

Efecto del etanol en períodos preovulatorios sobre la LH, FSH, prolactina y ovulación en ratas

J. Marcó *, V. Leandro **, I. Villa **, A. Esquifino *** y J. Larralde

Departamento de Investigaciones
Fisiológicas. C.S.I.C.
Pamplona

(Recibido el 15 de enero de 1982)

J. MARCO, V. LEANDRO, I. VILLA, A. ESQUIFINO y J. LARRALDE. *Effect of Ethanol on LH, FSH, Prolactin and Ovulation in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 39, 7-12. 1983.

The effect of ethanol (4 g/kg) as well as the role of serotonergic neurons on the rate of ovulation and plasma LH, FSH and prolactin secretion have been studied in rats at preovulatory periods (18th hour of diestrus).

It has been found that administration of ethanol in preovulatory periods decreased the number of ovules per rat ($p < 0.001$), the number of ovulating rats and LH levels ($p < 0.001$). These effects were accompanied by an increase in prolactin concentration ($0.05 > p > 0.02$), which was followed by a diffuse luteinization in the ovaric tissue. These results showed that ethanol had an effect of central depression in preovulatory periods. These effects could be mediated through the hypothalamic releasing factors.

Under previous serotonin depletion with p-chlorophenylalanine (PCPA: 300 mg/kg), ethanol caused similar effects on LH and FSH levels as compared with the control group with PCPA. However, prolactin concentration was not increased. These results showed that serotonergic neurons could be mediated in changes caused by ethanol on prolactin secretion, but do not affect directly in changes caused on LH and FSH secretion.

La ingestión crónica de alcohol etílico en madres gestantes produce importantes efectos teratogénicos en los fetos, habiéndose señalado también una acción antifertilizante, que ha sido observada en di-

versas especies de animales (1, 12, 29, 30). El etanol como depresor del S.N.C. reduce la actividad hipotalámica-hipofisaria (3, 4, 11) y disminuye la ovulación y la reproducción (1, 13, 16, 29). La acción depresora del etanol sobre el SNC parece depender de la potenciación de las neuronas inhibitoras que contienen ácido gamma-aminobutírico (GABA). En el hipotálamo, la potenciación de las neuronas GABA⁺ (22) podría inhibir las vías adrenérgicas que estimulan la producción y liberación de los factores de regulación hipotalámicos.

Los efectos teratogénicos y antifertili-

* Dirección actual: Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

** Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

*** Cátedra de Endocrinología Experimental. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid.

zantes del etanol no se producen sólo con dosis crónicas o dosis únicas en períodos avanzados del embarazo, sino que también existe una importante acción teratogénica y antifertilizante al administrar etanol en dosis únicas en períodos preovulatorios y en el primer día de embarazo (15, 20). El etanol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, producía una fuerte disminución del número de ratas preñadas y del número de embriones por rata, no siendo una acción antiimplantaria, sino una acción central, ya que disminuye el número de ratas que ovulan y el número de óvulos por rata.

En este trabajo se estudia el efecto de dosis únicas de etanol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro sobre los niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y prolactina, para comprobar en qué grado la acción antifertilizante observada en trabajos anteriores, depende de cambios en la secreción de estas hormonas. También se estudia el papel de las neuronas serotoninérgicas centrales en las alteraciones que produce el alcohol sobre las secreciones hipofisarias y la ovulación. Para ello utilizamos p-clorofenilalanina (PCPA), que es un inhibidor de la serotonina (5-HT) al deprimir intensamente la actividad de la enzima triptófano 5-hidroxilasa —que limita la velocidad de síntesis de la 5-HT—, con lo que produce una fuerte depleción de la 5-HT cerebral (14). Si la depleción previa de la 5-HT cerebral producida por la PCPA, es capaz de modificar las acciones del etanol, se puede decir que las neuronas serotoninérgicas intervienen como mediadoras en esos efectos centrales del etanol, dato actualmente muy controvertido (2, 6, 9, 28).

Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras de peso aproximado a 200 g. Se mantienen en condiciones de iluminación artificial

de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Temperatura ambiente controlada entre 20 y 25° C. Comida y agua *ad libitum*. Se realiza control del ciclo ovárico mediante frotis vaginales a la misma hora, utilizándose sólo las ratas que presentan ciclo regular por lo menos 12 días antes de los experimentos.

El alcohol etílico se disuelve en suero fisiológico al 25 %, y se administra por vía intraperitoneal en dosis únicas de 4 g/kg, a la hora 18 de diestro o 9 de proestro. La PCPA se disuelve en agua destilada con 1 % de Tween 80 y se administra en una sola dosis de 300 mg/kg i.p. (30 mg/ml) a la hora 18 de diestro. En las ratas control se administra intraperitonealmente suero fisiológico.

