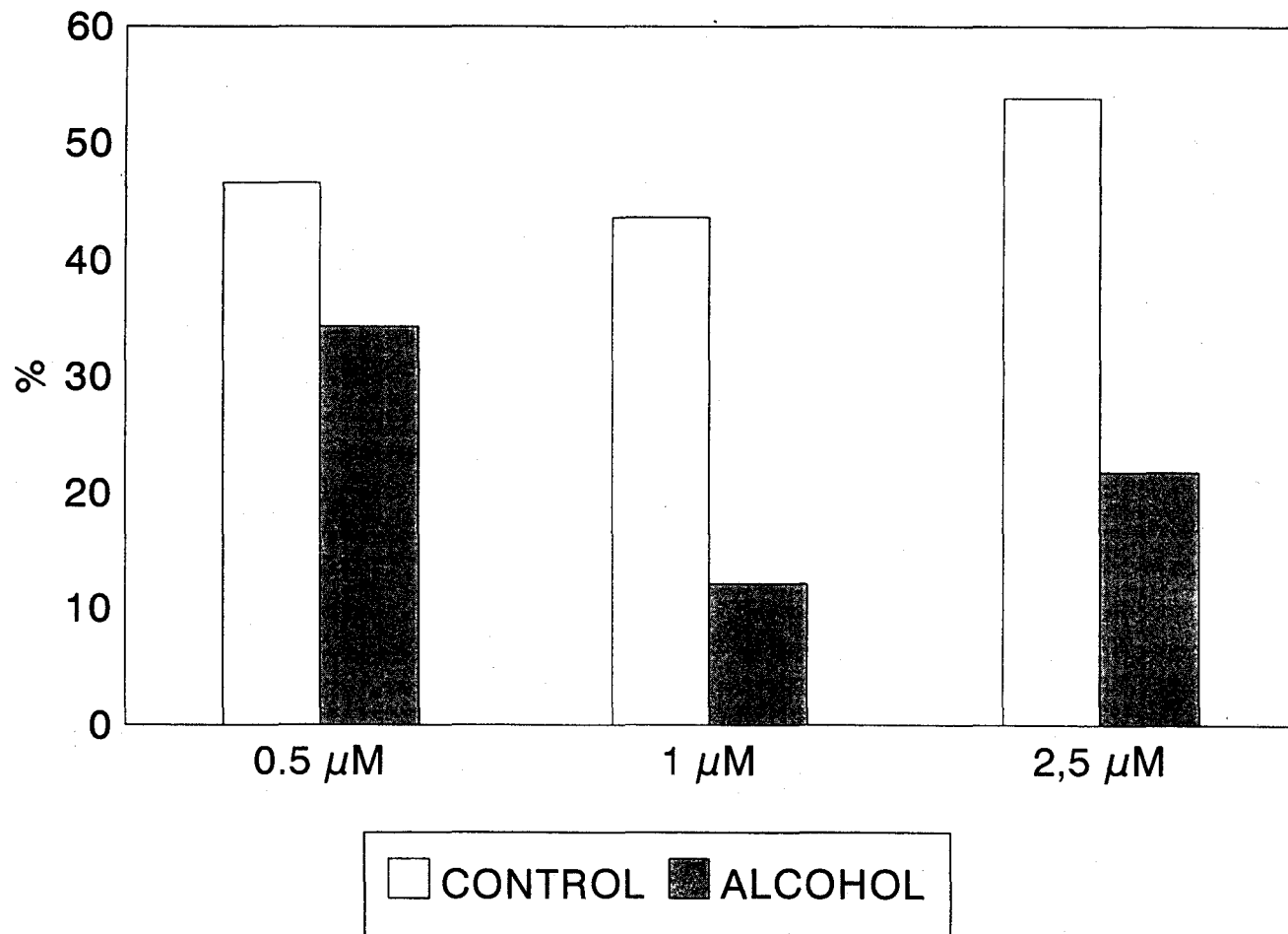


GRÁFICO 10

## DISCUSIÓN



## 5.-DISCUSIÓN

### 5.1.-ESTADO NUTRICIONAL

Los cambios observados en la evolución temporal de la nutrición de las ratas, podemos dividirlos en cuatro etapas:

#### 1ª Etapa:

Período de inducción al etanol. En este período desde el comienzo, ya se hace patente un menor consumo de pienso (GRÁFICO 1) por las ratas que ingieren alcohol, incluso cuando el alcohol está en una proporción del 5 % V/V. El consumo de bebida (GRÁFICO 2) se mantiene sólo un poco por debajo, a pesar de ir aumentando la cantidad de alcohol que ingieren las ratas, debido al incremento en la concentración de alcohol en el agua de bebida. La cantidad de calorías totales (GRÁFICO 3: calorías debidas a la comida más calorías debidas al alcohol) ingeridas, aumenta en las ratas que ingieren alcohol, a pesar de comer menos pienso.

#### 2ª Etapa:

Primer mes de ingesta de alcohol al 30 %. La diferencia del consumo de pienso entre ambos grupos, se hace más patente. Esto unido a un menor consumo de bebida, y por lo tanto de los gramos de alcohol, hace que la cantidad total de calorías que ingieren las ratas con alcohol en su dieta, disminuya haciéndose igual al del lote patrón. A partir de la 7ª semana el crecimiento del peso de las ratas (GRÁFICO 4) es diferente en ambos grupos, mientras que en las ratas con ingesta de

alcohol se estabiliza e incluso disminuye un poco, en las ratas patrones sigue creciendo uniformemente hasta la semana 16ª y a partir de entonces permanece prácticamente constante.

### 3ª Etapa:

En esta etapa (semanas 8 a 12) las ratas recuperan algo el consumo de comida y queda estabilizado a un nivel algo menor que al comienzo del tratamiento con alcohol. En cambio la ingesta de bebida sigue disminuyendo, haciendo que la cantidad de calorías totales ingeridas en el grupo tratado con alcohol, disminuya y quede por debajo del grupo control.

### 4ª Etapa:

A partir del tercer mes, la ingesta de bebida, el consumo de pienso y de calorías totales, así como el peso de las ratas, se estabilizan en ambos grupos, permaneciendo el nivel en las ratas con ingesta crónica de alcohol, por debajo de las ratas patrones, en los cuatro parámetros.

El estudio estadístico de las modificaciones mensuales producidas, a partir del período en que el alcohol está al 30 %, nos indica que las ratas con ingesta crónica de alcohol (TABLA 2) ingieren significativamente menos pienso que las ratas patrones, (TABLA 1). Esta diferencia se mantiene durante los 5 meses y podría explicarse por una sustitución de las calorías de la dieta por las del etanol.

Sin embargo esta sustitución no es completa, pues aunque las ratas alimentadas con alcohol ingieren menos calorías que las patrones, durante casi todo el período de ingesta de alcohol al 30 % en el agua de bebida (TABLA 4), aunque esta diferencia no es significativa.

En cambio Gruchow y cols. (1985) han observado en pacientes con

una ingesta moderada de alcohol, representando un 16 % del total de calorías consumidas, que se produce un ligero incremento en el total de calorías ingeridas. Estos datos se corresponden con lo que ocurre en muestras ratas durante el período de inducción con alcohol (1ª Etapa), en el cual existe una mayor ingesta de calorías totales en estas ratas, con respecto a las patrones (GRÁFICO 3).

Niveles de ingesta de alcohol, hasta un 23 % (Hillers y Massey, 1985), se han asociado con una sustitución de los carbohidratos de la dieta por el alcohol, tal como acontece en la 2ª Etapa (GRÁFICO 3), en la que el consumo de calorías totales llega a igualarse en ambos grupos. En individuos con una ingesta de más del 30 % de las calorías en forma de alcohol, se han detectado también una menor ingesta de proteínas y grasas, y déficit en la ingesta de ciertas vitaminas y minerales.

El mecanismo subyacente de este comportamiento de los sujetos alcohólicos, con respecto a su alimentación no está completamente aclarado. Se ha postulado supresión del apetito, gastroduodenitis, pérdida de la conciencia con la embriaguez y resaca. Todo esto podría explicar el hecho de que las ratas con ingesta de alcohol muy bajas, del orden del 5 % al comienzo de la inducción con alcohol, ya presenten un consumo menor de pienso que las ratas patrones.

La diferencia en la ganancia de peso, entre ambos grupos, es muy significativa a partir del 2º mes (TABLAS 1 y 2), y se mantiene hasta el final: las ratas con ingesta de alcohol sufren un deterioro en su tasa de ganancia de peso.

Colditz y cols, en 1991 analizaron en pacientes el consumo de alcohol junto con la composición dietética y la masa corporal. En este ensayo longitudinal a largo plazo con 90.000 mujeres, encontraron una relación inversa entre la cantidad de alcohol ingerido y la tasa de ganancia de peso. O sea, no sólo el tipo y cantidad de comida ingerida se afectaban por el consumo de alcohol, sino que basándose en la

cantidad total de calorías ingeridas, el consumo de alcohol no permitía mantener la tasa adecuada de ganancia de peso.

En otro estudio en el que sujetos alcohólicos bien nutridos tomaban mayor cantidad de proteínas, carbohidratos y grasas con respecto a los controles, lo que suponía en total un 30 % más de calorías, la tasa de ganancia de peso fue similar en ambos grupos (Leibel y cols, 1993)

Se ha intentado explicar esta menor eficiencia de las calorías del alcohol en la ganancia de peso de las ratas. Lieber y cols. (1991) sugirieron que las calorías del etanol, cuando eran administradas como un suplemento o sustituyendo a las calorías de los alimentos, eran metabolizadas menos eficientemente. Con una dieta que contiene alcohol, aproximadamente un 11 % más de la energía es usada para la producción de calor, comparado con una dieta normal. Estudios previos (Stock y Stuart, 1974) ya habían detectado un aumento de la termogénesis en un 15 %, en ratas después de sólo 10 días de ingesta de alcohol.

Suter y cols (1992) también obtuvieron un valor de la ineficiencia calórica de un 3 a un 11 %. Además calcularon también la disminución del cociente respiratorio con el reemplazo de las calorías del etanol, obteniendo una bajada de 0,84 a 0,82, mientras que se esperaba un valor de 0,80. Esta discrepancia abre la posibilidad de que algunas de las moléculas de acetato liberadas del metabolismo del alcohol puedan haber sido almacenadas en el organismo en forma de grasas.

En un trabajo previo, Reinus y cols. (1989) obtuvieron valores diferentes de la utilización de las calorías del alcohol, hallando un 4 % de ineficiencia en la ganancia de peso, y estos resultados fueron obtenidos utilizando dietas con bajo contenido en grasas. Parece ser que es necesaria una proporción relativamente elevada de grasas para que se de una marcada ineficiencia en la utilización de las calorías del alcohol, y esto parece estar relacionado con el hecho de que las dietas

ricas en grasas inducen el metabolismo de los peroxisomas, en los que se produce la reacción de la catalasa.

El despilfarro de energía como consecuencia de la ingesta de alcohol podría ocurrir también a través de la oxidación de éste por la MEOS, que genera sólo calor sin aparente conservación de la energía química, y posiblemente ésta sea la causa de que el alcohol produzca un gran incremento en la tasa de consumo de oxígeno en ratas alimentadas crónicamente con alcohol (Pirola y Lieber, 1976), ya que el alcohol induce esta vía metabólica, y en estas condiciones el despilfarro de energía se agrava (Pirola and Lieber, 1976).

El alcohol puede también favorecer otras vías catabólicas que no están acopladas de forma efectiva con la formación de enlaces fosforicos en energía, como los pasos iniciales de la degradación de los aminoácidos.

Parte de esta ineficiencia en la utilización de las calorías puede ser más aparente que real, siendo debida a la incapacidad del organismo para oxidar completamente el etanol. Es posible que las dos unidades de carbono del acetato, procedente del metabolismo del alcohol, sean usadas para la síntesis de lípidos, en forma de lipoproteínas o de ácidos grasos, o de ambos. El almacenamiento de las calorías del etanol en forma de lípidos, no produce necesariamente un aumento de peso, ya que los lípidos almacenan calorías de forma muy densa (aprox. 7000 kcal/kg) y pueden desplazar un peso de agua, de forma que resulta en un almacenamiento de calorías sin cambio en el peso (Leibel y cols, 1993).

