
Daño hepático producido por el alcohol: perspectivas terapéuticas con bloqueantes de la entrada de calcio

Liver damage produced by alcohol: therapeutic perspectives with calcium blockers

E. Cenarruzabeitia¹, A. Cobreros¹, L. Sainz²

INTRODUCCIÓN

El alcohol es por sí mismo un directo hepatotóxico¹ y también puede aumentar la hepatotoxicidad de una gran variedad de otras sustancias² de modo que bajas dosis de hepatotoxinas ambientales, junto con una ingestión continuada de alcohol, pueden llevar a una lesión hepática crónica. Aunque se han realizado importantes progresos, no se han logrado remedios definitivos en el tratamiento del daño hepático producido por el alcohol. Es por ello obvio que cualquier investigación que pueda suponer una aportación terapéutica en este campo tiene un gran interés. En este sentido en los últimos años se está prestando atención al papel protector de los bloqueantes de los canales de calcio como diltiazem, nifedipina y verapamil, en diversos tejidos^{3,4}. Es bien conocida la general implicación del ion calcio en la regulación de numerosos procesos patológicos y tóxicos. Una alteración en la homeostasis del calcio que conduzca a un incremento sostenido del nivel citosólico de este catión se ha asociado con citotoxicidad en respuesta a una variedad de agen-

tes en diferentes tipos celulares^{5,6}. La célula hepática también es sensible a este tipo de alteración. Una de las hipótesis postuladas para explicar la etapa clave que sigue a la agresión hepática es el papel esencial que juega la entrada de calcio a la célula de modo que el daño celular inducido, es dependiente de la entrada de calcio en el hepatocito⁷.

Partiendo de estos precedentes se postuló que, agentes que actúan disminuyendo la permeabilidad al calcio pueden proteger al hepatocito y que los bloqueantes de la entrada de calcio, al disminuir la entrada de este catión, pueden reducir las consecuencias que se derivan de la perturbación en su regulación. También se ha indicado que estos fármacos pueden tener un efecto citoprotector independiente del bloqueo de los canales de calcio. En esta línea de investigación varias publicaciones señalan el efecto beneficioso de nifedipina y verapamil en la necrosis centrolobular en hígado de rata, en situaciones de isquemia experimental⁵. Asimismo se ha postulado, que estos fármacos podrían tener un efecto beneficioso en el daño hepático

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 47-55.

1. Departamento de Farmacología. Universidad de Navarra.
2. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Pública de Navarra.

inducido por el alcohol⁸. En función de las consideraciones precedentes hemos investigado el papel beneficioso que pueden tener verapamil, nifedipina y diltiazem, cabezas de serie de los grupos terapéuticos de antagonistas de calcio más empleados, sobre el daño hepático inducido por el alcohol.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* se han realizado empleando suspensiones de hepatocitos aislados de rata mediante el método de Seglen. Para la determinación del Ca²⁺ intracelular, [Ca²⁺]_i, se cultivaron los hepatocitos durante 24 horas antes de comenzar el experimento. Se eligieron las concentraciones de etanol de 300 y 500 mM y el tiempo de incubación de 45 min como condiciones experimentales adecuadas para los estudios de citoprotección. Los bloqueantes de los canales de calcio, se añadieron a las suspensiones de hepatocitos 30 min antes de la adición del tóxico y a dos concentraciones distintas: 25 y 50 μM cada uno de ellos.

Se ha valorado:

- Actividades ALT, AST y LDH, mediante la valoración automática en un analizador Hitachi 704.
- Peroxidación lipídica⁹.
- Glutación intracelular (GSH)¹⁰.
- Calcio intracelular [Ca²⁺]_i, mediante el empleo de un autoanalizador de imagen (Magiscan), asociado a un programa informático para el cálculo de las concentraciones de Ca²⁺ a partir de los datos de emisión de fluorescencia y usando Fura-2 AM como fluorocromo.

Estudios *in vivo*. Intoxicación etílica aguda

Se han utilizado ratas macho, raza Wistar de 200-250 g de peso, procedentes de nuestro criadero. La administración de los antagonistas se ha realizado siguiendo tres pautas distintas, que diferían en los tiempos de administración de los productos así

como en el tiempo de sacrificio de los animales.

