

## DISCUSIÓN

Alrededor del 90% de la actividad ADH, en su forma mayoritaria ADH1 (y también ADH2 en humanos), está localizada en el hígado, órgano responsable de la oxidación de la mayor parte del etanol ingerido, así como de alcoholes y aldehídos de diferentes estructuras. El restante 10% de la actividad ADH, en las formas ADH1 y ADH4, se distribuye en numerosos órganos extrahepáticos, lo que demuestra un cierto nivel de oxidación de etanol en los distintos tejidos y células del organismo. Al igual que en el hígado, donde la oxidación del etanol es la causa más importante de la enfermedad alcohólica hepática (Kennedy y Tipton, 1990; Lieber, 1994; 1997), la actividad ADH extrahepática podría también constituir el origen de muchas patologías en diferentes órganos en los alcohólicos. Así pues, el trabajo de esta Tesis Doctoral se ha centrado principalmente en el estudio de la distribución de las dos formas etanol deshidrogenasa, ADH1 y ADH4. Numerosos estudios sobre la expresión de estas formas de ADH han establecido que tanto su mRNA como la proteína están ampliamente distribuidos en los diferentes tejidos de roedor y humano (Tabla 2 de la Introducción). En este trabajo, se ha profundizado en el estudio de la presencia de ADH1 y ADH4 en determinados órganos de rata y humano y en la distribución de los mRNA y/o proteínas en los tejidos y células. Ello ha permitido acotar aún más el papel fisiológico de cada una de las clases en un determinado tejido y comprender los posibles efectos deletéreos del alcohol en ese tejido. Estos efectos serían debidos no sólo a la acumulación local de acetaldehído y NADH, sino también al efecto inhibitor del etanol y acetaldehído sobre la actividad ADH y ALDH, frente a importantes sustratos endógenos esenciales para el mantenimiento y la función de tejidos y órganos tales como retinoides, productos de la peroxidación lipídica, serotonina y catecolaminas y  $\omega$ -hidroxiácidos grasos.

## 1 CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA LOCALIZACIÓN ESPECÍFICA DE LA ADH EN TEJIDOS

### 1.1 Expresión de la ADH en el sistema vascular

ADH4 es el enzima típico en el sistema vascular de la rata. La histoquímica ha mostrado actividad ADH4 en el endotelio de la túnica íntima y en la capa muscular de la túnica media. En contraste, ADH1B1 es la responsable de la actividad ADH de todos los vasos sanguíneos humanos analizados (Allali-Hassani y col., 1997).

La función fisiológica de la ADH en los vasos sanguíneos es probablemente similar en humano y rata. Ambas clases de ADH son muy activas en la transformación de alcoholes y aldehídos, de gran importancia en la protección de epitelios y endotelios. Así, el metabolismo de retinoides y la eliminación de los productos de peroxidación lipídica son las funciones sugeridas para la ADH en este tejido (Allali-Hassani y col., 1997). Ambos enzimas pueden oxidar retinol en la vía de síntesis del AR, modulador esencial del desarrollo y mantenimiento de los epitelios (Ang y col., 1996a; Boleda y col., 1993, Yang y col., 1994). Además, se ha sugerido la posible implicación de los retinoides en la diferenciación y envejecimiento de las células musculares (Cremona y col., 1995), lo que estaría en concordancia con la localización de la ADH en la túnica media de las arterias. Por otra parte, la ADH puede constituir un mecanismo de defensa frente a los aldehídos citotóxicos generados durante la peroxidación lipídica en el tejido vascular (tejido considerablemente oxigenado). La ADH, junto con otros sistemas enzimáticos como la glutatión-S-transferasa (Misra y col., 1995), serían responsables de la eliminación de estos productos de peroxidación, con un importante papel de protección frente a la arterioesclerosis, en la cual la peroxidación lipídica parece ser el factor que induce la formación de la placa arterioesclerótica (Palinski y col., 1989), y aductos formados por 4-hidroxinonenal y lipoproteína se han localizado en el ateroma (Jürgen y col., 1993).

En cuanto al metabolismo del etanol, ADH1B1 presente en los vasos humanos es perfectamente capaz de metabolizar el etanol a las concentraciones alcanzadas en sangre durante el consumo social de alcohol ( $K_m = 0,05 \text{ mM}$ ,  $k_{cat} = 9 \text{ min}^{-1}$ ; Bosron y col., 1983). Además de la notable actividad ADH detectada, la extensión del sistema vascular (en humano, el área total ocupada por las paredes vasculares se estima en  $500\text{-}700 \text{ m}^2$ ) indica una contribución significativa al metabolismo del etanol cuando éste está presente en la sangre. Además, los vasos sanguíneos humanos podrían tener una contribución en el metabolismo de primer paso del etanol. El origen del FPM es discutido, ya que aunque numerosos experimentos indican un papel de la ADH gástrica en el FPM (Caballería y col., 1987; 1989), la cantidad de enzima en este tejido es baja (Moreno y Parés, 1991; Moreno y col., 1994). Es posible que la ADH de los vasos pueda oxidar el etanol durante la absorción de éste en el estómago e intestino y

durante el primer paso desde las venas a los pulmones, antes de alcanzar la circulación general. Sin embargo, aunque la contribución de la ADH vascular al metabolismo extrahepático del etanol y al de primer paso puede ser significativa en humano, no lo debe ser en la rata, ya que ADH4, a las concentraciones de etanol experimentales, es prácticamente inactiva (Boleda y col., 1989).

La presencia de cierto nivel de metabolismo del etanol en el sistema circulatorio ha sido interpretada como un mecanismo de prevención contra las enfermedades cardiovasculares a través del mantenimiento de un medio reducido en el vaso y la minimización de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (Bello y col., 1994). Sin embargo, también se ha sugerido que algunos de los efectos perjudiciales del etanol son mediados por un aumento del estrés oxidativo que podría, en parte, ser originado por el propio metabolismo del etanol, el cual además puede generar una acumulación de lípidos (Bjorneboe y Bjorneboe, 1993; Kennedy y Tipton, 1990; Lieber, 1994; Srivastava y col., 1994). Adicionalmente, el metabolismo etanólico mediado por la ADH vascular interferiría con la función propuesta para esta enzima en la eliminación de productos de la peroxidación lipídica, contribuyendo así al deterioro vascular.

Algunos de los efectos del etanol en los vasos sanguíneos (Altura, 1984) podrían ser una consecuencia de su metabolismo, sobretodo a través de la generación de acetaldehído *in situ*. Aunque la concentración de acetaldehído en sangre es baja incluso a concentraciones de etanol elevadas, en los vasos sanguíneos podría llegar a ser elevada debido al metabolismo local del etanol, lo que podría explicar los efectos cardiovasculares del acetaldehído, como la liberación de catecolaminas (Altura y Altura, 1982; Kupari y col., 1983). Por otra parte, se ha sugerido que algunos de los efectos del acetaldehído tales como la estimulación de la liberación de prostaciclina vascular, podrían tomar parte en el efecto protector de un consumo moderado de alcohol frente algunas complicaciones cardiovasculares (Guivernau y col., 1987). Así pues, el metabolismo del etanol por la ADH de los vasos sanguíneos aporta un nuevo mecanismo para explicar los efectos del etanol en el sistema cardiovascular.

## **1.2 Expresión y papel fisiológico de la ADH en el tracto digestivo**

Esta Tesis proporciona un estudio detallado sobre la expresión de las formas de ADH implicadas en el metabolismo del etanol a lo largo del tracto digestivo de la rata. ADH1 y ADH4 se expresan de forma abundante en el tracto, aunque cada clase está confinada a regiones y tipos celulares muy concretos en cada región, y los niveles de expresión detectados cambian considerablemente entre las diferentes regiones. ADH4 es la forma prominente del tracto digestivo, con niveles de expresión elevados en lengua, esófago, estómago y recto, aunque también está presente en el intestino. El máximo de actividad se encuentra en el esófago ( $10,8 \pm 3,3$  mU/mg proteína), en concordancia con los resultados publicados en humano (Yin y col., 1997). Por el

contrario, ADH1 es la forma mayoritaria en intestino, con niveles de actividad máximos en el colon ( $5,5 \pm 0,92$  mU/mg proteína), aunque también se ha detectado en la parte superior del tracto. Los resultados obtenidos por las técnicas de ISH e IHC muestran que ADH1 y ADH4 se localizan principalmente en la mucosa del tracto. En la parte superior (esófago y primera porción del estómago) e inferior (colon y recto) del tubo digestivo, el mRNA de ADH1 está confinado a la base de la mucosa y a la *muscularis mucosae*, mientras que en el intestino se localiza en las células más expuestas a la luz del tubo. En contraste, el mRNA y la proteína correspondiente a ADH4 se encuentran localizados en la parte de la mucosa más externa (en contacto con la luz del tubo digestivo) en todas las regiones estudiadas.

En general, el mRNA y la proteína colocalizan, a excepción de la mucosa esofágica, donde el mRNA de ADH4 se detecta en las capas de células vivas, mientras que la proteína también se localiza en la capa queratinizada del epitelio multiestratificado. La distribución diferencial del mRNA y la proteína en los epitelios se ha descrito también para ADH3 y ADH4 en la mucosa oral y la piel, respectivamente (Haselbeck y col., 1997a; Hedberg y col., 2000). La precisa colocalización de las ADHs, tanto del mRNA, como de la proteína y actividad, demuestra que la proteína ADH se expresa en las diferentes áreas del tracto gastrointestinal donde se detecta el mRNA. Sin embargo, la restricción de la expresión de ADH1 y ADH4 a un relativamente pequeño número de células en algunas regiones del tubo explicaría la dificultad para demostrar su presencia en los homogeneizados de esas regiones por electroforesis en gel de almidón (Boleda y col., 1989; Julià y col., 1987b) o por transferencia *Northern* (Estonius y col., 1993; 1996; Zgombic-Knight y col., 1995a).

En general, los resultados obtenidos concuerdan con los trabajos parciales previamente publicados acerca de la distribución de la ADH, tanto de la proteína como del mRNA, en roedores (Boleda y col., 1989; Estonius y col., 1993; Haselbeck y col., 1997a; Julià y col., 1987b; Tietjen y col., 1994) y en humanos (Estonius y col., 1996; Parés y Farrés, 1995; Parés y col., 2001; Pestalozzi y col., 1983; Yin y col., 1997). El presente trabajo es, sin embargo, el más completo y detallado, y con técnicas más sensibles, que, por ejemplo, han permitido la detección de ADH1 en estómago, previamente desconocida.

### 1.2.1 ADH gastrointestinal y metabolismo del etanol

Los resultados de esta Tesis ponen de manifiesto que diferentes partes del tracto gastrointestinal pueden oxidar etanol, contribuyendo así al metabolismo de primer paso del etanol (FPM) (Caballería y col., 1987; 1989; Han y col., 1998; Lim y col., 1993; Oneta y col., 1998). Durante el consumo de alcohol, la parte superior del tracto gastrointestinal está expuesta a elevadas concentraciones de etanol (en el tracto humano se han descrito concentraciones de hasta 0,5 M (Halsted y col., 1973; Li, 1983). ADH4, con una elevada expresión en la parte superior del tubo digestivo y en el

estómago, podría ser la responsable de parte de ese FPM, tal y como se ha sugerido en trabajos anteriores (Moreno y Parés, 1991; Yin y col., 1997). De hecho, en un estudio con ratones *knock-out* para ADH4, se ha demostrado que este enzima tiene una contribución significativa en el metabolismo global de etanol (Deltour y col., 1999b). Es interesante remarcar que el etanol es oxidado de forma más eficiente por ADH4 humana (Crosas y col., 2000; Farrés y col., 1994), enzima también abundante en la parte superior del tubo digestivo (presente trabajo; Parés y col. 2001; Yin y col., 1993). Por lo tanto, su participación global al metabolismo del etanol podría ser superior a la ADH4 de la rata, sobre todo a concentraciones moderadas de etanol.

Respecto a ADH1 de rata, que presenta inhibición por exceso de sustrato a concentraciones de etanol moderadas (Crabb y col., 1983), se expresa a muy bajos niveles en estas zonas del tracto superior ( $0,71 \pm 0,28$  y  $0,90 \pm 0,45$  mU/mg de proteína en el esófago y estómago, respectivamente, Fig. 18) y, en consecuencia, su contribución relativa al FPM debe ser insignificante. Sin embargo, la presencia de ADH1 en capas específicas de la mucosa gástrica de rata, hasta ahora no descrita, demuestra una cierta contribución en el metabolismo extrahepático a bajas concentraciones de etanol.

Por otro lado, la concentración alcanzada en la célula intestinal después de la ingestión de alcohol es aproximadamente igual a la de la sangre (Halsted y col., 1973; Levitt y col., 1982) y demasiado baja para poder saturar a ADH4 de rata (Boleda y col., 1989). Así pues, ADH1, mayoritaria en el intestino, será la principal responsable de metabolizar el etanol a esas bajas concentraciones. La ALDH2, que oxida eficientemente el acetaldehído, está también presente en la mucosa y la capa muscular del intestino (Parés y Farrés, 1995; Yin y col., 1997). Así, la colocalización de ambas enzimas, ADH1 y ALDH2, sugiere un metabolismo activo del etanol en esta región del tubo digestivo, además del desarrollado por los microorganismos intestinales (Nosova y col., 1996; Salaspuro, 1996). La pareja ADH1-ALDH2, en el estómago e intestino, debe ser la responsable del metabolismo de alcoholes y aldehídos de cadena corta, tanto ingeridos como producidos por los microorganismos intestinales, y compuestos endógenos. La actividad ADH1 es elevada en el colon ( $5,5 \pm 0,92$  mU/mg de proteína, Fig. 18). Debe además señalarse que la flora microbiana de esta zona es la mayor fuente de etanol endógeno en los mamíferos (Baraona y col., 1986; Fisher, 1988), el cual podría ser, en parte, eliminado por ADH1, con elevada expresión en esta área del intestino grueso.

En el intestino de rata, cabe esperar que ADH4 tenga una contribución insignificante en la desintoxicación del alcohol ingerido (Crosas y col., 2000; Farrés y col., 1994). Este enzima podría estar implicado en la oxidación de otros alcoholes y en la reducción de los aldehídos citotóxicos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonal y el hexanal (Boleda y col., 1993), tal y como se expone en el apartado siguiente.

### 1.2.2 ADH gastrointestinal y peroxidación lipídica

ADH1 y ADH4 reducen aldehídos derivados de la peroxidación lipídica (Allali-Hassani y col., 1998; Boleda y col., 1993). La mucosa digestiva de las partes más externas del tracto gastrointestinal, está expuesta a oxígeno y, por lo tanto, es un lugar de activa peroxidación lipídica (Salas y col., 1999). En referencia a esta última función, ALDH3, también activa con aldehídos citotóxicos (Canuto y col., 1994; Lindahl y Petersen, 1991; Yin y col., 1993), colocaliza con ADH4 en la cavidad bucal, esófago y estómago (Parés y Farrés, 1995) y en la región colorectal (Yin y col., 1994). Por tanto, ADH4-ALDH3, ambas con una amplia especificidad de sustrato (Boleda y col., 1993; Sophos y col., 2001), actuarían en concierto en la eliminación de xenobióticos y compuestos derivados de la peroxidación lipídica (Boleda y col., 1993; Yin y col., 1993).

El etanol causa estrés oxidativo, incrementando la peroxidación lipídica y, en consecuencia, aumenta la concentración de aldehídos citotóxicos en los tejidos del tracto gastrointestinal (Mufti y col., 1993; Salas y col., 1999). Este aumento sería más significativo como consecuencia de la inhibición competitiva por etanol de la capacidad de ADH para metabolizar estos aldehídos derivados de la peroxidación lipídica.

### 1.2.3 ADH gastrointestinal y metabolismo de retinoides

Numerosos estudios han demostrado que el AR tiene una función en el mantenimiento de los epitelios, a través del control de la proliferación y diferenciación celulares (Gudas, 1994; Love y Gudas, 1994; Jetten, 1984). La expresión de ADH1 y ADH4 en varios tipos celulares de la mucosa del tracto gastrointestinal y su colocalización con RALDH1 (o ALDH1), RALDH2 (Bhat, 1998; Duester, 2001; Frota-Ruchon y col., 2000; Haselbeck y col., 1999; Napoli, 1999; Parés y Farrés, 1995) y RALDH3 (Duester, 2001), y con toda la maquinaria molecular implicada en el metabolismo y acción del AR (Crow y Ong, 1985; Dew y Ong, 1994; Dowlatshahi y col., 1984; Inagami y Ong, 1992; Kato y col., 1992; Ong y col., 1991; Schaefer y col., 1989; Shyu y col., 1995), sugiere una función de estas enzimas en la síntesis de AR necesaria para la proliferación, diferenciación y maduración celular de los epitelios del tracto, especialmente el de la mucosa oral, esofágica e intestinal.

