

## Efecto del etanol sobre la ovulación, reproducción y desarrollo fetal en la rata

J. Marcó \*, S. V. Leandro \*\*, I. Villa \*\* y J. Larralde

Departamento de Investigaciones  
Fisiológicas  
C.S.I.C.  
Pamplona (España)

(Recibido el 17 de noviembre de 1980)

J. MARCO, S. V. LEANDRO, J. VILLA and J. LARRALDE. *Effect of Ethanol on Ovulation, Reproduction and Fetal Development in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 37, 395-402. 1981.

Single doses of ethanol (0.5 and 4 g/kg) were injected at 18 h of the diestrus, 9 h of the proestrus and 18 h of the estrus phase (first day of pregnancy). The ovarian cycle, number of ovules and ovarian follicles, insemination, number of embryos, fetal development and the observed malformation were evaluated.

Alcohol (4 g/kg) at 18 h of the diestrus, increased the receptive estrus phase and the number of mature follicles in the ovary, while it decreased the number of ovulations, pregnancies and embryos in rats.

It was found that alcohol (4 g/kg) at preovulatory periods, increased the percentage of dead and malformed fetuses, and decreased the length of the higher limbs. Furthermore, the same doses of alcohol administered at the first day of pregnancy, produced a decrease in weight, size and length of the legs.

Results showed that single doses of alcohol injected in preovulatory periods and first day of pregnancy, had a teratogenic action. Furthermore, alcohol inhibited ovulation and stimulated animal receptibility when administered at 18 h of diestrus.

Es muy conocido el efecto teratogénico de la administración crónica del alcohol (4, 16-18) y su acción antifertilizante, que ha sido señalada en diversas especies animales (1, 7, 20, 22). A través de la potenciación de las neuronas inhibitoras

GABA (12), el alcohol deprime la actividad hipotalámica-hipofisaria (5, 6, 21), disminuyendo la ovulación y la reproducción (1, 20). La acción teratogénica del alcohol depende principalmente de su metabolito acetaldehído (14, 15) que, recientemente se ha comprobado *in vitro*, produce disminución de la multiplicación celular (23) — de lo que puede depender la disminución de la talla, peso y longitud de los miembros de los fetos —, e induce aberraciones cromosómicas (13, 23) que dan lugar a malformaciones.

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

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

Sin embargo, hay pocos trabajos que estudien los efectos de una simple dosis de alcohol (8, 9, 15, 17) y en ningún caso se ha estudiado experimentalmente los efectos teratogénicos y reproductores de dosis únicas de alcohol en períodos preovulatorios y en el primer día del embarazo. Por este motivo, y ante observaciones clínicas de nuestro Departamento de Pediatría sobre algunos casos teratológicos en hijos de madres abstemias que ingirieron una dosis tóxica de alcohol en períodos cercanos al embarazo, nos propusimos estudiar experimentalmente en ratas, el efecto de dosis únicas de alcohol sobre la ovulación, reproducción y desarrollo fetal en períodos preovulatorios (hora 18 de diestro y 9 de proestro) y el primer día de embarazo (hora 18 de estro).

### Material y métodos

Se utilizan 110 ratas Wistar hembras de peso aproximado de 200 g y machos de 300 g de comprobada capacidad de fecundación, mantenidas en condiciones estándar de iluminación artificial controlada de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, con temperatura constante de 20° C y comida y agua *ad libitum*. Se practica control del ciclo ovárico por frotis vaginales diarios a la misma hora y se utilizan sólo las ratas con ciclo regular por lo menos tres ciclos antes de comenzar los experimentos. Todos los animales han estado por lo menos un mes en condiciones de iluminación controlada antes de iniciar los experimentos.

El alcohol etílico se administra al 25% por vía i.p. en dosis únicas de 0,5 ó 4 g/kg, en períodos preovulatorios como la hora 18 de diestro y la hora 9 de proestro, o el primer día de embarazo a la hora 18 de estro. En unos grupos se estudia el efecto sobre el ciclo ovárico, en otros los efectos sobre la reproducción y desarrollo fetal y en otros la acción sobre la ovulación.

