

Influencia del etanol en períodos preovulatorios sobre el ciclo ovárico, progesterona y estradiol en rata*

J. Marcó, J. Espinosa **, M. Mancebo y M. Parafita

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Biología
Santiago de Compostela

(Recibido el 8 de marzo de 1983)

J. MARCO, J. ESPINOSA, M. MANCEBO and M. PARAFITA. *The Effect of Ethanol Administered During Preovulatory Periods on the Ovarian Cycle and Levels of Progesterone and Estradiol in the Rat.* Rev. esp. Fisiol., 40, 5-10. 1984.

The effect of high doses of ethanol (2 and 4 g/kg) administered to rats in pre-ovulatory periods (18th hour of diestrus) was studied.

Plasma levels of estradiol and progesterone were measured at 10 hours of oestrus and changes in the ovarian cycle and the number of mature follicles were recorded.

Compared with the control group, the receptive phase of estrus of the treated animals was longer lasting over 2 to 3 days. There was also an increase in the number of mature follicles as well as an increase in the plasma level of estradiol on the morning of estrus. Progesterone values showed no significant variations. Ethanol administered at the 18th hour of diestrus inhibits ovulation but not follicle development and allows the maintenance of high levels of estrogens on the morning of estrus. As a result the keratinization of the vaginal epithelium and the estrus phase are prolonged by 2 or 3 days.

Key words: Ethanol, Ovarian cycle, Progesterone.

Desde hace tiempo se conoce que la ingestión crónica de alcohol etílico en madres gestantes tiene un efecto antifertilizante (1, 14, 27, 28) y produce efectos teratogénicos en la descendencia (3, 13, 24-26). En contraposición a la extensa bi-

bliografía que existe sobre los efectos crónicos del etanol, es muy escasa la referida a dosis agudas (11, 12) y especialmente cuando se administra en períodos preovulatorios en los que se está produciendo la maduración folicular. En trabajos anteriores se había observado que la administración de dosis únicas de etanol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro —que corresponde al período preovulatorio en que se inicia el desarrollo folicular—, da lugar a una importante acción teratogénica con aumento del porcentaje de fetos

* Trabajo realizado con fondos procedentes de la Comisión Asesora Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno, proyecto n.º 615.

** Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

muerdos y malformaciones (21). También se observó una fuerte disminución del número de ratas preñadas y del número de embriones por rata, que no dependía de una acción antiimplantatoria del etanol, sino de una acción central, ya que disminuye también el número de ratas que ovulan y el número de óvulos por rata. Posteriormente se comprobó que el etanol a la hora 18 de diestro, posiblemente al afectar la síntesis de hormonas reguladoras hipotalámicas, produce una fuerte reducción de los niveles plasmáticos de LH, una menor disminución de los niveles de FSH y un incremento en los valores de prolactina (20).

En este trabajo se continúan estas investigaciones, estudiando los efectos a nivel ovárico de dosis únicas de etanol (2 y 4 g/kg), administradas a la hora 18 de diestro. Se valoran las alteraciones del ciclo ovárico, el desarrollo folicular y los niveles de las hormonas ováricas progesterona y estradiol.

Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras de peso aproximado a 200 g, que se mantienen en condiciones de iluminación artificial controlada de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, a temperatura ambiente de 20-25° C y con comida y agua *ad libitum*. Se realiza control del ciclo ovárico mediante frotis vaginales diarios a la misma hora según se ha descrito anteriormente (12-15), utilizándose sólo las ratas que presentan ciclo regular por lo menos 12 días antes de los experimentos. Para el estudio de las alteraciones del ciclo ovárico, los frotis vaginales se siguen realizando durante 10 días después del tratamiento.

El alcohol etílico se disuelve en suero fisiológico al 25 % y se administra por vía intraperitoneal en dosis únicas de 2 ó 4 g/kg a la hora 18 de diestro. En los animales control se administra intraperitoneal-

mente un volumen equivalente de suero fisiológico.

