

Tesis de Posgrado

Citotoxicidad del consumo crónico de alcohol sobre las gametas, la fecundación y embriogénesis preimplantatoria murina

Cebral, Elisa

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cebral, Elisa. (1998). Citotoxicidad del consumo crónico de alcohol sobre las gametas, la fecundación y embriogénesis preimplantatoria murina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3076_Cebral.pdf

Cita tipo Chicago:

Cebral, Elisa. "Citotoxicidad del consumo crónico de alcohol sobre las gametas, la fecundación y embriogénesis preimplantatoria murina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3076_Cebral.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.

**"Citotoxicidad del consumo crónico de alcohol sobre las gametas,
la fecundación y embriogénesis preimplantatoria murina".**

Doctorando: Elisa Cebral.

Director: Martha Alicia Fernández de Gimeno.

**Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
(CEFYO-CONICET).**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1998.

N 3 0 7 0

**“Citotoxicity by chronic alcohol consumption on mouse gametes,
fertilization and preimplantation embryogenesis”.**

**Palabras claves: alcoholismo, etanol, ovocito, espermatozoide, fecundación,
embriogénesis preimplantativa, ratón, prostanoides.**

**Keywords: alcoholism, ethanol, oocyte, spermatozoa, fertilization, preimplantation
embryos, mouse, prostanoids.**

A los hombres entrañables que con su ideario, lucharon, cayeron y continúan, porque son los que están, inspiran, porque tan entusiastas ejemplos de humanidad como queribles, son y serán inolvidables...

...El cultivo de la ciencia exige, me parece, un coraje excepcional. La ciencia comercia con un saber obtenido por medio de la duda. ...Nuestro nuevo arte de la duda cautivó a las multitudes... Y de pronto, aquellos hombres egoístas y brutales que se aprovecharon ávidamente de los frutos del trabajo científico, sintieron que la fría mirada de la ciencia detectaba y denunciaba una miseria milenaria pero artificial, que podía fácilmente ser eliminada si se los eliminaba a ellos mismos. Nos cubrieron entonces de amenazas y sobornos, que resultaron irresistibles para las almas débiles. Pero acaso, podemos negarnos al pueblo y, al mismo tiempo, ser hombres de ciencia?.

...Mi opinión es que el único fin de la ciencia consiste en aliviar la miseria humana. Si los científicos se dejan atemorizar por los tiranos y se limitan a acumular el conocimiento por el conocimiento mismo, la ciencia se convertirá en un inválido, y las nuevas máquinas sólo servirán para producir nuevas calamidades. Tal vez, con el tiempo, ustedes lleguen a descubrir todo lo que hay para descubrir, pero este progreso sólo los alejará más y más de la Humanidad. Y el abismo entre ella y ustedes, los científicos, puede llegar a ser tan profundo que cuando griten de felicidad ante algún nuevo descubrimiento, el eco les devolverá un alarido de espanto universal".

Bertolt Brecht
(de "Galileo Galilei").

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Julio, que con su plena confianza en mí y su capacidad de entendimiento, veracidad y estímulo aclaró mi mente en momentos difíciles. Mis padres, que han hecho mucho siempre para y por sus hijos. Mi hermano Coco, a quien extraño en estos momentos...

A los amigos y compañeros que han estado cerca para apoyarme con una palabra...

A Andrea Lasserre, amiga y compañera de trabajo, que gracias, no sólo a su capacidad profesional, sino también a su manera de dar afecto, ayudó a que pudiera avanzar y crecer en este trabajo y en la visión de las circunstancias. Especialmente quiero agradecer su apoyo en todo sentido para poder terminar esta tesis.

A Alicia Motta, que de compañera se convirtió en una sincera y verdadera amiga.

A Belen Herrero, que compartió abiertamente su trabajo con entusiasmo, me apoyo y ofreció su ayuda siempre.

A Mariel Boquet, que me supo acompañar en esta última etapa, y con quien aprendí a plantear directo los problemas.

A Virginia Novaro y Silvina Pérez Martínez, que, viviendo las mismas dificultades, estuvieron dispuestas a compartir sus conocimientos y preocupaciones.

A las chicas de "antes": Ana Franchi, Marcela Chaud, Alicia Faletti, quienes supieron escucharme, orientarme, apoyarme desde los inicios.

A Marcelo Viggiano, que fue el primero con quien trabajé y me enseñó, y ayudó aún en momentos de lejanía...

A Elida González y Alicia Jawerbaum, que muestran con su actividad diaria su trabajo en ciencia.

A Ramona Morales (Rami) que me enseñó otra forma de decir la verdad.

A los chicos del "futuro": Martín Berón de Astrada, Mariana Farina, Claudio Mastronardi, Alejandro Lomiczi... por demostrar un gran esfuerzo y dedicación para poder estar con nosotros...

A Daniel Gonzalez, que dio también afecto a los animales del bioterio. A Julito (Fernández Cueto) que nunca me negó su colaboración en mi trabajo.

A Ana Inés, Isabel, y recientemente, a Patricia, porque me facilitaron las cosas y se preocuparon para llevar adelante el CEFYBO.

A los demás compañeros del CEFYBO, que compartieron los momentos difíciles institucionales para seguir adelante...

Al personal de mantenimiento, y a Ramón Karpluck por la paciencia que nos tiene, y también por preocuparse para que las cosas funcionen...

A la Dra. Martha Fernández de Gimeno, que pensó en dar primero afecto y libertad, quien me recibió, aceptó y enseñó con su gran entusiasmo en mis comienzos, y que me apoyó todo lo que se pudo.

A la Dra. Valeria Rettori, quien comparte y transmite lo que sabe conmigo en momentos críticos.

Al CONICET por permitirme trabajar en ciencia.

A los animales de laboratorio, que me inspiraron cariño y responsabilidad por lo que hago.

El contenido de este trabajo de tesis comprendió parcialmente las siguientes publicaciones:

1. Effects of moderate chronic alcohol treatment on fertilization. Cebral, E., Lasserre, A., Vitullo, A., Rettori, V. y Gimeno, MAF. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* 45: 147-154 (1995).

2. Impaired mouse fertilization by low chronic alcohol treatment. Cebral, E., Lasserre A., Rettori, V. y Gimeno, MAF. *Alcohol and Alcoholism* 32 (5): 563-572 (1997).

3. Effects of low chronic ethanol exposure on prostaglandin E synthesis by preimplantation mouse embryos. Cebral, E., Motta, A., Boquet, M. y Gimeno, MAF. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58(3): 000, (1998).

4. Response to ovulatory induction following moderate chronic ethanol administration in mice. Cebral, E., Lasserre, A., Faletti, A. y Gimeno, MAF. *Medical Science Research* 26: 29-31 (1998).

5. Mouse oocyte quality and prostaglandin synthesis by cumulus oocyte complex after moderate chronic ethanol intake. Cebral, E., Lasserre, A., Motta, A. y Gimeno, MAF. En prensa en *Prostagl. Leuk. and Ess. Fatty Ac.* (1998).

RESUMEN

Se ha descrito que la ingesta crónica y/o aguda de altas concentraciones de etanol durante la gestación produce el síndrome de alcoholismo fetal (FAS). El objetivo principal de este estudio fue profundizar los conocimientos sobre los efectos deletéreos del consumo preconcepcional de etanol y sus consecuencias sobre el desarrollo preimplantativo del embrión. Machos adultos y hembras prepúberes de ratón F1 de (C57 x CBA), ingirieron etanol al 10, 5 y 2.5% en el agua de bebida por 30 días. A los 27 días del tratamiento se indujo la ovulación. Se estudio la calidad de las gametas, la tasa de fecundación y el grado de desarrollo preimplantativo alcanzado por embriones *in vitro* e *in vivo* (hasta día 4), y adicionalmente la incidencia del consumo de etanol en la maduración sexual de las hembras.

La administración crónica de etanol al 10 y 5% produjo retraso en la maduración folicular. Como consecuencia, los ovocitos ovulados presentaron altos índices de activación espontánea, partenogénica, y la capacidad de síntesis de PGE por el complejo cúmulo-ovocitario fue reducida con el consumo del 10 y aumentada con el consumo del 5% de etanol.

La tasa de fecundación *in vitro* e *in vivo* fue reducida cuando las hembras fueron tratadas con ambas dosis de etanol. Los ovocitos intactos de las hembras tratadas no fueron penetrados por los espermatozoides, y los ovocitos haploides oviductales permanecieron sin ser fecundados. El etanol afectó tanto la maduración del ovocito, la regulación y control de su calidad por las células del cúmulo, y también posiblemente la membrana plasmática ovocitaria y otros componentes celulares, lo que resultó en la pérdida de fecundabilidad.

El consumo crónico de etanol al 10 y 5%, en la fase preconcepcional de las hembras, produjo, tanto en el desarrollo *in vitro* como *in vivo*, tasa embrionaria diaria reducida, debido al crecimiento retrasado, al arresto embrionario en estadios de mórulas y en blastocistos tempranos, en los días 2, 3 y 4 (*in vivo*) y 5 de desarrollo *in vitro*, con ambas dosis de etanol. Asimismo, fue evidente la alta tasa de fragmentación embrionaria temprana, desde día 2 con etanol al 10%, y menor y más tardía en las hembras tratadas con etanol al 5%. El consumo de etanol al 10% produjo aumento de embriones anormales. El impacto del alcohol en el desarrollo embrionario fue menor con la dosis del 5%, debido a retraso y pérdida embrionaria de reducida intensidad.

Se puede concluir que la dosis mínima perjudicial para la gameta femenina y el desarrollo ulterior del embrión preimplantativo, administrada crónicamente a hembras prepúberes, fue el etanol al 5%. Los efectos del consumo crónico de etanol al 5% podrían deberse en parte a las acciones "subcrónicas" del etanol en los días periovulatorios.

SUMMARY

It was described that the chronic or acute consumption of high doses of ethanol during gestation produces the fetal alcohol syndrome (FAS). The main objective of this study was to progress in the acknowledgement about the deleterious effects of preconceptional consumption of ethanol and the consequences on the preimplantation embryo development. Adult male and prepubertal female mice (C57 x CBA) F1), were treated with 10, 5 and 2.5 % w/v of ethanol in drinking water for 30 days. On day 27 of the treatment, females were induced to superovulate. The quality of the gametes, the fertilization rates, the stages of preimplantation development reached by the embryos *in vitro* and *in vivo* (upto day 4) were studied, and the incidence of the ethanol ingestion on the sexual maturation in the female was determined.

The chronic administration of 10 and 5% of ethanol produced delayed follicular maturation. In consequence, the ovulated oocytes showed increased levels of spontaneous parthenogenetic activation, and the capacity of PGE synthesis by cumulus-oocyte complex (COC) was reduced by the 10% ethanol intake and increased by the 5% ethanol.

The *in vitro* and *in vivo* fertilization rate was only reduced when the females were treated with both doses of ethanol. The intact oocytes from the treated females were not penetrated by spermatozoa, and the increased oviductal haploid oocytes stayed unfertilized. The ethanol affected the maturation of the oocyte, the regulation and the control of the oocyte quality by the cumulus cells, also probably the oolema and others cellular components, which resulted in fertility loss.

The chronic consumption of 10 and 5% of ethanol by females in the preconceptional phase produced, in both *in vitro* and *in vivo* development, reduced daily rates of embryos, due to delayed growth, to embryonary arrest in morulae and early blastocyst stages, in days 2, 3 and 4 (*in vivo*) and 5 (*in vitro*) of the development, with both doses of ethanol. Also, it was evident high early embryo fragmentation rates, from day 2 with ethanol 10%, and lower and later in females treated with 5% of ethanol. The ingestion of 10% of ethanol produced increase of abnormal embryos. The ethanol impact in the embryo development was lower with the 5%, due to the reduced intensity of delayed growth and embryo loss.

It was concluded that the lower deleterious dose of ethanol, administered chronically to prepubertal females, that affects the gamete and the ulterior development of preimplantation embryos, was the 5% of ethanol. The effects of the chronic alcohol consumption could be due to, in part, the "subchronic" actions of the ethanol on the periovulatory days.

INDICE.

CAPITULO I. INTRODUCCION

I- GAMETAS, FECUNDACION Y EMBRIOGENESIS TEMPRANA EN MAMIFEROS.

1- Gameta femenina.

- 1.1. Foliculogénesis y desarrollo ovocitario. 16
- 1.2. Ovulación. 25
- 1.3. Atresia. 26
- 1.4. Aspectos morfológicos del ovocito ovulatorio 26

2- Gameta masculina.

- 2.1. Estructura espermática. 30
- 2.2. Maduración epididimaria. 32

3- Fecundación.

- 3.1. Capacitación espermática. 34
 - 3.1.1. Capacitación *in vivo*. 34
 - 3.1.2. Capacitación *in vitro*. 36
- 3.2. Penetración espermática a través del cúmulo. 36
- 3.3. Interacción espermatozoide-zona pelúcida. 37
 - 3.3.1. Unión zona pelúcida-espermatozoide. 38
 - 3.3.2. Reacción acrosomal (RA). 38
- 3.4. Fusión oocito-espermatozoide 38
- 3.5. Eventos de postfusión. 39
 - 3.5.1. Activación del ovocito.
 - 3.5.2. Reacción cortical.
 - 3.5.3. Desarresto de la meiosis
 - 3.5.4. Descondensación nuclear del espermatozoide.
 - 3.5.5. Formación de pronúcleos y singamia.
- 3.6. Consideraciones sobre la fecundación *in vivo* vs. *in vitro*. 41
- 3.7. Fallas en la fecundación. 41

4- Embriogenesis de preimplantación.

- 4.1. Aspectos del desarrollo. 42

4.1.1. Aspectos morfológicos.	
4.2. Aspectos genéticos.	44
4.3. Aspectos bioquímicos.	46
4.4. Consideraciones sobre el desarrollo <i>in vitro</i> .	47
II- ALCOHOLISMO	
1- Introducción.	49
2- El consumo crónico de etanol.	49
2.1. Absorción, distribución, metabolismo y eliminación.	
2.2. Tolerancia y adaptación	
3- Efectos particulares del etanol.	56
3.1. Mecanismos de teratogenicidad.	
3.2. Mecanismos de acción y/o efectos a nivel celular.	
3.3. Efectos a nivel orgánico-tisular.	
4- Administración del alcohol y modelos experimentales.	58
5- Funciones sexuales y reproductivas.	60
5.1. Etanol y función femenina.	
5.2. Etanol y función masculina.	
5.3. Etanol en la fecundación y en el desarrollo embrionario.	
III- PROSTAGLANDINAS.	
1- Introducción	69
2- Biosíntesis de eicosanoides.	69
3- Prostaglandinas y el consumo crónico de etanol.	74
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.	79
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
1- <u>Animales y tratamientos.</u>	81
1.1. Animales.	
1.2. Tratamiento crónico con etanol.	
1.3. Tratamiento subcrónico con etanol.	
2- <u>Medios de cultivo.</u>	82
3- <u>Metodos generales.</u>	83
3.1. Determinación del consumo y alcoholemia.	

3.2. Técnicas de estudio de la gameta femenina.	83
3.2.1. Obtención de ovocitos ováricos y oviductales.	
3.2.2. Determinaciones cuanti y cualitativas: clasificación tipológica.	
3.3. Técnicas de estudio de la gameta masculina.	86
3.3.1. Obtención de espermatozoides	
3.3.2. Medición de la concentración espermática.	
3.3.3. Determinación morfológica.	
3.3.4. Medición de la motilidad espermática.	
3.3.5. Determinación de la reacción acrosomal.	
3.3.6. Medición de la vitalidad y viabilidad	
3.4. Técnica de fecundación <i>in vitro</i>.	88
3.4.1. Preparaciones previas	
3.4.2. Preparación de las gametas	
3.4.3. Inseminación y evaluación de la FIV.	
3.5. Técnica de fecundación <i>in vivo</i>.	90
3.5.1. Apareamiento.	
3.5.2. Evaluación de la fecundación <i>in vivo</i> .	
3.6. Técnica de cultivo embrionario preimplantacional.	91
3.6.1. Cultivo embrionario.	
3.6.2. Evaluación del desarrollo <i>in vitro</i> .	
3.7. Determinación del desarrollo <i>in vivo</i> preimplantacional	92
3.7.1. Obtención de los embriones.	
3.7.2. Cuantificación tipológica embrionaria.	
3.7.3. Observaciones cualitativas.	
3.7.4. Medición del número nuclear embrionario.	
3.8. Medición de la síntesis de eicosanoides.	94
3.8.1. Prostaglandinas del complejo cúmulo-ovocito.	
3.8.2. Prostaglandinas e hidroxiácidos del espermatozoide.	
3.8.3. Prostaglandinas embrionarias.	
3.9. Fotomicrografía.	97
4- <u>Análisis estadísticos.</u>	98

CAPITULO III. RESULTADOS.

1- Grado de ingesta v de intoxicación.

1.1. Consumo sólido, líquido y calórico.	100
--	-----

1.2. Peso corporal	103
1.3. Alcoholemia.	103
2- <u>Gameta femenina.</u>	
2.1 Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol sobre hembras inmaduras.	
2.1.1. Respuesta cuantitativa a la inducción ovulatoria.	110
2.1.2. Respuesta cualitativa a la inducción ovulatoria.	115
2.2. Respuesta ovulatoria en el consumo de etanol de corto término.	
Efectos comparativos.	129
3- <u>Gameta masculina.</u>	
Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol en machos adultos.	138
3.1. Concentración espermática del epidídimo.	
3.2. Morfología espermática.	
3.3. Motilidad espermática epididimaria.	
4- <u>Fecundación.</u>	
Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol en hembras inmaduras y machos adultos.	
4.2. Fecundación <i>in vitro</i>.	142
<u>4.2.1. Capacitación <i>in vitro</i>.</u>	142
a. Motilidad	
b. Reacción acrosomal.	
c. Vitalidad y viabilidad.	
d. Biosíntesis de eicosanoides.	
<u>4.2.2. Fecundación: evaluación de los eventos de postinseminación.</u>	152
a. Activación ovocitaria	
b. Formación de pronúcleos.	
c. Calidad ovocitaria postinseminación.	
4.2. Fecundación <i>in vivo</i>.	153
4.2.1. Tasa de apareo	
4.2.2. Tasa de fecundación <i>in vivo</i> .	
5- <u>Embriogenesis de preimplantación.</u>	
Efecto del consumo crónico moderado y bajo en hembras inmaduras y machos adultos.	
<u>5.1. Desarrollo <i>in vitro</i> (hasta día 7 post-hCG).</u>	160
5.1.1. Aspectos cuantitativos.	
a. Tasa de desarrollo embrionario	

b. Tasa de fragmentación diaria.	
5.1.2. Aspectos cualitativos.	171
a. Morfología embrionaria.	
b. Biosíntesis de prostaglandina E.	
<u>5.2. Desarrollo <i>in vivo</i> (hasta día 4 post-hCG).</u>	173
5.2.1. Aspectos cuantitativos.	
a. Tasa embrionaria general diaria.	
b. Tasa de desarrollo por tipo embrionario.	
c. Distribución embrionaria utero-tubárica	
d. Tasa de fragmentación diaria.	
e. Número de núcleos embrionario e índice mitótico.	
5.2.2. Aspectos cualitativos.	189
a. Morfología embrionaria y vitalidad.	
b. Biosíntesis de prostaglandina E.	
CAPITULO IV. DISCUSION	
1.1. Intoxicación crónica.	197
1.2. Efectos sobre el ovocito	198
1.3. Efectos sobre el espermatozoide.	204
1.4. Efectos sobre la fecundación.	204
1.5. Efectos sobre el desarrollo embrionario de preimplantación.	208
CAPITULO V. CONCLUSIONES.	
1.1. Conclusiones.	218
1.2. Perspectivas futuras.	220
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA.	221

CAPITULO I

INTRODUCCION

I. GAMETAS, FECUNDACION Y EMBRIOGENESIS TEMPRANA EN MAMIFEROS.

1. GAMETA FEMENINA.

1.1. Foliculogénesis y desarrollo ovocitario.

La ovogénesis es la formación, desarrollo y maduración de la gameta femenina. En los mamíferos, comienza en el desarrollo fetal y termina en el adulto sexualmente maduro. Este proceso incluye : a) origen extraembrionario y extragonadal de las células germinales; b) migración de las células germinales a las gonadas presuntivas; c) diferenciación de las células germinales en oogonia o espermatozoides; d) activa mitosis en el ovario, en la fase tardía embrionaria y fetal; e) cesación de la mitosis de la oogonia e inicio de la primera meiosis (ovocitos primarios; f) cesación prolongada de la meiosis (arresto en diacinesis de la profase I); g) crecimiento ovocitario; h) reinicio de la meiosis (maduración meiótica: primera reducción meiótica) y ovulación; i) terminación meiótica (segunda división meiótica) en respuesta a la fertilización.

El folículo ovárico, unidad funcional del ovario, provee el sistema de soporte necesario para que el oocito alcance su máximo potencial y que adquiera la capacidad de unirse al espermatozoide. Las células foliculares controlarán la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos de los folículos seleccionados para la ovulación, contribuyendo a la atresia y destrucción de los ovocitos no seleccionados. Luego de la ovulación las celulares foliculares sufrirán profundos cambios en su sensibilidad hormonal y en su capacidad para producir esteroides, diferenciándose en cuerpo lúteo.

Las diferentes etapas del desarrollo folicular se muestran en la figura I.1.

1.1.a) Fase de crecimiento, independiente de gonadotrofinas.

Durante la vida reproductiva, el ovario contiene pools de ovocitos arrestados en profase I. Solamente los ovocitos totalmente crecidos resumirán la meiosis y serán ovulados durante el estro del ciclo. En la rata, un cohorte de folículos crece durante 4-5 días del ciclo estral (Hirshfield, 1991). En el humano, los folículos crecen durante la fase folicular temprana. En el ganado, oveja y yegua, el desarrollo folicular ocurre durante todo el ciclo estral (Fortune, 1994). No se conoce cuál es el estímulo que inicia el crecimiento folicular, aunque este puede ocurrir con concentraciones basales de gonadotrofinas (Halpin, y col., 1986), hormonas metabólicas y factores de crecimiento intraováricos (Peters y col., 1973). El crecimiento folicular es ininterrumpido, inclusive en la hembra prepúber y durante la preñez (Peters y col., 1975).

a.1) Folículo primordial.

Una vez que las oogonias del cortex interno ovárico, son rodeadas por una capa de células planas epiteliales, las células de la granulosa, y membrana basal, se forman los folículos primordiales (Wallace y col., 1989, Koering y col., 1991). Contiene ovocitos arrestados en diplotene/diacinesis de la profase I. Estos presentan un núcleo grande vesicular o vesícula germinal. Estos folículos crecen durante la vida fetal en algunas especies (primates, rumiantes), pero en otras se desarrolla durante el período neonatal temprano (roedores, conejos) (Hirshfield, 1991, Marion y Gier, 1971).

Los folículos persisten durante la vida funcional del ovario, ya que constituyen un reservorio de folículos en estado de reposo. Pueden iniciar el crecimiento en respuesta de distintos factores.

a.2) Folículos preantrales (primario y secundario).

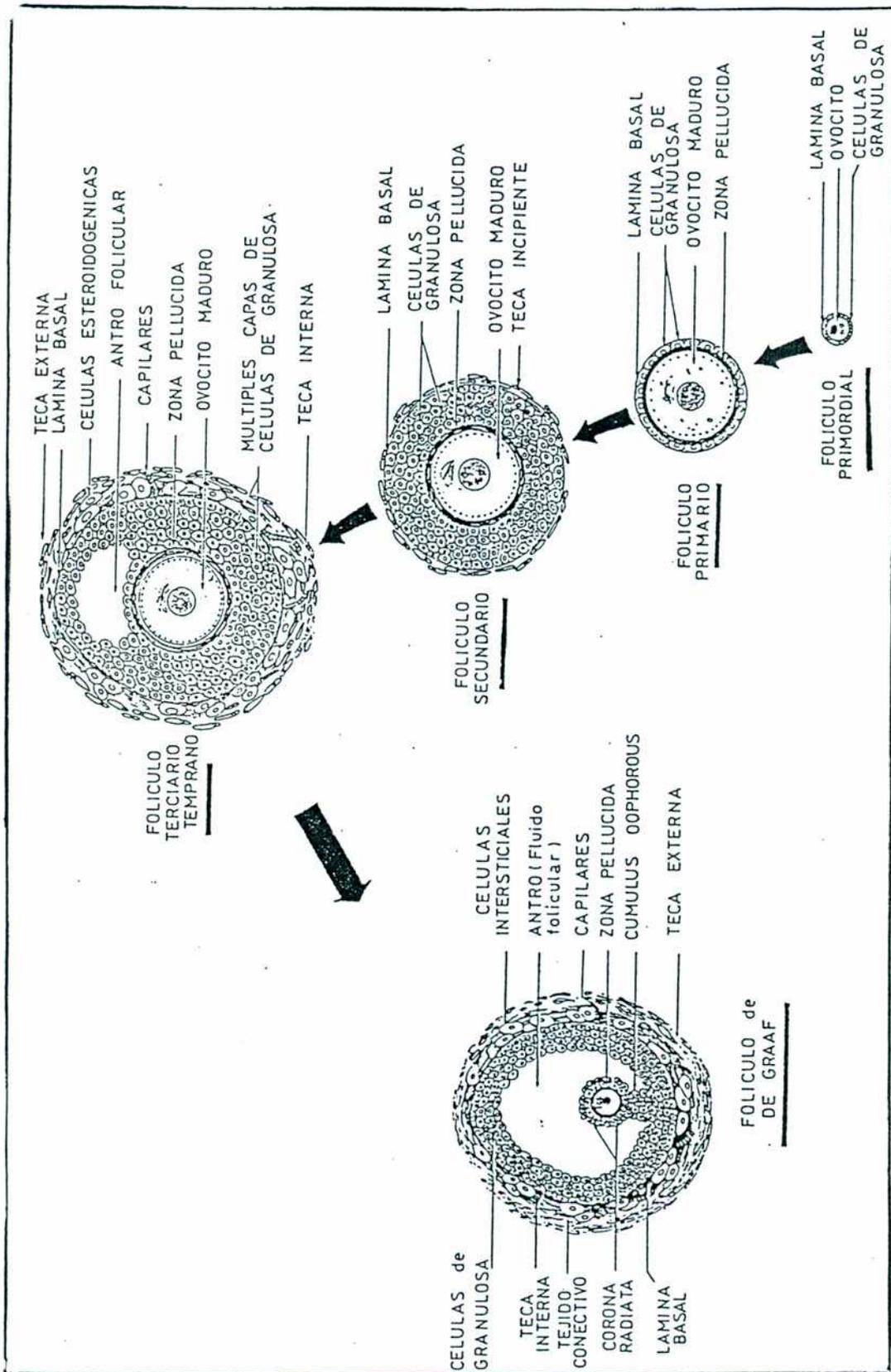
El folículo primario presenta una capa de células planas de mayor grosor y cúbicas. Contiene un ovocito primario, caracterizado principalmente por hipertrofia del aparato de Golgi (Gulyas, 1980). Se forma la zona pelúcida, cubierta glicoproteica, bajo la influencia dual del ovocito y las células de la granulosa del cúmulo (corona radiata) (Anderson, y Albertini, 1976). El ovocito y la capa de células de la granulosa están acoplados metabólicamente (Gilula y col., 1978). Las células tecales se distinguen morfológicamente y se diferencian del estroma gonadal, y delimitan los bordes del folículo. La membrana basal separa las células tecales de la granulosa.

En el folículo secundario, la granulosa prolifera para formar un epitelio estratificado, y una capa multilaminar rodea al ovocito primario. Este inicia su crecimiento arrestado en diacinesis. Los ovocitos promueven la proliferación de las células de la granulosa (Vanderhyden y col., 1992).

Altos niveles de AMPc, GMPc y purinas, acumuladas como consecuencia del metabolismo folicular, mantienen el arresto (Eppig. y Downs, 1984; Schultz, 1986; Hubbard y Terranova, 1982; Downs, 1990), controlando la maduración meiótica de los ovocitos.