*Estudio del ciclo ovárico.* Se administra alcohol (4 g/kg) en períodos preovulatorios y se estudian las variaciones del ovárico durante 15 días. En un grupo de 13 ratas el tratamiento es a la hora 18 de diestro y en otro de 14 ratas el alcohol se inyecta a la hora 9 de proestro.

*Estudio de la reproducción y del desarrollo fetal.* Se realiza la siguiente distribución de grupos experimentales: 11 ratas control; tratadas con alcohol a la hora 18 de diestro, 9 ratas con dosis de 0,5 g/kg y 13 ratas con 4 g/kg; tratadas a la hora 9 de proestro, 9 ratas con dosis de 0,5 g/kg y 10 ratas con 4 g/kg; y tratadas el primer día de embarazo, a la hora 18 de estro, 9 ratas con 4 g/kg.

Cada rata hembra se coloca con un macho en jaula individual durante 15 horas, desde la hora 18 de proestro a la 9 de estro. La presencia de espermatozoides en el frotis vaginal del día siguiente a permanecer en condiciones de copulación tiene especial interés, ya que indica que se ha producido inseminación y sirve para valorar la conducta reproductora. Las hembras se sacrifican a la hora 18 del día veinte de embarazo, para realizar el recuento de embriones vivos y muertos, pesar los fetos y las placentas y, en cada uno de los fetos, se determina la talla, la longitud de las extremidades y las malformaciones producidas.

*Estudio de las malformaciones.* Se emplea la técnica de WILSON modificada por BARROW (2, 24), que consiste en fijar los fetos en solución de Bouin durante 10 a 14 días, para estudiar con lupa, en primer lugar, las malformaciones externas y luego las internas mediante secciones seriadas de cabeza, cuello, tronco y secciones sagitales de corazón.

*Estudio de la ovulación.* Las 13 ratas control y las 11 tratadas con alcohol (4 g por kg) a la hora 18 de diestro, se sacrifican por decapitación a la hora 16 de estro, se disecan trompas y ovarios y se

realizan cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  de espesor, que se tiñen con hematoxilina-eosina para el recuento de óvulos en la trompa y realizar el estudio histológico de los ovarios (11).

Los resultados se expresan con la media y su desviación ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ) y el estudio estadístico se realiza por t de student y por el método de la  $\chi^2$ .

### Resultados

**Ciclo ovárico.** El ciclo ovárico normal de la rata se modifica por tratamiento con dosis únicas de alcohol. Así, al tratar con alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, se produce en todas las ratas alargamiento de la fase receptiva de estro, que se mantiene de 2 a 4 días, siendo el valor medio 2,2 días ( $p < 0,001$ ). Cuando el tratamiento es a la hora 9 de proestro, en 7 de las 10 ratas el ciclo es normal, en una se mantiene la fase de estro 2 días y en las dos restantes se alarga la fase de diestro (tabla I).

**Reproducción.** El tratamiento con alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, produce una gran disminución del número de ratas preñadas y del número de embriones por rata ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, la conducta reproductora no disminuye, ya que todas las ratas presentan inseminación (tabla II).

En el resto de los grupos, todas las ratas quedan inseminadas y preñadas, con un número de embriones por rata semejante al control.

**Desarrollo fetal y malformaciones.** El tratamiento con alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, aumenta el porcentaje de fetos muertos ( $p < 0,001$ ) y disminuye la longitud de los miembros superiores ( $p < 0,05$ ), mientras que la disminución en los inferiores no llega a ser significativa (tabla II). En las tres ratas que quedan preñadas, se observan malformaciones en un 6,23 % de los fetos ( $p < 0,05$ ), mientras que en el grupo control sólo presentan malformaciones el 1,04 % de los fetos.

El tratamiento a la hora 9 de proestro con dosis de 4 g/kg produce un efecto semejante, con incremento del porcentaje de fetos muertos ( $p < 0,01$ ) y disminución de la longitud de los miembros superiores ( $p < 0,05$ ). Se observan también malformaciones en un 11,9 % de los fetos ( $p < 0,005$ ), predominando en orden de frecuencia: comunicaciones interventriculares de corazón, agenesias renales, hidronefrosis, atrofas cerebrales, retromicrognatias y en menor grado hendiduras de paladar y microftalmia (fig. 1).

