

Gelatinasas como marcadores de consumo crónico de alcohol: un estudio piloto en Uruguay

Gelatinases as Markers of Chronic Alcohol Consumption: A Pilot Study in Uruguay

Gelatinasas como marcadores de consumo crônico de álcool: um estudo piloto em Uruguai

MartaMarco¹, DanielaBoragno^{1,2}, PaolaRodríguez^{1,2}, VictoriaMestreCordero¹, NataliaPereira³, PatriciaBerasain⁴, FlorenciaCadenas⁵, Cecilia Rodríguez⁵, Alejandra Moreira⁵, Ximena Simoff⁵, Virginia Bianchi⁵, Anna Barindelli⁶, Pablo Fielitz⁵, Silvia Olivera-Bravo²

RESUMEN

El consumo crónico de alcohol en Uruguay es un problema creciente, sin embargo, las determinaciones de biomarcadores consensuados no se realizan sistemáticamente ni se investigan otros marcadores potenciales. Para validar la hipótesis de que las metaloproteinasas de matriz con actividad gelatinasa son biomarcadores de consumo crónico de alcohol, se evaluaron muestras de sangre de 100 alcohólicos que comenzaron a atenderse en la Unidad de Trastornos Relacionados con el Alcohol y de 50 donantes sanos no alcohólicos. Las muestras de alcohólicos presentaron actividad de gelatinasas que triplicaron la de los controles y aumentos pequeños pero significativos en los niveles de gama-glutamyl transferasa, aspartato-aminotransferasa y volumen corpuscular medio. Los valores de transferrina deficiente en carbohidratos fueron menores en alcohólicos que en controles. Estos resultados permiten proponer a las gelatinasas como los indicadores más sensibles del consumo sostenido de alcohol en la población analizada ya que las enzimas hepáticas y el volumen corpuscular medio muestran una tendencia acorde con la literatura pero no alcanzaron valores asociados a la patología. Dado que la transferrina deficiente en carbohidratos es considerada el biomarcador indirecto más sensible y específico de consumo crónico de alcohol, los valores menores obtenidos en alcohólicos respecto de controles sugieren problemas metodológicos que podrían subsanarse aplicando otras técnicas de medida o la presencia de interferencias que deben ser identificadas. Finalmente, estos hallazgos justifican una extensión de este trabajo piloto, así como estudios adicionales centrados en la participación de las metaloproteinasas de matriz con actividad gelatinasa en las cascadas de daño asociadas al consumo crónico de alcohol.

Palabras clave: alcoholismo crónico, biomarcadores indirectos, gelatinasas.

ABSTRACT

Chronic alcohol consumption in Uruguay is a growing problem, however, determinations of consensual biomarker are not performed systematically neither potential markers are explored. To validate the hypothesis that matrix metalloproteinases with gelatinase activity are biomarkers of chronic alcohol consumption, blood samples of 100 alcoholics that began medical treatment at the Unidad de Trastornos Relacionados con el Alcohol and 50 healthy non-alcoholic donors were evaluated. Alcoholic samples showed gelatinase activity that tripled that of controls and small but significant increases in levels of gamma-glutamyl transferase, aspartate-aminotransferase and mean cellular volume. Carbohydrate deficient transferrin values were lower in alcoholics than in controls. These results allow

proposing gelatinases as the most sensitive indicators of sustained alcohol consumption in the population analyzed since hepatic enzymes and mean cellular volume showed a tendency consistent with the literature but did not reach values associated with the pathology. Since carbohydrate-deficient transferrin is considered the most sensitive and specific indirect biomarker of chronic alcohol consumption, lower values in alcoholics related to controls suggest methodological problems that could be solved by applying other measurement techniques or the presence of yet unknown interferences. Finally, these findings justify an extension of this pilot work, as well as additional studies focused on the participation of matrix metalloproteinases with gelatinase activity in the cascades of damage associated with chronic alcohol consumption.

Keywords: Chronic Alcoholism, Indirect Biomarkers, Gelatinases.