Aunque no sabemos si se produce un aumento de la termogénesis en nuestras ratas, sí es posible que exista un acúmulo de calorías en forma de grasas, ya que las ratas sometidas a tratamiento con alcohol ingieren significativamente, menor cantidad de líquido (TABLAS 1 y 2) y por tanto de agua que las patrones, lo que podría deberse a una mayor disponibilidad de agua en la rata, al ser desplazada de las células que

acumulan triglicéridos (Lehninger, 1982), lo que podría disminuir la necesidad de hidratación de la rata. Este último efecto parece que tarda en producirse, ya que en nuestras ratas no ocurre hasta la 2ª etapa (GRÁFICO 2).

Debido al menor consumo de bebida, se produce una menor ingesta de alcohol, y por tanto de calorías, lo que también favorece el que las ratas con ingesta crónica de alcohol no experimenten ganancia de peso.

En resumen, parece ser que existe una alteración en la utilización de las calorías del alcohol con respecto a las fuentes normales de energía, que pudiera ser debido a un despilfarro de energía en forma de calor, o un almacenamiento de las calorías en forma de lípidos.

## 5.2.-EFECTO DEL ALCOHOL EN EL pH INTESTINAL

No se observa diferencia significativa entre el pH intestinal medido en ratas patrones y en ratas con ingesta crónica de alcohol (TABLA 8).

El alcohol podría alterar el pH intestinal a través de una perturbación de la secreción gástrica. Se ha establecido que el alcohol puede estimular o inhibir la secreción por diversos mecanismos. A nivel clínico el efecto neto de esa influencia depende del tipo de bebida, la concentración de alcohol y la duración del abuso del alcohol.

Chey y cols. (1972) investigaron el efecto de altas dosis diarias de alcohol (4,4 g/kg) en la secreción ácida gástrica, en perros alimentados con una dieta equilibrada, durante un período de 12 meses. La secreción ácida media basal (BAO) aumentó de 2 a 4 veces durante el primer mes de administración de alcohol y permaneció elevada durante todo el período. La secreción ácida máxima media (MAO) del estómago también aumentó significativamente en el primer mes de consumo crónico de alcohol. El MAO permaneció elevado por 4 meses y disminuyó gradualmente hasta los valores normales los dos meses siguientes.

Por otra parte el alcohol también puede influir en el pH intestinal, alterando la secreción pancreática. Se ha descrito en sujetos alcohólicos crónicos, junto con una hipersecreción de proteínas, un aumento en la secreción pancreática de bicarbonato previo a la manifestación de la enfermedad del páncreas (Neves y cols, 1983).

En perros también se ha comprobado, que tras un período de ingesta crónica de alcohol, la administración de una infusión intravenosa de alcohol produce un incremento en la tasa de secreción de bicarbonato y proteínas (Sarles y cols, 1973)

Todos estos efectos estimulatorios del alcohol, de la secreción ácida gástrica y de la secreción alcalina pancreática, podrían justificar el hecho de que la exposición crónica al alcohol, en las ratas de nuestro experimento, sólo modificara en 0,03 unidades el valor del pH intestinal.



### 5.3.-EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL VOLUMEN DE BILIS

En la rata, a diferencia del hombre, no existe vesícula biliar, y la bilis es conducida directamente desde el hígado al intestino delgado, por el conducto biliar.

Se han llevado a cabo diversos trabajos acerca del efecto del alcohol sobre la secreción de bilis:

Boyer (1972), trabajando con ratas sometidas a ingesta de alcohol durante cuatro semanas, y en las que recogía la bilis antes y durante la infusión de taurocolato, obtuvo los siguientes resultados: por una parte el etanol aumentaba el volumen de bilis recogido a las dos horas, y la proporción de sales biliares antes y después de la infusión de taurocolato sódico; por otro lado el alcohol no alteró las proporciones relativas de colesterol, lecitina y sales biliares, ni la relación fosfolípidos /colesterol.

Este autor sugirió que el incremento en el volumen de bilis estuviera mediado por el aumento de la secreción de sales biliares. También propuso que un gran pool de sales biliares estuviera disponible para la excreción en las ratas alcoholizadas, debido a un efecto en la circulación enterohepática o debido a un incremento en la síntesis hepática de sales biliares a partir del colesterol.

Un año después, Maddrey (1973), estudiando ratas sometidas a ingesta de alcohol durante dos semanas, encontró que cuando los niveles de alcohol en sangre son despreciables, se observa un incremento en el flujo de bilis, además también aumenta la tasa de excreción de sales biliares. El aumento en la secreción de sales biliares, por la exposición al alcohol, contribuye al incremento del flujo de bilis; sin embargo el estímulo de la fracción de bilis dependiente de sales no biliares, representa 2/3 del incremento total del flujo.

Por otra parte Ballantoni y Truong (1992) han comprobado que la administración de glutatión produce un aumento importante de la coleresis en bilis (Ballantoni y Truong, 1992). El aumento del flujo de bilis observado en las ratas sometidas a ingesta moderada de alcohol podría deberse a un aumento del flujo hacia el exterior, del glutatión hepático (Fernandez-Checa y cols, 1987), ya que este grupo observó en hígado de ratas alimentadas con alcohol en la dieta, una disminución moderada en los niveles de glutatión citosólico, y un marcado descenso del glutatión mitocondrial, lo que atribuían a una alteración del flujo hacia el exterior, del glutatión hepático.

Por el contrario, cuando los niveles de etanol en sangre eran elevados, o cuando el etanol era añadido de forma aguda en la perfusión de hígado aislado, disminuía el flujo de bilis. Maddrey (1973) llegó a la conclusión de que el flujo de bilis podía estar aumentado o disminuido según los niveles de alcohol en sangre.

En nuestro trabajo, las ratas están sometidas a una elevada proporción de alcohol en la dieta, lo que según lo expuesto por Maddrey conduciría a una disminución del volumen de bilis en el grupo alcohólico, y así este volumen de bilis disminuye significativamente (TABLA).

Marin y cols. en 1975 trabajando con perros que tenían una fístula crónica observaron que la administración aguda de alcohol producía una moderada disminución del volumen de bilis excretado, y también una disminución de la salida de sales biliares y colesterol. Este efecto puede deberse también a la elevada concentración de alcohol alcanzada en sangre en una exposición aguda al alcohol.

#### 5.4.-FOLATO BASAL EN SUERO Y BILIS

Si observamos la (TABLA 3) de ingesta de folatos, comprobamos que los valores son significativamente menores en el grupo alimentados de forma crónica con alcohol, debido a un menor consumo del pienso que aporta la vitamina. Esta menor ingesta de folatos se corresponde con unos niveles basales de folatos en suero significativamente menores, en las ratas que ingieren alcohol (TABLA 6)

Cuando utilizamos folatos marcados, se ha observado una disminución muy pronunciada de la secreción biliar de folato, medida por diferencia en los valores de absorción entre las ratas con el conducto biliar canulado y aquellas en las que no hubo diversión de la bilis (GRAFICOS 7 y 10). Esta disminución de la secreción biliar de folatos, con la ingesta crónica de alcohol, también se ha constatado midiendo las DPM aparecidas en bilis tras la perfusión intestinal de ácido fólico; los resultados indican que esta diferencia se hace significativa cuando la concentración usada en la perfusión fue de 2,5  $\mu$ M (TABLA 43).

Además hemos comprobado que en las ratas con ingesta crónica de alcohol, se produce una disminución del volumen de bilis excretado a través del conducto biliar (TABLA 5). Este hecho puede enmascarar la disminución de la cantidad de folatos excretados, por concentración del soluto, lo que explicaría que no exista diferencia significativa en las concentraciones basales de folatos en bilis, entre el lote patrón y el lote sometido a ingesta crónica de alcohol (TABLA 7)

Otra explicación de la discrepancia entre los resultados obtenidos en las concentraciones de folatos (TABLA 7) y de folatos marcados que realizan la circulación enterohepática (GRÁFICO 7 y 10), podría ser que se miden efectos diferentes y en tiempos diferentes. Así, con la medida del efecto del alcohol en la cantidad de radiactividad aparecida en bilis, estudiamos el efecto en la circulación enterohepática durante el

tiempo transcurrido en la realización de los experimentos. En cambio, cuando medimos el efecto del alcohol en las concentraciones basales de folatos, estamos teniendo en cuenta todos aquellos factores que podrían afectar directa o indirectamente (por la alteración de los niveles plasmáticos) los niveles hepáticos de folatos, y su liberación a la bilis. Estos factores podrían alterarse a consecuencia del alcohol o de la menor ingesta de folatos en la dieta.

Sobre el efecto de esta menor ingesta se han realizado algunas investigaciones. Así McGuffin y cols. (1975) observaron que al someter a ratas a dieta carente de folatos, los folatos hepáticos se movilizaban paralelamente a la disminución de los folatos séricos.

Eisenga y cols. en 1992 sometiendo a ratas a dieta deficiente en folatos, observaron que los niveles plasmáticos disminuían en una semana, y a los 15 días la cantidad de folatos que aparecía en orina era menor. Además observaron que a los 2 ó 4 meses los folatos en hígado y en otros tejidos disminuían, lo que sugiere, junto con lo observado por los otros autores, que los niveles tisulares y plasmáticos de folatos tienden a equilibrarse. Por otro lado, al administrar a estas ratas PteGlu marcado observaron que en las ratas controles aparecía un 15 % del isótopo administrado, en cambio, en las ratas sometidas a restricción dietética, sólo aparecía un 12,5 % de la dosis en orina, lo que implica un mecanismo renal de retención de folatos en el organismo en estados carenciales.

Hillman y cols. (1977) en estudios previos habían observado que al someter a las ratas a un drenaje de la bilis, se producía una caída brusca de los niveles séricos de folato, pero con el tiempo esta caída se amortiguaba lo que implica una liberación de folatos por parte de los tejidos, cuando caen de forma marcada los niveles en suero.

Por otra parte hay que tener en cuenta también el efecto del alcohol en la distribución de los folatos. Aunque los menores niveles

séricos de folatos en el grupo con ingesta crónica de alcohol, reflejen la menor ingesta de folatos en la dieta, la exposición crónica al alcohol también puede alterar los valores séricos de folatos, ejerciendo efectos sobre la captación o liberación de folatos de los tejidos al torrente circulatorio.

Varios trabajos realizados en ratas (Hillman y cols, 1982) (Collins y cols, 1992) han puesto de manifiesto que el alcohol produce, en general, una mayor tendencia a retener folatos por los tejidos en situaciones carenciales de folatos, lo que sería un obstáculo para que los niveles séricos de folatos se equilibraran a partir del aporte de los tejidos. Por tanto en las ratas utilizadas en nuestro experimento, el hecho de que ingieran alcohol debe favorecer que exista diferencia significativa entre los niveles plasmáticos de folatos del lote patrón y el sometido a ingesta de alcohol (TABLA 6), como ya expusimos anteriormente.

El alcohol también puede alterar la excreción renal de folatos y, por tanto, los niveles plasmáticos de la vitamina. La mayoría de los trabajos revisados sobre este tema, en ratas (McMartin y cols, 1986a), o en monos (Blocker y Thenen, 1987) indicaban que el alcohol administrado de forma crónica produce un aumento de la excreción urinaria de folatos. Sin embargo, un trabajo realizado por McMartin y cols. en 1989 mostraba que aunque en ratas con ingesta apropiada de folatos, el alcohol aumentaba la excreción renal; en ratas sometidas a una dieta pobre en folatos (debido a la tendencia a mantener los niveles séricos adecuados) con ingesta crónica de alcohol, el resultado de ambos efectos era nulo. Esto último es lo que posiblemente ocurrirá en nuestro caso, en donde las ratas sometidas a ingesta crónica ingieren una cantidad de folatos por debajo de lo normal, por lo que se afectaría menos la eliminación renal de la vitamina por el alcohol.

## 5.5.-ABSORCIÓN EN YEYUNO

Said y cols en 1987 comprobaron que la absorción intestinal de folatos es máxima en el yeyuno, tanto en el hombre como en la rata, y en el íleon es del orden de 5 a 10 veces menor.

El transporte mediado de folatos es dependiente del pH del medio. El pH del interior del lumen 6,5-7 no es el ideal para el transporte de folatos, pero 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 en el hombre y en la rata.

En las Tablas 11 y 12 se observa que la absorción de ácido fólico en yeyuno, expresado como picomoles/tiempo/longitud de intestino, es mayor en el grupo con ingesta de alcohol que en el grupo control, siendo significativa esta diferencia sobre todo a los tiempos iniciales de perfusión.

Por el contrario en las mismas condiciones experimentales y expresado en picomoles absorbidos por unidad de tiempo y longitud, no se observan diferencias significativas en la absorción de 5MIHF entre los dos grupos de experimentación (TABLAS 13 y 14).

