

## EFFECTO CITOGENETICO DEL TEQUILA Y BRANDY EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

*Arturo Piña* \*\*  
*Víctor González B.* \*\*  
*Javier Osante V.* \*\*\*

### RESUMEN

El consumo inmoderado de bebidas alcohólicas puede tener efectos teratogénicos, carcinogénicos y mutagénicos en la especie humana. Se ha demostrado que el daño genético provocado por la ingestión de etanol se debe principalmente a su primer metabolito, el acetaldehído; sin embargo, las bebidas embriagantes contienen otras sustancias que también podrían ser genotóxicas. En este trabajo se estudian las propiedades mutagénicas del tequila y brandy en cultivos de linfocitos humanos con y sin enzimas que metabolizan el etanol. Los resultados indican que en ambos casos se daña el material hereditario, fenómeno que se manifiesta como un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas, lo cual podría atribuirse al acetaldehído y a los congéneres.

Las bebidas alcohólicas están constituidas principalmente por agua, alcohol etílico y un conjunto de sustancias conocidas como congéneres, que son las que les dan las características de olor y sabor específico. La presencia y concentración de éstas depende de los métodos y materia prima con que se elaboran. En la literatura se han descrito alrededor de 1,300 sustancias, entre las que destacan: alcoholes secundarios, aldehídos, cetonas, carbohidratos, vitaminas, minerales, fe-

noles, nitrosaminas y metales (Obe y Anderson, 1987).

Cuando se ingieren bebidas alcohólicas, el etanol se absorbe en un 80 a 90 por ciento en el intestino delgado y se oxida casi en su totalidad en los hepatocitos. En estas células existen dos vías enzimáticas para metabolizar el etanol: la deshidrogenasa alcohólica y el sistema microsomal de oxidación. Por medio de estos sistemas el etanol se transforma en acetaldehído, para posteriormente convertirse en acetato a través de la aldehidodeshidrogenasa; el acetato se libera al torrente sanguíneo y forma agua y CO<sub>2</sub> al llegar a otros tejidos (Erickson, 1987; Smith, 1986).

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas provoca serios problemas de salud al individuo y en algunos casos a su descendencia. Se ha observado que existe una relación muy estrecha en-

\* Laboratorio de Genética. Departamento de Morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

\*\* ENEP-Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

\*\*\* Sección de Matemáticas. Departamento de Física.

<sup>+</sup> Becario de COFAA-IPN.

tre la ingestión de bebidas etílicas y la presencia de cáncer en distintos órganos. Estudios epidemiológicos en distintas zonas geográficas indican que el consumo de ciertas bebidas alcohólicas puede estar asociado con cáncer en órganos específicos, como es el caso de algunos vinos rojos, y cáncer en estómago, esófago, faringe y cavidad oral (Obe y Ristow, 1979; Rosseberg *et al.*, 1990, y Barra *et al.*, 1990). Por otro lado, fue hasta 1973 cuando se reconoció y aceptó que el consumo materno del etanol tiene propiedades teratógenas; al conjunto de alteraciones físicas y psíquicas se les denominó síndrome alcohólico fetal (SAF). Este síndrome se presenta en el 40% de los hijos de las madres alcohólicas (Abel, 1982). En relación al efecto del alcoholismo paterno sobre la progenie, hay consenso en considerar que no provoca malformaciones aparentes; sin embargo, se ha observado que los hijos de padres alcohólicos pueden tener problemas de aprendizaje; en animales de laboratorio se ha observado que en algunas especies puede tener efectos teratógenos (Hegedus *et al.*, 1984 y Geva *et al.*, 1994).

Considerando que el cáncer y la presencia de malformaciones pueden ser consecuencia de alteraciones cromosómicas y que existen agentes químicos, físicos o biológicos que provocan da-

ño en el material hereditario, distintos grupos de investigadores se han dado a la tarea de estudiar las posibles propiedades mutagénicas del etanol, acetaldehído, bebidas alcohólicas y congéneres. Entre los métodos empleados para lograr lo anterior, destacan los citogenéticos, con los cuales es posible determinar la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH). El ICH es el intercambio de segmentos asimétricos equivalentes entre cromátides de un mismo cromosoma (Fig. 1). Existen sustancias que modifican el DNA, lo cual se expresa como un incremento en el ICH.

