

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN
ESCUELA DE POSGRADO**

**“Bioactivación del etanol en el testículo
de rata y su rol en la toxicidad
reproductiva en el alcoholismo”**

Leandro Nestor Quintans

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**

~2008~

RESUMEN

Los tóxicos pueden afectar la salud reproductiva masculina en uno o en varios sitios, que comprenden los testículos, las glándulas sexuales accesorias y el sistema nervioso central, incluyendo el sistema neuroendocrino. En presencia de un tóxico para el sistema reproductivo masculino es fundamental examinar los mecanismos de toxicidad. El conocimiento de los pasos de biotransformación que puede seguir el tóxico permitiría entender las consecuencias potenciales derivadas de la interacción de sus metabolitos con los blancos celulares. La información mecanística es la base para la predicción de la toxicidad potencial, de la vulnerabilidad de los componentes del sistema reproductivo masculino y para el desarrollo de medidas curativas o preventivas. El modelo roedor es uno utilizado comúnmente para el estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo. Para extrapolar los resultados obtenidos a la evaluación de riesgo, es crítico identificar y entender las diferencias especie-específicas en el metabolismo y la fisiología que pueden afectar la respuesta al tóxico en cuestión.

En la literatura científica podemos encontrar un gran número de estudios epidemiológicos que evidencian que el consumo excesivo de alcohol se asocia con una producción disminuida de testosterona y atrofia testicular. En estudios experimentales con ratas tratadas con etanol se observaron resultados similares. Estudios mecanísticos *in vitro* sobre la producción de testosterona por testículos aislados, revelaron que el etanol actúa, al menos en parte, directamente sobre los testículos afectando la producción de esta hormona. Una hipótesis acerca de como contribuye el alcohol a disminuir la testosterona en esos estudios *in vitro* involucra la transformación metabólica del etanol a acetaldehído. El fundamento de esta hipótesis es que en algunos estudios se encontró que el acetaldehído es más potente que el alcohol para impedir la liberación de testosterona. El acetaldehído puede dañar la función testicular directamente, inhibiendo las enzimas esteroideogénicas o, indirectamente, disminuyendo las defensas antioxidantes (ej: los niveles de glutatión reducido)

y aumentando la oxidación de lípidos y proteínas, causando daño al tejido y en consecuencia, a la reproducción.

Los objetivos de este trabajo de tesis fueron: demostrar que el tejido testicular es capaz de producir acetaldehído y radicales libres a partir del etanol, caracterizar las enzimas involucradas en estos procesos, buscar sustancias moderadoras de esta bioactivación y evidenciar el posible daño que provoca el alcohol en el tejido.

Los ensayos para medir producción de acetaldehído *in situ* mostraron, en la fracción microsomal de testículo de rata, una importante actividad enzimática dependiente de oxígeno y NADPH, que pudimos atribuir al citocromo P450 2E1 (CYP2E1), la P450 reductasa y la lipooxigenasa. En menor grado, también participarían la FMO y una peroxidasa. La producción del aldehído se inhibió significativamente con algunos polifenoles y compuestos azufrados de estructura característica. Se detectó la producción de radicales libres hidroxilo y 1-hidroxietilo, dependiente de hierro, que también podría atribuirse a la P450 reductasa o a una lipooxigenasa.

En la fracción citosólica, la generación de acetaldehído, dependiente de NAD⁺, se atribuyó principalmente a la alcohol deshidrogenasa (ADh) y se encontró una significativa actividad aldehído deshidrogenasa (AIDh) que oxida al aldehído a acetato. Se cuantificaron ambas enzimas. La inhibición de la oxidación del etanol se logró con algunos compuestos azufrados y varios terpenos.

La cuantificación del etanol y el acetaldehído *in vivo* mostró que el alcohol llega a los testículos en cantidad importante y hay producción de acetaldehído en ese tejido durante al menos diez horas después de la intoxicación aguda oral, tiempo en que aún el etanol permanece en este órgano.

Los ensayos con animales alimentados con dieta líquida tipo Lieber-De Carli mostraron una baja en la generación de acetaldehído tanto en microsomas como en citosol y en esta última fracción también disminuyó la actividad de la xantina óxidoreductasa (XOR), medida por formación de ácido úrico.

La evaluación de daño, realizada mediante ensayos de formación de grupos carbonilo proteicos y reducción del número de grupos sulfhidrilo proteicos sólo mostró un pequeño efecto en la fracción microsomal de ratas intoxicadas en forma aguda con etanol vía oral. Sí se observó un aumento significativo en la peroxidación de lípidos en ratas intoxicadas tanto en forma aguda como semi-crónica.

Todos estos hechos muestran que el etanol puede afectar al testículo debido a procesos enzimáticos ocurridos en el mismo y que esta actividad puede modularse por la presencia de sustancias varias (muchas de origen natural).