RESUMO

O consumo crônico de álcool no Uruguai é um problema crescente, no entanto, as determinações consensuais de biomarcadores não são realizadas sistematicamente ou os potenciais marcadores são explorados. Para validar a hipótese de que as metaloproteinasas de matriz com atividade gelatinase são biomarcadores do consumo crônico de álcool, foram avaliadas amostras de sangue de 100 alcoólatras que começaram a ser tratadas na Unidade de Trastornos Relacionados com el Alcohol e 50 doadores não-alcoólatras saudáveis. As amostras alcoólicas apresentaram atividade de gelatinase que triplicou a dos controles e pequenos mas significativos aumentos nos níveis de gama-glutamyl transferase, aspartato-aminotransferase e volume médio celular. Os valores de transferrina deficientes em carbohidratos foram menores nos alcoólistas que nos controles. Esses resultados permitem que as gelatinases sejam propostas como os indicadores mais sensíveis do consumo sustentado de álcool na população analisada, uma vez que as enzimas hepáticas e o volume celular médio apresentam uma tendência consistente com a literatura, mas não alcançaram valores associados à patología. Como a transferrina deficiente em carbohidratos é considerada o biomarcador indireto mais sensível e específico do consumo crônico de álcool, os valores mais baixos em alcoólatras do que em controles sugerem problemas metodológicos que poderiam ser sanados pela aplicação de outras técnicas de mensuração a presença de interferências que deben identificadas. Finalmente, esses achados justificam uma extensão deste trabalho piloto, bem como estudos adicionais voltados para a participação de metaloproteinasas de matriz com atividade de gelatinase nas cascatas de danos associados ao consumo crônico de álcool.

Palavras-chave: alcoolismo crônico, biomarcadores indiretos, gelatinases.

¹Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-2966-800X, 0000-0001-7683-2397, 0000-0002-2379-2835, 0000-0001-9417-6194

²Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Ministerio de Educación y Cultura (MEC). ORCID: 0000-0002-6483-1466 Contacto: solivera@iibce.edu.uy

³Laboratorio Central del Hospital Maciel, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-2629-2385

⁴Unidad de Biología Parasitaria, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-7388-6880

⁵UNITRA, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-4958-3177, 0000-0002-3830-4769, 0000-0001-5174-1085, 0000-0001-8197-4701, 0000-0002-7837-1253, 0000-0003-1082-0419

⁶Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-6792-0835

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, el alcohol es la droga más consumida con 261.000 de los 3.250.000 habitantes que muestran signos de consumo problemático y otros 100.000 con signos claros de dependencia del alcohol⁽¹⁾. Además, la incidencia del 13 % en adolescentes y mujeres menores de 18 años está aumentando en paralelo con una disminución continua en la edad de inicio del consumo de alcohol⁽¹⁾. Curiosamente, las determinaciones de parámetros biológicos que reflejen el consumo de alcohol no son usuales y los datos relacionados con los hábitos de consumo de alcohol surgen mayoritariamente de encuestas generales nacionales, ventas de bebidas alcohólicas y análisis de espirometría realizados por las autoridades de tránsito. Para comenzar a solucionar esta falta, en la Unidad de Trastornos Relacionados con el Alcohol (UNITRA, Hospital de Clínicas, UDELAR) se ha comenzado a realizar la determinación de algunos parámetros indirectos de consumo de alcohol: I- las enzimas hepáticas gamma-glutamyl-transferasa (GGT), alanin-aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) porque se encuentran entre los indicadores más utilizados de consumo crónico de alcohol⁽²⁾⁽³⁾, se ordenan como parte de la paraclínica de rutina y sus determinaciones son baratas y simples; II- volumen corpuscular medio (VCM) porque aumenta con el consumo excesivo de alcohol⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾ probablemente debido a la macrocitosis y al aumento del número de reticulocitos más grandes causados por el consumo de alcohol de larga duración⁽⁹⁾; III-transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) porque es propuesta como el biomarcador indirecto más específico del consumo sostenido de alcohol que además puede reflejar la abstinencia durante el tratamiento⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ y está elevada en la mayoría de los pacientes que consumen más de 50 gramos de etanol por día durante una semana⁽⁷⁾ ⁽⁹⁾; IV- fosfatasa alcalina (PA) como indicador de daño hepático y porque se encontraron niveles más altos en la colestasis alcohólica⁽¹⁰⁾.

