

# Estudio de la asociación alélica entre los polimorfismos de los genes de colágena tipo I (COLIA1 y COLIA2) y daño hepático de tipo alcohólico

Carlos Cruz\*  
Silvia Taba-Shiwa\*\*  
Adriana Díaz\*  
Flores Vargas-Vorackova\*\*  
Humberto Nicolini\*  
David Kershenobich\*\*

## Summary

The amount and duration of excessive alcohol consumption leading to liver injury are uncertain. While most heavy drinkers show evidence of fatty liver, only a minority develops features of overt disease (cirrhosis or hepatitis). Genetic factors associated to an increased susceptibility to these disorders have long time been suspected. Given that type I collagen is markedly increased in advanced liver cirrhosis, the human procollagen type  $\alpha$ -1 (COLIA1) and  $\alpha$ -2 (COLIA2) genes have been proposed as "candidate" genes in studies of genetic predisposition of the disease. The aim of this work was to analyze polymorphisms for the type I procollagen genes from alcoholic patients with and without cirrhosis, to test the hypothesis that these variants are related (and possibly contribute) to a predisposition to develop alcohol-induced liver damage. Seventy-four Mexican subjects who acknowledged having drunk 80 or more g of ethanol/day for at least 15 years were studied. Diagnosis or exclusion of alcohol liver disease (cirrhosis) was established by history, physical examination, biochemical tests, ultrasound and, in some cases, biopsy of the liver. Genotype analysis of three chosen regions of the type I procollagen genes (two in COLIA1, and one in COLIA2) containing polymorphic variants, were studied after PCR amplification. Observed allele and genotype frequencies for the polymorphisms analyzed were not statistically different among groups. Interestingly, the frequency for a common allele for the RsaI/COLIA1 system was higher in alcoholics compared with healthy subjects. In summary, the polymorphisms studied do not seem to be associated to a higher risk or susceptibility of alcohol liver damage. We cannot rule out that other loci, not explored herein, may contain molecular variants in linkage disequilibrium with nearby mutations modifying biosynthesis or structure of the type I collagen, affected directly or indirectly after an alcohol challenge.

**Key words:** Genetics of alcohol liver disease, collagen type I genes, allelic association.

## Resumen

Se desconoce la cantidad y duración del consumo excesivo de alcohol que lleva a la generación del daño hepático. Mientras que en la mayoría de los individuos que abusan del alcohol se desarrolla hígado graso, sólo en una pequeña proporción se genera inexorablemente un daño grave (cirrosis o hepatitis alcohólica). En numerosos estudios se indica la existencia de factores genéticos asociados a la susceptibilidad de desarrollar daño hepático inducido por el alcohol. La producción de la colágena tipo I es particularmente abundante en la cirrosis hepática; por esta razón, los genes que codifican para esta proteína se consideran como "candidatos" importantes en el estudio de la predisposición genética a esta enfermedad. El objetivo de este trabajo es el de analizar los polimorfismos para los genes humanos de colágena tipo I (COLIA1 y COLIA2) en muestras de alcohólicos que presentan o no cirrosis, para probar la hipótesis de que estas variantes pudieran estar asociadas (y probablemente contribuir) a la predisposición a desarrollar el daño hepático inducido por el consumo excesivo de etanol. Se estudiaron 74 pacientes mexicanos que reconocieron beber 80 g o más de etanol al día durante un lapso de por lo menos 10 años. El diagnóstico o, en su caso, la exclusión de cirrosis, fue establecido por medio de su historia clínica, pruebas de laboratorio, ultrasonido y, en algunos casos, biopsia hepática. Se analizaron los genotipos de 3 diferentes polimorfismos (dos en el gene COLIA1 y uno en el COLIA2), mediante la amplificación de las regiones correspondientes por PCR. No se observaron diferencias en las frecuencias de los alelos y los genotipos entre ambos grupos. Sin embargo, la frecuencia del alelo A2 del sistema polimórfico RsaI/COLIA1 fue mayor en los alcohólicos que en un grupo de sujetos sanos. En conclusión, los polimorfismos analizados no parecen estar asociados a un mayor riesgo o susceptibilidad de desarrollar daño hepático inducido por el alcohol. No se puede descartar que otras variantes no analizadas en este trabajo pudieran estar relacionadas con mutaciones cercanas, las cuales pudieran modificar la biosíntesis o estructura de la colágena tipo I, por medio de la interacción directa o indirecta del alcohol.

**Palabras clave:** Genética de la enfermedad hepática alcohólica, genes de colágena tipo I, asociación alélica.

\* Instituto Mexicano de Psiquiatría, IMP. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D.F.

\*\* Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", INNSZ.

## Introducción

El abuso del alcohol y el alcoholismo encabezan actualmente la lista de problemas sociales y de salud en todo el mundo, siendo catalogados como dos de las principales causas de muerte que afectan, de manera directa o indirecta, a millones de personas. En México, el consumo *per capita* se ha incrementado en los últimos años (23), razón por la cual hay una creciente preocupación al respecto, la cual se ve reflejada en el avance y desarrollo de las investigaciones sobre el alcoholismo en nuestro país. A partir de la segunda mitad del siglo XX, se dejó atrás la explicación monocausal de esta enfermedad, para adoptar un concepto multifactorial y, aunque el consumo de etanol sigue formando parte del campo médico, ahora se considera desde un punto de vista más amplio, al incorporar aspectos culturales, psicosociales y biológicos.