La relación peso fresco/cm de yeyuno es significativamente mayor en las ratas controles que en las que ingieren alcohol. En cambio no existen diferencias en la relación peso seco/cm de yeyuno (TABLA 10), lo que indicaría que por algún mecanismo, que podría ser osmótico, la ingesta crónica de alcohol disminuye el contenido en agua de la pared del yeyuno.

Cuando la absorción se expresa como nmoles/tiempo/peso fresco (TABLAS 19 y 20) o nmoles/tiempo/peso seco (TABLAS 21 y 22) tampoco se observan diferencias significativas en la absorción de 5MIHF, siendo los

valores mayores en las ratas con ingesta de alcohol. Sin embargo si existen diferencias significativas entre los dos lotes para la absorción de ácido fólico, en todas las concentraciones usadas y a casi todos los tiempos de perfusión, expresado por peso fresco (TABLAS 15 y 16), o por peso seco (TABLAS 17 y 18), acentuándose aún más el aumento de la absorción, si se expresa de esta forma, en el lote sometido a ingesta de alcohol.

Un estudio clínico (Halsted y cols, 1971), había sugerido que la malabsorción de folatos en sujetos alcohólicos crónicos era debida, en parte, al efecto de la deficiencia de folatos en las función del intestino delgado. En este estudio, el transporte "in vivo" de PteGlu marcado disminuyó en pacientes alcohólicos malnutridos, pero no se efectuó en pacientes bien nutridos sometidos a ingesta de alcohol sólo durante dos semanas. Estos resultados no serían comparables a los nuestros, ya que las ratas ingieren alcohol durante cinco meses.

Solomons y cols. (1975) observaron un aumento en el transporte de mono- y poliglutamilfolatos en ratas con ayuno parcial.

Más tarde, Racusen y Krawitt (1977) estudiaron mediante la técnica de sacos evertidos, el efecto del ayuno parcial y del alcoholismo, sólo o combinados con un déficit dietético de folatos, y obtuvieron los siguientes resultados: 1) en las ratas sometidas a ayuno parcial la absorción de folatos aumentaba con respecto a las ratas alimentadas "ad libitum" 2) en las ratas sometidas a ingesta crónica de alcohol y, por tanto, con una menor ingesta de pienso, la absorción de ácido fólico aumentó con respecto a las ratas "ad libitum", pero en menor magnitud que las ratas sometidas a únicamente a ayuno parcial 3) la restricción de folatos en la dieta no produjo ningún efecto significativo en ninguno de tres grupos.

Los resultados obtenidas por Racusen y Krawitt (1977) permiten aclarar en parte los resultados obtenidos en nuestro experimento. El

aumento observado en la absorción de ácido fólico, en las ratas sometidas a ingesta crónica de alcohol y, por tanto, con una menor ingesta de pienso, puede ser debido a este ayuno parcial, ya que parece que no existe efecto alguno de la restricción de folatos en la dieta en la absorción de ácido fólico "in vitro". Parece ser que el efecto del ayuno parcial en el transporte de nutrientes es debido a que los animales malnutridos tienen una elevada razón lípido/proteína en la membrana de las microvellosidades (Butzner y cols, 1990), lo que podría afectar la absorción.

Con respecto al efecto del alcohol, por los resultados de Racusen y Krawitt se deduce que el alcohol administrado de forma crónica, disminuye la absorción de folatos en sacos evertidos, ya que a igualdad de dieta o pair-fed, la absorción de folatos disminuye cuando se incluye en la bebida alcohol.

Por otra parte, en las condiciones experimentales de nuestro estudio "in vivo" (a diferencia de los resultados de Racusen y Krawitt que son "in vitro"), puede existir cierto efecto de los menores niveles de folatos en suero observada en el lote sometido a ingesta crónica de alcohol (TABLA 5). Este nivel disminuido de folatos en suero podría favorecer el componente pasivo del transporte de folatos, y este efecto podría sumarse a la influencia del ayuno parcial, aumentando los valores de absorción en las ratas que ingieren crónicamente alcohol.

Said y Strum (1986), trabajando también "in vitro", con sacos evertidos de intestino de rata, encontraron que el alcohol inhibía la absorción de 5-metilTHF en intestino evertido de rata. Esto podría explicar los resultados obtenidos en nuestro experimento con la absorción de 5MTHF, en el que no observamos alteración alguna en las ratas con ingesta crónica de alcohol con respecto a las ratas patrones alimentadas "ad libitum", ya que podría ser que el efecto favorecedor de la absorción debido al ayuno parcial se contrarrestara con el efecto negativo del alcohol en la absorción.



En cambio Reisenauer y cols.(1989) estudiando la absorción de PteGlu marcado, en el yeyuno de cerdos alimentados con una dieta adecuada, medida por estudios de perfusión "in vivo", no encuentran ninguna alteración en la absorción del isótopo, como consecuencia de la exposición crónica a alcohol. Cuando este estudio se repitió "in vitro" se obtuvieron resultados idénticos (Naughton y cols, 1989)

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren un comportamiento absortivo diferente de la mucosa intestinal del yeyuno, con respecto al ácido fólico y al 5-metilTHF (TABLAS 11 y 13) (TABLAS 12 y 14).

## 5.6.-ABSORCIÓN EN CIEGO

El ciego es parte del tracto gastrointestinal y parece jugar un papel importante en la fisiología intestinal de la rata.

Zimmerman en 1990 realizó una experiencia con yeyuno y ciego humanos en baño de órganos, encontrando que a pH neutro no existía diferencia en la absorción de ácido fólico en yeyuno y en ciego, en cambio a pH 5-6 la absorción en yeyuno era significativamente mayor que en ciego. Además, en el ciego nunca se absorbía el ácido fólico en contra de gradiente de concentración. Estos resultados pueden dar lugar a un modelo de la absorción intestinal de ácido fólico, consistente en dos mecanismos diferentes.

A pH neutro existe un transporte mediado en yeyuno y ciego, ya que era inhibido competitivamente por metotrexato, pero el folato no se transporta en contra de gradiente. Entonces es concebible que a ese pH se absorba el folato por difusión facilitada.

En contraste, a pH 5,5 existe transporte de folatos en contra de gradiente en yeyuno, pero no en ciego. El transporte en éste último no se modificó con la disminución del pH. Esto indicaría que a pH ácido podría existir un transporte activo en el yeyuno, que no se da en el ciego del hombre.

En nuestras ratas los resultados han sido los siguientes: En el rango de concentraciones estudiadas en las ratas patronas, la absorción en ciego es un 57 % de la absorción en yeyuno; y por otro lado la absorción de 5-metilTHF en ciego representa un 67 % de la absorción en yeyuno, o sea un porcentaje mayor. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Zimmerman en intestino humano, es decir la absorción en yeyuno es mayor que en ciego. De acuerdo con nuestros resultados, la absorción de ácido fólico en el ciego es aproximadamente la mitad que

en el yeyuno, lo que indica que en la rata el ciego juega un papel más importante en la absorción de folatos que el íleon, pues según Said y cols. (1987) la absorción ileal de folatos es de 5 a 10 veces menor que en el yeyuno.

Además los valores de absorción de ácido fólico son mayores que los de 5-metilTHF en el ciego (TABLAS 23 y 25) (TABLAS 24 y 26), siendo el comportamiento semejante al observado en el yeyuno.

En cambio, hemos observado una alteración en el ciego que no se produce en el yeyuno, como consecuencia de la ingesta crónica de alcohol. Hemos calculado la superficie del ciego en ambos lotes y hemos encontrado (TABLA 9) que es significativamente mayor en el lote con ingesta de alcohol. Este resultado coincide con los datos previamente obtenidos en nuestro laboratorio (Carreras y cols, 1994), en el que también se constató una mayor superficie del ciego en las ratas que ingieren alcohol.

También hemos calculado el peso fresco y el peso seco del ciego en ambos lotes, y la diferencia entre ambos pesos, que se corresponde con el agua no ligada del tejido. Al hacer los cálculos estadísticos hemos encontrado que en las ratas con ingesta de alcohol, la cantidad de agua del ciego es significativamente mayor (TABLA 9).

Entre las mecanismos responsables de esta alteración del tejido podemos encontrar lesiones reversibles como la tumefacción hidrópica o cambios ultraestructurales. O bien podría ser una lesión irreversible como atrofia, hipertrofia, hiperplasia, metaplasia, displasia o almacenamiento intracelular.

Las características del fenómeno observado, con gran acumulación de agua en el tejido, nos hace pensar que se da un proceso de tumefacción hidrópica, en el que las células lesionadas aumentan de tamaño debido a una acumulación de sodio en la célula y la consiguiente

entrada de agua en el citoplasma. Esta tumefacción puede ser producida por causas tan dispares como infecciones, isquemia, exceso de calor o frío, o toxinas como el alcohol. Esta última causa se ha puesto en evidencia en hepatocitos humanos (Rubin y Farber, 1986)

Cuando se estudia el efecto del alcohol en la absorción de ácido fólico expresado en función del tiempo, en ciego, se observa un aumento de la absorción, aunque esta diferencia sólo es significativa en algunos casos (TABLAS 23 y 24). En cambio cuando se expresan los valores de absorción como  $\text{nmol}/\text{tiempo}/\text{cm}^2$  de superficie sometido a perfusión, los valores son menores en el lote con ingesta crónica de alcohol, siendo significativa a las concentraciones de 1 y 2,5  $\mu\text{M}$  (TABLAS 27 y 28). Esta inversión de resultados puede explicarse por el aumento en la superficie del ciego de las ratas expuestas al alcohol, posiblemente debido a una acumulación de agua en sus células (TABLA 9). Cuando comparamos los valores de absorción expresados como  $\text{nmoles}/\text{tiempo}/\text{g}$  de peso fresco (TABLAS 31 y 32), o como  $\text{nmoles}/\text{tiempo}/\text{g}$  de peso seco (TABLAS 35 y 36) no observamos diferencias significativas, salvo algún caso aislado, entre el lote patrón y el lote expuesto a ingesta crónica de alcohol.

Al comparar los valores de absorción de 5MTHF/tiempo en el lote patrón y en el lote sometido a ingesta crónica de alcohol, (TABLAS 25 y 26) se observa un aumento de la absorción, al igual que en el yeyuno, pero este aumento en general no es significativo. En cambio cuando se expresa la absorción/ $\text{cm}^2$  de superficie (TABLAS 29 y 30), obtenemos que la absorción es menor en las ratas sometidas a ingesta crónica de alcohol, siendo esta diferencia significativa a 0,5  $\mu\text{M}$ , y en las demás concentraciones en los tiempos iniciales de perfusión. Esto podría ser debido, como en el caso del ácido fólico, al aumento significativo que experimenta la superficie del ciego con el alcohol. Al igual que en el caso del ácido fólico no encontramos, salvo excepciones, diferencias significativas en los valores de absorción expresados como  $\text{nmoles}/\text{tiempo}/\text{g}$  de peso fresco (TABLAS 33 y 34) o como  $\text{nmoles}/\text{tiempo}/\text{g}$  de peso seco (TABLAS 37 y 38).

Los resultados obtenidos en el ciego, con respecto al efecto del alcohol, coinciden con los obtenidos en el yeyuno en que se produce un aumento del transporte de folatos en las ratas con ingesta crónica de alcohol. Este aumento puede ser atribuible, como en el caso del yeyuno, al efecto del ayuno parcial (Racusen y Krawitt, 1977). No obstante pensamos que la disminución de los niveles séricos de folatos podrían jugar un papel importante, ya que parece ser que el proceso de transporte transcurre por difusión facilitada, la cual se favorece en gran medida cuando el gradiente positivo de concentración está aumentado. Al igual que con el yeyuno, el alcohol actuaría contrarrestando en parte estos dos efectos favorecedores del transporte de folatos en el ciego, por lo que el incremento producido no es tan grande como cabría esperar.

Los valores obtenidos en nuestras experiencias "in vivo", en patrones y en ratas que ingieren alcohol, no lo hemos podido comparar con otros resultados preexistentes, pues no hemos encontrado en la revisión bibliográfica ningún estudio de absorción de folatos en ciego, realizado "in vivo".

## 5.7.-COMPARACIÓN DE VALORES DE ABSORCIÓN DE 5MIHF Y ÁCIDO FÓLICO

Los resultados muestran que la absorción de ácido fólico, en yeyuno (TABLAS 13 y 14) y en ciego (TABLAS 25 y 26), es significativamente mayor que la de 5MIHF, en los animales tratados con etanol y en los controles.