Estudio de la ovulación. Las ratas se sacrifican por decapitación a la hora 16 de estro y se disecan trompas y ovarios. Se realizan cortes seriados de 5 a 10 μ de espesor, que se tiñen con hematoxilina-eosina. Este método permite una gran seguridad en el recuento de óvulos en la trompa y el estudio histológico de los ovarios con recuento de los folículos mayores a 500 μ (17-19).

Radioinmunoensayo de hormonas. Con las ratas ligeramente anestesiadas con éter, se extraen muestras de sangre por vía intracardiaca en un tercio de cada grupo respectivamente a las horas 18, 19 y 20 de la tarde de proestro. Se determina en plasma LH, FSH y prolactina por radioinmunoensayo de doble anticuerpo (23) con kits suministrados por NIAMD (National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, U.S.A.), marcados con I^{125} por el método de la cloramina T (10) y purificados en columna de Sephadex G-75. Los valores se expresan en ng/ml de plasma respectivamente de los preparados de referencia NIAMD rat LH-RP1, NIAMD rat FSH-RP1 y NIAMD rat prolactin-RP2.

La distribución de experimentos es la siguiente:

a) Dos grupos control de 19 y 13 ratas en los que se determinan, respectivamente, los niveles hormonales y el número de óvulos y de folículos maduros.

b) Dos grupos de 30 y 11 ratas tratadas con etanol a la hora 18 de diestro, en los que se determinan, respectivamente, los niveles hormonales y el número de óvulos y de folículos maduros.

c) Dos grupos de 18 y 10 ratas tratadas con PCPA a la hora 18 de diestro, en los que se determina, respectivamente, los niveles hormonales y el número de óvulos y de folículos maduros, y que sirven de control para valorar el papel de las neuronas serotoninérgicas.

d) Dos grupos de 12 y 16 ratas tratadas a la hora 18 de diestro con PCPA y a la hora 9 de proestro con etanol, en los que se determinan, respectivamente, los niveles hormonales y el número de óvulos y de folículos maduros, permitiendo valorar el papel de las neuronas serotoninérgicas en la acción central del etanol.

Los resultados se expresan con la media y la desviación de la media. El estudio estadístico se realiza aplicando el test de Student.

Resultados

En el estudio de la ovulación (tabla I) se observa que el etanol inyectado a la



Fig. 1. Sección de trompa de rata tratada con etanol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro y sacrificada a la hora 16 de estro.

Se aprecian dos óvulos rodeados cada uno con su cúmulo ovífero ($\times 400$).

hora 18 de diestro disminuye el número de ratas que ovulan ($p < 0,001$) y el número de óvulos por rata en las que ovulan (fig. 1), mientras que el número de folículos maduros es mayor respecto al control ($p < 0,001$). En el grupo tratado con PCPA a la hora 18 de diestro, que es el control para la valora-

Tabla I. Efecto del etanol (4 g/kg) y de la p-clorofenilalanina (PCPA) (300 mg/kg) sobre la ovulación en ratas sacrificadas a la hora 16 de estro.

Condiciones experimentales	N.º de ratas que ovulan	N.º de óvulos por rata	Nº de folículos maduros por rata
Control	13/13	9,15 \pm 0,45	4,77 \pm 0,64
Etanol, 18 h diestro	4 **/11	6,00 \pm 1,22 *	10,18 \pm 1,30 **
PCPA, 18 h diestro	0/10	—	15,10 \pm 0,57 **
PCPA, 18 h diestro y Etanol, 9 h proestro	0/12	—	14,42 \pm 0,42 **

* 0,01 > p > 0,035 respecto al control.

** p < 0,01 respecto al control.



Fig. 2. Sección de ovario de rata tratada con PCPA (300 mg/kg) a la hora 18 de diestro y con etanol (4 g/kg) a la hora 9 de proestro, que es sacrificada a la hora 16 de proestro. Se aprecian dos folículos mayores a 500μ con su oocito en el interior ($\times 50$).

ción del papel de las neuronas serotoninérgicas, se produce inhibición total de la ovulación y en los ovarios se observa el mayor número de folículos maduros ($p < 0,001$). En el grupo tratado primero con PCPA a la hora 18 de diestro y luego con etanol a la hora 9 de proestro, se produce también inhibición total de la ovulación y el número de folículos maduros en el ovario es semejante al grupo tratado sólo con PCPA (fig. 2). En todos los grupos, excepto en el control, se observa una ligera luteinización difusa en el tejido ovárico.