Por otra parte, el  $\beta$ -caroteno, absorbido por los enterocitos de la mucosa intestinal, es escindido enzimáticamente generándose dos moléculas de retinal (Wyss y col., 2001). Por tanto, ADH1 ( $K_m = 13 \mu\text{M}$ ;  $k_{cat}/K_m = 500 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para el retinal; Boleda y col., 1993) y ADH4 ( $K_m = 12 \mu\text{M}$ ;  $k_{cat}/K_m = 1750 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para el retinal; Boleda y col., 1993), detectadas en estas células, podrían estar implicadas en la vía de reducción que genera retinol, el cual una vez producido es inmediatamente esterificado, favoreciéndose la reacción de la ADH en el sentido de la reducción.

#### 1.2.4 ADH gastrointestinal y la patología alcohólica

Durante el consumo de alcohol, la parte superior del tracto digestivo está expuesta a elevadas concentraciones de etanol (Halsted y col., 1973; Li, 1983), que pueden ser metabolizadas por ADH4 y, en pequeña cantidad, por la flora bacteriana orofaríngea (Pikkarainen y col., 1979). La ALDH2 está presente, a bajos niveles, en lengua y estómago y no se expresa en esófago (Dong y col., 1996; Koivisto y Salaspuro, 1996; Parés y Farrés, 1995; Yin y col., 1993; 1997), por lo que elevados niveles de acetaldehído pueden acumularse en el compartimento intracelular, lo que puede ser causa de los efectos adversos del etanol en esas áreas del tracto digestivo: esofagitis, gastritis y cáncer (Tabla 6 de la Introducción).

En el estómago, el número de células parietales (secretoras de ácido clorhídrico), con elevada expresión ADH1, disminuye considerablemente en ratas tratadas con alcohol, lo que podría relacionarse con el menor contenido en ácido de las secreciones gástricas en los alcohólicos (de Oliveira y col., 1988). Por otra parte, la administración crónica de alcohol produce un descenso significativo en el número de células que contienen serotonina, localizadas en la parte media inferior de la región pilórica del estómago y en el intestino (Todorovic y col., 1993), donde hemos encontrado expresión de ADH1. Este enzima es activo en la reducción del 5-hidroxiindol-3-acetaldehído a 5-hidroxitriptofol en el catabolismo de la serotonina (Some y col., 1997; 2000; Svensson y col., 1999b), etapa que se ve favorecida durante el consumo de alcohol por aumento de la concentración de NADH (Some y col., 1997; 2000). La localización intestinal de ADH1 y su implicación en el catabolismo de la serotonina pueden estar relacionado con el desequilibrio generado por el etanol y sus efectos deletéreos en ciertas células gastrointestinales y, en consecuencia, con alteraciones gastrointestinales como la diarrea, que ha sido asociada con una alteración del metabolismo de la serotonina por el etanol en el intestino (Helander y Some, 2000).

En el intestino, el etanol daña la mucosa causando hemorragias, erosiones y vellosidades más cortas en el yeyuno e íleon (Baraona y col., 1975). También se han descrito daños en la función de absorción del intestino y diarrea durante el consumo crónico de alcohol. Todas estas alteraciones están asociadas a una disminución significativa de la integridad de la mucosa intestinal (Mazzanti y Jenkins, 1987; Rubin y col., 1972). Los resultados de esta Tesis predicen un metabolismo de etanol significativo en la mucosa intestinal, y la consecuente generación de acetaldehído. La comparación de los efectos de etanol y acetaldehído sobre el intestino de rata, demuestra que este último interfiere en mayor grado con la permeabilidad, fluidez y las funciones de transporte de las membranas del borde estriado de las células intestinales (Tillotson y col., 1981). Además, los desórdenes del colon relacionados con el etanol como son la diarrea y el cáncer colorectal (Seitz y col., 2001), se han asociado a una elevada concentración de acetaldehído en esta región del intestino

(Jokeleinen y col., 1996), la cual es una zona rica en ADH1 (Fig. 18), con relativamente baja actividad de ALDH2 (Koivisto y Salaspuro, 1996; Yin y col., 1994) y con una adicional generación de acetaldehído de origen microbiano (Baraona y col., 1986; Koivisto y Salaspuro, 1996; Nosova y col., 1996; Salaspuro, 1996).

El consumo crónico de alcohol es un importante factor de riesgo de cáncer en la parte superior del tracto (oral, de faringe y esofágico), así como de la región colorectal tanto en humanos como en rata (Franceschi y La Vecchia, 1994; Kune y Vitteta; 1992; Longnecker, 1995; Seitz y col., 1992; 2001; Thomas, 1995), aunque la etiopatogenia todavía no está clara. Varios estudios han relacionado la aparición de cáncer en estas zonas con una hiperregeneración celular de la mucosa ante la exposición crónica al alcohol, lo que se traduce en un incremento notable de la proliferación celular (Simanowski y col., 1994; 1995). Se ha sugerido que el acetaldehído, al provocar lesión de la mucosa, sería el origen y la causa de este aumento compensatorio de la proliferación celular. Otros trabajos sugieren que la reducción de los niveles de vitamina A puede tener importancia en la proliferación de varios tipos de tumores y que las alteraciones en el metabolismo de retinoides están relacionadas con la carcinogénesis (Love y Gudas, 1994; Seitz y col., 2001). Recientemente, se ha detectado formación de AR dependiente de NAD<sup>+</sup> a partir de todo-*trans*-retinol en la mucosa esofágica, gástrica y colorectal, y que esta es inhibida por el etanol, acetaldehído y algunos bloqueadores de los receptores de histamina como la ranitidina y la cimetidina (Crabb y col., 2001; Yokoyama y col., 2001). También hemos encontrado ADH4 en la mucosa esofágica humana. La inhibición de la actividad retinol deshidrogenasa por etanol de la ADH4 humana, presenta una Ki del orden de 6-10 mM (Allali-Hassani y col., 1998), de manera que concentraciones fácilmente alcanzadas por un consumo social de alcohol (del orden de 5-50 mM) ya bloquean la oxidación del retinol vía ADH, tanto *in vitro* (Allali-Hassani y col., 1998; Han y col., 1998) como *in vivo* (Yokoyama y col., 2001). Este hecho sugiere que la actividad retinol deshidrogenasa de la ADH podría resultar inhibida en presencia de etanol. Alternativamente, o como mecanismo adicional, el acetaldehído derivado de su metabolismo podría también interferir en la oxidación catalizada por ALDH1 (o RALDH1, Duester y col., 2000) y RALDH2—ambas detectadas en diferentes áreas del tracto. En consecuencia, proponemos que la alteración de la formación de AR por el etanol y/o acetaldehído podría ser una explicación alternativa para la patogénesis alcohólica en la mucosa digestiva y el aumento de la proliferación celular, con una elevada incidencia de neoplasia en el esófago y la región colorectal de los alcohólicos. En este sentido, la forma fisiológicamente inactiva de ALDH2 en orientales es un factor de riesgo en la generación de cáncer esofágico y colorectal en los alcohólicos, lo que sugiere un papel importante del acetaldehído en la carcinogénesis (Seitz y col., 2001).



### 1.3 Papel fisiológico de ADH1 y ADH4 en el cerebro adulto de rata

Numerosos estudios han sugerido la presencia de ADH en el SNC. Sin embargo, son, en general, ambiguos ya que las metodologías utilizadas no permitían identificar las formas enzimáticas presentes, estimar sus niveles, ni determinar su precisa localización. Tan solo se ha demostrado de forma inequívoca la presencia de ADH3 en el cerebro de rata y humano (Giri y col., 1989; Mori y col., 2000). La presencia de otras ADHs no se había demostrado, ni por métodos bioquímicos clásicos (Beisswender y col., 1985, Boleda y col., 1989) ni por análisis de transferencia *Northern* (Estonius y col., 1993, 1996; Zgombic-Knight y col., 1995a).

Los resultados de esta Tesis confirman de nuevo la dificultad en detectar mRNA o proteína de las diferentes clases de ADH. Así, la determinación de la actividad ADH, por ensayos de actividad o por electroforesis en gel de almidón, ha demostrado tan solo la presencia de ADH3 en todas las regiones del SNC estudiadas, pero no de los enzimas que oxidan etanol: ADH1 y ADH4. Trabajos publicados en los años 70 demostraron la presencia de actividad ADH en homogeneizados de cerebro de rata, mediante un ensayo enzimático acoplado que permitía la regeneración del coenzima. Esta metodología incrementaba notablemente la actividad del enzima y permitió detectar la actividad en el cerebro, donde otros no lo habían logrado por los métodos de análisis clásicos (Raskin y Sokoloff, 1968; 1972; 1974). En 1975, Tabakoff y von Wartburg, aislaron una ADH de cerebro de rata con un comportamiento muy similar al de la ADH hepática. Gracias a este sistema acoplado, que incrementaba unas 50 veces la sensibilidad del método espectrofotométrico estándar, se determinó una actividad de 0,45 mU/g de cerebro (Tabakoff y von Wartburg, 1975). Este dato concuerda con el hecho de que nosotros no hayamos podido detectar actividad ADH en el cerebro, ya que el límite inferior de actividad mediante el ensayo estándar llevado a cabo en nuestro laboratorio es de 0,5 mU/g de tejido.

El desarrollo y puesta a punto de la técnica de hibridación *in situ* ha permitido la detección de ADH1 y ADH4 en regiones específicas del cerebro adulto de rata. Los resultados obtenidos indican que el patrón de expresión de ADH1 y ADH4 es diferente para cada uno de ellos y, a su vez, está confinado a ciertos tipos celulares de regiones específicas del SNC. De las zonas estudiadas, ambas clases de ADH se localizan principalmente en la corteza cerebelar, formación hipocampal y en ciertas neuronas de la corteza cerebral de los lóbulos frontal, piriforme, temporal y occipital. Estos resultados concuerdan con los descritos por escasos y parciales trabajos previos que muestran la presencia de enzima ADH (presumiblemente ADH1), mediante inmunohistoquímica, en algunas neuronas de la corteza cerebral y en el cerebelo de rata (Kerr y col., 1989) y humano (Bühler y col., 1989). Esta precisa colocación del mRNA y la proteína, junto con los resultados obtenidos mediante transferencia *Western* e histoquímica, sugieren que la ADH activa debe estar presente en las regiones donde hemos encontrado mRNA por ISH. La restricción de la ADH a un

pequeño y concreto número de neuronas del SNC explicaría la gran dificultad en demostrar la presencia de ADH en homogeneizados de cerebro entero o de regiones nerviosas, por métodos bioquímicos clásicos como son la espectrofotometría y la electroforesis (Beisswender y col., 1985, Boleda y col., 1989) o por transferencia *Northern* (Estonius y col., 1993, 1996; Zgombic-Knight y col., 1995a), de forma que la proteína o el mensajero quedarían diluidos en el gran volumen de tejido que no presenta expresión de ADH.

### 1.3.1 ADH de cerebro y metabolismo del etanol

El etanol penetra con facilidad en el cerebro, cuya capacidad para metabolizarlo es objeto de debate desde hace tiempo (Zimatkin y Deitrich, 1997). Una cuestión crucial es saber si en el tejido nervioso pueden alcanzarse concentraciones relevantes de acetaldehído. El acetaldehído derivado del metabolismo del etanol periférico penetra con dificultad desde la sangre hacia el cerebro debido a la barrera metabólica representada por la ALDH en las meninges, ventrículos y vasos sanguíneos. Los niveles de acetaldehído han de ser muy elevados en sangre para poder detectarlo en el fluido cerebroespinal o en el tejido nervioso (Sippel, 1974; Westcott y col., 1980). Por lo tanto, la posibilidad de un metabolismo activo del etanol en el cerebro y la consecuente formación local de acetaldehído es una cuestión esencial. Nuestros resultados evidencian la existencia de diferentes puntos del SNC donde podría oxidarse el etanol por acción de la ADH y, por tanto, generarse acetaldehído. Las propiedades cinéticas de la ADH1 de rata predicen que esta forma puede oxidar eficientemente el etanol a las bajas concentraciones alcanzadas en el cerebro después de la ingestión oral. Además, ALDH2, principal responsable de la oxidación del acetaldehído (Tipton y col., 1989), se ha descrito en los mismos tipos celulares que ADH1 (Zimatkin y col., 1992). La colocalización de ADH1 y ALDH2 sugiere un metabolismo activo del etanol en determinadas áreas del cerebro adulto tales como cerebelo, corteza cerebral y formación hipocámpal. El hecho de que estas zonas ricas en ADH1 sean más vulnerables al daño neuronal frente al abuso del alcohol (Bengochea y Gonzalo, 1990; Eckardt y col., 1998; Hunt y Nixon, 1993; Pentney, 1993; Walker y col., 1993), podría ser debido a la producción endógena de acetaldehído. Es posible que el acetaldehído producido durante el metabolismo del etanol por la ADH, en localizaciones concretas y de forma transitoria en el SNC, pudiese mediar los efectos de refuerzo, neurotoxicidad y otros, atribuidos al abuso del alcohol (Eckardt y col., 1998). De hecho, se ha descrito degeneración en cerebelo, hipocampo y corteza después de la administración de acetaldehído en el cerebro de rata (Nakamura y col., 2000; Rintala y col., 2000). Por lo tanto, cabe esperar que frente al consumo crónico del alcohol, la ALDH podría no ser capaz de eliminar ese exceso de acetaldehído producido en esas zonas por la ADH1, que junto a un aumento de la producción de NADH podrían causar el daño y la muerte celular

(Lieber, 1997). Además, recientemente, se ha descrito que el acetaldehído inhibe la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en la circunvolución dentada (Abe y col., 1999). Este acetaldehído, de acuerdo con nuestros resultados, podría ser generado por la ADH1 después de la ingestión de etanol.

Por otra parte, hemos demostrado por primera vez, la expresión de ADH4 en el cerebro de rata. Aunque se ha descrito una contribución significativa de ADH4 de ratón en el metabolismo del etanol *in vivo* (Deltour y col., 1999b), la contribución de ADH4 en la oxidación del etanol en el cerebro es probablemente menor a la de la ADH1, tal y como predicen sus constantes cinéticas ( $K_m = 2,4 \text{ M}$ ). La concentración de etanol en sangre que alcanza el cerebro después de la ingestión oral es baja (no mayor de 50 mM), insuficiente para poder saturar el enzima (Boleda y col., 1989; Farrés y col., 1994). Sin embargo, la ADH4 humana oxida el etanol de manera más eficiente que la de rata ( $K_m = 37 \text{ mM}$ ), por lo tanto, su localización en zonas concretas del SNC humano, como en el cerebelo donde la hemos detectado por ISH, podría tener un papel significativo en la oxidación del alcohol.

ADH4 podría estar involucrada en la transformación de alcoholes y aldehídos de cadena larga (Boleda y col., 1993) y en la reducción de los aldehídos citotóxicos generados en la peroxidación lipídica (Allali-Hassani y col., 1998; Boleda y col., 1993), ambas funciones de gran importancia para el cerebro. De hecho, se ha descrito que la ingestión de etanol activa la peroxidación lipídica y la formación de radicales libres en el cerebro, especialmente en el cerebelo (Montoliu y col., 1994; 1995). Este proceso genera aldehídos biológicamente muy activos, tales como el 4-hidroxinonal y hexanal (Esterbauer y col., 1991), que podrían ser metabolizados y eliminados por ADH4 (Allali-Hassani y col., 1998; Boleda y col., 1993) y la ALDH citosólica (probablemente ALDH1) que también se ha detectado en estos tipos celulares del SNC.

### 1.3.2 ADH de cerebro y metabolismo de retinoides

El cerebro adulto de mamífero puede oxidar retinol y retinal para generar AR, siendo la sustancia gris cerebral, el cerebelo, las meninges, el hipocampo y la corteza cerebral los tejidos con la actividad más elevada (Connor y Sidell, 1997; Dev y col., 1993; Werner y DeLuca, 2002). En la presente Tesis, se ha observado la presencia de ADH en estas y otras regiones específicas y tipos celulares muy concretos del cerebro adulto, en los que también se han descrito los componentes específicos involucrados en la homeostasis del AR y en el metabolismo y la función de los retinoides. Así, se han localizado proteínas de unión a retinoides [CRBP y CRABP de tipo I y II (MacDonald y col., 1990; Zetterström y col., 1994; 1999)], receptores específicos para el AR [los RAR y los RXR (Krezel y col., 1999; Cullingford y col., 1998)] y los enzimas involucrados en la oxidorreducción del retinal [ALDH1 (Dockham y col., 1992; McCaffrey y col., 1993; Picklo y col., 2001; Zimatkin y col., 1991; 1996) y RALDH2

(McCaffrey y col., 1999; Yamamoto y col., 1996; 1998)]. Por tanto, la colocalización de la ADH con el aparato bioquímico asociado a la respuesta y al metabolismo del AR, sugiere que la ADH también debe tener una importante función en la vía de producción del AR. Aunque se ha detectado una retinol deshidrogenasa microsomal en el cerebro (Chai y col., 1995; 1996), hasta el momento no se ha descrito con exactitud su localización ni su contribución a la oxidación del retinol en este tejido. Por otra parte, la ADH es aproximadamente 100 veces más eficiente en la oxidación del retinol que la retinol deshidrogenasa microsomal (Duester, 1996).

