

# STRESS OSSIDATIVO ALCOL-CORRELATO E DIFFERENZE DI GENERE

Eleonora Barlocchi (a), Mauro Ceccanti (b), Rosanna M. Fidente (a), Rosa Draisci (a),  
Rosanna Mancinelli (a)

(a) *Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Riferimento Alcolologico, Regione Lazio, Roma*

## Introduzione

La regolazione ossidoriduttiva (o redox) gioca un ruolo fondamentale per la vita e il corretto funzionamento della cellula. La condizione di equilibrio ossidativo è dinamica ed essenziale per le funzioni fisiologiche della cellula in quanto molte proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali (recettori, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione) sono sensibili alle alterazioni anche lievi di tale equilibrio. Variazioni di piccola entità hanno quindi significato fisiologico di “modulazione” (1).

Quando, però, per motivi endogeni (patologie) o esogeni (esposizione a sostanze, radiazioni ionizzanti), intervengono fattori che alterano la omeostasi redox, si genera il cosiddetto stress ossidativo cioè la condizione patologica causata dalla rottura dell’equilibrio fisiologico, in un organismo vivente, fra la produzione di specie chimiche ossidanti e la loro eliminazione da parte dei sistemi di difesa antiossidanti (2). Alterazioni vere e proprie di tale equilibrio inducono stress ossidativo elevato e prolungato nel tempo con gravi disfunzioni funzionali, danni cellulari, apoptosi, necrosi, modificazioni epigenetiche. Lo squilibrio redox che compare in un processo patologico può essere la causa iniziale del fenomeno patologico, ma anche l’effetto finale del processo patologico. Riuscire a chiarire questi aspetti e quindi a comprendere il ruolo dello stress ossidativo nell’evento patologico può contribuire significativamente alla scelta dell’approccio terapeutico e al successo dell’intervento.

È noto che il consumo alcolico può generare stress ossidativo e questo è uno degli effetti più significativi che l’alcol induce a livello cellulare e che sono sotto il controllo di segnali genetici e molecolari (3). L’alcol induce stress ossidativo sia con azione diretta aumentando la produzione di specie chimiche ossidanti, sia con azione indiretta riducendo la capacità antiossidante della cellula. Le conseguenze sono alterazioni di lipidi e proteine e modificazioni epigenetiche del DNA che è particolarmente sensibile agli effetti dello stress ossidativo.

Il cervello è uno dei principali organi affetti dall’azione dell’alcol e studi recenti dimostrano che lo stress ossidativo alcol-correlato colpisce soprattutto il cervello (4). Ciò accade perché il cervello è di “per sé” un forte generatore di specie ossidanti in quanto utilizza il 20% dell’ossigeno dell’intero organismo, e anche perché il sistema antiossidante cerebrale è meno efficace ed efficiente di quello di altri organi come fegato e reni. È stato dimostrato anche che lo stress ossidativo alcol-correlato può contribuire in maniera significativa al danno prenatale che è influenzato da un insieme multifattoriale di fattori endogeni ed esogeni che lo modulano con meccanismi molecolari diversi. Tra i fattori coinvolti nella azione patogena alcol-correlata, nell’adulto come nel feto, lo stress ossidativo svolge un ruolo significativo tanto che molti studi clinici sono oggi focalizzati proprio su questo aspetto.

Il presente lavoro riporta sinteticamente alcune evidenze dalla letteratura recente e discute criticamente alcuni dei risultati di sperimentazioni cliniche condotte dagli autori.

## Metabolismo dell'alcol e stress ossidativo

Il metabolismo dell'etanolo comporta la scissione della molecola ad anidride carbonica e acqua attraverso gli intermedi acetaldeide e acetato. L'etanolo ingerito è convertito dall'alcol deidrogenasi nell'aldeide corrispondente cioè l'acetaldeide. Questa molecola viene a sua volta convertita dall'aldeide deidrogenasi mitocondriale ad acetato che entrerà nella biosintesi di molecole più complesse (acidi grassi) o nel ciclo di Krebs. Il metabolismo dell'alcol è influenzato da fattori genetici poiché dipende dal polimorfismo genetico degli enzimi coinvolti, ma anche ambientali poiché è soggetto ad induzione dovuta ad esposizione all'etanolo stesso o ad altri xenobiotici (5). Le vie metaboliche dell'alcol sono tre:

### 1. *Alcol-deidrogenasi (Alcohol DeHydrogenases, ADH)*

È il principale enzima coinvolto nella biotrasformazione dell'etanolo. Presenta ampia specificità di substrato ed è una proteina citosolica codificata da una famiglia poligenica (sette geni) localizzata sul cromosoma 4. Nell'uomo il metabolismo dell'etanolo mostra una notevole variabilità dovuta alla genetica e in particolare al polimorfismo dell'allele ADH2. È stato dimostrato che l'isoforma gastrica dell'ADH presente nella donna è meno attiva di quella dell'uomo e questo genera significative differenze di genere nel metabolismo dell'alcol (6). L'attività dell'ADH dipende anche dall'età: nel bambino, nell'adolescente e nell'anziano è minore rispetto a quella dell'adulto (7). Le possibili varianti enzimatiche compaiono con diversa frequenza tra popolazioni di diversa etnia e si stanno studiando le possibili correlazioni tra tali varianti e il rischio teratogeno dell'alcol. In particolare, si sta valutando l'ipotesi che il genotipo ADH2 sia materno che fetale possa essere collegato alla suscettibilità alla insorgenza di *Fetal Alcohol Spectrum Disorders* (FASD) (8).

### 2. *Citocromo P4502E1 (CYP2E1)*

È caratterizzato da un'affinità per l'etanolo molto più bassa di quella dell'ADH. In caso di consumo moderato è responsabile dell'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide solo per una quota del 10% circa. Quando il consumo alcolico aumenta o a seguito di assunzione cronica, l'ADH viene saturata e il contributo di CYP2E1 diventa rilevante. Il metabolismo catalizzato da CYP2E1 converte l'etanolo ad acetaldeide che viene a sua volta ossidata con rilascio di radicali liberi. Il citocromo P450 2E1 (CYP2E1) è inducibile dall'etanolo e contribuisce ad aumentare stress ossidativo e steatosi nei modelli di esposizione cronica ad alcol. Inoltre, a seguito di consumo cronico di alcol, CYP2E1 aumenta la clearance dell'etanolo e contribuisce all'instaurarsi della tolleranza metabolica in parallelo alla tolleranza del sistema nervoso centrale. A prova del fatto che il CYP2E1 è inducibile dall'etanolo, molti studi dimostrano che il contenuto di CYP2E1 aumenta da 4 a 10 volte in biopsie epatiche di persone che abbiano bevuto di recente (9) Nei bevitori cronici l'etanolo viene quindi convertito ad acetaldeide molto più velocemente e si liberano più radicali liberi. Il *binge drinking* è un ulteriore fattore di rischio di danno associato all'induzione di CYP2E1 (10).

### 3. *Catalasi*

È un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno. Partecipa solo in minima parte al metabolismo dell'alcol, arrivando a non più del 10%, quando l'alcolemia è molto elevata.

Tutte e tre le vie metaboliche portano alla formazione di acetaldeide e di radicali liberi (*Reactive Oxygen Species* ROS). L'acetaldeide è una molecola estremamente tossica

responsabile in gran parte degli effetti negativi dell'alcol (11). L'acetaldeide è molto reattiva e tende a formare addotti proteici e lipidici, stimolando la risposta linfocitaria e macrofagica del nostro organismo con conseguente produzione di citochine e specie reattive dell'ossigeno e quindi flogosi e alterazioni immunitarie (12). Inoltre l'acetaldeide riduce la disponibilità di antiossidanti a livello epatico, causando la deplezione di glutatione e di SAM (S-adenosil metionina): la diminuzione di glutatione riduce la difesa dai radicali liberi, e la deplezione di SAM, che comporta una ipo-metilazione degli acidi nucleici della cellula, potrebbe essere correlabile con una maggiore probabilità di cancerogenesi. Per quanto riguarda i radicali liberi, in caso di consumo eccessivo l'alcol induce aumento della produzione di ROS a livello mitocondriale con effetti anche sul DNA che è particolarmente suscettibile allo stress ossidativo (13). Il principale agente ossidante il DNA è il radicale idrossilico (HO•) che si attacca a diversi siti reattivi presenti sulle basi azotate e sul gruppo zuccherino fosforilato, provocando modificazioni epigenetiche quali idrossilazione, apertura dell'anello o frammentazione. A seguito della iperproduzione di ROS aumenta anche la sintesi di malondialdeide che è il principale prodotto della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi ed è causa di citotossicità nelle cellule causando degradazione delle membrane plasmatiche con conseguenze patologiche come aterosclerosi, invecchiamento cellulare, malattie cardiovascolari ed epatiche. La malondialdeide inoltre è in grado di reagire con la deossiadenosina e deossiguanina nel DNA formando composti mutageni precursori di carcinogenesi.