La idea de que hay un componente genético en el alcoholismo, aunque ha sido difundida en los últimos años, no es un concepto reciente. Los griegos ya señalaban que este padecimiento se presentaba en familias y, desde entonces, la mayor parte de los estudios sistemáticos al respecto han confirmado esta observación básica. Un trabajo de revisión de 39 estudios familiares sobre alcoholismo llevados a cabo hasta 1979, mostró que, en promedio, uno de cada tres alcohólicos tenía por lo menos un progenitor afectado; prevalencia que es marcadamente mayor que la reportada en los sujetos sanos (7). Numerosos estudios en gemelos y en sujetos adoptados (revisados en la referencia 3) han dado apoyo a la existencia de factores genéticos relacionados con el trastorno, y también han confirmado el papel fundamental que desempeña el medioambiente. A esto se agregan los trabajos llevados a cabo en modelos animales, con los cuales también se ha demostrado la transmisión genética de ciertas características relacionadas con el alcoholismo (8). A diferencia de los padecimientos hereditarios más comunes con herencia de tipo mendeliano, el alcoholismo y los rasgos relacionados con éste, parecen transmitirse de manera más compleja. El componente de transmisión está probablemente constituido por genes múltiples cuya expresión puede relacionarse con el desarrollo de ciertos rasgos de la personalidad, con conductas que llevan al alcoholismo, o bien con la predisposición a desarrollar trastornos orgánicos por el consumo de bebidas embriagantes. Este último punto es de gran importancia, ya que un consumo excesivo de alcohol puede repercutir sobre prácticamente cualquier parte del cuerpo, provocando, en algunas ocasiones, daño grave e irreversible. En particular el hígado, por ser el sitio en donde se metaboliza la mayor parte de la sustancia, es uno de los órganos más afectados. La ingestión de alcohol etílico en altas concentraciones y por periodos largos provoca frecuentemente la enfermedad hepática de tipo alcohólico (EHA), la cual incluye una amplia gama de lesiones, siendo las más características: el hígado graso o esteatosis, la hepatitis, la fibrosis y la cirrosis por alcohol.

La relación entre el consumo *per cápita* de alcohol y la prevalencia de cirrosis hepática ha sido ejemplificada en estudios epidemiológicos que muestran que el au-

mento de los patrones de consumo de alcohol en diferentes países o culturas se asocia a lo largo del tiempo con una mayor incidencia de cirrosis (15,31). Asimismo, estos estudios han mostrado que es el consumo de etanol el que determina la prevalencia de enfermedad hepática alcohólica (EHA), independientemente del tipo de bebida alcohólica que se consuma. En México, la cirrosis hepática ocupa el séptimo lugar como causa de mortalidad global. El análisis de las tablas de mortalidad por edad muestra que, entre los 25 y los 40 años (en la etapa de mayor producción socioeconómica), la cirrosis hepática constituye la cuarta causa de muerte. A nivel hospitalario, su frecuencia varía, aunque el análisis de los datos de un estudio reciente llevado a cabo en distintas instituciones del Distrito Federal, muestra que apareció aproximadamente en el 10 % de las necropsias practicadas (19). Por otra parte, se ha observado que en México, al igual que en muchas o otras partes del mundo, la mayoría de los decesos por cirrosis son provocados por el alcohol. En un estudio de 2,394 enfermos con cirrosis hepática del INNSZ, el tipo de cirrosis más frecuentemente encontrada se relaciona con el alcoholismo (57.7 % de los pacientes) (19).

A nivel individual se conoce muy poco sobre los factores que determinan la predisposición a la enfermedad. La cantidad y duración del consumo excesivo de alcohol, que conduce a las formas graves del trastorno, pueden llegar a variar. Se presume que un consumo "peligroso" lo constituye la ingestión diaria de 80 g de etanol o más por día; aunque es claro que es este tipo de patrón de consumo de por vida es el que representa el factor decisivo que eleva el riesgo de desarrollar la enfermedad (31). El hígado graso alcohólico es frecuente en la gran mayoría de los bebedores crónicos, sin embargo, esta condición se revierte al dejar de beber. Por el contrario, únicamente un estimado de 10-35% de los consumidores consuetudinarios desarrolla hepatitis y de sólo un 8 a un 20 % evoluciona a cirrosis alcohólica, la cual tiene implícita un mal pronóstico (20,24). Esta susceptibilidad individual a desarrollar la EHA sugiere que su origen es en parte genético. Esto está apoyado por los datos de un estudio con 15,924 pares de gemelos que muestran una concordancia mayor de cirrosis hepática de 14.6% en gemelos idénticos, comparada con sólo 5.4 % en gemelos fraternos, diferencia que no se explica por la varianza en las concordancias con respecto al alcoholismo entre los grupos comparados (17).

Como todos los órganos, el hígado contiene tejido conjuntivo extracelular (matriz extracelular), compuesto por colágenas, proteínas glicosiladas y proteoglicanos. Las colágenas representan el componente principal de la matriz (14). Las colágenas tipo I, III, IV, V y VI están presentes en el hígado normal, siendo los tipos I y III los que constituyen cerca del 80% de la colágena hepática total. En el hígado sano, la producción de la matriz extracelular es mínima, pero en el hígado cirrótico, la cantidad de colágena se incrementa de dos a seis veces más, siendo la colágena tipo I la forma que predomina (27). La colágena tipo I es un heterotrímero constituido por dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2, respectivamente, que poseen estructuras primarias distintas pero al-

tamente homólogas. Estas cadenas son codificadas por los genes COLIA1 y COLIA2, respectivamente, los cuales se encuentran en una única copia en el genoma humano haploide, no siendo sus loci sinténicos (36).

