

ESTUDIO MUTAGÉNICO DE UNA FRACCIÓN ALCOHÓLICA VOLÁTIL DEL TEQUILA EN LINFOCITOS HUMANOS

*Arturo Piña Calva**
*Eduardo Madrigal Bujaidar**
Miguel Ángel Méndez Villasana

RESUMEN

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas puede afectar la salud del individuo y en algunos casos a su descendencia. En consecuencia puede provocar cáncer, malformaciones en los hijos de madres alcohólicas y alteraciones en la capacidad reproductora en pacientes masculinos. Estudios recientes indican que el etanol es mutagénico a través de su primer metabolito, el acetaldehído y otras sustancias presentes en las bebidas tienen efectos genotóxicos.

Considerando que el tequila es una de las bebidas que más se consumen en México y que no existen estudios sobre el posible potencial mutagénico de su fracción alcohólica volátil, en este trabajo se realizaron los siguientes estudios: determinación cualitativa de los principales componentes de la fracción, análisis citogenético del efecto de ésta en cultivos de linfocitos (0.05%, 0.10%, 0.20%, 0.60% y 1.40% v/v), índice de replicación (IR) y cinética de proliferación celular. El estudio cualitativo muestra la presencia de acetaldehído y alcoholes superiores y en el análisis citogenético se observó un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en la dosis más alta. La cinética celular y el IR se modifican en la medida que aumentan las dosis. Todo lo anterior podría explicarse a partir de la presencia del acetaldehído presente en esta fracción.

INTRODUCCIÓN

El tequila es una bebida que sólo se fabrica en México a partir del *Agave tequilana* (Weber), que oficialmente se cultiva en poblaciones del es-

tado de Jalisco y algunas de Guanajuato, Nayarit y Michoacán. El proceso de elaboración consiste en la cocción de los núcleos centrales de la planta, con los cuales se obtienen los mostos que posteriormente se fermentan y destilan. El producto resultante es una mezcla constituida principalmente por agua y etanol; sin embargo, también están presentes en cantidades muy pequeñas un conjunto de sustancias químicas conocidas genéricamente como congéneres, que

*Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional; México, D.F. Becarios de COFAA.

son los que le dan las características organolépticas específicas al tequila.^{1,2}

Entre las normas que establece la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SCFI) para el tequila, destaca la información sobre las sustancias que pueden estar presentes en esta bebida, como son: etanol, metanol, alcoholes superiores y acetaldehído. Cabe mencionar, que en algunos casos la determinación cualitativa y cuantitativa de algunos componentes es difícil, ya que son muy inestables y se encuentran en cantidades muy pequeñas (tabla 1).³

De manera general se puede decir que, cuando se ingieren bebidas alcohólicas, el etanol se absorbe en la mucosa del tracto gastrointestinal (de 20 a 25% en estómago y de 75 a 80% en el intestino delgado). Considerando que el etanol es muy hidrofílico, una vez que se absorbe, se difunde rápida y uniformemente a los tejidos ricos en agua, por lo tanto las concentraciones más altas las encontramos en sangre. La eliminación del alcohol se lleva a cabo principalmente en el hígado a través de procesos de oxidación (90-95%), independientemente de la cantidad consumida y de la concentración de etanol en sangre. Pequeñas cantidades de etanol son excretadas como tal a través del aliento (5% aproximadamente), orina (0.5-2%) y sudor (0.5%). A temperaturas elevadas y altos niveles de etanol en sangre, estos valores pueden aumentar.⁴

La oxidación del etanol a acetaldehído se lleva a cabo por tres mecanismos enzimáticos, presentes fundamentalmente en las células hepáticas: el de la alcohol deshidrogenasa, presente en el citosol; el del sistema de oxidación microsomal, situado en el retículo endoplásmico y el de la catalasa, localizada en los peroxisomas. Transformado el etanol en acetaldehído, éste se convierte en acetato por medio de la aldehído

deshidrogenasa. Finalmente, el acetato se transforma en dióxido de carbono y agua en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El acetato también puede formar ácidos grasos, cuerpos cetónicos, aminoácidos y esteroides a través de la forma acetilada de la acetil Co A. En individuos sanos la alcohol deshidrogenasa es la principal responsable de la oxidación del etanol, en pacientes alcohólicos es el sistema de oxidación microsomal. En general se acepta que la contribución de la catalasa en la eliminación de alcohol es mínima.^{1,5}