#### 1.3.2.1 Posible papel de la ADH en la plasticidad neuronal y la neurogénesis

La plasticidad neuronal, representada por la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Cain, 1997; Chen y Tonegawa, 1997), es considerada un mecanismo celular esencial en los procesos de memoria y aprendizaje. Este fenómeno tiene lugar principalmente en la formación hipocampal (hipocampo y circunvolución dentada), y también en el neocórtex y el cerebelo (Bear y Kirkwood, 1993; Brown y col., 1988; Cain, 1997; Chen y Tonegawa, 1997; Teyler y col., 1989), todas ellas regiones donde hemos observado expresión de la ADH. La plasticidad neuronal es un importante fenómeno regulado por el AR (Chiang y col., 1998; Etchamendy y col., 2001; Misner y col., 2001). Así pues, en el cerebro los retinoides están relacionados con importantes funciones cognitivas como la LTP. La presencia de ADH1 y ADH4 en las regiones cerebrales responsables de la plasticidad sináptica, sugiere su implicación en esta importante función a través de la vía de síntesis del AR en la que participarían. En este sentido, varios trabajos describen que el etanol inhibe la LTP incluso a bajas concentraciones (Blitzer y col., 1990; Givens y McMahon, 1995; Peris y col., 1997). Esta inhibición podría ser debida, como se ha comentado anteriormente, al acetaldehído generado por la ADH de estas regiones (Abe y col., 1999), aunque también a la inhibición de la oxidación del retinol por la ADH en presencia de etanol.

La neurogénesis es otra importante función que se ha descrito recientemente en el SNC adulto en las regiones donde hemos encontrado ADH, tales como la circunvolución dentada de la formación hipocampal y ciertas zonas de la corteza (Eriksson y col., 1998; Gage y col., 1998; Kilpatrick y col., 1995; Magavi y col., 2000). Tanto el AR como las neurotrofinas juegan un importante papel en la neurogénesis durante el desarrollo, pero el mecanismo que regula la diferenciación de la progenie de las células madre del SNC adulto no está todavía bien caracterizado. Recientemente, se ha demostrado que el AR participa en el proceso de neurogénesis del adulto (Takahashi y col., 1999; Wohl y Weiss, 1998). Por tanto, podría ser que la ADH presente en estas zonas participase en la síntesis de AR necesario para la diferenciación de nuevas células neuronales.

### 1.3.2.2 Barrera hematoencefálica y ADH

El mRNA de ADH4 y ADH1 se ha localizado en los sistemas ventricular y vascular asociados al cerebro, tales como las meninges que rodean el cerebro y cerebelo, en los plexos coroideos del tercer y cuarto ventrículo, en los endimocitos que cubren las paredes de estos ventrículos y en el endotelio de los capilares sanguíneos. Estos resultados sugieren una función de este enzima en la barrera hematoencefálica. De hecho, la ALDH citosólica (probablemente ALDH1) ha sido también detectada en estos tejidos (Zimatkin y col., 1991). Una vez más, la colocalización de la ADH y la ALDH sugiere que estas enzimas podrían actuar, en una vía metabólica común, como barreras metabólicas en el SNC frente a alcoholes y aldehídos: la barrera entre la sangre y el fluido intersticial, por su presencia en el endotelio de los capilares que penetran en la sustancia cerebral; la barrera entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo representada por la ubicación en los plexos coroideos de los ventrículos; y la barrera entre el plasma y el tejido nervioso por la localización de estas enzimas en los endimocitos de las paredes de los ventrículos.

En el adulto, el AR parece tener una importante función en la regulación de la producción de líquido cefalorraquídeo en los plexos coroideos y su reabsorción en el espacio aracnoideo (Corey y Hayes, 1972). Por lo tanto, la síntesis de AR en los plexos coroideos puede representar un factor en la regulación autocrina de la producción de líquido cefalorraquídeo. El AR, actuaría una vez más, regulando la expresión de proteínas, sintetizadas por los plexos coroideos y presentes en el líquido cefalorraquídeo, esenciales para la función nerviosa adulta, como diversos factores de crecimiento y neurotrofinas (Cuevas y col., 1994; Díaz-Ruiz y col., 1993). Además, los plexos coroideos, como las meninges, contienen altos niveles de retinal deshidrogenasa (RALDH2) (Yamamoto y col., 1996; 1998) y otros componentes implicados en el metabolismo y acción del AR (MacDonald y col., 1990). Las meninges presentan una elevada capacidad de sintetizar AR (Dev y col., 1993). Por lo tanto, la presencia de ADH1 y ADH4 en los plexos coroideos y en las leptomeninges, podría tener relación con la función retinol deshidrogenasa de ambas clases, en la regulación de la síntesis de AR.

### 1.3.3 ADH de cerebro y metabolismo de las monoaminas

La ADH1 cataliza la oxidorreducción *in vitro* de los metabolitos derivados de la dopamina y el 5-HTOL (Mårdh y col., 1985; 1986; Consalvi y col., 1986). La dopamina está involucrada en importantes funciones que incluyen el movimiento, la atención y el aprendizaje (Heap y col., 1995). En relación con el aprendizaje asociado al hipocampo, se sabe que las neuronas piramidales del área CA1 contienen receptores dopaminérgicos. Por lo tanto, la presencia de ADH1 en estas células puede estar relacionada con la regulación de la concentración de dopamina y, en consecuencia, de las funciones específicas asociadas a esas neuronas. Por otra parte, el catabolismo

de la serotonina es otro buen ejemplo de un sistema sensible al etanol. La localización de ADH1 en estas zonas especialmente vulnerables a la acción del etanol en el SNC sugiere que el desequilibrio del metabolismo de estas aminas sea una posible causa de los efectos deletéreos del etanol.

## 1.4 Posibles funciones de ADH4 en los tejidos oculares

Los resultados obtenidos en esta Tesis han demostrado la presencia de ADH4 en diferentes tejidos oculares (Tabla 13 de Resultados).

### 1.4.1 Función de ADH4 como 11-*cis*-retinol deshidrogenasa en el ciclo visual

La detección de expresión de ADH4 en el epitelio pigmentado de la retina sugiere la participación de este enzima en el ciclo visual. El ciclo visual es básicamente un proceso cíclico en el que se produce la conversión del 11-*cis*-retinal a todo-*trans*-retinal, por acción de la luz, y la posterior regeneración del 11-*cis*-retinal en la oscuridad (Fig. 66). Los eventos moleculares que constituyen el ciclo visual tienen lugar principalmente en dos tipos celulares de la retina: las células del epitelio pigmentado y los segmentos externos de los fotorreceptores (conos y bastones) (Saari, 1999) (Fig. 66). Hasta el momento, sólo se ha propuesto a la 11-*cis*-retinol deshidrogenasa, RDH5, miembro de la familia de las SDR, como enzima responsable de la producción del 11-*cis*-retinal en la retina (Simon y col., 1995). Estudios genéticos han probado que mutaciones en la RDH5 podrían estar relacionadas con la ceguera nocturna congénita (*fundus albipunctatus*), lo que evidencia su participación directa en la visión (Cideciyan y col., 2000; González-Fernández y col., 1999; Yamamoto y col., 1999). Sin embargo, estudios con animales *knockout* para este enzima, demuestran que otros enzimas deben asegurar el funcionamiento de la vía de síntesis de 11-*cis*-retinal (Jang y col., 2001).

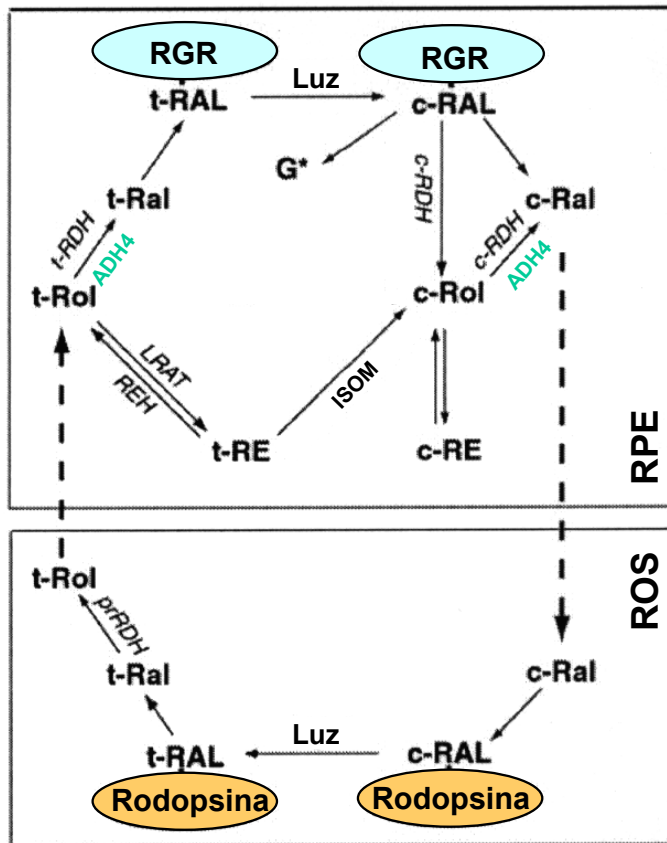
La actividad ADH4 detectada por nuestro grupo, mediante ensayos de actividad y electroforesis de almidón en homogeneizados de retina, hacía pensar en su posible implicación en el ciclo visual (Julià y col., 1983; Parés y col., 1985). Ahora, además, la localización específica de ADH4 en el epitelio pigmentado de la retina por ISH e IHC, y su elevada eficiencia catalítica frente al 11-*cis*-retinol ( $K_m = 28 \mu\text{M}$ ;  $k_{cat}/K_m = 9739 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Martras y col., artículo en preparación) apoyan el posible papel de esta ADH en esta etapa crítica del ciclo visual. El 11-*cis*-retinol se encuentra en cantidad suficiente para ser preferentemente procesado por ADH4 ( $V_{max}/K_m = 83,9 \text{ nmol/min por mg de proteína}$ ) que es 24 veces más eficaz que RDH5 ( $V_{max}/K_m = 3,5 \text{ nmol/min por mg de proteína}$ ; Wang y col., 1999).

### 1.4.2 Función de ADH4 como todo-*trans*-retinol deshidrogenasa en los tejidos oculares

La colocalización de ADH4, junto con otros enzimas, receptores y proteínas relacionadas con el metabolismo y acción de los retinoides, en los tejidos oculares sugiere varias implicaciones fisiológicas del enzima a través de su actividad todo-*trans*-retinol deshidrogenasa en la síntesis de AR: 1. En la córnea, con el mantenimiento del epitelio y de la función corneal; 2. La localización en la coroides está probablemente asociada al control del crecimiento esclerótico; 3. En el cuerpo ciliar, con el control de la composición del humor acuoso a través de la regulación de la expresión de proteínas específicas; 4. En el epitelio pigmentado de la retina estaría relacionada, por una parte, con la producción suplementaria del fotorreceptor 11-*cis*-retinal a través de la generación asociada a la proteína RGR unida al todo-*trans*-retinol, y por otra, con la promoción de la diferenciación de los fotorreceptores; y 5. En las capas de la retina restantes, con la cascada de transducción de señal del AR que controla el desarrollo del ojo en adulto.

En la córnea, hemos detectado ADH4 en el epitelio escamoso estratificado y en la monocapa de células endoteliales, localización que sugiere una función como retinol deshidrogenasa en la síntesis del AR, imprescindible para el mantenimiento de estos tejidos. También, hemos detectado ADH4 en la coroides, asociada con otros componentes implicados en la síntesis de AR (Chen y col., 1999; Fischer y col., 1999). Además, se ha encontrado ADH4 en el cuerpo ciliar que es el encargado de la fabricación y reabsorción del humor acuoso, de composición similar al líquido cefalorraquídeo. El cuerpo ciliar es una estructura con un epitelio cúbico, muy vascularizada y similar a la de los plexos coroideos de los ventrículos cerebrales. La presencia de ADH4 en el cuerpo ciliar hace pensar en una función retinol deshidrogenasa y de barrera metabólica frente a alcoholes y aldehídos, al igual que en el cerebro.

Recientemente, se ha demostrado la síntesis de todo-*trans*-retinal en las células del epitelio pigmentado de la retina, el cual unido a la proteína G de retina acoplada a receptor (RGR), es isomerizado a 11-*cis*-retinal por efecto de la luz. La existencia de esta nueva vía de generación del cromóforo 11-*cis*-retinal y la demostración de su importancia en el ciclo visual por estudios genéticos (Morimura y col., 1999; Yang y Fong., 2002), abre una nueva vía de participación de ADH4. Así, ADH4 podría estar implicada, también, en la generación de todo-*trans*-retinal—a partir de todo-*trans*-retinol—en el epitelio pigmentado (Fig. 66). También se ha encontrado expresión de la proteína RGR en las células de Müller (Jiang y col., 1993; Pandey y col., 1994).



**Figura 66. Dibujo esquemático del ciclo visual de los fotorreceptores de vertebrados.** La reacciones ocurren en dos tipos celulares, las células del epitelio pigmentado (RPE) y los segmentos externos de los fotorreceptores (ROS). Se indican las reacciones donde podría participar la ADH4. G\*, vía de transducción de señal asociada a proteína G activada por la RGR; ISOM, isómerohidrolasa; LRAT, lecitina-retinol aciltransferasa; c-Ral, 11-*cis* retinal; t-Ral, todo-*trans* retinal; c-Rol, 11-*cis* retinol; t-Rol, todo-*trans* retinol; c-RDH, 11-*cis*-retinol deshidrogenasa; tRDH, todo-*trans*-retinol deshidrogenasa; prRDH, retinol deshidrogenasa de fotorreceptores; RE, ésteres de retinol; REH, hidrolasa de ésteres de retinol; RGR, proteína G de retina acoplada a receptor (modificado de Saari, 1999; Yang y Fong., 2002).

La presencia de RGR sugiere la síntesis de todo-*trans*-retinal en esta capa de la retina, que sería generado a través de la oxidación del todo-*trans*-retinol catalizada por ADH4 presente en esta capa, tal y como hemos descrito en esta Tesis. Así mismo, la detección de la expresión de ADH4 en otras capas de la retina, tales como la capa nuclear externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna y la capa celular ganglionar, colocaliza con la presencia de otros componentes implicados en el metabolismo y transducción de señal del AR (Bossenbroek y col., 1998; Fischer y col., 1999), sugiriendo la activa participación de ADH4, también, en este proceso.

Niveles adecuados de vitamina A son esenciales para la diferenciación y el mantenimiento de las diferentes poblaciones celulares tales como las células



epiteliales, fibras nerviosas y células nerviosas (Amemiya, 2000). Así, la elevada expresión de ADH4 en los diferentes tejidos del globo ocular sugiere que este enzima podría jugar un importante papel en el mantenimiento de los niveles de retinoides, necesario para el buen funcionamiento de estos tejidos.

### 1.4.3 Función protectora de ADH4 frente a la peroxidación lipídica

La formación de radicales libres y productos de peroxidación lipídica se ha asociado a diversas patologías oculares (Babizhayer y Costa, 1994; Verdejo y col., 1999; Veriac y col. 1993). Recientemente, se han demostrado niveles significativos de metabolitos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal en el nervio óptico, la retina-coroides y la córnea (Pinazo-Durán y col., 1995; 1999). La localización de ADH4 en el epitelio escamoso estratificado y en la monocapa de células endoteliales de la córnea, sugiere una función protectora frente al estrés oxidativo generado en la capa más cercana al medio externo, implicada en la desintoxicación de productos de la peroxidación lipídica. De la misma forma, ADH4 en la retina, coroides y nervio óptico, podría estar también implicada en esta función.

Por otra parte, los radicales libres y los productos de peroxidación lipídica generados durante el consumo o exposición al alcohol, podrían estar implicados en los mecanismos de acción del alcohol en el globo ocular y una de las causas de la neuropatía óptica asociada al alcoholismo. Estudios en modelos animales de intoxicación alcohólica crónica, han mostrado que el alcohol induce la formación de radicales libres en el globo ocular y que las estructuras más afectadas en esta sentido son, de nuevo, el nervio óptico, la retina-coroides y la córnea (Pinazo-Durán y col., 1999). Así pues, la expresión de ADH4 en estas capas del globo ocular podría estar relacionada con la desintoxicación de los productos de peroxidación tanto en condiciones normales como durante la intoxicación etílica. El nervio óptico y la retina muestran los mayores niveles de peroxidación lipídica y se ha demostrado que los radicales libres podrían contribuir a las alteraciones ultraestructurales que provoca la intoxicación alcohólica crónica sobre la retina y el nervio óptico de la rata (Iborra y col., 1994). La distribución de ADH4 en estas zonas, especialmente susceptibles a la generación de radicales libres, sugiere una importante función protectora frente a los aldehídos generados en el proceso de estrés oxidativo.