Estudios realizados en linfocitos de pacientes alcohólicos, indican que éstos presentan un incremento de aberraciones cromosómicas y de intercambio de cromátides hermanas (Obe *et al.*, 1980 y Madrigal *et al.*, 1990). En madres alcohólicas también aumenta la frecuencia de ICH, pero en los hijos con SAF no se observan cambios en los niveles basales de ICH (Seshadri *et al.*, 1982).

Los experimentos *in vitro* con linfocitos humanos y distintas dosis de etanol son discrepantes, pues mientras algunos autores establecen que hay un incremento en el ICH y alteraciones cromosómicas, otros no lo encuentran (Obe y Anderson, 1987). A pesar de lo anterior, hay una



Fig. 1. Linfocito en metafase, las flechas indican cromosomas con intercambio de cromátides hermanas (ICH).

tendencia a considerar que el etanol no tiene efectos mutagénicos en este tipo de cultivos celulares. Cuando los cultivos de linfocitos se realizan en presencia de etanol y de la fracción microsomal (S9) de hígado de rata, que contiene las enzimas que oxidan el alcohol a acetaldehído, se observan efectos genotóxicos. Con acetaldehído se observan resultados similares. De estos estudios se concluye que es este metabolito y no el etanol el responsable de las alteraciones genéticas observadas (Obe *et al.*, 1979 y De Raat *et al.*, 1983). En relación a la mutagenicidad de las bebidas alcohólicas, existen pocos estudios, dada la gran diversidad que existe en el mundo.

Considerando que el tequila y el brandy son dos bebidas que se consumen en México con frecuencia, en este trabajo se determinaron las propiedades genotóxicas de estas bebidas, utilizando cultivos de linfocitos y la fracción microsomal S9 de hígado de rata.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Obtención y preparación de la fracción microsomal S9 (De Raat et al., 1983)*

Las enzimas responsables del metabolismo del etanol, presentes en el sistema microsomal de oxidación, se obtuvieron a partir de hepatocitos de rata. Para lograr lo anterior se utilizó una rata macho de la cepa Wistar (200 gr), a la cual se le administró, por vía intraperitoneal y por cinco días, fenobarbital (80 mg/kg/día). Veinticuatro horas después de la última inyección se realizó el sacrificio por dislocación cervical y se extrajo el hígado. Este órgano se homogeneizó en una solución de KCl 0.15 M y a 4°C, a razón de 3 ml por gramo de tejido. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 9,000 g y a 0°C, posteriormente el sobrenadante se almacenó -80°C hasta el momento de utilizarse. La solución de trabajo con la fracción S9 se preparó una hora antes de agregarla a los cultivos, con las siguientes sustancias: 1 ml de la fracción S9, 0.2 ml de NADP 0.2 M, 0.25 ml de glucosa 6 fosfato 0.2 M y 8.55 ml de una solución que contiene 20 ml de MgCl<sub>2</sub> 0.4 M, 20 ml de KCl 1.65 M, 500 ml de amortiguador de fosfatos 0.2 M y 315 ml de agua destilada.

### *Cultivo de linfocitos (Moorhead et al., 1960 y Arakaki y Sparkes, 1963.)*

Para la realización de los cultivos se empleó sangre de un individuo de 26 años, sexo masculino, clínicamente sano, sin hábitos de tabaquismo o etílicos, ni antecedentes de exposición a radiaciones o ingestión de fármacos en los últimos seis meses. Las dosis de tequila (40° G.L.) y brandy (38° G.L.) que se estudiaron fueron equivalentes a 0.48%, 0.96% y 1.44% de etanol. Los cultivos se realizaron en frascos, agregando en cada caso 8 ml de medio McCoy, 0.5 ml de fitohemaglutinina y 0.5 ml de sangre, incubando a 37°C durante 40 horas. Transcurrido este tiempo, a un lote de frascos se le agregaron las dosis a estudiar y la mezcla S9 (3%) (experimento 1). A otros sólo se les adicionaron las distintas concentraciones de las bebidas alcohólicas (experimento 2). En cada lote se incluyó un testigo negativo. En ambos casos se incubó 2 h a 37°C para posteriormente eliminar el sobrenadante por centrifugación; después se agregaron nuevamente 8 ml de medio McCoy, 0.5 ml de fitohemaglutinina y 45 µl de bromodesoxiuridina (20 µg/ml), y se dejaron en la estufa a 37°C durante 48 horas. Cincuenta minutos antes de iniciar la cosecha se agregó colchicina (0.02 mg/ml).