Esto no coincide plenamente con lo resultados de otros trabajos. Así Bhandari y Gregory (1992) encontraron que cuando administraban folatos radiactivos intragástricamente, y determinaban la desaparición del isótopo del lumen intestinal a las 8 horas, el isótopo que se encontraba en menor cantidad en los ensayos realizados por separado, era el ácido fólico, lo que sugiere que se absorbe en mayor cantidad que el 5MIHF, sin embargo, la diferencia entre las dos especies de folatos no era significativa.

En cambio en nuestro trabajo, la diferencia entre la absorción de ambos es muy significativa ( $P < 0,001$ ). Esto ocurre a todas las concentraciones y a los distintos tiempos.

La causa de esta diferencia no está clara, pero pensamos que podría ser que el transporte de ácido fólico por la membrana basolateral fuera mejor que para el metiltetrahidrofólico. Y el ácido fólico que se absorbe sin reducir se absorbería más fácilmente que el que se reduce a 5MIHF, dando un resultado neto de absorción superior, en nuestros experimentos, para el ácido fólico que para el 5MIHF.

## 5.8.-ABSORCIÓN DE FOLATOS EN SUPERFICIE TOTAL DEL INTESTINO

Los experimentos de absorción fueron llevados a cabo, usando un medio de perfusión con folatos a concentraciones fisiológicas ( $<10 \mu\text{M}$ ), en el intestino completo. El pH usado fue de 5,5 a 6,5, comúnmente encontrado en el intestino delgado del hombre, así como en el intestino de la rata (Lucas y cols, 1976) y que ha sido descrito como el óptimo para el transporte de folatos en el intestino (Rosenberg y Selhub, 1986).

La absorción intestinal de folatos ocurre principalmente en el yeyuno por medio de dos mecanismos: por un proceso dependiente del pH (Said y cols, 1987) y por un componente no saturable que implica difusión pasiva (Said y cols, 1988)

Said (1988) comprobó que en el íleon de ratas el transporte de ácido fólico no era afectado por inhibidores del transporte o por la presencia de 5-MTHF, lo que indica que se realiza por un mecanismo pasivo o poco saturable.

Existen trastornos gastrointestinales que alteran la absorción de folato, como la gastritis atrófica que produce disminución del transporte (Russell, 1986), o la insuficiencia pancreática que aumenta la absorción (Russell y cols, 1979). Estos efectos parecen estar mediados por alteraciones en el pH intraluminal.

Estudios morfométricos han mostrado (Persson y cols, 1990) que la altura de las vellosidades intestinales y de la superficie de la mucosa están reducidas en pacientes alcohólicos con respecto a los sanos. Aunque en nuestro departamento y con ratas en las mismas condiciones experimentales no se encontró alteración en esta longitud (Pérez Santos, 1986).

Halsted y cols. (1971), observaron en el hombre que el etanol no tenía efecto cuando la dieta era adecuada. Pero posteriormente en 1973 este grupo describió una disminución en el transporte yeyunal de ácido fólico en pacientes alcohólicos comparados con los abstinentes. Hallazgos similares fueron encontrados en monos por Romero y cols. (1981).

Estudios posteriores no observaron efectos inhibitorios del alcohol (Reisenauer y cols, 1989) en la absorción yeyunal de ácido fólico, cuando se experimentaba con cerdos.

Nuestros resultados muestran que la absorción de ácido fólico por la superficie total del intestino fue similar en las ratas controles y con ingesta de alcohol, cuando la concentración en el medio de perfusión fue de 2,5  $\mu\text{M}$  (TABLA 39). Sin embargo cuando en la perfusión se utilizaron bajas concentraciones (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) observamos un aumento (significativo A 1  $\mu\text{M}$ ) en el grupo con ingesta de alcohol. Estos datos parecen indicar un aumento en el transporte activo después de ingesta crónica de alcohol.

La absorción de 5MTHF fue menor que la de ácido fólico, cuando las condiciones del experimento fueron similares (TABLAS 39 Y 41). El efecto del alcohol en estos parámetros muestran interesantes aspectos. Said y Strum (1986) trabajando con intestino evertido de ratas, a las que sometía a ingesta crónica o aguda de etanol, llegaron a la siguiente conclusión: el etanol inhibe la absorción de 5MTHF 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. Estos resultados indicaban 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.



Bajo nuestras condiciones experimentales, a bajas concentraciones de sustrato ( $0,5 \mu\text{M}$ ), el transporte de 5MTHF no mostró diferencias significativas entre los dos grupos de animales estudiados (TABLA 41). Cuando la concentración de 5MTHF fue de 1 y  $2,5 \mu\text{M}$ , obtuvimos unos valores de absorción superiores (significativo a  $2,5 \mu\text{M}$ ) en el grupo con ingesta de etanol. Esto podría sugerir que, cuando el sustrato ensayado es el 5MTHF a altas concentraciones, se producen preferentemente procesos difusivos, como un mecanismo de adaptación frente a la ingesta de alcohol. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos por Strum y cols. (1971) quienes encontraron que el transporte de MTHF se produce preferentemente por difusión, y con Bjarnason y cols. (1984) que encontraron mayor permeabilidad intestinal en pacientes alcohólicos que en controles.

Comparando los resultados del estudio de absorción en la superficie total del intestino, con los de la doble perfusión en yeyuno y ciego, podríamos postular que existe una importante disminución de la absorción de folatos en el íleon de las ratas debido a la ingesta de alcohol, lo que podría explicar la disminución de la absorción de folatos encontrada en monos (Romero y cols, 1981) (Blocker y cols, 1987) que ingieren alcohol en su dieta.

## 5.9.-ABSORCIÓN DE FOLATOS EN INTESTINO COMPLETO. INFLUENCIA DE LA CANULACIÓN DEL CONDUCTO BILIAR.

Con la finalidad de cuantificar la CEH de folatos y su posible modificación por el alcohol, hemos canulado el conducto biliar para evitar el reingreso por la CEH de folatos al intestino y simultáneamente valorado el volumen de bilis y los folatos excretados por el hígado.

Nuestros resultados muestran que la absorción de ácido fólico (expresado como nmol/min.) por la superficie total del intestino en las ratas controles (TABLA 40), fue similar a la de las ratas con ingesta de alcohol, cuando la concentración en el medio a perfundir fue de 0,5  $\mu\text{M}$ . No obstante, obtuvimos disminuciones significativas en las ratas con ingesta de alcohol con respecto a las controles, a concentraciones más altas de ácido fólico (1 y 2,5  $\mu\text{M}$ ).

Con estas condiciones experimentales (TABLA 42), a concentraciones de sustrato de 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ , la absorción de 5-metiltetrahidrofolato en las ratas alcohólicas fue menor que para las controles, aunque esta diferencia fue solo significativa a 1  $\mu\text{M}$ . En cambio a la concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  se produce un aumento, no significativo, de la absorción en las ratas con ingesta crónica de alcohol.

La absorción de ácido fólico y 5MIHF es mayor en las ratas con el conducto biliar canulado que en las ratas no canuladas, tanto en las ratas alcohólicas (GRÁFICOS 6 Y 9) como en patrones (GRÁFICOS 5 Y 8), esto es debido a que en las canuladas la bilis no llega al intestino delgado, por tanto tampoco el ácido fólico o 5MIHF contenido en ellos. Como la absorción se determina por la diferencia de radiactividad en el líquido de perfusión, al principio y al final; si al final hay menos radiactividad porque se ha desviado la radiactividad biliar, la diferencia será mayor.

Cuando se calcula el porcentaje del ácido fólico (GRÁFICO 7) y/o 5MTHF (GRÁFICO 10) absorbido que reingresa en el intestino por la CEH (por la diferencia de absorción entre las ratas canuladas y no canuladas), en las ratas patrones este porcentaje es de un 48,02 % para el 5MTHF y de un 49,37% para el ácido fólico. Lo que coincide con los resultados obtenidos por Steinberg y cols. (1979) en ratas, quien afirma que aproximadamente un 50 % de los folatos que alcanzan los tejidos periféricos puede explicarse por este proceso de recirculación. Sin embargo estos autores hallaron que tras administrar a la rata una dosis de folato marcado, tarda aproximadamente 4 horas en aparecer el 50 % de la radiactividad administrada en la bilis, mientras que en nuestras ratas tarda aproximadamente una hora en aparecer el 50 % del ácido fólico o el 5MTHF absorbido.

En cambio cuando se hacen estos cálculos en las ratas alcohólicas, los valores son de 22,72 % para el 5MTHF y de 18,01 % para el ácido fólico. Esto indica una menor intensidad de la CEH de folatos en ratas que ingieren alcohol crónicamente. Estos cálculos se corresponden con los diferentes cantidades de radiactividad encontrada (TABLAS 43 Y 44) en la bilis recogida en las patrones y las alcohólicas, siendo menor en las ratas que ingieren alcohol.

Al revisar los efectos del alcohol sobre el folato contenido en el hígado, se observan que los resultados varían según las condiciones experimentales: ingesta aguda o crónica de alcohol. Así en ratas, según Hillman y cols (1977), la ingesta aguda de alcohol aumenta la incorporación de folato al hígado, mientras que para Wilkinson y Shane (1982) cambia mínimamente con la ingesta aguda.

Keating y cols.(1983) realizaron sus estudios en ratas a las que les administraron de forma crónica alcohol, y no encontraron diferencias apreciables en los valores de folato hepático, al compararlo con las ratas controles. Sin embargo, sí estaba aumentado el nivel de folilpentaglutamatos, lo que podría explicar en parte la disminución de

folatos séricos encontrado en las ratas que ingieren alcohol de forma crónica. Este aumento de folilpoliglutamatos hepáticos podría ser en parte responsable de la disminución de folatos excretados por la bilis, comentado anteriormente en nuestros resultados.

Inicialmente se creía que estos resultados estaban relacionados con problemas dietéticos de malnutrición derivados de la ingesta, pues los sujetos alcohólicos con buena nutrición no muestran deficiencia de folatos. Sin embargo los alcohólicos crónicos con anemia megaloblástica, suplementados con folato en la dieta a una dosis de PteGlu de 75 mg/día, que normalmente corrige la megaloblastosis, debida al déficit de folatos, tardaron mucho más tiempo en recuperar el estado normal cuando continuaban bebiendo alcohol. Como consecuencia debe existir alguna relación entre el alcohol y el metabolismo de folatos, lo que ha sido estudiado por numerosos autores (Halsted, 1980) (Hillman y Steinberg, 1982).

Se ha estudiado en primates no humanos (Romero y cols, 1981) los efectos de la ingestión crónica de alcohol sobre la absorción de ácido fólico marcado, pero ingiriendo una dieta balanceada, y observaron una disminución significativa en la absorción de folatos y en el contenido hepático de folatos.

Según Lane y cols. (1976), el alcohol aumenta la retención de folatos intracelular, con disminución de la liberación, lo que produce interferencias con la CEH normal de folatos, esto coincide con nuestros resultados. Además Valera y Selhub (1992) han puesto de manifiesto que cuando hay un déficit de folatos en suero, como sucede en nuestro caso (TABLA 6), aumenta la síntesis de los hexa y heptaglutamatos, que quedan almacenados en el hígado, disminuyendo la forma predominante con cinco glutamatos, por tanto disminuye la liberación de folatos a través de la bilis y esta alteración de la CEH puede producir a su vez una caída aguda de los niveles de folato en suero (Steinberg y cols, 1979)

No obstante, el efecto del alcohol sobre los sistemas de transporte de folatos en el hígado es controvertido. Parece que,

mientras que el alcohol inhibe la entrada de ácido fólico (Horne y cols, 1979), e inhibe la incorporación de folato exógeno (Tamura y Halsted, 1983), aumenta específicamente el transporte de 5MTHF, por un proceso dependiente del metabolismo del alcohol y probablemente relacionado con los cambios en la relación citosólica NADH/NAD (Horne y cols, 1979).

Hillman y cols. (1977) sugieren que en ratas el alcohol produce una marcada disminución en los folatos biliares y un aumento en la formación de folilpoliglutamatos que indicaría que el alcohol bloquea la excreción biliar de folatos. Así ellos concluyen que el alcohol bloquea la CEH.

Steinberg y cols (1982) desarrollan un modelo animal usando fibrosarcomas implantados subcutáneamente para estudiar la cinética "in vivo" de folato, y concluyen que el efecto del alcohol contrasta con el del déficit de folato, en los que el folato intrahepático era movilizado tanto como caían los niveles de folato sérico. Esto sugiere una vez más que el alcohol inhibe la CEH.