Globalmente, nel determinare gli effetti dell'alcol entrano in gioco fattori genetici come l'etnia e il genere, epigenetici e ambientali e ciò giustifica l'elevata differenza individuale nella risposta all'alcol.

## **Alcol, stress ossidativo e differenze di genere: evidenze sperimentali**

Nel corso degli anni, gli studi alcolologici stanno dimostrando che esistono significative differenze di genere nella risposta fisiologica all'alcol e che è necessario approfondire gli studi *gender-oriented* (14). Questa evidenza e le numerose prove del ruolo dello stress ossidativo nell'insorgenza di patologie alcol-correlate, hanno indotto il nostro gruppo di ricerca ad approfondire gli studi sperimentali sulle differenze di genere in relazione allo stress ossidativo. Sono state quindi studiate popolazioni diverse di uomini e donne alcolisti cronici per valutare eventuali differenze di genere, efficacia/efficienza diagnostica di biomarkers diversi, fattibilità/praticabilità di diverse procedure analitiche.

Lo studio dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (radicale idrossile, anione superossido, perossido di idrogeno, ossigeno singoletto), i cosiddetti ROM (*Reactive Oxygen Metabolites*), è stato effettuato tramite test colorimetrico che misura la capacità ossidante del plasma nei confronti di un cromogeno (un'ammina aromatica modificata) che funge da indicatore. La popolazione di pazienti alcolisti esaminati era costituita da uomini e donne di età comparabile intorno ai 45 anni, ma con differente tempo di esposizione ad alcol in quanto gli uomini avevano iniziato a bere mediamente 10 anni prima delle donne. I risultati dimostrano che, globalmente, la media dei valori dei ROM degli alcolisti è significativamente più alta rispetto alla popolazione di controllo ( $p < 0,05$ ) ma l'analisi separata per genere dimostra significatività per le donne ( $p < 0,005$ ) ma non per gli uomini:  $p = 0,17$  (15). Studi successivi sono stati effettuati per verificare i livelli di malondialdeide (MDA) plasmatica che è considerata, insieme ai suoi addotti, uno dei più affidabili bioindicatori di stress ossidativo anche in ambito neonatologico (16). I risultati dell'analisi della malondialdeide, dosata tramite procedura HPLC

(*High-Performance Liquid Chromatography*), dimostrano nelle donne alcoliste concentrazioni di MDA significativamente più alte che nei controlli ( $p < 0,0001$ ). Allo studio della malondialdeide è stato quindi associato lo studio di altri bioindicatori di stress ossidativo cioè la capacità antiossidante e la concentrazione di specie reattive dell'ossigeno nel sangue. Tali bioindicatori sono stati rispettivamente determinate con il FORT (*Free Oxygen Radicals Test*) e il test FORD (*Free Oxygen Radicals Defence*), test rapidi colorimetrici per la misura nel sangue intero dei livelli di radicali liberi e di difese antiossidanti (17). I risultati ottenuti confermano che nelle donne i livelli di stress ossidativo sono più alti e quindi è maggiore il rischio per la salute femminile e anche per il feto in caso di esposizione alcolica prenatale. Infatti, studi recenti stanno aprendo nuove conoscenze sul ruolo dello stress ossidativo nel determinare l'effetto teratogeno dell'alcol e sui meccanismi biologici implicati.

## Stress ossidativo ed effetto teratogeno dell'alcol

L'esposizione alcolica causa aumento dello stress ossidativo negli organi in via di sviluppo incluso il cervello e anche una breve esposizione può produrre alterazione dell'equilibrio redox. Recenti sperimentazioni su modelli animale di FASD dimostrano chiaramente che l'azione diretta dell'alcol tramite iperproduzione di ROS, e la azione indiretta tramite disregolazione dei sistemi antiossidanti endogeni sono implicati nella patologia dei disordini del neuro-sviluppo (18).

