



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

***ESTUDIO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ETANOL EN
EL ÚTERO DE RATA Y SU RELACIÓN CON LA TOXICIDAD
REPRODUCTIVA DEL ALCOHOL***

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología mención Química

LARA ROMINA BUTHET

Director de Tesis: Gerardo Daniel Castro

Lugar de Trabajo: CEITOX - UNIDEF

2013

RESUMEN

Los estudios epidemiológicos realizados en diferentes países incluyendo Argentina evidencian que el abuso del alcohol en la mujer es un problema de creciente interés. Como es de esperarse, la incidencia aumentada del hábito de beber se observa particularmente en los grupos de mujeres jóvenes. Es previsible que el número de bebedoras adultas se incremente en las próximas décadas. En tal sentido, es importante considerar que debido a las diferencias en el metabolismo del alcohol, la mujer en comparación con el hombre, se encuentra frente a un riesgo mayor de consecuencias negativas asociadas con el consumo de grandes cantidades de alcohol.

Se han reportado consecuencias dañinas del abuso de alcohol en la mujer. El alcohol altera severamente el ciclo menstrual normal. Es conocido que la mujer alcohólica presenta una variedad de desórdenes menstruales y reproductivos, desde ciclos irregulares, ausencia de ovulación, infertilidad y anticipación de la menopausia. Algunos investigadores estudiaron la causa de infertilidad en 3800 mujeres y reportaron que la ingesta moderada de alcohol estaba relacionada con un riesgo pequeño pero significativo de infertilidad y un riesgo incrementado para la endometriosis. Otros trabajos concluyeron que la probabilidad de un embarazo exitoso disminuía con el aumento en el consumo de alcohol. Un efecto tóxico sobre las funciones del ovario constituye una de las varias causas de infertilidad. El alcohol también puede afectar la implantación en el desarrollo temprano del blastocito.

Estos desórdenes reproductivos provocados por el hábito de beber también involucran alteraciones significativas de factores hormonales críticos, que incluyen la asociación con niveles aumentados de estrógenos plasmáticos en mujeres pre- y post-menopáusicas, y con niveles reducidos de progesterona en mujeres pre-menopáusicas.

Sin embargo, no todos los efectos del alcohol sobre los órganos reproductivos y los tejidos asociados pueden explicarse solo en términos de estas alteraciones endocrinas. La posibilidad de que el daño directo tanto del alcohol como de sus productos de biotransformación esté involucrado en esas alteraciones merece considerarse. Esto parece ser el caso para los efectos tóxicos de la ingesta de alcohol sobre el tejido mamario, la próstata y el ovario. Varios estudios han hecho evidente también un riesgo aumentado para cáncer cervical, vulvar y vaginal entre las mujeres

alcohólicas respecto de la población general. Sin embargo, estos hallazgos no se confirmaron en estudios poblacionales, en los que se ajustaron los factores de confusión. Por su parte, los cánceres de endometrio, cuerpo del útero y de ovario no parecen estar relacionados con el consumo de alcohol.

En el presente trabajo se intentó verificar si los cuernos de útero de rata tienen capacidad propia para metabolizar el etanol a acetaldehído y detoxificarlo luego a metabolitos menos tóxicos. Asimismo se investigó si el acetaldehído producido se acumula por un tiempo suficiente en el tejido uterino, de modo que le permita interactuar con moléculas relevantes y esto conducir a efectos dañinos. Se analizó la posibilidad que, al menos en parte, estos efectos fueran provocados por la oxidación del etanol a acetaldehído in situ.

Se encontró que la administración repetida de alcohol mediante la dieta líquida de Lieber y De Carli por 28 días produjo severas alteraciones en el cuerno uterino de la rata. Estas alteraciones descritas resultaron independientes del estado en el ciclo estral de los animales al momento de su sacrificio.

En la fracción citosólica del tejido de cuerno uterino de rata se observó que puede oxidar al etanol en una reacción mediada por la xantina oxidoreductasa. Esto fue comprobado mediante estudios bioquímicos y la enzima se detectó por histoquímica en la capa epitelial. Por otra parte con esta metodología se detectó aldehído deshidrogenasa en las capas muscular y serosa. También se encontró un proceso microsomal que no requirió NADPH, de naturaleza enzimática y dependiente de oxígeno. El mismo fue inhibido por dietilditiocarbamato, difenilenedionio, esculetina y ácido nordihidroguayarático.