Las células de la granulosa preantral tienen la capacidad de sintetizar progestágenos, andrógenos y estrógenos en cantidades limitadas. La enzima aromatasa cataliza la conversión de andrógenos (producidos en la teca) a estrógenos (en la granulosa) (aromatización) y parece ser el factor limitante de la producción ovárica de estrógenos. Esta enzima es activada por la FSH (Moon y col., 1975), de modo que la producción de estrógenos está limitada por el número de receptores para la hormona. Las células de la granulosa presentan receptores de FSH. Entonces el folículo preantral puede aromatizar pequeñas cantidades de andrógenos y generar su propio ambiente estrógeno (McNatty y col., 1979). Además, la FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitótico sobre las células de la granulosa y estimular

FIGURA I.1
Arquitectura y clasificación de los estadios del desarrollo folicular.



su proliferación (Richards, 1979). Los andrógenos, producidos en las células de la teca, activarían a la aromatasas (Hillier, y De Zwart, 1981). Los productos de los andrógenos, como dihidrotestosterona y androstenediona, no son aromatizables, y pueden inhibir la actividad de aromatasas (Hillier y col., 1980).

El destino del folículo preantral depende de un delicado balance: en bajas concentraciones, los andrógenos aumentan su propia aromatización y contribuyen a la producción de estrógenos. En concentraciones más altas, la capacidad de aromatización es sobrepasada, y el folículo deviene androgénico y finalmente atrésico.

1.1.b) Fase de maduración, dependiente de gonadotrofinas.

La FSH, junto con los estrógenos, inducen la maduración de la granulosa, gatillando la proliferación celular. Aparecen receptores para LH y se induce la síntesis de aromatasas. La FSH también estimula la síntesis de moléculas específicas para la maduración de la granulosa (proteoglicanos (Mueller, y col., 1978), inhibina (Davis y col., 1988), IGF-I (Hammond y col., 1988), interleukina-1, TNF).

b.1) Folículo antral o terciario.

Las células de la teca se dividen en dos capas: la teca interna (interior, glandular y muy vascularizada) y la teca externa (compuesta de tejido conectivo y fibras de músculo liso). Numerosos vasos sanguíneos y linfáticos penetran la teca externa y se comunican con un fino plexo de vasos en la teca interna. Bajo la influencia sinérgica de los estrógenos y la FSH, se produce un aumento de la producción de fluido folicular, que comienza a acumularse en los espacios intercelulares de las células de la granulosa hasta que se forma una cavidad (el antro), que provee el medio en el cual el ovocito y la granulosa que lo rodea pueden nutrirse. El contenido del fluido parece derivar en parte del plasma y también de productos secretorios de las células de la granulosa (Edwards, 1974). Su concentración proteica es levemente menor que la de la sangre. La presencia de estrógenos y FSH en el fluido antral es esencial para el crecimiento folicular (McNatty y col., 1979). Los folículos antrales con mayores tasas de proliferación de la granulosa contienen las mayores concentraciones de estrógenos, y tendrán la mayor probabilidad de mantener un ovocito viable. Por el contrario, un entorno androgénico promueve cambios degenerativos en el ovocito.

El antro permite el acceso de FSH y LH hasta sus receptores celulares. Al momento de la formación del antro, el ovocito interrumpe el crecimiento y adquiere la competencia para reanudar la meiosis (condensación inicial de la cromatina alrededor del núcleo (Wassarman, 1976; Mattson, y Albertini, 1990; Wickramasinghe, y col., 1991). Sin embargo, las interacciones entre las células foliculares y el ovocito, mantienen el arresto meiótico hasta el

momento de la ovulación. La competencia para la reasunción de la meiosis es adquirida independientemente de la comunicación entre la granulosa y el ovocito en crecimiento (Eppig y col., 1993).

b.1.1) Teoría de las "2 células, 2 gonadotropinas"

La síntesis de esteroides parece estar compartimentalizada dentro del folículo. En la teca no se han detectado receptores para FSH. La granulosa produce preferencialmente estrógenos, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en las células tecales (Hillier y col., 1980; McNatty y col., 1980; Tsang y col., 1980). Surgió el concepto de "dos células, dos gonadotropinas" en la esteroidogénesis ovárica (figura I.2). En respuesta a la LH, las células tecales son estimuladas para producir andrógenos, que pueden ser luego convertidos a estrógenos, a través de la aromatización inducida por FSH en las células de la granulosa (Moon y col., 1978; Richards y col., 1987).

La rápida acumulación de receptores de FSH por medio de la proliferación de la granulosa estimula la aromatización de andrógenos derivados del compartimiento tecal en desarrollo. Luego, la actividad combinada de ambos compartimientos resulta en una producción más eficiente de estradiol, necesaria para generar el pico preovulatorio de estrógenos.

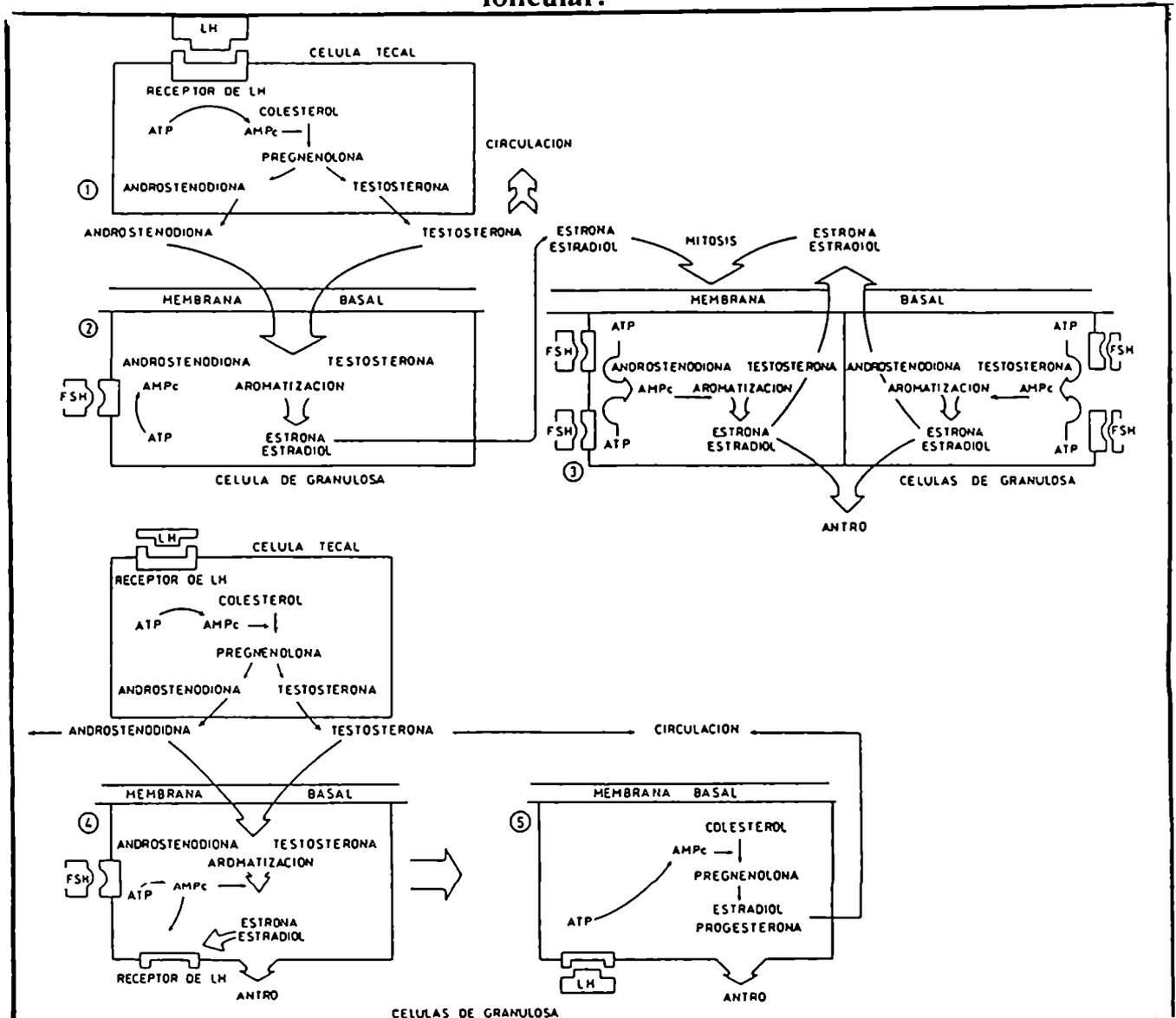
b.1.2) Reclutamiento folicular y selección del folículo dominante.

En la rata, el reclutamiento folicular de un grupo ovulatorio ocurre alrededor del momento de la formación del antro folicular. El número de folículos reclutados es mayor que el número ovulatorio, ya que un número especie específico de folículos ovulatorio continúan creciendo varios días para alcanzar el tamaño ovulatorio.

Los estrógenos y la FSH intervienen en la selección de los folículos destinados a ovular (Smith y col., 1975; Abraham, y col., 1972). La retroalimentación negativa que producen los estrógenos sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipofisario puede servir para privar a los otros folículos menos desarrollados de FSH adecuada (Zelevnik, 1981), descenso que podría disminuir la actividad aromatasas dependiente de FSH, limitando así la producción de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto interrumpiría la proliferación de las células de la granulosa y promovería la conversión hacia un microambiente androgénico, lo cual es inductor de la atresia irreversible. Este proceso sería el responsable de la selección de los folículos dominantes, que llegarán a la ovulación en cada ciclo.

La mayor tasa de proliferación de las células de la granulosa en los folículos dominantes determina el mayor contenido de receptores de FSH. Como resultado, el estímulo para la aromatización es mantenido en estos folículos, pero no en los menos desarrollados. Rápidamente, en los folículos seleccionados, la producción de estrógenos excede la contribución de los demás folículos en conjunto. Además, el incremento de la masa de

FIGURA I.2
Teoría de "dos células, dos gonadotrofinas" para la esteroidogénesis folicular.



(1) La LH estimula la producción tecal de andrógenos. (2) Androstenodiona y testosterona son convertidos a estrona y estradiol por aromatización inducida por FSH en las células de la granulosa. (3) La FSH induce un aumento en el desarrollo de sus propios receptores. Juntos, FSH y estradiol estimulan la proliferación de la granulosa, lo que resulta en un incremento de los receptores de FSH y de la producción de estrógenos. (4) Potenciada por el estradiol, la FSH induce receptores de LH en las células de la granulosa. (5) Actuando por su propio receptor, la LH inicia la luteinización, resultando en la producción de progesterona.

granulosa es acompañado por un aumento del desarrollo de la vasculatura de la teca, ofreciendo un acceso preferencial de la FSH a estos folículos que también poseen el mayor número de receptores de la hormona. Estos eventos permiten que los folículos dominantes retengan la sensibilidad única a la FSH y tengan un desarrollo preovulatorio continuado a pesar de los niveles menguantes de la gonadotropina (Zelevnik y Kubik, 1986).

Se ha visto que la FSH induce el desarrollo de los receptores de LH y de prolactina (Zelevnik y col., 1974; Wang y col., 1979) en las células de la granulosa de los folículos antrales grandes. Además, la producción aumentada de estrógenos, expresión de la dominancia, actúa centralmente para estimular el pico de LH y localmente para promover la inducción de los receptores requeridos para la respuesta (Richards y Midgley, 1976). La destrucción de algún folículo dominante en la ola de crecimiento, es seguida por la aparición de otro folículo dominante inicial.

b.1.3) Mecanismos de retroalimentación.

La sucesión de eventos en el ovario esta coordinada con centros hipotálamo-hipofisarios por medio de mecanismos de retroalimentación. La liberación hipofisaria de FSH es muy sensible a la influencia negativa de los estrógenos, aun en bajas concentraciones, respondiendo en forma inmediata (Knobil, 1974). A niveles más elevados de estrógenos, la supresión de la FSH es profunda y sostenida. Los estrógenos ejercen retroalimentación negativa sobre la LH a niveles bajos y moderados, pero a niveles más altos (valor umbral en humano y roedores de 200 pg/ml), son capaces de generar retroalimentación positiva sobre la liberación de LH (Young y Jaffe, 1976).

La inhibina, la activina y la folistatina también ejercen mecanismos de retroalimentación. La inhibina (glicoproteína producida por la granulosa y las células luteales de rata y humanas) inhibe selectivamente la liberación de FSH (Rivier y col., 1986).

b.2) Folículos preovulatorio o de De Graaf.

Las células de la granulosa adyacentes a la membrana basal se alargan y contienen alta densidad de receptores para LH con activa síntesis esteroideogénica (Zoller y Weisz, 1979). Las células internas que rodean al antro folicular y las del cúmulo, tienen pocos receptores para LH (Hillensjo y col., 1981). Los factores solubles producidos por el ovocito promueven la mucificación del cúmulo, permitiendo que estas células secreten ácido hialurónico en respuesta a la FSH (Salustri y col., 1990).

Como consecuencia del pico de LH, incrementa la vascularización del folículo. Las células de la granulosa muestran los primeros signos de luteinización con el inicio de la producción de

progesterona, siendo la LH promotora de este proceso. Los ovocitos maduran meióticamente y completan la primera división meiótica, alcanzando la metafase II. El cúmulo que rodea al ovocito se expande por liberación de material viscoso extracelular.

El folículo preovulatorio produce cantidades crecientes de estrógenos a medida que va madurando. Los niveles de estradiol se elevan rápidamente, alcanzándose un pico antes o inmediatamente después del pico de LH (Fujii y col., 1983). Las concentraciones sostenidas de estradiol por sobre el umbral estimulan el pico de LH. En ausencia de FSH o de estrógenos suficientes, la respuesta de los folículos a la LH se evidencia como atresia más que luteinización (Richards y col., 1976). Las altas concentraciones de LH que se alcanzan en el momento del pico preovulatorio causan una desensibilización transiente de sus receptores, por lo que las células efectoras se hacen refractarias a la estimulación de la LH. Sin embargo, luego de la ovulación, las células recuperan su capacidad de responder a la gonadotropina (Richards y Williams, 1976).

En la rata, se observa un gran pico preovulatorio de progesterona y 20 hidroxiprogestero-20 en cercano al momento del pico de LH, provenientes posiblemente de las células de la granulosa (March y col. 1979). La progesterona también facilita la respuesta a la retroalimentación positiva de los estrógenos, induciendo un pico combinado de FSH y LH. Esta acción podría ayudar a coordinar el estímulo ovulatorio con la maduración del folículo preovulatorio (Terasawa y col., 1980).

b.2.1. Desarresto de la meiosis I y reasunción meiótica.

En respuesta al pico de LH ocurre la maduración nuclear y el ovocito es arrestado en metafase II. Los oocitos removidos de los folículos antrales y cultivados in vitro, maduran espontáneamente, sin estímulo hormonal (Downs, 1993; Racowski y Baldwin, 1989).

La reasunción de la meiosis es un evento de activación intracelular específico, que ocurre bajo la influencia de señales extracelulares sobre la membrana celular. Se ha propuesto una hipótesis para el mecanismo involucrado en la reasunción de la meiosis. Un flujo de factores regulatorios (Downs y col., 1988) desde las células foliculares al oocito mantiene el arresto meiótico. Luego del pico de LH, se produce el desacople entre las células y la pérdida de la comunicación, interrumpiéndose la llegada de sustancias inhibitorias al ovocito (Dekel, 1988; Coskun y Lin, 1992).

. Aspectos estructurales del desarresto meiótico.

El desarresto de la meiosis incluye la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), la formación de la placa metafásica y condensación cromosómica, el movimiento de la placa hacia la corteza del ovocito, la separación de los cromosomas homólogos, la liberación del primer cuerpo polar y el arresto en metafase II del ovocito dentro del folículo preovulatorio. Los cromosomas permanecen condensados y ensamblados en el ecuador de la placa metafásica. Con estos

eventos, decrece el número de uniones estrechas entre la granulosa (Rotmensch y col., 1986).

. Aspectos regulatorios.

Varios factores regulan el arresto meiótico, que esta controlado por la acción sinérgica de los componentes del fluido folicular. Al momento de la ovulación, el ovocito escapa de este control inhibitorio y reasume la maduración en forma espontánea (Sato y Koide, 1987).

La LH causa la reasunción de la meiosis independientemente de sus efectos esteroideogénicos.

El factor de inhibición de la maduración del ovocito (OMI) (péptido proteico no esteroideo (Tsafri, 1988) es secretado por las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños (Tsafri, 1978; Motlik y col., 1991). Se ha visto que el fluido folicular de los folículos pequeños contienen cantidades más altas de OMI que el fluido de los folículos preovulatorios (Schultz, 1991).

El factor promotor de la maduración (MPF) regula la condensación cromosómica luego de la ruptura de la vesícula germinal, alcanzando alta concentración durante la metafase I y II (Schultz, 1991). La aparición del MPF activo precede a la ruptura de la vesícula.

La caída en el AMPc, y la actividad kinasa dependiente del AMPc permite la activación. Una alta concentración de AMPc inhibe la reasunción de la meiosis (Schultz, y col., 1983).

El aumento del calcio intracelular es necesario para la reasunción meiótica (Powers y Paleos, 1982; Downs, S.M., 1993). La estimulación de la maduración foliculo-ovocitaria por la LH es dependiente de las concentraciones de calcio externo (Downs, 1993), y la liberación de calcio de los depósitos intracelulares induce el desarresto meiótico. El calcio liberado por las células foliculares en respuesta a la estimulación gonadotrófica, forma un gradiente de concentración e induce la ruptura de la vesícula en el ovocito (Downs, 1993). El Ca^{2+} por sí solo puede disparar la maduración. Solamente los ovocitos que no presenten un umbral normal de respuesta de Ca^{2+} no madurarán (Moreau y Guerrier, 1979).

Los esteroides contribuyen al arresto de los ovocitos (Downs y col., 1985). Un aumento en la LH se correlaciona con el aumento en la progesterona y con la disminución de la uniones estrechas, a medida que el ovocito reasume la meiosis (Racowsky y col., 1989).

1.2. Ovulación.

Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación (Peters y McNatty, 1980). Este esteroide, a través de retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de LH (Helmond y col., 1980). El folículo preovulatorio libera el ovocito arrestado en metafase II, hasta que es fecundado o activado por otros estímulos.

La ruptura folicular se ha atribuido al incremento de la presión del fluido folicular en la mitad del ciclo, a la contracción de células musculares lisas foliculares, la mucificación, expansión y

dislocamiento del cúmulo del estrato granuloso y al clivaje proteolítico de la pared folicular (LeMaire, 1989). Se ha comparado a la ovulación con un proceso inflamatorio agudo (Epifano y Dean, 1994), en el cual ocurre hiperemia, vasodilatación e infiltración de leucocitos y macrófagos, participando también otros mediadores: prostaglandinas, factores angiogénicos, histamina, bradiquinina, activadores de plasminógeno y plasmina (Epifano y Dean, 1994).

1.3. Atresia.

Fenómeno por el cual los folículos pierden la integridad y el contenido ovocitario. Este proceso depende de la edad, el estado fisiológico individual, el estadio de desarrollo folicular y los factores genéticos y ambientales. Una vez que un folículo entra en el pool de crecimiento puede ser ovulado o va a la atresia.

La gran pérdida ovocitaria ocurre durante la vida fetal y la pubertad. La apoptosis y la muerte celular programada es el mecanismo propuesto para la atresia folicular (Crisp, 1992). En la rata y ratón, hay entre 15 y 20 folículos antrales grandes 12-16 horas antes de la ovulación. El 50 % ovulará y los restantes van a atresia.

La atresia ovocitaria esta caracterizada por la "pseudomaduración": ruptura de la vesícula germinal, el alineamiento de los cromosomas en metafase y posible extrusión de un cuerpo polar (Savard y col., 1965), aumento de gránulos, agregación de organelas (Short, 1962; Younghai y Short, 1970), alteraciones en la zona pelúcida (Fowler y col., 1978) y la regresión del ooplasma.

Los ovocitos atrésicos tienen pocas células del cúmulo (Crisp, 1992), y hay una reducción de las uniones estrechas (Mori y Marsh, 1982; Crisp, 1992). El ovocito eventualmente se desintegra y el remanente es fagocitado, mientras que la zona pelúcida puede persistir como una banda refráctil.

La cesación de la mitosis de la granulosa es característica de la atresia de los folículos preovulatorios. También, el número de receptores para FSH y los niveles de aromatasa decrecen, y así incrementa la producción de andrógenos. Las células de la granulosa son invadidas por neutrofilos y macrófagos, y el antro folicular se llena de tejido conectivo (Crisp, 1992). Las células de la granulosa atrésicas presentan alteraciones histo y bioquímicas que definen su morfología (Wiest y col., 1963). La hipertrofia de la teca es característica de folículos atrésicos (Terakawa y col., 1978).

El último paso en la atresia es el completo colapsamiento folicular (Greep y col., 1942).

1.4. Aspectos morfológicos del ovocito ovulatorio.

1.4.1. Clasificación tipológica de los ovocitos.

Los disturbios en el progreso del ciclo celular, por la edad postovulatoria del ovocito y la edad de la hembra pueden reducir la fertilidad (Eichenlaub-Ritter, 1994). Así, fallos en la fecundación pueden deberse a alteraciones en la calidad del ovocito.

Se ha visto que los folículos incapaces de desarrollar contienen bajas concentraciones de estradiol en el antro y células de la granulosa incapaces de responder a la FSH, conteniendo ovocitos degenerados o atrésicos (McNatty y col., 1979).

El ovocito con anomalías morfológicas citoplasmáticas puede finalizar en la fragmentación y posterior necrosis, como parte del proceso apoptótico (Alison y Sarraf, 1992). Ovocitos anormales pueden ser liberados por inducción exógena de la ovulación, cuando los folículos atrésicos son inducidos a ovular (Takase y col., 1995). Las deformaciones de la superficie de los ovocitos reflejarían cambios en la tensión de la membrana plasmática, y pueden ocurrir en ovocitos nucleados o anucleados. También, la fragmentación del ADN puede ocurrir en ovocitos activados partenogenéticamente, lo cual sugiere que la apoptosis puede estar relacionada con la partenogénesis (Takase y col., 1995).

La inability de un espermatozoide competente para penetrar un ovocito puede estar asociada a anomalías citológicas (Bedford y Kim, 1993): inmadurez (estadio de vesícula germinal, metafase I), cuerpos refráctiles citoplasmáticos, uno o más núcleos, ooplasma degenerativo, cromosomas individuales dispersos en el citoplasma, ausencia de cromosomas, zona pelúcida elongada, diferentes grados de activación partenogénica. El carácter resistente o impenetrable de la zona pelúcida puede reflejar una variedad de anomalías ovoplasmáticas. Defectos en el sistema de actina en el ovocito (importante para los procesos de rotación del huso y la extrusión del cuerpo polar) está relacionado con extrusión anormal del segundo cuerpo polar, lo cual conduce a triploidía, mientras que defectos en el sistema de microtúbulos está asociado a pérdida o ganancia de cromosomas, llevando a aneuploidías (Webb y col., 1986; Pickering y col., 1988).

El arresto de la cigota en desarrollo ha sido asociado con husos multipolares o degradación del huso, ausencia de formación de cuerpo polar, prematura condensación de la cromatina (PCC), imbalance cromosómico (Eichenlaub-Ritter y col., 1995). La presencia de cromosomas desordenados o dispersos, degeneramiento del huso, sobremaduración ovocitaria (Eichenlaub-Ritter y col., 1995), con diversos grados de activación (Winston y col. 1991) es típica del envejecimiento *in vivo* de ovocitos en metafase II. Este proceso puede ser intrafolicular, cuando el ovocito maduro es retenido por más tiempo, o intratubárico, cuando el ovocito es ovulado a tiempo pero la fecundación está retrasada.

Una apropiada interacción entre los cromosomas y microtúbulos durante el ensamblado del huso es necesaria para la división meiótica. Luego, el movimiento del aparato del huso meiótico hacia la periferia celular es un prerequisite para la división y extrusión del primer cuerpo polar (Soewarto y col., 1995). Si la migración del huso se inhibe (por inhibición de la polimerización de actina), se puede originar una metafase II diploide, sin la formación de cuerpo polar, u ovocitos con dos pronúcleos. Luego de la fertilización, estos ovocitos pueden formar triplodes o embriones digínicos, dependiendo de si extruyó el segundo cuerpo polar (Soewarto y col., 1995).

Entonces, las estructuras anormales del huso pueden ser: huso reducido, fibras del huso aberrantes, disrupción del huso y cromosomas dispersos de la placa metafásica (Pickering y col. 1988). Se ha visto que el porcentaje de embriones partenogénicos con un solo pronúcleo correspondía al porcentaje de ovocitos con disrupción del huso durante el período de 12-32 hs post-hCG (Webb y col., 1986). Los embriones con 2 pronúcleos parecen derivar de ovocitos en los que el huso ha permanecido periférico (Webb y col., 1986; Pickering y col., 1988). La sincronía entre la maduración citoplasmática y nuclear ovocitaria puede estar influenciada por las condiciones en las que madura (Santalo y col., 1992).

1.4.2. Activación partenogénica.

Recientemente, se ha descripto activación partenogénica en ovocitos humanos (Winston y col., 1991). Se ha visto que la activación puede ocurrir en folículos deficientes de células de la granulosa, y probablemente resulte de la inability de esos folículos para mantener un nivel suficiente del inhibidor de la meiosis (Eppig, 1978). La reasunción de la meiosis también ocurre dentro de los folículos atrésicos, de manera independiente de gonadotrofinas (Byskov, 1978; Eppig, 1982).

Diversos agentes físicos y químicos pueden inducir la activación partenogénica del ovocito (Scott y Smith, 1995).

a. Aspectos morfológicos.

a.1. Exocitosis de gránulos corticales.

Se ha visto que los ovocitos activados como los no activados envejecidos, pueden perder los gránulos corticales (GC) (Yanagimachi y Chang, 1961; Tombes y col., 1992), aunque esta pérdida es parcial. Posiblemente la liberación de los GC no es un prerequisite esencial para el avance del desarrollo partenogénico. Pero, la reacción de zona puede no funcionar normalmente después de la activación partenogénica (Flechon y col., 1975).

a.2. Estructura de la zona pelúcida.

Luego de la activación del ovocito, ocurre la disolución de la capa más externa de la zona

pelúcida (Baranska y col., 1973). Disminuye la susceptibilidad de la zona a la proteólisis ("hardening"). También, en los ovocitos activados, se ha detectado actividad ovoperoxidasa en el espacio perivitelino y en asociación con los gránulos corticales liberados (Gulyas y Schmel, 1980).

a.3. Cuerpo polar y núcleos.

El número y tamaño de los pronúcleos presentes depende del número de cromosomas involucrados y de si estos permanecieron en grupos (Austin, 1969).

La diferente formación nuclear puede producir: a) ovocitos con uno o dos pronúcleos y segundo cuerpo polar aparentemente normal (con material nuclear), b) ovocito con pronúcleos y fragmento citoplasmático similar a segundo cuerpo polar, c) ovocito sin cuerpo polar (por resorción) y un pronúcleo, d) ovocito de clivaje inmediato con dos fragmentos citoplasmáticos parecidos a cuerpos polares, e) ovocito de clivaje inmediato con aparente cuerpo polar y numerosos fragmentos pequeños en el espacio perivitelino (Tarkowski, 1975).

a.4. Aparato meiótico y elementos del citoesqueleto.

Luego de la activación espontánea, se observó migración periférica del huso meiótico (Kaufman, 1983). Se encontró un incremento en la asociación entre el huso meiótico y estructuras con actividad de fosfatasa ácida (Longo, 1980), lo cual se relacionó con el deterioro del ovocito y eventos disruptivos y de fragmentación. Varios investigadores han observado que los ovocitos activados partenogenéticamente presentan ocasionalmente (6-8 horas postactivación) fragmentos citoplasmáticos en el espacio perivitelino (Witkowska, 1973). Se ha sugerido que la presencia de estos fragmentos podría reflejar una reacción cortical anormal y un incremento en el grado de inestabilidad del ooplasma, o estar relacionados con alteraciones en el citoesqueleto, asociado con la membrana celular. Los fragmentos citoplasmáticos anucleares y nucleares, fueron encontrados en ovocitos con 2 pronúcleos y en embriones de clivaje inmediato.

b. Aspectos bioquímicos.