El consumo excesivo de etanol puede afectar la salud del individuo y en algunos casos a su descendencia. Así sabemos que existe estrecha relación entre la ingesta de bebidas alcohólicas y cáncer en hígado, colon y recto. Estudios epidemiológicos también muestran una alta incidencia de cáncer en la cavidad oral, faringe y estómago, en regiones del norte de Italia donde se consumen grandes cantidades de vino tinto.⁶

Con respecto a las repercusiones que tienen los hábitos etílicos en la descendencia, se sabe que los hijos de madres alcohólicas pueden presentar diversos tipos de malformaciones y retraso en el desarrollo físico y mental, lo que constituye el síndrome alcohólico fetal. En lo referente al consumo paterno de etanol, no se ha demostrado que éste tenga efectos teratogénicos, no obstante, algunos estudios indican que los hijos de padres alcohólicos pueden presentar problemas de aprendizaje. Los pacientes con alcoholismo crónico pueden presentar impotencia y disminución en la fertilidad provocada por alteraciones en la producción de espermatozoides, que puede ir desde disminución en su número hasta la ausencia total.^{7,9}

Considerando que el cáncer, malformaciones y algunos problemas de aprendizaje pueden estar

Tabla 1. Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y significancia estadística (Sig.) en cultivos de linfocitos tratados con distintas concentraciones de la fracción alcohólica de tequila (FAVT).

T(-) X ± E.E.	T(+) X ± E.E.	.05%FAVT X ± E.E.	.10% FAVT X ± E.E.	.20% FAVT X ± E.E.	.60% FAVT X ± E.E.	1.4% FAVT X ± E.E.
8.9 ± 0.33	28.9 ± 1.1	8.9 ± 0.63	9.76 ± 0.51	9.6 ± 0.46	10.1 ± 0.65	10.7 ± 0.66
		No Sig.	No Sig.	No Sig.	No Sig.	Sig.

T (-)=testigo negativo; T (+)=testigo positivo; X=media; E.E.=error estándar.

ligados a alteraciones en el material genético, y que éstas a su vez pueden ser provocadas por la acción de agentes químicos mutagénicos, distintos grupos de investigadores se han dado a la tarea de estudiar las posibles propiedades genotóxicas del etanol y las bebidas alcohólicas. Los estudios realizados, tanto en animales de laboratorio como en pacientes alcohólicos, muestran que el etanol y algunas bebidas alcohólicas tienen propiedades mutagénicas, ya que pueden incrementar la frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas (ICH).^{10,12}

Considerando que el tequila es una bebida cuyo consumo es frecuente en nuestro país, que también es mutagénica en animales de laboratorio y no se conoce el potencial genotóxico de su fracción volátil, en este trabajo se determinó la mutagenicidad del conjunto de estas sustancias en linfocitos humanos, a través de la cuantificación de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas. Además, se determinó el índice mitótico, la proliferación celular y el índice de replicación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la fracción alcohólica volátil de tequila (FAVT)

Para obtener la FAVT se utilizó un equipo de destilación (Pyrex) con el que se destiló un litro de tequila blanco (38°GL) a una temperatura entre 78° y 80°C. Por medio de cromatografía de gases (VARIAN mod 1400, con columna de vi-

drio Porapak y detector de ionización de flama de hidrógeno) se realizaron las determinaciones cualitativas para identificar algunos de los posibles constituyentes de la FAVT. (Tabla 2.)

Cultivo de linfocitos

Los cultivos celulares se realizaron empleando sangre total de un donador femenino con 25 años de edad, clínicamente sano, sin hábitos de tabaquismo o etílicos y sin antecedentes de exposición a fármacos o radiaciones en los últimos seis meses. Las dosis que se estudiaron fueron 0.05, 0.10, 0.20, 0.60 y 1.40 % (v/v) de la FAVT. Los cultivos se realizaron en frascos de vidrio estériles, agregando en cada caso, 8 ml de medio Mc Coy, 0.5 de fitohemaglutinina y 0.5 ml de sangre periférica. Los frascos se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido este tiempo se agregaron las distintas dosis de la FAVT y la 5 bromo desoxiuridina (18 ng/ml). Los testigos negativo y positivo se trataron en condiciones idénticas a los problemas, excepto que en el negativo no se adicionó la FAVT y en el positivo se agregó mitomicina C. (50 ng/ml). 50 minutos antes de concluir el periodo de incubación se agregó colchicina (0.02 mg/ml), posteriormente se colocó el contenido de los frascos en tubos de ensayo y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en KCl (0.075M) incubándolo a 37°C por 20 minutos. Después se efectuó la fijación celular con una solución de ácido acético metanol (1-3), operación que se repitió dos veces más.¹³

Tabla 2. Principales componentes del tequila blanco (SCFI 1983).

