

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN
ESCUELA DE POSGRADO

***"Bioactivación del etanol en el tejido mamario de rata,
su relación con los efectos promotores del cáncer por
alcohol. Inhibidores con potencial uso preventivo"***

María Eugenia Maciel

Director: Dr. Gerardo Daniel Castro

**Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Toxicológicas
CEITOX-CITEFA/CONICET**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencia y Tecnología – Mención Química

~2006~

Resumen

sobre la producción de acetaldehído en la fracción microsomal y solo el alil mercaptano mostró un leve efecto inhibitorio sobre la fracción citosólica.

“Bioactivación del etanol en el tejido mamario de rata, su relación con los efectos promotores del cáncer por alcohol. Inhibidores con potencial uso preventivo”

de las actividades enzimáticas celulares de ese tejido. En el caso del metabolismo del etanol mediado por la fracción microsomal dependiente de NADPH y **Maciel, María Eugenia** inmaduras presentaron la

respuesta más baja y la adultas post lactación la más alta. En cuanto a la

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue estudiar el potencial de distintos componentes dietarios para modular la biotransformación del etanol a acetaldehído en el tejido mamario de rata, y también su efecto sobre el daño celular promovido, en relación con el consumo de alcohol ligado a cáncer de mama.

Esto permitiría orientar hacia a una estrategia preventiva, sobre bases racionales, con el fin de neutralizar los daños que genera el alcohol a través de sus metabolitos tóxicos, ya sean producidos *in situ* o provenientes de otros sitios de biotransformación en el organismo.

en la fracción citosólica como microsomal de la glándula mamaria de ratas de la cepa Sprague Dawley. En

La biotransformación de etanol a acetaldehído mediada por xantino oxidoreductasa (XOR) fue inhibida fuertemente por ácido fólico y polifenoles como ácido elágico, flavonoles (quercetina, miricetina y kaempferol), flavonas (apigenina, baicaleína y luteolina), isoflavonas (formononetina), flavanoles ((-)-catequina y epigallocatequina galato), flavanonas (hesperetina), lignanos (enterodiol), en concentraciones tan bajas como 10 μM .

La bioactivación microsomal fue inhibida por polifenoles como ácido nordihidroguayarático, flavonoles (fisetina y kaempferol), flavonas (apigenina y luteolina), isoflavonas (genisteína), flavanoles ((-)-catequina y epicatequina), ácidos fenólicos y derivados (ácido cafeico y ácido ferúlico), antocianidinas (pelargonidina), en concentraciones tan bajas como 10 μM .

En el caso de los compuestos azufrados, se observó que varios de ellos (ej. compuestos provenientes del ajo como alil metil sulfuro, dialil disulfuro, alil mercaptano, dialil sulfuro) mostraron una significativa actividad inhibitoria

sobre la producción de acetaldehído, en la fracción microsomal y solo el alil mercaptano mostró un leve efecto inhibitorio sobre la fracción citosólica.

Se estudió la influencia del estado fisiológico sobre la capacidad metabolizante del etanol a acetaldehído en tejido mamario de rata, en función de las actividades enzimáticas involucradas en cada fracción celular de ese tejido. En el caso del metabolismo del etanol mediado por la fracción microsomal dependiente de NADPH y oxígeno, las hembras inmaduras presentaron la respuesta más baja y las adultas post lactación la más alta. En cuanto a la activación del etanol a acetaldehído mediada por la fracción citosólica, también la respuesta fue máxima para las adultas post lactación y baja para las inmaduras, con muy poca diferencia respecto de las adultas vírgenes. Además se observó correlación, en los tres grupos, entre la biotransformación citosólica del etanol a acetaldehído con la actividad de la xantina óxidoreductasa, la cual fue establecida por la producción de ácido úrico.

Se estudió también el efecto de la administración repetida de etanol sobre su biotransformación a acetaldehído, tanto en la fracción citosólica como microsomal de la glándula mamaria de ratas de la cepa Sprague Dawley. En ambos casos se observó un incremento significativo de la generación de acetaldehído, dependiente de xantina oxidoreductasa en el caso de citosol, y dependiente de NADPH y oxígeno en el caso de microsomas.

También se determinó que las actividades de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa son muy bajas en el tejido mamario de rata en relación con las determinadas en los hígados de los mismos animales.

Hemos demostrado la capacidad del ácido fólico y de varios polifenoles para inhibir de modo significativo la bioactivación a acetaldehído en la fracción citosólica, debido a que este metabolismo es catalizado principalmente por la xantina oxidoreductasa. Otras sustancias naturales, polifenoles y azufrados,

por su parte, mostraron un poder inhibitor importante sobre la biotransformación a nivel de la fracción microsomal.