La activación partenogenética se caracteriza por presentar incremento de liberación espontánea de depósitos maduros (Whittingham y Siracusa, 1978). Un simple desplazamiento de Ca^{++} asociado a los fosfolípidos de membrana es suficiente para iniciar la maduración del ovocito (Nicolson, 1976; Whittingham y col., 1978). Se sabe que la liberación de Ca^{++} intracelular es el estímulo universal de la activación ovocitaria, por fecundación o partenogénesis (Tombes y col., 1992). La reanudación de la meiosis II (Tombes y col., 1992), es un evento independiente del Ca^{++} externo (a diferencia de la meiosis I), y dependiente de la liberación de los depósitos intracelulares y subsecuente elevación transiente (Shiina y col., 1993). Luego, se dispara la activación de la vía de inositol fosfatos (IP3) (Kline y Kline, 1992).

También, la liberación de Ca^{++} intracelular involucra la liberación de los gránulos corticales (Steinhardt y Alderton, 1982; Swann y Ozil, 1994).

En la estimulación partenogenética ocurre un incremento simple monotónico de Ca^{++} , diferente de la serie de oscilaciones de Ca^{++} vistas en la fertilización. Entonces, un incremento simple pero de larga duración es suficiente para disparar el desarrollo partenogenético (Swann y Ozil, 1994). Sin embargo, se observó que el primer Ca^{++} transiente no es suficiente para causar el desarresto meiótico y que la reacción cortical requiere varios picos de Ca^{++} transientes. Además, es probable que la exocitosis de GC este estimulada por la producción de DAG y la subsecuente estimulación de la PKC (Swann y Ozil, 1994). El calcio causa producción de DAG, el cual luego estimula la proteína kinasa C, que respondería a específicas series de espigas de calcio. Los niveles de estimulación en la activación del ovocito deben estar modulados ya que sobreestimulación prolongada de la PKC causa la reabsorción del segundo cuerpo polar (Swann y Ozil, 1994). Se vio que la estimulación de la actividad PKC en los ovocitos en metafase II induce la exocitosis de gránulos corticales, la formación de pronúcleos y cambios en la fosforilación proteica similar a los observados durante la activación natural de los ovocitos (Gallicano y col., 1993).

También, se observaron en los ovocitos activados alteraciones en el potencial eléctrico de membrana, probablemente asociados con cambios en el influjo y eflujo de cationes bivalentes.

La síntesis proteica es necesaria para mantener el arresto meiótico (Kubiak, 1989), cuando se pierde incrementa la susceptibilidad a la activación (Swann y Ozil, 1994). La reasunción meiótica esta causada por la desaparición del factor promotor de la maduración (MPF) y del factor citostático (CSF) (Swann y Ozil, 1994). El hecho que la actividad del MPF puede retornar a los niveles de preactivación después de un aumento transiente de Ca^{++} puede explicar por que algunas veces ocurre la extrusión de segundo cuerpo polar pero falla la formación de pronúcleo (Swann y Ozil, 1994).

2. GAMETA MASCULINA.

2.1. Estructura espermática.

2.1.1. Morfología espermática.

La formación del espermatozoide (espermatogénesis) ocurre en los túbulos seminíferos del testículo, e involucra una serie de divisiones meióticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, un remodelamiento morfológico de la espermátide y la liberación de la célula libre en el lumen del tubo seminífero mediante el proceso conocido como espermiación.

El espermatozoide de mamíferos consiste principalmente de cabeza y flagelo. La cabeza esta

compuesta por un acrosoma, el núcleo, citoplasma y cantidades remanentes de estructuras del citoesqueleto. El acrosoma es un gránulo secretorio de gran tamaño que rodea y recubre la porción anterior del núcleo, que es haploide y cuya cromatina se encuentra muy condensada. El flagelo contiene un axonema central, mitocondrias y fibras densas, las cuales forman el citoesqueleto. La cabeza, al igual que el flagelo, esta rodeada por la membrana plasmática y contiene muy poco citoplasma (Eddy, 1988).

Las estructuras especializadas del espermatozoide son marcadores de su funcionalidad: el acrosoma contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la fecundación y el flagelo posee la fuente de energía y la maquinaria necesaria para la motilidad y la entrada al ovocito.

La morfología general del espermatozoide de mamíferos se muestra en la figura I.3.

2.1.2. La membrana plasmática.

La membrana plasmática del espermatozoide esta subdividida en regiones que difieren tanto en su función como en su composición. La mayoría de las regiones se establece durante la espermiogénesis, aunque en el cobayo ocurre en el paso por el epidídimo.

Las regiones son el reflejo de la adquisición de funciones específicas determinadas por componentes de superficie y citoplasmáticos del espermatozoide.

En la mayoría de los espermatozoides de mamíferos, las principales regiones de la membrana plasmática de la zona de la cabeza son: el acrosoma anterior, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal.

En el flagelo, las regiones de la membrana están ubicadas sobre la pieza media y la región posterior del flagelo. Entre estas regiones se encuentra el annulus, el cual es un anillo fibroso que rodea a los componentes del axonema y esta firmemente unido a la membrana plasmática (Eddy, 1988).

2.1.3. La cabeza.

La cabeza del espermatozoide de mamíferos esta ocupada mayoritariamente por el núcleo y el acrosoma. El volumen del núcleo del espermatozoide es menor que el de las células somáticas y su cromatina está muy condensada.

El acrosoma se origina a partir del complejo de Golgi, en la espermátide y es análogo a un lisosoma (Allison y Hartree, 1970): posee un pH ácido y contiene enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa, B-N-acetil-glucosaminidasa, fosfatasa acida, proacrosina, acrosina, fosfolipasa A₂ (PLA₂), colagenasa, neuraminidasa, calpaina II y fosfolipasa C (PLC), entre otras (Yanagimachi, 1994). Estas enzimas le permiten atravesar las distintas cubiertas del ovocito para luego fusionarse con el oolema (membrana plasmática del ovocito).

El acrosoma esta formado por dos segmentos: el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial. Se encuentra ubicado en la region anterior de la cabeza, justo por debajo de la

membrana plasmática y esta limitado por el núcleo en su parte posterior. La membrana acrosomal interna esta firmemente adherida a la porción anterior de la envoltura nuclear, mientras que la membrana acrosomal externa se encuentra por debajo de la membrana plasmática (figura I.3).

Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa se fusiona y se vesiculiza con la membrana plasmática, liberándose el contenido del acrosoma. En la mayoría de las especies, la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión del espermatozoide con el ovocito.

2.1.4. El flagelo.

Esta estructura esta compuesta por cuatro segmentos: la pieza conectora (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Las principales estructuras que se encuentran en el flagelo son el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa.

El axonema se extiende a lo largo de todo el flagelo y esta compuesto por un complejo de microtúbulos del tipo 9+2, altamente ordenado y rodeado por densas fibras que se extienden desde la cabeza hasta el final posterior del axonema. La porción anterior del flagelo contiene mitocondrias envueltas en una hélice compacta (vainas mitocondrial); mientras que la porción posterior o pieza principal posee una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas. Las fibras densas y la vaina fibrosa conforman el citoesqueleto del flagelo.

El flagelo provee la energía del movimiento necesaria para la fecundación. Los diferentes elementos que constituyen el flagelo generan ondas desde la base de este hasta su punta y proveen la fuerza para la propulsión (Eddy, 1988).

2.2. Maduración espermática.

La capacidad de fecundar al ovocito la adquieren por lento pasaje a través del epidídimo, denominándose a este proceso "maduración epididimaria". El lugar donde los espermatozoides completan su maduración varía según la especie. En la rata, ocurre en el segmento distal del corpus (cuerpo) (Dacheux y Paquignon, 1980). En la mayoría de las especies la maduración se completa en el segmento distal del epidídimo caudal (cola). En aquellas especies donde los espermatozoides se almacenan en el conducto deferente antes de ser eyaculados, la maduración puede continuar en este conducto. En el hamster, tanto los espermatozoides del epidídimo caudal como los provenientes del conducto deferente fecundan el 100% de los ovocitos. Sin embargo, todos los ovocitos fecundados por espermatozoides del cauda son monospermicos, mientras que los fecundados por espermatozoides del conducto deferente son polispermicos (Yanagimachi y col., 1985). Esto indicaría que los espermatozoides del conducto deferente son mas competentes para fecundar que los del cauda.

Uno de los cambios más importantes que sufren los espermatozoides en el proceso de maduración es la adquisición de la motilidad. En el epidídimo caudal, los espermatozoides presentan un movimiento activo y progresivo mientras que en el testículo carecen de motilidad, lo cual se debería en parte a la inmadurez de la membrana plasmática (Ishijima y col., 1985). La transferencia de ciertas sustancias como la carnitina (Acott y col., 1983) y la glicerofosocolina (Infante y Huszagh, 1985) del fluido epididimario al espermatozoide es importante para la adquisición de la motilidad.

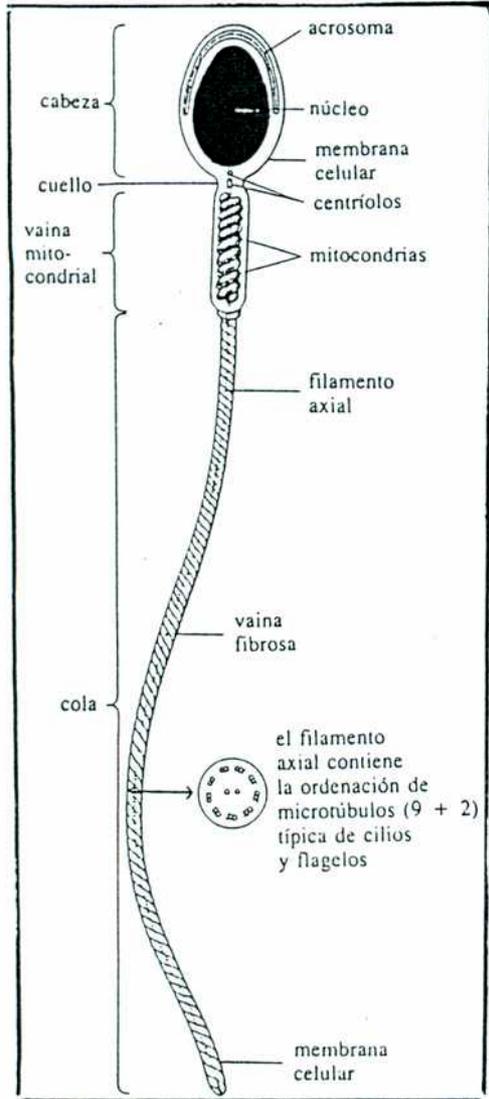
El epidídimo presenta gran actividad secretora y de absorción. La osmolaridad y la composición química del fluido secretado por este varía de un segmento a otro (Lechene, 1982). En el epidídimo se crea un microambiente adecuado y característico para el espermatozoide y a su vez el espermatozoide regula este microambiente estimulando la actividad secretora del epitelio epididimario (Leung y Wong, 1994). La totalidad de la membrana plasmática del espermatozoide directamente expuesta al fluido epididimario, se altera diferencialmente en las distintas regiones del epidídimo (Olson y Orgebin-Crist, 1982) y resulta en la capacidad de adherirse a la zona pelúcida del ovocito (Cuasnicú y col., 1984).

Cuando los espermatozoides salen del testículo, la membrana plasmática esta cubierta con varias macromoléculas (antígenos) que durante el pasaje por el epidídimo se pierden o se alteran. Existen también glicoproteínas que se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide (Young y col., 1985). Este mecanismo parece estar mediado, en parte, por enzimas (galactosiltransferasa, sialittransferasa) (Bernal, y col., 1980) presentes en el fluido epididimario.

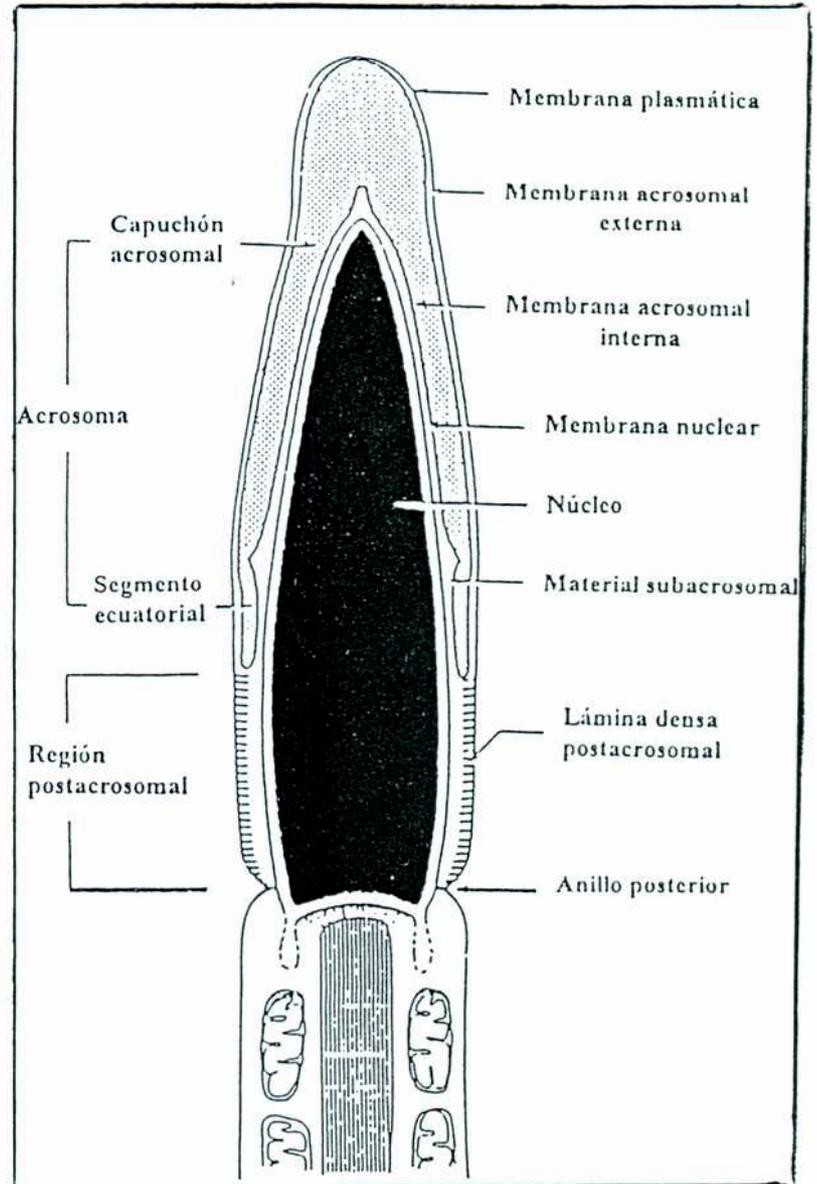
Las glicoproteínas no son las únicas moléculas de membrana que varían durante la maduración. Los lípidos de membrana también sufren cambios químicos y físicos (Parks y Hammerstedt, 1985). En el corpus epididimario hay una elevada síntesis de colesterol, lo cual sugiere que el colesterol se integra a la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración espermática.

FIGURA I.3
Estructuras del espermatozoide de mamíferos.

Diagrama general



Corte sagital de la cabeza de espermatozoide



3. FECUNDACION.

3.1. Capacitación espermática.

Los espermatozoides que maduraron en el epidídimo se mueven activamente pero necesitan pasar primero por el tracto genital femenino para poder fecundar, para lo cual el espermatozoide debe estar "capacitado" (*capacitación*: cambios fisiológicos (funcionales) que llevan al espermatozoide de mamíferos a ser competente para fecundar al ovocito). Se postula que este proceso ocurre cuando ciertas moléculas, que estabilizan la membrana plasmática, son eliminadas o alteradas para favorecer así los posteriores procesos de *hiperactivación* y *reacción acrosomal* (Bedford, 1967), que aunque puedan ocurrir a la vez, son eventos separados.

3.1.1. Capacitación *in vivo*.

Se sabe que el lugar donde los espermatozoides comienzan la capacitación varía según el sitio de deposición de los mismos. En algunas especies, como el perro, el cerdo y varios roedores, el semen es depositado en el útero; mientras que en la mayoría de los mamíferos euterios, éste es depositado en la vagina siendo el cervix el sitio donde la gameta masculina comienza a capacitarse.

En la mayoría de las especies, la capacitación termina en el istmo. En esta región del oviducto los espermatozoides se almacenan hasta el momento de la ovulación. Es una zona rica en receptores adrenérgicos (Jasen, 1978) y posee irrigación directa desde el ovario y así una alta sensibilidad a pequeñas variaciones hormonales (Hunter y col., 1983). Esto explicaría la sincronía entre el ascenso de los espermatozoides y el descenso de los ovocitos a la ampolla (Smith y Yanagimachi, 1991). Los espermatozoides pueden capacitarse en el oviducto o el útero aislado (Brackett y Server, 1970). Sin embargo, se ha demostrado que los espermatozoides se capacitan con mayor eficiencia cuando pasan secuencialmente primero por el útero y luego por el oviducto. El tracto genital tendría la habilidad para controlar la velocidad de capacitación y para sincronizar el encuentro efectivo entre las dos gametas.

- *Eventos durante la capacitación.*

3.1.1.1. Cambios en la membrana plasmática.

a. Alteraciones proteicas.

Las proteínas unidas a la membrana plasmática de manera no covalente se liberan durante el pasaje por el útero; mientras que otras se adsorben a la membrana (Volgmayr y Sawyer, 1986). Algunas proteínas estructurales epididimarias pierden residuos de azúcares disminuyendo su peso molecular (Singer y col., 1985). Otras proteínas migran distancias cortas (Rochwerger y

Cuasnicú, 1992). La fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa tendría origen en una zona libre de partículas.

b. Alteración de los lípidos.

De la membrana plasmática se liberan esteroides libres y conjugados (colesterol y desmoesteroides sulfatados), otorgándole una mayor fluidez a la misma (Ehrenwald y col., 1988). La fijación de Ca^{2+} en la fosfatidilserina inhibe la acción estabilizadora de este fosfolípido sobre la fosfatidil-etanolamina. La metilación de fosfatidiletanolamina aumenta el contenido de fosfatidilcolina, la cual favorece la formación de lisofosfatidilcolina (Stojanoff y col., 1988).

Estos cambios en la relación colesterol : fosfolípidos contribuyen a la desestabilización de las membranas, perdiendo la rigidez adquirida durante la maduración epididimaria. La mayor fluidez de las membranas favorece los procesos de reacción acrosomal y fusión de gametas.

3.1.1.2. Cambios metabólicos.

Se conocen poco los cambios metabólicos que ocurren durante la capacitación. Se describió un aumento de la actividad respiratoria durante este proceso (Boell, 1985), y se lo atribuyó a la presencia de sustratos energéticos en el medio capacitante y no al proceso de capacitación en sí mismo. Se observó, también, un aumento del pH intracelular, que refleja un intercambio de iones: una reducción intracelular de K^+ y un aumento de Na^+ (Hyne y col., 1985). Algunos autores, postularon un aumento del Ca^{2+} durante la capacitación (Fraser y McDermott, 1992), y otros demuestran lo contrario (Ruknudin y Silver, 1990).

3.1.1.3. Cambios en la motilidad espermática.

Durante la capacitación los espermatozoides adquieren primeramente una motilidad progresiva y lineal. Como *consecuencia* de la capacitación, los espermatozoides adquieren un patrón de motilidad característico llamado *hiperactivación* (Fraser, 1977). Los espermatozoides hiperactivos se mueven batiendo la cola en forma de látigo y generalmente describiendo un ocho con la cabeza. La hiperactivación espermática comenzaría en la ampolla del oviducto. Se postula que este tipo de motilidad serviría al espermatozoide para despegarse del epitelio del istmo oviductal (que funciona como reservorio) y permitirle avanzar dentro del fluido viscoso del oviducto hacia el ovocito (Deutch y col., 1985). También, facilitaría la entrada del espermatozoide por las distintas cubiertas del ovocito (hipótesis mecánica).

Las bases bioquímicas de la hiperactivación no se conocen con exactitud. Se ha comprobado que la presencia de calcio (Yanagimachi, 1982) y de glucosa (Cooper, 1984) es indispensable para que se genere la hiperactivación. El aumento de calcio intracelular, posiblemente vía proteína G, que a su vez activa canales de Ca^{2+} , estimula a la adenilato ciclasa. El aumento de

AMPC activa a proteína quinasas, las cuales fosforilan proteínas relacionadas con el deslizamiento del axonema (dineína) (Yanagimachi, 1994).

3.1.2. Capacitación *in vitro*.

La capacitación puede también ocurrir fuera del tracto genital femenino. Para obtener espermatozoides capacitados *in vitro*, son necesarios los siguientes requerimientos:

- que la suspensión espermática este libre del plasma seminal (Shalgi y col., 1981). Ciertos componentes (zinc, la caltrina, proteína de la vesícula seminal inhibidora de la acrosina), que provienen de las glándulas anexas (vesícula seminal, próstata, glándulas de Cowper y de Littre) se adhieren a la membrana plasmática del espermatozoide previniendo la expresión de la capacidad fecundante del mismo. La remoción del plasma seminal por centrifugación o por migración espontánea (swim up) es indispensable para que ocurra la capacitación *in vitro*. Si espermatozoides ya capacitados son resuspendidos en plasma seminal, estos se decapacitan; siendo entonces la capacitación un proceso reversible.

- proveer adecuado medio de incubación, que puede ser una solución Krebs-Ringer modificada o Tyrode suplementada con sustratos metabólicos adecuados (lactato, piruvato y glucosa).

- suplementar el medio con aceptores de colesterol como el suero y la albúmina (BSA), siendo el primero más eficiente por poseer proteínas como las HDL, LDL y VLDL. Se postuló que la albúmina favorece la desestabilización de la membrana plasmática mediante la remoción del colesterol (Ravnik y col., 1993).

El tiempo que requiere la capacitación *in vitro* varía según la especie. En el ratón es de aproximadamente 90-120 minutos (min) mientras que el humano es de 3 a 5 horas.

3.2. Penetración espermática a través del cúmulo.

Los ovocitos de mamíferos poseen dos importantes barreras (las células del cúmulo y la zona pelúcida), que el espermatozoide debe atravesar antes de fusionarse con el oolema.

El cúmulo está compuesto por células de la granulosa y por células tecales, y por una matriz de ácido hialurónico asociado a proteínas (Virji y col., 1990), con capacidad de secretar progesterona y prostaglandinas (Schuetz y Dubin, 1981). Las funciones del cúmulo serían: reducir el proceso de endurecimiento o "hardening" de la zona pelúcida luego de la ovulación; seleccionar los espermatozoides más aptos para la fecundación; favorecer el anclaje y la fusión del espermatozoide con el oolema (Yudin y col., 1988).

Sólo los espermatozoides que están capacitados pero todavía no reaccionados logran atravesar el cúmulo (Austin, 1960; Cummins y Yanagimachi, 1986).

Hasta el momento, los datos experimentales *in vitro* demuestran que tanto la motilidad como la acción enzimática (por la hialuronidasa asociada a la membrana, no de origen acrosomal)

intervienen en el pasaje a través del cúmulo.

3.3. Interacción espermatozoide-ovocito.

3.3.1. Interacción espermatozoide-zona pelúcida.

Cuando el ovocito atraviesa el oviducto, se incorporan a la zona pelúcida (matriz acelular glicoproteica ovocitaria) glicoproteínas sintetizadas por células epiteliales del istmo y de la ampolla (Abe y Oikawa, 1991). Se identificaron diferentes familias de glicoproteínas de la zona pelúcida, con cierto grado de homología (Chamberlin y Dean, 1990). En el ratón, la zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3. Las ZP2 y ZP3 se combinan para formar filamentos, los cuales se unen mediante la ZP1, originando una estructura tridimensional (Wassarman, 1991).

Se le asignan diferentes funciones: evitar la polispermia, inducir la reacción acrosomal en algunas especies (ratón), proteger al ovocito y al embrión de daños físicos, crear un microambiente óptimo para el desarrollo embrionario, siendo fundamental su presencia para el desarrollo *in vivo* del embrión preimplantacional.

- Unión zona pelúcida-espermatozoide.

Los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la zona pelúcida de los ovocitos maduros, unión que está mediada por componentes en la zona y presentes en la superficie espermática.

3.3.1.1. Receptores en la zona pelúcida.

La superficie de espermatozoide tiene moléculas con alta afinidad a la zona pelúcida y esos sitios son saturables.

En la zona pelúcida, la molécula ZP3 se une a la membrana plasmática del espermatozoide sobre el capuchón acrosomal (cuando está intacto, disparando la reacción acrosomal) y la ZP2 se une preferentemente a la membrana acrosomal interna (cuando el espermatozoide está reaccionado) (Mortillo y Wassarman, 1991).

3.3.1.2. Receptores en el espermatozoide.

Se ha postulado que el receptor espermático de la molécula ZP3 es una proteína con dos sitios de unión, una con actividad de ligando y el otro con la capacidad de desencadenar la reacción acrosomal (Kopf y Gerton, 1991). Duncan y Fraser (1993) demostraron que una proteína de 95 kD con actividad tirosina kinasa podría cumplir esa función. Para el receptor de la ZP2 se ha propuesto a la enzima acrosina (Bleil y col., 1988), ya que se la localizó en la membrana acrosomal interna de espermatozoides de hamster (Barros y col., 1992).

3.3.2. La reacción acrosomal.

El acrosoma de los espermatozoides de mamíferos es una organela rodeada por membranas y recubre la porción anterior del núcleo espermático.

La reacción acrosomal (RA) es un evento exocitótico característico de la gameta masculina. Involucra múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa dando origen a vesículas híbridas (Barros y col., 1967). Como resultado de esta reacción, el contenido acrosomal es liberado y la membrana acrosomal interna queda expuesta a fin de interactuar con la zona pelúcida. El segmento ecuatorial no se vesiculiza.

La reacción acrosomal facilitaría al espermatozoide el pasaje a través de las distintas cubiertas del ovocito para fusionarse finalmente con el oolema (Yanagimachi, 1994). La reacción acrosomal parece estar asociada con cambios a nivel de la membrana espermática, que favorecen la fusión con el oolema. *In vivo*, gran número de espermatozoides mueren en el tracto genital femenino perdiendo el acrosoma. Sólo aquellos que se encuentran en el lugar correcto y en el momento adecuado sobreviven al medio hostil del tracto (Overstreet y Cooper, 1979). En el momento de la fecundación, algunos espermatozoides sufren reacción acrosomal en el cúmulo para facilitar la entrada de otros espermatozoides no reaccionados (Cummins y Yanagimachi, 1986), los cuales están aptos para interactuar con la zona pelúcida y fecundar al ovocito. Los espermatozoides intactos pueden unirse a la zona pelúcida. Sin embargo, en cobayo y en conejo se comprobó que el espermatozoide reaccionado también es capaz de unirse a la zona pelúcida.

Cuando los espermatozoides mueren, las membranas pierden semipermeabilidad y el acrosoma se autodigiere. La reacción acrosomal *verdadera* o espontánea (fisiológica) ocurre en espermatozoides móviles vivos, en ausencia de inductores (Bedford, 1970). Los inductores fisiológicos descritos pueden ser: la zona pelúcida, el fluido folicular, la progesterona, el diacilglicerol (DAG), el factor natriurético atrial (ANP), y entre los no fisiológicos: el ionóforo de Ca^{++} , el medio hiperosmótico y el etanol (Tarín y Trounson, 1994).

3.4. Fusión ovocito-espermatozoide.

Luego de penetrar la zona pelúcida, el espermatozoide reaccionado atraviesa rápidamente el espacio perivitelino (espacio estrecho entre la zona pelúcida y el oolema), se fusiona con el oolema y como consecuencia de la fusión, pierde su motilidad (Longo y col., 1986).

El proceso de fusión es menos especie-específico que el de la unión a la zona pelúcida y depende de la temperatura, del pH del medio y del status acrosomal del espermatozoide.