Debido a la clara sobreexpresión de la proteína que codifican en el hígado cirrótico, es posible que la posesión de variantes estructurales y funcionales de colágena tipo I pudiera estar relacionada con diferencias en la susceptibilidad individual a desarrollar el trastorno inducido por el consumo de alcohol. Los genes mencionados presentan sitios polimórficos, lo cual permite utilizarlos como marcadores genéticos en estudios poblacionales de asociación entre algún alelo y la EHA. Un estudio de este tipo en la población mexicana resulta aun más interesante debido a la gran frecuencia de muertes que ocurren en nuestro país por cirrosis hepática de tipo alcohólico ya que hay escasamente 3 estudios publicados a nivel mundial, sin haberse demostrado, de manera clara, si existe o no asociación con la enfermedad (4,10).

El objetivo de este trabajo fue el de determinar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 diferentes polimorfismos de los genes colágena tipo I (dos en la secuencia de COLIA1 y uno en la secuencia de COLIA2), entre grupos de alcohólicos que presentan o no daño hepático. Asimismo, se determinaron a modo de referencia los mismos parámetros en un grupo de cirróticos no alcohólicos y en sujetos sanos. Para disminuir el efecto de las diferencias étnicas en las frecuencias de los alelos, el estudio se restringió a individuos con padres y abuelos mexicanos.

## Métodos

### Sujetos

Los candidatos al estudio fueron pacientes ambulatorios u hospitalizados, seleccionados a partir del análisis de los expedientes clínicos de la Clínica de Hígado del Departamento de Gastroenterología del INNSZ. A cada uno de los sujetos se le informó de los objetivos del estudio, firmando una carta de consentimiento para participar en el protocolo. A cada paciente se le hizo una exploración física, se elaboró su historia clínica, y se le hizo una valoración nutricional. Todos los sujetos proporcionaron información sobre sus antecedentes familiares, acerca de enfermedades en general, y, en especial, acerca de la cirrosis, con lo cual se construyó un familliograma, subrayando las causas de los fallecimientos y los antecedentes del consumo de alcohol. El patrón de consumo de alcohol, tanto actual como en retrospectiva, se determinó con base en la evaluación de las preguntas correspondientes sobre la cantidad y la frecuencia de la ingestión, incluidas en el AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) (30), así como de la información registrada en su historia clínica de toda su vida. Los pacientes fueron distribuidos en alguno de los siguientes grupos de estudio, con base en criterios clínicos, laboratoriales, ultrasonográficos y en algunos casos, histológicos.

### *Alcohólicos con daño hepático*

Los individuos que hubieron bebido durante 15 años o más, un mínimo de 80 g de etanol/día, con pruebas de funcionamiento hepático anormales y diagnóstico de hepatopatía (hepatitis o cirrosis) alcohólica. Puntaje del AUDIT mayor a 8.

### *Alcohólicos sin daño hepático*

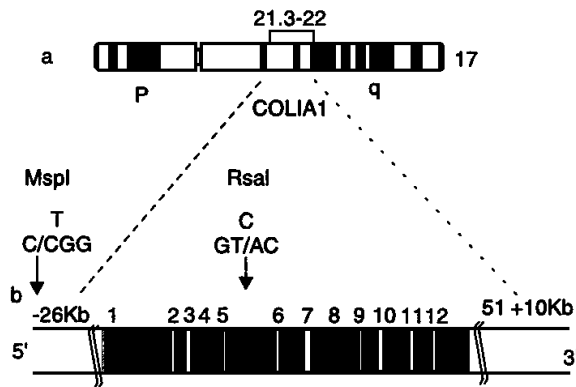
Los individuos que hubieran bebido durante 15 o más años un mínimo de 80 g por día con hepatopatía descartada, pruebas de funcionamiento hepático normales y puntaje del AUDIT mayor de 8.

El daño hepático, en su caso, fue sugerido por una historia clínica compatible, apoyada por los datos obtenidos de los exámenes físico, clínico y de laboratorio confirmatorios (TGO, bilirrubinas, GGT, VCM e IGA elevados.). Para el diagnóstico de hepatitis se efectuó en algunos casos el análisis de una biopsia hepática con los siguientes criterios histológicos: necrosis hepatocelular de predominio en la vénula hepática terminal, con presencia en esta zona de leucocitos segmentados junto a células con cuerpos hialinos de Mallory y degeneración balonoide. En tanto que para el diagnóstico de cirrosis se establecieron como criterios histológicos, la presencia de nódulos de regeneración, rodeados de tejido conectivo y pérdida de la arquitectura lobular normal.

Se establecieron como criterios de exclusión: que el paciente no aceptara participar en el proyecto, que hubiera recibido transfusiones sanguíneas durante los 4 meses previos al inicio del estudio, o bien que resultara positivo para antígenos de virus de hepatitis y no perteneciera al grupo de cirrosis no alcohólica o que alguno de sus padres o abuelos no hubiera nacido en México.

Adicionalmente, se incluyó un grupo de individuos con diagnóstico de cirrosis de diversa etiología (bajo los criterios antes mencionados, incluyendo en algunos casos la biopsia hepática), en los cuales se excluyó como causa probable el consumo excesivo de alcohol (puntaje global en el AUDIT menor a 8). Asimismo, se analizaron muestras obtenidas de individuos sanos, en la mayoría de los cuales se excluyó el diagnóstico tanto de abuso como de dependencia del alcohol u otro fármaco, así como la presentación de algún problema psiquiátrico (tras la aplicación del CIDI, versión al español). Todos los sujetos de este último grupo tuvieron calificaciones en el AUDIT menores a los 8 puntos. Todos estos individuos también fueron informados acerca de los propósitos de este estudio, y firmaron una carta indicando su consentimiento para participar en el protocolo.