Transcurrido el tiempo, se colocó el contenido de los frascos en tubos de ensaye y se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y el botón celular se suspendió en KCl (0.075) incubándolo a 37°C por 20 minutos. Después se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y fijó con una solución de ácido acético-metanol (1 a 3), esta operación se repitió dos veces más y con la suspensión de células se hicieron las laminillas. La tinción diferencial se realizó empleando el colorante fluorescente *Hoetch* 33258 y *Giemsa* (4%) (Perry y Wolff, 1974). Se analizaron 30 células de segunda división en metafase, con un objetivo 100x. El análisis estadístico se efectuó con las pruebas de Análisis de Varianza y Tuckey ( $p = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar estadísticamente las medias de ICH de los distintos tratamientos con el testigo, se observó que hay diferencias significativas en los

dos experimentos, con excepción de la dosis 1 de brandy. También se encontró que el tequila tiene mayor actividad mutagénica que el brandy (tabla 1, gráficas 1 y 2).

En la literatura se ha informado que existen algunas bebidas alcohólicas con propiedades genotóxicas con y sin activadores metabólicos, mientras que otras sólo dañan el material genético en presencia de la fracción S9. También existen trabajos que demuestran que los congéneres o algunos de sus componentes son genotóxicos (De Raat *et al.*, 1983). En los cultivos sin la fracción microsomal S9, el etanol no se metaboliza, por tanto, la mutagenicidad observada podría atribuirse a los congéneres presentes en el tequila y brandy.

Por otro lado, se sabe que el acetaldehído es un compuesto muy reactivo debido a la naturaleza electrofílica del grupo carbonilo, que puede reaccionar fácilmente con los radicales amino de una gran variedad de macromoléculas, incluyendo al DNA (Dellarco, 1988). En experimentos *in vivo* e *in vitro*, el acetaldehído incrementa la frecuencia de ICH y las aberraciones cromosómicas. En los cultivos con brandy o tequila y la fracción S9, el etanol se transforma en ace-

taldehído y se observó que la frecuencia de ICH es mayor a la encontrada en los cultivos sin S9. Estos hallazgos se explican a partir de la presencia del acetaldehído y de las sustancias presentes en las bebidas estudiadas.

#### CONCLUSIONES

Los estudios realizados en pacientes alcohólicos indican que la ingestión excesiva de bebidas alcohólicas puede tener efectos mutagénicos. Sin embargo, para explicar este fenómeno es necesario tomar en consideración las propiedades genotóxicas de las bebidas que se consumen. En este trabajo se demuestra que el tequila y brandy son mutagénicos con y sin la fracción microsomal S9, lo cual indica que la mutagenicidad es resultado de la acción del acetaldehído y los congéneres. Estudios futuros en los que se aíslen e identifiquen las sustancias contenidas en las bebidas embriagantes, permitirán conocer con exactitud sus propiedades genotóxicas. Con esto se podrán establecer normas y medidas de prevención tendientes a evitar los efectos adversos del consumo inmoderado de estas sustancias.

TABLA 1.