Sin embargo estudios posteriores del grupo de Ging y cols. (Tomado de Weir y cols, 1985) han demostrado que el alcohol tiene un efecto marginal sobre la forma hepática de folato, pero no tiene efectos sobre la excreción biliar de folatos. Para estos autores el factor regulador de la excreción de folatos a la bilis es el grado de déficit de folatos en suero e hígado y esto ocurre a pesar de que el animal beba o no alcohol. Por lo que según ellos, es incierto que el alcohol produzca un bloqueo de la CEH.

A pesar de esto, estudios realizados en ratas (McMartin y cols, 1986) sugieren que la ingesta de alcohol produce un aumento marcado en la excreción renal de folatos, y el efecto del alcohol disminuyendo la folemia sería debido a un aumento en la excreción renal más que su interferencia con el metabolismo del folato hepático. Este grupo ha

mostrado que el efecto del alcohol sobre la excreción de folatos está relacionado con la dosis y con la duración del tratamiento.

Según todo lo expuesto, podría ser que el alcohol disminuyera la CEH de folatos, no de forma directa sino indirectamente porque aumente la excreción renal de folatos, lo que disminuiría los niveles de folatos séricos, y como hemos dicho anteriormente la CEH de folato está relacionado principalmente con el folato sérico. Por tanto si disminuye, puede ser que disminuya paralelamente la excreción biliar de folatos.

En 1989 McMartin, Collins y Bairnsfather, estudiaron en ratas el efecto del alcohol ingerido durante 12 semanas, suplementadas o no en la dieta con folato. La excreción urinaria aumenta en ratas que ingieren alcohol y folato pero no en ratas con déficit de folato e ingesta de alcohol. Las ratas que consumían dietas deficientes en folato tenían una rápida disminución en la excreción urinaria de folatos, lo que sugiere una adaptación renal para conservar folatos. Los niveles tisulares y plasmáticos de folato prácticamente no se afectaban por la ingestión de alcohol, en ratas con ingesta deficitaria de folatos.

Los resultados sugieren que en ratas que consumen dieta de alto contenido en folato, la ingesta crónica de alcohol aumenta la excreción de folatos, pero no en suficiente magnitud para afectar de forma importante a la homeostasis de folato.

Como se observa cuando se comparan los resultados de absorción total de ácido fólico o 5MTHF (TABLAS 39 Y 41) en ratas, controles o que ingieren alcohol de forma crónica, los valores son mayores en el segundo grupo, aunque la diferencia no es significativa. Teóricamente esto indicaría que el alcohol no sólo no disminuye la absorción de folatos como afirman algunos autores (Said y Strum, 1986), sino que incluso la aumentan.

Por el contrario hemos visto que en las ratas canuladas los resultados son opuestos, pues la absorción es mayor para las patrones como era de esperar ya que el alcohol produce alteraciones histológicas a nivel del yeyuno (Peerson, 1991). La causa de esta diferencia según lo expuesto es la disminución de la CEH de folato que se produce en las ratas que ingieren alcohol. Lo que pone de manifiesto el error metodológico que se produce cuando se estudia la absorción intestinal de folatos sin desviar la bilis mediante canulación del conducto biliar.

## CONCLUSIONES



## 6.-CONCLUSIONES

1.-No existen diferencias significativas en el consumo calórico entre ambos grupos, sin embargo, sí se produce una disminución significativa en la ganancia de peso en las ratas alcohólicas, lo que podría deberse a un acúmulo de calorías en forma de grasa.

2.-La ingesta crónica de alcohol no modifica el pH.

3.-El volumen de bilis disminuye en las ratas que ingieren crónicamente alcohol.

4.-Las ratas que beben alcohol en el agua de bebida, consumen significativamente menos folato que las patrones y sus niveles basales en suero también son menores. Sin embargo no existen diferencias entre ambos grupos en los valores basales de fólico en bilis.

5.-La absorción yeyunal de ácido fólico, aumenta a todas las concentraciones estudiadas, a los 15 y 30 minutos de perfusión, en el grupo de ratas que ingieren alcohol crónicamente, lo que puede deberse a un aumento del gradiente debido a una disminución en el folato sérico que se produce en este grupo.

6.-La absorción yeyunal de MTHF no se modifica de forma significativa en ratas con ingesta crónica de alcohol con respecto a las patrones.

7.-En las ratas que ingieren crónicamente alcohol, aumenta de forma significativa la superficie del ciego respecto a las controles, provocado probablemente por un acúmulo de agua intracelular.

8.-En ciego la absorción de ácido fólico y 5MTHF en nmoles/tiempo no varía significativamente en las ratas que ingieren alcohol con respecto a las controles. Sin embargo, cuando los resultados se expresan por pmoles/tiempo.cm<sup>2</sup> disminuye la absorción de fólico y 5MTHF, debido al aumento en la superficie del ciego.

9.-Al comparar la absorción de fólico o 5MTHF entre ciego y yeyuno en el rango de concentraciones estudiadas en las ratas patrones, la absorción de fólico en ciego es un 57 % de la del yeyuno y la del 5MTHF un 67 %.

10.-La absorción de fólico en yeyuno y ciego es significativamente mayor que la del 5MTHF tanto en alcohólicas como en patrones, para todas las concentraciones y a los distintos tiempos.

11.-La absorción de ácido fólico a través de toda la superficie intestinal tiende a ser mayor en ratas alimentadas con alcohol que en controles (significativo a 0,5  $\mu\text{M}$ ), sin embargo a la concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  es algo menor. Estos resultados se invierten cuando se canula el conducto biliar, haciéndose significativamente menor para las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$ , en el grupo de ratas sometidas al tratamiento con alcohol.

12.-La absorción total de 5MTHF aumenta a las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$  (significativo el último) , mientras que a la concentración 0,5  $\mu\text{M}$  se observa que es prácticamente igual, en las ratas con ingesta crónica de alcohol. Cuando se canula el conducto biliar la absorción es menor en las ratas sometidas a ingesta de alcohol, siendo significativa la diferencia para la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, a la concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  la absorción total de 5MTHF es ligeramente mayor.

13.-El porcentaje de ácido fólico absorbido que reingresa en el intestino por la CEH en los patrones es del 48 % para el 5MTHF y 49 %

para el ácido fólico. En ratas tratadas con alcohol, estos porcentajes son de 22 % para el 5MTHF y de 18 % para el ácido fólico, lo que indica una menor intensidad de las CEH de folatos en las ratas que ingieren alcohol crónicamente. Esto explica las diferencias encontradas al comparar los resultados entre los dos grupos experimentales, canuladas o no canuladas.

## BIBLIOGRAFÍA

## 7.-BIBLIOGRAFÍA

Admirand WH, Cronholm T and Sjövall J: Reduction of dehydroepiandrosterone sulfate in the liver during ethanol metabolism. *Biochem.Biophys.Acta*, 202, pp:343-348, 1970

Antony AC, Kane MA, Portillo RM, Elwood PC and Kolhouse JF: Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells. *J.Biol.Chem.*, 260, pp: 14911-14917. 1985

Antonsson DL, Barak AJ and Vanderhood IA: Effect of acute and chronic ethanol ingestion on zinc absorption. *Clin.Res.*, 26, 660A, 1978

Badcock J and Tomkins AM: Effect of folate deficiency on crypt and villus cells isolated from gut epithelium. *Proc.Nut.Soc.* A50. 1978

Baggott JE, Morgan SL, HA T, Vaughn WH and Hine RJ: Inhibition of folate-dependent enzymes by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem.J.* 282, pp:197-202. 1992

Baker SJ, Kumar S and Swaminathan: Excretion of folic acid in bile. *The Lancet*. March 27, pp:685. 1965

Ballatori N and Truong AT: Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am.J.Physiol.*, 263, pp:G617-G624, 1992

Baraona E, Julkunen R, Tannerbaum L and Lieber CS: Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats.

Gastroenterology, 90, pp:103-110, 1986

Baugh CM, Krumdieck CL and Butterworth CE: Absorption of folic acid poly- $\gamma$ -glutamates in dogs. J.Nutr., 105, pp:80-89, 1975

Beck WS: Drugs and the intestinal absorption of folate. J.Lab.Clin.Med., 108, pp:263-264. 1986

Bhandari SD, Joshi SK and McMartin KE: Folate binding and transport by rat kidney brush-border membrane vesicles. Biochim.Biophys.Acta, 937, pp:211-218, 1988

Bhandari SD and Gregory III JF: Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity. Am.J.Clin.Nutr. 51, pp:87-94. 1990

Bhandari SD and Gregory III JF: Folic acid, 5-methyl-tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats. J.Nutr. 122, pp:1847-1854, 1992

Bjarnason I, Ward K and Peters TJ: The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. Lancet. I, pp:179-182, 1984

Björneboe GE, Björneboe A, Johnsen J, et al. Calcium status and calcium-regulating hormones in alcoholics. Alcohol.Clin.Exp.Res., 12, pp:229-232, 1988

Blair JA and Matty AJ: Acid microclimate in intestinal absorption. Clin.Gastroenterol., 3, pp:183-197, 1974

Blakeborough and Salter DN: Folate transport in enterocytes and brush-border-membrane vesicles isolated from the small intestine of the neonatal goat. Brit.J.Nutr., 59, pp:485-495, 1988

Blakey RL: Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986. Eur.J.Biochem., 168, pp:251-253, 1987

Blocker DE and Thenen SW: Intestinal absorption, liver uptake, and excretion of <sup>3</sup>H-folic acid in folic acid-deficient, alcohol-consuming nonhuman primates. Am.J.Clin.Nutr. 46, pp:503-510, 1987

Bode JC: Alcohol and the gastrointestinal tract. Adv.Intern.Med.Pediatr., 45, pp:1-77, 1980

Bode JC, Knuppel H, Schwerk W, Lorenz-Meyer H, Durr HK: Quantitative histomorphometric study of the jejunal mucosa in chronic alcoholics. Digestion, 23, pp:265-270, 1982

Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. Hepatogastroenterol, 31, pp:30-34, 1984

Bode Ch, Kolepke K, Schäfer K and Bode JC: Hydrogen breath test in alcoholics: evidence for bacterial overgrowth in the small intestine. Ale Alcoholism, 24, pp:368, 1989

Boles JM, Youinou P and Garre M: La carence en acide folique: fréquence chez 480 malades. Conséquences sur la phagocytose. La Revue de Médecine Interne, 111, pp:51-56, 1982

Botez MI and Lambert B: Acide folique, grossesse et système nerveux. Union médicale du Canada, 108, pp:839-849, 1979

Boyer JL: Effect of chronic ethanol feeding on bile formation and secretion of lipids in the rat., 62, pp:294-301, 1972

Breen KJ, 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, pp:121-126, 1985

Brown JP, Davidson GE, Scott JM and Weir DG: Effect of diphenylhydantoin and ethanol feeding on the synthesis of rat liver folates from exogenous pteroylglutamate (<sup>3</sup>H). *Biochem.Pharmacol.*, 22, pp.2387, 1973

Butzner JD, Brockway PD and Meddings JB: Effects of malnutrition on microvillus membrane glucose transport and physical properties. *Am.J.Physiol.*, 259, G940-G946, 1990.