En el grupo tratado a la hora 18 de estro, es decir, el primer día de embarazo, se observa en los fetos disminución de peso ( $p < 0,01$ ), de talla ( $p < 0,05$ ) y de la longitud de los miembros superiores ( $p < 0,01$ ) e inferiores ( $p < 0,001$ ). Se produce también aumento del porcentaje de fetos muertos ( $p < 0,01$ ) y se observan malformaciones en un 3,17 % de los fetos, incremento que no llega a ser significativo respecto al control.

Cuando el tratamiento es con dosis de 0,5 g/kg, sólo se observa un incremento

Tabla I. Efecto del etanol (4 g/kg) sobre el ciclo ovárico en periodos preovulatorios.

Hora y fase de tratamiento	N.º de ratas con ciclo normal	N.º de ratas que alargan la fase de estro	N.º de ratas que alargan la fase de diestro	Días consecutivos con la fase de estro	Días consecutivos con la fase de diestro
18 h diestro (n = 13)	0	13 (100 %)	0	2 días en 8 ratas 3 días en 3 ratas 4 días en 2 ratas	—
9 h proestro (n = 10)	7 (70 %)	1 (10 %)	2 (20 %)	2 días en 4 ratas	2 días en 1 rata 5 días en 1 rata

Tabla II. Efecto de dosis únicas de etanol sobre la reproducción y desarrollo fetal en ratas sacrificadas a la hora 18 del día 20 de embarazo.

Condiciones experimentales	Hora y fase tratamiento	Inseminación	Ratas preñadas	Embriones por rata	Embriones muertos (%)	Peso embriones	Talla embriones	Longitud milímetros		Peso placentas
								Superiores	Inferiores	
Control (n = 11)	—	11	11	8,73 ± 0,45	0	2,52 ± 0,07	31,17 ± 0,28	10,13 ± 0,25	10,16 ± 0,15	0,45 ± 0,01
Alcohol 0,5 g/kg (n = 9)	18 h diestro	9	7 (77,77 %)	7,00 ± 1,37	1,58	2,40 ± 0,03	31,39 ± 0,28	10,03 ± 0,20	10,28 ± 0,14	0,53 ± 0,02**
Alcohol 4 g/kg (n = 13)	18 h diestro	13	3*** (23,07 %)	1,54 ± 0,89***	15,00***	2,51 ± 0,04	31,90 ± 0,80	9,60 ± 0,10*	10,00 ± 0,0	0,41 ± 0,03
Alcohol 0,5 g/kg (n = 9)	9 h proestro	9	9	8,56 ± 0,63	1,29	2,48 ± 0,04	31,62 ± 0,30	10,58 ± 0,11	10,59 ± 0,09	0,48 ± 0,01
Alcohol 4 g/kg (n = 10)	9 h proestro	10	10	9,10 ± 0,38	9,89**	2,49 ± 0,09	31,15 ± 0,45	9,65 ± 0,16*	9,84 ± 0,15	0,45 ± 0,01
Alcohol 4 g/kg (n = 9)	18 h estro	9	9	8,11 ± 0,42	8,21**	2,27 ± 0,07**	30,34 ± 0,24*	9,59 ± 0,11**	9,34 ± 0,10***	0,46 ± 0,02

\*\*\* P < 0,001 respecto al control.  
 \*\* 0,01 > P > 0,005 respecto al control.  
 \* 0,05 > P > 0,02 respecto al control.

en el peso medio de las placentas en el grupo tratado a la hora 18 de estro ( $p < 0,01$ ), lo que está de acuerdo con lo señalado por otros autores (4, 19).