Los valores medios de LH en el grupo control presentan una gran variabilidad debido a que corresponden al pico ovulatorio de LH de la tarde de proestro (tabla II). En los demás grupos con tratamiento, se observa una fuerte disminución de los niveles de LH ($p < 0,001$), que se mantienen bajos durante las 3 horas de la tarde de proestro en que han sido determinados, siendo la disminución más acusada en el grupo tratado con PCPA y etanol. En este grupo se observa que respecto al grupo tratado con PCPA que se utiliza como su control, se

Tabla II. Efecto del etanol (4 g/kg) y de la p-clorofenilalanina (PCPA) (300 mg/kg) sobre la LH, FSH y prolactina.

Las muestras de plasma se obtienen entre las horas 18 y 20 de proestro. Entre paréntesis, número de ratas de cada grupo.

Condiciones experimentales	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	Prolactina (ng/ml)
Control	$560,0 \pm 111,1$ (19)	$288,1 \pm 37,5$ (16)	$84,1 \pm 10,1$ (19)
Etanol, 18 h diestro	$35,6 \pm 6,4^{**}$ (30)	$216,7 \pm 19,8$ (27)	$175,0 \pm 35,8^*$ (27)
PCPA, 18 h diestro	$51,2 \pm 9,9^{**}$ (18)	$228,7 \pm 14,7$ (15)	$208,7 \pm 32,0^{**}$ (18)
PCPA, 18 h diestro y Etanol, 9 h proestro	$18,9 \pm 1,6^{\dagger\dagger}$ (16)	$215,0 \pm 14,9$ (16)	$155,3 \pm 23,3^{**}$ (16)

$\dagger\dagger$ $p < 0,001$ respecto al control y el grupo tratado con PCPA.

$**$ $p < 0,001$ respecto al control.

$*$ $0,05 > p > 0,02$ respecto al control.

produce también una disminución significativa ($p < 0,001$).

Los valores de FSH no presentan disminución significativa y los niveles de prolactina experimentan un aumento significativo respecto al control en los grupos tratados con etanol ($0,05 > p > 0,02$), con PCPA ($p < 0,001$) y con PCPA más etanol ($p < 0,001$), aunque en este último grupo, respecto a su grupo control tratado con PCPA, no se produce incremento, sino una disminución no significativa.

Discusión

El etanol a la hora 18 de diestro produce una fuerte disminución del número de ratas que ovulan, del número de óvulos por rata en las que ovulan y de los niveles de LH durante la tarde de proestro. Aunque se han señalado aumentos de LH con dosis agudas de etanol en humanos (8, 21), sin embargo, en la mayoría de los trabajos se ha observado disminución de los niveles de LH con etanol, tanto en humanos (26, 27) como en ratas (3, 4), lo que está de acuerdo con nuestros resultados.

El etanol administrado poco antes del período crítico de la LH inhibe la ovulación (13), pero se observa que también disminuye la ovulación y los niveles de LH cuando el etanol se administra 24 horas antes del pico ovulatorio de LH, momento en el que se está iniciando el incremento de la actividad hipotalámica y la producción de los factores de regulación hipotalámicos. En estas condiciones, los niveles de FSH no disminuyen significativamente, permitiendo un desarrollo folicular normal como hemos observado, mientras que la prolactina aumenta, lo que está de acuerdo con otros trabajos que utilizaban dosis crónicas de etanol, aunque con dosis agudas no obtuvieron variaciones significativas (5). Posiblemente la inhibición hipotalámica en la producción o liberación del factor inhibidor

de la prolactina, sea responsable del aumento de la prolactina, que da lugar a una ligera luteinización difusa en el tejido ovárico.

En el estudio de la ovulación, la PCPA, al inhibir totalmente la ovulación y producir un desarrollo folicular máximo, impide que se manifiesten las acciones propias del etanol de disminución de la ovulación e incremento de desarrollo folicular en el grupo que se ha producido depleción previa de 5-HT con PCPA. Estos resultados parecen indicar que las neuronas serotoninérgicas no intervienen como mediadoras en la acción del etanol sobre la secreción de LH y FSH, lo que está de acuerdo con trabajos que indican que no hay variaciones en los niveles de 5-HT en la mayor parte de las áreas encefálicas después del tratamiento con etanol (6, 7, 24, 25, 28).

Respecto a los niveles plasmáticos de prolactina, el etanol en el grupo tratado con PCPA, en vez de producir un aumento, disminuye no significativamente los niveles de prolactina respecto al control con PCPA. Esto indica que posiblemente las neuronas serotoninérgicas intervienen como mediadoras en la acción del etanol sobre la secreción de prolactina, ya que la depleción de la 5-HT central por la PCPA, impide el incremento de la secreción de prolactina que produce el etanol.

Agradecimientos

Al NIAMD (Rat Pituitary Hormone Program) por la donación de los kits de LH, FSH y Prolactina de rata empleados en el radioinmunoensayo.