Dado que el consumo crónico y excesivo de alcohol induce una respuesta inflamatoria en el cerebro y que la neuroinflamación se ha propuesto como desempeñando un rol esencial en el desarrollo de la adicción al alcohol⁽¹¹⁾, nuestra hipótesis sostiene que los efectores de la inflamación conocidos como metaloproteinasas de matriz (MMP) 2 y 9 (también denominadas gelatinasas por su acción gelatinolítica) podrían ser biomarcadores tempranos y altamente sensibles del consumo problemático de alcohol. Estas dos enzimas en particular han mostrado niveles elevados en una amplia gama de enfermedades humanas⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾, donde la inflamación juega un papel

preponderante. Para comprobar esta hipótesis se determinó la actividad de MMP-2 y MMP-9 en las mismas muestras provenientes de alcohólicos y donadores controles no bebedores.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN ESTUDIADA

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela (Facultad de Medicina, UdelaR), cuyos procedimientos siguen el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki). La población analizada incluyó a los pacientes de UNITRA que cumplieron los siguientes requisitos: edad mínima de 18 años; alcohol como la única droga consumida desde al menos 1 año y ausencia de otras enfermedades. Una vez admitidos en la UNITRA, el nivel de consumo de alcohol fue establecido de acuerdo a la escala AUDIT completa (del inglés *Alcohol Use Disorder Identification Test*)⁽¹⁵⁾. Se presentó y luego invitó a participar en este estudio a cada paciente admitido en la UNITRA, solicitándole la firma de un consentimiento informado escrito que permite el uso de sus parámetros bioquímicos para fines de investigación. En total, se realizó un estudio analítico transversal en una cohorte de 100 pacientes de UNITRA AUDIT IV y en 50 donantes sanos no consumidores de alcohol que fueron invitados a participar en este estudio y posteriormente se clasificaron como nivel I de la escala AUDIT. En ambos grupos estudiados, la edad promedio fue de 45 años y varió de 26 a 70 años, con un 10-15 % de mujeres y un 85-90 % de hombres representando la distribución de género de los bebedores crónicos de alcohol en Uruguay⁽¹⁾.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvieron muestras biológicas durante el día de la primera entrevista médica de cada paciente o control que confirmó una abstinencia de 8 h. Se obtuvo un par de muestras en tubos con anticoagulantes y una tercera en tubos secos. Cada muestra se almacenó inmediatamente a 5 °C por menos de 6 h, luego se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio Central del Hospital Maciel, donde se procesaron simultáneamente las muestras provenientes de los grupos control y alcohólicos. Los niveles de gelatinasas en suero se determinaron de las muestras obtenidas en tubos secos y fueron realizadas en el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Química por dos personas

independientes empleando el método de doble ciego. Cada determinación se realizó por duplicado o por triplicado en tres procedimientos diferentes.

Las enzimas GGT, AST, ALT y PA se midieron espectrofotométricamente en un equipo Beckman Coulter AU 480 utilizando sus respectivos métodos enzimáticos cinéticos siguiendo las sugerencias de la Federación Internacional de Química Clínica⁽¹⁶⁾. Brevemente, para determinar GGT se evaluó a la liberación de 5-amino-2-nitrobenzoato al catalizar la transferencia de ácido glutámico a glicilglicina a 405 nm, mientras que para determinar AST o ALT se evaluó la pérdida de absorbancia a 340 nm producida por el consumo de NADH durante la transaminación de aspartato (AST) o alanina (ALT) a -oxoglutarato⁽¹⁶⁾. La actividad PA se midió determinando la tasa de conversión de p-nitrofenilfosfato en medio alcalino tamponado con 2-amino-2-metil-1-propanol a 520 nm⁽¹⁶⁾. Los niveles de albúmina se determinaron usando verde de bromocresol como indicador de color y de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes.

Los valores de CDT y transferrina total se determinaron en el Laboratorio de Inmunología del Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas Manuel Quintela empleando un ensayo inmunonefelométrico directo N Latex CDT mediante el uso de un kit comercial⁽⁹⁾. Todos los valores, excepto VCM y CDT se expresaron como valores relativos a proteínas totales determinadas por el método del ácido bicinconínico⁽¹⁷⁾.