<i>Grado de alcohol (etanol)</i>	<i>38 - 55° G.L.</i>
Extracto seco	0 - 0.2 gr/l
Metanol	0 - 300 mg/dl de alcohol anhidro
Alcoholes superiores	0 - 400 mg/dl de alcohol anhidro
Acetaldehído	20 - 30 mg/dl de alcohol anhidro
Propanol	0 - 40 mg/dl de alcohol anhidro
Isobutanol	7 - 200 mg/dl de alcohol anhidro
Alcohol isoamílico	7 - 200 mg/dl de alcohol anhidro
Ácido acético	2 - 400 mg/dl de alcohol anhidro
Butanol	1 - 2 mg/dl de alcohol anhidro
Cenizas	0 - 0.1 g/l

La tinción diferencial de las cromátides hermanas se efectuó de acuerdo a la técnica de fluorescencia más Giemsa con algunas modificaciones.^{14,15} Los puntos básicos de dicha técnica incluyen el colorante Hoechst 33258, la activación del proceso tintoreo mediante la exposición a luz negra y, finalmente, la tinción con colorante de Giemsa. Concluido este procedimiento se determinó la frecuencia de ICH analizando 30 metafases en segunda división, por dosis. El análisis estadístico se efectuó con las pruebas de análisis de varianza y Tuckey ($p \leq 0.05$). Además, se determinó el índice mitótico (número de metafases en 1000 células), la cinética celular (porcentaje de células en primera, segunda y tercera división mitótica) y el índice de replicación (IR), parámetro que nos indica el número de ciclos celulares que ocurren durante el tiempo de cultivo al aplicar la fórmula: $IR = (1MI + 2MII + 3MIII) / 100$, donde MI, MII y MIII corresponden al porcentaje de células en primera, segunda y tercera división respectivamente.¹⁶

RESULTADOS

De la destilación del tequila se obtuvieron aproximadamente 340 ml de fracción alcohólica volátil. El estudio cualitativo indicó que los compuestos presentes son: etanol, metanol, acetato de etilo, propanol, isobutanol, acetaldehído, propanalaldehído y butiraldehído.

La frecuencia de intercambio de cromátides hermanas se muestra en la tabla 1 y gráfica 1.

Al realizar el análisis estadístico, comparando la frecuencia de ICH del testigo negativo con los encontrados en los tratados se observó que existe diferencia significativa únicamente en los que tienen la dosis más alta de la fracción alcohólica volátil de tequila (1.40% de la FAVT). En el testigo positivo se observa que la frecuencia de ICH se incrementa casi el triple, en relación con el negativo.

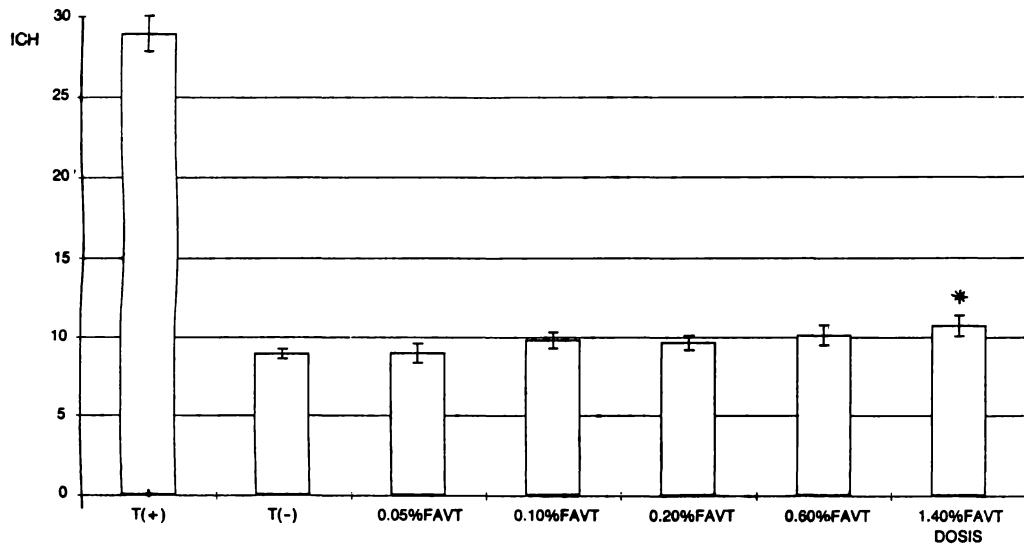
También se observó que el índice mitótico disminuye cuando se incrementa la dosis de la FAVT (gráfica 2 y tabla 3). Con respecto al porcentaje de células en primera, segunda y tercera división se encontró que al aumentar la dosis de la FAVT se incrementa el número de células en primera división mientras que las de segunda y tercera división disminuyen (gráfica 3 y tabla 3). Esto se pone de manifiesto al calcular el índice de replicación, ya que también disminuye al aumentar la dosis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