La determinación de progesterona y 17- β -estradiol se realiza por radioinmunoensayo (RIA), utilizando kits de reactivos marcados con I¹²⁵ de Nordiclab. Las muestras sanguíneas se obtienen a las 10:00 a.m. del primer día de estro, sacrificando los animales por decapitación después de una ligera anestesia con éter. La sangre se centrifuga a 3.500 rpm durante 15 min y el suero obtenido se fracciona en alícuotas que se conservan a -20° C hasta la realización del RIA. La determinación de progesterona (ng/ml) se realiza por un método directo (9), mientras que para el 17- β -estradiol (pg/ml) hubo un proceso previo de extracción con éter dietílico (10). En ambos casos, la radiactividad libre se separa de la ligada al complejo antígeno-anticuerpo mediante precipitación con polietilenglicol. La radiactividad se mide en un contador gamma (GAMMAmatic-II, Kontron) y la curva estándar se ajusta mediante un método spline-logarítmico, con un error máximo en el ajuste, para ambos casos, del 1 %. Las muestras se determinan por duplicado, obteniendo un coeficiente máximo de variabilidad intraensayo del 3,5 %.

Para el estudio del desarrollo folicular, se extraen los ovarios en las ratas sacrificadas a las 10:00 a.m. del primer día de estro y se realiza el conteo de folículos maduros con lupa según se ha descrito anteriormente (6-8).

La distribución de experimentos es la siguiente: *a*) tres grupos de 10 ratas, uno para control, y los otros dos tratados con etanol en dosis de 2 y 4 g/kg respectivamente, en los que se valoran las alteraciones del ciclo ovárico; *b*) tres grupos de 10 ratas, uno control y dos tratados con etanol en dosis de 2 y 4 g/kg respectivamente, que se sacrifican a la hora 10 del primer día de estro y en los que se determinan los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol, así como el número de folículos maduros en los ovarios.

Los resultados se expresan mediante la media y el error estándar. La diferencia entre grupos se analiza mediante el test de Student para datos desapareados.

Resultados

La administración de etanol a la hora 18 de diestro modifica el ciclo ovárico (tabla I), produciéndose con la dosis de 4 g/kg un alargamiento de la fase receptiva de estro en todas las ratas, que se mantiene de 2 a 3 días en vez de un día, con un valor medio de 2,2 días ($p < 0,001$). Cuando el tratamiento es con una dosis de 2 g/kg, sólo en 3 ratas se prolonga la fase de diestro y en 5 el ciclo es normal.

El número de folículos maduros que se observa en el ovario a la hora 10 de estro (fig. 1), es de $4,5 \pm 0,4$ en el grupo control, mientras que en el grupo tratado con etanol en dosis de 2 g/kg es de $5,9 \pm 0,4$ y con la dosis de 4 g/kg es de $13,7 \pm 0,5$, siendo el incremento en los dos grupos tratados significativo respecto al control.

Los niveles séricos de progesterona obtenidos a la hora 10 de estro son $0,4 \pm 0,1$ ng/ml en el grupo control, $0,3 \pm 0,1$ ng/ml en el tratado con etanol en dosis de 2 g/kg y $0,7 \pm 0,2$ ng/ml en el tratado con dosis de 4 g/kg, no observándose varia-

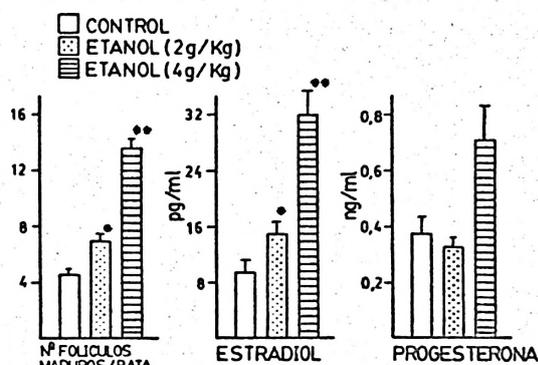


Fig. 1. Efecto de dosis únicas de etanol a la hora 18 de diestro sobre el desarrollo folicular y niveles séricos de estradiol y progesterona, en ratas sacrificadas a la hora 10 del primer día de estro.