Los antagonistas del calcio se administraron a dosis de 20 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal, de acuerdo con las pautas ya establecidas. Como vehículo se utilizó suero fisiológico. El etanol se administró por vía oral, a la dosis de 6 g/Kg de peso, diluido con agua al 50% (v/v). A los animales control se les administró una solución de sacarosa isocalórica. Para cada ensayo fueron empleados un mínimo de seis animales por grupo de tratamiento.

Se ha determinado:

Actividad sérica de ALAT, ASAT y LDH, albúmina sérica; colesterol y triglicéridos hepáticos y glucosa sérica (autoanalizador Hitachi 704). Proteínas hepáticas por el método de Lowry¹¹; peroxidación lipídica por el método de Buege y glutación (GSH) hepático¹².

Estudios *in vivo*. Intoxicación etílica crónica

Se emplearon ratas macho, Wistar de 185±10g de peso inicial. El etanol se administró durante 45 días, empleando la dieta semilíquida de Lieber-De Carli (dieta control y etanol), que aporta el etanol como el 36% de las calorías totales. Los antagonistas de calcio se administraron diariamente (a partir del día 21) por vía oral, a la dosis de 20 mg/Kg. Inicialmente, durante 7 días, se procedió al acondicionamiento de los animales y para ello se administró a todos ellos la dieta control, carente de etanol. Posteriormente, los animales fueron distribuidos en 5 grupos en función del tratamiento recibido. Para cada grupo fue empleado un número inicial de 8 animales. Tras 45 días, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación y posterior extracción y congelación del hígado en nitrógeno líquido. Asimismo, se recogieron muestras de sangre para las posteriores determinaciones bioquímicas en suero.

Se ha determinado:

Peroxidación lipídica por el método de Buege⁹; glucógeno hepático por el método de McGarry y col.¹³; glutación (GSH) hepático¹²; Velocidad de Síntesis Proteica (Ks)¹⁴;

triglicéridos y colesterol hepáticos, así como la Actividad Sérica Lactato Deshidrogenasa (autoanalizador Hitachi 704). Estudios histológicos.

RESULTADOS

Efecto citoprotector de los bloqueantes de los canales de calcio en hepatocitos aislados de rata

Reinlib y col.¹⁷ observaron que en la adición extracelular de distintas concentraciones de etanol provocaba un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el hepatocito, por lo que nosotros realizamos unos experimentos iniciales con el fin de comprobar que realmente el etanol a concentraciones de 500 y 300 mM originaba un aumento del calcio intracelular en nuestras condiciones experimentales. Se observó que efectivamente este incremento tenía lugar en nuestras células.

Con el fin de seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para los estudios de citoprotección, se realizó un ensayo preliminar en el que los hepatocitos fueron expuestos a concentraciones crecientes de etanol durante distintos tiempos. El daño celular originado por el tóxico fue cuantificado mediante la determinación de las actividades enzimáticas ALT, AST y LDH en el medio de incubación. Tras establecer las concentraciones de etanol de 500 y 300 mM y el tiempo de incubación de 55 min como condiciones experimentales, se procedió al estudio del efecto protector de verapamil, nifedipina y diltiazem en suspensiones de hepatocitos intoxicados con etanol. Se determinó la liberación de enzimas (ALT, AST y LDH) al medio de incubación, así como el nivel de glutatión reducido (GSH) y la peroxidación lipídica en los distintos grupos experimentales.

El etanol, tanto a concentración de 300 como 500 mM, originó un aumento muy significativo en la liberación de ALT, AST y LDH al medio. También se observó un aumento en la peroxidación lipídica acompañado de una significativa deplección del GSH intracelular, como consecuencia de la adición de etanol al medio de incubación.