Los ensayos de inhibición con anticuerpos demostraron que en la superficie espermática existen moléculas que intervienen en el proceso de fusión. También se ha sugerido que tanto en el ovocito como en el espermatozoide habría integrinas involucradas en este proceso.

La región de fusión espermática específica es el segmento ecuatorial en los mamíferos euterios, mientras que en los marsupiales es la membrana acrosomal interna. El segmento ecuatorial adquiere la capacidad fusogénica al producirse la reacción acrosomal. Durante la fusión, la región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas por el ovocito vía fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es fagocitada.

En el oolema del ovocito existe también, dos regiones bien diferenciadas y específicas para la fusión con el espermatozoide. (1) una región libre de gránulos corticales, por donde extruye el segundo cuerpo polar, y (2) el resto de la membrana que se encuentra recubierta de microvellosidades. Rara vez el espermatozoide se fusiona con el oolema de la región libre de gránulos corticales. No se sabe aun que mecanismos moleculares estarían involucrados en la exclusión de esta zona durante la fusión con el espermatozoide.

3.5. Eventos de postfusión.

3.5.1. Activación del ovocito.

La fusión entre el oolema y el espermatozoide dispara una serie de eventos bioquímicos y morfológicos que determinan la activación ovocitaria.

Cerca del sitio de unión del espermatozoide se generan en pocos segundos sucesivas ondas de calcio. El aumento de Ca^{2+} intracelular resulta de la liberación de los depósitos intracelulares. Como consecuencia, se dispara el intercambio Na^+ , K^+ a través de la membrana plasmática, resultando un incremento en el pH intracelular y la hiperpolarización gradual de la membrana del ovocito (Miyazaki, 1988). Estos cambios generan la activación irreversible del ovocito, cambios en el metabolismo lipídico, la reducción del NAD y la síntesis proteica y de ADN (Epel, 1979).

El espermatozoide no sólo desencadena la activación sino que también interviene en el mecanismo de movilización de Ca^{2+} . Según algunos autores, un ligando del espermatozoide se uniría al oolema activando a la PLC vía la proteína G o via tirosina quinasa. Swann (1990), propone a un factor citosólico del espermatozoide como responsable de la activación de la PLC. Se ha visto que la inserción de espermatozoides en la membrana del ovocito causa cambios locales a nivel de sus lípidos.

Por otro lado, la activación ovocitaria se puede lograr artificialmente mediante un influjo periódico de Ca^{2+} o por la inyección de 1-4-5-inositol trifosfato (IP_3) (Cran y col., 1988). Es probable que después de la activación los componentes ovocitarios cambien (Jackowski y col., 1988).

3.5.2. Reacción cortical.

En respuesta a la movilización del calcio se produce la exocitosis de los gránulos corticales.

Estos gránulos están adyacentes al oolema y contienen mucopolisacáridos, ácido fosfatídico, enzimas hidrolíticas y peroxidasa, que son liberadas al espacio perivitelino en la reacción cortical. Estos compuestos modifican las características químicas y físicas de la zona pelúcida. Se ha encontrado en el ratón, una proteasa de gránulos corticales que hidroliza parcialmente a la glicoproteína ZP2 promoviendo el endurecimiento o "hardening" de la zona pelúcida (Moller y Wassarman, 1989). La zona, así modificada, impide la entrada de los espermatozoides generando el bloqueo polispermico.

El bloqueo no está acotado a la zona pelúcida (reacción de zona), sino que el oolema también contribuye a evitar la polispermia. El bloqueo polispermico del oolema murino se da un minuto después de la fusión (Sato, 1979). La liberación de los gránulos corticales y por ende el bloqueo de zona ocurre varios minutos después.

3.5.3. Desarresto de la meiosis.

Durante la activación ovocitaria, la gameta femenina reanuda la meiosis arrestada en metafase II. El aumento de Ca^{++} y la acción de la PLC que rompe el balance de proteínas fosforiladas/desfosforiladas modulando los canales iónicos de membrana, inactivan al MPF y al CSF (Whitaker y Patel, 1990). Esta inactivación junto al aumento de pH interno permite al ovocito completar la meiosis y expulsar el segundo cuerpo polar, que lleva la otra mitad del ADN materno.

3.5.4. Descondensación nuclear del espermatozoide en el ooplasma.

Durante la transformación de espermátide a espermatozoide, las histonas nucleares son reemplazadas por protaminas. En el proceso de maduración espermática ocurre una extensa conversión de protaminas reducidas (SH a S-S) otorgando rigidez al núcleo (Meistrich y Reid, 1976) y favoreciendo así el pasaje del espermatozoide por las distintas cubiertas del ovocito. Cuando el núcleo espermático es incorporado al ovocito sufre una serie de transformaciones como la desintegración de la envoltura nuclear, la descondensación de la cromatina, la reducción de puentes disulfuro de protaminas asociadas al ADN y el cambio de protaminas por histonas.

La desintegración de la envoltura nuclear ocurre durante el estadio de metafase II de ovocito. La ruptura comienza a nivel del segmento ecuatorial y continúa antero-posteriormente. De acuerdo con Berrios y Bedford (1976), los espermatozoides murinos fusionados con ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal son incapaces de romper la envoltura nuclear, lo que significa que el ooplasma del ovocito maduro interviene en el proceso de desintegración nuclear. La descondensación de la cromatina tiene lugar durante la activación ovocitaria, en el pasaje de metafase II a telofase II. La activación no es un proceso indispensable para la

descondensación. También, cuando los espermatozoides son microinyectados en ovocitos maduros, los ovocitos permanecen inactivados pero los espermatozoides son capaces de descondensarse (Uehara y Yanagimachi, 1977).

3.5.5. Formación de pronúcleos y singamia.

Luego de la expulsión del segundo cuerpo polar, comienza la recondensación de la cromatina espermática. El estadio de mayor condensación de la cromatina masculina corresponde a la formación de los pronúcleos (Adenot y col., 1991).

El desarrollo del pronúcleo masculino esta bajo el control de factores citoplasmáticos. La formación del pronúcleo femenino requiere la activación ovocitaria.

La síntesis de ADN comienza simultáneamente en los dos pronúcleos. En el ratón la síntesis ocurre 10-11 hs luego de la penetración del espermatozoide y dura de 6-7 hs (Howlett y Bolton, 1985). Finalmente, los pronúcleos migran al centro del ovocito y se produce la fusión nuclear.

3.6. Consideraciones sobre la fecundación *in vivo* vs. *in vitro*.

Con el *apareo*, los espermatozoides, depositados en el tracto genital femenino, tiene que atravesar el cervix, el útero y la union uterotubárica antes de llegar al oviducto. Cada una de estas barreras reduce el número de espermatozoides de tal manera que sólo los más aptos y normales llegan a fecundar al ovocito. Diferentes factores juegan un rol importante en el pasaje de los espermatozoides a través del cervix. El transporte a través del útero depende unicamente de las contracciones uterinas y no de la motilidad espermática. Sin embargo, en ausencia de motilidad espermática, pocos espermatozoides alcanzaran el útero. Luego, el número de espermatozoides que entra al oviducto es muy pequeño (<100) comparado con la cantidad eyaculada inicialmente (50 x 10⁶/ eyaculado, en el ratón). Parece ser que la unión uterotubal es una barrera para el ascenso espermático, de tal modo que solamente los mótiles alcanzan la ampolla oviductal.

En el oviducto, la mayoría de los espermatozoides permanecen en el istmo proximal hasta el tiempo de la ovulación, donde la actividad flagelar es baja. A las 6 horas postcoito, la motilidad "activada" (hiperactivación) comienza en la ampolla (Cooper y col., 1979), y gradualmente los espermatozoides se mueven hacia el sitio de fecundación.

La *fecundación in vitro* provee la posibilidad de estudio de diferentes aspectos fisiológicos y morfológicos del proceso, excluyendo los factores que estan involucrados *in vivo*, además de poder controlar la variables (masculina o femenina).

3.7. Fallas en la fecundación.

En la fecundación, ciertas fallas pueden ocasionar anormalidades cromosómicas. La

polispermia: fecundación por más de un espermatozoide. *Ginogénesis*: fallo en la extrusión del segundo cuerpo polar (2 PN). *Androgénesis*: material genético masculino solamente, en ovocito anucleado. Algunos fallos pueden deberse a anomalías ovocitarias previas a la fecundación (ovocitos *haploides activados*) y muchos coinciden con errores en la meiosis (no disyunción, placa metafásica anormal, etc.). Los ovocitos envejecidos por pocas horas previas a la fecundación tienen efectivamente posibilidades bajas de desarrollo embrionario normal, ya que parece que el retraso está asociado con la muerte embrionaria y con anomalías cromosómicas como triploidismo. Estos puntos no están claros para el caso de la gameta masculina. Parece ser que la inseminación con espermatozoides envejecidos retrasa la fecundación porque pocos espermatozoides alcanzarían la ampolla.

4- EMBRIOGENESIS DE PREIMPLANTACION.

4.1. Aspectos morfológicos.

4.1.1. Tiempos de clivaje, compactación y formación del blastocisto.

El tiempo de desarrollo embrionario depende del reloj celular, en el cual participarían el factor promotor de la maduración (MPF) (abundante en el ovocito murino y en las células somáticas y embrionarias en mitosis), los fosfolípidos de membrana, fosfatidil inositol y diacilglicerol, calcio citosólico, calmodulina y varias proteínas kinasas (Berridge, 1984; Macara, 1985). Estos factores podrían regular la proliferación celular, a través de cambios en el pH citosólico, el cual oscila durante el ciclo celular (Busa y Nuccitelli, 1984).

Los eventos de clivaje progresan más lentamente en los mamíferos que en otras especies. Existe un marcado efecto genético sobre el tiempo de clivaje en los dos primeros ciclos celulares (Shire y Whitten, 1980). Las divisiones más tardías ocurren aproximadamente en intervalos de 10 hs. Cuando el embrión es cultivado *in vitro*, su desarrollo está retardado en 2 hs. o más en cada ciclo comparando con el desarrollo *in vivo*, de tal forma que el tiempo requerido para el desarrollo a blastocisto *in vitro* puede ocurrir un día entero posterior respecto del desarrollo *in vivo* (Harlow y Quinn, 1982; Streffer y col., 1980). Los embriones humanos también se desarrollan *in vitro* tan lentamente como el embrión de ratón (Trousseau y col., 1982). Existe hoy considerable información acerca de la dinámica del ciclo celular en varios estadios del desarrollo embrionario.

El clivaje es asincrónico en los embriones de mamíferos. Embriones de 2 células, luego de 4 células, anteceden al estadio de mórula.

El término de *mórula* se le asignó al embrión compuesto de varios blastómeros (5 o más). Una vez que éste llegó 8-16 células, comienza el proceso de *compactación*, por el cual los

blastómeros individuales parecen perder identidad (Lewis y Wright, 1935), formándose la *mórula compactada*. En este evento morfogénético, las uniones estrechas y las incipientes uniones fuertes se forman entre los blastómeros más externos. Durante la mitosis hacia las 16 células, la *mórula compactada* puede sufrir decompactación, y luego una subsecuente compactación. La *mórula tardía* tiene 32 células (84 hs post-hCG), y se encuentra en tránsito hacia el útero.

Los embriones que entran al útero inician el proceso de diferenciación epitelial, el cual culmina con la formación del trofoectodermo (Ducibella y col., 1975; Goodall y Johnson, 1984) y la cavidad blastocélica en el *blastocisto*. La formación del blastocele involucra el transporte de fluido por las células trofoectodérmicas. Se inicia la diferenciación celular: la región celular interna, llamada macizo celular interno (MCI), y el epitelio externo (el trofoectodermo), que envuelve al MCI y retiene el fluido del blastocele. El trofoectodermo mural rodea al blastocele, y el trofoectodermo polar yace sobre el MCI. El número de células en el cual se inicia el blastocisto varía entre las especies, pero en general son 32 células. El fluido se comienza a acumular, en vesículas citoplasmáticas, después de la división a 16 células en el hamster y en cerdos, al estadio de 32 células en ratón, y 64 células en la oveja. Durante la *expansión del blastocisto*, aumenta la asincronía entre las divisiones celulares en el embrión murino (Chisholm y col., 1985). Esto culmina en la aparición de células gigantes por un proceso de endoduplicación (síntesis de ADN sin división celular), el cual comienza en el trofoectodermo mural, opuesto al MCI, a los 4,5 a 6,5 días de gestación (d.g.), dependiendo de las especies (Papaioannou y Ebert, 1986).

Paralelamente, a los 4 d.g., la zona pelúcida comienza a adelgazarse y se produce el "hatching" del embrión: el blastocisto escapa de la zona pelúcida cerca del epitelio uterino y se inicia el proceso de implantación (cerca de las 120 hs posthCG). El proceso de hatching *in vivo* puede ser diferente del que ocurre *in vitro*.

En la tabla de la figura 1.4 se muestra la secuencia de eventos morfológicos del desarrollo *in vitro* murino, detallándose los tiempos respecto al clivaje previo y al tiempo de inyección de hCG.

4.1.2. Potencia de los blastómeros embrionarios y asignación celular.

Se ha encontrado que la mayoría de los blastómeros individuales aislados de los estadios de 4 y 8 células, desarrollan a vesículas trofoblásticas desprovistas de células internas (Tarkowski y Wroblewska, 1967). Entonces, se propuso que la diferenciación en trofoectodermo y MCI estaba determinada por la posición (interna o externa) de los blastómeros en el estadio de *mórula* (16-32 células), con lo que los blastómeros embrionarios mantendrían su potencia hasta los estadios tardíos (Tarkowski, 1959; Rossant y Vijn, 1980; Ziomek y col., 1982). Se vio

también que las células del MCI del blastocisto son totipotentes, y esta condición se pierde durante la expansión blastocélica al tiempo de división de 32 a 64 células (Handsyde, 1978; Rossant y Lis, 1979). Entonces, la posición de un blastómero en el embrión temprano establece su característica subsecuente. Los clivajes tempranos tiene solamente células externas. A las 16 células, en el embrión murino, los blastómeros externos son ligeramente máyores que los internos, y están polarizados, presentando alta densidad de microvellosidades en las superficies libres. En contraste, las células internas, son apolares (Ziomek y Johnson, 1980). Posteriormente, el trofoectodermo del blastocisto deriva de las células externas (Cruz y Pedersen, 1985).

Entonces, la *hipótesis de la polarización* predice que los blastómeros polarizados mantendrán la capacidad de generar células apolares, y viceversa, hasta que los dos linajes tisulares del blastocisto se separan en dos poblaciones; y que las células localizadas en el interior de la mórula o del blastocisto se mantendrán localizadas en los linajes del MCI durante los siguientes estadios.

4.2. Aspectos genéticos.

Los embriones de mamíferos placentarios muestran un establecimiento temprano de la expresión génica embrionaria, necesaria para la diferenciación de células especializadas requeridas para el crecimiento intrauterino.

Se ha demostrado que la expresión del genoma embrionario es temprana (estadio de 2 células) (Wudl y Chapman, 1976), ya que los eventos morfogenéticos de compactación y desarrollo del blastocisto requiere de la previa expresión génica (Kaufman y Gardner, 1974).

4.2.1. Roles diferenciales de los genomas maternos y paternos.

a) Partenogenesis.

Este fenómeno ocurre en por lo menos una especie de cada clase de vertebrados, pero no se habían encontrado evidencias en los mamíferos.

Se ha visto que individuos con alteraciones en el número de pronúcleos en la cigota (Kaufman y Gardner, 1974) mueren durante el desarrollo periimplantatorio (Surani y col., 1986). La partenogénesis puede producir embriones diploides como resultado de la supresión del segundo cuerpo polar. Estos embriones desarrollan hasta estadios intermedios en la gestación.

Puede ocurrir partenogenesis espontanea ocurre en ovocitos ováricos, en el ratón (Stevens, 1975). Este fenómeno puede ser inducido experimentalmente por una variedad de tratamientos, por los cuales se produce aparente activación normal, clivaje y formación del blastocisto (Kaufman, 1983) (figura I.5). Los individuos partenogénéticos diploides desarrollan hasta estadios postimplantatorios, siendo embriones pequeños de 25 somitos por el día 10 de

FIGURA I.4
Eventos del desarrollo en el tiempo.

Eventos	Hs post-inseminación	Hs post-hCG	
<u>1er.Ciclo celular</u>		12-17	
. Ovulación			
Extrusión de IICP	1-2		
Formación Pronúcleos	8-10		
Citocinesis	18.5-21.5	24-32 (Día 1)	
	Horas pos-clivaje	Horas post-hCG	Horas de cultivo
<u>2do.Ciclo</u>			
. 2 células (citocinesis)	18-20	48-50	0
<u>3er. Ciclo</u>			
4 células	8-13	58-60	24
compactación	3.5-7.5		48
citocinesis (decompact.)	11-14	72	
<u>5to Ciclo</u>			
16 células			
(recompactación y citocinesis)	14	84	
<u>6to.Ciclo.</u>			
. 32 células			
- inicio cavitación	2	90-98	72
- expansión		11	
- extrusión de ZP	-	120	96

*: Horas de cultivos desde embrión de 2 células.

ZP: zona pelúcida

Expansión: de la cavidad blastocélica.

gestación (Graham, 1974).

Es posible que el fallo en el desarrollo partenogenético sea debido a alguna deficiencia nuclear y no a la condición citoplasmática (Maan y Lovell-Badga, 1984). Más aún, las cigotas que contienen dos núcleos maternos, aun de diferentes cepas murinas, manifiestan arresto en el desarrollo indistinguible de los partenogenones (McGrath y Solter, 1984). Estos embriones se arrestan en estadios del día 10 como embrión retrasado con escaso tejido extraembrionario (Surani y col., 1984). Estos resultados sugieren que existe una deficiencia en la expresión génica en los estadios postimplantatorios que puede ser solamente complementada por el pronúcleo derivado del espermatozoide. Entonces, la contribución nuclear materna y paterna no son equivalentes.

b) Ginogenones y androgenones.

Los embriones partenogenéticos diándricos (2 PN) pueden desarrollar hasta estadios postimplantatorios (día 10), caracterizados por embrión y saco vitelino rudimentario y membranas extraembrionarias casi normales (Barton y col., 1984). Contrariamente, los embriones digínicos presentan crecimiento extraembrionario retardado (Van Blerkom, 1981). Entonces, el componente materno tiene un rol en el desarrollo embrionario y el paterno en el desarrollo extraembrionario.

4.3. Aspectos bioquímicos.

En el desarrollo embrionario, los linajes celulares adquieren especificidad bioquímica como parte de la diferenciación. Algunos productos y factores embrionarios se encuentran tempranamente en el embrión preimplantatorio.

Aunque algunos cambios en el patrón de síntesis proteica posterior a la fecundación (1-2 células) aparece como resultado de modificaciones posttranscripcionales (Van Blerkom, 1981), otros cambios parecen utilizar el ARNm materno (Howlett y Bolton, 1985). La tasa de síntesis proteica no incrementa en las primeras 24 hs después de la fecundación (Merz y col., 1981), hasta recién durante el desarrollo del embrión de 2 células. Entonces, éste comienza a depender de los productos del genoma embrionario.

4.3.1. Matriz extracelular.

En el estadio de blastocisto, se comienza a sintetizar fibronectina que se acumula sobre la superficie basal de las células endodérmicas primitivas y cerca de la unión del endodermo parietal y el trofoectodermo (Wartiovaara y col., 1979). Aunque un componente de laminina es sintetizado en el ovocito no fecundado, los depósitos intercelulares no aparecen antes del estadio de 8-16 células (Cooper y MacQueen, 1983). También, el colágeno de tipo III se

deposita en el estadio de 16 células.

4.3.2. Moléculas de la superficie celular.

Son necesarias para la compactación. Se describieron moléculas calcio dependientes aún antes de la compactación : la ovoalbumina, caderinas y moléculas de adhesión celular.

En la compactación y formación del blastocisto intervienen también varias lectinas.

La fosfatasa alcalina aparece en el embrión de 2 células, se incrementa su actividad en mórulas de 8-16 células y en los blastocistos esta restringida al MCI (Mulnard y Huygens, 1978).

La acumulación del fluido blastocélico y la formación de la cavidad es dependiente de la actividad de la Na^+,K^+ ATPasa, ya presente en la superficie celular de la mórula (Vorbrot y col., 1977). Esta enzima también tiene un rol en la polarización de los blastómeros.

4.3.3. Señales embrionarias.

Varias son las moléculas que actúan como señales embrionarias, tanto para el propio crecimiento y desarrollo en forma autocrina, como para el proceso de implantación.

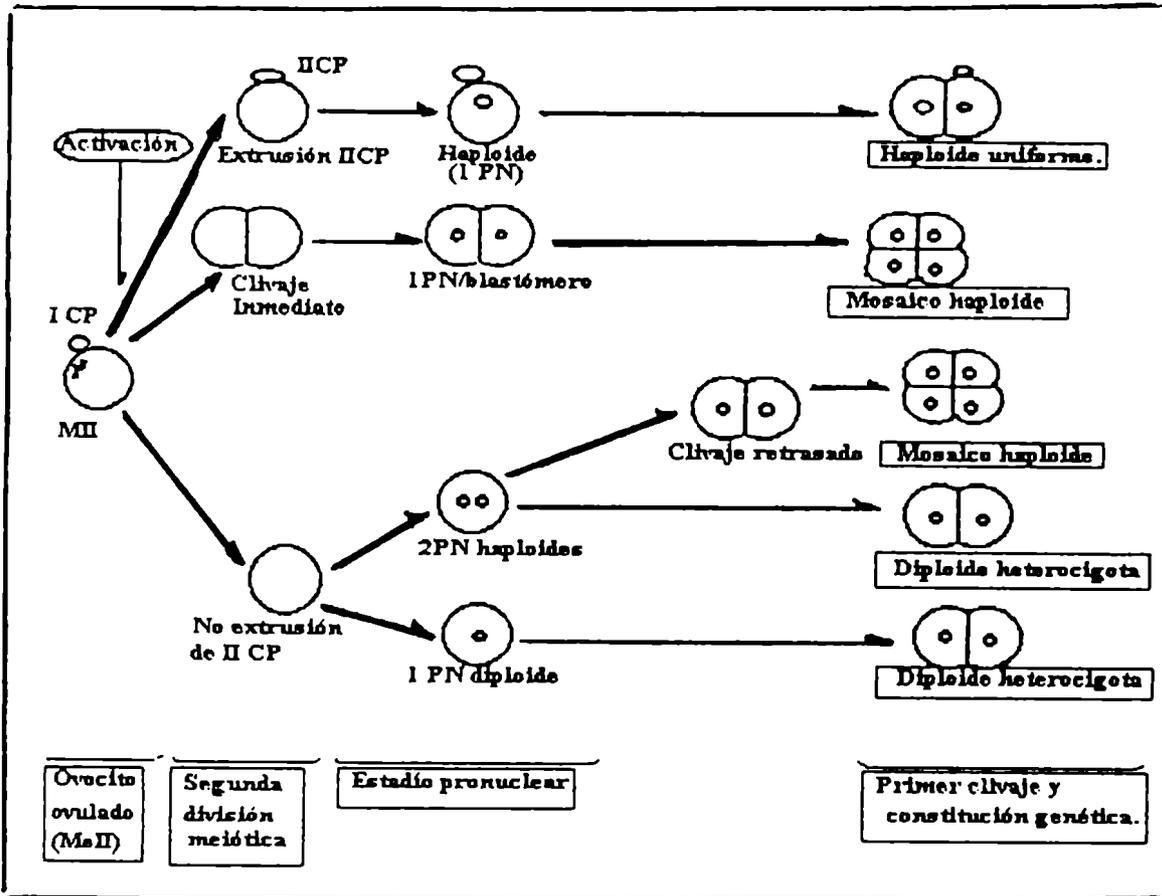
En este trabajo de tesis se considerarán específicamente las prostaglandinas sintetizadas por los embriones (III-1.2)

4.2. Consideraciones sobre el desarrollo *in vitro*.

Desde 1950 la mayoría de las investigaciones fueron realizadas por los métodos del cultivo *in vitro*, ya que confiere ventajas en el análisis del propio embrión, por su accesibilidad para el tratamiento y la intervención, aunque algunas características embrionarias no fueran equivalentes con los estadios *in vivo*.

El cultivo *in vitro* de embriones murinos (que parecen ser una de las especies más comparables al embrión humano), ha sido utilizado como metodo de estudios clínicos y también para elucidar las características bioquímicas y genéticas del desarrollo temprano, además de detectar las diferencias específicas de cada estadio en cuanto a la bioquímica y maduración genética embrionaria. También el cultivo *in vitro* confiere estudios mas rápidos y precisos, descartando los factores maternos involucrados.

FIGURA I.5
Vías de desarrollo y constitución genética
de ovocitos activados partenogénicamente.



- . Haploide uniforme: por la extrusión del segundo cuerpo polar.
- . Mosaico haploide: el segundo cuerpo polar parece un blastómero normal.
- . Diploide heterocigota: resulta de la supresión de la formación del segundo cuerpo polar o de la fusión de los pronúcleos con el segundo cuerpo polar. La heterocigosis en estos partenogones es el resultado de la recombinación durante la meiosis.
- . Diploide homocigota: resulta de la diploidización del pronúcleo femenino.

Se muestran los posibles partenogones de ovocitos de ratón. Se producen diferentes genotipos embrionarios dependiendo de si estruyó o no el segundo cuerpo polar y el tiempo y la naturaleza de la primera división celular.

II- ALCOHOLISMO

1. Introducción

El abuso de alcohol se ha convertido en un problema médico-social de primer orden. Se sabe que el etanol es un teratógeno porque su consumo es capaz de generar anomalías congénitas y anomalías estructurales (anatómicas), funcionales o bioquímicas, siendo el efecto tóxico más grave el producido en la gestación (Abel, 1989, Sadler, 1995).

El consumo de alcohol contribuye al desarrollo de diversos desordenes gastrointestinales (pancreatitis, erosión duodenal, gastritis, síndromes de malaabsorción, hepatitis alcohólica, cirrosis); complicaciones neuropsiquiátricas, encefalopatías, demencia alcohólica, atrofia cerebral, degeneración cerebelar, enfermedad cardiovascular y endócrina entre otros. El consumo de alcohol reduce la expectativa de vida en 12 años (Maxwell, 1984).

2. El consumo crónico de etanol.

2.1. Absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

2.1.1. Absorción

Es absorbido totalmente por el tracto digestivo (especialmente estómago e intestino delgado proximal). El tiempo entre la última ingesta y los picos máximos de alcohol en la sangre son entre 30 y 90 min.

Son muchos los factores que modifican la absorción en el estómago. Al principio, la absorción es rápida, pero a continuación disminuye a un ritmo muy lento aunque siga siendo alta la concentración gástrica. Si esta retrasado el vaciamiento del estómago, por presencia de alimentos, se retrasará también la absorción del etanol en el intestino. La absorción a este nivel es muy rápida y completa, y es independiente de la presencia de alimentos en el estómago o en el intestino.

La tasa de absorción es parcialmente determinada por factores genéticos (Crabb y col., 1987).

2.1.2. Distribución

Después de su absorción, el etanol se distribuye con uniformidad en el total de agua corporal, en los tejidos y líquidos del cuerpo. La placenta es permeable al etanol, por lo que éste logra acceso libre a la circulación fetal (Goodman y Gilman).

. Concentración de etanol en los líquidos corporales en relación con la intoxicación.

El aumento del alcohol en la sangre depende de la dosis de consumo. Los niveles de alcoholemia en los humanos definen las alteraciones funcionales y comportamentales. Cuando la concentración del etanol en la sangre alcanza 20-30 mg/dl se deteriora el tiempo de reacción, disminuye el control motor fino y las facultades mentales, e incrementa la euforia.

Con 50-100 mg/dl se empiezan a producir disturbios en el caminar. En promedio, la ingestión de 44 g de etanol en forma de whisky con el estómago vacío da por resultado una concentración sanguínea máxima de 67 a 92 mg/dl, pero después de una comida mixta será de 30 a 53 mg/dl.