Se expresa la media y el error estándar para $n = 10$ en cada grupo experimental. * $p < 0,01$ respecto al control. ** $p < 0,001$ respecto al control y al grupo tratado con etanol (2 g/kg).

ciones significativas entre estos grupos (figura 1).

Los niveles séricos de estradiol a la hora 10 de estro se incrementan significativamente en los grupos tratados con etanol con respecto al control, cuyo valor medio es de $8,6 \pm 0,7$ pg/ml mientras que en el grupo tratado con 2 g/kg es de $13,7 \pm 1,8$ pg/ml ($p < 0,01$) y en el grupo tratado con 4 g/kg es de $29,3 \pm 4,9$ pg/ml

Tabla I: Efecto de dosis únicas de etanol a la hora 18 de diestro sobre el ciclo ovárico. Cada grupo experimental es de 10 ratas.

Condiciones experimentales	N.º de ratas con ciclo normal	N.º de ratas con fase de estro alargada	Duración de la fase de estro (días/n.º ratas)	N.º de ratas con fase de diestro alargada	Duración de la fase de diestro (días/n.º ratas)
Control	10 (100%)	0	1/10	0	1/10
Etanol (2 g/kg)	5 (50%)	3 (30%)	2/2 4/1	2 (20%)	2/2 1/8
Etanol (4 g/kg)	0	10* (100%)	2/7 3/3	0	1/10

* $p < 0,001$

($p < 0,001$), valor que es más de tres veces superior al control.

Discusión

Anteriormente se había observado que la administración de etanol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro disminuía la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, con una fuerte reducción de los niveles de LH, mientras que los valores de FSH disminuían en menor grado (20). El efecto depresor del etanol sobre la LH ha sido señalado también por otros autores (4, 15, 22, 24). La reducción de los niveles de FSH parece que no afecta de forma importante el desarrollo folicular, ya que se observan abundantes folículos maduros en el ovario al tratar con etanol. Sin embargo, la fuerte reducción de los niveles de LH impide en gran parte la rotura folicular (5), ya que anteriormente se había comprobado que sólo se producía ovulación en 4 de 13 ratas, con un número de óvulos muy inferior al control (21). Además, cuanto mayor es la dosis de etanol administrada, mayor es el número de folículos que se observan en el ovario, indicando que se está inhibiendo la ovulación pero no el desarrollo folicular.

Por otra parte, al no producirse ovulación por efecto del etanol, las células de la teca interna de los folículos continúan secretando estrógenos, observándose niveles de estradiol significativamente mayores respecto al control, que se incrementan con la dosis de etanol y que guardan relación con el número de folículos maduros que se observan en la mañana de estro. Los niveles elevados de estrógenos son los responsables de la queratinización del epitelio vaginal (2) y del alargamiento de la fase receptiva de estro que se observa al tratar con etanol, especialmente con la dosis de 4 g/kg.

Los valores séricos de progesterona no varían significativamente, posiblemente porque en la mañana del primer día de estro no se ha producido todavía en los

ovarios control una luteinización suficiente para que los cuerpos lúteos secreten progesterona. Probablemente, si se determinaran los niveles de progesterona al día siguiente, se encontrarían diferencias significativas entre el control y los grupos tratados, ya que los cuerpos lúteos de los animales control se habrían desarrollado totalmente y secretarían grandes cantidades de progesterona, mientras que en los tratados con etanol que sufren inhibición de la ovulación, no presentarían cuerpos lúteos y, por lo tanto, los niveles de progesterona serían mucho menores.

Resumen

Se estudia el efecto de dosis agudas de etanol (2 y 4 g/kg) administradas a ratas en el período preovulatorio de la hora 18 de diestro. Se valoran las alteraciones del ciclo ovárico, el número de folículos maduros y los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona a la hora 10 de estro.