Estos hallazgos tiene a nuestro entender una relevancia particular en cuanto a su potencial preventivo, debido a que el acetaldehído, reconocido mutágeno y carcinógeno, es el principal metabolito tóxico del etanol y puede producirse *in situ* o llegar a la mama vía la circulación sanguínea desde otros órganos. La acción deletérea del acetaldehído excede la mutagenicidad, ya que esta molécula tan reactiva además puede alterar los mecanismos de reparación del ADN, disminuir el contenido de GSH, es citotóxica y puede tener un papel determinante en los procesos de iniciación y promoción tumoral.

La acción inhibitora de estos compuestos naturales sobre la formación de acetaldehído debe interpretarse entonces como un factor claramente beneficioso contra el riesgo carcinogénico en tejido mamario. Varias de estas sustancias tienen propiedades antioxidantes, con lo que ofrecen la ventaja adicional de contribuir a la contención del estrés oxidativo promovido por la exposición al etanol, particularmente en un tejido como el mamario, que no posee una capacidad importante de defensa frente a la agresión oxidante.

oxidoreductase (XOR) was strongly inhibited by folic acid and polyphenols such as ellagic acid, flavonols (quercetin, miricetin and kaempferol), flavones (enterodiol), in concentrations as low as 10 µM. The microsomal bioactivation was inhibited by polyphenols like nordihydroguaiaratic acid, flavonols (fisetin and kaempferol), flavones (apigenin and luteolin), isoflavones (genistein), flavanols ((-)-catechin and epicatechin), phenolic acids and their derivatives (caffeic acid and ferulic acid), and anthocyanidins (pelargonidin), in concentrations as low as 10 µM.

In the case of the sulphur compounds tested, several of them showed a significant inhibiting activity (eg. compounds found in garlic as allyl methyl sulfide, diallyl disulfide, allyl mercaptan, diallyl sulfide) on the microsomal

INDICE		
I.D.4.-	Etiología.	56
I.E.-	Alcohol Y Cáncer De Mama	59
I.E.1.-	Detección.	61
I.E.2.-	Diagnóstico.	61
I.-	INTRODUCCION	1
I.E.3.-	Estrógenos y el riesgo de cáncer de mama.	62
I.A.-	El Consumo De Alcohol Como Problema Sanitario	2
I.A.1.-	Consumo moderado: conceptos, definiciones e importancia para la salud publica.	4
I.A.2.-	Estimación del consumo de alcohol.	8
I.A.3.-	Alcohol y peso corporal.	9
I.A.4.-	Alcohol y el sistema cardiovascular.	12
I.A.5.-	Alcohol y embarazo.	13
I.A.6.-	Alcohol y alteraciones en el sistema óseo.	15
I.A.7.-	Alcohol y sistema nervioso central.	16
I.A.8.-	Alcohol y enfermedades hepáticas.	18
I.A.9.-	Relevancia del problema en América y Argentina.	19
I.B.-	Mecanismos De Biotransformación Del Etanol Carcinogénesis Por Alcohol	24
I.B.1.-	Alcohol y cáncer del tracto aerodigestivo.	25
I.B.2.-	Efectos del etanol en la iniciación y promoción de la carcinogénesis.	26
I.B.3.-	Hipótesis sobre los mecanismos involucrados en la carcinogénesis por alcohol.	30
I.B.4.-	Efectos del etanol sobre el sistema inmunológico.	33
I.C.-	El Alcohol Y La Mujer	37
I.C.1.-	Diferencias de genero relevantes en la intoxicación con etanol.	37
I.C.2.-	Efectos del alcohol sobre el sistema reproductor femenino.	38
I.C.2.1.-	Alcohol y pubertad.	38
I.C.2.2.-	Alcohol y el sistema reproductor femenino.	40
I.C.2.3.-	El alcohol en la mujer menopausica.	41
I.C.2.4.-	Efectos de la disfunción reproductiva inducida por alcohol sobre el esqueleto.	42
I.D.-	Biotransformación del etanol en la fracción citosólica de la célula. Cáncer De Mama	43
I.D.1.-	Embriología, anatomía e histología de la glándula mamaria.	43
I.D.1.1.-	Cambios de la glándula mamaria en la adolescencia.	43
I.D.1.2.-	Anatomía.	44
I.D.1.3.-	Histología.	46
I.D.1.4.-	Cambios físicos y fisiológicos de la histología mamaria.	47
I.D.1.5.-	Embarazo y lactancia.	49
I.D.1.6.-	Menopausia.	49
I.D.2.-	Epidemiología del cáncer de mama.	49
I.D.3.-	Epidemiología del cáncer de mama en Argentina.	52