*Ovulación.* Para determinar si la disminución de la reproducción observada al tratar con alcohol a la hora 18 de diestro, era un efecto antimplantatorio o central, se estudia el efecto sobre la ovulación de una dosis de alcohol (4 g/kg) ad-

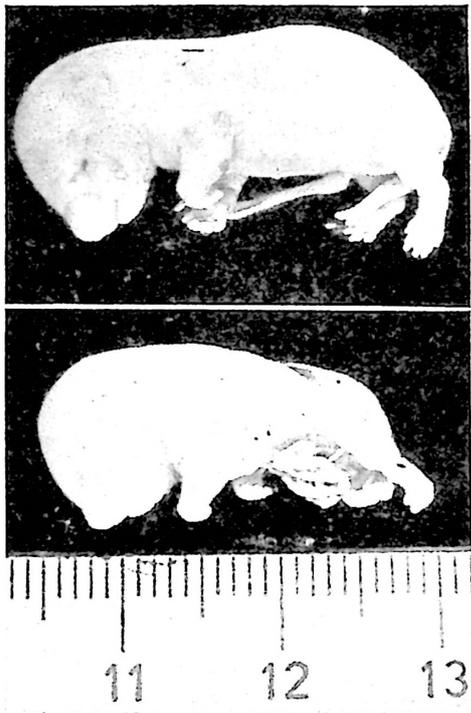


Fig. 1. Efecto del alcohol (4 g/kg) sobre fetos de rata.

Feto de madre control (arriba). Feto con malformaciones de madre tratada a la hora 9 de proestro (abajo), en el que se observa disminución de talla, extremidades cortas, macrocefalia y malformaciones abdominales externas.

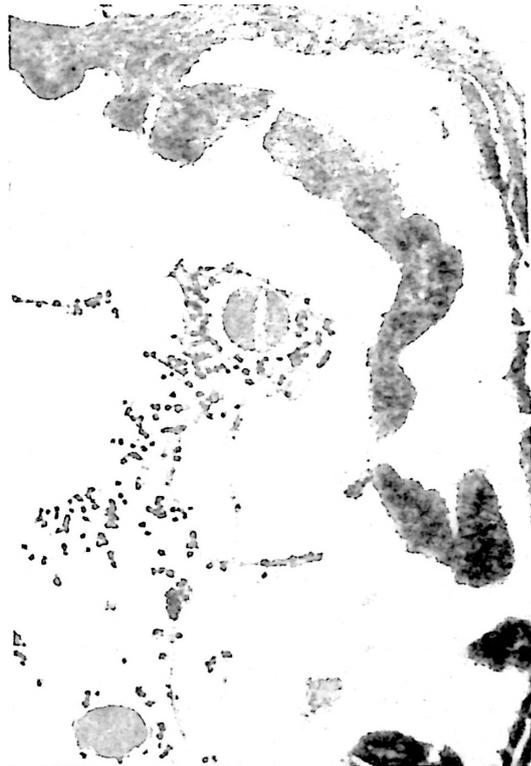


Fig. 2. Sección de trompa de rata control, en la que se aprecian dos óvulos con su cúmulo ovigero ( $\times 150$ ).

Tabla III. Efecto de dosis agudas de etanol (4 g/kg) en la hora 18 de diestro, sobre la ovulación y maduración folicular en ratas sacrificadas a la hora 16 de estro.

Condiciones experimentales	Número de ratas	Número de ratas que ovulan	Número de óvulos por rata que ovula	Número de folículos maduros por ratas
Control	13	13	$9,15 \pm 0,45$	$4,77 \pm 0,64$
Alcohol	11	4 **	$6,00 \pm 1,22$ *	$10,18 \pm 1,30$ **

\*\*  $P < 0,001$ .  
\*  $0,01 > P > 0,005$ .