## 2 EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LA ADH POR ÁCIDO RETINOICO EN HEPATOMA DE RATA

Se ha determinado el patrón de expresión ADH en la línea celular H4IIEC3 de hepatocarcinoma de rata y se ha comparado con el hígado. La electroforesis en gel de almidón y tinción por actividad, los ensayos de actividad por espectrofotometría, y la transferencia *Western* han demostrado la expresión de ADH1, ADH3 y ADH4 en las

células H4IIEC3 y han confirmado la ausencia de ADH4 en hígado de rata. Así pues, la línea de hepatocarcinoma de rata H4IIEC3 se ha revelado como un buen modelo para el estudio de la regulación de la expresión de las diferentes clases de la ADH, incluida ADH4 ausente en hígado.

La eliminación del suero bovino fetal del medio de crecimiento de las células H4IIEC3 disminuye los niveles de actividad de ADH1 y ADH4, de forma más acusada para ADH1, lo que indica que su expresión depende en mayor grado de hormonas o efectores normalmente presentes en el suero. En un trabajo anterior, utilizando la línea celular 11-3, también de hepatocarcinoma de rata, los niveles de transcrito ADH1 disminuyen drásticamente al crecer los cultivos en medio suplementado con suero al que se habían eliminado previamente las hormonas esteroides (Majewski y Yang, 1995).

Se ha estudiado el efecto de los retinoides sobre la expresión de ADH1, ADH3 y ADH4 en las células H4IIEC3. Los diferentes isómeros de AR provocan un aumento de los niveles de mensajero de ADH1 de rata, siendo el 9-*cis*-AR el isómero más potente. En cambio, todos los isómeros de AR ensayados, provocan una represión del gen ADH4 de rata, y en este caso, el todo-*trans*-AR es el isómero más activo. El 13-*cis*-AR es el de menor potencia, lo que podría estar relacionado con una lenta biotransformación al isómero activo todo-*trans*, ya que el 13-*cis* no puede unirse a los receptores nucleares de AR (Armstrong y col., 1994). Finalmente, ninguno de los tres isómeros de AR ensayados afecta a la expresión de ADH3, de forma que los niveles de mRNA se mantienen constantes en todos los experimentos con retinoides.

Estos resultados sugieren un papel de los retinoides en la regulación de la actividad ADH, en concordancia con la hipótesis de la autorregulación de la síntesis de AR por parte del propio AR (Duester, 1991) y con los análisis realizados en las secuencias de la región promotora del gen *ADH1* de rata, ratón y humano (Ceci y col., 1987; Crabb y col., 1991; Duester y col., 1999; Edenberg y Brown, 1991), en las que se han encontrado elementos reguladores que responden a retinoides (RARE). Por otra parte, los estudios realizados en la zona promotora del gen de ADH4 de rata, ratón (Zgombic-Knight y col., 1993; 1995b; 1997) y humano (Duester y col., 1991; Harding y Duester, 1992; Yokoyama y col., 1995) sugieren una región que funcionaría como RARE, promoviendo la hipótesis de un mecanismo de regulación en el control de la síntesis de AR. Por último, la secuencia del gen *ADH3* humano revela un promotor rico en G+C, falta de caja TATA y típico de proteínas que se expresan de forma constitutiva, lo que indica una regulación muy diferente a las del resto de clases ADH (Hur y Edenberg, 1992).

Así pues, la diferente regulación con ácido retinoico de los genes ADH1 y ADH4 así como la distribución tisular de los enzimas sugiere una función específica de cada una en la vía metabólica de los retinoides.

## DISCUSION FINAL

Esta Tesis Doctoral proporciona nuevos datos acerca de la distribución tisular y celular de las alcohol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en tejidos de rata adulta, que permiten comprender con más claridad las implicaciones fisiológicas de cada uno de estos enzimas. Además, el estudio realizado en la rata, comparado con el trabajo iniciado también en humanos, muestra que la distribución de las ADH en los diferentes tejidos estudiados, es similar en las dos especies. En consecuencia, la rata podría ser un buen modelo animal para conocer la etiología de las patologías asociadas con el consumo de alcohol, particularmente las relacionadas con la localización de su metabolismo.

A pesar de que existe un elevado número de publicaciones sobre la ADH gastrointestinal, en esta Tesis presentamos el estudio más completo sobre los enzimas ADH1 y ADH4, activos con etanol y retinoides. Así, se ha estudiado cada una de las regiones del tubo digestivo, desde la cavidad oral hasta el recto. Aunque principalmente se ha trabajado con rata, también presentamos resultados obtenidos con tejidos humanos. Se ha medido la actividad en homogeneizados mediante ensayos espectrofotométricos y se han detectado las formas enzimáticas mediante electroforesis. Se presentan, también, resultados sobre los niveles de proteína por análisis mediante transferencia *Western*. Se han aplicado metodologías de inmunohistoquímica y, por primera vez en la ADH, de hibridación *in situ*. Todo ello nos ha permitido establecer conclusiones sólidas sobre la distribución de estos enzimas y sobre los niveles en qué se expresan. Esta información, juntamente con las propiedades cinéticas de los enzimas estudiados, previamente determinados por nuestro grupo, nos permite postular, de manera razonable, la función fisiológica de estos enzimas en las diferentes partes del tracto digestivo. Cabe señalar en primer lugar que ambos enzimas, ADH1 y ADH4, se expresan a lo largo de todo el tracto, aunque en diferentes capas tisulares en función de la región analizada. En general, ADH4 se expresa mayoritariamente en las regiones inicial y final del tubo y en las capas más externas de la mucosa, en contacto con el lumen. Este enzima podría representar una primera barrera metabólica frente a las agresiones por alcoholes y aldehídos ingeridos, y frente a los generados endógenamente por la peroxidación lipídica. ADH1 es, sobre todo, intestinal y muestra una localización más interna, representando una segunda barrera metabólica. Las dos formas de ADH podrían contribuir al metabolismo de primer paso del etanol y a la eliminación de etanol producido por la flora bacteriana intestinal. Es de interés constatar que las áreas con mayor presencia de ADH, y en consecuencia de mayor oxidación de etanol, esófago y colon, son especialmente vulnerables al cáncer asociado al consumo de alcohol. Las

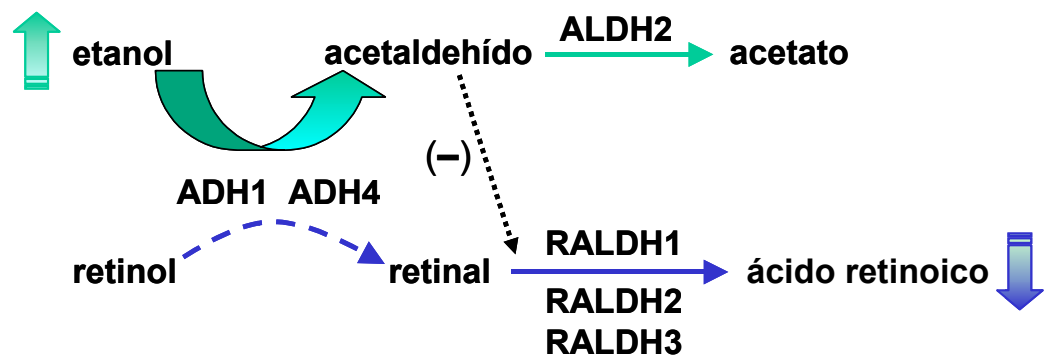
constantes cinéticas de ADH1 y ADH4 predicen su contribución a la oxidación de retinol, en la vía de síntesis de ácido retinoico (AR), hormona esencial para el desarrollo y el mantenimiento de las mucosas. Finalmente, el intestino es el órgano donde se produce la escisión del  $\beta$ -caroteno a retinal y la consiguiente reducción de éste a retinol. Esta reacción también podría ser catalizada por la ADH y, por tanto, podría constituir un enzima clave en el proceso de absorción de la vitamina A.

La presencia de ADH en cerebro y la posibilidad, por tanto, de metabolismo endógeno de etanol en cerebro, era hasta ahora materia de discusión. En esta Tesis, se demuestra, sin ambigüedad, la presencia en cerebro de los principales enzimas implicados en la oxidación del etanol y retinol, ADH1 y ADH4. Estos enzimas se expresan en muy pequeña cantidad y en regiones muy concretas del SNC, por lo que su actividad resulta imposible de detectar con los métodos convencionales, espectrofotométricos y electroforéticos. Han sido necesarias la inmunodetección, las técnicas de ISH y tinción histoquímica. ADH1 y ADH4 se han localizado en muy pocos tipos celulares, esencialmente neuronas y células epiteliales, del cerebelo, la formación hipocampal, diferentes regiones de la corteza cerebral y en los sistemas ventricular y vascular asociados al tejido nervioso. En consecuencia, estas células serán capaces de oxidar etanol, a las concentraciones alcanzadas tras un consumo normal, y por tanto, se producirán en estas células desequilibrios metabólicos, como el exceso de NADH, así como la generación del tóxico acetaldehído. La presencia de metabolismo en estas áreas concretas del SNC proporciona nueva información para comprender alguna de las alteraciones producidas por el etanol sobre la autorregulada producción de líquido cefalorraquídeo, las funciones cognitivas y de memoria, la locomoción y la coordinación motora, y el mantenimiento de los tejidos epiteliales. Recientemente, se ha demostrado que el AR está en la base de estas funciones cerebrales y nosotros sugerimos que la ADH—que se ha encontrado en los mismos tejidos y tipos celulares donde se ha demostrado un metabolismo activo de retinoides—podría representar la conexión entre el abuso crónico de alcohol y las patologías asociadas. Otra posible función reguladora de la ADH en cerebro podría ser la del metabolismo de las aminas biógenas ya que varios metabolitos del catabolismo de las catecolaminas son buenos sustratos de la ADH, especialmente de ADH1. No se puede excluir una contribución en la desintoxicación de los aldehídos citotóxicos de la peroxidación lipídica. Esta es una función especialmente significativa en el sistema ventricular y en los vasos sanguíneos asociadas al SNC, formando parte de la barrera hematoencefálica.

ADH4 es la única forma que se expresa en tejidos oculares, principalmente en la coroides, cuerpo ciliar, nervio óptico y en algunas capas de la cornea y retina. El ojo es un interesante órgano en términos de metabolismo de retinoides y nosotros proponemos que ADH4 tiene una importante contribución a este metabolismo. Las constantes cinéticas de ADH4 para el 11-*cis*-retinol indican que este enzima lo oxida

muy eficientemente. Estos datos, junto con la elevada y específica expresión de ADH4 en el epitelio pigmentado de la retina, sugieren que ADH4, participa en el ciclo visual generando el fotopigmento. Además, la expresión de ADH4 en otros tejidos oculares, junto con la maquinaria implicada en el metabolismo y acción de retinoides, sugiere una función reguladora de mantenimiento de estos tejidos a través de la síntesis de AR. Por último, es posible una función protectora de ADH4 que actuaría en la eliminación de aldehídos citotóxicos de la peroxidación lipídica—incrementada por la acción de la luz y la radiación UV—especialmente en la córnea.

Finalmente, proponemos la hipótesis de que las vías metabólicas de la eliminación de etanol y la síntesis del AR están relacionadas a través de la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa (Fig. 67). Así, durante el consumo de alcohol, elevadas concentraciones de etanol podrían alterar la homeostasis del AR por una inhibición de la oxidación del retinol catalizada por la ADH. Estudios *in vitro* demuestran que el etanol es un inhibidor competitivo de la actividad retinol deshidrogenasa de la ADH. Adicionalmente, el acetaldehído producido durante el metabolismo de etanol podría inhibir la actividad retinal deshidrogenasa de las aldehídos deshidrogenasas, reduciendo aún más la síntesis de AR (Fig. 67).



**Figura 67. Modelo de inhibición de la síntesis de ácido retinoico por el metabolismo de etanol.**

Por otro lado, hemos demostrado, en el presente trabajo, que el AR regula la expresión de los genes *ADH1* y *ADH4*. Utilizando la línea de hepatocarcinoma de rata H4IIEC3 como modelo, el tratamiento con diferentes isómeros de AR provoca un importante aumento en los niveles de mRNA de *ADH1* y un descenso en los de *ADH4*. Ello sugiere una autorregulación de la vía metabólica de síntesis de AR por el propio producto final, positiva para *ADH1* y negativa para *ADH4*. Esta regulación diferencial sugiere funciones diferentes para *ADH1* y *ADH4* y concuerda con los estudios realizados recientemente por el grupo de Duester (Molotkov y col., 2002a; 2002b), en ratones deficientes en *ADH1* o *ADH4*, así como en los dobles mutantes. Estos estudios han confirmado que *ADH1* y *ADH4*, aunque no son esenciales para el

desarrollo y la supervivencia en situaciones normales, presentan funciones bien diferenciadas en la supervivencia de los animales en situaciones de exceso y deficiencia de vitamina A, respectivamente. Adicionalmente, en ratones deficientes en ADH1, se ha demostrado que la administración conjunta de retinol y etanol causa la reducción de los niveles de AR, en comparación de los niveles alcanzados en la administración única de retinol (Molotkov y Duester, 2002)

# CONCLUSIONES

1. Se han puesto a punto técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica, y de hibridación *in situ*, que han permitido, por primera vez en nuestro laboratorio, la detección de las alcohol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en diferentes tejidos y células animales.
2. ADH4 es la alcohol deshidrogenasa típica en el sistema vascular de la rata. La histoquímica ha mostrado actividad ADH4 en el endotelio de la túnica íntima y en la capa muscular de la túnica media de venas y arterias. La ISH e IHC han confirmado estos resultados. En vasos sanguíneos humanos, el isoenzima ADH1B1 es el único responsable de la actividad de ADH, con una distribución parecida a la de ADH4 en la rata.
3. ADH1 y ADH4 se detectan a lo largo de todo el tracto digestivo, aunque muestran un patrón de expresión diferente, tal como se ha demostrado por electroforesis en gel de almidón y ensayos de actividad espectrofotométrica. ADH4 es característica de las regiones superiores e inferiores del tracto digestivo, las partes más externas; ADH1 es mayoritaria en el intestino delgado e inicio del grueso.
4. Los dos enzimas están localizados en diferentes capas celulares. ADH4 se detecta en toda la mucosa, especialmente en las capas más externas, en contacto con el lumen, mientras que ADH1 está relegada a las capas más internas.
5. La precisa localización de los dos enzimas en distintas zonas de la mucosa digestiva sugiere que actúan como barreras metabólicas a diferentes niveles, frente a la agresión de alcoholes y aldehídos ingeridos o producidos por la flora microbiana. ADH4, en las zonas más expuestas al oxígeno, podría tener un papel en la eliminación de productos de peroxidación lipídica.

## Conclusiones

6. Las constantes cinéticas apoyan una función de ADH1 y ADH4 en el metabolismo de retinoides, importante para el mantenimiento de la mucosa digestiva. También podrían intervenir en la reducción de retinal a retinol, en el proceso de absorción y metabolismo del  $\beta$ -caroteno en el intestino.

7. Las técnicas bioquímicas clásicas (ensayos de actividad y electroforesis) así como los análisis por transferencia *Northern*, no han permitido detectar la expresión de ADH en los homogeneizados de cerebro entero o de regiones concretas del SNC, a excepción de ADH3 que se ha encontrado en todas las regiones analizadas.

8. La hibridación *in situ* ha permitido determinar la localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en poblaciones celulares de regiones específicas del SNC especialmente vulnerables a los efectos deletéreos del etanol, tales como el cerebelo, la corteza cerebral y la formación hipocampal. Ambas enzimas están presentes también en el sistema vascular y ventricular asociados al tejido nervioso: leptomeninges, plexos coroideos y capa endotelial de los ventrículos y los vasos y capilares sanguíneos.

9. La inmunodetección de ADH4 en homogeneizados de diferentes regiones del cerebro de rata revela la presencia de proteína en tejidos cerebrales aunque en pequeña cantidad. Por otra parte, la actividad ADH detectada por tinción histoquímica en secciones de cerebro demuestra que la proteína activa colocaliza con el mRNA detectado por ISH.

10. En el SNC, probablemente la función más relevante de la ADH es la síntesis de ácido retinoico, a través de su actividad retinol deshidrogenasa, lo que concuerda con la expresión de ADH en los mismos tejidos y tipos celulares donde se ha demostrado un metabolismo activo de retinoides, los cuales están implicados en esenciales funciones en el cerebro adulto.

11. Otra función de la ADH en el SNC podría ser la eliminación de alcoholes y aldehídos citotóxicos, entre ellos el etanol. Esta función sería especialmente significativa en el sistema ventricular y en los vasos sanguíneos asociados al SNC, formando parte de la barrera hematoencefálica.

