

MÓDULO I

Factores Genéticos en la Patogénesis de la Esteatohepatitis

Dr. LUIS QUIÑONES⁽¹⁾

El objeto de esta exposición es analizar un factor genético que se está postulando como posible causa, al menos en parte, de la esteatohepatitis no alcohólica y alcohólica: el denominado gen CYP2E1, que pertenece a la familia del citocromo P450 y que tiene ciertas características particularmente importantes.

ANTECEDENTES DEL GEN CYP2E1

Comparando la esteatohepatitis no alcohólica con la alcohólica se ha determinado que morfológicamente son muy similares, cuando no idénticas, y que el consumo de ciertos fármacos con capacidad pro oxidante puede desencadenar su aparición y aumentar su gravedad, debido al estrés oxidativo que inducen especies reactivas de oxígeno, radicales orgánicos y lipoperóxidos. La isoenzima CYP2E1 participa en el metabolismo de muchos medicamentos y de muchos compuestos endógenos oxidativos, por lo que se la ha señalado como la principal isoenzima P450 causante de la generación del estrés oxidativo.

El primer fundamento de esta hipótesis es el hecho de que esta enzima puede metabolizar una serie de compuestos oxidativos y de generar especies reactivas de oxígeno. Otro argumento, es su participación en el ciclo de generación de ión superóxido. Sin embargo, se ha demostrado claramente que el daño hepático es más frecuente en alcohólicos obesos, de modo que el papel de la enzima CYP2E1 surge con fuerza del hecho de que participa directamente en el metabolismo del etanol y por-

que este compuesto induce su actividad de transcripción.

Lo anterior se ha demostrado con estudios de actividad enzimática realizados con métodos de dos tipos. El más conocido consiste en usar clorzoxazona como sustrato *in vivo* y medir la actividad denominada clorzoxazona hidroxilasa. El otro método es la inmunodetección, según la cual esta isoenzima estaría aumentada en alcohólicos obesos.

Sin embargo, hay evidencias de que esta enzima no es la única causante. Datos experimentales procedentes de animales carentes de la enzima CYP2E1 (o sea, que tienen el gen inactivo) demuestran que la enzima CYP4A10 complementa la función de CYP2E1 cuando ésta no muestra actividad. Otro antecedente importante, es que para la generación de un cuadro de esteatohepatitis bastarían menos de dos pasos. El primer impacto (*hit*) sería la esteatosis, inducida por alcohol o simplemente por obesidad, y el segundo impacto sería el estrés oxidativo, que podría deberse a diversos factores, pero hay que considerar que entre las isoenzimas de desintoxicación P450, la nombrada es la que genera mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno.

Además, la isoenzima CYP2E1 presenta variantes alélicas de diferentes velocidades de transcripción dentro de la población, lo que significa que algunas personas tienen un gen cuya variante alélica tiene mayor velocidad de transcripción y, por lo tanto, mayor actividad enzimática. Esas personas podrían generar más especies reactivas de oxígeno, lo que aumen-

⁽¹⁾ Laboratorio de Bioquímica y Toxicología Ambiental. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

taría sus probabilidades de sufrir un estrés oxidativo.

LA ENZIMA CYP2E1

Es una proteína que cuenta con 493 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 56.849 Dalton. Una de sus funciones consiste en biotransformar sustancias como etanol, acetaldehído, paranitrofenol, benceno, N-nitrosoaminas, derivados del cigarrillo y la acetona y acetoacetato presentes en la cetoacidosis diabética. Su actividad oxidativa sobre los cuerpos derivados de la acetona explica su posible participación en esta patología.

También se piensa que podría tener actividad anticarcinogénica, aunque es discutible, porque desintoxica ciertos compuestos que tienen capacidad carcinogénica; por ejemplo, la acetona se metaboliza en acetol y en metilglioxal por acción de esta enzima, todos ellos procesos tendientes a la desintoxicación. Sin embargo, también se ha visto que puede bioactivar algunos compuestos con esta capacidad, como el 1,3 butadieno y algunas N-nitrosoaminas; por lo tanto, esta propiedad no está bien establecida.

El gen de esta enzima se ubica en el cromosoma 10 humano. Tiene 9 exones, 11.413 pares de bases y algunas variantes alélicas derivadas del polimorfismo genético presente en el intrón 6 y en la región sobrerregulatoria del gen. Es una hemoproteína, pues posee un grupo hem.

INDUCTORES DE LA ENZIMA CYP2E1

La acetona, el etanol, los triglicéridos, algunos fármacos como la isoniazida y otros agentes prooxidantes, como el hierro, la amiodarona, etc, actúan como inductores de esta enzima, lo que significa que si se la expone a estos compuestos, la enzima responde con un incremento de su actividad. Algunas acetonas y el etanol, además de inductores, son sustratos de la enzima. Los sustratos exclusivos son el metanol, el acetol, el acetoacetato, la clorzoxazona, que se usa como prueba metabólica para definir la actividad de la enzima *in vivo*, el paranitrofenol, el uretano, etc.