De todos los sujetos se obtuvo una muestra sanguínea por venopunción, de la cual una porción se utilizó en el análisis bioquímico y de marcadores virales, midiendo bilirrubinas, ALT, AST, FA, GGT, proteína total y albúmina. El resto de la sangre fue utilizado en la extracción de ADN genómico por el método de Kawasaki (18).

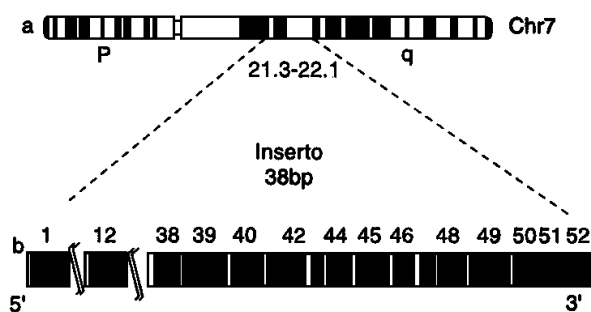


**Figura 1.** (a) Representación esquemática de la localización del gene COLIA1 en el cromosoma 17. (b) Mapa del gene con los sitios polimórficos descritos. Los rectángulos negros corresponden a las regiones intrónicas (no codificantes) del gene, y las franjas claras corresponden a las regiones exónicas (codificantes). Las flechas indican los polimorfismos analizados en la secuencia de este gene.

#### Obtención de los genotipos

El sitio polimórfico MspI, localizado aproximadamente a 26 kb del principio de la transcripción del gene COLIA1, fue amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* diseñados a partir de la secuencia obtenida de un fragmento Sall-Hind III de 800 pb, a partir del cósmido CG102, que contiene el sitio polimórfico para la enzima de restricción correspondiente(2). En caso de presentarse el sitio de restricción correspondiente, el amplicón resultante de 200 bp, produce una banda ancha que contiene dos fragmentos de 100 bp (figura 1).

El polimorfismo producido por una transición C → T, 388 bp 5' del principio del exón 6 del gene COLIA1 fue detectado mediante la digestión con la endonucleasa RsaI del amplicón correspondiente (28). Los alelos producidos de 685 bp (Rsa-) o los fragmentos 562 + 123 bp (Rsa+), fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (figura 1).



**Figura 1.** (a) Representación esquemática de la localización del gene COLIA2 en el cromosoma 7. (b) Mapa del gene. Los rectángulos negros corresponden a las regiones intrónicas (no codificantes) del gene, las franjas claras corresponden a las regiones exónicas (codificantes). La flecha indica la posición del polimorfismo analizado por inserción/delección.

La variante molecular resultante de la presencia o ausencia de un inserto 38 bp dentro del intrón del sistema alélico F (HGM10) del gene COLIA2, fue detectado mediante la amplificación por PCR del fragmento, según lo descrito en Watson y Dalgleish (38). Los fragmentos amplificados producen, según el caso, alelos de 641 o 603 bp (figura 2).

#### Análisis estadístico

Los datos acerca de la edad y los valores obtenidos en el AUDIT se reportan como promedio ± desviación estándar. Para valorar la comparabilidad entre grupos se utilizaron la prueba t de Student y la estadística de  $\chi^2$ . Las frecuencias alélicas y de los genotipos fueron analizadas mediante la prueba de  $\chi^2$  corregida para continuidad por Yates, derivadas de las tablas de 2 × 2 o 3 × 2 correspondientes.

#### Resultados

En el estudio se incluyeron individuos de ambos sexos, mayores de 50 años en promedio. De todos los sujetos que aceptaron participar en el estudio (aproximadamente 110 individuos), se seleccionaron, finalmente 74 y los restantes fueron descartados por tener anticuerpos al virus de hepatitis (ya fueran sujetos alcohólicos o sanos), por haber bebido durante menos de 10 años o porque a pesar de ser mexicanos por nacimiento tenían ascendencia extranjera. Finalmente, los individuos que se estudiaron se dividieron, de acuerdo con el diagnóstico, en 39 alcohólicos con cirrosis y 35 alcohólicos sin cirrosis. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en relación a la edad y los puntajes promedio de AUDIT, como se muestra en el cuadro 1. A estas muestras se agregaron 74 controles sanos, así como 44 cirróticos no alcohólicos. Como se muestra en ese mismo cuadro, la mayor parte de los pacientes alcohólicos, con o sin cirrosis, fueron del sexo masculino. Esta misma proporción por género (80-90 % de hombres), y por grupo se procuró mantener en los grupos restantes. Sin embargo, esta tendencia no pudo conservarse en el grupo de cirróticos no alcohólicos, en los que la proporción de mujeres se ve invertida.

A pesar de que la intención original fue la de analizar el número total de las muestras obtenidas para cada uno de los polimorfismos, varias de éstas resultaron refractarias a la amplificación por PCR para alguno(s) de los 3 sistemas estudiados, probablemente debido a impurezas presentes en la muestra (eg. hemoglobina) que se sabe inhiben a la Taq polimerasa. De esta manera, el análisis final se restringió a un número particular de muestras por sistema polimórfico, como se indica en los cuadros 2-4 correspondientes.