ZIMOGRAFÍA EN GELATINA

El ensayo de zimografía en gel fue realizado según Marco et al (2006)⁽¹⁷⁾ con pequeñas modificaciones. Brevemente, 1 % de gelatina para cultivo celular se copolimerizó en gel de poliacrilamida al 8 %. Empleando geles de 15 carriles, se cargaron 0,5 µl de cada muestra de suero en cada carril y se sometieron a electroforesis a 100 V durante aproximadamente 3 h empleando el sistema Miniprotean II (BioRad, Reino Unido). En cada gel se sembró igual cantidad de proteínas de MMP-2 y MMP-9 recombinante. Luego de la corrida electroforética, el gel se desmontó, lavó 2 veces a temperatura ambiente con Triton X-100 al 2,5 % durante 30 minutos, se enjuagó 3 veces en agua destilada y se incubó durante 18 h a 37 °C en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, suplementado con 25 mM de CaCl₂, 200 mM de NaCl y 0.005 % Brij 35. Después de la incubación, el gel se tiñó con 1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 preparado en metanol al 40 % y ácido acético glacial al 10 % y luego se destiñó hasta percibir bandas claras donde se identificó la degradación de gelatina. El cálculo de las masas moleculares aparentes de las bandas gelatinolíticas se realizó por referencia a MMP-

9 y -2 recombinantes empleadas como patrones. El área de cada banda se determinó con el programa Image J (NIH) y se expresó como unidades absolutas (UA).

ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Cada determinación bioquímica se incluyó en una tabla que contenía las muestras numeradas, sin ninguna referencia a la identidad de cada participante en el estudio. Los datos de diferentes laboratorios se agruparon después de parametrizar los valores a proteínas totales, excepto los valores de VCM que se tomaron en valores de fL y CDT que se denominaron como un porcentaje de la transferrina total como generalmente se reporta en la literatura existente⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Después de agrupar los datos, se analizó la estadística descriptiva en cada parámetro considerando a toda la población de controles y pacientes, luego se hicieron gráficos de cajas de cada población utilizando GraphPad Prism6 indicándose el rango (mínimo y máximo), la mediana y los cuartiles 1 y 3 de cada población. La comparación entre los valores presentes en controles y en pacientes se realizó con pruebas estadísticas del mismo software, empleándose ANOVA de una cola para comparación entre grupos.

RESULTADOS

Los niveles de GGT y AST parametrizados a proteínas totales y la relación AST/ALT mostraron aumentos significativos en los alcohólicos en comparación con los controles, (**Figuras 1B, D y E**, $p < 0.05$), mientras que ALT (**Figura 1C**) no mostró diferencias significativas entre ambas poblaciones. VCM presentó un aumento pequeño pero significativo ($p < 0.001$) con una escasa dispersión de valores que fue mucho menor que la presentada por los otros parámetros analizados (**Figura 1F**). Los valores de CDT referidos a porcentaje de transferrina total bajaron en alcohólicos en comparación con los controles (**Figura 1G**) y los niveles de PA fueron similares entre ambos grupos (**Figura 1H**).

Las diferencias mayores entre alcohólicos y controles se detectaron en la actividad enzimática de MMP-2, MMP-9 o la suma de ambas (**Figura 2A, B**), donde los alcohólicos triplicaron o cuadruplicaron los valores de los controles. Los niveles de albúmina no mostraron cambios al comparar ambos grupos (**Figura 2C**).

DISCUSIÓN

Las enzimas hepáticas, GGT y AST mostraron aumentos significativos en los alcohólicos, mientras