Carreras O, Murillo ML, Delgado MJ and Bolufer J.: Galactose absorption after jejunal bypass in rats. *Nutr.Rep.Int.*, Vol 38, pp: 1219-1229, 1988

Carreras O, Delgado MJ and Murillo ML: D-Galactose absorption for the whole intestinal surface after different types of resection and bypass. *Scand.J.Gastroenterol.*, 24, pp:304-308, 1989

Carreras O, Vazquez AL, Rubio JM, Delgado MJ y Murillo ML: Effect of chronic ethanol on D-galactose absorption by the rat whole intestinal surface. *Alcohol*, Vol.9, pp:83-86, 1991

Carreras O, Vazquez AL, Rubio JM, Delgado MJ y Murillo ML: The effect of ethanol on intestinal L-leucine absorption in rats. *Arch.Inter.Phys.Biochim.Biophys.*, 101, pp:13-16, 1993

Carreras O, Vázquez AL, Rubio JM, Delgado MJ and Murillo ML: Comparative effects between intestinal absorption of folic acid and methyltetrahydrofolic acid in chronic ethanol-fed rats. *Ann.Nutr.Metab.*, 38, pp:221-225, 1994

Cederbaum AI, Dicker E and Rubin E: Transfer and reoxidation in reducing equivalents as the rate-limiting steps in the oxidation of ethanol by liver cells isolated from fed and fasted rats. *Arch.Biochem.Biophys.*, 183, pp:638-646, 1977



Chanarin I: The megaloblastic anaemias, 2nd ed., Blackwell, Oxford, p.521., 1979

Chey WY, Kosay S and Lorber SH: Effects of chronic administration of ethanol on gastric secretion of acid in dogs. Dig.Dis. 17, pp:153-159, 1972

Chen IW y cols: Semi automated system for simultaneous assays of serum vitamin B and folic acid in serum evaluated. Clin.Chem., 28, pp: 2161-2165, 1982

Cichowicz DJ and Shane B: Mammalian folypoly- $\gamma$ -glutamate synthetase. 2. Substrate specificity and kinetic properties. 26, pp:513-521. 1987

Colditz GA, Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Gordis E and Willet W: Alcohol intake in relation to diet and obesity in women and men. Am.J.Clin.Nutr. 54, pp:49-55, 1991

Collins TD, Eisenga BH, Bhandari SD and McMartin KE: Effects of ethanol on tissue folate incorporation and recovery from folate deficiency in rats. Alcohol.Clin.Exp.Res., 16, pp:757-763, 1992

Colaman N y Herbert V: Total folate binding capacity of normal human plasma, and variations in uremia, cirrhosis, and pregnancy. Blood, 48, pp:911-921, 1976

Cook JD, Cichowicz DJ, George S, Lawler A and Snane B: Mammalian folylpoly- $\gamma$ -glutamate synthetase. 4. In vitro and in vivo metabolism of folates and analogues and regulation of folate homeostasis. Biochemistry, 26, pp:530-539, 1987

Cossack ZT and Rojhani: Fibre in enteral formulae: effects of sugar-beet versus soy fibre on zinc and folic acid absorption in human subjets. Clin.Nutr. 11, pp:35-38 1992

Craig GM, Elliot C and Hughes KR: Masked vitamin B<sub>12</sub> and folate deficiency in the elderly. Brit.J.Nutr. 54, pp:613-619 1985

Da Costa M and Rothemberg: Characterization of the folate-binding proteins associated with the plasma membrane of rat liver. Biochim.Biophys.Acta 939, pp:533-541 1988

Darcy-Vrillon B, Selhub J and Rosenberg IH: Analysis of sequential events in intestinal absorption of foyllypolyglutamate. Am.J.Physiol. 255 G361-G366, 1988

Doig MT, Peters JR, Sur P, Dang M and Priest DG: Determination of mouse liver 5-methyltetrahydrofolate concentration and polyglutamate forms. J.Biochem.Biophys.Methods. 10, pp:287-294, 1985

Domschke S, Domschke W and Lieber CS: Hepatic redox state: Attenuation of the acute effects of ethanol induced by chronic ethanol consumption. Life Sci., 15, pp:1327-1334, 1974

Eichner ER and Hillman RS: The evolution of anemia in alcoholic patients. Am.J.Med. Vol:50, pp:218-232, 1971

Eichner ER, Pierce HI and Hillman RS: Folate balance in dietary-induced megaloblastic anemia. N.Engl.J.Med. Vol:284, pp:938, 1971

Eilam Y, Ariel M, Jablonska M and Grossowicz: On the mechanism of folate transport in isolated intestinal epithelial cells. Ann.J.Physiol. 240, pp:G170-G175, 1981

Eisenga BH, Collins TD and McMartin KE: Differential effects of acute ethanol on urinary excretion of folate derivatives in the rat. J.Pharmacol.Exp.Therap. Vol.248, N° 3, 1989a

Eisenga BH, Collins TD and McMartin KE: Effects of acute ethanol on urinary excretion of 5-methyltetrahydrofolic acid and folate derivatives in the rat. *J.Nutr.* 119, pp:1498-1505, 1989b

Eisenga BH, Collins TD and McMartin KE: Incorporation of <sup>3</sup>H-label from folic acid is tissue-dependent in folate-deficient rats. *J.Nutr.* 122, pp:977-985, 1992

Everman BW and Koblin DD: Aging, chronic administration of ethanol, and acute exposure to nitrous oxide: effects on vitamin B<sub>12</sub> and folate status in rats. *Mechanism of Ageing and Development*, 62, pp:229-243, 1992

Fazio V, Flint DM and Wahlqvist: Acute effects of alcohol on plasma ascorbic acid in healthy subjects. *Am.J.Clin.Nutr.*, 34, pp:2394-2396, 1981

Foo SK and Shane B: Regulation of polyglutamate synthesis in mammalian cells. *J.Biol.Chem.*, 257, pp:13587-13592, 1982

Fernández-Checa JC, Ookhtens M and Kaplowitz N: Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol. *J.Clin.Invest.*, 80: pp:57-62, 1987

Fernandes-Costa F and Metz J: Binding of methylfolate and pteroylglutamic acid by the specific serum folate binder. *J.Lab.Clin.Med.*, pp:181-188, 1979

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 pp:1-101, 1989

Gruchow HW, Sobocinski KA, Barboriak JJ and Scheller JG: Alcohol consumption, nutrient intake and relative body weight among U.S. adults.

Am.J.Clin.Nutr. 42, pp:289-295, 1985

Hajjar JJ, Tomicic T and Scheig RL: Effect of chronic ethanol consumption on leucine absorption in the rat small intestine. *Digestion*, 22, pp:170-176, 1981

Hallbäck DA, Eriksson M and Sjöqvist A: Nerve-mediated effect of ethanol on sodium and fluid transport in the jejunum of the rat. *Scand.J.Gastroenterol.*, 25, pp:859-864, 1990

Halsted CH: Jejunal perfusion of simple and conjugated folates in man. *Gastroenterology*. 68, pp:261-269, 1975

Halsted CH: Folate deficiency in alcoholism. *Am.J.Clin.Nutr.*, pp:2736-2740, 1980a

Halsted CH: Intestinal absorption and malabsorption of folates. *Ann.Rev.Med.* 31, 79-87, 1980b

Halsted CH: The intestinal absorption of dietary folates in health and disease. *J.Am.Coll.Nutr.*, 8, pp:650-658, 1989

Halsted CH, Griggs RC and Harris JW: The effects of alcoholism on the absorption of folic acid (<sup>3</sup>H-PGA) evaluated by plasma levels and urine excretion. *J.Lab.Clin.Med.*, 69, pp:116, 1967

Halsted CH, Robles EA and Mezey E: Decreased jejunal uptake of labeled folic acid (<sup>3</sup>H-PGA) in alcoholic patients: roles of alcohol and malnutrition. *N.Engl.J.Med.*, 285, pp:701-706, 1971

Halsted CH, Robles EA and Mezey E: Distribution of ethanol in the human gastrointestinal tract. *Am.J.Clin.Nutr.*, 26, pp:831-834, 1973a

Halsted CH, Robles EA and Mezey E: Intestinal malabsorption in folate-

deficient alcoholics. *Gastroenterology*, 64, pp:526-532, 1973b

Halsted CH, Beer WH, Chandler CJ, Kathryn R, Wolfe BM, Lynn B and Cerda JJ: Clinical studies of intestinal folate conjugases., 107, pp:228-232, 1986

Henderson GB: Folate-binding proteins. *Annu.Rev.Nutr.*, 10, pp:319-335, 1990

Henderson GB, Tsuji JM and Harish PK: Mediated uptake of folate by a high-affinity binding protein in sublines of L1210 cells adapted to nanomolar concentrations of folate. *J.Membrane Biol.* 101, pp:247-258, 1988

Herbert V: Experimental nutritional folate deficiency in man. *Trans.Assoc.Am.Physicians.*, 75, pp:307-320, 1962

Herbert V: Recommended dietary intakes (RDI) of folate in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 45, 661-670, 1987

Hermos JA, Adams WH, Lin Y and Trier J: Mucosa of the small intestine in folate deficient alcoholics. *Ann.Internal Med.*, 76, pp: 957, 1972

Hillers VN and Massey IK: Interrelationships of moderate and high alcohol consumption with diet and health status. *Am.J.Clin.Nutr.* 41, pp:356-362, 1985

Hillman RS, and Steinberg SE: The effects of alcohol on folate metabolism. *Ann.Rev.Med.* 33, pp:345-354, 1982

Hillman RS, McGuffin R and Campbell C: Alcohol interference with the folate enterohepatic cycle. *Trans.Assoc.Am.Physicians.*, 90, pp:145-156, 1977

Hillman RS, Campbell CM and Steinberg SE: Role of the enterohepatic cycle in the recovery of folate from senescent red cells. *Trans.Assoc.Am.Physicians.*, 95, pp:237-243, 1982

Hjelle JT, Christensen EI, Carone FA and Selhub J: Cell fractionation and electron microscope studies of kidney folate-binding protein. *Am.J.Physiol*, 260, pp:C338-C346, 1991

Holm J, Hansen SI, Hoier-Madsen M and Bostad L: A high-affinity folate binding protein in proximal tubule cells of human kidney. *Kidney Internat.*, 41, pp:50-55, 1992

Hoppner K and Lampi B: Effect of nitrite ingestion on the bioavailability of folate in the rat. *Internat.J.Vit.Nutr.Res.* 62, pp: 244-247, 1992

Horne DW: Na<sup>+</sup> and pH dependence of 5-methyltetrahydrofolic acid and methotrexate transport in freshly isolated hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta.* 1023, pp:47-55, 1990

Horne DW, Briggs WT and Wagner C: Studies on the transport mechanism of 5-methyltetrahydrofolic acid in freshly isolated hepatocytes: effect of ethanol. *Arch.Biochem.Biophys.*, 196, pp: 557-565, 1979

Horne DW, Cook RJ and Wagner C. Effect of dietary methyl group deficiency on folate metabolism in rats. *J.Nutr.* 119, pp:618-621, 1989

Julia P, Farres J and Parès X: Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur.J.Biochem.*, 162, pp:179-189, 1987

Kalant H: Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol. In. *The biology of alcoholism. Vol.I, Biochemistry.* New York, Plenum Press, p:1-62, 1971

Kalant H: Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol. In. The biology of alcoholism. Vol.I, Biochemistry. New York, Plenum Press, p:1-62, 1971

Kalant H, Khanna JM and Endrenyi L: Effect of pyrazole on ethanol metabolism in ethanol-tolerant rats. Can.J.Physiol.Pharmacol., 53, pp:416-422, 1975

Kamen BA and Capdevilla A: Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content. Proc.Natl.Acad.Sci., 83, pp:5983-5987, 1986

Kamen BA, Wang MT, Streckfuss AJ, Peryea X and Anderson RGW: Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. J.Biol.Chem., 263, pp: 13602-13609, 1988

Kaur J, Jaswal VMS, Nagpaul JP and Mahmood A: Effect of chronic ethanol administration on the absorptive functions of the rat small intestine. Alcohol, 10, pp:299-302, 1993

Kalbfleisch JM, Lindeman RD, Ginn HE, et al: Effects of ethanol administration on urinary excretion of magnesium and other electrolytes in alcoholic and normal subjects. J.Clin.Invest., 42, pp:1471-1475, 1963

Keating S, Weir DG and Scott JM: in Chemistry and Biology of Pteridines (Ed. JA Blair), pp:977, Walter de Gruyter, Berlin, 1983

Kesavan V and Noronha JM: Folate malabsorption in aged rats related to low levels of pancreatic folyl conjugase. Am.J.Clin.Nutr., 37, pp:262-267, 1983

Keshavarzian A, Dangleis M, Wobbleton J, Cornish R and Iber F: Small bowel transit and lactose intolerance in chronic alcoholics.