Las frecuencias de alelos en los 3 sistemas polimórficos analizados no fueron significativamente distintas de lo esperado en un equilibrio de tipo Hardy-Weinberg (datos no mostrados). Por otra parte, el análisis de los datos por  $\chi^2$  de las frecuencias de alelos y genotipos no mostró diferencia significativa en ninguna de las comparaciones establecidas, entre los grupos de alcohólicos con o sin EHA. Sólo en el sistema COLIA1/RsaI la

**CUADRO 1**  
**Características demográficas de los grupos**

Grupo	Tamaño muestra	Edad (años)	Edad (mínima)	Edad (máxima)	Sexo		Audit (puntos)
					M	F	
Alcohólicos con cirrosis	39	58 ± 11	39	78	31	08	22 ± 6
Alcohólicos sin cirrosis	35	54 ± 13	33	86	31	04	21 ± 6
Cirróticos no alcohólicos	44	52 ± 13	19	71	07	37	01 ± 1
Controles sanos	74	41 ± 09	25	60	68	06	03 ± 2

**CUADRO 2**  
**Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MspI del gene pro $\alpha$ 1 de Colágena tipo I**

Grupo	n	Alelos		Genotipos			A1A1 + A1A2 No. (%)
		A1 No. (%)	A2 No. (%)	A1A1 No. (%)	A1A2 No. (%)	A2A2 No. (%)	
Alcohólicos con cirrosis	33	52(79)	14(21)	20(61)	12(36)	1(03)	32(97)
Alcohólicos sin cirrosis	31	42(68)	20(32)	15(48)	12(39)	4(13)	27(87)
Cirróticos no alcohólicos	30	41(68)	19(32)	13(43)	15(50)	2(07)	28(93)
Controles sanos	31	50(81)	12(19)	19(60)	12(40)	0(0)	31(100)

distribución de los genotipos entre todos los grupos se mostró marginalmente distinta ( $\chi^2 = 6.0$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.05$ ) (cuadro 3). En este caso particular, la frecuencia del alelo 2 (que presenta el sitio de restricción) fue mayor, aunque no estadísticamente significativa, para ambos grupos de alcohólicos (con y sin cirrosis) cuando se le compara con el grupo de sujetos sanos. (OH<sup>+</sup> cirrosis vs control:  $\chi^2 = 3.14$ ,  $df = 1$ ; OH<sup>-</sup> cirrosis vs control  $\chi^2 = 3.12$ ,  $df = 1$ ;  $P = 0.08$ , para ambas comparaciones).

### Discusión

La tasa de cirrosis hepática observada en México es una de las más altas de América; superior a las de algunos países de Europa y Oceanía y comparable a la descrita en España entre la población masculina (12). Dado que hay una estrecha relación entre el abuso de alcohol y el desarrollo del trastorno, la mortalidad por cirrosis hepática se ha adoptado internacionalmente como uno de los indicadores del alcoholismo. En México, cerca del 60% de los casos de cirrosis hepática están relacionados con el consumo excesivo de alcohol.

Aunque se ha establecido que el riesgo de desarrollar hepatopatía alcohólica parece depender de si se ha sobrepasado un determinado umbral de consumo (31), no se ha podido explicar por qué el hígado de 4 de cada 5 alcohólicos tolera el etanol año tras año sin desarrollar daño grave, mientras que el de otros individuos desarrolla cirrosis después de pocos años de abusar del alcohol. Este fenómeno sugiere la existencia de factores individuales, algunos posiblemente genéticos, que modifican el riesgo o la susceptibilidad a desarrollar del proceso fibrótico. El descubrimiento de tales factores tendría un valor inmediato en las medidas terapéuticas, debido a que las estrategias actuales tienen un valor limitado y sólo la completa abstinencia del alcohol, la cual únicamente se logra en un porcentaje mínimo de casos, es efectiva.

Con la finalidad de identificar los marcadores genéticos que se relacionen con la prevalencia de enfermedades hepáticas de tipo alcohólico, se han estudiado diversos genes que pudieran estar asociados al metabolismo del alcohol, a la respuesta inmunológica o al proceso fibrótico característico de la cirrosis. Entre estos genes sobresalen los que intervienen en el metabolismo del etanol, que codifican para la deshidroge-

**CUADRO 3**  
**Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo RsaI del gene pro $\alpha$ 1 de Colágena tipo I**

Grupo	n	Alelos		Genotipos			A1A1 + A1A2 No. (%)
		A1 No. (%)	A2 No. (%)	A1A1 No. (%)	A1A2 No. (%)	A2A2 No. (%)	
Alcohólicos con cirrosis	39	07(09)	071(91)	00(00)	07(18)	33(82)	07(18)
Alcohólicos sin cirrosis	35	06(09)	064(91)	01(03)	04(11)	30(86)	05(14)
Cirróticos no alcohólicos	44	12(14)	076(86)	00(00)	12(27)	32(73)	12(27)
Controles sanos	74	28(19)	120(81)	05(07)	19(24)	50(69)	23(31)

**CUADRO 4**  
**Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo COLIA2 inserto 38 pb del gene pro $\alpha$ 2**  
**de colágena tipo I**