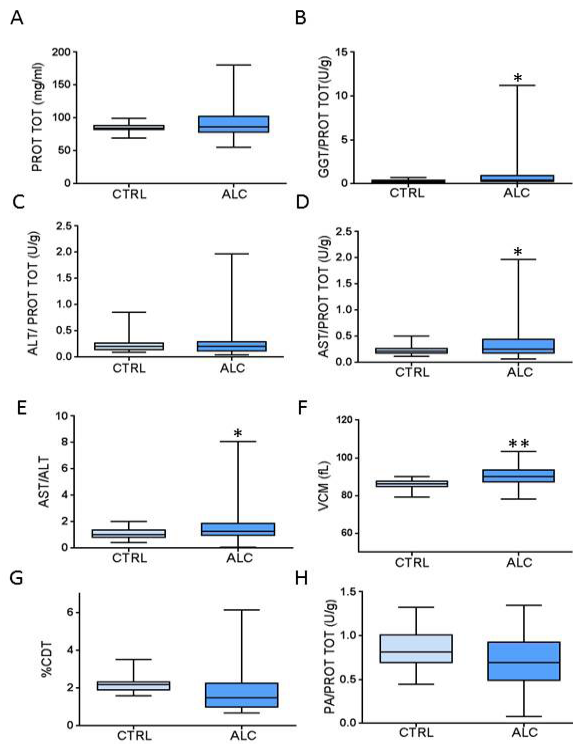


Figura 1. Valores séricos de proteínas totales (A); GGT (B); ALT (C); AST (D); relación ALT/AST (E); VCM (F); CDT (G) y AP (H) en controles y alcohólicos. Los valores fueron normalizados a proteínas totales (U/mg) excepto para VCM expresado como fL y CDT expresada como % de transferrina total de acuerdo a lo usualmente aceptado⁽⁷⁾⁽⁸⁾. Las gráficas de cajas que muestran los valores mínimos y máximos, primer y tercer cuartil y mediana, así como el análisis de datos entre grupos se realizó con GraphPad Prism6 empleando ANOVA de una cola. (*) indica $p < 0.05$ y (**) $p < 0.001$.

que ALT fue similar en ambas poblaciones, confirmando la mayor sensibilidad de GGT en comparación con ALT y AST como se reportó anteriormente⁽³⁾. Sin embargo, aunque la relación AST/ALT fue significativamente mayor en alcohólicos que en controles, no alcanzó el valor considerado patológico (>2), probablemente porque el abuso de alcohol de larga data tiende a disminuir los valores de esas enzimas por el daño hepático producido⁽³⁾. Sin embargo, la ausencia de cambios en la fosfatasa alcalina sugiere que los alcohólicos no presentan daño hepático significativo⁽¹⁸⁾. Otra posible explicación de la falta de mayores diferencias entre alcohólicos y controles puede surgir del rango de edad extendido de la población estudiada, ya que las enzimas hepáticas como la GGT parecen aumentar en pacientes de 18 a 65 años⁽¹⁸⁾ y no parecen responder al consumo de alcohol en menores de 30 años⁽³⁾. Para dilucidar este punto, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para permitir el análisis estadístico comparando franjas etarias menores (10 años aproximadamente)⁽¹⁸⁾.

En este estudio, los niveles de MCV se elevaron en pacientes alcohólicos en comparación con los controles como reporta la literatura⁽²⁰⁾, aunque los

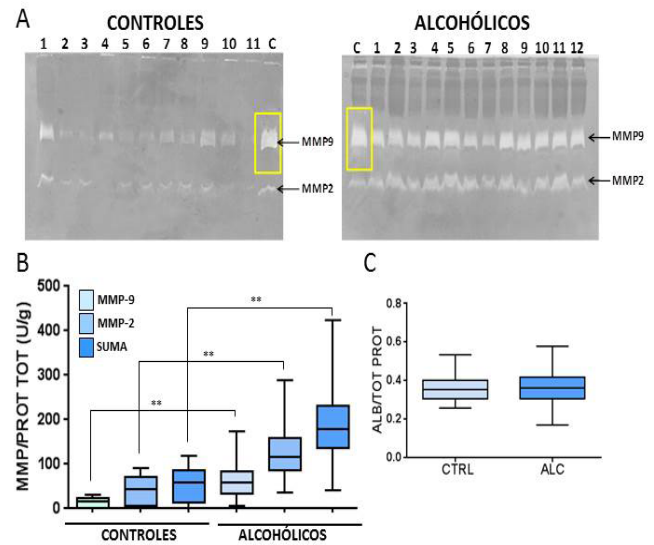


Figura 2. Determinación de MMP-2 y MMP-9 en sueros de controles y alcohólicos. (A) Zimogramas representativos de controles y alcohólicos, evidenciando la hidrólisis de gelatina que se observa como bandas blancas en un gel coloreado en los lugares correspondientes a los tamaños de MMP-2 y MMP-9. Los recuadros amarillos muestran los controles positivos correspondiente a MMP-2 y MMP-9 recombinante comercial. (B) Cuantificación en U/L de bandas positivas a MMP-2 y MMP-9 luego de la determinación de las áreas con el programa Image J y la parametrización de proteínas totales de cada muestra. Las gráficas muestran la mediana, el rango de valores mínimo y máximo y los cuartiles correspondientes. (C) Valores de albúmina en pacientes y controles sin diferencias entre los grupos.

valores obtenidos están dentro del rango normal⁽³⁾⁽¹⁹⁾.