Citoprotección frente a etanol 300 mM

Cuando el etanol se añadía a la concentración de 300 mM, verapamil y nifedipina mostraron su máximo efecto a bajas concentraciones (25 μ M), reduciendo la liberación de ALT, AST y LDH en un 21, 29 y 23% respectivamente para verapamil y un 38, 29 y 37% para nifedipina. Sin embargo, diltiazem exhibió un efecto mayor cuando se añadía a la mayor concentración (50 μ M), reduciendo dichas actividades en un 21, 41 y 16% respectivamente. Nifedipina (50 μ M) y diltiazem (25 μ M) redujeron de forma significativa el aumento de la peroxidación lipídica originado por el etanol. Verapamil también mostró cierta reducción, si bien ésta no fue significativa. Ninguno de los tres antagonistas de calcio fue capaz de revertir la deplección de GSH originada por etanol 300 mM. La figura 1 muestra el efecto de verapamil, nifedipina y diltiazem frente al aumento de la peroxidación lipídica (A), la deplección de GSH intracelular (B) y la liberación de LDH (C), provocado por el etanol 300 mM.

Citoprotección frente a etanol 500 mM

Al igual que en el caso anterior, el etanol añadido a la concentración de 500 mM originó un gran aumento en las actividades enzimáticas ALT, AST y LDH. Verapamil y diltiazem mostraron mayor eficacia a concentraciones superiores (50 μ M), reduciendo la liberación de ALT, AST y LDH en un 23, 16 y 23% respectivamente para verapamil y en un 33, 28 y 35% para diltiazem. Por el contrario, nifedipina seguía presentando un efecto mayor cuando se añadía a la concentración de 25 μ M, mostrando una reducción del 23% para ALT, 10% para AST y 16% para LDH. El incremento en la peroxidación lipídica originado por el etanol, fue revertido por nifedipina a las dos concentraciones ensayadas (25 y 50 μ M). Diltiazem fue el único de los tres antagonistas ensayados capaz de preservar el contenido celular de GSH.

Efecto hepatoprotector de los antagonistas de calcio frente a la intoxicación etílica aguda