Gastroenterology, 88, pp:1444, 1985

Kohashi M, Yoneda K and Iwai Kazuo: Distribution of dihydrofolate reductase and activity producing folate cofactors in rat small intestinal segments. *Agric.Biol.Chem.*, 51 (5), pp:1455-1456, 1987

Krasner N, Cochran KM, Russell RI, Carmichael HA and Thompson CG: Alcohol and absorption from the small intestine. I, Impairment of absorption from the small intestine in alcoholics. *Gut*, 17, pp:245-248, 1976

Krebs HA and Perkins JR: The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.J.*, 118, pp:635-644, 1970

Krumdieck CL, Fukushima K, Fukushima T, Shiota T y Butterworth CE: A long-term study of the excretion of folate and pterins in human subjects after ingestion of <sup>14</sup>C acid, with observations of the effects of diphenylhydantoin administration. *Am.J.Clin.Nutr.*, 31, pp:88-93, 1978

Kuo YJ and Shanbour LL: Effects of ethanol on sodium, 3-Omethylglucose and l-alanine transport in the jejunum. *Am.J.Dis.Dig*, 23, pp:51-56, 1978

Lamboeuf Y, La Droitte P and De Saint Blanquat G: The gastrointestinal metabolism of ethanol in the rat. Effect of chronic alcohol intoxication. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 261, pp:157-169, 1983

Landon MJ and Hytten FE: The excretion of folate in pregnancy. *Br.J.Obstet.Gynaec.*, 78, pp:769-775, 1971

Landon MJ and Oxley A: Relation between maternal and infant blood folate activities. *Arch.Dis.Child.*, 46, pp:810-815, 1971

Landsdown ABG and Dayan AD: Alterations in crypt cell populations in the small intestine as an early toxic response to sub-acute ethanol



administration. Arch.Toxicol., 59, pp:448-452, 1987

Lane F, Goff P, McGuffin R, Eichner ER and Hillman RS: Folic acid metabolism in normal, folate deficient and alcoholic man. Brit.J.Haematol., 34, pp:489-500, 1976

Lavoie A and Cooper BA: Rapid transfer of folic acid from blood to bile in man, and its conversion into folate coenzymes and into a pteroylglutamate with little biological activity. Clin.Sci.Mol.Med., 46, pp:729-741, 1974

Lehninger AL: Vitaminas y coenzimas. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. 1981

Leibel RL, Dufour M, Hubbard VS and Lands WEM: Alcohol and calories: a matter of balance. Alcohol, 10, pp:429-434, 1993

Leslie GI and Rowe PB: Folate binding by the brush border membrane proteins of small intestinal epithelial cells. Biochemistry, 11, pp:1696-1703, 1972

Lindenbaum J: Folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies in alcoholism. Sem.Hematol., 17, pp:119-129, 1980

Liang CS and Lowenstein JM: Metabolic control of the circulation. J.Clin.Invest., 62, pp:1029-1038, 1978

Lieber CS: Metabolic effects produced by alcohol in the liver and other tissues. Adv.Intern.Med., 14, pp:151-199, 1968

Lieber CS: Biochemical and molecular basis for alcohol-induced injury to liver and other tissues. N.Engl.J.Med., 319, pp: 1639-1650, 1988

Lieber CS: Perspectives: Do alcohol calories count? Am.J.Clin.Nutr., 54,

pp:976-982, 1991

Lieber CS: Metabolism of ethanol. In: Medical and nutritional complications of alcoholism. Plenum Publishing Corporation. pp:1-35, 1992

Lieber CS and DeCarli LM: Reacción de Lieber de la oxidación del etanol en los microsomas hepáticos. Science, 162, pp:917-918, 1968

Lieber CS and DeCarli LM: The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. J.Pharmacol.Exp.Ther., 181, pp:279-287, 1972

Lieber CS, Lasker JM, DeCarli LM, Salli 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, pp:791-795, 1988

Lindenbaum J and Roman MJ: Nutritional anemia in alcoholism. Am.J.Clin.Nutr., 33, pp:2727-2735, 1980

Link H, Blaurock M, Wernet P, Niethammer D, Wilms K and Ostendorf P: Acute folic acid deficiency after bone marrow transplantation. Klin.Wochenschr, 64, pp:423-432, 1986

Lucas ML, Blair JA, Cooper PT and Coke WT: Relationship of the microclimate in rat and human intestine to malabsorption. Biochem.Soc.Trans., 4, pp:154-156, 1976

Maddrey WC and Boyer JL: The acute and chronic effects of ethanol administration on bile secretion in the rat. J.Lab.Clin.Med., 82, 1973

Marin GA, Karjoo M, Ward N and Rosato E: Effects of alcohol on biliary lipids in the presence of a chronic biliary fistula.

Surg.Gynecol.&.Obst., 141, pp:352-356, 1975

Mason JB 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, pp:620-625, 1988

Matsuzaki S, Gordon E and Lieber CS: Increased ADH independent ethanol oxidation at high alcohol concentrations in isolated rat hepatocytes: The effect of chronic alcohol feeding. J.Pharm.Exp.Ther. 217, pp:133-137, 1981

Mazzanti R, Jenkins WJ: Effect of chronic ethanol ingestion on enterocyte turnover in rat small intestine. Gut, 28, pp:52-55, 1987

Mazzanti R, Debnam E and Jenkins WJ: Effect of chronic ethanol intake on lactase activity and active galactose absorption in rat small intestine. Gut, 28, pp:56-60, 1987

McGuffin R, Goff P and Hillman RS: The effect of diet and alcohol on the development of folate deficiency in the rat. Br.J.Haematol., 31, pp:185-192, 1975

McGuire JJ and Bertino JR: Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates. Mol.Cell.Biochem., 38, pp:19-48, 1981

McMartin KE, Virayotha V and Tephly TR: High-pressure liquid chromatography separation and determination of rat liver folates. 209, pp:127-136, 1981

McMartin, Collins TD and Bairnsfather L: Cumulative excess urinary excretion of folate in rats after repeated ethanol treatment. J.Nutr., 116, pp:1316-1325, 1986a

McMartin KE, Collins TD, Shiao CQ, Vidrine L and Redetzki HM: Study of dose-dependence and urinary folate excretion produced by ethanol in humans and rats. *Alcohol.Clin.Exp.Res.*, 10, pp-419-424, 1986b

McMartin KE, Collins TD, Eisenga BH, Fortney T, Bates WR and Baimsfather: Effects of chronic ethanol and diet treatment on urinary folate excretion and development of folate deficiency in the rat. *J.Nutr.*, 119, pp:1490-1497, 1989

McMartin KE, Hazen-Martin DJ and Sens DA. Use of human proximal tubule cell cultures to study folate transport and binding. *Tox.Letters*, 53, pp:241-242, 1990

Mezey E and Halsted CH: Effects of alcohol on gastrointestinal and pancreatic fuction. In: *Fermented Food Beverages in Nutrition*, edited by Gastineau C, Darby WJ and Turner T, New York: Academic Press, pp:277-302, 1979

Muldoon RT, Eisenga BH, Morshed KM and McMartin Ke: 5-methyltetrahydrofolate is reabsorbed and metabolized in isolated perfused rat kidney. *J.Nutr.*, 122, pp:2415-2423, 1992

Naughton CA, Chandler CJ, Duplantier RB and Halsted CH: Folate absorption in alcoholic pigs: in vitro hydrolysis and transport at the intestinal brush border membrane. *Am.J.Clin.Nutr.*, 50, pp:1436-1441, 1989

Nebert DW, Adesnik M et al: The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA*, 6, pp:1-11, 1987

Neves MM, Borges DR and Videla MP: Exocrine pancreatic hypersecretion in Brazilian alcoholics. *Am.J.Gastroenterol.* 78, pp:513-516, 1983

Nixon PF and Bertino JR: Effective absorption and utilization of oral formyltetrahydrofolate in man. *New.Engl.J.Med.*, 286, pp:175-179, 1970

Ohnishi K and Lieber CS: Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J.Biol.Chem.* 252, pp:7124-7131, 1977

Olinger EJ, Bertino JR and Binder HJ: Intestinal folate absorption: II. Conversion and retention of pteroylmonoglutamate by jejunum. *J.Clin.Inv.*, 52, pp:2138-2145, 1973

Olivares M, Hertrampf E, Llaguno S, Chadud P and Stekel A: Folic acid nutrition in marasmic infants. *Nutr.Res.*, pp:1365-1370, 1986

Pares X and Vallee BL: New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem.Byophys.Res.Comm.*, 98, pp:122-130, 1981

Pearson AGM and Turner AJ: Folate-dependent 1-carbon transfer to biogenic amines mediated by methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature*, 258, pp:173-174, 1975

Perry J and Chanarin I: Formylation of folate as step in physiological folate absorption. *Brit.Med.J.*, 2, pp:588-589, 1973

Perry J, Deacon R, Lumb M and Chanarin I: Impaired formylation and uptake of tetrahydrofolate by rat small gut following cobalamin inactivation. *Biochim.Biophys.Acta*, 923, pp:286-290, 1987

Persson J: Alcohol and the small intestine. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26, pp:3-15, 1991

Persson J, Berg NO, Sjolund K, Stenling R, Magnusson PH: Morphologic changes in the small intestine after chronic alcohol consumption. *Scand.J.Gastroenterol.*, 25, pp:172-184, 1990

Pfeiffer A, Hogl B and Kaess H: Effect of alcohol and commonly ingested alcoholic beverages on gastric emptying and gastrointestinal transit. *Clin.Investig.*, 70(6), pp:487-491, 1992

Pirola RC and Lieber CS: Hypothesis: Energy wastage in alcoholism and drug abuse: Possible role of hepatic microsomal enzymes. *Am.J.Clin.Nutr.*, 29, pp:90-93, 1976

Poe M: Acidic dissociation constants of folic acid, dihydrofolic acid, and methotrexate. *J.Biol.Chem.*, 252, pp:3724-3728, 1977

Ponz F, Ilundain A and Lluch M: Method for successive absorptions with intestinal perfusion in vivo. *Rev.Esp.Fisiol.*, 35, pp:97-104, 1979

Preedy VR and Peters TJ: Protein synthesis of muscle fractions from the small intestine in alcohol fed rats. *Gut*, 31, pp:305-310, 1990

Preedy VR, Marway JS, Siddiq T, Ansari FA, Hashim IA y Peters TJ: Gastrointestinal protein turnover and alcohol misuse. *Drug.Alcohol.Depend.*, 34(1), pp:1-10, 1993

Priest DG, Veronee CD, Mangum M, Bednarek JM and Doig MT: Comparison of folylpolyglutamate hydrolases of mouse liver, kidney, muscle and brain. *Mol.Cell.Biochem.*, 43, pp:81-87, 1982

Racker E: Aldehyde deshydrogenase, a diphosphopyridine nucleotido linked enzyme. *J.Biol.Chem.*, 177, pp:883-892, 1949

Racusen LC and Krawitt EL: Effect of folate deficiency and ethanol ingestion on intestinal folate absorption. *Digestive Diseases*, 22,

pp:915-920, 1977

Reinus JF, Heymsfield SB, Wiskind R, Casper K, Galambos JT: Ethanol: Relative fuel value and metabolic effects in vivo. *Metabolism*, 38, pp:125-135, 1989

Reisenauer AM: Affinity labelling of the folate-binding protein in pig intestine. *Biochem.J.*, 267, pp:249-252, 1990

Reisenauer AM and Halsted CH: Human jejunal brush border folate conjugase. Characteristics and inhibition by salicylazosulfapyridine. *Biochem.Biophys.Acta*, 659, pp:62-69, 1981

Reisenauer AM, Halsted CH, Jacobs LR and Wolfe BM: Human intestinal folate conjugase: adaptation after jejunoileal bypass. *Am.J.Clin.Nutr.*, 42, pp:660-665, 1985

Reisenauer AM, Chandler CJ and Halsted CH: Folate binding and hydrolysis by pig intestinal brush-border membranes. *Am.J.Physiol.*, 251, pp:G481-G486, 1986

Reisenauer AM, Buffington T, Villanueva JA and Halsted CH: Folate absorption in alcoholic pigs: in vivo intestinal perfusion studies. *am.J.Clin.Nutr.*, 50, pp: 1429-1435, 1989

Revell P, O'Doherty, Tang A and Savidge GF: Folic acid absorption in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J.Int.Med.*, 230, pp:227-231, 1991

Rodriguez J, López-Nuevo M, Delgado MJ, Murillo MC and Carreras O: Changes in the ileal disaccharidase activities in rats after long-term ethanol feeding. (En prensa)

Roggin GM, Iber FL and Linscheer WG: Intraluminal fat digestion in the chronic alcoholic. *Gut*, 13, pp:107-111, 1972

Romero JJ, Tamura T and Halsted CH: Intestinal absorption of [<sup>3</sup>H]folic acid in the chronic alcoholic monkey. *Gastroenterology*, 80, pp:99-102, 1981

Rosenberg IH: Absorption and malabsorption of folates. *Clin.Haematol.*, 5, pp:592-618, 1976

Rosenberg IH: Intestinal absorption of folate. *Physiology of the gastrointestinal tract*, pp:1221-1230. Raven Press, New York, 1981

Rosenberg IH: 1989 Herman award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. *Am.J.Clin.Nutr.*, 51, pp:531-534, 1990

Rosenberg IH and Selhub J: Folates and Pterins. *Nutritional, Pharmacological and Psychological Aspects*. New York, Wiley, Vol.3, pp:147-176, 1986

Rubin E, Ryback BJ, Lindenbaum J, Gerson CD, Walker G and Lieber CS: Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology*, 63, pp:801-814, 1972

Rubinoff M, Abramson R, Schreiber C and Waxman S: Effect of a folate-binding protein on the plasma transport and tissue distribution of folic acid. *Acta Haemat.*, 65, pp:145-152, 1981

Russell RM, Dhar GJ, Dutta SK and Rosenberg: Influence of intraluminal pH on folate absorption: studies in control subjects and in patients with pancreatic insufficiency. *J.Lab.Clin.Med.*, 93, pp:428-436, 1979

Sadasivan E, Rothenberg S, da Costa M and Brink L: Characterization of multiple forms of folate-binding protein from human leukemia cells.