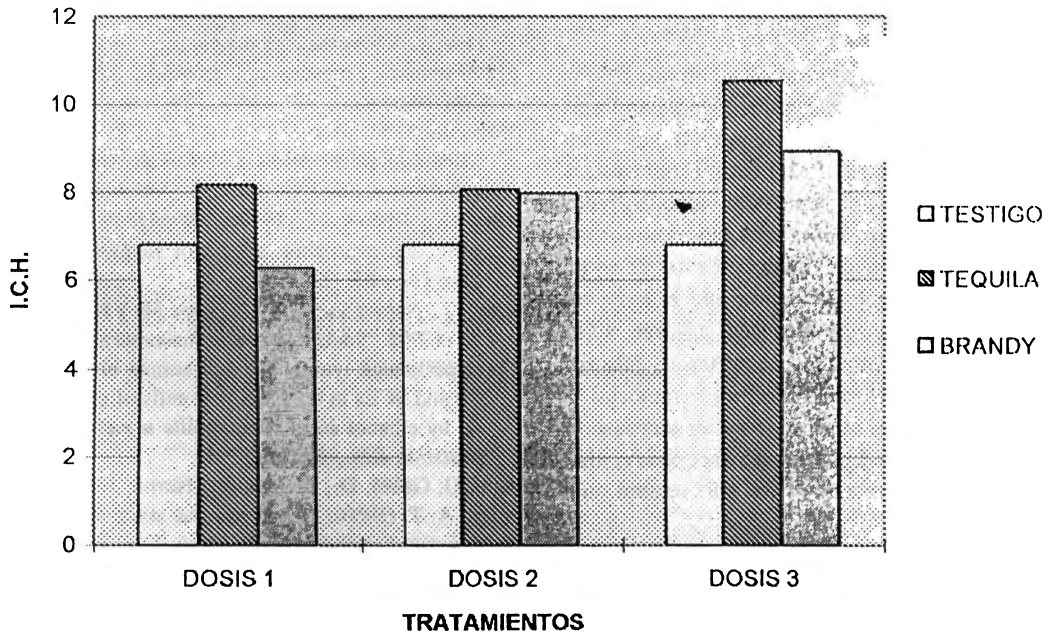
Intercambio de cromátides hermanas en cultivos de linfocitos humanos tratados con tequila o brandy.

*Sin la fracción microsomal S9.*

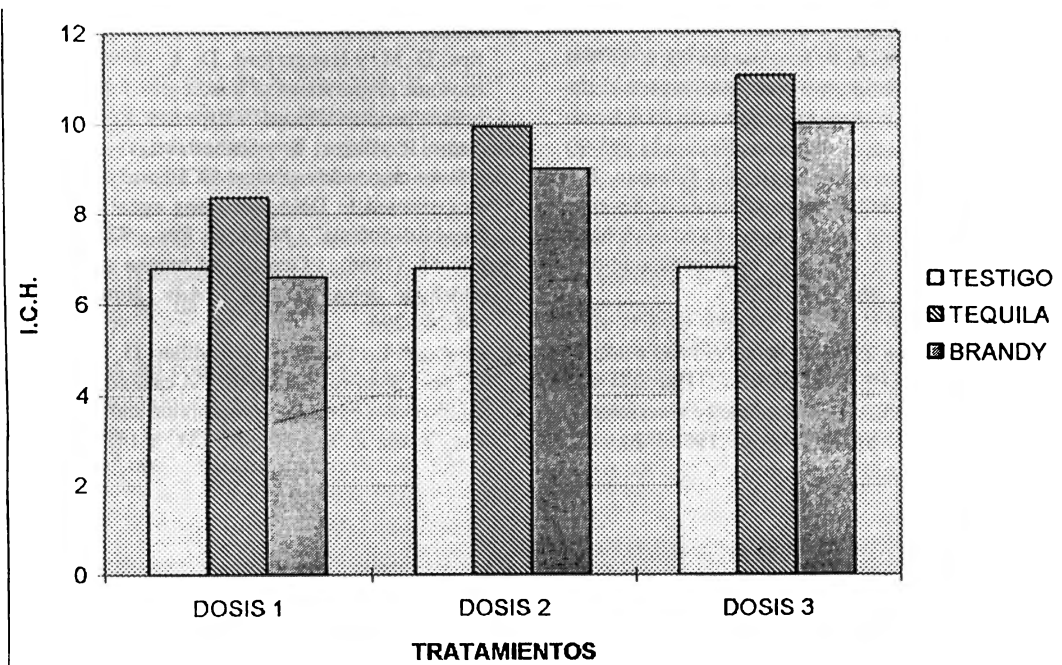
	Testigo	Tequila 1	Tequila 2	Tequila 3	Brandy 1	Brandy 2	Brandy 3
Media	6,8	8,16	8,06	10,53	6,06	7,96	8,93
Error típico	0,35	0,55	0,34	0,38	0,24	0,35	0,52

*Con la fracción microsomal S9*

	Testigo	Tequila 1	Tequila 2	Tequila 3	Brandy 1	Brandy 2	Brandy 3
Media	6,8	8,36	9,93	11,03	6,6	9	10
Error típico	0,35	0,54	0,68	0,51	0,38	0,41	0,85