Resumen

Se estudia en ratas el efecto del etanol (4 g/kg) en períodos preovulatorios (hora 18 de diestro) y el posible papel de las neuronas serotoninérgicas en la acción del alcohol. Se valoran los niveles plasmáticos de LH, FSH y prolactina, el número de óvulos en las trom-

pas, el número de folículos maduros y el aspecto histológico de los ovarios.

El etanol en períodos preovulatorios disminuye el número de óvulos de rata ($p < 0,001$), el número de ratas que ovulan y los niveles de LH ($p < 0,001$). Además aumentan los niveles de prolactina ($0,05 > p > 0,02$), que dan lugar a luteinización difusa en el tejido ovárico. Estos resultados indican que el etanol en períodos preovulatorios tiene una acción depresora central, afectando probablemente a la formación y/o liberación de los factores de regulación y/o liberación de los factores de regulación hipotalámicos.

Previa depleción serotoninérgica con p-clorofenilalanina (PCPA: 300 mg/kg), el etanol produce efectos semejantes en los niveles de LH y FSH respecto al control con PCPA, mientras que los niveles de prolactina disminuyen.

Bibliografía

- ABEL, E. L. y GREIZERSTEIN, H. B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 207, 916-921, 1979.
- CARMICHAEL, F. J. e ISRAEL, Y.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193, 824-834, 1975.
- CHAPIN, R. E., BRESE, G. R. y MUELLER, R. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 212, 6-10, 1980.
- CICERO, T. J., MEYER, E. R. y BELL, R. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 108, 210-215, 1979.
- EARLL, J. M., GAUNT, K., EARLL, L. A. y DJUH, Y. Y.: *Aviat. Space Environm. Med.*, 47, 808-810, 1976.
- FRANKEL, D., KHANKA, J. M., KALANT, H. y LE BLANC, A. E.: *Psychopharm.*, 37, 91-100, 1974.
- FUKUMORI, R., MINEGISHI, A. y SATOH, T.: *Eur. J. Pharmacol.*, 61, 199-202, 1980.
- GORDON, G. G., SOUTHREN, A. L. y LAEBER, C. J.: *Acta Clin. Exp. Res.*, 3, 210-212, 1979.
- GOTHONI, P. y AHTEE, L.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46, 113-120, 1980.
- GREEDWOOD, E. C., HUNTER, W. N. y GLOVER, J. S.: *Biochem. J.*, 89, 114-123, 1963.
- GREENE, L. W. y HOLLANDER, C. S.: *Alcoholism.*, 4, 1-5, 1980.
- HINCKERS, H. J.: *J. Perinat. Med.*, 6, 3-10, 1978.
- KIEFFER, J. D. y KETCHEL, M. M.: *Acta Endocrinol.*, 65, 117-124, 1970.
- KOE, B. K. y WEISSMANN, A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154, 499-516, 1966.
- LEANDRO, V., MARCÓ, J., DEL REAL, C., VILLA, I. y LARRALDE, J.: *Bol. Soc. Cast. Ast. Leon. de Pediatría*, 22, 253-263, 1981.
- MALATESTA, V. J., POLLACK, R. H., WILBANKS, W. A. y ADAMS, H. E.: *Sex. Res.*, 15, 101-107, 1979.
- MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 35, 63-74, 1979.
- MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 35, 75-84, 1979.
- MARCÓ, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y GUINDO, N.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 287-296, 1981.
- MARCÓ, J., LEANDRO, V., VILLA, I. y LARRALDE, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 395-402, 1981.
- MENDESOL, J. M., MELLO, N. K. y ELLINGBOE, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 202, 676-682, 1977.
- NESTOROS, J. N.: *Science*, 209, 708-710, 1980.
- NISWENDER, G. D., CHEN, C. L., MIDGLEY Jr., A. R., MEITES, J. y ELLIS, S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 130, 793-797, 1969.
- POHORECKY, L. A., NEWMAN, B., SUN, J. y BAILEY, W. H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 204, 424-432, 1978.
- RAWAT, A. K.: *J. Neurochem.*, 28, 1175-1182, 1977.
- ROWE, P. H., RACE, P. A., SHENTON, J. C., ELLWOOD, M. y LEHANE, J.: *J. Endocrinol.*, 63, 50P, 1975.
- SIMIONESCU, L., OPRESCU, M., PROTIC, M. y DIMITRIV, V.: *Endocrinology*, 15, 45-49, 1977.
- TYCE, G. M., FLOCK, E. V., TAYLOR, W. F. y OWEN, C. A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 134, 40-44, 1970.
- TZE, W. J. y LEE, M.: *Nature*, 257, 479-480, 1975.
- VAN-THIEL, D. H., GAVALER, J. S., LESTER R. y SHERINS, R. J.: *J. Clin. Invest.*, 61, 624-632, 1978.