Grupo	n	Alelos		Genotipos			A1A1 + A1A2 No. (%)
		A1 No. (%)	A2 No. (%)	A1A1 No. (%)	A1A2 No. (%)	A2A2 No. (%)	
Alcohólicos con cirrosis	39	07(09)	071(91)	00(00)	07(18)	33(82)	07(18)
Alcohólicos sin cirrosis	35	06(09)	064(91)	01(03)	04(11)	30(86)	05(14)
Cirróticos no alcohólicos	44	12(14)	076(86)	00(00)	12(27)	32(73)	12(27)
Controles sanos	74	28(19)	120(81)	05(07)	19(24)	50(69)	23(31)

nasa alcohólica, el aldehído deshidrogenasa y el citocromo P450 (ADH3, ALDH2, CYP2E1, respectivamente). Estos genes son muy polimórficos y tienen diferentes alelos que codifican a isoenzimas con distinta capacidad para metabolizar el etanol (1). Hasta la fecha, los intentos por relacionar algunos de los alelos de estos genes con la susceptibilidad a desarrollar cirrosis hepática alcohólica han sido contradictorios [ADH: refs (11,26); CYP2E1: refs (6,9,22)]. Por otra parte aunque parece evidente que la posesión de una forma alélica mutante y catalíticamente inactiva, denominada ALDH2\*2 (que tienen frecuentemente las poblaciones orientales, pero no los individuos de raza caucásica) podría servirle a ciertos individuos homocigotos a este alelo, como un factor biológico que los protegiera del alcoholismo (16), su papel como factor preventivo secundario para desarrollar daño hepático no se ha determinado con certeza (13,32). En México, un estudio reciente llevado a cabo en el INNSZ no mostró que existiera esta forma mutante inactiva en un grupo de 90 individuos y, por lo tanto, tampoco diferencias alélicas entre los mismos, al dividirlos por la presencia o ausencia de EHA (21). Se han estudiado otros genes también altamente polimórficos, como aquéllos del sistema de antígenos HLA, asociando, por ejemplo, al HLA B con una rápida evolución a la cirrosis (29).

Esta es la primera vez que se analizan polimorfismos en los genes de la colágena I en una población latinoamericana, en relación con la enfermedad hepática alcohólica. Los estudios anteriores de asociación llevados a cabo en poblaciones caucásicas, han mostrado resultados contradictorios. Weiner y cols., empleando la técnica de PLFR (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y sondas de DNA genómico y complementario para mapear dos sitios polimórficos del gene COLIA2, localizados en las regiones 5' y 3' del gene, respectivamente, indicaron haber encontrado con mayor frecuencia un haplotipo específico en los alcohólicos con cirrosis, que en los alcohólicos sin cirrosis y en los controles sanos. Sin embargo, la muestra analizada fue muy pequeña y las características étnicas y raciales de los grupos de comparación no eran muy claras, lo cual limitó la interpretación de los resultados. En un segundo estudio, en el se que analizó por PCR un polimorfismo detectado mediante la restricción con la endonucleasa MspI en el gene COLIA2, se encontró una asociación significativa entre el genotipo homocigoto del alelo mayor de 2.2 kb en un grupo de 41 individuos que presentaron hepatitis alcohólica agu-

da, en comparación con los alcohólicos sin hepatitis y con los controles (10). Por haberse incluido en este estudio a individuos alcohólicos que reconocieron haber abusado del alcohol sólo durante 2 años, es posible que algunos o muchos de estos sujetos no hayan consumido alcohol suficiente tiempo como para desarrollar las características clínicas observables en la enfermedad hepática. Un tercer estudio llevado a cabo con 56 alcohólicos con cirrosis, y 74 controles sanos no mostró ninguna evidencia de que se relacionaran los 4 diferentes polimorfismos presentes en los genes de COLIA1 y COLIA2 (incluido el polimorfismo RsaI del gene pro $\alpha$ 1 tipoI analizado en este trabajo) con el diagnóstico de cirrosis alcohólica (4). Este trabajo no incluyó a los individuos que a pesar de haber abusado del alcohol durante una o más décadas no desarrollaron cirrosis. Es importante mencionar, sin embargo, que en este último caso se observó una diferencia en la frecuencia de este marcador del gene COLIA1, al comparar a los controles de este estudio (individuos originarios del noreste de Inglaterra), con otro grupo de la población caucásica inglesa —probablemente más heterogéneo— reportado previamente por otros investigadores (34). Este hallazgo pone de manifiesto la importancia que tiene estudiar poblaciones étnicas y racialmente similares.

El presente estudio se llevó a cabo en una muestra de población mexicana, la cual, a pesar de ser mestiza, comprende individuos probablemente más similares étnicamente que los estudiados anteriormente. El hecho de que tanto los padres como los abuelos de los probandos fueran mexicanos, reduce la probabilidad de incluir una mayor heterogeneidad poblacional. No obstante, el uso de nuevas metodologías de análisis genético estadístico, como la denominada de Riesgo Relativo por Haplotipo (HRR) (35) o la Prueba de Desequilibrio, de Spielman (33), que utilizan la información parental como control interno de las frecuencias alélicas, eliminando así el sesgo antes mencionado, deben ser consideradas como estrategias de investigación en el futuro.

A diferencia de los estudios anteriores, en el presente trabajo se analizaron 3 diferentes polimorfismos (dos nunca antes analizados: MspI/COLIA1 e inserción/delección de 38 pb COLIA2, y uno previamente reportado: RsaI/COLIA1) con un contenido de información polimórfica relativamente alto (0.4-0.46), en un número similar de pacientes con cirrosis alcohólica y alcohólicos sin cirrosis. Se consideró que la comparación con-

tra un grupo de controles sanos no permitía responder la pregunta de interés, ya que estos individuos no están sujetos al factor de riesgo que representa consumir bebidas alcohólicas, y si las consumen, quizá no han estado expuestos el tiempo necesario para llegar a tener las características clínicas del daño al hígado. Sin embargo, se analizó este grupo con el objeto de establecer valores que representen las posibles frecuencias de estos alelos en la población mexicana. Por último, se incluyó a un grupo de cirróticos no alcohólicos con el propósito de probar si hay distintos grados de susceptibilidad a la cirrosis, independientemente de la etiología, o si, por el contrario, la susceptibilidad se relaciona con el etanol y no con otros agentes causales.