Hay innumerables variantes alélicas de estas

enzimas. La alteración denominada CYP2E1*1B produce *in vitro* una mayor actividad post alcohol o en obesos; lo mismo ocurre también con la variante CYP2E1*5B. El reconocimiento de estas variantes alélicas en los seres humanos se ha realizado con uso de enzimas de restricción como DRA1 y XBA1, en un caso, y PST1, RCA1 y DRA1 en el otro, lo que ha permitido realizar un *screening* en la población.

ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS

Alrededor de 250 pacientes de la población chilena se sometieron a un *screening* que consistió en un análisis simple de una muestra sanguínea a la que se le extrae DNA, que se amplifica mediante la técnica de PCR y se somete a la acción de enzimas de restricción; así se detectan los diferentes patrones que corresponden a las distintas variantes alélicas.

La variante alélica que detecta la enzima DRA1 muestra patrones distintos. El genotipo más frecuente o genotipo normal es el de una persona heterocigota, en la que aparece una banda superior y una inferior; luego está la persona homocigota que corresponde a la variante alélica en la que aparece sólo la banda superior. Esta genotipificación permite definir la velocidad de transcripción y el grado de actividad de la enzima CYP2E1, e identificar así a las personas que en teoría son más susceptibles al estrés oxidativo, el que sería una de las causas de la esteatohepatitis. En el caso de RCA1 o PST1, reconocidas aquí por las dos enzimas en polimorfismo, también se pueden generar patrones distintos.

Lo sabemos porque hemos determinado, también la actividad de esta enzima *in vivo* con clorzoxazona utilizándolo como sustrato en estudios anteriores y en estudios actuales en colaboración con el Dr. Poniachik, basados en la metodología, presentada y publicada por la Dra. Lucasque, lo que hace es simplemente utilizar clorzoxazona y posterior 2 horas a la ingesta, determinar en sangre y posiblemente en orina, también el metabolito que es un solo metabolito 6-hidróxiclorzoxazona que es producido en un 90% por la enzima CYP2E1 que utiliza NABDH y oxígeno. Este metabolito puede ser detectado mediante HPLC en el cuál

este en un cromatograma hipotético, en el cual aparece primero la 6-hidroxiclorzoxazona y, en segundo lugar, la clorzoxazona y podemos cuantificar cuánto se está generando del metabolito, por lo tanto, qué actividad existe de la enzima.

El hecho de que las variantes alélicas generan mayor actividad en las enzimas se ha demostrado por determinación de esta actividad *in vivo* con clorzoxazona; basados en una metodología publicada por la Dra. Lucas en Francia. Consiste en administrar clorzoxazona y, dos horas después de la ingesta, determinar en sangre y orina el nivel del metabolito 6-hidroxiclorzoxazona, producido en 90% por la enzima CYP2E1, utilizando NADPH y oxígeno. Este metabolito se puede detectar mediante HPLC y se obtiene un cromatograma en el que aparece primero la 6-hidroxiclorzoxazona y en segundo lugar la clorzoxazona. Si se cuantifica la cantidad de metabolito que se está generando, se puede determinar el grado de actividad enzimática.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS

El análisis de las características genéticas y de la actividad enzimática de cada persona, permitirá aclarar por qué existe una actividad aumentada de CYP2E1 y las posibles causas. Según lo que se describe en la literatura, una de las causas del aumento de CYP2E1 puede ser la acción de agentes pro oxidantes como el alcohol, que puede aumentar la enzima CYP2E1. Las dietas ricas en grasas y, en

general, los ácidos grasos polisaturados, pueden inducir la actividad de esta enzima, igual que las cetonas y la presencia de variantes alélicas, es decir, de la característica genética que aumenta la probabilidad de incrementar esta enzima. La resistencia a la insulina también es un posible factor.

La acumulación de más de un factor que favorezca el incremento de la actividad de esta enzima aumentaría la susceptibilidad a la patología. Por ejemplo, los alcohólicos obesos que presenten polimorfismo y que tengan la actividad de la enzima muy aumentada estarían en mayor riesgo de generar esteatohepatitis.

Uno de los productos reconocidos como estimulantes de CYP2E1 son los lipoperóxidos, que se sabe que pueden generar daño hepático, fibrosis y esteatohepatitis. Por otra parte, la CYP2E1 puede generar especies reactivas de oxígeno mediante su actividad metabólica sobre algunos agentes oxidantes y mediante el ciclo que genera ión superóxido, lo que también puede conducir a daño hepático, fibrosis y esteatohepatitis.

En la literatura también se encuentran estudios según los cuales los lipoperóxidos pueden inducir quimiotaxis de leucocitos, activación de citoquinas y alteración de las células de Küpfer, todo lo cual también puede conducir a daño hepático y esteatohepatitis.

Este panorama general demuestra que los dos episodios o *hits* que conducen al desarrollo de esteatohepatitis son la esteatosis y el estrés oxidativo. Éste utiliza como eje central el aumento de la actividad de la enzima CYP2E1, que probablemente es de etiología multifactorial.