**Gráfica 1.** Intercambio de cromátides hermanas (ICH) en cultivos de linfocitos *sin* la fracción microsomal S9.



**Gráfica 2.** Intercambio de cromátides hermanas (ICH) en cultivos de linfocitos *con* la fracción microsomal S9.

## SUMMARY

The excessive consumption of alcoholic beverages can have teratogenic, carcinogenic and mutagenic effects on human beings. It has been shown that genetic injury by ethanol ingestion is due mainly to its first metabolite acetaldehyde. However, alcoholic beverages have other substances that could be genotoxic also. In this work, mutagenic properties of tequila and brandy are studied on human lymphocytes cultures with/without enzymes metabolizing ethanol. Results show that in both cases hereditary material is damaged, which is evidenced as an increase in Sister Chromatid Interchange frequency, that could be due to acetaldehyde and related substances.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abel, E. (1982). "Consumption of alcohol during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring". *Human biology*, **54**: 421-453.
- Arakaki, D. T. y Sparkes, R. S. (1963). "Micro-technique for culturing leukocytes from whole blood". *Cytogenetics*, **2**, 57.
- De Raat, W. K.; Davis, P. B. y Bakker, G. L. (1983). "Induction of sister-chromatid exchanges by ethanol and alcoholic beverages after activation by rat-liver homogenate". *Mutation Res.*, **124**: 85-90.
- Barra, S.; Franceschi, S.; Negri, E.; Talemini, R. y Vecchia, C. (1990). "Type of alcoholic beverage and cancer of oral cavity pharynx and oesophagus in an Italian area with high wine consumption". *Int. J. Cancer*, **46**: 1017-1020.
- Erickson, C. J. P. (1987). "Genetic aspects of the relation between alcohol metabolism and consumption in humans". *Mutation Res.*, **186**: 241-247.
- Dellarco, V. (1988). "A mutagenicity assessment of acetaldehyde". *Mutation Res.*, **195**: 1-20.
- Geva, D.; Goldschmidt, L.; Stoffer, D. y Day, N. (1993). A longitudinal analysis of effect of prenatal alcohol exposure and growth". *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, **17**: 1124-1129.
- Hegedus, A. M.; Alterman, A. y Tarter, R. E. (1984). "Learning achievement in sons of alcoholics". *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, **8**: 330-333.
- Obe, G. y Ristow, H. (1979). "Mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects of alcohol". *Mutation Res.*, **65**: 229-259.
- Obe, G.; Natarajan, A. T.; Meyers, M. y Hertog, D. A. (1979). "Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro* and SCEs in bone marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde". *Mutation Res.*, **68**: 291-294.
- Obe, G.; Göbel, D.; Engeln, H.; Herha, J. y Nataraja, A. T. (1980). "Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics". *Mutation Res.*, **73**: 377-386.
- Obe, G. y D. Anderson (1987). "Genetic effects of ethanol". *Mutation Res.*, **186**: 177-200.
- Madrigal, E.; Piña, A.; Vidal, P. y Rubio, D. (1990). "Presencia de alteraciones genéticas en pacientes con alcoholismo". *Rev. Mex. Pat. Clin.*, **37**: 33-35.
- Madrigal, E.; Calderón, R. y Díaz Barriga, S. (1991). "Sister chromatid exchange frequencies induced *in vivo*, and *in vitro* by residues of brandy". *J. Toxicol Environ. Health*, **32**: 479-486.
- Moorhead, P.S.; Nowell, P. C.; Mallman, W. J.; Bat-tips, D. M. y Hungerford, D. A. (1960). "Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood". *Exp. Cell Res.*, **20**: 613.
- Seshadri, R.; Baker, E. y Sutherland, G. R. (1982). "Sister-chromatid exchange (SCE) analysis in mothers exposed to DNA-damaging agents and their newborn infants". *Mutation Res.*, **97**: 139-146.
- Smith, M. (1986). "Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenase". *Adv. Hum. Genet.*, **14**: 249-296.
- Rosemberg, L.; Palmer, J. R.; Miller, D. R.; Clarke, E. A. y Shapiro, S. (1990). "A case control study of alcoholic beverage consumption and breast cancer". *Am. J. Epidemiol.*, **131**: 6-14.