Inicialmente se ensayaron 3 pautas de administración distintas según lo indicado

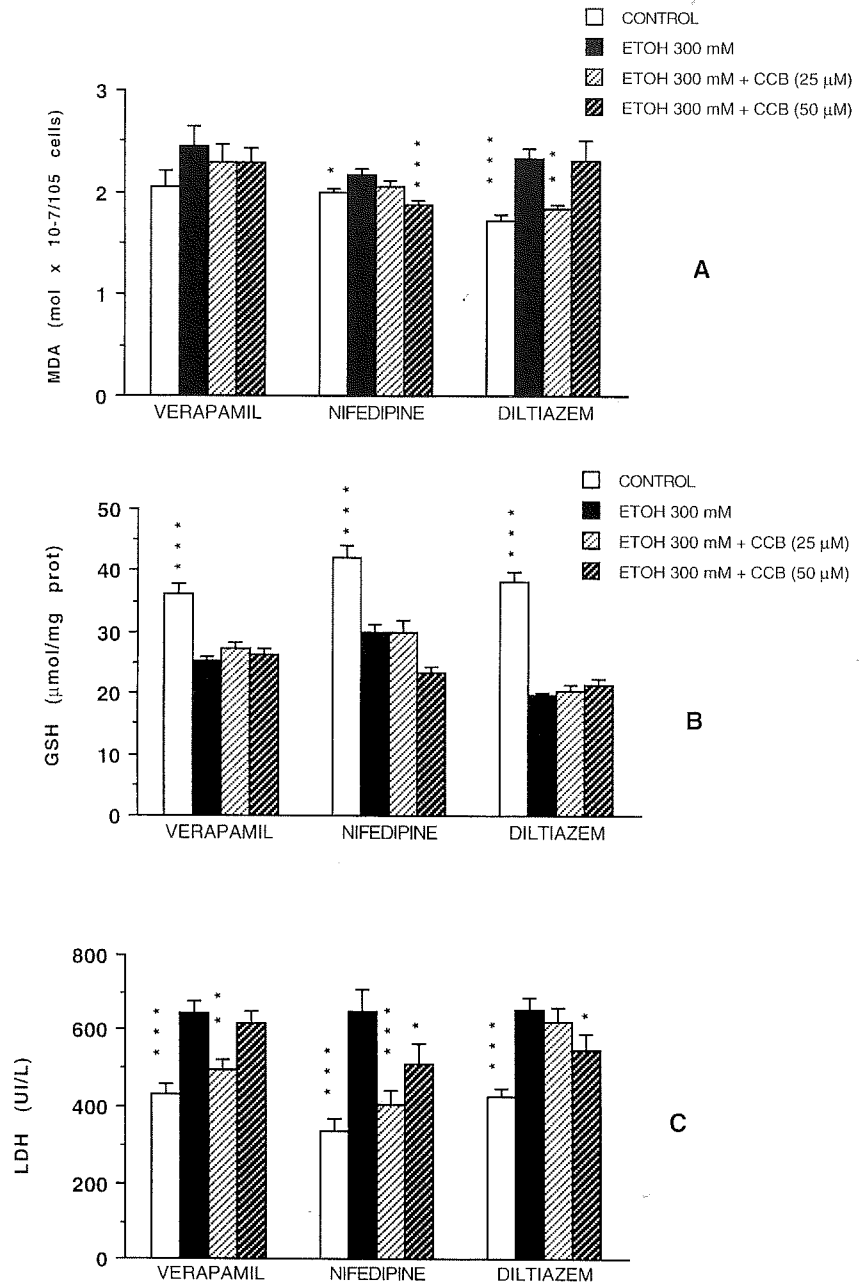


Figura 1. Efecto de verapamil, nifedipina y diltiazem (25 y 50 μM), frente al aumento de la peroxidación lipídica (A), la depleción de GSH (B) y la liberación de LDH (C) originada por el etanol, en suspensiones de hepatocitos. Según Fisher PLSD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Probabilidad frente al grupo etanol.

en el apartado de material y métodos. Tras el análisis de los resultados obtenidos, se observó que la pauta más adecuada para el estudio del efecto hepatoprotector de los bloqueantes de los canales de calcio, era aquella en la que dichos fármacos son administrados 1 h antes de la administración del etanol, sacrificando los animales 6 h des-

pués. Los resultados obtenidos siguiendo esta pauta, se muestran en la tabla 1.

El etanol originó un aumento muy significativo en la actividad sérica LDH. Diltiazem y verapamil fueron capaces de reducir dicho incremento. De la misma forma, también se observó un aumento en el conteni-

Tabla 1. Efecto de verapamil, nifedipina y diltiazem sobre diversos parámetros hepáticos tras la intoxicación aguda (pauta c) y crónica por etanol.

INTOXICACIÓN AGUDA

	CONTROL	ETANOL	VERAPAMIL + ETOH	NIFEDIPINA + ETOH	DILTIAZEM + ETOH
Proteínas (mg prot / g tej)	153 ± 0,01	167 ± 0,01	157 ± 0,004	161 ± 0,005	164 ± 0,71
Peroxidación (µmol MDA / g prot)	26,6 ± 0,08 *	32,2 ± 0,19	28,6 ± 0,21	33,2 ± 0,11	29,2 ± 0,18
Triglicéridos (mg / g tejido)	5,63 ± 0,40 **	10,23 ± 0,40	7,44 ± 0,43 **	8,73 ± 0,89	7,99 ± 0,66 **
Glutación (GSH) (mg / g tejido)	0,40 ± 0,02 *	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,40 ± 0,06 *	0,39 ± 0,02 *
Glucosa sérica (mg / dl)	179,2 ± 6,28	178,3 ± 18,4	162,5 ± 12,3	150,0 ± 5,23	162,4 ± 13,2
LDH (UI / L)	402,4 ± 41 **	1029,2 ± 129	657,8 ± 153 *	836,8 ± 187	570,75 ± 46 **