Con 100-150 mg/dl se produce ataxia, deterioro mental y motor, alteraciones en la memoria de corto plazo. Más del 50% de las personas se encuentra muy intoxicada cuando la concentración es de 150 mg/dl. Con 200 mg/dl: falta de respuesta a los estímulos sensoriales; con 250 mg/dl: coma, y mayor que 500 mg/dl: muerte (figura I.6)

Se ha visto que las patologías humanas necesitan interpretación en los rangos de 50-200 mg/dl. Estos valores están asociados con el consumo de 70-150 mg/dl de etanol por día.

2.1.3. Metabolismo.

a. La oxidación del etanol.

La vía usual de metabolización es por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), aunque un remanente puede ser metabolizado por el sistema enzimático microsomal hepático que está presente en el retículo endoplásmico liso (sistema MEOS). El mayor producto de la metabolización es el acetaldehído, tóxico que es metabolizado a acetato por la aldehído deshidrogenasa. El acetato luego es oxidado en la mitocondria a dióxido de carbono y agua por el ciclo de Krebs, con la formación de ATP (figura I.7). Por eso resulta importante la disponibilidad de ADP para la metabolización completa del etanol.

El 90-98% del etanol que ingresa se oxida por completo. La tasa de oxidación es relativamente constante con el tiempo, y se incrementa muy poco al elevarse la concentración del alcohol en la sangre. La cantidad de etanol que se oxida por unidad de tiempo es proporcional al peso corporal. En el adulto, el etanol se metaboliza en 120 mg/kg/hora (30 ml en 3 horas).

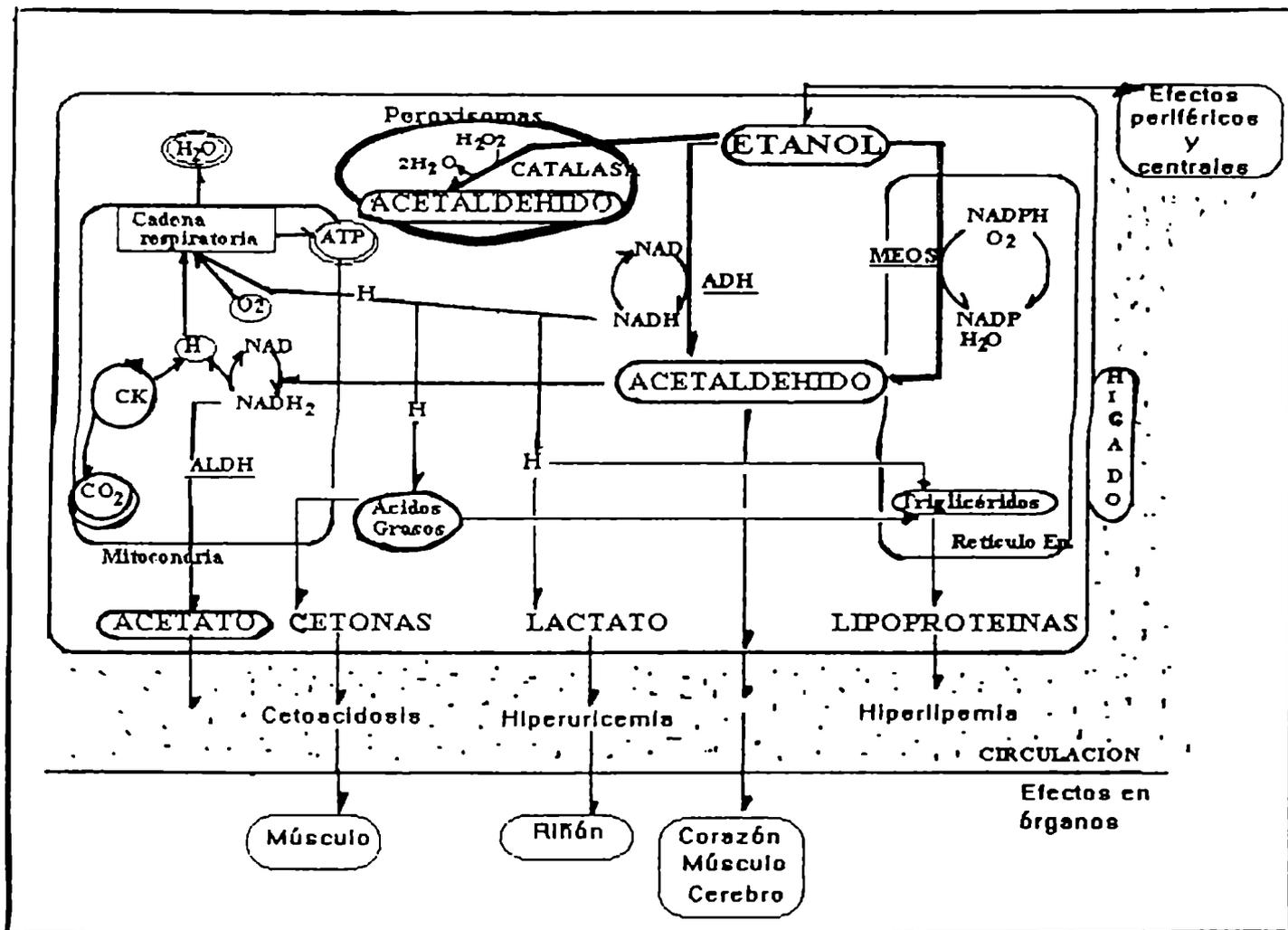
FIGURA I.6

Correlación entre la alcoholemia y los efectos de la intoxicación.

Niveles de Alcoholemia (mg/dl)	Efectos esperados.
20-99	Deterioro de la coordinación, euforia.
100-199	Ataxia, pensamiento disminuído, empobrecimiento del juicio y ánimo
200-299	Marcada ataxia, habla confusa, deterioro del juicio, náusea y vómitos.
300-399	Estadío I anestésico, lapsus de memoria, ánimo muy lábil.
400	Fallo respiratorio, coma, muerte.

FIGURA I.7

Metabolización del etanol en el hígado, y efectos a nivel periférico.



La oxidación del etanol se produce principalmente en el hígado. El producto acetaldehído se convierte en acetil-CoA, que puede a su vez ser utilizado en diversas reacciones anabólicas que participan en la síntesis de colesterol, ácidos grasos y otros constituyentes tisulares.

b. Enzimas del metabolismo.

La ADH tiene 8 o más isoenzimas en el humano cada una con diferentes propiedades metabólicas y con diferentes patrones por grupos humanos. La expresión de la enzima está genéticamente regulada. Las isoenzimas de clase I (ADH₁, ADH₂, ADH₃) son homo y heterodímeros con unidades de 40.000 M. La clase II contiene a la ADH₄, contribuye a la oxidación del etanol a altas concentraciones. En los humanos un número de factores determinan la variabilidad de la ADH: la presencia de isoenzimas determinadas genéticamente y los polimorfismos, la variación en la expresión génica, la especificidad orgánica del patrón de isoenzimas, las alteraciones patológicas en los tejidos.

La ADH oxida el 90% del etanol, principalmente en el hígado, habiendo pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal y en el riñón (Crabb y col., 1987). Se ha localizado ADH en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo, testículo (células de Leydig), túbulos seminíferos, próstata, ovario y útero con menor intensidad, páncreas.

El sistema microsomal "MEOS" puede ser inducido por la exposición crónica de etanol, y agregar variabilidad a la remoción de etanol de la sangre. Contribuye a la metabolización no lineal del etanol en concentraciones elevadas. La principal enzima de este sistema microsomal es el citocromo P-450 (Kato y col., 1988), pero también el citocromo c-reductasa y los fosfolípidos juegan un rol importante en el metabolismo. Se encontró que la inducción de MEOS está determinada genéticamente en diferentes cepas de ratón (Petersen y Atkinson, 1980).

La catalasa localizada en los peroxisomas hepáticos, también puede intervenir en el metabolismo del etanol, sólo cuando dispone de peróxido de hidrógeno (Handler y col., 1988). Por eso tiene un rol menor.

La ALDH, aldehído deshidrogenasa, que oxida el acetaldehído, tiene por lo menos 4 isoenzimas, que parecen estar relacionadas con los grados de alcoholismo en determinadas poblaciones (Suwaki y Ohara, 1985).

Existe polimorfismo genético en la deshidrogenasa de alcohol y del aldehído. Las variantes tienen propiedades catalíticas diferentes y se encuentran con frecuencias distintas en las

diversas poblaciones raciales (Bosron y col., 1986). Esto puede explicar en parte las variaciones en la tasa de metabolismo del etanol entre los individuos.

c. Consecuencias del metabolismo de etanol.

Una consecuencia de la oxidación del etanol es el incremento de la relación NADH:NAD, que refleja un incremento de la tasa de lactato (hiperlactacidemia), y contribuye a la acidosis reduciendo la capacidad renal de excreción de ácido úrico (hiperuricemia). Además, el consumo crónico de etanol produce hígado hipermetabólico con un alto consumo de oxígeno. También la actividad de la bomba Na-K ATPasa incrementa con el consumo crónico, que utiliza ATP, con lo cual se reduce el potencial fosforilativo.

d. Control de la tasa de reoxidación del NADH.

El NADH generado por la ADH puede ser reoxidado por la cadena respiratoria mitocondrial. Este proceso es dependiente de la tasa de fosforilación, que durante la oxidación del etanol esta limitada a la disponibilidad del ADP. La cantidad de NADH generada por el etanol puede exceder la capacidad hepática para disponerlo. El incremento del NADH en el citosol termina inhibiendo a las ADH. Además al incrementar ADP incrementa la actividad de la Na-K ATPasa de la membrana (Crabb y col., 1987).

e. Efecto de la dieta y de las hormonas sobre la actividad total de la ADH.

Se vio que las hormonas influyen en los niveles de ADH. Las hembras de ratas poseen mayor actividad que los machos. Esta diferencia se puede deber al efecto de los esteroides sobre la secreción de la hormona de crecimiento, la cual incrementa la actividad de la ADH. La testosterona decrece esta actividad. La diferencia sexual en la tasa metabólica puede estar también relacionada con las diferencias en el volumen de distribución. Parece que esta diferencia en la actividad de la ADH esta limitada a los roedores.

La restricción proteica en la dieta reduce la actividad de la ADH en un 50%. Por otro lado, la actividad y la tasa de eliminación del etanol estan sujetas al ritmo circadiano, el cual esta unido a los momentos de alimentación (Crabb y col., 1987).

f. Efecto del consumo sobre la actividad ADH y MEOS.

El consumo crónico de etanol tiene pocos efectos sobre la actividad de la ADH en ratas. El

consumo de alcohol por largos periodos induce el sistema MEOS y su eliminación es vía ese sistema. Esta inducción parece ser el factor más importante en el desarrollo de la tolerancia metabólica al etanol (Crabb y col., 1987).

2.1.4. Eliminación

Sólo el 15% es excretado, el resto se metaboliza en el hígado a una tasa de 7 g de etanol por hora (1g= 1ml de 100% de etanol) (Lieber, 1983). La concentración en la sangre cae de manera aprox. lineal cuando se trata de concentraciones moderadas. La tasa de eliminación del etanol a bajas concentraciones es lenta, siendo más rápida a altas concentraciones. Esto se explica por la existencia de altas y baja Km de las enzimas metabolizadoras (Crabb y col., 1987).

La tasa de eliminación del etanol esta alterada en los pacientes con desórdenes endócrinos (incrementada en los diabéticos y reducida en los obesos).

En los humanos la eliminación del etanol no es sustancialmente diferente según el género. Sin embargo, en las hembras, teniendo menos agua corporal y menor volumen para la distribución del etanol, el etanol desaparece de la sangre más rápido que en los machos (Rachamin y col., 1980; Cicero y col., 1980)

2.2. Tolerancia y adaptación.

La tolerancia al alcohol puede ser *metabólica*, primariamente producida a través de un incremento en la actividad de la ADH y de MEOS (sistema microsomal de oxidación del etanol), y/o *farmacodinámica*, por la aparente adaptación directa del SNC al alcohol (Jaffe, 1985). También se ha hablado de tolerancia metabólica referida al incremento de la habilidad para metabolizar el etanol consumido en forma crónica.

Se dieron diversas explicaciones sobre los mecanismos de tolerancia:

- 1- Por la destrucción del alcohol en el tracto gastroin-testinal antes de la absorción.
- 2- Por pasaje retrasado del alcohol a la circulación
- 3- Por el incremento de la oxidación en el hígado antes de alcanzar la circulación general.
- 4- Por almacenamiento del alcohol en el cuerpo, y remoción de la circulación.
- 5- Por rápida oxidación y destrucción corporal.
- 6- Por rápida excreción del alcohol
- 7- Por reducida penetración en cerebro.

Los factores comportamentales juegan un rol en la tolerancia y la adaptación.

La tolerancia incrementa durante 3 semanas de tratamiento.

El consumo crónico de etanol cambia la concentración de los ácidos grasos fosfolípidicos de la membrana y esta composición covaría con la tolerancia durante el consumo crónico. Se piensa que el incremento de colesterol en las membranas de los consumidores crónicos produce rigidez por lo cual se reduce la movilidad de los lípidos y estos confiere tolerancia al etanol (Droitte y col., 1984).

Durante el período de abstinencia se revierte la sensibilidad al etanol, pero la restauración al estado normal de los ácidos grasos es incompleta (Droitte y col., 1984).

3. Efectos particulares del etanol.

3.1. Mecanismos de teratogenicidad.

Los teratógenos interfieren con los mecanismos normales de desarrollo embrionario, produciendo muerte celular, genotoxicidad, interferencia mitótica, función alterada de ácidos nucleicos, inhibición enzimática, deficiencia de sustancias esenciales, suministro energético alterado, y membranas dañadas (Weis y Weis, 1987; Scialli, 1992).

Un agente teratogénico es aquel que produce anomalías por interferencia con los mecanismos de inducción y diferenciación, provocando desarrollo anormal, con o sin pérdida o adición cromosómica (Schreiner y Holden, 1983)

Los desordenes mitóticos en la división celular producidos por el etanol ocurrirían por la interferencia en la formación del huso, la separación de las cromátides, o en la biosíntesis de ADN (Goodman y col., 1985; Brennan, 1991).

3.2. Mecanismos de acción y/o efectos a nivel celular

3.2.a. Sobre membranas y enzimas asociadas (Topel, 1985).

El etanol fluidifica las membranas a concentraciones no letales (Sun, 1979). Se inserta entre los lípidos alterando la movilidad lateral o la interacción con la porción hidrofóbica de las proteínas, lo que resulta en cambios estéricos. Además produce expansión de la membrana, desorganización lipídica.

La continua exposición al etanol es el estímulo para las respuestas adaptativas, dadas por los cambios en la estructura y función de las membranas.

A bajas concentraciones el etanol incrementa el transporte de Ca^{++} y la actividad de la Na-K ATPasa probablemente al incrementar la fluidez. Sin embargo a altas concentraciones puede causar desorganización lipídica y disrupción de la interacción lipido-proteica. También es

posible que provoque, una vez insertado en las membranas, alteraciones permanentes de la conformación de ciertas proteínas.

Los cambios en la composición lipídica explicarían alguna clase de tolerancia. Por ejemplo, el incremento de colesterol en la bicapa lipídica no permitiría que el etanol se inserte en la membrana.

Hallazgos recientes sugieren que el etanol interfiere con las comunicaciones intercelulares (Hashieh y col., 1992).

Además, el flujo intracitoplasmático de calcio provocado por el daño en la membrana iniciaría los mecanismos de apoptosis (Rose y col., 1975).

3.2.b. Efectos del etanol sobre las membranas mitocondriales.

El consumo crónico de etanol altera la composición proteica de las membranas mitocondriales (decrece el contenido específico, cambio en la estructura molecular) y cambia la estructura lipídica (Waring y col., 1982). Decrece el contenido de citocromo oxidasa, citocromos b, de NADH-deshidrogenasa, de ATPasa. También, después de la intoxicación crónica con etanol, las membranas mitocondriales muestran rigidez (Topel, 1985).

3.3. Efectos a nivel orgánico-tisular.

El alcohol afecta a todos los sistemas orgánicos corporales. Realizamos breve referencia al SNC y hepático, para desarrollar luego los efectos a nivel del sistema reproductivo.

Lo general es que el etanol tiene importantes efectos depresivos a nivel central, por la disolución de los lípidos de membrana y por perturbar la función de los canales iónicos y otras proteínas de membrana. Las propiedades estimulantes en el SNC predominan a bajas dosis (bajas alcoholemias), posiblemente debido a la depresión de neuronas inhibitorias. El nivel final de deterioro comportamental y neurológico depende de la edad del individuo, el peso, el sexo y la previa ingesta de etanol, como también su nivel de tolerancia.

Por otro lado, la ingestión aguda de etanol, incluso en dosis intoxicantes, quizás produzca pocos cambios duraderos en la función hepática. Sin embargo, si se consume de manera regular da lugar a una constelación de efectos adversos relacionados con la dosis que parecen resultar principalmente de su metabolismo (Lieber, 1994). Aunque la desnutrición puede intensificar la lesión hepática, un estado nutricional excelente no previene la hepatitis alcohólica ni su degeneración en cirrosis.

La acumulación de grasa en el hígado ("*higado graso*") es un suceso incipiente, y puede producirse en sujetos normales después de la ingesta de cantidades relativamente bajas de etanol. Esto se debe a la inhibición tanto del ciclo del ácido tricarboxílico como del de oxidación de la grasa, en parte por la generación de NADH en exceso, por la acción de la deshidrogenasa del alcohol (Goodman y Gilman).

El paso siguiente es el desarrollo de la "*hepatitis alcohólica*", cuyo órgano aparece invadido de linfocitos (Maxwell, 1984).

La ingestión regular de cantidades más que moderadas de alcohol causa aumento de la acumulación de acetaldehído, en parte por reducción de la actividad de su deshidrogenasa. Se atribuyen varios efectos adversos al acetaldehído, entre ellos, el incremento de la peroxidación de los lípidos y lesión de membranas mitocondriales y celulares, agotamiento de glutatión, agotamiento de vitaminas y oligometales, en especial la piridoxina y la vitamina A, y disminución del transporte y la secreción de proteínas a causa de la inhibición de la polimerización de la tubulina. Lo anterior explica la acumulación de grasas y agua en el hígado, que progresa a la necrosis y fibrosis característica de los *hígados cirróticos*.

4. Administración del alcohol y modelos experimentales.

Los modelos experimentales permiten reproducir y estudiar la patogénesis del alcoholismo. Uno de los principios fue clarificar los efectos del alcohol independientemente de las consecuencias nutricionales producidas.

El desarrollo de modelos animales apropiados para los estudios sobre alcoholismo fue importante (Boulton y col., 1992), y también para la elucidación de los mecanismos productores del *síndrome de alcoholismo fetal (FAS)* (Ledig y col., 1989). En este contexto, la mayoría de las anomalías clínicamente observadas en asociación con el consumo materno de etanol, pudieron ser replicadas en los animales de experimentación de varias especies (ratón, rata, pollo, cerdo, perro, burro, mono). En particular, el ratón fue apropiado para el estudio de los efectos teratogénicos del etanol, especialmente durante la gestación (Randall y col., 1987).

. *Modelos* (Ward, 1987).

. *Etanol en el agua de bebida*.

Esta ruta es utilizada en forma preferencial ya que es el modo de consumo del humano. El modelo de ingesta de etanol por bebida produce bajos niveles de alcoholemia. Este modelo ha

sido utilizado para estudios de los efectos crónicos sobre el intestino, el corazón, y testículo (Zucoloto y col., 1984). La simplicidad es una ventaja (Lieber y col., 1989), aunque se ha visto que los efectos nutricionales son difíciles de medir y controlar, y puede producir deshidratación cuando el etanol es administrado sólo en el agua. La ingesta de altas dosis de alcohol es reducida por la aprensión natural del animal. Como consecuencia el consumo es insuficiente para sostener apreciables niveles de etanol en la sangre y causar daño hepático, aún con dieta adecuada. A pesar de pocos inconvenientes, este modelo sirvió para determinados propósitos experimentales: estudio de efectos específicos independientemente de los cambios nutricionales asociados. Este tipo de administración puede producir la inducción del sistema MEOS (Lieber y col., 1989).

. La administración por inyección intraperitoneal o intravenosa.

Pueden servir para realizar estudios metabólicos en los cuales los parámetros deben ser bien controlados (dosis y tiempo de exposición), y son generalmente utilizados para estudiar los efectos agudos u crónicos de altas dosis de etanol, que incluyen dependencia física, daño tisular y teratogénesis por el alcohol (Lieber y col., 1985). También los efectos teratogénicos del etanol se han demostrado en los animales de experimentación luego de una dosis de 3 g/kg en días específicos de gestación (Sulik y Johnston, 1983). Sin embargo, se ha criticado este modo de administración porque causa irritación peritoneal.

. Infusión intragástrica.

Se ha utilizado para alcanzar valores altos de alcoholemia (100-400 mg/dl) (Tsukamoto y col., 1985), e inducir dependencia física. Con éste se estudiaron las acciones de corto plazo del etanol sobre los lípidos hepáticos. No se ha usado por períodos mayores a 1 semana (Lieber y col., 1989).

. Dietas líquidas.

Pareció el método más adecuado para estudiar los efectos crónicos del etanol cuando son necesarios controles nutricionales y elevados niveles de alcoholemia, dando el 35% de calorías derivadas del etanol (% EDC) y alcanzándose 100-150 mg/dl de alcoholemia en los roedores (Lieber y col., 1989; 1991). Sin embargo, se ha criticado este régimen líquido, ya que forzaría al animal a consumir cantidades preestablecidas de ingredientes y no permite la natural selección entre el alcohol y el alimento (Zucoloto y col., 1984). Además, se ha sugerido que se reduce la biodisponibilidad del etanol en la dieta posiblemente debido a que el etanol se une a algunos componentes de ésta (de Fiebre y col., 1994). Por otro lado el elemento en el estómago

altera la farmacología del etanol después de la administración oral, y por eso a veces se debe sustraer el alimento de los animales 15 hs antes de la administración del etanol (el alimento en el estómago retrasa el momento del pico de alcoholemia y resulta en bajas concentraciones de alcohol) (de Fiebre y col., 1994).

. Inhalación.

Causa irritación pulmonar con consecuencias secundarias (estres).

. Etanol in vitro y cultivos celulares.

Muchos investigadores han utilizado el cultivo celular para analizar en detalle los mecanismos moleculares de acción del etanol (Gordon y col., 1987).

5. Funciones sexuales y reproductivas.

Se sabe que el alcohol disminuye la capacidad de reacción sexual en varones y mujeres. Las alteraciones funcionales principales se detallan en cada sexo.

5.1. Etanol y función femenina.

Los efectos pueden deberse a las acciones primarias sobre el sistema hipotálamo-hipofisario vía alteraciones en la secreción de gonadotrofinas y/o efectos directos sobre el ovario (Yung y Russfield, 1972).

a. Efectos a nivel central.

Parece que el efecto primario del consumo de alcohol es a nivel central (Mendelson y Mello, 1988). El alcohol puede alterar la actividad pulsátil de GnRH en las mujeres alcohólicas que presentan enfermedad hepática. Suprime la liberación de LHRH con la concomitante inhibición de la actividad secretoria de LH y FSH. Las mujeres alcohólicas presentan amenorrea con niveles normales de prolactina (Valimaki y col., 1984), pero también se ha observado hiperprolactinemia sin amenorrea (Valimaki y col., 1990). En algunos casos aparece menopausea temprana (Gavaler, 1992)

b. Efectos a nivel periférico y gonadal.

Se ha visto en mujeres con cirrosis, severas anormalidades en el ciclo menstrual. El abuso de alcohol y la dependencia causa severa disrupción del ciclo menstrual en la mujer, incluyendo amenorrea, anovulación, disfunción del fase lutea, patología ovárica y abortos espontáneos (Valimaki y col., 1984; Mello y col., 1988; Harlao y Shiono, 1970; Hughes y col., 1980). Las mujeres alcohólicas sin amenorrea, pueden tener ciclos anovulatorios o disfunción de fase lútea

(Mello y col., 1992). La significancia clínica es el deterioro de la fertilidad o la prevención de la preñez por abortos espontáneos.

La anovulación puede deberse a la ausencia de pico de gonadotrofinas. La disfunción de fase lútea esta referida al acortamiento entre ovulación y menstruación. La inadecuada fase lútea se da cuando los niveles de progesterona son bajos con largos intervalos entre ovulación y menstruación. El alcohol al suprimir la FSH por elevación del estradiol, durante la fase folicular, retrasa la maduración folicular y la ovulación o produce disfunción de la fase lútea (Mello y col., 1992; Hutz y col., 1990). El alcohol suprime la progesterona después de la estimulación con hCG (Teoh y col., 1990).

El alcohol altera la ovulación y la función del ciclo estral en los modelos animales de experimentación de administración crónica (Mello y col., 1983; Krueger y col., 1982). Ratas hembras tratadas con etanol presentaron marcada disrupción de la estructura ovárica y su función (Valimaki y col., 1984; Mello, 1988). Los efectos del consumo de etanol dependen de la dosis administrada la frecuencia y el período de exposición.

Por otra parte, las acciones del etanol sobre la gameta femenina solamente se han estudiado exponiendo los ovocitos en forma directa a distintas concentraciones de etanol. Así, los ovocitos de los mamíferos, arrestados en segunda metafase meiótica, pueden ser activados por el estímulo directo de la exposición al etanol, lo que lo lleva al parcial o completo desarrollo de un embrión partenogénico. La activación del ovocitos por el etanol, causa un aumento trasiente de calcio intracelular, que dura mientras permanece la exposición al etanol (Cuthbertson y col., 1981; Kaufman, 1983; Shiina y col., 1993).

Sin embargo, no se conocen trabajos sobre los efectos de la ingesta crónica o aguda del etanol en la calidad de los ovocitos, ni tampoco de que manera el consumo de etanol puede alterar la fisiología del complejo cúmulo ovocitario.

5.2. Etanol y función masculina.

La asociación entre el consumo crónico de etanol y el fallo reproductivo en el macho esta bien reconocida (Van Thiel y Lester, 1974; Gordon y col., 1979; Abel, 1980; Anderson y Willis, 1981; Heine, 1981). Las acciones del alcohol pueden ser sobre las neuronas hipotalámicas o sobre la hipófisis y testículo, y a su vez producir anomalías en el metabolismo esteroideo hepático (Bannister y Lowosky, 1987).

La ingestión crónica en el varón puede causar impotencia, esterilidad, atrofia testicular y

ginecomastia (Anderson y col., 1983). La feminización en los varones alcohólicos tiene un doble origen. En primer lugar la lesión hepática inducida produce hiperestrogenización y reducción de la tasa de producción de testosterona. Y también, al incrementar la actividad de las enzimas del retículo endoplásmico hepático, el etanol aumenta la tasa de inactivación metabólica de la testosterona. Los estudios clínicos han descrito varios grados de fallos reproductivos en los alcohólicos (Van Thiel y Loriaux, 1979, Majumdar, 1979).

Pocos estudios han evaluado si estos cambios contribuyen o reflejan un fallo reproductivo o en la fertilidad (Anderson y col., 1983). Los estudios se han realizados con machos adultos, viéndose que la fisiopatología es dependiente de la dosis y la duración de la exposición. Algunos estudios fueron realizados con machos inmaduros (Ficher y Levitt, 1980; Chiao y col., 1981). Se sabe que la ingesta crónica de etanol retrasa la maduración sexual del macho (Ramaley, 1982; Anderson y col., 1987).

a. Efectos a nivel central.

El consumo crónico de etanol deprime los niveles de LH sérica (Salonen y Huhtaniemi, 1990). Sin embargo, el contenido de LH en la pituitaria apareció incrementado por el alcohol o sin cambio (Emanuele y col., 1990; Cicero y col., 1990). Esto sugiere la existencia de fallos a nivel de la liberación de LH, ya que el alcohol deteriora el tráfico de la LH a través del citoplasma (Hoek y Rubin, 1990). Es posible que el etanol pueda alterar la glicosilación de la LH, el ensamblado de las subunidades y la posterior secreción. Además, el acetaldehído es altamente reactivo a la tubulina, unión que deteriora el funcionamiento de los eventos dependientes de microtúbulos, como el tráfico y la secreción (Tuma y Sorell, 1988).