Los resultados obtenidos con CDT no están de acuerdo con la evidencia que propone que CDT sea el biomarcador indirecto más sensible y específico para identificar el consumo de alcohol porque no se ve afectado por otras enfermedades o medicamentos para hepáticos o enfermos crónicos⁽³⁾⁽⁶⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾.

Dado que el resto de los parámetros determinados en los alcohólicos cumple las tendencias de valores reportados en la literatura, entendemos que la ausencia de cambios observados en CDT en esta población probablemente se deba a problemas metodológicos, lo que podría solucionarse con abordajes más sensibles como electroforesis capilar entre otros⁽¹⁰⁾. Otras posibles explicaciones para los valores de CDT encontrados en alcohólicos podrían relacionarse con las interferencias reportadas en la literatura, entre las que se incluyen las variantes genéticas de transferrina⁽²³⁾, errores congénitos del metabolismo de las glicoproteínas que causan glicoproteínas deficientes en hidratos de carbono⁽²⁴⁾, variaciones en el estado hormonal femenino⁽²⁵⁾, niveles de hierro corporal⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾ y valores biométricos y hábitos personales⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾. En principio, descartamos la influencia de las variantes genéticas y de errores congénitos ya que la metodología empleada excluye esos sesgos⁽¹⁷⁾⁽²⁴⁾ y las influencias

debidas a la presencia femenina ya que la relación de sexos se mantuvo en ambos grupos analizados. Entendemos que la influencia de los niveles de hierro en los valores de CDT en alcohólicos es menor, ya que las condiciones vitales de estos pacientes hacen improbable que exista una sobrecarga de hierro que es la asociada a niveles bajos de CDT⁽²⁶⁾. Finalmente, pese a que en este estudio no se realizaron determinaciones de los valores biométricos de los participantes, no podemos descartar su influencia ni la del hábito de fumar en ninguno de los dos grupos. No obstante, ello podría explicar incrementos en los valores de CDT⁽²²⁾⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾, no disminuciones.

Los resultados más relevantes obtenidos fueron los enormes aumentos en los niveles de gelatinasas en pacientes alcohólicos en comparación con los controles. Este es un resultado novedoso ya que la literatura reporta escasos trabajos anteriores reportando niveles aumentados de gelatinasas en alcohólicos crónicos. Si bien Sillanaukee y colegas (2002)⁽¹⁸⁾ mostraron elevaciones de proteína MMP-9 en alcohólicos finlandeses probablemente debido a la condición inflamatoria general crónica que sufren los alcohólicos⁽¹¹⁾, los aumentos eran menores y no habían reportado cambios en MMP-2. Analizando pacientes del este de Polonia, Prystupa y colegas (2015)⁽²⁹⁾ encontraron niveles aumentados de MMP-2, MMP-8 y MMP-9 solo en las etapas cirróticas en alcohólicos cirróticos hepáticos, pero no antes. En cambio, nuestros resultados no están de acuerdo con los datos obtenidos por Madro y cols.⁽³⁰⁾ que muestran disminución en la actividad de MMP-2 en alcohólicos cirróticos y ausencia de cambios en la actividad de MMP-9. Hay parcial coincidencia con los reportes de Kuyvenhoven y cols.³¹ que muestran incrementos en los niveles de MMP-2, pero no en MMP-9, en relación directa con la progresión del daño hepático de diferente etiología, incluyendo alcoholismo.

Nuestros resultados no solo muestran aumentos mayores en MMP-9 que los reportados anteriormente⁽¹⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾, sino que estos aumentos aparecen antes que el daño hepático significativo según sugieren los valores obtenidos de PA en la población analizada. Por tanto, proponemos que las gelatinasas pueden actuar como biomarcadores de consumo crónico de alcohol con una sensibilidad incluso mayor que la reportada previamente. Además, como los datos encontrados en este trabajo concuerdan con los reportados en alcohólicos finlandeses y polacos, la respuesta de las gelatinasas al abuso de alcohol parece superar la debilidad de otros biomarcadores que están influenciados por múltiples factores como los hábitos alimenticios y personales que interfieren con los valores considerados normales y con las referencias

de corte para identificar etapas patológicas⁽³⁾⁽⁵⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁸⁾⁽³²⁾. Por lo tanto sugerimos que las gelatinasas podrían ser biomarcadores sensibles y generales de consumo crónico de alcohol.