12. Las células que expresan ADH serán capaces de oxidar etanol, a las concentraciones alcanzadas tras un consumo normal. En consecuencia, se producirán en estas células desequilibrios metabólicos, como el exceso de NADH, así como generación de acetaldehído, que podrían ser la base de algunos de los efectos neurotóxicos del consumo y abuso de alcohol.



13. Los tejidos oculares, poseen una elevada expresión de ADH4, que se ha detectado en algunas capas de la cornea, la coroides, el cuerpo ciliar, la retina y en el nervio óptico. La elevada eficiencia de ADH4 con diferentes isómeros de retinoides, sugiere su participación en el mantenimiento de los tejidos oculares a través de su actividad todo-*trans*-retinol deshidrogenasa para la generación de ácido retinoico. Por otra parte, podría también participar en el ciclo visual, en la generación del fotopigmento en la retina, a través de su actividad 11-*cis*-retinol deshidrogenasa.

14. Utilizando la línea de hepatocarcinoma de rata H4IIEC3 como modelo, el tratamiento con diferentes isómeros de ácido retinoico provoca un aumento de los niveles de mRNA de ADH1 y un descenso en los del mRNA de ADH4. Ello sugiere la existencia de una autorregulación de la vía metabólica de síntesis de ácido retinoico por el propio producto final, positiva para ADH1 y negativa para ADH4, y aporta nuevas evidencias de la implicación de estos enzimas en la homeostasis del ácido retinoico.

15. En los tejidos y células donde se expresan ADH1 y ADH4, la inhibición de la oxidación de retinol por parte del etanol, y la consiguiente disminución en la síntesis de ácido retinoico, podría representar un mecanismo adicional para explicar los efectos tóxicos debidos al consumo de etanol.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Yamaguchi, S., Sugiura, M. y Saito, H. (1999) The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long-term potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **27**, 1805-1810.
- Agarwal, D.P. y Goedde, H.W. (1992) Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetics* **2**, 48-62.
- Ahmed, F. (1999) Vitamin A deficiency in Bangladesh: a review and recommendations for improvement. *Public Health Nutr.* **2**, 1-14.
- Akabane, J. (1979). Aldehydes and related compounds. En: *International encyclopedia of pharmacology and therapeutics* vols. II, section 20, (Tremolières, J., ed.) pp 523-560. Pergamon, Oxford.
- Algar, E.M. y Holmes, R.S. (1989) Purification and properties of mouse stomach aldehyde dehydrogenase. Evidence for a role in the oxidation of peroxidic and aromatic aldehydes. *Biochim. Biophys. Acta* **995**, 168-173.
- Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Peralba, J.M., Vaglenova, J., Vidal, F., Richart, C., Farrés, J. y Parés, X. (1997) Alcohol dehydrogenase of human and rat blood vessels. Role in ethanol metabolism. *FEBS Lett.* **405**, 26-30.
- Allali-Hassani, A., Peralba, J.M., Martras, S., Farrés, J. y Parés, X. (1998) Retinoids,  $\omega$ -hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H<sub>2</sub>-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* **426**, 362-366.
- Altura, B.M. (1984) Alcohol, stroke, hypertension and the heart. Introduction and overview. *Alcohol* **1**, 321-323.
- Altura, B.M. y Altura, B.T. (1982) Microvascular and vascular smooth muscle actions of ethanol, acetaldehyde, and acetate. *Fed. Proc.* **41**, 2447-2451.
- Ambroziak, W. y Pietruszko, R. (1991) Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *J. Biol. Chem.* **266**, 13011-13018.
- Amemiya, T. (2000) The eye and nutrition. *Jpn. J. Ophthalmol.* **44**, 320-326.
- Ang, H.L., Deltour, L., Zgombic-Knight, M., Wagner, M.A. y Duester, G. (1996a) Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 1050-1064.
- Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M. y Duester, G. (1996b) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 9526-9534.
- Ang, H.L. y Duester, G. (1997) Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: Spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev. Dyn.* **208**, 536-543.

## Bibliografía

- Armstrong, R.B., Ashenfelter, O.K., Eckhoff, C., Levin, A.A. y Shapiro, S.S. (1994) En: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine* (Sporn, M.B., Roberts, A.B. y Goodman, D.S., eds.), 2ª edición, pp. 545-572. Raven Press, New York, USA.
- Amon, R., Esposti, S.D. y Zern, M.A. (1995) Molecular biological aspects of alcohol-induced liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **19**, 247-256.
- Babizhayer, M.A. y Costa, E.B. (1994) Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochem. Biophys. Acta* **225**, 326-337.
- Baraona, E., Pirola, R.C. y Lieber, C.S. (1975) Acute and chronic effects of ethanol on intestinal lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **388**, 19-28.
- Baraona, E., Julkunen, R., Tannenbaum L. y Lieber, C.S. (1986) Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. *Gastroenterology* **90**, 103-110.
- Basile, A., Hoffer, B. y Dunwiddie, T. (1983) Differential sensitivity of cerebellar Purkinje neurons to ethanol in selectively out bred lines of mice: maintenance *in vitro* independent of synaptic transmission. *Brain Res.* **264**, 69-78.
- Batt, R.D. (1989) Absorption, distribution, and elimination of alcohol. En: *Human Metabolism of Alcohol, vol. I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects and General Interest* (Crow, K.E. y Batt, R.D., eds.) pp.3, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Bear, M.F. y Kirkwood, A. (1993) Neocortical long-term potentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 197-202
- Beisswender, T.B., Holmquist, B. y Vallee, B.L. (1985) Chi-ADH is the sole alcohol dehydrogenase isozyme of mammalian brains: Implications and inferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 8369-8373.
- Bello, A.T., Bora, N.S., Lange, L.G. y Bora, P.S. (1994) Cardioprotective effects of alcohol: mediation by human vascular alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1858-1864.
- Bengochea, O. y Gonzalo, L.M. (1990) Effect of chronic alcoholism on the human hippocampus. *Histol. Histopathol.* **5**, 349-357.
- Berger, S.L. (1987) Quantifying <sup>32</sup>P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymo.* **152**, 49-54.
- Bhat, P.V. (1998) Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency. *FEBS Lett.* **426**, 260-262.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D. y Uyeda, C.T. (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* **43**, 429-435.
- Bilanchone, V., Duyster, G., Edwards, Y. y Smith, M. (1986) Multiple mRNAs for human alcohol dehydrogenase (ADH): developmental and tissue specific differences. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3911-3926.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bjorkhem, I., Jornvall, H. y Zeppezauer, E. (1973) Oxidation of omega-hydroxylated fatty acids and steroids by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 413-420.
- Bjorneboe, A. y Bjorneboe, G.E. (1993) Antioxidant status and alcohol-related diseases. *Alcohol Alcohol.* **28**, 111-116.
- Blakley, P.M. y Scott, W.J. Jr. (1984) Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. 1/2.Teratogenicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**, 355-371.

- Blitzer, R.D., Gil, O. y Landau, E.M. (1990) Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain. Res.* **537**, 203-208.
- Blomhoff, R. (1994) Transport and metabolism of vitamin A. *Nutrition Reviews* **52**, S13-S23.
- Boleda, M.D., Julià, P., Moreno, A. y Parés, X. (1989) Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 74-81.
- Boleda, M.D., Saubi, N., Farrés, J. y Parés, X. (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: Aldehydes of lipid peroxidation,  $\omega$ -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 85-90.
- Bosron, W.F., Magnes, L.J. y Li, T.K. (1983) Kinetic and electrophoretic properties of native and recombined isoenzymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **22**, 1852-1857.
- Bosron, W.F. y Li, T.K. (1987) Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme* **37**, 19-28.
- Bossenbroek, N.M., Sulahian, T.H. y Ubels, J.L. (1998) Expression of nuclear retinoic acid receptor and retinoid X receptor mRNA in the cornea and conjunctiva. *Curr. Eye Res.* **17**, 462-469.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative determination of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, T.H., Chapman, P.F., Kairiss, E.W. y Keenan, C.L. (1988) Long-term synaptic potentiation. *Science* **242**, 724-728.
- Bühler, R., Pestalozzi, D., Hess, M. y Von Wartburg, J. -P. (1983) Immunohistochemical localisation of alcohol dehydrogenase in human kidney, endocrine organs and brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 55-59.
- Bujanda L. (2000) The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 3374-3382.
- Caballería, J., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1987) The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. *Life Sci.* **41**, 1021-1027.
- Caballería, J., Frezza, M., Hernandez-Muñoz, R., DiPadova, C., Korsten, M.A., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1989) Gastric origin of the first-pass metabolism of ethanol in humans: effect of gastrectomy. *Gastroenterology* **97**, 1205-1209.
- Cain, D.P. (1997) LTP, NMDA, genes and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 235-242.
- Canuto, R.A., Ferro, M., Muzio, G., Bassi, A.M., Leonarduzzi, G., Maggiora, M., Adamo, D., Poli, G. y Lindahl, R. (1994) Role of aldehyde metabolizing enzymes in mediating effects of aldehyde products of lipid peroxidation in liver cells. *Carcinogenesis* **15**, 1359-1364.
- Castellano, B., González, B., Jensen, M.B., Pedersen, E.B., Finsen, B.R. y Zimmer, J. (1991) A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 561-568.
- Ceci, J.D., Zheng, Y.W. y Felder, M.R. (1987) Molecular analysis of mouse alcohol dehydrogenase: nucleotide sequence of the Adh-1 gene and genetic mapping of a related nucleotide sequence to chromosome 3. *Gene* **59**, 171-182.
- Cederbaum, A.I., Pietruszko, R., Hempel, J., Becker, F.F. y Rubin, E. (1975) Characterization of a nonhepatic alcohol dehydrogenase from rat hepatocellular carcinoma and stomach. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 348-360.
- Cesarone, C.F., Bolognesi, C. y Santi, L. (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal. Biochem.* **100**, 188-197.

## Bibliografía

- Chai, X., Zhai, Y., Popescu, G. y Napoli, J.L. (1995) Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. Expression of its mRNA relative to type I. *J. Biol. Chem.* **270**, 28408-28412.
- Chai, X., Zhai, Y. y Napoli, J.L. (1996) Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III. *Gene* **169**, 219-222.
- Chai, X., Zhai, Y. y Napoli, J.L. (1997) cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 33125-33131.
- Chambon, P. (1993) The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene* **135**, 223-228.
- Chen, C. y Tonegawa, S. (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 157-184.
- Chen, F., Figueroa, D.J., Marmorstein, A.D., Zhang, Q., Petrukhin, K., Caskey, C.T. y Austin, C.P. (1999) Retina-specific nuclear receptor: A potential regulator of cellular retinaldehyde-binding protein expressed in retinal pigment epithelium and Muller glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 15149-15154.
- Chen, C.S. y Yoshida, A. (1991) Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 743-747.
- Cheung, C., Smith, C.K., Höög, J.O. y Hotchkiss, S.A. (1999) Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 100-107.
- Chiang, M.-Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguère, V., Sucov, H.M. y Evans, R.M. (1998) An essential role for retinoid receptors RAR and RXR in long-term potentiation and depression. *Neuron* **21**, 1353-1361.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chu, R., Lin, Y., Rao, M.S., Reddy, J.K. (1995a) Cooperative formation of higher order peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor complexes on the peroxisome proliferator responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 29636-29639.
- Chu, R., Madison, L.D., Lin, Y., Kopp, P., Rao, M.S. y Jameson, J.L. y Reddy, J.K. (1995b) Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 11593-11597.
- Cideciyan, A.V., Haeseleer, F., Fariss, R.N., Aleman, T.S., Jang, G.F., Verlinde, C.L., Marmor, M.F., Jacobson, S.G. y Palczewski, K. (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-*cis*-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis. Neurosci.* **17**, 667-678.
- Comporti, M. (1998) Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radic. Res.* **28**, 623-635.
- Connor, M.J. y Sidell, N. (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol. Chem. Neuropathol.* **30**, 239-252.
- Consalvi, V., Mårdh, G. y Valle, B.L. (1986) Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1009-1016.
- Corey, J.E. y Hayes, K.C. (1972) Cerebrospinal fluid pressure, growth, and hematology in relation to retinal status of the rat in acute vitamin A deficiency. *J. Nutr.* **102**, 1585-1593.
- Cortot, A., Jobin, G., Ducrot, F., Aymes, C., Giraudeau, V. y Modigliani, R. (1986) Gastric emptying and gastrointestinal absorption of alcohol ingested with a meal. *Dig. Dis. Sci.* **31**, 343-348.

- Crabb, D.W., Bosron, W.F. y Li, T.K. (1983) Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: application to predicting alcohol elimination rates *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 299-309.
- Crabb, D.W., Stein, P.M., Dipple, K.M., Hittle, J.B., Sidhu, R., Qulali, M., Zhang, K. y Edenberg, H.J. (1991) Structure and expression of the rat class I alcohol dehydrogenase gene. *Genomics* **5**, 906-914.
- Crabb, D.W., Pinairs, J., Hasanadka, R., Fang, M., Leo, M.A., Lieber, C.S., Tsukamoto, H., Motomura, K., Miyahara, T., Ohata, M., Bosron, W., Sanghani, S., Kedishvili, N., Shiraishi, H., Yokoyama, H., Miyagi, M., Ishii, H., Bergheim, I., Menzl, I., Parlesak, A. y Bode, C. (2001) Alcohol and retinoids. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 207S-217S.
- Cremona, O., Muda, M., Appel, R.D., Frutiger, S. Hughes, G.I., Hochstrasser, D.F., Geinoz, A. y Gabbiani, G. (1995) Differential protein expression in aortic smooth muscle cells cultured from newborn and aged rats. *Exp. Cell. Res.* **217**, 280-287.
- Cronholm, T. (1985) Hydrogen transfer between ethanol molecules during oxidoreduction *in vivo*. *Biochem. J.* **229**, 315-322.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jörnvall, H., Farrés, J. y Parés, X. (2001) A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J. Biol. Chem.* **276**, 19132-19140.
- Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X. y Farrés, J. (2000) Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: A conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180-25187.
- Crow, J.A. y Ong, D.E. (1985) Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**, 4707-4711.
- Cuevas, P., Carceller, F., Reimers, D., Fu, X. y Giménez-Gallego, G. (1994) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in choroid plexus of the rat. *Neurol. Res.* **16**, 310-312.
- Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R. y Clark, J.B. (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and the retinoid X receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , in rat central nervous system. *J. Neurochem.* **70**, 1366-1375.
- Current Protocols in Molecular Biology (Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, eds.). John Willey & Sons, Inc., Massachusetts, USA.
- Dafeldecker, W.P. y Valle, B.L. (1986) Organ-specific human alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of isozymes from testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 1056-1063.
- Deltour, L., Ang, H.L. y Duester, G. (1996) Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB* **10**, 1050-1057.
- Deltour, L., Haselbeck, R.J., Ang, H.L. y Duester, G. (1997) Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol. Reprod.* **56**, 102-109.
- Deltour, L., Foglio, M.H. y Duester, G. (1999a) Impaired retinol utilization in *Adh4* alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25**, 1-10.
- Deltour, L., Foglio, M.H. y Duester, G. (1999b) Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase *Adh1*, *Adh3*, and *Adh4* null mutant mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 16796-16801.
- Dev, S., Adler, A.J. y Edwards, R.B. (1993) Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Res.* **632**, 325-328.

## Bibliografía

- Dew, S.E. y Ong, D.E. (1994) Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry* **33**, 12340-12345.
- Díaz-Ruiz, C., Pérez-Tomas, R., Domingo, J. y Ferrer, I. (1993) Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha in choroid plexus of the rat and chicken. *Neurosci. Lett.* **164**, 44-46.
- Ditlow, C.C., Holmquist, B., Morelock, M.M. y Vallee, B.L. (1984) Physical and enzymatic properties of a class II alcohol dehydrogenase isozyme of human liver: pi-ADH. *Biochemistry* **23**, 6363-6368.
- Dockham, P.A., Lee, M.O. y Sladek, N.E. (1992) Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2453-2469.
- Dolney, D.E., Szalai, G., Duester, G. y Felder, M.R. (2001) Molecular analysis of genetic differences among inbred mouse strains controlling tissue expression pattern of alcohol dehydrogenase 4. *Gene* **267**, 145-156.
- Dong, Y.J., Peng, T.K. y Yin, S.J. (1996) Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. *Alcohol* **13**, 257-262.
- Dowlatshahi, K., Mehta, R.G., Levin, B., Cerny, W.L., Skinner, D.B. y Moon, R.C. (1984) Retinoic-acid-binding protein in normal and neoplastic human esophagus. *Cancer* **54**, 308-311.
- Duester, G., Smith M., Bilanchone, V. y Hatfield, G.W. (1986) Molecular analysis of the human class I alcohol dehydrogenase gene family and nucleotide sequence of the gene encoding the  $\beta$ subunit. *J. Biol. Chem.* **261**, 2027-2033.
- Duester, G. (1991) Human liver alcohol dehydrogenase gene expression. Retinoic acid homeostasis and fetal alcohol syndrome. En: *Drug and alcohol abuse reviews, vol. 2: Liver pathology and alcohol* (Watson, R.R., ed.), pp 375-402. The Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- Duester, G., Shean, M.L., McBride M.S. y Steward, M.J. (1991) Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1638-1646.
- Duester, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**, 12221-12227.
- Duester, G. (1998) Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *J. Nutr.* **128**, 459S-462S.
- Duester, G., Farrés, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Höög, J.-O., Parés, X., Plapp, B.V., Yin, S.-J. y Jörnvall, H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 389-395.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315-4324.
- Duester, G. (2001) Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 469-480.
- Duthie, S.J., Coleman, C.S. y Grant, M.H. (1988) Status of reduced glutathione in the human hepatoma cell line, HEP G2. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3365-3368.
- Dyck, L.E. (1995) Polymorphism of a class 3 aldehyde dehydrogenase present in human saliva and in hair roots. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **19**, 420-426.
- Eckardt, M.J., File, S.E., Gessa, G.L., Grant, K.A., Guerri, C., Hoffman, P.L., Kalant, H., Koob, G.F., Li, T.K. y Tabakoff, B. (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 998-1040.