Anche un'esposizione alcolica occasionale può produrre squilibrio dello stato redox intracellulare e produrre danno soprattutto a livello cerebrale. Il cervello, infatti, è particolarmente sensibile alle variazioni redox perché è un forte generatore di ROS (fosforilazione ossidativa) utilizzando il 20% dell'ossigeno consumato dall'intero organismo. Inoltre ha un alto contenuto di ferro e i neurotrasmettitori come dopamina, serotonina, norepinefrina, possono reagire spontaneamente con l'ossigeno generando ioni superossido. Si ipotizza che l'etanolo induca la iper-produzione di ROS aumentando l'attività di xantina ossidasi e NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) ossidasi. Inoltre sembra che l'alcol diminuisca la capacità antiossidante intracellulare riducendo il glutathione ridotto e l'attività di SOD (*Super Oxidase Dismutase*), catalasi, glutathione perossidasi, glutathione reduttasi nelle cellule fetali dove peraltro le difese antiossidanti sono inferiori rispetto all'adulto.

Lo squilibrio redox subito durante la vita fetale potrebbe avere effetti a lungo termine e ridurre l'efficienza del sistema antiossidante nel corso della vita (19). È stato dimostrato che l'effetto tossico indiretto dell'alcol è correlato alla patologia placentare e che quindi la placenta ha un ruolo significativo nel danno alcol-correlato. Nelle placente di ratto esposte ad etanolo si osservano ischemia e/o infarti che ne riducono lo spessore per aumento di necrosi cellulare compromettendo il passaggio di nutrienti al feto e quindi la crescita intrauterina. L'esposizione alcolica cronica inoltre ostacola o danneggia la conversione fisiologica dei vasi sanguigni uterini necessaria per espandere la circolazione materna nella placenta. Gundogan *et al.* hanno dimostrato l'impatto dello stress ossidativo alcol-relato sulla funzione del trofoblasto placentare e quindi il potenziale danno alla gravidanza (20). Inoltre il metabolita acetaldeide attraversa la placenta e causa direttamente danni allo sviluppo fetale. Tutto ciò viene a determinare una condizione di ipossia che, associata a stress ossidativo e apoptosi, potrebbe spiegare alcune delle anomalie nello sviluppo cerebrale e anche i problemi comportamentali osservati nei pazienti affetti da FASD (21).

## Conclusioni

I risultati sperimentali dimostrano concordemente che lo stress ossidativo costituisce un fattore di rischio per chi abusa alcol e che le differenze di genere sono significative. Infatti nelle donne alcoliste i livelli di stress ossidativo risultano significativamente superiori a quelli maschili anche se la storia di abuso è di parecchi anni più breve rispetto agli uomini di età comparabile. In gravidanza, ciò implica un rischio maggiore sia per la madre che per il feto anche perché il sistema antiossidante fetale non è così efficiente da poter contrastare l'aumento delle specie ossidanti. Lo stato dell'arte negli studi sperimentali, pur indicando lo stress ossidativo come fattore di rischio, dimostra anche che ci sono molti aspetti da chiarire e molti problemi aperti nella ricerca soprattutto per quanto riguarda lo studio degli effetti dell'alcol in gravidanza. Tra questi certamente la scelta del modello sperimentale poiché la trasferibilità del modello di esposizione è un aspetto essenziale per migliorare la comparabilità dei risultati degli studi su FAS (*Fetal Alcohol Syndrome*) e FASD. Inoltre, non è noto qual è il periodo gestazionale di maggiore suscettibilità e quindi quali potrebbero essere la/le finestre terapeutiche ottimali per l'eventuale uso di antiossidanti. Sarebbe auspicabile approfondire gli studi quantificando e comparando i livelli di difese antiossidanti e specie ossidative nei diversi periodi dello sviluppo. Queste informazioni potrebbero essere utili anche per il trattamento e indicare se la supplementazione pre-postnatale con antiossidanti e/o particolari vitamine (es. la vitamina B1) potrebbe avere effetti benefici. Alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento con antiossidanti può migliorare alcuni deficit associati con disordini del neuro-sviluppo come autismo e ADHD (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) ma il tema necessita di approfondimenti.