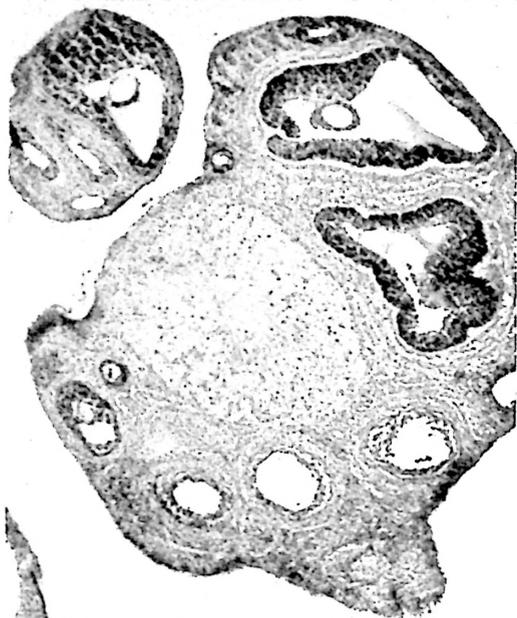


Fig. 3. Sección de ovario de rata tratada con alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro y sacrificada a la hora de 16 de estro. Se aprecian folículos grandes con el ovocito en el interior en dos de ellos ( $\times 40$ ).

ministrada a la hora 18 de diestro (tabla III). Se observa que disminuye el número de ratas que ovulan ( $p < 0,001$ ), ya que sólo 4 de las 11 ratas presentan óvulos en las trompas, con un número medio de óvulos significativamente menor respecto al control ( $p < 0,01$ ) (fig. 2). En el ovario se observan abundantes folículos maduros (fig. 3), en un número significativamente mayor respecto al control ( $p < 0,01$ ).

### Discusión

El tratamiento con alcohol a la hora 18 de diestro disminuye el número de ratas preñadas y el número de embriones por rata, siendo el efecto muy significativo con la dosis de 4 g/kg. En estas condiciones se produce también una disminu-

ción del número de ratas que ovulan y del número de óvulos por rata, lo que indica que la disminución de la reproducción no se debe a un efecto antimplantatorio, sino a un efecto central sobre la ovulación. En los ovarios se observan abundantes folículos maduros, sugiriendo que el desarrollo folicular es normal, pero la rotura folicular ha sido inhibida parcialmente por la administración de dosis altas de alcohol, probablemente por disminución de la descarga de LH, mientras que la secreción de FSH no está alterada, lo que está de acuerdo con lo señalado por otros autores (10). La disminución en la secreción de LH puede deberse a la potenciación por el alcohol del sistema GABA central (12), que inhibiría las vías adrenérgicas responsables de la secreción de LHRH.

Por otra parte, todos los animales presentan inseminación, indicando que la conducta reproductora no está disminuida y además, en el grupo tratado con alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, se produce alargamiento de la fase de estro —que es la de mayor receptibilidad—, probablemente debido a un incremento en el nivel de estrógenos por acción del alcohol, ya que la receptabilidad de la rata hembra depende de esta hormona (3).

Los efectos teratogénicos de dosis únicas de alcohol (4 g/kg) se manifiestan en periodos preovulatorios por un incremento del porcentaje de fetos muertos, de fetos con malformaciones y por una disminución de la longitud de los miembros superiores. Cuando el tratamiento es a la hora 18 de estro, es decir, el primer día de embarazo, el alcohol, además de aumentar el porcentaje de fetos muertos y con malformaciones, disminuye el peso, la talla y la longitud de los miembros.

Junto con los conocidos efectos teratogénicos de dosis crónicas de alcohol, se ha citado también que dosis únicas producen análogos efectos cuando se administran en periodos medios y avanzados del embarazo (9, 15, 17). Sin embargo,

nuestros resultados indican que, incluso en períodos preovulatorios (hora 18 de diestro y 9 de proestro) y primer día de embarazo (hora 18 de estro), pueden obtenerse también importantes efectos teratogénicos. La mayor acción teratogénica se produce al administrar el alcohol en períodos preovulatorios, ya que se observa un mayor porcentaje de fetos muertos y con malformaciones. Una explicación de estos resultados puede ser que las alteraciones cromosómicas producidas por niveles elevados de alcohol, a través de su metabolito acetaldehído (14, 15), sean mayores cuando el acetaldehído actúa directamente por vía sanguínea sobre el ovocito en la fase final de su maduración, respecto a cuando el óvulo fecundado está libre en la trompa en el primer día del embarazo.