Finalmente, aunque nuestros resultados sustentan la hipótesis de niveles elevados de gelatinasas resultantes del alcoholismo crónico sostenido, el posible papel de estas enzimas en el establecimiento de la dependencia al alcohol⁽³³⁾ debe ser considerado al momento de analizar estrategias terapéuticas.

CONCLUSIONES

Este estudio piloto muestra claramente que GGT y MCV, pero fundamentalmente la actividad de las gelatinasas, son los biomarcadores indirectos que reflejan mejor el consumo crónico de alcohol en la cohorte de pacientes uruguayos analizada. Por otra parte, si estos biomarcadores se interpretan en el contexto de cada historial médico, permitirán un mejor conocimiento de la salud del paciente, mejorando la conciencia sobre su condición y sobre los efectos de la dependencia del alcohol en su cuerpo.

Declaración de intereses: Los autores son responsables por el contenido y la redacción del documento y no reportan conflictos de interés.

Agradecimientos: Agradecemos a todos los participantes en este trabajo, en particular los pacientes y donadores controles. También damos las gracias al Laboratorio de Inmunología (Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela) y a sus integrantes Ana González, Celia Buzzi, Mayra Martínez y Natalia Rodríguez por su participación en las determinaciones de CDT.

REFERENCIAS

1. **Junta Nacional de Drogas.** VI Encuesta Nacional en Hogares sobre Consumo de Drogas, 2016. Montevideo: JND, 2016. Disponible en: https://www.gub.uy/junta-nacional-drogas/sites/junta-nacional-drogas/files/documentos/publicaciones/201609_VI_encuesta_hogares_OUD_ultima_rev.pdf
2. **Pratt D, Kaplan M.** Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med.* 2000; 342 (17): 1266-1271.
3. **Conigrave K, Davies P, Haber P, Whitfield JB.** Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction.* 2003; 98(Suppl2):31-43.
4. **Wu A, Chanarin I, Levi AJ.** Macrocytosis of chronic alcoholism. *Lancet.* 1974; 1(7862):829-831.
5. **Helander A, Eriksson CJ.** Laboratory tests for acute alcohol consumption: results of the WHO/ISBRA study on state and trait markers of alcohol use and dependence. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2002; 26(7):1070-1077.
6. **Andresen-Streichert H, Müller A, Glahn A, Skopp G, Sterneck M.** Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic contexts. *DtschÄrztelbl Intl.* 2018; 115(18):309-315.
7. **Salmela K, Laitinen K, Nystrom M, Salaspuro M.** Carbohydrate-deficient transferrin during 3 weeks' heavy alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994; 18(2):228-230.
8. **Helander A, Wielders J, Anton R, Arndt T, Bianchi V, Deenmamode J, Jeppsson J, Whitfield J, Weykamp C, Schellenberg F.** Reprint of Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate deficient transferrin (CDT). *ClinChimActa.* 2017; 467:15-20.
9. **Delanghe JR, Helander A, Wielders JP, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H.** Development and multicenter evaluation of the N latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *ClinChem.* 2007; 53(6):1115-1121.
10. **Pérez Carreras M, Castellano G.** Higado y alcohol. En: Montoro MA, GarcíaPagán JC(Eds.). *Gastroenterología y Hepatología.* AEG: Madrid, 2012. Cap. 55. p. 799-814.
11. **Flores-Bastias O, Karahanian E.** Neuroinflammation produced by heavy alcohol intake is due to loops of interactions between Toll-like 4 and TNF receptors, peroxisome proliferator-activated receptors and the central melanocortin system: A novel hypothesis and new therapeutic avenues. *Neuropharmacology* 2018; 128:401-407.
12. **Galliera E, Tacchini L, Corsi Romanelli MM.** Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights. *ClinChem Lab Med.* 2015; 53(3):349-355.
13. **Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, et al.** Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 2016; 231(12):2599-2621.
14. **Fingleton, B.** Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *BiochimBiophysActa.* 2017; 1864(11PtA):2036-2042.