De acuerdo con nuestros datos, no hay diferencias en las frecuencias de alelos o genotipos entre los grupos de alcohólicos, independientemente de la presencia o ausencia de cirrosis.

Tomando en cuenta que sólo se analizó un número limitado de polimorfismos incluidos en las secuencias de los genes de interés, y que los mismos se encuentran en regiones no codificantes (y aun alejadas del gene como en el caso del polimorfismo MspI/COLIA1 presente a 26 Kb del primer codón), no puede descartarse la posibilidad de que el estudio de estos mismos genes, pero analizando directamente los exones o las regiones promotoras, aumentaría la probabilidad de discriminar los alelos con susceptibilidad, en especial si se construyen haplotipos.

Fue interesante encontrar que la frecuencia del alelo denominado A2 del sistema polimórfico RsaI en el intrón 5 del gene COLIA1 fue mayor en ambos grupos de pacientes alcohólicos (con o sin EHA) que la observada en el grupo de controles sanos (la cual, a su vez, fue muy similar a la descrita en otras poblaciones caucásicas (4,25,35). De hecho, si se agrupa a los alcohólicos (independientemente de que tengan o no daño al hígado) y se compara en particular la frecuencia de este alelo con el grupo control, se observa que hay una desviación de la hipótesis nula ( $\chi^2 = 5.550$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.018$ ). No obstante, parece difícil establecer cuál sería la posible relación de esta variante polimórfica

con la susceptibilidad al alcoholismo o con algún rasgo asociado con un trastorno distinto del daño hepático.

Es claro, sin embargo, que el alcohol altera directa o indirectamente la expresión de los genes de colágena, como lo han puesto de manifiesto experimentos recientes llevados a cabo en ratones transgénicos (37). Dado que en la cirrosis, las modificaciones en la estructura de la cromatina, o bien las diferencias en el estado de metilación del DNA, parecen ser sucesos relacionados con la regulación de los genes de colágena I (5) y que se han identificado y parcialmente caracterizado varios factores *cis* y *trans* que regulan la actividad transcripcional de los genes de colágena, uno podría suponer que otras variantes moleculares de estos genes, u otros genes (no exploradas en el presente estudio), pudieran modificar la biosíntesis o estructura de la colágena tipo I por medio de su interacción directa o indirecta con el alcohol.

En conclusión, nuestros resultados no apoyan la idea de que los polimorfismos estudiados pudieran estar directamente asociados con una mayor susceptibilidad desarrollar de EHA. Otras regiones de estos genes no explorados aún, podrían contener variantes estructurales relacionadas con el daño hepático inducido por alcohol. La identificación de los alelos específicos asociados con el diagnóstico de la EHA, no sólo pudiera ser importante como marcador de un *locus* de riesgo a desarrollar el trastorno, sino también podría llegar a darnos una idea más clara de los mecanismos moleculares que conducen a esta terrible enfermedad.

Este estudio fue apoyado por donativos del CONACyT (0669P-M) y Fundación Miguel Alemán.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el esfuerzo y dedicación de los médicos cirujanos Nayeli Garibay y Dan Green en la obtención de pacientes, así como la valiosa ayuda y apoyo técnico brindado por las químicas farmacéuticas biólogas Beatriz Camarena y Sara Sixtos. El doctor Julio Granados, del Departamento de Inmunología del INNSZ, proporcionó varias de las muestras analizadas del grupo control.

### REFERENCIAS

1. ARNON R, DEGLI-ESPOSTI S, ZERN MA: Molecular biology aspects of alcohol-induced liver disease. *Alcoholism Clin Exp Res*, 19:247-256, 1995.
2. BAKER R, LYNCH J, FERGUSON L, SYKES B: PCR detection of five restriction site dimorphisms at the type I collagen loci COLIA1 and COLIA2. *Nucl Acids Res*, 19:4315, 1991
3. BALL DM, MURRAY RM: Genetics of alcohol misuse. *British Med Bull* 50(1):18-35, 1994.
4. BASHIR R, DAY CP, JAMES OFW, OGILVIE DJ, SYKES B, BASSENDINE MF: No evidence for involvement of type I collagen structural genes in genetic predisposition to alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 16:316-319, 1992.
5. BRENNER DA, WESTWICK J, BREINDL M: Type I collagen gene regulation and the molecular pathogenesis of cirrhosis. *Am J Physiol*, 264:G589-G595, 1993
6. CARR LG, HARTLEROAD JT, LIANG Y, MENDENHALL C, MORITZ T, THOMASSON H: Polymorphism at the P450IIE1 is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men. *Alcohol Clin Exp Res*, 19(1):182-184, 1995.
7. COTTON NS: The familial incidence of alcoholism: a review. *J Stud Alcohol*, 40:89-116, 1979.
8. CRABB J: Molecular methods: Mapping, moving and manipulating genes. *Alcohol Clin Exp Res*, 19:793-794 1995.
9. CHAO YC, YOUNG TH, CHANG WK, TANG HS, HSU CT: An investigation of whether polymorphisms of cytochrome P450E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-storage organ damage in a Chinese population. *Hepatology*, 22(5):1409-1414, 1995.
10. CHRISTA L, ZARSKI J-P, NALPAS B, AUGEREAU, BREHOT C: Nested polymerase chain reaction on cellular DNA in plasma: a rapid method to investigate the collagen type I A2 MspI polymorphic restriction site in alcoholic patients. *Hum Genet*, 88:537-540, 1992.
11. DAY CP, BASHIR R, JAMES OFW, BASSENDIRE MF, CRABB DW, THOMASSON HR. Investigation of the role of polymorphisms at the alcohol and aldehyde dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol related end-organ damage. *Hepatology*, 14:798-801, 1991.
12. DE LA FUENTE R, MEDINA-MORA ME: Las adicciones en México. 1. el abuso del alcohol y los problemas relacionados. *Salud Mental*, 10(2):3-12, 1987.