Se observa en los grupos tratados, respecto al control, un alargamiento de la fase receptiva de estro que se mantiene de 2 a 3 días, aumento del número de folículos maduros e incremento de los niveles plasmáticos de estradiol en la mañana de estro. Los valores de progesterona no varían significativamente.

Se concluye que el etanol—administrado en dosis agudas a la hora 18 de diestro— inhibe la ovulación pero no el desarrollo folicular, permitiendo que se mantengan elevados los niveles de estrógenos en la mañana de estro y, como consecuencia, se prolonga durante 2 ó 3 días la queratinización del epitelio vaginal y la fase de estro.

Bibliografía

1. ABEL, E. L. y GREIZERSTEIN, H. B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **207**, 916-921, 1979.
2. BRENNER, R. M., WEST, N. B.: *Ann. Rev. Physiol.*, **37**, 273-302, 1975.
3. BROWN, N. A., GOULDING, E. H. y FABRO, S.: *Science*, **206**, 573-575, 1979.
4. CICERO, T. J. MEYER, E. R. y BELL, R. D.: *J. Pharm. Exp. Ther.* **208**, 210-215, 1978.
5. GAY, V. L., MIDGLEY, J. R. y NISWENDER, G. D.: *Fed. Proc.*, **29**, 1880-1887, 1970.
6. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y

- MARCÓ, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 63-68, 1975.
7. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 29-32, 1976.
8. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y RIBAS, B.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 301-306, 1976.
9. HAMMOND, G. L., VIINIKKA, L. y VIHKO, R.: *Clin. Chem.*, **23**, 1250-1257, 1976.
10. HANING, R., ORCZYK, G. P., CADWELL, B. V. y BEHRMAN, H. R.: En «Methods of Hormone Radioimmunoassay» (2.ª ed.) (B. M. Jaffe y H. R. Behrman, eds.). Academic Press, Nueva York, 1979, pp. 675-685.
11. KIEFFER, J. D. y KETCHEL, M. M.: *Acta Endocrinol.*, **65**, 117-124, 1970.
12. KRONICK, J. B.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **124**, 676-680, 1976.
13. KUMAR, S. P.: *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **12**, 254-257, 1982.
14. HINCKERS, H. J.: *J. Perinat. Med.*, **6**, 3-10, 1978.
15. LEPPALUOTTO, J. RAPELI, M., VARIS, L. y RANTA, T.: *Acta Physiol. Scand.*, **95**, 400-408, 1975.
16. MARCÓ, J., TOSAR, A., GONZÁLEZ-BARÓN, S. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 81-86, 1978.
17. MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 63-74, 1979.
18. MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 75-84, 1979.
19. MARCÓ, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y GUNINDO, N.: *Rev. esp. Fisiol.*, **37**, 287-296, 1981.
20. MARCÓ, J., LEANDRO, V., VILLA, I., ESQUIFINO, A. y LARRALDE, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **39**, 7-12, 1983.
21. MARCÓ, J., VILLA, I. y LARRALDE, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **37**, 395-402, 1981.
22. MENDELSON, J. H., MELLO, N. K. y ELLINGBOE, J.: *J. Pharm. Exp. Ther.*, **202**, 676-681, 1977.
23. O'SHEA, K. S. y KAUFMAN, M. H.: *J. Anat.*, **128**, 65-76, 1979.
24. ROWE, P. H., RACE, P. A., SHENTON, J. C., ELLWOOD, M. y LEHANE, J.: *J. Endocrinol.*, **63**, 50-55, 1975.
25. SCHWETZ, B. A., SMITH, F. A. y STAPLES, R. E.: *Teratology*, **18**, 385-392, 1978.
26. SIGH, S. L. y SNYDER, A. K.: *J. Nutr.*, **112**, 98-103, 1982.
27. TZE, W. J. y LEE, M.: *Nature*, **257**, 479-480, 1975.
28. VAN-THIEL, D. H., GAVALER, J. S., LESTER, R. y SHERINS, R. J.: *Clin. Invest.*, **61**, 624-632, 1978.