### Resumen

Se estudia en ratas el efecto de dosis únicas de alcohol (0,5 y 4 g/kg), inyectadas a la hora 18 de diestro, 9 de proestro y 18 de estro (primer día de embarazo). Se valora el ciclo ovárico, el número de óvulos en la trompa y de folículos en el ovario, la inseminación, la fecundación, el número de embriones por rata, el desarrollo fetal y las malformaciones producidas.

La administración de alcohol (4 g/kg) a la hora 18 de diestro, aumenta la duración de la fase receptiva de estro, el número de folículos maduros en el ovario y disminuye la ovulación, el número de ratas preñadas y el número de embriones por rata.

Los efectos teratogénicos producidos por la administración de alcohol (4 g/kg) en períodos preovulatorios son: aumento del porcentaje de fetos muertos, de fetos con malformaciones y disminución de la longitud de los miembros superiores en los fetos. Cuando el tratamiento es en el primer día de embarazo, además, disminuye en los embriones el peso, la talla y la longitud de los miembros inferiores.

Estos resultados demuestran una acción teratogénica del alcohol en dosis únicas en períodos preovulatorios y en el primer día del em-

barazo. Además, el alcohol inhibe la ovulación y aumenta la receptividad al ser administrado a la hora 18 de diestro.

### Bibliografía

1. ABEL, E. L. y DINTCHEEFF, B. A.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **207**, 916-921, 1978.
2. BARROW, M. V. y TAYLOR, J.: *J. Morph.*, **127**, 291-306, 1969.
3. BRENNER, R. M. y WEST, N. B.: *Ann. Rev. Physiol.*, **37**, 273-302, 1975.
4. BROWN, N. A., GOULDING, E. H. y FABRO, S.: *Science*, **206**, 573-575, 1979.
5. CICERO, T. J. y BADGER, T. M.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **201**, 427-433, 1977.
6. GREENE, L. W.: *Alcoholism*, **4**, 1-5, 1980.
7. HINCKERS, H. J.: *J. Perinat. Med.*, **6**, 3-10, 1978.
8. KIEFFER, J. D. y KETCHEL, M. M.: *Acta Endocrinol.*, **65**, 117-124, 1970.
9. KRONICK, J. B.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **124**, 676-680, 1976.
10. LEPÁLVOTO, J., RAPELI, M., VARIS, R. y RANTA, T.: *Acta Physiol. Scand.*, **95**, 400-406, 1975.
11. MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 63-74, 1979.
12. NESTOROS, J. N.: *Science*, **209**, 708-710, 1980.
13. OBE, G. y RISTOW, H.: *Mutation Res.*, **65**, 229-259, 1979.
14. OBE, G. y RISTOW, H.: *Mutation Res.*, **56**, 211-213, 1977.
15. O'SHEA, K. S. y KAUFMAN, M. H.: *J. Anat.*, **128**, 65-76, 1979.
16. PUIG, M., ARCE, A., DE JUANA, R., LEANDRO, S. V. y VILLA-ELIZAGA, I.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **23**, 198-208, 1979.
17. SANDOR, S. y AMEIS, D.: *Rev. Reum. Embryol. Cytol., Ser. Embryol.*, **8**, 105-118, 1971.
18. SCHWETZ, B. A., SMITH, F. A. y STAPLES, R. E.: *Teratology*, **18**, 385-392, 1978.
19. SKOSYREVA, A. M.: *Akush. Ginek.*, **4**, 15-18, 1973.
20. TZE, W. J. y LEE, M.: *Nature*, **257**, 479-480, 1975.

21. VAN-THIEL, D. H., LESTER, R., y VAITUKAITIS, J.: *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **47**, 499-507, 1978.
22. VAN-THIEL, D. H., GAVALER, J. S., LESTER, R. y SHERINS, R. J.: *J. Clin. Invest.*, **61**, 624-632, 1978.
23. VÉGHÉLYI, P. V. y OSZTOVICS, M.: *Experientia*, **15**, 195-196, 1978.
24. WILSON, J. G.: En «*Teratology. Principles and Techniques*» (J. G. Wilson and J. Warkany, eds.). The University of Chicago Press, Chicago, 1965, pp. 262-277.