I.D.4.-	Etiología.	56
I.E.-	Alcohol Y Cáncer De Mama	59
I.E.1.-	Detección.	61
I.E.2.-	Genética y patología.	62
I.E.2.1.-	Tipos de tumores.	62
I.E.3.-	Estrógenos y el riesgo de cáncer de mama.	66
I.E.3.1.-	Estrógenos endógenos y su metabolismo.	67
I.F.-	Alcohol Etílico. Toxicocinética	75
I.F.1.-	Características generales del alcohol etílico.	75
I.F.2.-	Absorción.	78
I.F.2.1.-	Alimentos.	80
I.F.3.-	Distribución.	80
I.F.4.-	Peso corporal y tipo de cuerpo.	81
I.F.5.-	Eliminación.	83
I.F.6.-	Tolerancia.	84
I.G.-	Mecanismos De Biotransformación Del Etanol	85
I.G.1.-	Alcohol deshidrogenasa.	87
I.G.2.-	Sistema oxidante microsomal del etanol (MEOS).	94
I.G.3.-	Sistema oxidante del etanol en la membrana nuclear.	96
I.G.4.-	Catalasa.	97
I.G.5.-	Oxidación no enzimática.	99
I.G.6.-	Metabolismo no oxidativo.	102
I.G.7.-	Xantina oxido reductasa.	103
I.H.-	Metabolismo Del Acetaldehído	104
I.H.1.-	Sistema aldehído deshidrogenasa.	105
I.H.2.-	Aldehído oxidasa.	108
I.H.3.-	Sistema oxidante microsomal de acetaldehído (MAOS).	109
I.I.-	Biotransformación Del Etanol En La Glándula Mamaria	111
I.I.1.-	Biotransformación del etanol en la fracción citosólica de glándula mamaria de rata.	111
I.I.2.-	Biotransformación del etanol en la fracción microsomal de glándula mamaria de rata.	114
I.I.3.-	Aldehído deshidrogenasa en la glándula mamaria de rata.	118
I.I.4.-	Rol fisiológico de la xantina oxidoreductasa.	119
I.I.5.-	XOR en la inmunidad innata.	121
I.I.6.-	Rol de la XOR en la secreción de glóbulos de grasa en la leche.	124
I.I.7.-	XOR humana.	125
I.I.8.-	ROS/RNS derivadas de XOR en las señales celulares.	126

I.J.-	Compuestos Naturales De Relevancia Dietaria	128
I.J.1.-	Polifenoles.	128
I.J.1.1.-	Acidos fenólicos y sus derivados.	129
I.J.1.2.-	Flavonoides.	130
I.J.1.2.1.-	Flavanoles.	130
I.J.1.2.2.-	Flavonoles.	130
I.J.1.2.3.-	Isoflavonas.	131
I.J.1.3.-	Estilbenos.	131
I.J.1.4.-	Lignanós.	132
I.J.1.5.-	Acido eláxico.	132
I.J.1.6.-	Consumo dietario de compuestos fenólicos.	133
I.J.1.7.-	Propiedades antioxidantes.	133
I.J.2.-	Acido fólico.	135
I.J.3.-	Azufrados.	137
I.J.3.1.-	Componentes del ajo.	137
I.J.3.2.-	Isotiocianatos.	137
I.J.4.-	Terpenos.	139
II.-	OBJETIVOS	140
III.-	MATERIALES Y METODOS	143
III.A.-	Materiales	144
III.A.1.-	Sustancias químicas.	144
III.A.1.1.-	Polifenoles.	144
III.A.1.2.-	Azufrados.	145
III.A.1.3.-	Terpenos.	145
III.A.1.4.-	Varios.	146
III.A.2.-	Equipamiento.	146
III.A.3.-	Animales.	147
III.A.3.1.-	Tratamiento con administración de dieta líquida Lieber de Carli estándar.	148
III.B.-	Métodos	150
III.B.1.-	Aislación de fracciones subcelulares.	150
III.B.1.1.-	Aislación de las fracciones citosólica y microsomal.	150
III.B.1.2.-	Aislación de fracción citosólica para la medición de la actividad XO/XDh.	151
III.B.1.3.-	Aislación de diferentes fracciones subcelulares para la determinación de la actividad ALDh.	152
III.B.2.-	Técnicas empleadas en las distintas incubaciones.	153
III.B.2.1.-	Incubaciones con la fracción microsomal.	154
III.B.2.2.-	Incubaciones con la fracción citosólica.	155
III.B.3.-	Determinación de acetaldehído por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama.	156
III.B.4.-	Incubación de fracción citosólica para la medición de la actividad XO/XDh.	157
III.B.5.-	Incubación de diferentes fracciones celulares para la determinación de la actividad ALDh.	158