La generación de acetaldehído in situ puede dañar el tejido uterino. Se conoce que el acetaldehído es un compuesto mutagénico, carcinogénico y citotóxico capaz de reaccionar con moléculas relevantes de la célula (proteínas, lípidos, glutatión, ADN, etc.). Muchos autores postulan que la disminución en el contenido de glutatión es la causa determinante para explicar el estrés oxidativo observado por la acción del etanol, particularmente en sitios extrahepáticos.

Los experimentos donde se observó un incremento en la emisión de quimioluminiscencia pusieron en evidencia la condición de susceptibilidad al estrés oxidativo que presenta el cuerno de útero de rata luego de la exposición repetida al

alcohol. La relevancia de haber demostrado que el cuerno uterino es capaz de oxidar el etanol a acetaldehído, se hace evidente en las alteraciones ultraestructurales observadas en el tejido en animales expuestos repetidamente al alcohol. Este planteo surge como resultado de la susceptibilidad que presenta el útero frente a condiciones de estrés oxidativo.

La presencia de pasos metabólicos en el cuerno uterino capaces de oxidar al etanol a acetaldehído sumado al hecho que se detectó una actividad baja para su destrucción mediante la aldehído deshidrogenasa, sugiere una tendencia a la acumulación de acetaldehído durante la exposición al etanol. Esto probó ser el caso en los experimentos desarrollados. Los resultados sugieren claramente que el acetaldehído producido in situ o aquel proveniente de la contribución de otros sitios del organismo por vía sanguínea permanecerá un tiempo suficiente para tener la oportunidad de reaccionar con moléculas críticas y causar así efectos dañinos.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.I.	El Alcance del Problema	2
1.I.1.	Consumo episódico intenso	4
1.I.2.	El alcohol y la Argentina	6
1.II.	Toxicocinética del Etanol	13
1.II.1.	Biotransformación del etanol. Enzimología	18
1.II.1.1.	Deshidrogenasas piridín-dependientes	20
1.II.1.1.1.	Alcohol deshidrogenasa	20
1.II.1.2.	Proteínas ferrosulfatadas y citocromos	22
1.II.1.2.1.	Sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS)	22
1.II.1.3.	Oxigenasas	25
1.II.1.4.	Deshidrogenasas flavín-dependientes	25
1.II.1.4.1.	Citocromo P450 reductasa	26
1.II.1.4.2.	Xantino oxidoreductasa	27
1.II.1.5.	Catalasa y peroxidasa	29
1.II.1.5.1.	Catalasa	29
1.II.1.5.2.	Peroxidasa	31
1.II.1.6.	Lipoxigenasas	31
1.II.1.7.	Oxidación no enzimática del etanol	33
1.II.1.8.	Metabolismo no oxidativo del etanol	35
1.II.1.9.	Metabolismo del acetaldehído	36
1.II.1.9.1.	Aldehído oxidasa	36
1.II.1.9.2.	Aldehído deshidrogenasa	37
1.II.1.9.3.	Sistema de oxidación microsomal de acetaldehído	40
1.III.	Descripción del Sistema Reprodutor Femenino	41
1.III.1.	Ovarios	44
1.III.2.	Útero, cervix y vagina	45
1.III.2.1.	Útero	45
1.III.2.2.	Vagina	46
1.III.3.	El ciclo menstrual	46
1.IV.	El Sistema Reprodutor de la Rata Hembra	47
1.IV.1.	Ovario y oviducto	47
1.IV.2.	Útero	48
1.IV.3.	La pubertad en la rata	48
1.IV.4.	Descripción de los cambios hormonales en el ciclo de la mujer y en la rata	49
1.V.	Toxicología Reproductiva Femenina	52
1.V.1.	Patologías reproductivas	54
1.V.2.	Mecanismos de acción de las sustancias tóxicas sobre el sistema reproductor	56
1.V.3.	Mecanismos de acción de sustancias tóxicas en el sistema reproductor de la rata hembra	60
1.VI.	El Alcohol y su Relación con las Patologías Reproductivas en la Mujer	63
1.VI.1.	La evidencia epidemiológica	63
1.VI.1.1.	La infertilidad	63