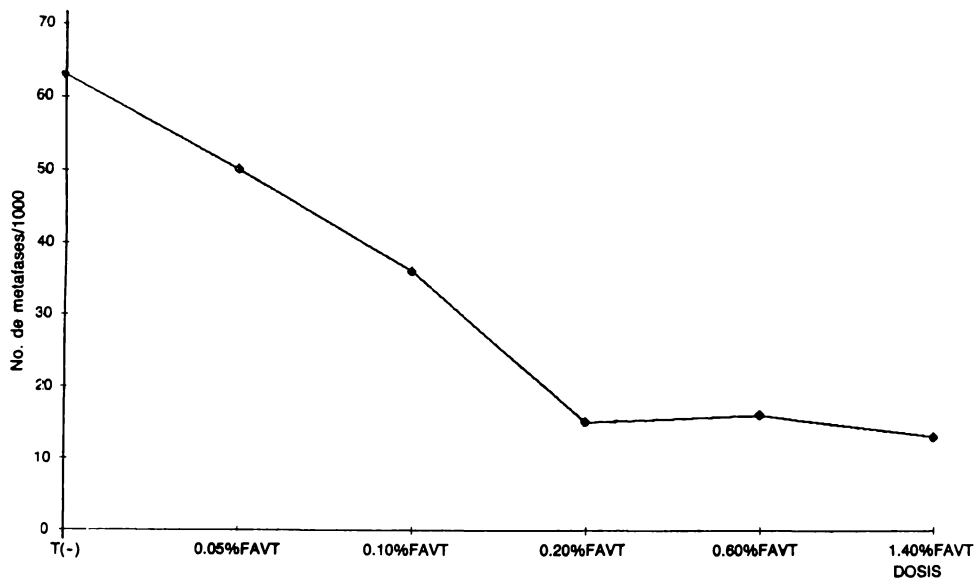
Para explicar los resultados de este trabajo, en particular los cambios en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas, es importante considerar los hallazgos obtenidos en otras investigaciones análogas. Los estudios realizados *in vivo* muestran que el etanol y las bebidas alcohólicas son mutagénicas; sin embargo, en algunos experimentos hechos *in vitro*, se encontró que el etanol no provocaba ningún tipo de daño citogenético, mientras en otras investigaciones sí se reportó dicho efecto. Esta contro-

Tabla 3. Índice mitótico (IM) y cinética de la proliferación celular (CPK) en cultivos de linfocitos tratados con la fracción alcohólica volátil de tequila (FAVT) $I.R = (1MI + 2MII + 3MIII) / 100$, donde MI, MII y MIII es el porcentaje de células en primera, segunda y tercera división mitótica respectivamente. MMC = mitomicina C.

Dosis	I:M. mitosis/1000ce	CPK			I.R.
		MI	MII	MIII	
0	63	40	52	8	1.68
0.05% (v/v) FAVT	50	54	41	5	1.51
0.10% (v/v) FAVT	36	49	46	5	1.56
0.20% (v/v) FAVT	15	65	31	4	1.39
0.60% (v/v) FAVT	16	67	30	3	1.36
1.40% (v/v) FAVT	13	72	28	0	1.28
MMC 50 ng/ml	9	81	16	3	1.22

Gráfica 1. Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH).

T(-)= testigo negativo. T(+)= testigo positivo. FAVT= fracción alcohólica de tequila.
 *= diferencia significativa, barras sobre la gráfica = error estándar.

Gráfica 2. Índice mitótico (número de metafases en 1000 células).