Se han notado valores disminuidos de FSH en plasma pero no cambios en contenidos de la pituitaria (Salonen y Huhtaniemi, 1990). Esto sugiere un bloqueo en la liberación relacionado con el tráfico intracelular alterado.

También, el impacto a nivel hipotalámico del consumo de etanol es la inhibición de la secreción de LHRH.

El alcohol produce hiperprolactinemia (Seilicovich y col., 1982, 1985; Soyka y col., 1991). El mecanismo propuesto fue el incremento de B endorfina hipotalámica (Schultz y col., 1980) e hipofisaria (Adams y Cicero, 1991) y la inhibición dopaminérgica (Seilicovich y col., 1985).

b. Efectos a nivel gonadal y periférico.

La administración crónica de etanol altera los niveles circulantes de la LH (Cicero y Badger,

1977, Cicero y col., 1978, Mendelson, 1977), la testosterona (Cicero y Badger, 1977; Gordon, 1976) e incrementa la prolactina circulante (Ylikahiri y col., 1978). También se vio incremento de la androstenediona (Gordon y col., 1979), disminución del número de receptores gonadotrofos testiculares (Salonen y Huhtaniemi, 1990). Adicionalmente los pesos testiculares reducidos (Van Thiel y col., 1979; Klassen y Persaud, 1978), morfología testicular alterada (Anderson y col., 1980) y actividad esteroidogénica (Gordon y col., 1980) ha sido observada en los animales de laboratorio luego de la administración crónica de etanol.

Se ha visto una caída en la testosterona al día 5 de ingesta crónica de etanol, y declinación progresiva a lo largo de 4 semanas de consumo. Estos estudios confirmaron el efecto supresor de etanol sobre la testosterona (Adams y Cicero, 1991). Se supone que disminuye la tasa de producción, incrementa el clearance, y la conversión periférica de la testosterona a estradiol. El metabolismo del etanol en el testículo genera caída en el cofactor NAD, por lo cual se reduce la esteroidogenesis. También la falta de citrato, glutamato y piruvato están involucradas en la caída de la testosterona (Orpana y col., 1990). Además, el alcohol incrementa la corticosterona circulante vía activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, y la corticosterona actuando sobre las células de Leydig puede inhibir la síntesis y/o liberación de testosterona (Rivier y col., 1990). Se ha demostrado que el alcohol incrementa la B endorfina en el fluido intersticial testicular, lo cual también inhibe la testosterona (Adams y Cicero, 1991).

5.3. Etanol en la fecundación y en el desarrollo embrionario.

a. Etanol en la fecundación.

La inability de un espermatozoide aparentemente normal para penetrar la zona pelúcida está a veces asociado con anomalías ovoplásmicas (1 o ningún cuerpo polar, etc) (Bedford y Kim, 1993).

El etanol parece inhibir la capacitación o la reacción acrosomal (Anderson y col., 1981, 1983), ya que interfiere con los mecanismos de transducción de membrana para disparar la respuesta intracelular (Hoek y Rubin, 1990). Los mecanismos por los que el etanol reduce la fecundación no están bien claros. Se han postulado varias hipótesis: reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides epididimarios, incremento de anomalías morfológicas, disminución de la motilidad, incompleta maduración espermática dentro del epididimo, o incapacidad del espermatozoide de realizar capacitación y reacción acrosomal (Zaneveld, 1978). Alternativamente, la espermatogenesis anormal puede producir espermatozoides

metabólicamente deficientes, por ejemplo en el contenido enzimático acrosomal (acrosina, hialuronidasa), necesaria para la penetración del ovocito (Zaneveld, 1975). También, se ha sugerido que el etanol puede ser mutagénico cuando es ingerido crónicamente (Badr y Badr, 1975; Anderson y col., 1978; Mankes y col., 1982).

Los estudios con animales han demostrado que el etanol puede inhibir la fecundación *in vitro* (Anderson y col., 1982) e *in vivo* (Joyce y col., 1982), posiblemente inhibiendo los procesos de capacitación espermáticos previos a la penetración del ovocito (reacción acrosomal y capacitación) (Rogers, 1982). Por otro lado, se ha visto que la mujer consumidora tiene elevado riesgo de infertilidad con consumo alto de etanol (Mello, 1988), y aún con moderadas dosis de etanol puede afectarse la fertilidad (Grosdtein y col., 1994).

Los efectos del etanol crónico sobre la pubertad de las hembras son poco conocidos. En las ratas hembras inmaduras, los efectos deletéreos de esta droga son el retraso de la apertura vaginal, reducción del peso ovárico y uterino (Bo y col., 1982). Sin embargo, los períodos de desarrollo por los cuales los efectos del etanol pueden diferir en cuanto a la sensibilidad sobre la gameta femenina y su fertilidad no han sido identificados. Por lo antes expuesto, se planteó estudiar los efectos de la ingesta prolongada de etanol moderado y bajo, de modo de buscar la mínima dosis que produce alteraciones en la fecundación, y evaluar cómo influye cuando las hembras fueran administradas con etanol durante la etapa de maduración sexual (en edad prepuberal). Adicionalmente, se examinó la posibilidad que el período subcrónico de ingesta de etanol pueda alterar la calidad de la gameta femenina.

b. Etanol en el desarrollo embrio-fetal.

El etanol es tóxico y teratogénico para el desarrollo embrio-fetal en el ratón, (Randall y Taylor, 1979), dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición (Lochry y col., 1982). No está claro hasta el presente si el alcohol o el acetaldehído, principal metabolito, es el teratógeno activo, ya que ambos son capaces de inducir anomalías congénitas en las crías de madres expuestas. El acetaldehído interfiere con el funcionamiento del aparato mitótico/ meiótico, induce aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y crosslinking entre las cadenas de ADN (Natarajan y Obe, 1982). A veces, el síndrome de alcoholismo fetal se presentó con cariotipos anormales. Así se ha confirmado que el etanol es mutagénico, principalmente por su metabolito el acetaldehído, en los roedores machos (Barilyak y Kozachuk, 1981, Hunt, 1987) y hembras (Alvarez y col., 1980), siendo así muy probablemente

etanol son importantes dado que el patrón de abuso de alcohol en la población general es la ingesta de moderadas y bajas concentraciones de alcohol.

Por otra parte, el cultivo *in vitro* embrionario (desarrollo *in vitro*) ha sido utilizado ampliamente para estudiar las anomalías morfológicas embrionarias. Por ejemplo, un embrión partenogénico puede ser reconocido en el sistema *in vitro* (Winston y col., 1991). Además, el ratón ha sido la especie de elección en los estudios de teratogenicidad del etanol (Monis y Bavister, 1990).

- *Consideraciones sobre el síndrome de alcoholismo fetal (FAS).*

El FAS se describió de manera completa recientemente (Warren y Bast, 1988), y se ha referido a un conjunto de disfunciones y alteraciones como la deficiencia de crecimiento pre y postnatal, retraso en el desarrollo o deficiencia mental, microcefalia y comportamiento anormal (Figura I.8).

El FAS se puede producir en el infante humano, cuando la madre fue consumidora de etanol antes y durante la gestación (Lee y Wakabayashi, 1985), durante la gestación (Samson, 1981) o en días específicos de la preñez (Sulik y col., 1981; Brannigan y Burke, 1982; Brannigan y Cotel, 1984), por ejemplo durante la gastrulación y organogénesis embrionaria (Ledig y col., 1991, Randall, 1987, Simm y Murdoch, 1990, Webster y Ritchie, 1991).

El diagnóstico del FAS es realizado por diversas características distintivas:

- a) **Retardo pre y postnatal:** retraso en el crecimiento embrio-fetal, disminución del peso y tamaño, y/o circunferencia craneana reducida a la décima parte de la edad gestacional normal (Abel., 1982; Rosett y Weiner, 1984; Weinberg, 1985; Ginsburg y col., 1991).
- b) **Disfunción del SNC:** signos de anomalía neurológica, retraso de desarrollo, deterioro de la función intelectual, sentido del peligro disminuido, falta de capacidad de funcionamiento adulto independiente.
- c) **Características faciales dismórficas:** con por lo menos dos de tres de los siguientes signos: microcefalia, micro-oftalmia y/o aberturas palpebrales cortas, nariz corta, angostamiento o hipoplasia del labio superior, y/o aplastamiento del área maxilar (Rosett, 1980).
- d) **Disfunción hormonal y metabólica:** inhibición de la síntesis proteica, desbalances hormonales, hipoglucemia, disturbios vitamínicos, cambios en el balance ácido base (Maxwell, 1984).
- e) **Disfunción orgánica:** defectos cardíacos, genitales externos anormales y anomalías de oído medio (Day y col., 1991a, 1991b; Streissguth y col., 1991; Forrest y col., 1992; Larroque,

1992), alteración del sistema muscular, esquelético, falta de coordinación, hiperactividad.

Estas características pueden deberse en parte a un efecto inhibitorio directo del etanol (o del acetaldehído) sobre la proliferación celular embrionaria al principio de la gestación. Puede producirse también por desnutrición selectiva por lesión de la placenta (Fisher y col., 1981). Además de las anomalías morfológicas y neurológicas típicas, los niños con el síndrome manifiestan gran aumento de la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, ya que experimentan trastornos severos del sistema inmunológico.

Debido a los efectos teratogénicos, la ingestión moderada de etanol está contraindicada durante la gestación. Según la población estudiada, la incidencia del FAS completo varía entre 1:300 y 1:2000 de los nacidos vivos, y ocurre en un tercio de los niños nacidos de madres que consumieron más de 150 g de etanol diariamente durante la gestación. La menor cantidad de alcohol ingerida que se ha juzgado relacionada con el FAS es de 75 ml al día. Sin embargo aún no está claro si hay algún límite inferior seguro (Goodman y Gilman).

También se ha definido el **FAE: efectos alcohólicos fetales**, que es cuando la madre gestante fue consumidora. Estos individuos presentan características de anomalía menos pronunciadas o solamente algunas características del FAS.

FIGURA I.8
Síndrome de alcoholismo fetal en adolescentes y adultos
(Appelbaum,, 1995, Nurse Practitioner,20(10):24-36).



1. Figura superior: Mujer adolescente diagnosticada con FAS al nacimiento, con retardo intelectual (bordeleana). Fotografiada al nacimiento, a los 9 meses, 5 y 14 años. Presenta persistente aberturas palpebrales, alargamiento nasal.
2. Figura media: Mujer adulta diagnosticada con FAS a los 4 años. Nivel de IQ:85-90. Fotografiada a los 4,9,13 y 19 años. Las manifestaciones faciales en este paciente, estan dentro de las características normales.
3. Figura inferior: Adolescente diagnosticado con FAS, con severo retardo. Fotografiado al nacimiento, a los 5,10 y 14 años. Se presentó deficiente crecimiento y microcefalia a lo largo de la vida. Con la edad, hubo un considerable crecimiento relativo de la nariz, que resultó en borde nasal ensanchado.

III- PROSTAGLANDINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

1. Introducción.

Las prostaglandinas (PGs) son lípidos de importante actividad biológica, derivados de ácidos grasos naturales, que se encuentran difundidos en varios tejidos de mamíferos, de invertebrados y de vegetales (Morse y col., 1977). Se asignó con el nombre de *prostaglandina*, a extractos de la vesícula seminal que tenían actividad vasopresora y estimulante del miometrio, presuponiendo un origen prostático (Von Euler, 1936). En 1963 se diferenció y aisló toda una serie de prostaglandinas, describiéndose sus estructuras (Bergstrom y Samuelson, 1963).

Las prostaglandinas presentan una gran cantidad de funciones siendo estas muy difundidas en todos los sistemas biológicos. Actúan sobre la presión arterial, la agregación plaquetaria, provocan contracción o relajación de diversos músculos lisos, quimiotaxis y quimioquinesis de células sanguíneas. Tiene importantes funciones en la luteólisis, la ovulación, la fertilización, modulando efectos hormonales y de neurotransmisión.

El equilibrio de sus concentraciones fisiológicas es importante. La presencia en exceso es responsable de diversos desórdenes como procesos inflamatorios y alérgicos, alteraciones del ciclo sexual y abortos. Su deficiencia puede conducir a trastornos en la presión arterial (aumento) y traer infertilidad.

Las prostaglandinas se dividen en tres series de acuerdo con el grado de insaturación de sus cadenas laterales: serie I: derivada del ácido dihomo-gamma linoleico, con una doble ligadura en la cadena, la serie II: originadas del ácido araquidónico, con dos dobles ligaduras en la cadena, la serie III: originadas a partir del ácido eicosapentanoico, con tres dobles enlaces. Las diferentes clases de PGs se definen a partir de la composición estructural del anillo pentano: A, B, C, D, E, F, G, H e I, las cuales se distinguen entre sí en el carbono 9. El subíndice alfa o beta describe la posición estequiométrica en 0 del anillo ciclopentano (el grupo hidroxilo 9 de $\text{PGF}_{2\alpha}$ está orientado por encima del plano del anillo). Para los tromboxanos se utiliza una nomenclatura semejante, siendo la estructura básica el ácido trombanoico.

2. Biosíntesis de eicosanoides.

Los ácidos grasos esenciales como el linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3) forman, a través de elongación y desaturación, el ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3), el ácido araquidónico (C20:4) y el ácido 5-8-11-14-17-eicosapentanoico (C20:5), los que son sustratos

para la síntesis de los eicosanoides (Figura I.9).

Los ácidos grasos de 20 carbonos, polinsaturados e hidroxilados constituyen los eicosanoides: las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs).

Aunque algunas familias de prostaglandinas derivan del ácido dihomo-gamma-linolénico y del eicosapentanoico, la mayor parte de la síntesis y metabolismo esta limitada a los productos del ácido araquidónico.

Los ácidos grasos con dos o más dobles ligaduras (linoleico y linolénico) pueden sufrir desaturación y elongación para formar los sustratos de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos.

2.1. Cascada del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico se origina a partir de los ácidos grasos esenciales, estando gran parte esterificado en pools de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol (Flower y Blackwell, 1976). Sin embargo, el araquidónico esterificado no es sustrato para la síntesis de eicosanoides, ya que necesita ser liberado. La enzima PLA₂ regula la disponibilidad del sustrato, movilizándolo de los pools (Ramwell y col., 1977). La isoforma principal de la PLA₂, presente en el citosol, es fosforilada y así translocada a la membrana a la cual se asocia de manera Ca⁺⁺ dependiente (Galser y col., 1993).

El araquidónico libre es rápidamente oxidado a través de dos caminos principales independientes (fig I.10).

- Camino de la ciclooxigenasa.

Se producen PGs, TXs y prostaciclina (PGI) por la catalización de la enzima prostaglandina H sintasa (PGH) o *ciclooxigenasa (COOX)* (Behrman y Romero, 1992). Esta enzima presenta un grupo hemo y cataliza la reacción entre una molécula de ácido araquidónico y dos moléculas de oxígeno para formar el endoperóxido PGG₂, el cual es reducido a PGH₂. Estos intermediarios son precursores directos de la PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂, TXA₂ y del ácido hidroxihexadecatrienoico (HHT) (fig 1.11).

Se han descrito dos isoformas de la ciclooxigenasa: la COOX-1, que se expresa constitutivamente, y la COOX-2, que es inducida en respuesta a endotoxinas, citocinas, factores de crecimiento y ésteres de forbol (DuBois y col., 1994).

FIGURA I.9

Relación entre prostaglandinas, leucotrienos y ácidos grasos esenciales.

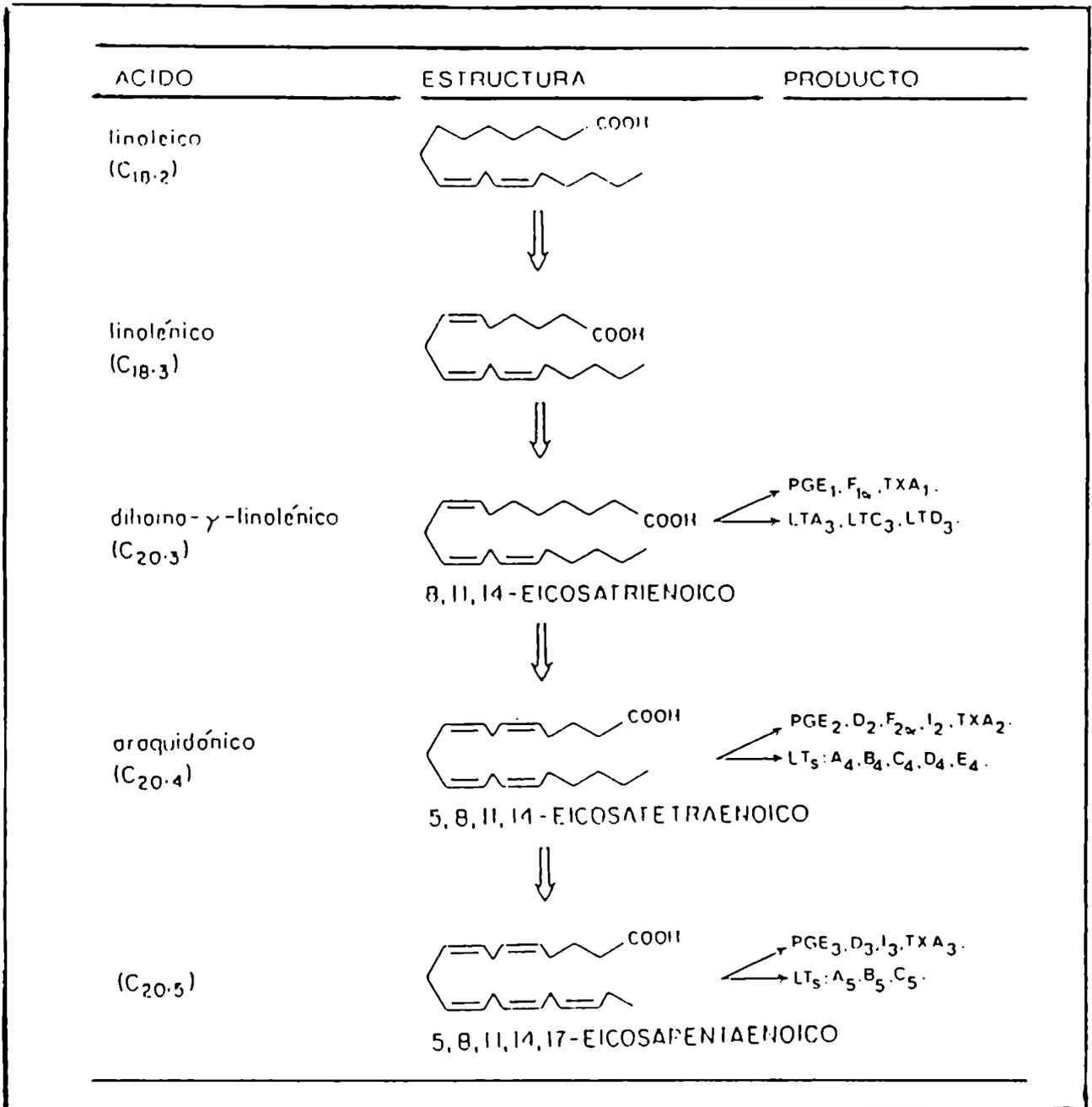


FIGURA I.10
Liberación del ácido araquidónico y metabolización por la vía de la
ciclooxigenasa o de la lipoxigenasa.

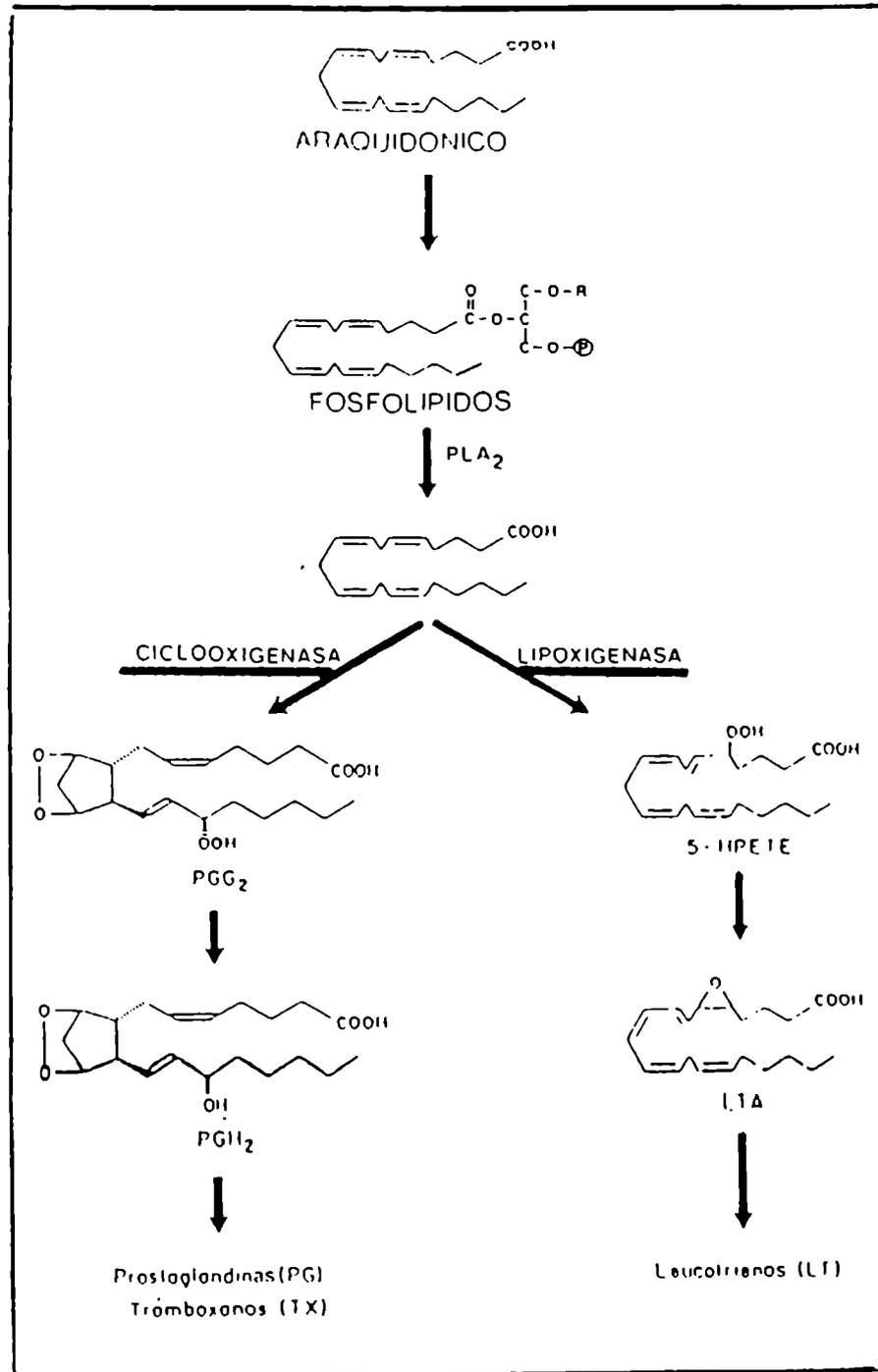
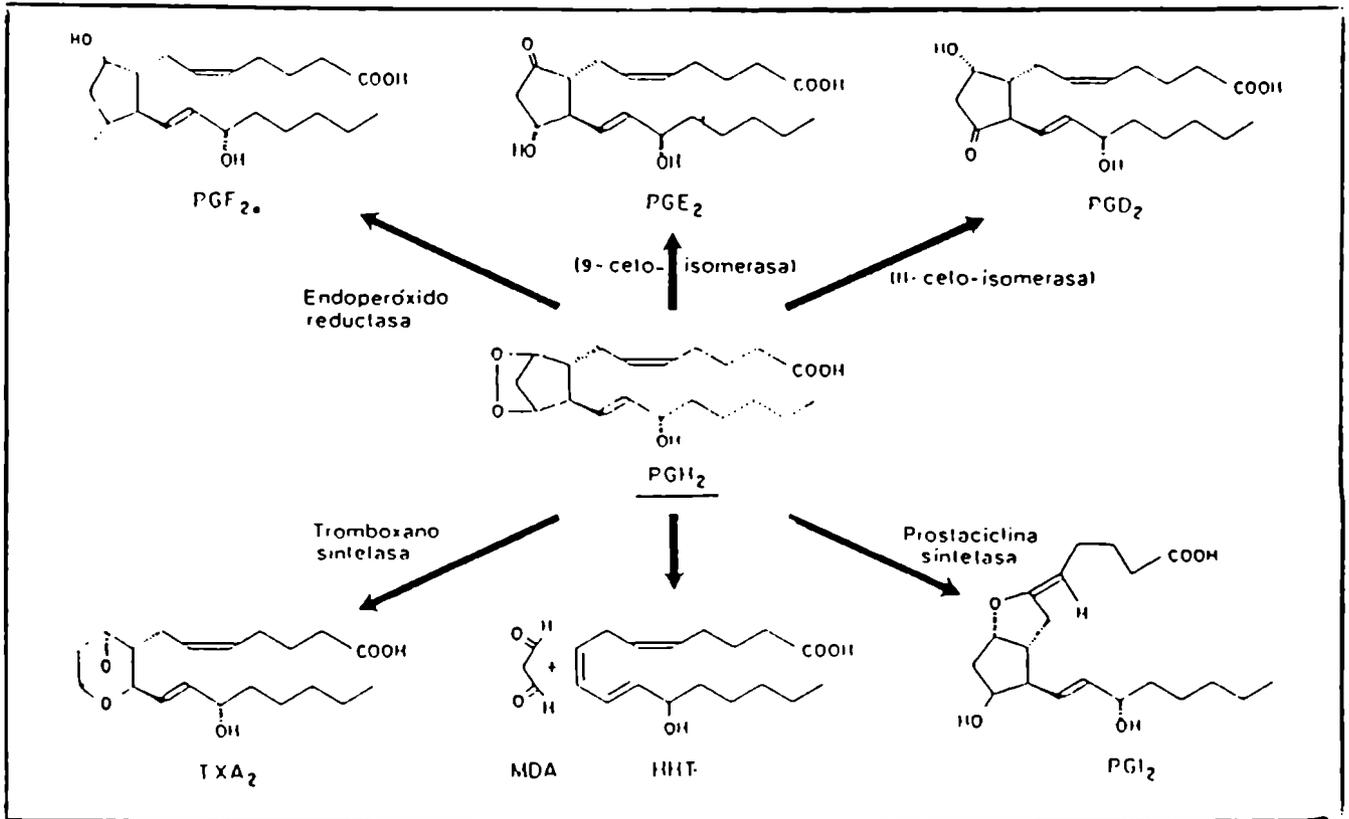


FIGURA I.11
Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos.



MDA: malondialdehido.

- *Camino de la lipoxigenasa.*

Varios peróxidos intermedios son originados por el camino de las *lipoxigenasas* (15, 12 y 5) (LOX). A partir del 5-HPETE (5 hidroxí-5,8,10,14 eicosatetraenoico) se origina el 5-HETE (5 hidroxí-5,8,11,14 eicosatetraenoico) y el LTA₄ (leucotrieno A₄), el cual podrá formar LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄ (fig I.12) (Behrman y Romero, 1992).

2.2. Metabolismo de los eicosanoides.

Las células de los mamíferos son capaces de sintetizarlos en respuesta a diversos estímulos (Harris y col., 1979). Al ser liberados inmediatamente luego de su síntesis, son moduladores autocrinos y paracrinos de la función celular, siendo rápidamente metabolizados.

La oxidación enzimática del grupo alcohol del carbono 15 y las reacciones hidrolíticas espontáneas de PGI₂ y TXA₂ a 6-ceto-PGF₁ alfa y TXB₂ produce una rápida pérdida de actividad biológica de prostaglandinas y tromboxanos, respectivamente (Bendz, 1977).