INTOXICACIÓN CRÓNICA

	CONTROL	ETANOL	VERAPAMIL + ETOH	NIFEDIPINA + ETOH	DILTIAZEM + ETOH
LDH (UI / L)	863,5 ± 88,7 *	1335,8 ± 101	1292,5 ± 109	1376,6 ± 181	965,4 ± 50,9 *
Peso Hígado (g)	8,07 ± 0,08 ***	10,50 ± 0,41	11,74 ± 0,55	11,40 ± 0,54	11,19 ± 0,51
Triglicéridos (mg / g tej)	33,3 ± 4,18 ***	193,8 ± 32,1	190,8 ± 20,9	189,5 ± 17,7	188,3 ± 16,2
Peroxidación (µmol MDA / g prot)	34,2 ± 0,16 **	42,8 ± 0,34	32,4 ± 0,14 **	32,5 ± 0,19 **	30,2 ± 0,17 ***
GSH (mg / g tej)	1,45 ± 0,06 *	1,25 ± 0,05	1,20 ± 0,09	1,33 ± 0,06	1,57 ± 0,07 **
Glucógeno (mg / 100 mg tej)	1,26 ± 0,09 ***	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,22 ± 0,02	1,21 ± 0,13 ***
Ks (% renov / día)	39,1 ± 3,65 ***	23,2 ± 2,53	21,2 ± 1,57	18,1 ± 1,53	32,3 ± 3,82 *

Según Fisher PLSD. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Probabilidad frente al grupo etanol.

do hepático de triglicéridos en aquellos animales intoxicados con etanol. De nuevo verapamil y diltiazem fueron los antagonistas más efectivos reduciendo la acumulación de triglicéridos hepáticos. No se encontraron diferencias significativas en el contenido hepático de proteínas ni en el nivel de glucosa en sangre, entre los distintos grupos experimentales; sin embargo, se hizo patente un incremento en la peroxidación lipídica acompañado de una deplección del GSH hepático en los animales intoxicados. Nifedipina y diltiazem mostraron un efecto protector, conservando los niveles de GSH. Por el contrario, ninguno de los tres bloqueantes de los canales de calcio ensayados fue capaz de revertir el incremento de la peroxidación lipídica originado por la administración de etanol, si bien verapamil y diltiazem mostraron cierta tendencia a reducir dicho aumento.

Efecto hepatoprotector de los antagonistas de calcio frente a la intoxicación ética crónica

La intoxicación ética crónica se realizó empleando la dieta semilíquida de Lieber-De Carli y según el protocolo expuesto en el apartado de material y métodos. Los resultados más significativos, se muestran en la tabla 1.

El peso del hígado de los animales intoxicados crónicamente con etanol era significativamente mayor que el de los animales del grupo control. Del mismo modo, se observó un aumento muy significativo de los triglicéridos hepáticos que estaba acompañado por un incremento proporcional del nivel de colesterol como consecuencia de la ingesta continuada de etanol. Ninguno de los tres bloqueantes de los canales de calcio ensayados fue capaz de reducir esta acumulación de grasa en el hígado.

El etanol administrado de forma crónica originó un aumento muy significativo en la peroxidación lipídica, que como cabía esperar, iba acompañado de una deplección en el contenido hepático de GSH. Nifedipina, verapamil y diltiazem revirtieron el incremento en la peroxidación; sin embargo, únicamente aquellos animales tratados

con diltiazem presentaron unos niveles de GSH similares a los del grupo control. El contenido hepático en glucógeno también disminuyó sensiblemente como consecuencia de la ingestión crónica de etanol. De nuevo diltiazem se mostró como el antagonista de calcio más eficaz, restaurando el nivel de glucógeno hepático.

La ingesta continuada de alcohol provocó una disminución muy significativa en la velocidad de síntesis proteica, si bien no se observaron diferencias en el contenido hepático de proteínas entre los distintos grupos experimentales. Diltiazem volvió a resultar el antagonista más eficaz, aumentando significativamente la velocidad de síntesis proteica. La actividad sérica LDH aumentó significativamente en los animales intoxicados. Al igual que lo ocurrido con otros parámetros, los animales tratados con diltiazem presentaron unos niveles de LDH en sangre significativamente menores que los del grupo intoxicado con etanol. Los niveles de albúmina y lucosa en sangre no mostraron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

El estudio histológico confirmó lo que ya habíamos observado mediante la determinación de algunos parámetros hepáticos, revelando la existencia de esteatosis en el hígado de las ratas intoxicadas crónicamente con etanol.