T(-)= testigo negativo.
 FAVT= fracción alcohólica volátil de tequila (v/v).

versia se resolvió cuando se efectuaron cultivos con la fracción microsomal (S9) de hígado de rata, y sin dicha fracción. Los resultados de estos experimentos mostraron daño genético únicamente los cultivos que contenían etanol y S9 y como la mencionada fracción contiene las enzimas responsables del metabolismo del etanol, se concluyó que éste era mutagénico a través de su primer metabolito, el acetaldehído.^{17,18}

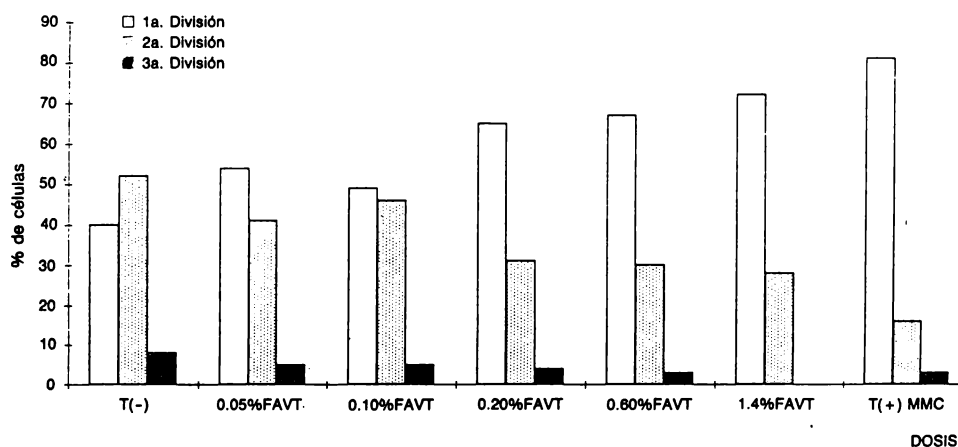
En relación a la mutagenicidad de las bebidas alcohólicas, se ha descrito en la literatura que todas las estudiadas son mutagénicas en presencia de la fracción S9, y que algunas también lo son en ausencia de esta fracción. Para explicar el último fenómeno se ha sugerido que algunas de las sustancias presentes en las bebidas (congéneres), podrían ser las responsables del efecto genotóxico observado. Esta hipótesis se complementa con los resultados de otras investigaciones en las que se encontró que el conjunto de sustancias contenidas en la fracción acuosa de tequila y brandy son mutagénicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunado a lo anterior, también se ha confirmado que algunas sustancias específicas presentes en vinos y cervezas (dimetil amina, dietil amina, quercetina y rutina) han resultado mutagénicas en sistemas de prueba bacterianos.^{16,19,20}

En este trabajo se encontró que la fracción alcohólica no incrementó la frecuencia de ICH en las cuatro primeras dosis, pero en la última sí se observó incremento significativo. Para ex-

plicar esto es necesario partir de las siguientes consideraciones: a) que el etanol es mutagénico a través de su primer metabolito, el acetaldehído,¹⁷ b) que en la fracción alcohólica se encuentran diversas sustancias entre las que destaca el acetaldehído (entre 20 y 30mg/100 ml de alcohol anhidro)³ y c) que el acetaldehído es mutagénico en cultivos de linfocitos (4.4 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo).²¹ La ausencia de daño en las concentraciones entre 0.05 y 0.6% de FAVT podría deberse a que los niveles de acetaldehído son muy pequeños (0.15 $\mu\text{g/ml}$ - 1.8 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo) y a la carencia de enzimas para transformar el etanol en acetaldehído. En el caso de la dosis más alta de la FAVT (1.4%), el incremento en la frecuencia de ICH podría atribuirse principalmente al acetaldehído, según la norma oficial, aproximadamente 4.2 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo, las otras sustancias presentes en la fracción, también podrían contribuir en el incremento del intercambio de cromátides hermanas.

El índice mitótico disminuye en la medida que aumenta la dosis (gráfica 2 y tabla 3), lo que sugiere que la fracción estudiada es citotóxica a las dosis estudiadas. En relación al porcentaje de células en primera, segunda y tercera división, se observó que al incrementar la dosis aumenta el número de células en primera mientras que disminuyen las frecuencias de segunda y tercera (gráfica 3, tabla 3). Lo anterior se pone de manifiesto al calcular el índice de replicación, el cual, de manera análoga, también disminuye.

Gráfica 3. Número de células en 1a., 2a. y 3a. división.



T(-) = testigo negativo. T(+) = testigo positivo.

Esto nos indica que la FAVT altera algunos procesos que ocurren durante el ciclo celular, dando como resultado modificaciones en el tiempo que se requiere para que éste ocurra (tabla 3).