1.VI.1.2.	Los abortos espontáneos	63
1.VI.1.3.	Los síntomas menstruales	64
1.VI.1.4.	Los tumores ginecológicos	64
1.VI.2.	Efectos del alcohol sobre la regulación del sistema hipotalámico-hipofisario- gonadal	66
1.VI.2.1.	Alteraciones en el desarrollo del sistema hipotalámico-hipofisario-gonadal durante la pubertad en relación con el consumo de alcohol	68
1.VI.3.	Alcohol, estrés oxidativo asociado y reproducción femenina	71
1.VI.3.1.	Edad	71
1.VI.3.2.	Peso corporal	71
1.VI.3.3.	Alcohol y estrés oxidativo	72
1.VI.3.4.	Especies reactivas de nitrógeno	73
1.VI.3.5.	Mecanismos de defensa	74
2.	OBJETIVOS	76
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.I.	Materiales	80
3.I.1.	Sustancias químicas	80
3.I.2.	Equipamiento utilizado	81
3.I.3.	Animales y tratamientos	82
3.I.3.1.	Animales	82
3.I.3.2.	Tratamientos	83
3.I.3.2.1.	Protocolo de administración de la dieta líquida Lieber & De Carli estándar	83
3.I.3.2.2.	Protocolo de administración para la intoxicación aguda por vía oral	83
3.II.	Métodos	84
3.II.1.	Aislamiento de diferentes fracciones celulares purificadas	84
3.II.1.1.	Obtención de las fracciones citosólica y microsomal de cuernos de útero	84
3.II.1.2.	Aislamiento de la fracción mitocondrial para la medición de la actividad de aldehído deshidrogenasa	85
3.II.2.	Determinación del contenido de proteínas	86
3.II.3.	Medición de la actividad biotransformadora de etanol a acetaldehído en diferentes fracciones celulares de cuerno de útero de rata	86
3.II.3.1.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal	86
3.II.3.2.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica	88
3.II.4.	Procedimiento analítico para la medición de acetaldehído en fase gaseosa	89
3.II.5.	Medición de la actividad biotransformadora de etanol a acetaldehído en diferentes fracciones celulares luego del consumo repetido de alcohol	89
3.II.6.	Procedimientos histoquímicos para la detección de las actividades enzimáticas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa	89

3.II.7.	Procedimiento histoquímico para la detección de la actividad enzimática de xantino oxidoreductasa	90
3.II.8.	Detección de radicales hidroxilo y 1-hidroxietilo por spin trapping y análisis de sus aductos por cromatografía gaseosa – espectrometría de masas	91
3.II.8.1.	Procesamiento de la muestra biológica	91
3.II.8.2.	Caracterización de los aductos de espín de referencia	92
3.II.8.3.	Procedimiento analítico para la detección de los aductos con PBN	93
3.II.9.	Determinación de las actividades alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa por espectrofotometría	93
3.II.9.1.	Determinación de la actividad alcohol deshidrogenasa	94
3.II.9.2.	Determinación de la actividad aldehído deshidrogenasa	95
3.II.10.	Determinación de los niveles de etanol en diferentes tejidos <i>in vivo</i>	96
3.II.10.1.	Incubación de tejidos hepático y de cuerno uterino	96
3.II.10.2.	Incubación de plasma	96
3.II.10.3.	Procedimiento de análisis de niveles de etanol por GC-FID	97
3.II.11.	Determinación de los niveles de acetaldehído en diferentes tejidos <i>in vivo</i>	97
3.II.11.1.	Incubación de tejidos hepático y de cuerno uterino	97
3.II.11.2.	Incubación de plasma	98
3.II.11.3.	Procedimiento de análisis de niveles de acetaldehído por GC-FID	98
3.II.12.	Biomarcadores de estrés oxidativo	98
3.II.12.1.	Determinación del contenido de grupos carbonilo proteicos	99
3.II.12.2.	Disminución del contenido de grupos sulfhidrilo proteicos	100
3.II.12.3.	Determinación de lipohidroperóxidos	100
3.II.12.4.	Determinación de quimioluminiscencia inducida por peróxidos en fracciones celulares u homogenatos de tejido	102
3.II.12.5.	Determinación del contenido total de glutatión, glutatión reducido y glutatión oxidado	103
3.II.13.	Microscopía electrónica de transmisión	105
3.II.14.	Tratamiento estadístico de los datos	106
4.	RESULTADOS	107
4.I.	Observaciones generales en las ratas hembras expuestas a la intoxicación crónica con alcohol	108
4. II.	Oxidación del etanol a acetaldehído en la fracción microsomal de cuernos de útero de rata	110
4.II.1.	Efecto del cofactor FAD sobre la oxidación del etanol en la fracción microsomal	112
4.III.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica de cuernos de útero de rata	114
4.IV.	Actividad de alcohol deshidrogenasa y de aldehído deshidrogenasa en hígado y cuerno de útero de rata	116
4.V.	Actividad xantino oxidasa en cuernos de útero	118