Estos trabajos de investigación tienen impacto sobre la comunidad, por su efecto psicológico y social. En reiteradas oportunidades, artículos periodísticos y comunicaciones científicas, internacionales y locales, señalaron el problema del consumo creciente de bebidas alcohólicas en Argentina, especialmente entre jóvenes y adolescentes. El efecto perjudicial del consumo de bebidas alcohólicas en la juventud es particularmente serio si consideramos que en la salud reproductiva, este es el rango etario más comprometido.

Creemos que gran parte del problema sería evitable por educación y prevención, que induzca al cambio de hábitos que son perjudiciales para la salud. Estudios como los que se realizaron en este trabajo intentan proveer las bases racionales a estas acciones y son elementos indispensables para el logro del convencimiento de las personas.

INDICE

I-	INTRODUCCION	1
I.1-	EL ALCOHOL	2
I.1.A-	El alcohol en el cuerpo	2
I.1.B-	Absorción	3
I.1.C-	Distribución	4
I.1.D-	Metabolismo	5
I.2-	APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	8
I.2.A-	Funciones reproductivas y hormonas sexuales masculinas	8
I.2.B-	Anatomía y fisiología de los órganos sexuales masculinos.	8
I.2.C-	Espermatogénesis	9
I.2.C.1-	Etapas de la espermatogénesis	9
I.2.C.2-	Función de las células de Sertoli.	11
I.2.C.3-	Fisiología del espermatozoide	12
I.2.C.4-	Función de las vesículas seminales	13
I.2.C.5-	Función de la glándula prostática	14
I.2.C.6-	Eyacuación	14
I.2.D-	Testosterona y otras hormonas sexuales masculinas	15
I.2.D.1-	Secreción de testosterona por las células intersticiales del testículo	15
I.2.D.2-	Metabolismo y funciones de la testosterona	16
I.2.D.3-	Control de las funciones sexuales masculinas por las hormonas gonadotróficas	19
I.2.D.4-	Vida sexual y climaterio masculino	21
I.3-	COMO AFECTA EL ALCOHOL AL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO.	22
I.3.A-	El alcohol y los testículos	24
I.3.B-	Mecanismos del daño reproductivo inducido por el alcohol	25
I.3.B.1-	Estrés oxidativo	25
I.3.B.2-	Daño celular oxidativo	28
I.3.B.3-	Acetaldehído	31
I.3.B.4-	Óxido Nítrico	32
I.3.B.5-	Opioides	32
I.3.B.6-	Leptina	33
I.3.B.7-	Inducción del metabolismo	33

I.3.B.8-	Otros mecanismos	34
I.3.C-	El alcohol y la unidad hipotalámico - pituitaria del varón	35
I.3.D-	Efectos de la exposición paterna a alcohol en la reproducción	37
I.3.E-	Efecto nocivo del alcohol sobre la próstata	38
I.4-	TOXICIDAD REPRODUCTIVA POR OTROS AGENTES	40
I.4.A-	Agentes ambientales / ocupacionales	40
I.4.A.1-	Agroquímicos y productos industriales	40
I.4.A.2-	Metales pesados	41
I.4.B-	Agentes terapéuticos	42
I.4.B.1-	Fármacos	42
I.4.B.2-	Esteroides anabólicos	43
I.4.B.3-	Terapia de radiación	43
I.4.C-	Sustancias de abuso	44
I.4.D-	Disruptores endocrinos	45
I.4.E-	Otros factores	47
I.5-	ENZIMOLOGIA DEL METABOLISMO DEL ETANOL	49
I.5.A-	Sistema alcohol deshidrogenasa	51
I.5.B-	Sistema microsomal oxidante del etanol (MEOS)	54
I.5.C-	NADPH-citocromo P450 reductasa	56
I.5.D-	Catalasa	56
I.5.E-	Oxidación no enzimática	57
I.5.F-	Lipooxigenasas	59
I.5.G-	Metabolismo no oxidativo	62
I.6-	ENZIMOLOGIA DEL METABOLISMO DEL ACETALDEHIDO	62
I.6.A-	Sistema aldehído deshidrogenasa	63
I.6.B-	Aldehído oxidasa	64
I.6.C-	Sistema microsomal oxidante de acetaldehído (MAOS)	65
II-	OBJETIVOS	66
III-	MATERIALES Y METODOS	68
III.1-	SUSTANCIAS QUIMICAS	69
III.2-	EQUIPAMIENTO	72