Biochem.Biophys.Acta, 882, pp:311-321, 1986

Said HM and Hollander D: Does aging affect the intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate?. Digestion, 30, pp:231-235, 1984

Said HM and Redha R: A carrier-mediated transport for folate in basolateral membrane vesicles of rat small intestine. Biochem.J., 247, pp:141-146, 1987

Said HM and Strum BS: Effect of ethanol and other aliphatic alcohols on the intestinal transport of folates. Digestion, 35, pp:129-135, 1986

Said HM, Hollander D and Katz D. Absorption of 5-methyltetrahydrofolate in rat jejunum with intact blood and lymphatic vessels. Biochem.Biophys.Acta., 775, pp:402-408, 1984a

Said HM, Hollander D and Strum WB: Inhibitory effect of unconjugated bile acids on the intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate in rat jejunum in vitro. Gut, 25, pp:1376-1379, 1984b

Said HM, Ghishan FK and Murrell JE: Ontogenesis of intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate in the rat. Am.J.Physiol., 249, pp:G567-G571, 1985

Said HM, Ghishan FK and Murrell JE: Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. Diabetes Research, 3, pp: 363-367, 1986a

Said HM, Horne DW and Wagner C: Effect of human milk folate binding protein on folate intestinal transport. Arch.Biochem.Biophys., 251, pp:114-120, 1986b

Said HM, Ghishan FK and Redha R: Folate transport by human intestinal brush-border membrane vesicles. Am.J.Physiol., 252, pp:G229-G236, 1987

Said HM, Redha R, Tipton W and Nylander W: Folate transport in ileal brush border-membrane vesicles following extensive resection of proximal and middle small intestine in the rat. *Am.J.Clin.Nutr.*, 47, pp:75-79, 1988

Salter DN and Blakeborough P: Influence of goat's milk folate-binding protein on transport of 5-methyltetrahydrofolate in neonatal-goat small intestinal B.B.M.V. *Br.J.Nutr.*, 59, pp:497-507, 1988

Sarles H, Tiscornia O, Palasciano G, Brasca A, Hage G, Devaux MA and Gullo L: Effects of chronic intragastric ethanol administration on canine exocrine pancreatic secretion. *Scand.J.Gastroenterol.* 8, pp:85-96, 1973

Schreiber SS, Oratz M, Rothschild MA, Reff F and Evan C: Alcoholic cardiomyopathy. II. The inhibition of cardiac microsomal protein synthesis by acetaldehyde. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 6, pp:207-213, 1974

Schron CM: pH modulation of the kinetics of rabbit jejunal, brush-border folate transport. *J.Membrane Biol.*, 120, pp:192-200, 1991

Schron CM, Washington C and Blitzer BL: Anion specificity of the jejunal folate carrier: effects of reduced folate analogues on folate uptake and efflux. *J.Membrane Biol.*, 102, pp:175-183, 1988

Seitz HK, 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), pp:2214, 1982

Seitz HK, 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, pp:192-196, 1985

Selhub J and Rosenberg IH: Folate transport in isolated brush border membrane vesicles from rat intestine. *J.Biol.Chem.*, 256, pp: 4489-4493, 1981

Selhub J, Brin H and Grossowicz N: Uptake and reduction of radioactive folate by everted sacs of rat small intestine. *Eur.J.Biochem.*, 33, pp:433-438, 1973

Selhub J, Powell GM and Rosenberg IH: Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate. *Am.J.Physiol.*, 246, pp:G515-G520, 1984

Sjölund K, Persson J and Bergman L: Can villus atrophy be induced by chronic alcohol consumption? A case report. *J.Int.Med.*, 226, pp:133-135, 1989

Steinberg SE: Mechanisms of folate homeostasis: *Am.J.Physiol.* 246, G319-G324, 1984

Steinberg SE, Campbell CL and Hillman RS: Kinetics of the normal folate enterohepatic cycle. *J.Clin.Invest.* Vol.64, pp:83-88, 1979

Steinberg SE, Campbell CL and Hillman RS: Effect of alcohol on hepatic secretion of methylfolate ( $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ ) into bile. *Biochem.Pharmacol.*, 30, pp:98-101, 1980

Steinberg SE, Campbell CL and Hillman RS: The role of the enterohepatic cycle in folate supply to tumour in rats. *Brit.J.Haematol.*, 50, pp:309-316, 1982

Steinberg SE, Campbell CL and Hillman RS, in *Chemistry and Biology of Pteridines* (Ed.J.A.Blair), p.1013, Walter de Gruyter, Berlin, 1983

Stock MJ and Stuart JA: Thermic effects of ethanol in the rat and man. *Nutr.Metabol.* 17, pp:297-305, 1974

Stokstad ELR, Shin YS and Tamura T: Distribution of folate form in food and folate availability, pp:56 en : Folic acid biochemistry and physiology in relation to the human nutrition requirement. Washington DC: National Academy of Sciences, 1977

Strugala GJ, Overhoff H and Forth W: Bidirectional transfer and tissue accumulation of folic acid by rat intestine in vitro. Digestion, 32, pp:255-266, 1985

Strum WB: Enzymatic reduction and methylation of folate following pH-dependent, carrier-mediated transport in rat jejunum. Bichim.Biophys.Acta, 554, pp:249-257, 1979

Suter PM, Scutz Y, Jequier E: The effect of ethanol on fat storage in healthy subjets. N.Engl.J.Med., 326, pp:983-987, 1992

Takada A, Matsuda Y and Takase S: Effects of dietary fat on alcohol-pyrazole hepatitis in rats: The pathogenetic role of the nonalcohol dehydrogenase pathway in alcohol-induced hepatic cell injury. Alcoholism:Clin.Exp.Res., 10: 403-411, 1986

Tamura T and Halsted CH: Folate turnover in chronically alcoholic monkeys. J.Lab.Clin.Med., 101, pp:623-628, 1983

Tamura T and Kaiser LL: The absorption of pteroylpolyglutamate and intestinal pteroylpolygammaglutamyl hydrolase activity in zinc-deficient rats. J.Nutr., 121, pp:1042-1046, 1991

Tamura T, Shane B, Baer MT, King JC, Margen S and Stokstad ELR: Absorption of mono- and polyglutamyl folates in zinc depleted man. Am.J.Clin.Nutr., 31, pp:1984-1987, 1978

Tamura T, Romero JJ, Watson JE, Gong EJ and Halsted CH: Hepatic folate metabolism in the chronic alcoholic monkey. J.Lab.Clin.Med., 97, pp:654-

661, 1981

Tani M and Iwai K: Investigation of absorption and conversion of pteroylglutamic acid in the small intestine of the rat in situ. *J.Chromatography*, 267, pp:175-181, 1983

Tani M, Fushiki T and Iwai K: Influence of folate-binding protein from bovine milk on the absorption of folate in gastrointestinal tract of rat. *Biochim.Biophys.Acta*, 757, pp:274-281, 1983

Tchernia G, Blot I, Rey A, Kaltawasser JP, Zittoun J, Papiernik E: Maternal folate status birthweight and gestional age, *Dev.Pharmacol.Ther.*, 4, Suppl.1, pp:58-65, 1982

Thomson ABR: Effect of chronic ingestion of ethanol on in vitro uptake of lipids and glucose in the rabbit jejunum. *Am.J.Physiol*, 246, pp:120-129, 1984

Tisman G and Herbert V: B<sub>12</sub> dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B<sub>12</sub> deficiency. *Blood*, 41, pp:465-469, 1973

Urbach J, Abrahamov A and Grossowicz N: Congenital isolated folic acid malabsorption. *Arch.Dis.Child.*, 62, pp:78-80, 1987

Varela-Moreiras G and Selhub J: Long-term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *J.Nutr.*, 122, pp:986-991, 1992

Veitch RL, Lumeng L and Li TK: Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse: The effect of ethanol oxidation on hepatic pyridoxal-5-phosphate metabolism. *J.Clin.Invest.*, 55, pp: 1026-1032, 1975

Von der Porten A, Gregory JF, Toth JP, Cerda JJ, Curry SH and Bailey LB: In vivo folate kinetics during chronic supplementation of human subjects with deuterium-labeled folic acid. *J.Nutr.*, 122, pp:1293-1299, 1992

Von Wartburg JP, Papenberg J and Aebi H: An atypical human alcohol dehydrogenase. *Can.J.Biochem.*, 43, pp:889-898, 1965

Wang TTY, Reisenauer AM and Halsted CH: Comparison of folate conjugase activities in human, pig, rat and monkey intestine. *J.Nutr.*, 115, pp:814-819, 1985

Ward GJ and Nixon PF: Modulation of pteroylpolyglutamate concentration and length in response to altered folate nutrition in a comprehensive range of rat tissues. *J.Nutr.*, 120, pp:476-484, 1990

Wedel M, Pieters JE, Pikaar NA and Ockhuizen T: Application of a three-compartment model to a study of the effects of sex, alcohol dose and concentration, exercise and food consumption on the pharmacokinetics of ethanol in healthy volunteers. *Alcohol-Alcohol*, 26(3), pp:329-336, 1991

Weir DG, McGing PG and Scott JM: Folate metabolism, the enterohepatic circulation and alcohol. *Biochem.Pharmacol.*, 34, pp:1-7, 1985

Whitehead VM, Comty CH, Posen GA and Kaye M: Homeostasis of folic acid in patients undergoing maintenance hemodialysis. *New.Engl.J.Med.*, 279, pp:970-974, 1968

Wilkinson JA and Shane B: Folate metabolism in the ethanol-fed rat. *J.Nutr.*, 112, pp:604-609, 1982

Williams W and Huang KC: Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey. *Am.J.Physiol.*, 242, pp:F484-F490, 1982

Wilson FA and Hoyumpa A: Ethanol and small intestinal transport. *Gastroenterology*, 76, pp:388-403, 1979

Winne D: Dependence of intestinal absorption in vivo on the unstirred layer. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 304, pp:175-181, 1978

Wisniewska IR, Gawlik Z, Sasiniowska-Motyl M: Effect of simultaneous administration of ibuprofen and ethanol on the alkaline phosphatase activity in the small intestine. *Folia Histochem Cytobiol*, 23, pp:51-60, 1985

Wu A, Chanarin I, Slavin G and Levi AJ: Folate deficiency in the alcoholic--its relationship to clinical and haematological abnormalities, liver disease and folate stores. *Brit.J.Haematol.*, 29, pp:469-478, 1975

Zamierowski MM and Wagner C: Identification of folate binding proteins in rat liver. *J.Biol.Chem.*, 252, pp:933-938, 1977

Zettner A, Boss GR and Seegmiller JE: A long-term study of the absorption of large oral doses of folic acid. *Ann.Clin.Lab.Sci.*, 11, pp:516-524, 1981

Zimmerman J: Folic acid transport in organ-cultured mucosa of human intestine. Evidence for distinct carriers. *Gastroenterology*, 99, pp:964-972, 1990

Zimmerman J, Selhub J and Rosenberg IH: Role of sodium in transport of folic acid in the small intestine. *Am.J.Physiol.*, 251, pp:G218-G222, 1986

Zimmerman J, Selhub J and Rosenberg IH: inhibition of folate absorption by dihydrofolate reductase inhibitors, trimethoprim and pyrimethamine. *Am.J.Clin.Nutr.*, 46, pp:518-522, 1987

Zimmerman J, Gilula Z, Selhub J and Rosenberg IH: Kinetic analysis of the effect of luminal pH on transport of folic acid in the small intestine. *Internat.J.Vit.Nutr.Res.*, 59, pp:151-156, 1988

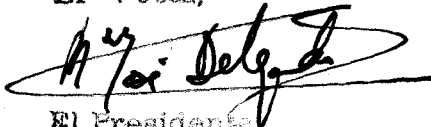


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. OCTAVIO FERNANDEZ BORRACHERO  
titulada ABSORCIÓN DE FOLIOS, CIRCULACIÓN  
ENTEROHEPÁTICA Y ALCOHOL  
acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 12 de FEBRERO 1996

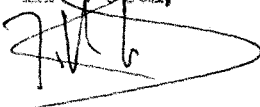
El Vocal,



El Presidente



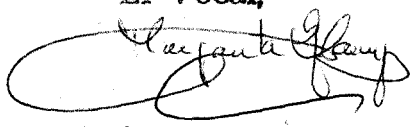
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