4.VI.	Determinación de los niveles de etanol in vivo en tejidos de animales intoxicados en forma aguda con alcohol	119
4.VII.	Determinación de los niveles de acetaldehído in vivo en diferentes tejidos de animales intoxicados en forma aguda con etanol	121
4.VIII.	Efecto del consumo repetido de alcohol sobre la biotransformación del etanol a acetaldehído	123
4.VIII.1.	Biotransformación en la fracción microsomal	123
4.VIII.2.	Biotransformación en la fracción citosólica	124
4.IX.	Efecto de la exposición al alcohol sobre parámetros vinculados con el daño oxidativo en cuernos de útero	125
4.IX.1.	Determinación del contenido de carbonilos proteicos en animales expuestos repetidamente al alcohol	125
4.IX.2.	Determinación del contenido en grupos sulfidrilo proteicos en animales expuestos repetidamente al alcohol	125
4.IX.3.	Formación de radicales libres hidroxilo y 1-hidroxietilo en la biotransformación del etanol en fracciones celulares de cuerno de útero de rata	126
4.IX.3.1.	Fracción microsomal	126
4.IX.3.2.	Fracción citosólica	126
4.IX.4.	Determinación de quimioluminiscencia inducida por hidroperóxidos en cuernos de útero de animales expuestos repetidamente al alcohol	131
4.IX.5.	Determinación de lipohidroperóxidos en tejido de cuerno de útero de animales expuestos repetidamente al alcohol	132
4.IX.6.	Efecto de la intoxicación alcohólica sobre los niveles de glutatión en tejido de cuernos de útero e hígado	133
4.X.	Alteraciones ultraestructurales en el tejido de cuernos de útero de ratas expuestas repetidamente al alcohol	134
5.	DISCUSIÓN	137
6.	CONCLUSIONES	153
7.	BIBLIOGRAFÍA	156
8.	ABREVIATURAS	188
9.	APÉNDICE	192
9.I.	Publicaciones	193
9.II.	Presentaciones a Congresos	193

ÍNDICE DE TABLAS

1.	INTRODUCCIÓN	
Tabla I.	Historia de consumo por edad y sexo en Argentina	10
Tabla II.	Tipo de consumidor por edad y género, Argentina	12
Tabla III.	Enzimas que intervienen en la oxidación del etanol	18
Tabla IV.	Distintas clases de aldehído deshidrogenasa	38
Tabla V.	Comportamiento y citología vaginal en las fases del ciclo estral de la rata	51
Tabla VI.	Disfunciones reproductivas habituales en la mujer	55
Tabla VII.	Factores que pueden afectar la función reproductiva en la mujer	58
Tabla VIII.	Patologías asociadas con el consumo de alcohol en las mujeres	66
Tabla IX.	Efectos del alcohol sobre el sistema endocrino en adolescentes y animales	70
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
Tabla X.	Sustancias químicas utilizadas	80
Tabla XI.	Esquema de preparación de mezclas de incubación con microsomas	87
Tabla XII.	Esquema de preparación de mezclas de incubación con citosol	88
Tabla XIII.	Determinación de la actividad ALDH en diferentes fracciones celulares	95
Tabla XIV.	Determinación de lipohidroperóxidos en cuernos de útero de rata	101
Tabla XV.	Esquema experimental para la determinación del contenido de glutatión total y reducido en tejidos de rata	105
4.	RESULTADOS	
Tabla XVI.	Observaciones macroscópicas en los úteros de animales expuestos repetitivamente al alcohol	108
Tabla XVII.	Diferencias en el ciclo estral entre animales intoxicados repetidamente con etanol y sus respectivos controles	109
Tabla XVIII.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal de cuernos de útero de rata	111
Tabla XIX.	Efecto del cofactor FAD sobre la biotransformación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal de cuernos de útero de rata	113
Tabla XX.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica de cuernos de útero de rata	115
Tabla XXI.	Actividades de alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en hígado y cuerno de útero de rata	116
Tabla XXII.	Niveles de etanol in vivo en hígado, cuerno de útero y plasma en función del tiempo, luego de la intoxicación aguda con alcohol	120

Tabla XXIII.	Niveles de acetaldehído in vivo en hígado, cuerno de útero y plasma en función del tiempo, luego de la intoxicación aguda con alcohol	122
Tabla XXIV.	Efecto del consumo repetido de alcohol sobre la oxidación del etanol a acetaldehído en la fracción microsomal	123
Tabla XXV.	Efecto del consumo repetido de alcohol sobre la oxidación del etanol a acetaldehído en la fracción citosólica	124
Tabla XXVI.	Contenido de grupos carbonilo proteicos en tejido de cuerno de útero de ratas expuestas repetidamente al alcohol	125
Tabla XXVII.	Contenido de grupos sulfhidrilo proteicos en tejido de cuerno de útero de ratas expuestas repetidamente al alcohol	126
Tabla XXVIII.	Contenido de glutatión en tejidos de cuerno de útero y hepático de ratas expuestas repetidamente al alcohol	133