13. ENAMOTO NM, TAKASE S, TAKADA N, TAKADA A: Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. *Hepatology*, 13:1071-1075, 1991.
14. FLEISCHMAJER R, OLSEN BR, KUHN K: STRUCTURE, molecular biology and pathology of collagen. *New York Acad Sci*, 530:592, 1990.
15. GRANT BF, DUFOUR MC, HARFORD TC: Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, (8)1:12-25, 1988.
16. HIGUCHI S, MATSUSHITA S, IMAZEKI H, KINOSHITA T, TAKAGI S, KONO H: Aldehyde dehydrogenase genotypes in Japanese alcoholics. *Lancet*, 343:741, 1994.
17. HRUBEC Z, OMENN GS: Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordance for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin Exp Res*, (5)2:207-215, 1981.
18. KAWASAKI ES: Sample preparation from blood, cells, and other fluids. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. San Diego, 1990.
19. KERSHENOBICH D: Cirrosis hepática. En: Villalobos JJ (ed). *Gastroenterología*. Editorial Méndez. 4a. ed. Vol. (II)11:1471-1481, 1993.
20. LIEBER CS: Mechanisms of ethanol-drug nutrition interactions. *Clin Toxicol*, 32:631-681, 1994.
21. LISKER R, RAMIREZ E, PEREZ G, DIAZ-BARRIGO R, SIPERSTEIN M, MUTCHINICK O: Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Mexicans with alcoholic liver cirrhosis. *Arch Med Res*, 26(supl):S63-S67, 1995.
22. MAEZAWA Y, YAMAUCHI M, TODA G: Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome p450IIIE1 gene and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 89:561-565, 1994.
23. MEDINA-MORA ME, MARIÑO MC, LOPEZ EK: Situación epidemiológica en el hemisferio: México y Centroamérica. *Las Adicciones: Hacia un Enfoque Multidisciplinario*. Secretaría de Salud. Consejo Nacional Contra las Adicciones, 1994.
24. MEZEY E: Alcoholic Liver Disease. *Prog Liver Dis*, 7:555-72, 1982.
25. MOTTES M, CUGOLA L, PIGNATTI: Haplotype frequencies of the collagen type I genes in the Italian population. *Hum Genet*, 83:369-372, 1989
26. POUPON RE, NALPAS B, COUTELLE C, FLEURY B, COZIGOU P, HIGUERET D: Polymorphism of alcohol dehydrogenase, alcohol and aldehyde dehydrogenase activities: Implications in alcoholic cirrhosis in white patients. The french group for research on alcohol and liver. *Hepatology*, 15:1017-1022, 1992.
27. ROJKIND M, GIAMBRONE MA, BIEMPICA L: Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 76: 710-719, 1979.
28. ROSE J, MACKAY K, JOHNSON R, DALGLEISH R: PCR detection of a COLIA1 RsaI RFLP. *Nucl Acids Res*, 19:3163, 1991.
29. SAUNDERS JB, HAINES A, PORTMANN B: Accelerated development of alcoholic cirrhosis in patients with HLA B8. *Lancet*, 1:1381-1384, 1982.
30. SAUNDERS JB, AASLAND OG, BABOR TF, DE LA FUENTE JR, GRANT M: Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption-II. *Addiction*, 88:791-804, 1993.
31. SAVOLAINEN VT, LIESTO K, MÄNNIKKÖ A, PENTTILÄ A, KARHUNEN PJ: Alcohol consumption and alcoholic liver disease: evidence of a threshold level of effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 17(5)1112-1117, 1993.
32. SHIBUYA A, YOSHIDA A: Genotypes of alcohol metabolizing enzymes in Japanese with alcoholic liver diseases: a strong correlation of the usual Caucasian type aldehyde dehydrogenase (ALDH2-1) with disease. *Am J Hum Genet*, 43:744-748, 1989.
33. SPIELMAN RS, MCGINNIS RS, EWENS WJ: Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 506-516, 1993.
34. SYKES BC, OGILVIE DJ, WORDSWORTH P, ANDERSON J, JONES N: Osteogenesis imperfecta is linked to both type I collagen structural genes. *Lancet*, 2: 69-72, 1986.
35. TERWILLIGER JD, OTT J: A haplotype-based "Haplotype relative risk" approach to detecting allelic associations. *Hum Hered*, 42:337-346, 1992.
36. VUORIO E, DE COMBRUGGHE B: The family of collagen genes. *Ann Rev Biochemistry*, 59:837-872, 1990.
37. WALTON CM, WU GY, PETRUFF CA, CLARK SH, LICHTLER AC, WU CH A: collagen enhancer-promoter construct in transgenic mice is markedly stimulated by ethanol administration. *Hepatology*, 23:310-315, 1996.
38. WATSON CJ, DALGLEISH R: PCR detection of a 38 bp length variant in the COLIA2 gene. *Nucl Acids Res*, 18:5925, 1991.

**RESPUESTAS DE LA SECCIÓN  
AVANCES EN LA PSIQUIATRÍA  
Autoevaluación**

1. d
2. c
3. d
4. b
5. d
6. a
7. e
8. d
9. e
10. b
11. d
12. b