La metabolización de la PGE₂ esta catalizada por la 15-hidroxí-prostaglandina deshidrogenasa (Nakano y col., 1969), enzima regulada por diversas hormonas, especialmente por estrógenos. La oxidación es seguida de una reducción catalizada por la 13 reductasa (Samuelsson y col., 1971). Posteriormente, se producen dos oxidaciones para obtener el producto final (fig I.13).

3. Prostaglandinas y el consumo crónico de etanol.

La actividad funcional del complejo cúmulo-ovocitario (CCO) y el rol fisiológico de las células de la granulosa en la regulación y control de la calidad de los ovocitos, fue poco estudiado (Sato y Koide, 1987). Se sabe que el cúmulo o sus componentes pueden directamente beneficiar las funciones espermáticas, promover la capacitación (Bavister, 1982), y/o la reacción acrosomal (Boatman, y Robbins, 1991; Tesarik y col., 1988). Anteriormente se ha explorado la liberación de prostaglandinas del complejo CO de rata (Viggiano y col., 1990, 1992, 1995) y su influencia local sobre la motilidad oviductal (Wikremasinghe, 1988). Las PGs pueden afectar la motilidad espermática (Schiegel y col., 1981), la reacción acrosomal (Joyce y col., 1987) y los ensayos de penetración en el hamster (Aitken y Kelly, 1985). La PGE₂ induce síntesis folicular del ácido hialurónico, expansión del cúmulo (Eppig, 1981) y maduración del ovocito en el ratón (Murdoch, 1988; Salustri y col., 1985; Cho, 1976).

Sin embargo, no esta bien documentado si las PGs pueden actuar directamente sobre los ovocitos, si su acción esta mediada a través del fluido folicular o las células de la granulosa.

FIGURA I.12
Biosíntesis de leucotrienos.

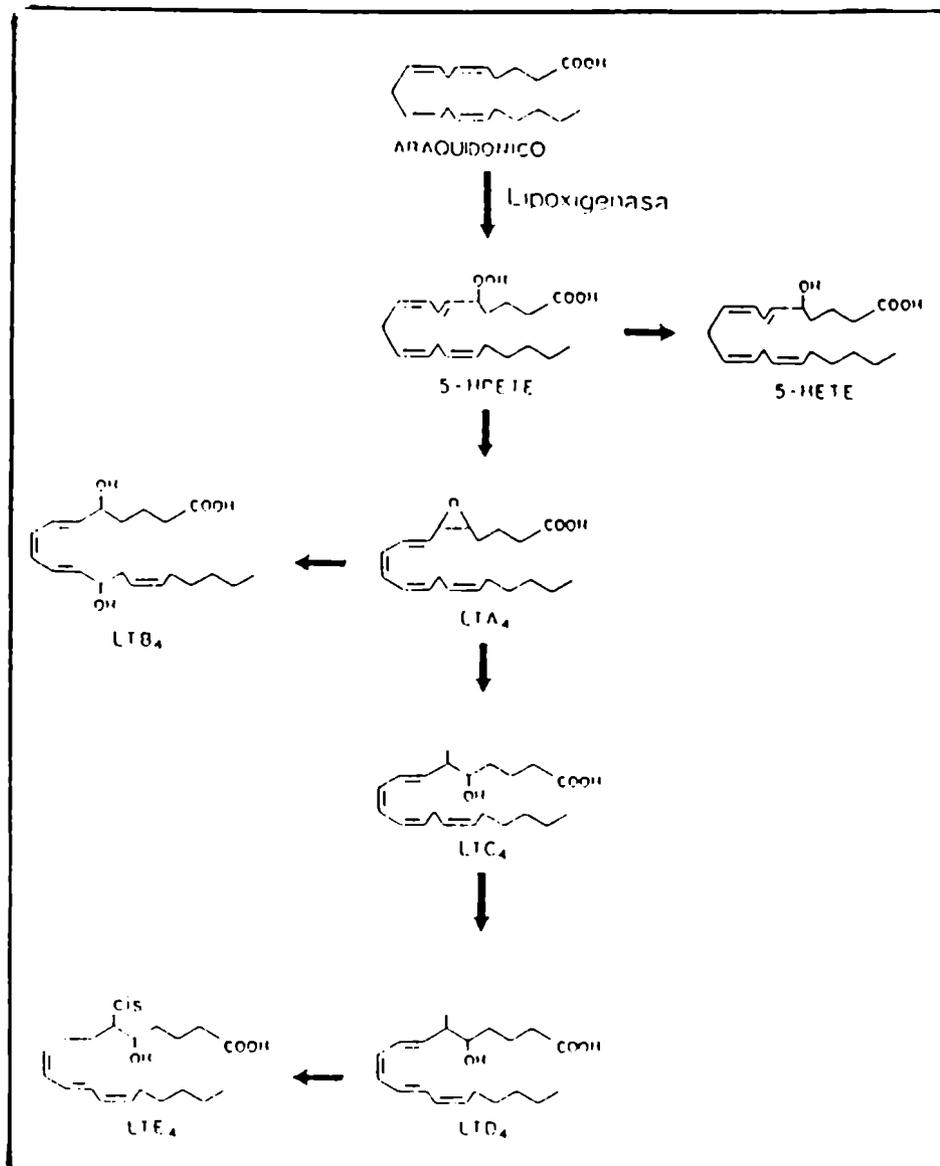
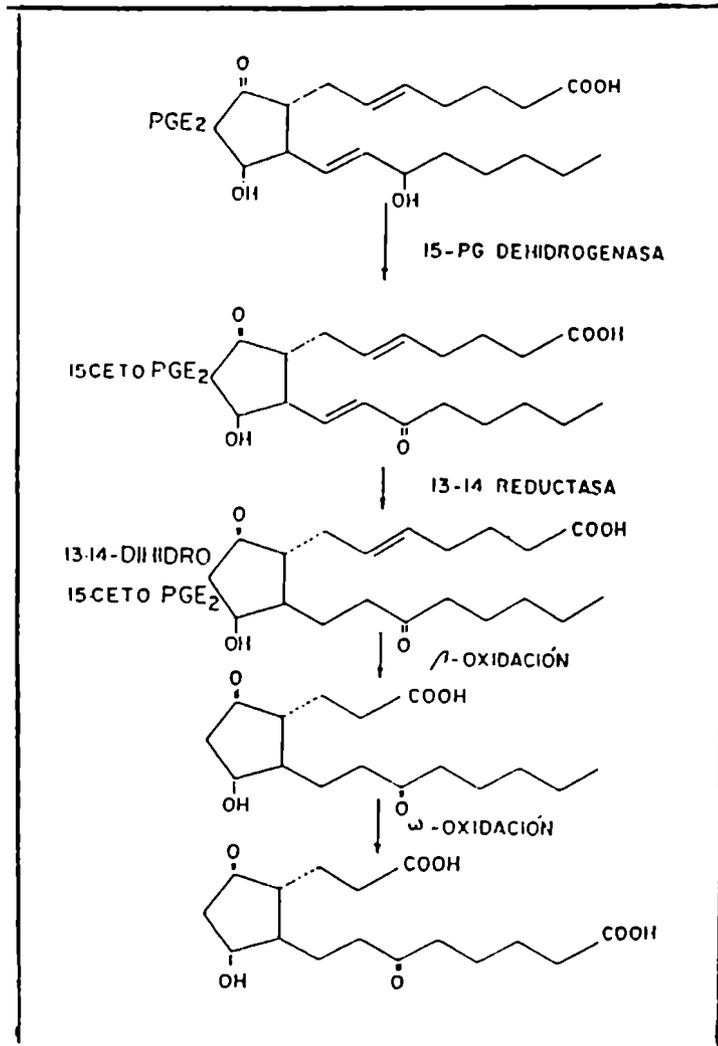


FIGURA I.13
Metabolización de la PGE₂.



Las mediciones de las PGs en el medio de maduración pudieron ser importantes para la evaluación de la calidad de los ovocitos para la fecundación. Pero, un desbalance en la producción relativa de eicosanoides puede ser observado en circunstancias patológicas.

Los efectos del consumo de etanol sobre el ovocito, las células del cúmulo y la influencia sobre la producción de PGE por el complejo CO, no son conocidos. En este trabajo de tesis se estudio la relación entre los efectos deletéreos del consumo crónico de etanol sobre la síntesis de PGE y la calidad de la gameta, siendo los niveles de producción de la PG tomados como indicadores de calidad.

Por otro lado, las prostaglandinas participan en la modulación del desarrollo embrionario, estando implicadas en los cambios de la fisiología del útero y el cuerpo lúteo durante la gestación temprana (Pratt y col., 1977; Reynolds y col., 1981), y también, regulan el transporte de las gametas y embriones a través de tracto genital femenino (Viggiano y col., 1990).

Las prostaglandinas son requeridas en el proceso de extrusión (hatching) del blastocisto *in vitro* (Baskar y col., 1981; Hartshome y col., 1991) en el ratón. Se vio que la indometacina, previene el hatching del embrión de la zona pelúcida (Baskar y col., 1981; Van der Weiden y col., 1993). También las PGs estan implicadas en la expansión del blastocisto a través de efectos sobre el transporte de agua (Barth y col., 1972). Estan involucradas en el inicio y estimulación de la implantación, en el ratón, rata y hamster (Kennedy, 1977; Uehara y col., 1984). Los blastocistos forman la mayor fuente de PGs en el sitio de implantación en el conejo, en el día 7 de preñez (Pakrasi y Dey, 1982). También las PGs de los blastocistos median el incremento de la permeabilidad vascular del endometrio (Hoffman y col., 1977; Kennedy y col., 1980). La PGE₂ esta también involucrada en el inicio de la decidualización en la rata (Holmes y Gordashko, 1977; Kennedy y Lukash, 1982), modulando el metabolismo del epitelio endometrial, y alterando la liberación de factores para la implantación (Holmes y col., 1990).

En el desarrollo embrio-fetal, también se ha visto que los niveles de PGs son importantes para establecer funciones fisiológicas normales. Así, se ha descrito que la PGE₂ dada s.c. en día 9, 12 o 15 de gestación, en el ratón, incrementa la incidencia de crías con malformaciones (Persaud, 1975).

La mayoría de las teorías sobre los mecanismos de teratogenicidad inducida por el etanol postulan que ocurren cambios no específicos en la estructura de membrana.

Pero, los mecanismos de acción teratogénicos del etanol en los fetos permanece sin ser

determinados. Se ha postulado que el etanol puede afectar la vía metabólica de los ácidos grasos esenciales (EFA) y el metabolismo de las prostaglandinas (Horrobin 1980). Los estudios se han focalizado en la producción de PGE por el complejo tisular útero/embrionario (Anton y col., 1988), cuando las madres fueron expuestas al alcohol.

Altos niveles de PGE alteran el curso normal del crecimiento y desarrollo fetal (Randall y col., 1987a). Como se ha descrito que el etanol induce anomalías en los niveles de síntesis de prostaglandinas maternas y/o fetales (Randall y col., 1987b; Anton y col., 1990), se sugirió que las PGs pueden estar involucradas en la etiología de los defectos al nacimiento (Horrobin, 1980), y que el sistema PG puede tener un rol en las acciones teratogénicas del etanol.

Así, se ha visto que los niveles de PGs en los fetos expuestos prenatalmente al alcohol, son más elevados que los normales. También, la exposición materna del etanol durante preñez altera el catabolismo de las PGs (Randall y col., 1987a).

Sin embargo, no se conoce la capacidad de síntesis de PGE por embriones de preimplantación, provenientes de hembras alcohólicas, es decir, que no son expuestos durante la gestación. Entonces, se ha evaluado la síntesis de PGE por embriones de 2 células y blastocistos producidos por desarrollo *in vitro* e *in vivo*, cuando las hembras fueron administradas crónicamente con etanol en la fase preconcepcional.

IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El estado actual del conocimiento acerca de los problemas del alcoholismo en la reproducción, permite aclarar múltiples mecanismos de toxicidad que produce el etanol a nivel reproductivo, tanto a nivel central como periférico, a nivel ovárico o testicular, en forma directa o indirecta. Sin embargo, hasta la fecha son pocos los estudios realizados sobre los efectos tóxicos del etanol, administrado crónicamente en la fase preconcepcional e incluso continuándose durante la preñez temprana, hasta periodos postimplantativos. Además, bien se ha establecido y descrito el síndrome de alcoholismo fetal (FAS), que es producido por altas dosis de etanol en los periodos más susceptibles de la gestación, es decir, en la organogénesis y neurulación. Pero, escaso énfasis ha habido sobre los posibles efectos del consumo de alcohol sobre el desarrollo embrionario de preimplantación. Por otro lado, los efectos adversos del etanol son dependientes de la dosis, la frecuencia y el tiempo de exposición.

A la luz de estos antecedentes nos cuestionamos sobre la incidencia de la ingesta crónica de etanol solamente en la etapa preconcepcional sobre el desarrollo preimplantativo, fase en la cual el animal no fuera expuesto al tóxico. Ningún antecedente de este modelo fue encontrado. Sin embargo, se han publicado pocos casos clínicos sobre el alto riesgo de abortos espontáneos en mujeres que consumen bebidas fuertes semanalmente. Se sabe que el etanol produce serios daños en la función ovárica y ovulatoria, pero un estudio completo sobre el fallo ovocitario y los mecanismos involucrados no fueron descritos. Solamente, se han planteado estudios sobre los efectos directos de la exposición del etanol sobre la gameta femenina. Parece más estudiada la fisiopatología espermática, en ratón, aunque también faltan definiciones y profundización. En este sentido comenzamos a estudiar también funciones espermáticas durante la capacitación y en la fecundación in vitro, con machos tratados con etanol en forma crónica. Por lo tanto nuestra hipótesis fue que el consumo crónico de etanol por hembras y machos de ratón produciría alteraciones en la fecundación y el desarrollo ulterior del embrión en la fase preimplantativa. Suponíamos que debería definirse una dosis mínima de etanol la cual no fuera capaz de producir toxicidad.

Objetivos.

1. Establecer el grado de intoxicación según las diferencias de género, edad individual, y la dosis mínima deletérea de etanol utilizada en el ratón.
2. Determinar las alteraciones producidas en las gametas, por la administración crónica de 10, 5 y 2.5% de etanol durante 30 días, de hembras murinas en la etapa de maduración sexual y en los machos adultos, y poder establecer la sensibilidad de la intoxicación en cuanto a la severidad de los efectos a nivel morfológico y a nivel de la síntesis de eicosanoides.
3. Estudiar si el tratamiento crónico de etanol moderado y bajo afectan la tasa de fecundación (*in vitro* e *in vivo*) y los eventos relacionados.
4. Establecer los efectos posteriores del consumo crónico pregestacional sobre el desarrollo (*in vitro* e *in vivo*) del embrión preimplantativo, observando los niveles de toxicidad producidos por las dosis empleadas, en lo referente al crecimiento embrionario general e individual (ritmo de división y número celular por embrión), morfología, capacidad de síntesis de prostaglandina E, proceso de fragmentación y pérdida embrionaria temprana.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1- ANIMALES Y TRATAMIENTOS.

1.1. Animales.

Se utilizaron ratones híbridos (C57B x CBA) F1 que fueron mantenidos con un régimen de luz diaria de 14 hs. y temperatura controlada (25°C). Machos adultos de 75 días de edad (peso corporal promedio: 29.50 ± 0.88 g) y hembras prepúberes de 30 días de edad (peso corporal promedio: 16.80 ± 0.55 g) se separaron al comienzo del tratamiento y fueron colocados en grupos de 3 a 5 por jaula. Se alimentaron con alimento balanceado Purina "ad libitum".

1.2. Tratamiento crónico con etanol.

Los animales fueron tratados con etanol (alcohol 96°) al 10, 5 y 2.5 % m/v en el agua de bebida durante 30 días consecutivos. Los controles recibieron agua adicionada de dextrosa en forma isocalórica a la bebida etanólica. El acceso al alimento fue "ad libitum". El peso corporal fue medido durante el período del tratamiento.

1.3. Tratamiento subcrónico con etanol.

Hembras de 30 días de edad fueron separadas y mantenidas bajo condiciones controladas, alimentadas con agua y comida "ad libitum" por 27 días. El tratamiento con etanol comenzó a las 10:00 del día 27 con el agregado de etanol en el agua de bebida, y finalizó a las 10:00 del día 30 (72 hs de exposición) cuando fueron sacrificadas. Los controles se realizaron como fue descrito previamente. Las hembras se superovularon durante la exposición a etanol (item 3.2.1).

2- MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios utilizados se muestran en la tabla II.1.

El medio de cultivo utilizado para la fecundación fue denominado medio de fecundación (MF) (Whittingham, modificado por Fraser y Drury, 1975), adicionado con 3% de seroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chem.Co) y previamente equilibrado bajo atmósfera de 95% aire y 5 % CO₂ a 37°C. Para la preparación del medio se utilizó agua para cultivo de embriones esterilizada (Sigma Chem. Co.), y el medio se filtró (filtros Corning) bajo flujo laminar.

El medio empleado para el cultivo de los embriones de preimplantación fue el M16 (Whittingham, 1971, Sigma Chem. Co.), adicionado de BSA, que fue filtrado y equilibrado de

la misma manera.

Para la recolección de ovocitos y embriones se utilizó M2 (Quinn y col., 1982).

Se preparó medio Krebs-Ringer para las incubaciones del complejo cúmulo-ovocito y de embriones.

3- METODOS GENERALES

3.1. Determinación del consumo y la alcoholemia.

- Consumo.

Las calorías ingeridas por día fueron estimadas por el valor calorífico de la dieta sólida utilizada (2900 kcal/kg), teniendo en cuenta que la dextrosa contiene 3.8 kcal/g. La cantidad de alimento consumido fue determinado diariamente por el peso entre el ofrecido y el remanente no consumido. La cantidad de líquido diario ingerido fue determinada de la etanol (7.1 kcal/g) fueron estimadas. Con estos datos los patrones de ingesta calórica diarios y el porcentaje de las calorías derivadas del etanol (% EDC) fueron calculados.

- Alcoholemia.

Grupos separados de 5 machos adultos tratados crónicamente con etanol al 5 y 10 % m/v, con sus controles, fueron decapitados a las 22:00 del día 29 y a las 6:00 del día 30, para poder detectar el grado de alcoholemia. La sangre troncal fue recolectada en tubos heparinizados Eppendorf y mantenida a -70°C. Las determinaciones fueron realizadas con un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard (modelo 5840). Los niveles de etanol fueron cuantificados por curvas estándares de concentraciones conocidas y fueron expresadas como mg etanol/dl sangre.

3.2. Técnicas de estudio de la gameta femenina.

3.2.1. Obtención de los ovocitos ováricos y oviductales.

Con el fin de inducir la ovulación (superovulación), las hembras tratadas fueron inyectadas a las 18:00 del día 27 con 10 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin, Sigma Chem. Co.) via intraperitoneal, y a las 48 hs siguientes se inyectaron 10 UI de hCG (Human Chorionic Gonadotrophin, Sigma). Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical a las 14, 16 y 20 hs posteriores a la hCG.

Los oviductos y los ovarios de cada hembra por separado se removieron y se colocaron en capsulas de Petri con M2.

TABLA II.1
Medios de cultivo (g/100 ml).

	MF	M16	M2
NaCl	0.5803	0.5533	0.5533
NaHCO ₃	0.2106	0.2101	0.0349
Glucosa	0.1000	0.1000	0.1000
KCl	0.0201	0.0356	0.0356
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.0056		
Penicilina	0.0063	0.0060	0.0060
Estreptomina	0.0050	0.0050	0.0050
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0264	0.0252	0.0252
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.0102	0.0293	0.0293
Rojo fenol	0.0013	0.0010	0.0010
BSA	3.0000	0.4000	0.4000
Piruvato de sodio	500 ml	0.0036	0.0036
Lactato de sodio	350 ml	0.2610	0.2610
KH ₂ PO ₄			0.0162
HEPES			0.4969

. Medio Krebs (KRB):

Na ⁺ : 145 mM	Glucosa: 11 mM
K ⁺ : 5.9 mM	(pH 7.4)
Ca ⁺⁺ : 2.2 mM	
Mg ⁺⁺ : 1.2 mM	
Cl ⁻ : 127 mM	
HCO ₃ ⁻ : 25 mM	
SO ₄ ²⁻ : 1.2 mM	
PO ₄ ³⁻ : 1.2 mM	

. Ovocitos ováricos.

Los folículos maduros de cada ovario fueron cuantificados bajo microscopio binocular, y luego punzados usando una fina aguja de 30-G y pinza de disección. Los ovocitos liberados fueron lavados con micropipeta capilar y medio de cultivo para remover las células de la granulosa adheridas. Cuando fue necesario, se utilizó hialuronidasa (0.1%, Sigma Chem.Co.) para remover las células de la corona radiata. Los ovocitos fueron colocados en gotas de medio limpio para ser cuantificados y calificados.

b. Ovocitos oviductales.

La ampolla del oviducto fue punzada con aguja y el complejo cumulo-ovocito (CCO) fue liberado al medio M2 adicionado con hialuronidasa, para dispersar las células de la granulosa. Luego de unos minutos los ovocitos liberados son inmediatamente lavados (tres veces) y colocados en medio limpio para ser observados bajo microscopio invertido de contraste de fase. Para realizar la determinación del estado nuclear, los ovocitos fueron incubados en 100 ml de medio con el fluorocromo vital Hoechst 33342 (0.5 mg/ml), cubierto con aceite mineral, durante 1 hora en estufa gaseada a 37°C. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de fluorescencia, luego de montar los ovocitos en microgota con cubreobjetos y soporte de parafina.

b.1. Morfología ovocitaria del CCO.

A las 16 hs posthCG, el CCO de una hembra fue recuperado por ruptura de la ampolla y colocado en 100 ml de M2, cubierta de aceite mineral. El complejo fue incubado durante 5-6 hs en estufa gaseada para cultivo (37°C, 5% CO₂ en aire) para determinar si la calidad de los ovocitos contenidos en la masa de células de la granulosa fue alterada durante las horas de incubación (*in vitro*). Al finalizar el tiempo de incubación, las células de la granulosa fueron dispersadas con hialuronidasa y los ovocitos libres lavados fueron observados bajo microscopio invertido de contraste de fase.

b.2. Capacidad de síntesis de prostaglandina E por el complejo cumulo-ovocitario.

Estos estudios se detallan en el ítem 3.8.

3.2.2. Determinaciones cuanti y cualitativas.

La cantidad de ovocitos contenidos en los ovarios y en los oviductos de cada hembra fue

determinada y luego clasificados como sigue.

a. Clasificación morfológica celular.

Se utilizó microscopía óptica de contraste de fase. Los tipos de ovocitos se clasificaron en: ovocito inmaduro (con vesícula germinal), ovocito normal (con primer cuerpo polar (I CP) y apariencia citoplasmática normal), ovocito anormal (con alteraciones morfológicas), ovocitos activados partenogenéticamente (con y sin II CP o embrión de 2 células de clivaje inmediato), ovocito fragmentado (con vacuolización, fragmentos en espacio perivitelino o citoplasma fragmentado), ovocito necrótico (con lisis citoplasmática).

b. Clasificación morfológica nuclear.

Con microscopía de fluorescencia se clasificaron en: vesícula germinal (VG), ovocito con placa metafásica normal (metafase II, maduro), placa metafásica anormal (disrupción de placa y cromosomas dispersos), ovocitos activados: con II CP y 1 PN, metafase III (Kubiak (1989), cuando el ovocito arrestado en metafase libera el segundo cuerpo polar), activado con II CP y 0 PN (anucleado o con cromosomas dispersos (disrupción de placa), activado sin II CP + 1PN (diploidizado), embrión de 2 células o de clivaje inmediato.

3.3. Técnicas de estudio de la gameta masculina.

3.3.1. Obtención de espermatozoides.

Al cabo del tratamiento, los machos se sacrificaron por dislocación cervical. Un epididimo por animal se disectó del testis y se colocó en una caja de Petri con MF, en donde se cortó en sus partes anatómicas: cabeza, cuerpo y cauda. Cada una se sumergió en una gota de 200 ml de MF bajo aceite y se extrajeron los espermatozoides contenidos por cortes, bajo microscopio binocular. La masa espermática obtenida se dejó 5 min en estufa gaseada para facilitar su dispersión y así efectuar el conteo espermático.

3.3.2. Medición de la concentración espermática.

El tejido remanente fue removido y la suspensión fue homogenizada con pipeta. Una buena muestra espermática se caracteriza por presentar una óptima dispersión en el medio al cabo de ese tiempo (Bavister, 1989). La concentración de espermatozoides (spz) de las partes del epididimo se determinó con cámara de Neubauer, realizando la dilución (D) apropiada para el conteo. Y se calculó mediante la siguiente fórmula:

nro.cuadrantes contados (5)

3.3.3. Determinación morfológica.

Para evaluar alteraciones en la morfología espermática, se preparó una suspensión en MF de espermatozoides contenidos en el cauda epididimario. Se realizó un frotis con una gota de la muestra, se dejó secar y se sumergió en formol salino buffereado durante 15 min. Luego se lavaron durante 15 a 20 min con agua destilada, y posterior al secado se tiñen los portas con solución de Giemsa buffereada durante 90 min. Los lavados se efectuaron con agua destilada, y las observaciones se realizaron con microscopía de campo claro a 1000 x bajo aceite de inmersión. Las alteraciones morfológicas que se buscaron fueron: de cabeza (micro y macrocefalia, amorfa, rotada, acéfalo, etc), de cola (quebrada, corta, etc), inmaduros (con gota citoplasmática), mixtos. Los cálculos fueron efectuados sobre un total de 100 espermatozoides contados.

3.3.4. Medición de la motilidad

En el mismo procedimiento descrito, bajo cámara de Neubauer y microscopio invertido la motilidad espermática de las partes del epidídimo fue medida, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles, inmóviles e hiperactivados. El patrón de hiperactivación fue identificado cuando se presentó un gran movimiento del flagelo en forma de "látigo" siendo la motilidad no progresiva intercalada con pequeños episodios de motilidad lineal progresiva (Yanagimachi, 1994).

Con el fin de estudiar la evolución de la motilidad de muestra espermática durante un tiempo de incubación o de capacitación in vitro, el cauda del epidídimo de un ratón fue cortado dentro de una gota de 200 µl de MF cubierta de aceite, y luego de su dispersión por 5 min, se colocó en la estufa gaseada durante 2 hs, ya que el tiempo de capacitación en el ratón oscila entre los 90 y 120 min.

3.3.5. Determinación de la reacción acrosomal.

La técnica de estudio es por HOS-SPERMAC (Viggiano y col.), que permitió detectar simultáneamente la presencia del capuchón acrosomal y la viabilidad espermática. Spermac es un kit de tres tinciones (A, B y C) y una solución fijadora (formaldehído) (Tinción Spermac, Stain Enterprises, Onderstepoort, Sud Africa). La tinción "C" (verde) es específica y semi-

contenidos nucleares.

Brevemente, desde los 0 hasta los 240 min cada 60 min, se tomaron alicuotas de 20 ml de la suspensión espermática, y se colocaron en tubos Eppendorf con 200 ml de medio hiposmótico (MHOS= 7.35 g de citrato de sodio y 13.51 g de fructosa en 1 litro de agua destilada). Se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 20 ml de MHOS. Las suspensiones se extendieron en portaobjetos y se dejaron secar, inmediatamente después se fijaron con 5% de formaldehído (v/v) durante 1 h. Luego de la fijación, los extendidos se lavaron tres veces en agua destilada, se sumergieron 1 min en la tinción "A", y 2 min en la "B" y "C". Entre cada tinción, los preparados se enjuagaron en agua destilada. Se dejaron secar y se examinaron (sin montar) bajo microscopio de campo claro a 1000 x con aceite de inmersión.

Con la tinción Spermac, la presencia del capuchón acrosomal murino se revela como una banda verde sobre la cabeza, y el núcleo se tiñe de rojo (Herrero y col.1995). En las observaciones, los espermatozoides viables como la presencia del capuchón acrosomal se determinó en al menos 100 espermatozoides. El porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente (en ausencia de inductor fisiológico) (sin capuchón) se calculó para los diferentes tiempos de incubación y excluyendo los no viables.