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	INTRODUCCIÓN	
Figura 1.	Consumo <i>per capita</i> en el total de adultos mayores de 15 años, en litros de alcohol puro, año 2005	3
Figura 2.	Prevalencia de episodios de consumo fuerte de alcohol en varones, año 2004	4
Figura 3.	Prevalencia de episodios de consumo fuerte de alcohol en mujeres, año 2004	5
Figura 4.	Prevalencias de vida de consumo de bebidas alcohólicas de la población de 16 a 65 años según región estadística por sexo. Localidades de cinco mil y más habitantes	7
Figura 5.	Prevalencias de vida de consumo de bebidas alcohólicas de la población de 16 a 65 años según agrupamiento urbano por sexo. Localidades de cinco mil y más habitantes	8
Figura 6.	Alcoholemia en función del tiempo	14
Figura 7.	Posibles consecuencias del metabolismo de xenobióticos	17
Figura 8.	Principales vías de metabolización del etanol y su ubicación celular	19
Figura 9.	Localización del sistema citocromo P450 en la membrana del retículo endoplásmico	27
Figura 10.	Mecanismo no enzimático de la oxidación del etanol	34
Figura 11.	Órganos reproductores femeninos	41
Figura 12.	Eje hipotalámico pituitario gonadal femenino	42
Figura 13.	Sistema reproductor de la rata hembra	47
Figura 14.	Cambios hormonales en el ciclo de la mujer y en el de la rata	49
Figura 15.	Ciclo de desarrollo y maduración sexual	54
Figura 16.	Mecanismos de toxicidad reproductiva	56
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
Figura 17.	Aislamiento de las fracciones microsomal y citosólica	84
Figura 18.	Aislamiento de la fracción mitocondrial	85
4.	RESULTADOS	
Figura 19.	Fotografías de cuernos de útero de animales intoxicados y los respectivos controles	109
Figura 20.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal de cuernos de útero de rata (representación gráfica de la Tabla XVIII)	112
Figura 21.	Efecto del cofactor FAD sobre la oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción microsomal de cuernos de útero (representación gráfica de la Tabla XIX)	113
Figura 22.	Oxidación de etanol a acetaldehído en la fracción citosólica de cuernos de útero de rata (representación gráfica de la Tabla XX)	114
Figura 23.	Actividad aldehído deshidrogenasa en cuernos de útero de rata	117

Figura 24.	Actividad xantino oxidasa en cuernos de útero de rata	118
Figura 25.	Niveles de etanol in vivo en útero, hígado y plasma en función del tiempo, luego de una dosis única de alcohol (representación gráfica de la Tabla XXII)	119
Figura 26.	Niveles de acetaldehído in vivo en útero, hígado y plasma en función del tiempo, luego de una dosis única de etanol (representación gráfica de la Tabla XXIII)	121
Figura 27.	Perfil cromatográfico obtenido por monitoreo selectivo de iones de muestras de incubación conteniendo fracción microsomal de cuernos de útero, etanol y PBN	127
Figura 28.	Perfil cromatográfico obtenido por monitoreo selectivo de iones de muestras de incubación conteniendo fracción microsomal de hígado, etanol y PBN	128
Figura 29.	Perfil cromatográfico obtenido por monitoreo selectivo de iones de muestras de incubación conteniendo fracción citosólica de cuernos de útero, etanol y PBN	129
Figura 30.	Perfil cromatográfico obtenido por monitoreo selectivo de iones de muestras de incubación conteniendo fracción citosólica de hígado, etanol y PBN	130
Figura 31.	Quimioluminiscencia iniciada por t-butilhidroperóxido en homogenato de cuernos de útero de rata intoxicada repetidamente con etanol. La medición comienza con el agregado de de t-butilhidroperóxido 3mM	131
Figura 32.	Niveles de lipohidroperoxidos detectados por la formación del complejo de naranja de xilenol en cuernos de útero de rata	132
Figura 33A.	Microfotografía de transmisión electrónica de la mucosa de cuernos de útero en la rata control	134
Figura 33B.	Microfotografía de transmisión electrónica de la mucosa de cuernos de útero en la rata control	135
Figura 34A.	Microfotografía de transmisión electrónica de la mucosa de cuernos de útero en la rata intoxicada con alcohol	136
Figura 34B.	Microfotografía de transmisión electrónica de la mucosa de cuernos de útero en la rata intoxicada con alcohol	136