- Edenberg, H.J. y Brown, C.J. (1992) Regulation of human alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenetics* **2**, 185-196.
- Edenberg, H.J. y Bosron, W.F. (1997) Alcohol dehydrogenases. En: *Comprehensive Toxicology*, vol. 3: *Biotransformation* (Guengerich F. P., ed.), pp 119-131. Pergamon, New York, USA.
- Edenberg, H.J. (2000) Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **64**, 295-341.
- Ehrig, T., Bosron, W.F. y Li, T.K. (1990) Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol.* **25**, 105-116.
- Erickson, C.K. (1979) Factors affecting the distribution and measurements of ethanol in the body. En: *Biochemistry and Pharmacology of ethanol* (Majchrowicz, E., Noble, E.P., eds.), pp 9, Plenum Press, New York, USA.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Pettersson, D.A. y Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313-1317.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. y Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128.
- Estonius, M., Danielsson, O., Karlsson, C., Persson, H., Jörnvall, H. y Höög, J.-O. (1993) Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases. Assessment of mRNA species in mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* **215**, 497-503.
- Estonius, M., Svensson, S. y Höög, J.-O. (1996) Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Lett.* **397**, 338-342.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R. y Huguere, P. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci.* **21**, 6423-6429.
- Farrés, J., Moreno, A., Crosas, B., Peralba, J.M., Allali-Hassani, A., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. y Parés, X. (1994) Alcohol dehydrogenase of class IV ( $\sigma\sigma$ -ADH) from human stomach. cDNA sequence and structure/function relationships. *Eur. J. Biochem.* **224**, 549-557.
- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fernández, M. R. (1998) Características de la FALDH (ADH clase III): Distribución de la FALDH. En: *Estudios funcionales y estructurales de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de Saccharomyces cerevisiae. Clonaje, delección y mutagénesis dirigida*. Tesis Doctoral. pp 16-17, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.
- Fischer, A.J., Wallman, J., Mertz, J.R. y Stell, W.K. (1999) Localization of retinoid binding proteins, retinoid receptors, and retinaldehyde dehydrogenase in the chick eye. *J. Neurocytol.* **28**, 597-609.
- Fisher, S.E. (1988) Ethanol levels *in vivo*. *FASEB J.* **2**, 2324.
- Franceschi, S. y La Vecchia, C. (1994) Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colon-rectum. *Dig Dis* **12**, 276-289.
- Franke, H., Kittner, H., Berger, P., Wirkner, K. y Schramek, J. (1997) The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol* **14**, 445-454.
- Fries, R.W., Bohlken, D.P. y Plapp, B.V. (1979) 3-Substituted pyrazole derivatives as inhibitors and inactivators of liver alcohol dehydrogenase. *J. Med. Chem.* **22**, 356-359.



## Bibliografía

- Frohman, M.A. (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods. Enzymol.* **218**, 340-356.
- Frota-Ruchon, A., Marcinkiewicz, M. y Bhat, P.V. (2000) Localization of retinal dehydrogenase type 1 in the stomach and intestine. *Cell. Tissue Res.* **302**, 397-400.
- Furne, J. y Levitt, M.D. (1999) Speed of gastric emptying and metabolism of ethanol. *Gut* **45**, 916-923.
- Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr S.T. y Ray, J. (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 11879-11883.
- Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A. y Ray, J. (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* **36**, 249-266.
- Garro, A.J. y Lieber, C.S. (1990) Alcohol and cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 219-249.
- Giri, P.R., Linnoila, M., O'Neill, J.B. y Goldman, D. (1989) Distribution and possible metabolic role of class III alcohol dehydrogenase in the human brain. *Brain Res.* **481**, 131-141.
- Givens, B. y McMahon, K. (1995) Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* **688**, 27-33.
- González-Fernández, F., Kurz, D., Bao, Y., Newman, S., Conway, B.P., Young, J.E., Han, D.P. y Khan, S.C. (1999) 11-*cis*-retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus. *Mol. Vis.* **5**, 41-46.
- Gough, W.H., VanOoteghem, S., Sint, T. y Kedishvili, N.Y. (1998) cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase that oxidizes all-*trans*-retinol and 3 $\alpha$ -hydroxysteroids. *J. Biol. Chem.* **273**, 19778-19785.
- Gow, A.J., Buerk, D.G. y Ischiropoulos, H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 2841-2845.
- Grondona, J.M., Kastner, P., Gansmuller, A., Decimo, D., Chambon, P. y Mark, M. (1996) Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARGamma2 compound mutant mice. *Development* **122**, 2173-2188.
- Gross, M.D., Hays, R., Gapstur, S.M., Chaussee, M. y Potter, J.D. (1994) Evidence for the formation of multiple types of acetaldehyde-haemoglobin adducts. *Alcohol Alcohol.* **29**, 31-41.
- Gross, C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neurosci.* **1**, 67-73.
- Grün, F., Hirose, Y., Kawauchi, S., Ogura, T. y Umehono, K. (2000) Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J. Biol. Chem.* **275**, 41210-41218.
- Gudas, L.J., Sporn, M.B. y Roberts, A.B. (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. En: *The Retinoids: biology, chemistry, and medicine* (Sporn, A.B., Roberts, A.B., y Goodman, D.S., eds), 2<sup>nd</sup> edition, pp. 443-520. Raven Press Ltd, New York, USA.
- Guivernau, M., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1987) Acute and chronic effects of ethanol and its metabolites on vascular production of prostacyclin in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 59-64.
- Halsted, C.H., Robles, E.A. y Mezey, E. (1973) Distribution of ethanol in the human gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **26**, 831-834.
- Hammersen, F. (1987) Sabotta/Hammersen: *Histología-Atlas en color de anatomía microscópica*. 3<sup>a</sup> edición. Salvat Editores, S.A., Barcelona, España.

- Han, C.-L., Liao, C.-S., Wu, C.-W., Hwong, C.-L., Lee, A.-R. y Yin, S.-J. (1998) Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.* **254**, 25-31.
- Handler, J.A., Bradford, B.U., Glassman, E., Ladine, J.K. y Thurman, R.G. (1986) Catalase-dependent ethanol metabolism in vivo in deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 4487-4492.
- Harding, P.P. y Duester, G. (1992) Retinoic acid activation and thyroid hormone repression of the human alcohol dehydrogenase gene ADH3. *J. Biol. Chem.* **267**, 14145-14150.
- Haselbeck, R.J., Ang, H.L. y Duester, G. (1997a) Class IV alcohol/retinol dehydrogenases along the mouse gastrointestinal epithelium. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **21**, 1484-1490.
- Haselbeck, R.J., Ang, H.L., Deltour, L. y Duester, G. (1997b) Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology* **138**, 3035-3041.
- Haselbeck, R.J., Ang, H.L. y Duester, G. (1997c) Class IV alcohol/retinol dehydrogenase localization in epidermal basal layer: potential site of retinoic acid synthesis during skin development. *Dev. Dyn.* **208**, 447-453.
- Haselbeck, R.J. y Duester, G. (1998) ADH4-lacZ transgenic mouse reveals alcohol dehydrogenase localisation in embryonic midbrain/hindbrain, otic vesicles, and mesencephalic, trigeminal, facial, and olfactory neural crest. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1607-1613.
- Haselbeck, R.J., Hoffmann, I. y Duester, G. (1999) Distinct functions for Aldh1 and Aldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* **25**, 353-364.
- Heap, L., Ward, R.J., Abiaka, C., Dexter, D., Lawlor, M., Pratt, O., Thomson, A., Shaw, K. y Peters, T.J. (1995) The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 263-270.
- Hedberg, J.J., Höög, J.O., Nilsson, J.A., Xi, Z., Elfving, A. y Grafstrom, R.C. (2000) Expression of alcohol dehydrogenase 3 in tissue and cultured cells from human oral mucosa. *Am. J. Pathol.* **157**, 1745-1755.
- Helander, A., y Some, M. (2000) Dietary serotonin and alcohol combined may provoke adverse physiological symptoms due to 5-hydroxytryptophol. *Life Sci.* **67**, 799-806.
- Holmes, R.S. (1978) Electrophoretic analyses of alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, aldehyde oxidase, sorbitol dehydrogenase and xanthine oxidase from mouse tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **61**, 339-346.
- Holtke, H.J., Sagner, G., Kessler, C. y Schmitz, G. (1992) Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. *Biotech.* **12**, 104-113.
- Höög, J.O. y Brandt, M. (1995) Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 355-364.
- Hsu, L.C., Chang, W.C., Hiraoka, L. y Hsieh, C.L. (1994) Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6. *Genomics* **24**, 333-341.
- Hsu, L.C. y Yoshida, A. (1993) Human stomach aldehyde dehydrogenase, ALDH3. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 141-152.
- Hunt, W.A. y Nixon, S.J. (1993). Alcohol-induced brain damage. En: *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Monograph* 22. NIH Publication 93-3549. NIAAA, Rockville, Maryland, USA.

## Bibliografía

- Hunt, W.A. (1996) Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain—a review. *Alcohol*. **13**, 147-151.
- Hur, M.-W. y Edenberg, H.J. (1992). *Gene* **121**, 305-311.
- Iborra, F.J., Caño-Parra, J., Renau-Piqueras, J. y Pinazo-Durán, M.D. (1994) Lipid peroxidation in the retina catalyzed by cytochrome P450 reductase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 21-35.
- Iborra, F.J., Renau-Piqueras, J., Portoles, M., Boleda, M.D., Guerri, C. y Parés, X. (1992) Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) in the nucleus. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1865-1878.
- Inagami, S. y Ong, D.E. (1992) Purification and partial characterization of cellular retinol-binding protein, type two, from human small intestine. *J. Nutr.* **122**, 450-456.
- Jang, G.F., Van Hooser, J.P., Kuksa, V., McBee, J.K., He, Y.G., Janssen, J.J., Driessen, C.A. y Palczewski, K. (2001) Characterization of a dehydrogenase activity responsible for oxidation of 11-cis-retinol in the retinal pigment epithelium of mice with a disrupted RDH5 gene. A model for the human hereditary disease fundus albipunctatus. *J. Biol. Chem.* **276**, 32456-32465.
- Jedziniak, J. y Rokita, J. (1983) Aldehyde metabolism in the human lens. *Exp. Eye Res.* **37**, 119-127.
- Jensen, D.E., Belka, G.K. y Du Bois, G.C. (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* **331**, 659-668.
- Jetten, A.M. (1984) Modulation of cell growth by retinoids and their possible mechanisms of action. *Fed. Proc.* **43**, 134-139.
- Jiang, M., Pandey, S. y Fong, H.K. (1993) An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 3669-3678.
- Jokelainen, K., Matysiak-Budnik, T., Makisalo, H., Hockerstedt, K. y Salaspuro, M. (1996) High intracolonic acetaldehyde values produced by a bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation in piglets. *Gut* **39**, 100-104.
- Jolly, A. (1966) Lemur social behavior and primate intelligence. *Science* **153**, 501-506.
- Jones, A.W., Jonsson, K.A. y Kechagias, S. (1997) Effect of high-fat, high-protein, and high-carbohydrate meals on the pharmacokinetics of a small dose of ethanol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **44**, 521-526.
- Jörnvall, H., Danielsson O, Eklund H, Hjelmqvist L, Hoog JO, Pares X, Shafqat J (1993) Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 533-544.
- Jörnvall, H. y Höög, J.-O. (1995) Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol.* **30**, 153-161.
- Jörnvall, H., Höög, J.O., Persson, B. y Parés, X. (2000) Pharmacogenetics of the alcohol dehydrogenase system. *Pharmacology* **61**, 184-191.
- Julià, P., Farrés, J. y Parés, X. (1983) Purification and partial characterization of a rat retina alcohol dehydrogenase active with ethanol and retinol. *Biochem. J.* **213**, 547-550.
- Julià, P., Farrés, J. y Parés, X. (1986) Ocular alcohol dehydrogenase in the rat: Regional distribution and kinetics of the ADH-1 isoenzyme with retinol and retinal. *Exp. Eye Res.* **42**, 305-314.
- Julià, P., Boleda, M.D., Farrés, J. y Parés, X. (1987a) Mammalian alcohol dehydrogenase: characteristics of class III isoenzymes. *Alcohol Alcohol.* **1**, 169-173.

- Julià, P., Farrés, J. y Parés, X. (1987b) Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* **162**, 179-189.
- Jürgens, G., Chen, Q., Esterbauer, H., Mair, S., Ledinski, G. y Dinges, H.P. (1993) Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). *Arterioscler. Thromb.* **13**, 1689-1699.
- Karhunen, P.J., Erkinjuntti, T. y Laippala, P. (1994) Moderate alcohol consumption and loss of cerebellar Purkinje cells. *Br. Med. J.* **308**, 1663-1667.
- Kato, S., Alderman, J. y Lieber, C.S. (1987) Respective roles of the microsomal ethanol oxidizing system and catalase in ethanol metabolism by deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 586-591.
- Kato, S., Mano, H., Kumazawa, T., Yoshizawa, Y., Kojima, R. y Masushige, S. (1992) Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem. J.* **286**, 755-760.
- Kato, I. (1995) The Extent of the Problems and the epidemiological aspects of alcohol drinking. En: *Alcohol and the gastrointestinal tract*. (Preedy V.R. y Watson R.R., eds), pp 1-17. CRC Press, New York, USA.
- Kaufman, S.E. y Kayem, M.D. (1978) Induction of gastro-oesophageal reflux by alcohol. *Gut* **19**, 336-338.
- Kaufman, S.E. y Kaye, M.D. (1979) Effect of ethanol upon gastric emptying. *Gut* **20**, 688-692.
- Kedishvili, N.Y., Gough, W.H., Wilhelmina, I.D., Parsons, S., Li, T.-K. y Bosron, W.F. (1998) Effect of cellular retinol-binding protein on retinol oxidation by human class IV retinol/alcohol dehydrogenase and inhibition by ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 191-196.
- Kelly, J.P., Kaufman, D.W., Koff, R.S., Laszlo, A., Wiholm, B.E. y Shapiro, S. (1995) Alcohol consumption and the risk of major upper gastrointestinal bleeding. *Am. J. Gastroenterol.* **90**, 1058-1064.
- Kennedy N.P. y Tipton K.F. (1990) Ethanol metabolism and alcoholic liver disease. *Essays. Biochem.* **25**, 137-195.
- Kerr, J.T., Maxwell, D.S. y Crabb, D.W. (1989) Immunocytochemistry of alcohol dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **13**, 730-736.
- Kilpatrick, T.J., Richards, L.J. y Bartlett, P.F. (1995) The regulation of neural precursor cells within the mammalian brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**, 2-15.
- King, G., Hirst, L. y Holmes, R. (1999) Human corneal and lens aldehyde dehydrogenases. Localization and function(s) of ocular ALDH1 and ALDH3 isozymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 189-198.
- Koivusalo, M. y Uotila, L. (1991) Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.1): evidence for the identity with class III alcohol dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **284**, 305-313.
- Koivisto, T. y Salaspuro, M. (1996) Aldehyde dehydrogenases of the rat colon: comparison with other tissues of the alimentary tract and the liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 551-555.
- Krebs, H.A. y Perkins, J.R. (1970) The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* **118**, 635-644.
- Krężel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupé, V., Kastner, P., Borrelli, E. y Chambon, P. (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* **279**, 863-867.