Los resultados encontrados en este trabajo confirman y complementan los hallados por otros autores en experimentos análogos. Es decir, que el etanol es mutagénico a través de su primer metabolito el acetaldehído y que probablemente otras sustancias presentes en las bebidas alcohólicas también son mutagénicas. Sin embargo, en una siguiente etapa sería conveniente aislar, identificar y cuantificar los distintos componentes del tequila en la perspectiva de conocer sus posibles propiedades mutagénicas.

SUMMARY

Excessive drinking of alcoholic beverages can affect the individuals health and in some cases their descendants. In consequence it can cause cancer, congenital malformations in children of alcoholic mothers and alterations in the reproductive capacity of male patients. Recent studies indicate that ethanol is mutagenic through its first metabolite, the acetaldehyde and other present substances in drinks have genotoxic effects.

Considering that tequila is one of the drinks most consumed in Mexico and that there are no studies of the possible mutagenic potentials of its volatil alcoholic fraction, in this work the following studies were carried out: qualitative determination of the main components of the fraction, cytogenetic analysis of the effect of this in lymphocyte cultures (0.05%, 0.10%, 0.20% 0.60% and 1.4% V/V), replication index (I.R.) and cinetics of cellular proliferation. The qualitative study shows the presence of acetaldehyde and superior alcohols and in the cytogenetic analysis an increment in the frequency of sisters chromatid interchange was observed.

With the highest dose, cellular cinetics and the I.R. are modified as doses are increased. All of these could be explained by the presence of acetaldehyde in this fraction.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Analley, B.H. 1988. "Chemistry of alcoholic beverages". En: Garriott J.C. Ed. *Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens*. PSG. Publishing Company Inc. U.S.A. pp. 1-35.
2. Guzmán, M. 1986. *El tequila*. Lienzo, 26: 32-36.
3. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (S.C.F.I.) 1983. Norma Oficial Mexicana (NOM-V-18-1983) "Bebidas Alcohólicas Destiladas: Tequila". Dirección General de Normas.
4. Agarwal, D.P. y Goedde, H.W. 1990. "Alcohols metabolism". En: *Biochemistry and genetic variation in alcohol metabolism, alcohol tolerance and alcoholism*. Springer Verlag. U.S.A. pp. 52-65.
5. Lieber, C.; Barcona, E.; Leo, A. y Gerro, A. 1987. "Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs carcinogens and nutrition". *Mutation Res.*, 186: 201-233.
6. Barra, S.; Franceschi, S.; Negri, E.; Talemmini, 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.
7. Abel, E. 1982. "Consumption of alcohol during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring". *Human Biology*, 54: 421-453.
8. Hegedus, A.M., Alterman, A. y Tarter, R.E. 1984. "Learning achievement in sons of alcoholics". *Alcoholism: Clin Exp. Res.*, 8: 330-333.
9. 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.
10. Obe, G.; Gobel, D.; Elgeln, H.; Herba, L. y Natarajan, A.T. 1980. "Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics". *Mutation Res.*, 73: 377-386.
11. 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.
12. Piña, A.; Madrigal, E. y Cassani, M. 1991. "Daño genético producido por bebidas alcohólicas". *Ciencia y Desarrollo*, 17: 47-54.
13. Barch, M.J.; Lawse, H.J. y Arsham, M.S. 1993. "Peripheral blood culture". En *Cytogenetics Laboratory Manual*. Ed. Barch M.J. Raven Press. Ltd. New York. pp. 17-30.
14. Perry, P. y Wolff, S. 1974. "New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid". *Nature*, 251: 156-158.
15. Madrigal, E.; Calderón, R. y Díaz Barriga, S. 1991. "Sister chromatid exchange frequencies induced *in vivo* and *in vitro* by the residues of

- brandy". *J. Toxicol. Environ. Health*, **32**: 479-486.
16. Piña, A. y Madrigal, E. 1993. "SCE frequencies induced by ethanol, tequila and brandy in mouse bone marrow cell *in vivo*". *Toxicol. Lett*, **66**: 1-5.
 17. Obe, G. y D. Anderson 1987. "Genetic effects of ethanol". *Mutation Res.*, **186**: 177-200.
 18. Obe, G.; Natarajan, A.T.; Meyers, M. y Hertog, P.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.
 19. 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.
 20. Madrigal, E.; E. Rosas, A. y Ramos, A. 1990. "Mouse bone marrow cytogenetic damage produced by residues of tequila". *Mutation Res.*, **241**: 133-137.
 21. Dellarco, V.L. 1988. "A mutagenicity assessment of acetaldehyde". *Mutation Res.*, **195**: 1-20.