DISCUSIÓN

El etanol, sustancia psicoactiva, es fundamentalmente un depresor del SNC. Tiene gran importancia farmacológica debido a la multiplicidad de sus acciones biológicas y por su capacidad adictogénica, lo que hace del alcoholismo un grave problema social.

El etanol es capaz de producir una serie de alteraciones a corto y a largo plazo sobre la fisiología humana. Los efectos más notorios a corto plazo ocurren a nivel de SNC, mientras que a largo plazo el alcohol produce alteraciones en varios tejidos, destacando el hígado, órgano donde se metaboliza más del 90% del etanol ingerido. La metabolización del etanol produce alteraciones celulares que conducen a un daño hepático y, en casos de abuso, a cirrosis hepática, siendo ésta la

principal causa de muerte entre los alcohólicos. Leblach demostró una relación directa dosis-respuesta entre la cantidad de alcohol consumida y la incidencia de cirrosis en el hígado¹⁵.

El acetaldehído producido en la primera oxidación del etanol es una sustancia altamente reactiva, atribuyéndosele gran parte de los efectos tóxicos del etanol por diferentes mecanismos. Produce una disminución de la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, aumenta la peroxidación lipídica, disminuye la concentración de GSH (conocido protector frente a fenómenos oxidativos) y produce alteraciones en los grupos -SH de diversas enzimas, inactivándolos y conduciendo a una disminución del transporte de proteínas, quedando éstas retenidas en el hepatocito, produciendo en último término hepatomegalia. En una segunda oxidación el acetaldehído, en presencia de aldehído-deshidrogenasa, se convierte en acetato, el cual libera adenosina con la consiguiente vasodilatación y aumento en el consumo de oxígeno celular ya iniciado por la presencia de NADH generado en las dos oxidaciones.

El propio etanol, sin un metabolismo previo, es capaz de producir daño celular por interacción directa con las membranas lipídicas, afectando los mecanismos de transducción ligados a receptor, lo que lleva a una activación de los enzimas acoplados a ellos (adenilatociclasa, fosfolipasa C y fosfolipasa D) con el consiguiente aumento del calcio intracelular¹⁶. Reinlib y col.¹⁷ observaron que la adición extracelular de distintas concentraciones de etanol provocaba un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el hepatocito, por lo que se pensó que los bloqueantes de los canales de calcio, al disminuir la concentración intracelular de este catión, podrían tener un efecto beneficioso frente al daño hepático inducido por el alcohol.

En nuestro trabajo, se ha estudiado la actividad hepatoprotectora de los bloqueantes de canales de calcio verapamil, nifedipina y diltiazem en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente determinamos la $[Ca^{2+}]_i$ en nuestras células, tanto en condiciones basales (para asegurar una concentración

de calcio aceptable, entre 50 y 200 nm) como en presencia de etanol 300 y 500 mM para comprobar que, efectivamente, nuestras células respondían con un aumento del calcio citosólico tras la adición de etanol al medio. Cuando la célula se pone en contacto con el tóxico, se induce toda una serie de cambios morfológicos que van a provocar un daño celular puesto de manifiesto por un incremento en la liberación de enzimas intracelulares ALT, AST y LDH¹⁸. Verapamil, nifedipina y diltiazem fueron capaces de reducir la liberación de enzimas al medio de incubación. En este sentido, en los estudios *in vivo* también se observó un aumento en la actividad sérica LDH. Diltiazem fue especialmente eficaz reduciendo dicha actividad sérica.

El daño hepatocelular causado por el etanol también se pone de manifiesto por un aumento de la peroxidación lipídica y una deplección de GSH. Estas alteraciones lógicamente son más pausibles en los modelos *in vivo* y más concretamente en el caso de la intoxicación crónica. Nifedipina, verapamil y diltiazem fueron capaces de revertir completamente el aumento en la peroxidación lipídica originado por la ingesta continuada de etanol. Respecto a la deplección de GSH, se observó una tendencia en los tres antagonistas a aumentar los niveles de este protector hepático, si bien sólo se observó una restauración completa del GSH en aquellos animales tratados con diltiazem.