## Bibliografía

- Krežel, W., Kastner, P., Borrelli, E. y Chambon, P. (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* **89**, 1291-1300.
- Kühnel, W. (1987) Atlas de citología y anatomía microscópica. 6ª edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.
- Kune, G.A. y Vitetta, L. (1992) Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr. Cancer* **18**, 97-111.
- Kunh, H.G., Dickinson-Anson, H. y Gage, F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**, 2027-2033.
- Kunitoh, S., Asai, H., Imaoka, S., Funae, Y. y Monna, T. (1996) Metabolism of acetaldehyde to acetate by rat hepatic P-450s: presence of different metabolic pathway from acetaldehyde dehydrogenase system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 22A-24A.
- Kupari, M., Lindros, K., Hillbom, M., Heikkila, J. y Ylikahri, R. (1983) Cardiovascular effects of ingestion: their modification by beta-adrenergic blockade and alcohol dehydrogenase inhibition. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **7**, 283-288.
- Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A. y Bhat, P.V. (1995) A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid. *Biochem. J.* **305**, 681-684.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M. y Chambon, P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**, 539-548.
- Lerman, S. (1992) Ocular side effects of accutane therapy. *Lens Eye Toxic Res.* **9**, 429-438.
- Levitt, M.D., Doizaki, W. y Levine, A.S. (1982) Hypothesis: metabolic activity of the colonic bacteria influences organ injury from ethanol. *Hepatology* **5**, 598-600.
- Levitt, M.D., Levitt, D.G., Furne, J. y DeMaster, E.G. (1994) Can the liver account for first-pass metabolism of ethanol in the rat? *Am. J. Physiol.* **267**, G452-457.
- Levitt, M.D., Furne, J. y DeMaster, E. (1997) First-pass metabolism of ethanol is negligible in rat gastric mucosa. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 293-297.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A. y Dräger, U.C. (2000) A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech. Dev.* **95**, 283-289.
- Li, T.K. (1977) Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **45**, 427-83.
- Li, T.K., Bosron, W.F., Dafeldecker, W.P., Lange, L.G. y Vallee, B.L. (1977) Isolation of pi-alcohol dehydrogenase of human liver: Is it a determinant of alcoholism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4378-4381.
- Li, T.-K. (1983) The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function. En: *Medical and Social Aspects of Ethanol Abuse* (Tabakoff, B., Sutker, P.B. y Randall, C.L., eds), pp. 47-77. Plenum Press, New York, USA.
- Lieber, C.S. (1994) Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* **106**, 1085-1105.
- Lieber, C.S. (1995) The metabolic of alcohol and its implications for the pathogenesis of disease. En: *Alcohol and the gastrointestinal tract*. (Preedy, V.R. y Watson, R.R., eds.), pp. 19-39. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Lieber, C.S. (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta* **257**, 59-84.
- Lieber, C.S. (2000) Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt. Sinai J. Med.* **67**, 84-94.
- Lim, R.T., Gentry, R.T., Jr., Itio, D., Yokoyama, H., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1993) First-pass metabolism of ethanol is predominantly gastric. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 1337-1344.
- Lindahl, R. y Petersen, D.R. (1991) Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1583-1587.
- Lindahl, R. (1992) Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 283-335.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. y Stamler, J.S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M. y Chambon, P. (1993) Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643-658.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Decimo, D., LeMeur, M., Dierich, A., Gorry, P. y Chambon, P. (1995) Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **53**, 475-486.
- Longnecker, M.P. (1995) Alcohol consumption and risk of cancer in humans: an overview. *Alcohol* **12**, 87-96
- Love, J.M. y Gudas, L.J. (1994) Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 825-831.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M. y Chambon, P. (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7225-7229.
- MacDonald, P.N., Bok, D. y Ong D.E. (1990) Localization of cellular retinol-binding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4265-4269.
- Magavi, S.S., Leavitt, B.R. y Macklis, J.D. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. **405**, 951-955.
- Majewski, J.L. y Yang, W. (1995) The class I alcohol dehydrogenase gene is glucocorticoid-responsive in the rat hepatoma microcell hybrid cell line, 11-3. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **19**, 1430-1434.
- Mangelsdorf, D.J. (1994) Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* **52**:S32-S44.
- Mårdh, G., Luehr, C.A. y Vallee, B.L. (1985) Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4979-4982.
- Mårdh, G., Dingley, A.L., Auld, D.S. y Vallee, B.L. (1986) Human class II (pi) alcohol dehydrogenase has a redox-specific function in norepinephrine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 8908-8912.
- Mårdh, G. y Vallee, B.L. (1986) Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the interconversion of alcohols and aldehydes in the metabolism of dopamine. *Biochemistry* **25**, 7279-7282.
- Marschall, H.U., Oppermann, U.C., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Höög, J.O. y Jörnvall, H. (2000) Human liver class I alcohol dehydrogenase gammagamma isozyme: the sole cytosolic 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase of iso bile acids. *Hepatology* **31**, 990-996.

## Bibliografía

- Martras, S. (1998) Separació de retinoids per HPLC i estudi de l'especificitat de l'alcohol deshidrogenasa classe IV amb retinoids. Trabajo de investigación de tercer ciclo del programa de doctorado de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Mazzanti, R. y Jenkins, W.J. (1987) Effect of chronic ethanol ingestion on enterocyte turnover in rat small intestine. *Gut* **28**, 52-55.
- McCaffery, P., Posch, K.C., Napoli, J.L., Gudas, L. y Dräger, U.C. (1993) Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. *Dev. Biol.* **158**, 390-399.
- McCaffery, P. y Dräger, U.C. (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7772-7776.
- McCaffery, P., Wagner, E., O'Neil, J., Petkovich, M. y Dräger, U.C. (1999) Dorsal and ventral retinoic territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech. Dev.* **85**, 203-214.
- McEvily, A.J., Holmquist, B., Auld, D.S. y Vallee, B.L. (1988) 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$ -steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits. *Biochemistry* **27**, 4284-4288.
- McManus, I.R., Brotsky, E. y Olson, R.E. (1966) The origin of ethanol in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **121**, 167-170.
- Mertz, J.R., Shang, E., Piantedosi, R., Wei, S., Wolgemuth, D.J. y Blaner, W.S. (1997) Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis*-retinol oxidation. A possible role in 9-*cis*-retinoic acid formation. *J. Biol. Chem.* **272**, 11744-11749.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Fan, X., Cuenca, A.E. y Duester, G. (2000) RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech. Dev.* **97**, 227-230.
- Mira, L., Maia, L., Barreira, L. y Manso, C.F. (1995) Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 53-58.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F. y Evans, R.M. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 11714-11719.
- Misra, P., Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. y Boor, P.J. (1995) Glutathione S-transferase 8-8 is localized in smooth muscle cells of rat aorta and is induced in an experimental model of atherosclerosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 27-33.
- Molotkov, A., Deltour, L., Foglio, M.H., Cuenca, A.E. y Duester, G. (2002a) Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 13804-13811.
- Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M.H., Martras, S., Farrés, J., Parés, X. y Duester, G. (2002b) Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5337-5342.
- Molotkov, A. y Duester, G. (2002c) Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol Intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* Apr 17 [epub ahead of print].
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Vallés, S., Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J. Neurochem.* **65**, 2561-2570.
- Montoliu, C., Vallés, S., Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1994) Ethanol induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: Effect of chronic alcohol consumption. *J. Neurochem.* **63**, 1855-1862.

- Moreno, A. y Parés, X. (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.* **266**, 1128-1133.
- Moreno, A., Parés, A., Ortiz, J., Enríquez, J. y Parés, X. (1994) Alcohol dehydrogenase from human stomach: variability in normal mucosa and effect of age, gender, ADH3 phenotype and gastric region. *Alcohol Alcohol.* **29**, 663-671.
- Mori, O., Haseba, T., Kameyama, K., Shimizu, H., Kudoh, M., Ohaki, O., Arai, Y., Yamazaki, M. y Asano, G. (2000) Histological distribution of class III alcohol dehydrogenase in human brain. *Brain Res.* **852**, 186-190.
- Morimura, H., Berson, E.L. y Dryja, T.P. (1999) Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1000-1004.
- Mufti, S.I., Eskelson, C.D., Odeleye, O.E. y Nachiappan, V. (1993) Alcohol-associated generation of oxygen free radicals and tumor promotion. *Alcohol Alcohol.* **28**, 621-628.
- Nakamura, K., Iwahashi, K., Itoh, M., Ameno, K., Ijiri, I., Takeuchi, Y. y Suwaki, H. (2000) Immunohistochemical study on acetaldehyde adducts in alcohol-fed mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **24**, 93S-96S.
- Napoli, J.L. (1996) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**, S52-S62.
- Napoli, J.L. (1999) Interactions of retinoid proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1440**, 139-162.
- Nauta, W.J. y Feirtag, M. (1979) The organization of the brain. *Sci. Am.* **241**, 88-111.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Dräger, U.C., Chambon, P. y Dolle, P. (1997) Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **62**, 67-78.
- Noller, H.F., Green, R., Heilek, G., Hoffarth, V., Huttenhofer, A., Joseph, S., Lee, I., Lieberman, K., Mankin, A. y Merryman, C. (1995) Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem. Cell. Biol.* **73**, 997-1009.
- Norsten, C., Cronholm, T., Ekstrom, G., Handler, J.A., Thurman, R.G. y Ingelman-Sundberg, M. (1989) Dehydrogenase-dependent ethanol metabolism in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) lacking cytosolic alcohol dehydrogenase. Reversibility and isotope effects in vivo and in subcellular fractions. *J. Biol. Chem.* **264**, 5593-5597.
- Nosova, T., Jokelainen, K., Kaihovaara, P., Jousimies-Somer, H., Siitonen, A., Heine, R. y Salaspuro, M. (1996) Aldehyde dehydrogenase activity and acetate production by aerobic bacteria representing the normal flora of human large intestine. *Alcohol Alcohol.* **31**, 555-564.
- Okuda, A. y Okuda, K. (1983) Physiological function and kinetic mechanism of human liver alcohol dehydrogenase as 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258**, 2899-2905.
- de Oliveira, C., Cruz, A.R. y Goncalves, R.P. (1988) Effect of chronic alcoholism upon the parietal cells of the stomach of rats. *Anat. Anz.* **165**, 395-403.
- Oneta, C.M., Simanowski, U.A., Martínez, M., Allali-Hassani, A., Parés, X., Homann, N., Conradt, C., Waldherr, R., Fiehn, W., Coutelle, C. y Seitz, H.K. (1998) First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut* **43**, 612-619.
- Ong, D.E., Lucas, P.C., Kakkad, B. y Quick, T.C. (1991) Ontogeny of two vitamin A-metabolizing enzymes and two retinol-binding proteins present in the small intestine of the rat. *J. Lipid. Res.* **32**, 1521-1527.



## Bibliografía

- Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg, D. y Witztum, J.L. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1372-1376.
- Pandey, S., Blanks, J.C., Spee, C., Jiang, M. y Fong, H.K. (1994) Cytoplasmic retinal localization of an evolutionary homolog of the visual pigments. *Exp. Eye Res.* **58**, 605-613.
- Parés, X., Farrés, J. y Vallee, B.L. (1984) Organ specific alcohol metabolism: placental chi-ADH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 1047-1055.
- Parés, X. y Farrés, J. (1995) Alcohol and aldehyde dehydrogenases in the gastrointestinal tract. En: *Alcohol and the gastrointestinal tract*. (Preedy, V.R. y Watson, R.R., eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Parés, X., Martínez, S.E., Borrás, E., Martras, S., Rossell, A., Farrés, J., y Vaglenova, J. (2001) Distribution of ADH in human organs. Relevance for alcohol metabolism and pathology. En: *Alcohol in Health and Disease*. (Agarwal, D.P. y Seitz, H.K., eds), pp. 87-102. Marcel Dekker, New York, USA.
- Parés, X. Julià, P. y Farrés, J. (1985) Properties of rat retina alcohol dehydrogenase. *Alcohol* **2**, 43-46.
- Parés, X., Cederlund, E., Moreno, A., Hjelmqvist, L., Farrés, J. y Jörnvall, H. (1994) Mammalian class IV alcohol dehydrogenase (stomach alcohol dehydrogenase): Structure, origin, and correlation with enzymology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1893-1897.
- Paxinos, G. (1995) *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, USA.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition. Academic Press, Sydney.
- Pentney, R.J. (1993). Alterations in the structure of the cerebellum after long-term ethanol consumption. En: *Alcohol-induced brain damage: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph 22* (Hunt, W.A. y Nixon, S.J., eds), NIH publication 93-3548, pp. 249-276. NIAAA, Rockville, Maryland, USA.
- Peralba, J.M., Crosas, B., Martínez, S.E., Julià, P., Farrés, J. y Parés, X. (1999) Amphibian alcohol dehydrogenase. Purification and characterization of classes I and III from *Rana perezi*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 343-350.
- Peris, J., Anderson, K.J., Vickroy, T.W., King, M.A. y Walker, D.W. (1997) Neurochemical basis of disruption of hippocampal long term potentiation by chronic alcohol exposure *Front. Biosci.* **2**, d309-316.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B.-C., Lindahl, R. y Hempel, J. (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137-146.
- Pestalozzi, D.M., Bühler, R., von Wartburg, J.P. y Hess, M. (1983) Immunohistochemical localization of alcohol dehydrogenase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **85**, 1011-1016.
- Picklo, M.J., Olson, S.J., Markesbery, W.R. y Montine, T.J. (2001) Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer disease *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 686-695.
- Pietruszko, R. (1979) Nonethanol substrates of alcohol dehydrogenase. En: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol vol I* (Majchrowicz, E. y Noble, E.P., eds), pp 87-106. Plenum Press, New York, USA.
- Pietruszko, R., Crawford, K. y Lester, D. (1973) Comparison of substrate specificity of alcohol dehydrogenases from human liver, horse liver, and yeast towards saturated and 2-enoic alcohols and aldehydes. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 50-60.
- Pikkarainen PH, Salaspuro MP, Lieber CS. (1979) A method for the determination of "free" acetaldehyde in plasma. *Alcohol Clin Exp Res* **3**, 259-61.

- Pinazo-Durán, M.D., Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1993) Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. *Teratology* **48**, 305-322.
- Pinazo-Durán, M.D., Lindros, K.O., Renau-Piqueras, J. e Iborra, F.J. (1995) Localización de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial en la retina y coroides de la rata y su función en el catabolismo de los productos de la peroxidación lipídica. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **69**, 441-450.
- Pinazo-Durán, M.D., Verdejo, C., Montoliu, C. y Guerri, C. (1999) Formación de radicales libres en el globo ocular durante la intoxicación alcohólica crónica. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **5**,
- Popescu, G. y Napoli, J.L. (2000) Analysis of rat cytosolic 9-*cis*-retinol dehydrogenase activity and enzymatic characterization of rat ADHII. *Biochim. Biophys. Acta.* **1476**, 43-52.
- Pozzato, G., Moretti, M., Franzin, F., Croce, L.S., Lacchin, T., Benedetti, G., Sablich, R., Stebel, M. y Campanacci, L. (1995) Ethanol metabolism and aging: the role of "first pass metabolism" and gastric alcohol dehydrogenase activity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **50**, B135-B141.
- Promega (1992). cDNA synthesis using the Riboclone system. Protocol and Applications Guide, 2<sup>nd</sup> edition, 208-221.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. y Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18**, 4633-4644.
- Raff, M.C., Fields, K.L., Hakomori, S.I., Mirsky, R., Pruss, R.M. y Winter, J. (1979) Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* **174**, 283-308.
- Raner, G.M., Vaz, A.D. y Coon, M.J. (1996) Metabolism of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol. Pharmacol.* **49**, 515-522.
- Raskin, N.H. y Sokoloff, L. (1968) Brain alcohol dehydrogenase. *Science* **162**, 131-132.
- Raskin, N.H. y Sokoloff, L. (1972) Enzymes catalyzing ethanol metabolism in neural and somatic tissues of the rat. *J. Neurochem.* **19**, 273-282.
- Raskin, N.H. y Sokoloff, L. (1974) Changes in brain alcohol dehydrogenase activity during chronic ethanol ingestion and withdrawal. *J. Neurochem.* **22**, 427-434.
- Ray, W.J., Bain, G., Yao, M. y Gottlieb, D.I. (1997) CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J. Biol. Chem.* **272**, 18702-18708.
- Rich, A. y RajBhandary, U.L. (1976) Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 805-860.
- Rintala, J., Jaatinen, P., Parkkila, S., Sarviharju, M., Kiianmaa, K., Hervonen, A. y Niemela, O. (2000) Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol.* **35**, 458-463.
- Roberts, E.S., Vaz, A.D. y Coon, M.J. (1992) Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.* **41**, 427-433.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. y Reeves, H.C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Dräger, U.C. y De Luca, L.M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80**, 1021-1054.
- Rothman, K.J. (1980) The proportion of cancer attributable to alcohol consumption. *Prev. Med.* **9**, 174-179.