III.3-	ANIMALES Y TRATAMIENTOS	73
III.3.A-	Tratamiento con administración de dieta líquida Lieber - De Carli estándar	74
III.3.B-	Intoxicación aguda vía oral	74
III.4-	AISLAMIENTO DE FRACCIONES CELULARES	75
III.4.A-	Obtención de fracciones citosólica y microsomal	75
III.4.B-	Obtención de fracción mitocondrial	76
III.4.C-	Aislación de fracción citosólica para la medición de la actividad XO/XDh	77
III.4.D-	Aislación de fracciones celulares para la medición de la actividad ALDh	79
III.5-	DETERMINACION DE PROTEINAS	80
III.6-	MEDICION DE LA ACTIVIDAD BIOTRANSFORMADORA DE ETANOL A ACETALDEHIDO EN DIFERENTES FRACCIONES CELULARES	81
III.6.A-	Procedimiento analítico para la medición de acetaldehído en fase gaseosa	81
III.6.B-	Incubación de fracción microsomal para medir formación de acetaldehído a partir de etanol	81
III.6.C-	Incubación de fracción citosólica para medir formación de acetaldehído a partir de etanol	83
III.7-	DETECCION DE RADICALES HIDROXILO Y 1-HIDROXIETILO POR CAPTURA DE SPIN Y CROMATOGRAFIA GASEOSA-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC-MS)	84
III.7.A-	Caracterización de los aductos de spin de referencia	85
III.7.B-	Procesamiento de las muestras biológicas	85
III.7.C-	Procedimiento analítico por GC-MS	86
III.8-	INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ALCOHOL DESHIDROGENASA	87
III.9-	MEDICION DE LA ACTIVIDAD XO/XDh EN LA FRACCION CITOSOLICA	88
III.10-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ALDh EN DIFERENTES FRACCIONES CELULARES	90

III.11-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADh EN LA FRACCION CITOSOLICA	91
III.12-	DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ETANOL <i>IN VIVO</i> EN DIFERENTES TEJIDOS	92
III.13-	DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ACETALDEHÍDO <i>IN VIVO</i> EN DIFERENTES TEJIDOS	93
III.14-	DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILO PROTEICOS	94
III.15-	DETERMINACION DE GRUPOS SULFHIDRILO PROTEICOS	94
III.16-	DETERMINACION DE LIPOHIDROPEROXIDOS EN LA FRACCION MICROSOMAL DE TESTICULO DE RATA	95
III.17-	TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS	97
IV-	RESULTADOS	98
IV.1-	OXIDACION DEL ETANOL A ACETALDEHIDO EN LA FRACCION MICROSOMAL DE TESTICULO DE RATA	99
IV.1.A-	Caracterización del sistema enzimático microsomal	99
IV.1.B-	Efecto de polifenoles sobre la biotransformación microsomal del etanol	101
IV.1.C-	Efecto de compuestos azufrados sobre la biotransformación microsomal del etanol	103
IV.2-	FORMACION DE RADICALES HIDROXILO Y 1-HIDROXI-ETILO EN LA BIOTRANSFORMACION MICROSOMAL DEL ETANOL	104
IV.3-	OXIDACION DEL ETANOL A ACETALDEHIDO EN LA FRACCION CITOSOLICA DE TESTICULO DE RATA	107
IV.3.A-	Caracterización del sistema enzimático citosólico	107
IV.3.A.1-	Lipooxigenasas	108
IV.3.A.2-	Determinación de la actividad alcohol deshidrogenasa en citosol de testículo rata.	109
IV.3.A.3-	Determinación de la actividad aldehído deshidrogenasa en diferentes fracciones celulares de testículo de rata	110

IV.3.A.4-	Inhibición de la actividad alcohol deshidrogenasa	111
IV.3.B-	Efecto de compuestos azufrados sobre la biotransformación citosólica del etanol	112
IV.3.C-	Efecto de polifenoles sobre la biotransformación citosólica del etanol	114
IV.3.D-	Efecto de terpenos sobre la biotransformación citosólica del etanol	114
IV.4-	EFFECTOS DE LA EXPOSICION <i>IN VIVO</i> AL ETANOL SOBRE EL TESTICULO DE RATA	116
IV.4.A-	Efecto del consumo repetido de alcohol sobre la biotransformación del etanol a acetaldehído	116
IV.4.B-	Medición de la actividad xantina óxidoreductasa en la fracción citosólica de testículo de rata	117
IV.4.C-	Niveles de etanol <i>in vivo</i> en ratas intoxicadas en forma aguda con etanol	118
IV.4.D-	Niveles de acetaldehído <i>in vivo</i> en ratas intoxicadas en forma aguda con etanol	120
IV.4.E-	Efecto de la exposición al etanol sobre parámetros vinculados con el daño oxidativo en el testículo	122
IV.4.E.1-	Disminución de la cantidad de grupos sulfhidrilo proteicos	122
IV.4.E.2-	Formación de grupos carbonilo proteicos	122
IV.4.E.3-	Formación de lipohidroperóxidos en la fracción microsomal	123
V-	DISCUSION Y CONCLUSIONES	125
VI-	BIBLIOGRAFIA	141
VII-	ABREVIATURAS	162
VIII-	APENDICE	166