Este estudio, apoya la idea de Thurman y col.⁸ que sugirieron que los bloqueantes de los canales de calcio podrían proteger el hígado frente al daño provocado por etanol. El mecanismo exacto por el cual los antagonistas de calcio previenen el daño hepático originado por el etanol no está claro. El bloqueo de la entrada de calcio no es el único efecto citoprotector atribuido a estos fármacos, sino que se han postulado otras acciones que contribuirían a dicha protección: un efecto estabilizador de membranas¹⁹, la preservación de la función y ultraestructura mitocondrial²⁰, la prevención de la desorganización lisosomal, un aumento del flujo sanguíneo en diversos órganos²¹, así como un efecto antiperoxidante^{5,22}. Nuestros resultados apoyan la idea de que el efecto protector de los blo-

queantes de los canales de calcio frente al daño hepático inducido por etanol no ocurre por un único mecanismo.

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son las siguientes:

1. En estudios *in vitro* en hepatocitos aislados de rata, el etanol a concentraciones de 300 y 500 mM, produce un aumento de la concentración intracelular de calcio libre y un efecto citotóxico que se manifiesta en el incremento de la actividad transaminasa (ALT, AST) y lactato deshidrogenasa (LDH). También origina una deplección de glutatión (GSH) intracelular así como un incremento en la peroxidación lipídica.

2. Cuando el etanol se añade a concentración 300 mM, verapamil y nifedipina ejercen un efecto citoprotector reduciendo la liberación de enzimas ALT, AST y LDH, si dichos fármacos son añadidos a la menor concentración ensayada (25 μ M). Diltiazem también mostró este efecto protector siendo más eficaz a la concentración de 50 μ M.

Nifedipina (50 μ M) y diltiazem (25 μ M) reducen de forma significativa el incremento de la peroxidación lipídica originada por etanol 300 mM.

3. Verapamil y diltiazem, a concentración 50 μ M, ejercen un efecto citoprotector reduciendo las actividades enzimáticas ALT, AST y LDH en hepatocitos intoxicados con etanol 500 mM. Nifedipina sigue presentando un efecto mayor cuando es añadida a concentración 25 μ M.

El incremento de la peroxidación lipídica originado por etanol 500 mM es revertido por nifedipina a las dos concentraciones ensayadas (25 y 50 μ M). Diltiazem es el único de los bloqueantes de los canales de calcio ensayados capaz de prevenir la deplección de GSH.

4. En estudios *in vivo*, la administración de una única dosis de etanol, produce un cuadro hepatotóxico caracterizado por un aumento de los triglicéridos hepáticos, peroxidación lipídica y actividad sérica LDH y por una disminución del contenido hepático de glutatión (GSH).

De las tres pautas de tratamiento ensayadas en la intoxicación etílica aguda, la más eficaz resulta ser aquella en la que los

bloqueantes de los canales de calcio son administrados una sola vez, una hora antes de la administración de etanol, sacrificando los animales 6 h después. En estas condiciones, diltiazem parece ser el antagonista más eficaz, reduciendo significativamente el nivel de triglicéridos hepáticos así como la actividad sérica LDH. Asimismo diltiazem es capaz de prevenir la deplección de glutatión originada tras la administración de una única dosis de etanol. Verapamil es eficaz frente al aumento de los triglicéridos hepáticos y de la actividad sérica LDH, mientras que nifedipina es capaz de preservar el nivel hepático de GSH.