III.B.6.-	Incubación de la fracción citosólica para la determinación de la actividad ADh.	160
III.B.7.-	Estadística.	161
III.B.8.-	Determinación de proteínas.	161
IV.-	RESULTADOS	163
IV.A.-	Estudio De La Capacidad De Compuestos Naturales Presentes En Los Alimentos Para Interferir En Los Procesos De Biotransformación Del Etanol En Tejido Mamario De Rata En La Etapa De Post Lactación	164
IV.A.1.-	Fracción citosólica.	164
IV.A.1.1.-	Efecto de polifenoles y ácido fólico sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica.	164
IV.A.1.1.1.-	Actividad de xantina oxido reductasa en tejido mamario de rata. Inhibición por algunos de los compuesto naturales ensayados.	173
IV.A.1.2.-	Efecto de compuestos azufrados habituales en la dieta sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica.	175
IV.A.1.3.-	Efecto de terpenos habituales en la dieta sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica.	177
IV.A.2.-	Fracción microsomal.	179
IV.A.2.1.-	Efecto de polifenoles y sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal.	179
IV.A.2.2.-	Efecto de compuestos azufrados habituales en la dieta sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal.	186
IV.A.2.3.-	Efecto de terpenos habituales en la dieta sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal.	189
IV.A.2.4.-	Efecto de conocidos inhibidores de lipoxigenasas sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal.	191
IV.B.-	Estudio De La Influencia Del Estado Fisiológico Sobre La Capacidad Del Tejido Mamario Para Metabolizar El Etanol A Acetaldehído	193
IV.B.1.-	Influencia del estado fisiológico sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica.	193
IV.B.2.-	Actividad de xantina oxido reductasa en tejido mamario de rata en función del estado fisiológico.	195
IV.B.3.-	Influencia del estado fisiológico sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal.	197

IV.C.-	Estudio Del Efecto Inductor Del Consumo Repetitivo De Alcohol Sobre La Actividad Biotransformadora Del Etanol A Acetaldehído	199
I. IV.C.1.-	Efecto inductor del consumo repetitivo de alcohol sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica y microsomal.	199
Tabla 1:	Contenido de alcohol en una estándar.	6
IV.D.-	Determinación De La Actividad Alcohol Deshidrogenasa Y Aldehído Deshidrogenasa En El Tejido Mamario De Rata En La Etapa De Post Lactación	202
Tabla 3:	Clasificación de la OMS de los países sobre la base de los índices de mortalidad en niños y en adultos.	20
IV.D.1.-	Actividad aldehído deshidrogenasa en distintas fracciones del tejido mamario de rata en etapa de post lactación.	202
IV.D.2.-	Actividad alcohol deshidrogenasa en la fracción citosólica de tejido mamario de rata en etapa de post lactación.	204
Tabla 5:	Características demográficas de las regiones del continente americano, 2000.	22
V.-	DISCUSION	205
Tabla 6:	Porcentaje y número de casos de cáncer en todo el mundo atribuido al alcohol, 1990.	24
VI.-	CONCLUSIONES	222
VII.-	BIBLIOGRAFIA	226
Tabla 7:	Promedio de consumo de alcohol en función del sexo y de la edad.	226
VIII.-	ABREVIATURAS	264
Tabla 8:	Distribución de casos por cáncer de mama 1997-2001.	264
IX.-	APENDICE	269
Tabla 9:	ARGENTINA: número de casos en mujeres por sitio tumoral y grupo de edad. 1997-2001.	269
IX.A.-	Publicaciones	270
Tabla 10:	Resumen de los factores de riesgo para el cáncer de mama.	27
IX.B.-	Presentaciones A Congresos	271
Tabla 11:	Etapas de la intoxicación con alcohol.	77
Tabla 12:	Factores que afectan la absorción del etanol.	79
Tabla 13:	Contenido de alcohol de algunas bebidas típicas.	82
Tabla 14:	Contenido de alcohol (%) en distintos tragos.	82
Tabla 15:	Actividad de la alcohol deshidrogenasa sobre varios órganos de rata.	89
Tabla 16:	Alcohol deshidrogenasa (ADh). Polimorfismo en mamíferos.	90
Tabla 17:	Flavonoides: estructura general, sustituyentes y fuentes alimentaria.	134
Figura 1:	Corte histológico de tejido mamario humano en etapa de reposo.	47
Figura 2:	Corte histológico de tejido mamario humano en etapa de lactación.	47
Figura 3:	Tasas ajustadas de mortalidad para los principales sitios tumorales	53