15. **Saunders J, Aasland O, Babor T, De la Fuente J, 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.* 1993; 88(6):791-804.
16. **Schumann G, Klauke R.** New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. *ClinChimActa* 2003; 327(1-2):69-79.
17. **Marco M, Baz A, Fernández C, González G, Hellman U, Salinas G, et al.** A relevant enzyme in granulomatous reaction, active matrix metalloproteinase-9, found in bovine *Echinococcus granulosus* hydatid cyst wall and fluid. *Parasitol Res.* 2006; 100(1):131-139.
18. **Sillanaukee P, Kalela A, Seppa K, Hoyhtya M, Nikkari S.** Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of alcohol abusers. *Eur J Clin Inv.* 2002;32(4):225-229.
19. **Hasselblatt M, Martin F, Maul O, Ehrenreich H, Kernbach-Wighton G.** Persistent macrocytosis following abstinence from chronic alcohol use. *JAMA.* 2001;286(23): 2946.
20. **Topic A, Djukic M.** Diagnostic characteristics and application of alcohol biomarkers. *ClinLab.* 2013;59 (3-4):233-245.
21. **Jastrzębska I, Zwolak A, Szczyrek M, Wawryniuk A, Skrzydło-Radomańska B, Daniluk J.** Biomarkers of alcohol misuse: recent advances and future prospects. *PrzGastroenterol.* 2016;11(2):78-89.
22. **Niemelä O.** Biomarker-Based Approaches for Assessing Alcohol Use Disorders. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(2):166.
23. **Stibler H, Borg S.** The value of carbohydrate deficient transferrin as a marker of high alcohol consumption. En: Kuriyama K, Takaya A, Ishii H, ed. *Biochemical and social aspects of alcohol and alcoholism.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1988. p. 503-506.
24. **Torrente MP, Freeman WM, Vrana KE.** Protein biomarkers of alcohol abuse. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(4):425-436.
25. **De Feo TM, Fargion S, Duca L, Mattioli M, Cappellini MD, Sampietro M, Cesana BM, Fiorelli G.** Carbohydrate-deficient Transferrin, a Sensitive Marker of Chronic Alcohol Abuse, Is Highly Influenced by Body Iron. *Hepatology.* 1999;29(3):658-663.
26. **Bakhireva LN, Cano S, Rayburn WF, Savich RD, Leeman L, Anton RF, et al.** Advanced gestational age increases serum carbohydrate-deficient transferrin levels in abstinent pregnant women. *Alcohol Alcohol.* 2012;47(6):683-687.
27. **Chrostek L, Cylwik B, Gruszewska E, Panasiuk A, Szmitkowski M.** N-latex CDT results in liver diseases. *Alcohol Alcohol.* 2012;47(4):428-432.
28. **Whitfield JB, Dy V, Madden PAF, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW.** Measuring Carbohydrate-Deficient Transferrin by Direct Immunoassay: Factors Affecting Diagnostic Sensitivity for Excessive Alcohol Intake. *Clin Chem.* 2008;54(7):1158-1165.
29. **Prystupa A, Boguszevska-Czubara A, Bojarska-Junak A, Toruń-Jurkowska A, Roliński J, Zatuska W.** Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(2):325-328.
30. **Madro A, Czechowska G, Slomka M, Celinski K, Szymonik-Lesiuk S, Kurzepa J.** The Decrease of Serum MMP-2 Activity Corresponds to Alcoholic Cirrhosis Stage. *Alcohol.* 2012;46(2):155-157.
31. **Kuyvenhoven J, van Hoek B, Blom E, van Duijn W, Hanemaaijer R, Verheijen JH, et al.** Assessment of the clinical significance of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in patients with various chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *ThrombHaemost.* 2003;89(4):718-725.
32. **Chen J, Conigrave KM, Macaskill P, Whitfield JB, Irwig L.** Combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase to increase diagnostic accuracy for problem drinking. *Alcohol & Alcoholism* 2003;38(6):574-582.
33. **Stefaniuk M, Beroun A, Lebitko T, Markina O, Leski S, Meyza K, et al.** Matrix Metalloproteinase-9 and Synaptic Plasticity in the Central Amygdala in Control of Alcohol-Seeking Behavior. *Biol Psychiatry.* 2017;81(11):907-917.

Nota: Aprobación final del artículo Comité Ejecutivo de AnFaMed. Director y editor responsable Dr. Migliaro.

Recibido: 03/10/2019
Aceptado: 28/12/2019