5. Se comprueba la validez de la dieta semilíquida de Lieber-De Carli como modelo experimental para reproducir el daño hepático causado por la ingesta crónica de etanol. Así, el cuadro de lesión hepática se caracteriza por un aumento significativo de la actividad sérica transaminasa (ALT, AST) y lactato deshidrogenasa (LDH), deplección de glucógeno y glutatión hepático, incremento de la peroxidación lipídica y del contenido hepático de triglicéridos así como disminución de la velocidad de síntesis proteica. Diltiazem aparece de nuevo como el más eficaz de los tres antagonistas de calcio ensayados, ejerciendo un claro efecto hepatoprotector al revertir significativamente el aumento en la actividad LDH; recuperar el contenido en glucógeno y GSH hepático, disminuir la peroxidación lipídica e incrementar la velocidad de síntesis proteica.

6. Estos resultados sugieren que verapamil, nifedipina y diltiazem ejercen un efecto citoprotector en hepatocitos aislados de rata intoxicados con etanol. Los estudios *in vivo* muestran a diltiazem como el antagonista de calcio más eficaz, disminuyendo el daño hepático provocado por la administración de alcohol tanto de forma aguda como crónica, manifestándose este hecho en la recuperación de diversos parámetros hepáticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. LIEBER CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 1994; 106: 1085-1105.

2. WANG PY, KANEKO T, TSUKADA H, SATO A. Dose and route dependency of metabolism and toxicity of chloroform in ethanol-treated rats. *Arch Toxicol* 1994; 69: 18-23.
3. ROMERO G, LASHERAS B, SAINZ L, CENARRUZABEITIA E. Protective effects of calcium channel blockers in carbon tetrachloride-induced liver toxicity. *Life Sciences* 1994; 55: 981-990.
4. SATORRES J, PÉREZ-MATEO M, MAYOL MJ, ESTEBAN A, GRAELLS ML. Protective effect of diltiazem against acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Liver* 1995; 15: 16-19.
5. LANDON EJ, NAUKAM RJ, SASTRY BVR. Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem Pharmacol* 1985; 35: 697-705.
6. LEMASTERS JJ, DI GIUSEPPI J, NIEMINEN AL, HERMAN B. BLEBBING free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 1987; 325: 78-81.
7. THOMAS CE, REED DJ. CURRENT status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989; 10: 375-384.
8. THURMAN RG, APEL E, BADR M, LEMASTERS JL. Protection of liver by calcium entry blockers. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 522: 757-770.
9. BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-307.
10. HISSIN PT, HILF RA. Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 34: 214-226.
11. LOWRY OH, ROSEBROUGH NI, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
12. ELLMAN GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
13. MCGARRY ID, KAWAJIMA M. From dietary glucose to liver glycogen, the full cycle round. *Ann Rev Nutr* 1987; 7: 51-73.
14. MARTÍNEZ JA. Validation of a fast, simple and reliable method to assess protein synthesis in individual tissues by intraperitoneal injection of a flooding dose of 3H-Phenylalanine. *J Biochem Biophys Methods* 1989; 349-354.
15. LELBACH WK. En: *Alcohol Liver Pathology*. Khanna JM eds. Addiction Research Foundation. Ontario. Canada; 1-18.
16. HOEK JB. Ethanol and signal transduction in the liver. *Faseb J* 1992; 6: 2386-2396.
17. REINLIB L, AKINSHOLA E, POTTER JJ, MEZEY E. Ethanol-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ and inositol (1,4,5) triphosphate in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 774-780.
18. KAMIMURA S, GAAL K, BRITTON RS. Increased 4-hydroxynonenal levels in alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1992; 16: 448-453.
19. MICHAEL AD, WHITING RL. Cellular action of nifedipine. *Am J Cardiol* 1989; 64: 3H-7H.
20. MATSUDA S. Protective effects of calcium antagonist (Nitrendipine) on calcium ionophore A 23187-induced liver cell injury. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1991; 38: 35-44.
21. SHINOHARA M, KAYASHIMA K, KOMORI K. Protective effects of verapamil on ischemia induced hepatic damage in the rat. *Eur Surg Res* 1990; 22: 256-262.
22. BURKE TJ, ARNOLD PE, GORDON JA, BULGER RE, DOBYAN DC, SCHRIER RW. Protective effects of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischaemia. Functional, morphological, and mitochondria studies. *J Clin Invest* 1984; 74: 1830-1841.