Comunque, anche se gli studi clinici sono ancora insufficienti a dare risposte conclusive, le evidenze sperimentali suggeriscono l'opportunità di introdurre lo studio dello stress ossidativo nella diagnostica di routine attraverso l'utilizzo di bioindicatori di stress ossidativo per evidenziare un danno alcolico soprattutto nelle donne. Anche in ambito di diagnostica ostetrica e neonatale l'uso di tali indicatori potrebbe migliorare le conoscenze sui meccanismi patogenetici ed evidenziare precocemente situazioni a rischio. La disponibilità di biomarcatori sensibili e specifici, e di metodologie analitiche di elevata affidabilità e praticabilità rende oggi più facilmente realizzabile questo obiettivo.

## Bibliografia

1. Corti A, De Tata V, Pompella A. Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana. *Ligand Assay* 2009;14(1):8-15.
2. Ficociello B, Sturchio E, Minoia C, Casorri, L, Imbriani P, Signorini S. Epigenetica ed esposizione ambientale a xenobiotici. *Med Lav G Ital Erg* 2010;32(1):13-22.
3. Zima T, Fialová L, Mestek O, Janebová M, Crkovská J, Malbohan I, Štípek S, Mikulíková L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001;8:59-70.
4. Chandrasekar R. Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Front Mol Neurosci* 2013;28:6-14
5. Gemma S, Vichi S, Testai E. Fattori metabolici e genetici che predispongono al danno da alcol e alla sindrome feto-alcolica. In: Mancinelli R, Laviola G (Ed.). *Disturbi da esposizione ad alcol in gravidanza: il problema che non c'era*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/37). p. 81-95.

6. Frezza, M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women: the role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med* 1990;322:95-7.
7. Mancinelli R, Guiducci MS. La donna e l'alcol: vulnerabilità biologica? *Ann Ist Super Sanità* 2004; 40(1):19-23
8. Das UG, Cronk CE, Martier SS, Simpson PM, McCarver DG. Alcohol dehydrogenase 2\*3 affects alterations in offspring facial morphology associated with maternal ethanol intake in pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28(10):1598-606.
9. Lieber CS. Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 2000;20:395-430.
10. Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, Yoo SH, Yun JW, Gonzalez FJ, Keshavarzian A, Song BJ. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1238-45.
11. Muggironi G, Fois GR, Diana M. Ethanol-derived acetaldehyde: pleasure and pain of alcohol mechanism of action. *Front Behav Neurosci* 2013;7-87.
12. Buttari B, Profumo E, Mancinelli R, Cesta Incani U, Tosti ME, Attilia ML, Ceccanti M, Riganò R. Chronic and acute alcohol exposure prevents monocytes derived dendritic cells from differentiating and maturing. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21(4):929-39.
13. Mukhopadhyay P, Horváth B, Zsengellér Z, Bátkai S, Cao Z, Kechrid M, Holovac E, Erdélyi K, Tanchian G, Liaudet L, Stillman IE, Joseph J, Kalyanaraman B, Pacher P. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2012;53(5):1123-38.
14. Mancinelli R. Gender differences in alcohol related impairment: a critical review. *OA Alcohol* 2013;1(1):8.
15. Mancinelli R, Barlocchi E, Ciprotti M, Senofonte O, Fidente RM, Draisci R, Attilia ML, Vitali M, Fiore M, Ceccanti M. Blood thiamine, zinc, selenium, lead and oxidative stress in a population of male and female alcoholics: clinical evidence and gender differences. *Ann Ist Super Sanità* 2013;49(1):65-72.
16. Cipierre C, Haÿs S, Maucourt-Boulch D, Steghens JP, Picaud JC. Malondialdehyde adduct to hemoglobin: a new marker of oxidative stress suitable for full-term and preterm neonates. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:694014.
17. Pavlatou MG, Papastamataki M, Apostolakou F, Papassotiriou I, Tentolouris N. FORT and FORD: two simple and rapid assays in the evaluation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009;58(11):1657-62.
18. Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health* 2001;25(3):175-84.
19. Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Christie BR. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res Rev* 2011;67(1-2):209-25.
20. Gundogan F, Elwood G, Mark P, Feijoo A, Longato L, Tong M, de la Monte SM. Ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat placenta: relevance to pregnancy loss. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34(3):415-23.
21. Bosco C and Diaz E. Placental Hypoxia and Foetal Development Versus Alcohol Exposure in Pregnancy. *Alcohol Alcohol* 2012;47:109-17.