## Bibliografía

- Rubin, E., Rybak, B.J., Lindenbaum, J., Gerson, C.D., Walker, G. y Lieber, C.S. (1972) Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology* **63**, 801-814.
- Saari, J.C. (1999) Retinoids in mammalian vision. En: *Retinoids: The Biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action* (Nau, H y Blaner, W.S., eds), pp 565-588. Springer, Heidelberg, Germany.
- Salas, A., Panés, J. y Pique, J.M. (1999) Oxidative stress and gastrointestinal damage *Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 309-317.
- Salaspuro, M. (1996) Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications. *Ann. Med.* **28**, 195-200.
- Salaspuro, M. y Lindros, K. (1985) Metabolism and toxicity of acetaldehyde. En *Alcohol Related Diseases in Gastroenterology* (Seitz, H.K. and Kommerel, B., eds.), pp 106-123, Springer-Verlag, Berlin.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schaefer, W.H., Kakkad, B., Crow, J.A., Blair, I.A. y Ong, D.E. (1989) Purification, primary structure characterization, and cellular distribution of two forms of cellular retinol-binding protein, type II from adult rat small intestine. *J. Biol. Chem.* **264**, 4212-4221.
- Seitz, H.K., Simanowski, U.A., Garzon, F.T., Rideout, J.M., Peters, T.J., Koch, A., Berger, M.R., Einecke, H., Maiwald, M. (1990) Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology* **98**, 406-413.
- Seitz, H.K., Simanowski, U.A. y Osswald, B.R. (1992) Epidemiology and pathophysiology of ethanol-associated gastrointestinal cancer. *Pharmacogenetics* **2**, 278-287.
- Seitz, H.K., Egerer, G., Simanowski, U.A., Waldherr, R., Eckey, R., Agarwal, D.P., Goedde, H.W., y von Wartburg, J.P. (1993) Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, sex, and alcoholism. *Gut* **34**, 1433-1437.
- Seitz, H.K., Matsuzaki, S., Yokoyama, A., Homann, N., Vakevainen, S. y Wang, X.D. (2001) Alcohol and cancer. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 137S-143S.
- Sellin, S., Holmquist, B., Mannervik, B. y Vallee, B.L. (1991) Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **30**, 2514-2518.
- Shimozono, M., Townsend, J.C., Ilsen, P.F. y Bright, D.C. (1998) Acute vision loss resulting from complications of ethanol abuse. *J. Am. Optom. Assoc.* **69**, 293-303.
- Shyu, R.Y., Jiang, S.Y., Huang, S.L., Chang, T.C., Wu, K.L., Roffler, S.R. y Yeh, M.Y. (1995) Growth regulation by all-trans-retinoic acid and retinoic acid receptor messenger ribonucleic acids expression in gastric cancer cells. *Eur. J. Cancer.* **31A**, 237-243.
- Simanowski, U.A., Suter, P., Russell, R.M., Heller, M., Waldherr, R., Ward, R., Peters, T.J., Smith, D. y Seitz, H.K. (1994) Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* **35**, 1102-1106.
- Simanowski, U.A., Stickel, F., Maier, H., Gartner, U. y Seitz, H.K. (1995) Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* **12**, 111-115.
- Simanowski, U.A., Egerer, G., Oneta, C., Keil, T., Parés, X., Conradt, C., Arce, L., Waldherr, R., Stickel, F., Russell, R.M., Aderjan, R., Klee, F. y Seitz, H.K. (1998) Helicobacter pylori infection decreases gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism of ethanol in man. *Digestion* **59**, 314-320.

- Simon, A., Hellman, U., Wernstedt, C. y Eriksson, U. (1995) The retinal pigment epithelial-specific 11-*cis*-retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **270**, 1107-1112.
- Sippel, H.W. (1974) The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *J. Neurochem.* **23**, 451-452.
- Smith, M., Hopkinson, D.A. y Harris, H. (1971) Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann. Hum. Genet.* **34**, 251-271.
- Smith, J. y Steinemann, T.L. (2000) Vitamin A deficiency and the eye. *Int. Ophthalmol. Clin. Fall.* **40**, 83-91.
- Some, M., Beck, O. y Helander, A. (1997) Acute interaction between ethanol and serotonin metabolism in the rat. *Life Sci.* **61**, 577-583.
- Some, M., Svensson, S., Hoog, J.O. y Helander, A. (2000) Studies on the interaction between ethanol and serotonin metabolism in rat, using deuterated ethanol and 4-methylpyrazole. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 385-391.
- Sophos, N.A., Pappa, A., Ziegler, T.L. y Vasiliou, V. (2001) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 323-337.
- Srivastava, L.M., Vasisht, S., Agarwal, D.P. y Goedde, H.W. (1994) Relation between alcohol intake, lipoproteins and coronary heart disease: the interest continues. *Alcohol Alcohol.* **29**, 11-24.
- Stauber, R.E., Stepan, V., Trauner, M., Wilders-Truschnig, M., Leb, G. y Krejs, G.J. (1995) Evaluation of carbohydrate-deficient transferrin for detection of alcohol abuse in patients with liver dysfunction. *Alcohol Alcohol.* **30**, 171-176.
- Stoschitzky, K. (2000) Cardiovascular system. En: Handbook of alcoholism (Zernig, G., Saria, A., Kurz, M. y O'Malley, S.S., eds). CRC Press LLC, Boca raton, Florida, USA.
- Streissguth, A.P. y Martin, J.C. (1983) Prenatal effects of alcohol abuse in humans and laboratory animals. En: *The Pathogenesis of Alcoholism*. (Kissin, B. y Begleiter, H., eds.), pp 539-589. Plenum Press, New York, USA.
- Stromberg, P. y Höög, J.O. (2000) Human class V alcohol dehydrogenase (ADH5): A complex transcription unit generates C-terminal multiplicity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **278**, 544-549.
- Svensson, S., Stromberg, P. y Höög, J.O. (1999a) A novel subtype of class II alcohol dehydrogenase in rodents. Unique Pro(47) and Ser(182) modulates hydride transfer in the mouse enzyme. *J. Biol. Chem.* **274**, 29712-29719.
- Svensson, S., Some, M., Lundsjo, A., Helander, A., Cronholm, T. y Höög, J.O. (1999b) Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin. *Eur. J. Biochem.* **262**, 324-329.
- Szalai, G., Duester, G., Friedman, R., Jia, H., Lin, S., Roe, B.A. y Felder, M.R. (2002) Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *Eur. J. Biochem.* **269**, 224-232.
- Tabakoff, B. y Von Wartburg, J.P. (1975) Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **63**, 957-966.
- Takahashi, J., Palmer, T.D. y Gage, F.H. (1999) Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neuronal stem cell cultures. *J. Neurobiol.* **38**, 65-81.
- Terelius, Y., Norsten-Hoog, C., Cronholm, T. y Ingelman-Sundberg, M. (1991) Acetaldehyde as a substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 689-694.

## Bibliografía

- Teyler, T.J., Perkins, A.T. 4th y Harris, K.M. (1989) The development of long-term potentiation in hippocampus and neocortex. *Neuropsychologia* **27**, 31-39.
- Thomas, D.B. (1995) Alcohol as a cause of cancer. *Environ. Health Perspect.* **103**, 153-160.
- Thomas, J.D., Goodlett, C.R. y West, J.R. (1998) Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol exposure and correlates with motor performance. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **105**, 159-166.
- Tietjen, T.G., Mjaatvedt, C.H. y Yang, V.W. (1994) Cellular localization of the class I alcohol dehydrogenase transcript in adult rat tissues. *Histochem. J.* **26**, 526-532.
- Tillotson, L.G., Carter, E.A., Inui, K.I. y Isselbacher, K.J. (1981) Inhibition of Na<sup>+</sup>-stimulated glucose transport function and perturbation of intestinal microvillus membrane vesicles by ethanol and acetaldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**, 360-370.
- Tipton, K.F., Henehan, G. y Harrington, M. (1989) Cellular and intracellular distribution of aldehyde dehydrogenases. En: *Human metabolism of alcoholism* (Crow, K.E. y Batt, R.D., eds), pp. 105-116. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- [Todorovic, V., Koko, V., Varagic, J., Lackovic, V., Vuzevski, V. y Milin, J.](#) (1993) Effects of chronic ethanol administration on the serotonin-producing cells in rat gastric antral and duodenal mucosa. *Histol. Histopathol.* **8**, 285-296.
- Tolf, B.R., Dahlbom, R., Theorell, H. y Akesson, A. (1982) Synthetic inhibitors of alcohol dehydrogenase. Pyrazoles containing an unsaturated hydrocarbon residue in the 4-position. *Acta Chem. Scand. B.* **36**, 101-107.
- Tomita, S., Okuyama, E., Ohnishi, T y Ichikawa, Y. (1996) Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 273-281.
- Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF (1996) Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* **23**, 872-880.
- Uotila, L. y Koivusalo, M. (1989) Glutathione-dependent oxidoreductases: Formaldehyde dehydrogenase, coenzymes and cofactors. En: *Glutathione. Chemical, biochemical and medical aspects. Vol. III* (Dolphin, D., Poulson, R. y Avramovic, O., eds.) pp 517-551. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- Uotila, L. y Koivusalo, M. (1997) Expression of formaldehyde dehydrogenase and S-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 365-371.
- Vallee, B.L. y Bazzone, T.J. (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* **8**, 219-244.
- Van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F.H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* **2**, 266-270.
- Verdejo, C., Marco, P., Renau-Piqueras, J. y Pinazo-Durán, M.D. (1999) Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* **13**, 183-188.
- Veriac, S., Tisie, G. y Bone, C. (1993) Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* **56**, 85-88.
- von Wartburg, J.P., Bethune, J.L. y Vallee, B.L. (1964) Human liver-alcohol dehydrogenase. Kinetic and physicochemical properties. *Biochemistry* **3**, 1775-1782.
- Wagner FW, Burger AR y Vallee BL (1983) Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes. *Biochemistry* **22**, 1857-1863.

- Walker, D.W., King, M.A. y Hunter, B.E. (1993) Alterations in the structure of the hippocampus after long-term ethanol consumption. En: *Alcohol-induced brain damage: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph 22*, (Hunt, W.A. y Nixon, S.J., eds), NIH publication 93-3548, pp. 231-247. NIAAA, Rockville, Maryland, USA.
- Wang, J., Chai, X., Eriksson, U. y Napoli, J.L. (1999) Activity of human 11-*cis*-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *Biochem. J.* **338**, 23-27.
- Watson, P.E. (1989) Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals En: *Human Metabolism of Alcohol, vol. I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects and General Interest* (Crow, K.E. y Batt, R.D., eds), pp.41. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Werner, E.A. y Deluca, H.F. (2002) Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E672-E678.
- Westcott, G.L., Weiner, H., Shulz, J. y Myers, R.D. (1980) *In vivo* acetaldehyde in the rat brain of the rat treated with ethanol. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 411-417.
- Wheater P.R., Burkitt H.G. y Daniles, V.G. (1987) *Histología funcional: Texto y atlas en color*. Editorial JIMS, S.A., Barcelona, España.
- White, J.A., Beckett-Jones, B., Guo, Y.D., Dilworth, F.J., Bonasoro, J., Jones, G. y Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* **272**, 18538-18541.
- White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.P., Jones, G. y Petkovich, M. (2000) Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-*trans*-retinoic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 6403-6408.
- Whitfield, J.B. y Martin, N.G. (1993) Aversive reactions and alcohol use in Europeans. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 131-134.
- Wilkinson, D.G. y Nieto, M.A. (1993) Detection of messenger RNA by *in situ* hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* **225**, 361-373.
- Windholz, M. (1976) *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals and drugs*. Ninth edition. Meck y Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A.
- Wohl, C.A. y Weiss, S. (1998) Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J. Neurobiol.*, **37**, 281-290.
- Wolff, P.H. (1972) Ethnic differences in alcohol sensitivity. *Science* **175**, 449-450.
- Wolfla, C.E., Ross, R.A. y Crabb, D.W. (1988) Induction of alcohol dehydrogenase activity and mRNA in hepatoma cells by dexamethasone. *Arch. Biochem. Biophys.* **263**, 69-76.
- Worrall S, de Jersey J, Wilce PA, Seppa K, Hurme L, Sillanaukee P (1998) Comparison of carbohydrate-deficient transferrin, immunoglobulin A antibodies reactive with acetaldehyde-modified protein and acetaldehyde-modified albumin with conventional markers of alcohol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1921-1926.
- Wyss, A., Wirtz, G.M., Woggon, W.D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Riss, G., Bachmann, H., y Hunziker, W. (2001) Expression pattern and localization of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochem. J.* **354**, 521-529.
- Yamamoto, H., Simon, A., Eriksson, U., Harris, E., Berson, E.L. y Dryja, T.P. (1999) Mutations in the gene encoding 11-*cis* retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat. Genet.* **22**, 188-191.

## Bibliografía

- Yamamoto, M., McCaffery, P. y Dräger, C.U. (1996). Influence of choroid plexus on cerebellar development: analysis of retinoic acid synthesis. *Dev. Brain Research*. **9**, 182-190.
- Yamamoto, M., Dräger, U.C., Ong, D.E. y McCaffery, P. (1998) Retinoid-binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis and degradation. *Eur. J. Biochem.* **257**, 344-350.
- Yang, Z.-N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.-K. y Bosron, W.F. (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenase for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 587-591.
- Yang, M. y Fong, H.K. (2002) Synthesis of the all-*trans*-retinal chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin in cultured pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 3318-3324.
- Yasunami, M., Chen, C.S. y Yoshida, A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7610-7614.
- Yin, S.J., Wang, M.F., Liao, C.S., Chen, C.M., y Wu, C.W. (1990) Identification of a human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochem. Int.* **22**, 829-835.
- Yin, S.J., Wang, S.L., Liao, C.S. y Jörnvall, H. (1993) Human high- $K_m$  aldehyde dehydrogenase (ALDH3): molecular, kinetic and structural features. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 87-98.
- Yin, S.J., Liao, C.S., Lee, Y.C., Wu, C.W. y Jao, S.W. (1994) Genetic polymorphism and activities of human colon alcohol and aldehyde dehydrogenases: no gender and age differences. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 1256-1260.
- Yin, S.J., Liao, C.S., Wu, C.W., Li, T.T., Chen, L.L., Lai, C.L. y Tsao, T.Y. (1997) Human stomach alcohol and aldehyde dehydrogenases: comparison of expression pattern and activities in alimentary tract. *Gastroenterology* **112**, 766-775.
- Yokoyama, H., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1995) Upstream structure of human ADH7 gene and the organ distribution of its expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 216-222.
- Yokoyama, H., Matsumoto, M., Shiraiishi, H., Miyagi, M., Kato And, S. y Ishii, H. (2001) Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent retinoic acid formation from retinol in the human gastric mucosa: inhibition by ethanol, acetaldehyde, and H2 blockers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 24S-28S.
- Zachman, R.D. y Grummer, M.A. (1998) The interaction of ethanol and vitamin A as a potential mechanism for the pathogenesis of Fetal Alcohol syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1544-1556.
- Zeiner, A.R., Paredes, A. y Christensen, H.D. (1979) The role of acetaldehyde in mediating reactivity to an acute dose of ethanol among different racial groups. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **3**, 11-18.
- Zetterström, R.H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T. y Olson, L. (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid-binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 407-416.
- Zetterström, R.H., Simon, A., Giacobini, M.M., Eriksson, U. y Olson, L. (1994) Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neurosci.* **62**, 899-918.
- Zgombic-Knight, M. y Duester, G. (1993) DNA elements mediating retinoid and thyroid hormone regulation of alcohol dehydrogenase gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 571-580.
- Zgombic-Knight, M., Ang, H.L., Foglio, M.H. y Duester, G. (1995a) Cloning of the mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) cDNA and tissue-specific expression pattern of the murine ADH gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 10868-10877.
- Zgombic-Knight, M., Foglio, M.H. y Duester, G. (1995b) Genomic structure and expression of the ADH7 gene encoding human class IV alcohol dehydrogenase, the form most efficient for retinol metabolism in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**, 4305-4311.

- Zgombic-Knight, M., Deltour, L., Haselbeck, R.J., Foglio, M.H. y Duester, G. (1997) Gene structure and promoter for Adh3 encoding mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase). *Genomics* **41**, 105-109.
- Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K.J., Neve, R.L., Hogan, P., Chin, W.W. y Dräger, U.C. (1996) Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **240**, 15-22.
- Zheng, Y.W., Bey, M., Liu, H. y Felder, M.R. (1993) Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of a possible new enzyme class. *J. Biol. Chem.* **268**, 24933-24939.
- Zimatkin, S.M. (1991) Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J. Neurochem.* **56**, 1-11.
- Zimatkin, S.M., Rout, U.K., Kouvasalo, M., Bühler, R. y Lindros, K.O. (1992) Regional distribution of low-K<sub>m</sub> mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **16**, 1162-1167.
- Zimatkin, S.M. y Lindros, K.O. (1996) Distribution of catalase in rat brain: Aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol.* **31**, 167-174.
- Zimatkin, S.M. y Deitrich, R.A. (1995) Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **19**, 1300-1306.
- Zimatkin, S.M. y Deitrich, R.A. (1997) Ethanol metabolism in the brain. *Addict. Biol.* **2**, 387-399.