3.3.6. Medición de la vitalidad y viabilidad.

Con la tinción HOS-Spermac, se pudo distinguir simultáneamente los espermatozoides viables (vivos), ya que estos presentan un patrón de "swelling" o hinchados, lo cual indica la integridad de la membrana plasmática. Los espermatozoides hinchados, luego de 1 h de incubación en medio MHOS, presentan cola enrollada, o un pequeño rulo en la punta de la cola, o cola doblada sobre sí misma. El porcentaje de espermatozoides vivos fue calculado sobre un total de 100, para cada tiempo de capacitación hasta los 240 min. Entonces la viabilidad espermática de la muestra quedó también determinada con la observación a los 240 min.

3.4. Técnica de fecundación *in vitro*

Una fecundación exitosa depende de las condiciones de mantenimiento de los animales, de las cepas utilizadas, del protocolo de estimulación de la ovulación, de la calidad de los ovocitos, de una buena motilidad espermática, de la concentración de espermatozoides durante la

capacitación y de la concentración de inseminación, además del medio adecuado utilizado.

3.4.1. Preparaciones previas.

El día anterior al ensayo, se preparó el medio MF y se dejó en estufa gaseada. En cajas de Petri Corning 60 x 15 mm se dispusieron gotas (100-150 ml) del MF, donde se colocarían las gametas. Las gotas se cubrieron con 10 ml de vaselina líquida (Parafarm, Argentina) o aceite mineral (Sigma) para evitar la evaporación. El volumen de aceite queda estandarizado para lograr una profundidad constante sobre cada gota y una tensión de gas uniforme (O₂ y CO₂). Las cajas preparadas se incubaron en la estufa (5% CO₂ en aire, 37°C, pH 7.4) para lograr equilibrio entre el MF y el aceite.

3.4.2. Preparación de las gametas.

3.4.2.a. Suspensión espermática.

En la mañana del día 29, los machos se sacrificaron por dislocación cervical. Un cauda epididimario de un animal fue disecado y colocado en una gota de 200 ml de MF en cápsula de Petri, cubierta con aceite. Los espermatozoides se extrajeron efectuando cortes en el cauda bajo microscopio binocular, y la masa densa se dejó dispersar por 5 min. El tejido remanente fue extraído y la concentración espermática fue determinada. La suspensión espermática fue incubada (capacitación in vitro) por 120 min en estufa de cultivo.

3.4.2.b. Obtención de los ovocitos.

Al día 27 del tratamiento las hembras fueron inyectadas para inducir la ovulación, con 10 UI PMSG a las 18:00 i.p., y 48 hs más tarde con 10 UI de hCG. Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical a las 16-17 hs posthCG, los oviductos de cada una se removieron y se colocaron en caja de Petri con M2. Bajo microscopio binocular y en cámara de flujo laminar, los oviductos limpios se sumergieron en las gotas de MF antes preparadas (un oviducto por gota de 150 ml). Para expulsar el complejo cumulo-ovocitos (CCO) la ampolla fue punzada. Luego las cápsulas fueron colocadas en la estufa hasta la inseminación.

3.4.2.c. Inseminación in vitro y evaluación de la FIV.

Al cabo de los 120 min de incubación de la muestra espermática, los CCOs de dos gotas de MF, provenientes de una hembra, fueron inseminados con $1-2 \times 10^6$ spz/ ml (cada una) que provenían de un macho, de modo tal que los ovocitos de una hembra fueron inseminados por los espermatozoides de un macho (un caso). Los grupos estudiados fueron:

Grupo I (C x C): ovocitos de hembras controles inseminados con espermatozoides de machos

controles.

Grupo II (C x A): ovocitos de hembras controles inseminados con espermatozoides de machos tratados (A).

Grupo III (A x C): ovocitos de hembras tratadas (A) inseminados con espermatozoides de machos controles

Grupo IV (A x A): ovocitos de hembras tratadas (A) inseminados con espermatozoides de machos tratados (A).

- Evaluación de los eventos de la fecundación

Los ovocitos fueron recuperados a las 5 horas *post-inseminación*, y lavados para remover las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos. Luego, los ovocitos de una hembra fueron colocados en una gota de 100 µl de medio M16, cubierta con aceite, en donde se realizaron las observaciones bajo microscopio invertido. En este momento, los ovocitos fueron cuantificados y clasificados como: intacto, "activados" cuando se visualizó el segundo cuerpo polar (II CP), fragmentados (con fragmentos citoplasmáticos), necróticos (con lisis citoplasmática).

A las 7-8 hs *post-inseminación*, una fracción del total de ovocitos activados fue incubada en 100 µl de M16 con el fluorocromo Hoechst 33342 (0.5 mg/ml) (Sigma Chem.Co.) durante 1 h, para examinar bajo microscopía de fluorescencia la formación pronuclear. Entonces los ovocitos fueron clasificados como: ovocito no fecundado, fecundado normal (con II CP y 2 PN), ovocito haploide activado partenogenéticamente (II CP y 1 PN), ovocito triploide (polispermico, con II CP y 3 PN), y ovocito anucleado (0PN) (Figura II.3).

Se calculó el promedio de los porcentajes individuales de cada hembra considerada, donde N fue el número de hembras utilizadas, con los errores estandar (SEM).

3.5. Técnica de fecundación *in vivo*.

3.5.1. Apareamiento

La superovulación de las hembras fue inducida por inyección de 10 UI de PMSG a las 15:00 del día 27 de tratamiento, y 10 UI de hCG 48 hs mas tarde. Inmediatamente después de la inyección de hCG una hembra fue colocada en la jaula del macho que fue previamente separado unos días antes. El apareo fue confirmado mediante la presencia del tapón vaginal 14-18 hs posteriores.

Los siguientes grupos fueron estudiados:

Grupo I (C x C): hembras controles apareadas con machos controles.

Grupo II (A x C): hembras tratadas (A) apareadas con machos controles.

3.5.2. Evaluación de la fecundación *in vivo*

Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical 24-32 hs después del apareo: día 1 de preñez (día 2 posthCG). Los embriones de 1 célula fueron recuperados en M16 lavando la ampolla del oviducto de cada hembra, y fueron colocados en 100 ml de M16 limpio cubierto con aceite, para su observación con microscopía invertida. Cuando el medio que contuvo los embriones se adicionó con Hoechst 33342 (0.5 mg/ml), se incubaron 1 h para observar la morfología nuclear, bajo microscopio de fluorescencia. En este caso se cuantificó: ovocito fecundado (II CP + 2PN), ovocito activado sin fecundar: II CP + 1 PN, II CP + 0PN (o cromosomas dispersos), 0 CP + 1 o 2 PN, embrión de 2 células de clivaje inmediato; ovocito sin fecundar (con placa metafásica normal (metafase II), con placa metafásica anormal (cromosomas dispersos), sin placa o anucleado) y ovocito fragmentado y/o necrótico.

3.6. Técnica de cultivo embrionario preimplantacional.

3.6.1. Cultivo embrionario.

Se evaluó el desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*. A las 5-6 hs postinseminación, los ovocitos y embriones recuperados de las gotas de MF, se lavaron y se transfirieron a gotas de 100 ml de medio M16, cubierto con aceite, de modo que cada gota contuvo los embriones de una hembra (un caso). Los embriones fueron cultivados durante 6 días en estufa gaseada de cultivo, a 37°C. Los grupos estudiados fueron:

Grupo I (C x C): embriones de hembras controles y machos controles.

Grupo II (C x A): embriones de hembras controles y machos tratados (A).

Grupo III (A x C): embriones de hembras tratadas (A) y machos controles.

Grupo IV (A x A): embriones de hembras tratadas (A) y machos tratados (A).

Se calculó el promedio de los porcentajes de embriones obtenidos, con sus errores, siendo n el número de animales utilizados.

3.6.2. Evaluación del desarrollo *in vitro*.

- *Cuantificación general.*

Los embriones fueron examinados diariamente aproximadamente a la misma hora, bajo microscopio invertido de contraste de fase. Para poder comparar con los tiempos de desarrollo *in vivo*, se tomó como referencia de partida la inyección de hCG, entonces en el día 1 de

empezó a cuantificar a partir del día 2 (24 hs postinseminación y 48 hs poshCG), cuando se obtuvieron embriones de 2 células. Al día 3: embriones de 2, 3 y 4 células. Al día 4: los embriones estuvieron en estadio de mórula precompactada (8 células) y mórula compactada. Al día 5 se desarrollaron blastocistos tempranos (con blastocele inicial), blastocistos expandidos (cavidad y embrión de mayor tamaño) y algunos embriones aún en mórula. Al día 6 aparecieron blastocistos "hatching" (escapando de la zona pelúcida), además de blastocistos expandidos y algunos tempranos. Al día 7 los blastocistos obtenidos fueron "hatched" (salidos de la zona pelúcida).

- Calidad embrionaria.

La morfología embrionaria fue examinada desde el día 2 hasta el 6 de cultivo. Los embriones anormales fueron cuantificados e incluidos en los cálculos generales, siendo luego discriminados y mostrados en una figura separada.

Alteraciones en la morfología embrionaria fueron definidas como una combinación de factores relativos a la apariencia microscópica. Las siguientes anomalías fueron tenidas en cuenta: fragmentación extracelular (presencia de pequeños fragmentos citoplasmáticos en el espacio perivitelino); blastómeros no intactos, tamaño desigual de los blastómeros, blastómeros contraídos, blastómeros decompactados, formación anormal del blastocele (falso blastocele), vesículas en el trofooctodermo, pequeño maciso celular interno (MCI), lisis citoplasmática o fragmentaciones en el blastocele.

- Proceso de fragmentación.

Los embriones u ovocitos fragmentados fecundados o no, con lisis y/o fragmentación total fueron observados diariamente y cuantificados, de forma de poder comparar con los porcentajes de embriones anormales hallados.

3.7. Determinación del desarrollo *in vivo* preimplantacional.

3.7.1. Obtención de los embriones.

Al día 27 del tratamiento, las hembras fueron inyectadas (15:00 hs) para inducir la ovulación, como se describió previamente. Una vez inyectada la hCG, las hembras fueron apareadas con los machos (una hembra y un macho por caja). Al día siguiente se confirmó el apareamiento por presencia de tapón vaginal. Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical, y los oviductos y uteros fueron colocados en cápsulas de Petri con M2, separados por hembra. Cada

oviducto y útero fue cuidadosamente cortado y lavado en gotas de medio, en donde bajo lupa, se buscaron los embriones. Con ayuda de micropipetas capilares, los ovocitos no fecundados, embriones intactos y otros fragmentados o necróticos fueron lavados y transferidos a gotas limpias de M2 cubierto de aceite, y colocados inmediatamente en estufa para su posterior observación.

3.7.2. Cuantificación tipológica embrionaria.

La clasificación y descripción de los embriones aquí presentada, fue realizada utilizando microscopía invertida de contraste de fase y la técnica de tinción nuclear de Tarkowski (item 3.7.4).

Los tipos de embriones recuperados fueron: en día 2 (46-48 hs poshCG) del oviducto: embriones de 2 células, en día 3 (76-80 hs posthCG) del oviducto (notando que pudieron estar en la unión uterotubal): embriones en mórula (8-16 células). En día 4 (94-99 hs poshCG), lavando oviducto y útero, se encontraron: mórulas (definidas hasta las 32 células), blastocistos tempranos sin blastocele (desde 32 células, con vesiculización inicial citoplasmática, que indicó el comienzo de la cavitación), blastocistos tempranos con blastocele visible, blastocistos expandidos (con blastocele mayor y maciso celular interno (MCI) visible), blastocisto "hatched" con blastocele visible, blastocisto "hatched" sin blastocele (se describió este tipo como blastocisto colapsado implantativo, pareciendo ser la forma más desarrollada cerca de las 100 hs posthCG). Por microscopía de contraste de fase: se distinguieron las variantes: mórula, blastocisto temprano con cavidad, expandido y "hatched" (con y sin cavidad).

Se calcularon para cada día, los porcentajes de embriones encontrados para cada hembra y el promedio general (n: número de hembras utilizadas). Se cuantificó el porcentaje total de embriones por hembra como también la distribución embrionaria utero-tubal a las 98-99 hs posthCG (día 4).

3.7.3. Observaciones cualitativas.

Por microscopía de contraste de fase se evaluó la morfología embrionaria y se detectaron anomalías morfológicas, descritas como antes. No se realizaron estas observaciones en el caso de blastocistos avanzados (ej. "hatched"), ya que este análisis requiere de otras técnicas no utilizadas para este estudio.

Como se evaluó la vitalidad de los embriones, se adicionó a la gota de M16 con los embriones

el fluorocromo Hoechst 33342 (0.5 mg/ml), que es coloración vital, y se incubaron durante 1 h en estufa. Luego se lavaron los embriones en medio y se montaron entre porta y cubre para determinar su vitalidad con microscopio de fluorescencia.

3.7.4. Medición del número de núcleos embrionarios.

Los embriones separados de cada hembra, mantenidos en M16 en estufa, fueron individualmente tratados con la técnica de Tarkowski, para determinar el número de células/embrión. En el caso de los embriones de día 4, las mórulas tardías y blastocistos tempranos sin cavidad, cuya apariencia fue muy similar al microscopio óptico, fueron montados en forma separada de los blastocistos con cavidad. Se definió el tipo de embrión analizado cuando se realizó el recuento nuclear, y se tomo como criterio, que a partir de las 32 células (6to. ciclo celular) el embrión comienza la cavitación, y por lo tanto se lo consideró como blastocisto muy temprano. En este caso, se pudo visualizar el comienzo de la cavitación a partir de vesículas pequeñas en el citoplasma. Para el resto de los blastocistos (expandidos y "hatched") se aplicó la técnica para realizar un recuento aproximado del número nuclear, así se calculó que el MCI debería contener del orden de 30 células. Estos datos son por lo tanto inexactos debido a que esta técnica es inapropiada para estudiar el trofoblasto y el MCI, o blastocistos muy avanzados.

La técnica de tinción nuclear consistió básicamente, en colocar los embriones en una gota de citrato de sodio al 1 % (solución hipotónica) por 10-15 min a temperatura ambiente, dependiendo del estadio de desarrollo. Luego, los embriones son levantados con micropipeta y colocados en el centro de un porta perfectamente limpio, siendo el diámetro de esta gota no mayor que 2 mm. El fijador, preparado previamente con 3 partes de metanol y 1 de ácido acético, es cargado en la micropipeta y expulsado sobre la gota de embriones del porta. Las membranas celulares de los embriones desaparecen con este procedimiento y los núcleos quedan fijados al porta. Posteriormente, una vez bien seco el preparado, se tiñe con una solución de Giemsa (Merck) (3 partes de agua destilada: 1 parte de Giemsa) por 15 min, y se lavan los portas con agua destilada. Las observaciones se realizaron con microscopía óptica común a 25 y 40 x.

3.8. Medición de la síntesis de eicosanoides.

3.8.1. Prostaglandina E del complejo cúmulo-ovocito (CCO).

A las 16 hs posthCG, las hembras controles y tratadas por 30 días con 5 y 10 % de etanol, fueron sacrificadas y los CCOs se obtuvieron por punción de las ampulas oviductales dentro de medio de cultivo. De cada complejo, el número de ovocitos contenido fue cuantificado bajo microscopio con ayuda de pinza y aguja de disección. El CCO de una hembra (una muestra) fue incubado en 2 ml de solución Krebs por 1 h, en baño metabólico con agitación constante (agitador modelo Dubnoff) a 37°C y una atmósfera de 95% O₂-5% CO₂. Luego, la solución de incubación fue acidificada a pH 3 con HCl 1 N y extraída 3 veces con un volumen igual de acetato de etilo. Las muestras se secaron en estufa de vacío a temperatura ambiente, y fueron guardadas a -70°C hasta las determinaciones por RIA.

- Radioinmunoensayo de PGE.

La PGE fue cuantificada con antisuero de conejo. La muestra y todos los reactivos fueron reconstituídos en buffer salino fosfato (PBS) 0.01 M (pH 7.4), que contuvo 0.15 M de NaCl, 0.1% de BSA y 0.1% de azida sódica. Las fracciones (100 µl) de los standards y los extractos de las muestras fueron incubados con antisuero (500 µl) por 30 min a 4°C. Luego de la adición del marcador (100 µl), la incubación fue continuada por 60 min a 4°C. Las formas unidas y libres se separaron con una suspensión de carbón-dextran (1.0%, 0.1%, respect). La sensibilidad de estos ensayos fue 10 pg/tubo. La reactividad cruzada de la PGE₂ fue 100 % con la PGE₁ y menos del 0.1% con otras PGs. Las cantidades de PGE fue expresada en pg/ovocito, porque el número de ovocitos contenidos en la masa del cúmulo provee el tamaño del complejo.

3.8.2. Prostaglandinas e hidroxiácidos del espermatozoide.

La *técnica de radioconversión del [14C] ácido araquidónico* permite evaluar la capacidad de síntesis de prostanoides e hidroxiácidos a partir del agregado de ácido araquidónico exógeno.

El contenido de los epididmos caudales (6-9 x 10⁷ spz/ml) de los machos controles y tratados por 30 días con 5 y 10% de etanol se incubó en 1 ml de MF adicionado con 3% de BSA bajo estufa de cultivo a 37°C durante 60 min. Luego las muestras se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 5 ml (Corning), se agregó 0.25 mCi de [¹⁴C] ácido araquidónico (52.9 Ci/mol; 1 Ci=37 GBq) (New England Nuclear) y se incubó durante otros 60 min en un baño termostático tipo Dubnoff bajo atmósfera de carbogeno (95% O₂, 5% CO₂) a 37°C.

Finalizada la incubación, los productos derivados de la lipoxigenasa se extrajeron tres veces con 2 ml de acetato de etilo. Los extractos obtenidos se secaron con N₂, los residuos se

resuspendieron en 0.2 ml de cloroformo: metanol (2:1 v/v) y se sembraron en placa de sílica gel (cromatografía en capa delgada) a fin de separar los metabolitos derivados de la lipoxigenasa formados durante la incubación. Paralelamente se sembró el ácido 5-hidroxi-5,8,11,14-eicosatetraenoico (5-HETE) (Paesel, Frankfurt) como testigo. La corrida se realizó en cuba cromatográfica conteniendo una mezcla de solventes: acetato de etilo: isooctano: ácido acético: agua (76:67:20:100 v/v). Una vez corrida la placa y evaporado el solvente, el testigo se reveló con vapor iodado. Los Rf obtenidos para el ácido araquidónico y el 5-HETE fueron 0.85 y 0.70 respectivamente. La placa se cortó en segmentos de aprox. 1 cm, y se colocaron en viales agregándoles 10 ml de líquido de centelleo LKB1214 Rackbeta. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentajes de conversión de radioactividad total de la placa (% cpm en la placa).

Finalizada la extracción de los productos de la lipoxigenasa y a fin de extraer los productos derivados de la ciclooxigenasa, el medio de incubación remanente se acidificó con HCl 0.01 M hasta pH 3. Se agregó un volumen de acetato de etilo y se dejó en contacto a 4°C durante 18-22 hs. Cumplido este período, se extrajo la fase superior y se realizaron dos extracciones más con igual volumen de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se llevaron a sequedad bajo atmósfera de N₂. Los residuos de las muestras fueron eluidos con una mezcla de cloroformo: metanol (2:1 v/v) y se sembraron en placas mediante capilares. Paralelamente, se sembraron testigos auténticos de PGE₂, PGF_{2α}, 6 cet-PGF_{1α} y TXB₂ (Sigma Chem.Co). La corrida se realizó en cuba cromatográfica con 200 ml de benceno: dioxano: ácido acético glacial (60:30:3 v/v). La posición de los testigos en la placa seca se visualizó con ácido fosfomolibdico (Sigma Chem.Co.) en etanol al 10% p/v, seguido de calentamiento a 110°C durante 10 min. Los valores de Rf obtenidos fueron: 0.47 para PGE₂, 0.35 para PGF_{2α}, 0.22 para 6-ceto-PGF_{1α}, 0.57 para TXB₂ y 0.80 para el ácido araquidónico. La placa se cortó en segmentos y se colocaron en viales con 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad presente se determinó a las 24 hs siguientes en un contador de centelleo líquido LKB1214 Rackbeta. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentajes de conversión de radioactividad total de la placa.

3.8.3. Prostaglandinas embrionarias.

La PGE de embriones de 2 células, de mórulas y de blastocistos, obtenidos *in vitro* e *in vivo* fue determinada por radioinmunoensayo.

- Obtención de los embriones.

Al día 27 de tratamiento con etanol, las hembras fueron estimuladas para inducir la ovulación. A las 16-17 hs posthCG, las hembras fueron sacrificadas y los CCOs fueron extraídos de los oviductos para realizar "fecundaciones in vitro" y desarrollo in vitro (3.4 y 3.6).

Para la recuperación de los embriones desarrollados in vivo, se procedió como antes (3.7). Las hembras fueron apareadas al momento de la inyección de la hCG, y fueron sacrificadas al día 2, 3 y 4 de desarrollo. Los embriones se recuperaron por lavado de los oviductos y úteros de cada hembra.

Los grupos estudiados fueron:

Grupo I (C x C): embriones de hembras controles fecundadas con machos controles.

Grupo II (C x A): embriones de hembras controles fecundadas con machos tratados (A).

Grupo III (A x C): embriones de hembras tratadas (A) fecundadas con machos controles.

- Radioinmunoensayo.

Los embriones fueron colocados en 2 ml de solución Krebs (aprox. 6 embriones por muestra proveniente de una hembra:un caso). Se incubaron durante 1 h en baño termostático tipo Dubnoff, a 37°C y con agitación, bajo atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, la solución con HCl 1 N y extraídas tres veces con igual volumen de acetato de etilo. Los extractos fueron secados bajo N₂ a temperatura ambiente, y el residuo fue mantenido a -70°C hasta el RIA.

Se cuantificó la PGE utilizando un antisuero de conejo. Las muestras y todos los reactivos fueron reconstituídos en PBS 0.01 M (pH 7.4), que contuvo BSA 0.1 %. Las fracciones (100 ml) de los standards y los extractos de la muestras fueron incubadas con antisuero (500 ml) por 30 min a 4°C. Las formas libres y unidas fueron separadas con una suspensión de carbón dextran. La sensibilidad de estos ensayos fue de 10 pg/tubo. La cantidad de PGE sintetizada y liberada al medio fue expresada como pg PGE/embrión, siendo N el número de hembras utilizado.

3.9. Fotomicrografía.

Las fotos de ovocitos y embriones que estuvieron en cápsulas de cultivo fueron realizadas con microscopio invertido "Olimpus" (IMT-2, WLWCD 0.30, Japan), utilizando luz blanca y con cámara automática incorporada. La película fue Agfapan 100 asas. Los ovocitos y embriones montados en porta y teñidos con fluorocromo se fotografiaron con microscopio Zeiss (Wets

Germany), exponiéndolos a luz blanca y fluorescencia, con película Kodak 1600 asas. Los núcleos de los embriones fueron fotografiados utilizando película Kodak 400 asas, con el mismo microscopio.

4. ANALISIS ESTADISTICOS.

Para las comparaciones estadísticas entre dos tratamientos se utilizó la prueba "t" de Student para muestras no apareadas. En los casos en que tres o más tratamientos se compararon, se realizó un análisis de la varianza, y se aplicó el test de Dunnett, para comparar con el grupo control. Para algunos casos, de análisis de distribución de frecuencias entre grupos se aplicaron pruebas de X^2 de independencia.

En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. El N fue el número de animales utilizados (una muestra). Los resultados fueron por lo general expresados como el promedio de los porcentajes individuales con el error estándar (SEM).

CAPITULO III

RESULTADOS

1. GRADO DE INGESTA Y DE INTOXICACION.

En varios estudios se determinó que el grado de consumo de alcohol es dependiente del género, además de la susceptibilidad de la cepa y la especie utilizada como modelo. Es variada la bibliografía acerca de los efectos metabólicos dependiendo del grado de ingesta. Por lo general los datos provienen de estudios en la rata, en los que la dieta líquida es la más comúnmente utilizada. Determinaciones sobre el consumo, el peso corporal y el grado de alcoholemia, se realizaron de modo de analizar el modelo en ratón y mostrar el grado de intoxicación.

1.1. Consumo sólido, líquido y calórico.

El promedio diario de la cantidad de alimento sólido (g= gramos) y bebida (control adicionada con dextrosa o con etanol) consumida por las hembras y los machos de ratón fueron medidos y expresados por kg de peso corporal.

Las hembras tratadas con etanol al 5% en el agua de bebida consumieron la misma cantidad de alimento sólido que las hembras controles, mientras que las hembras tratadas con etanol al 10% consumieron mayor cantidad de alimento ($p < 0.001$) (Figura III.1.A). Esto se debería a que las hembras tratadas con 10% redujeron significativamente la ingesta de bebida etanólica, comparando con sus controles ($p < 0.05$). Sin embargo, las hembras tratadas con 5% de etanol también parecen beber menos que las controles (Figura III.1.B). No se observaron diferencias en la cantidad de calorías totales (kcal) consumidas por las hembras controles y tratadas con 5 y 10 % de etanol (Figura III.2).

En las hembras tratadas una porción calórica proviene de las derivadas del etanol. El porcentaje de calorías derivadas del consumo de etanol al 5% fue 11.7% EDC , para el etanol al 10%: 27% EDC (Figura III.2).

Los machos tratados con 5 y 10% de etanol mostraron el mismo patrón de consumo de alimento sólido y líquido que las hembras, aunque en general los valores fueron menores (Figura III.3.A y B). Del mismo modo, las calorías totales consumidas por los machos fue menor que en las hembras, con ambos tratamientos (Figura III.4). Sin embargo, el % EDC en los machos tratados con 5% es algo mayor que el de las hembras tratadas con la misma concentración etanólica (16.5%).

FIGURA III.1.A. Consumo sólido de hembras tratadas con 5 y 10 % de etanol.

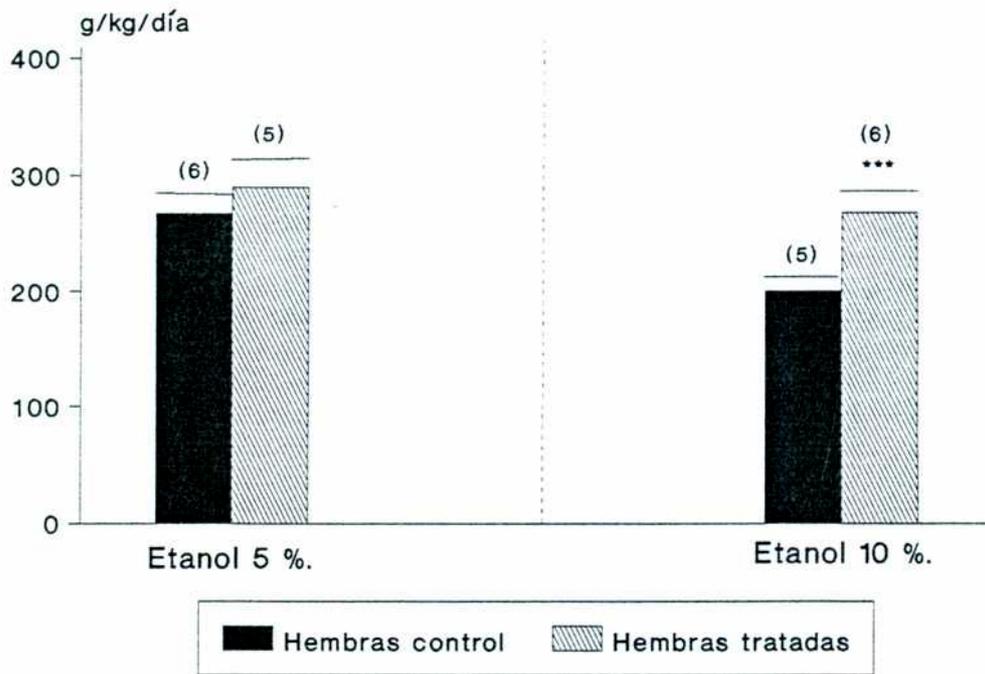


FIGURA III.1.B: Consumo líquido de hembras tratadas con 5 y 10% de etanol.

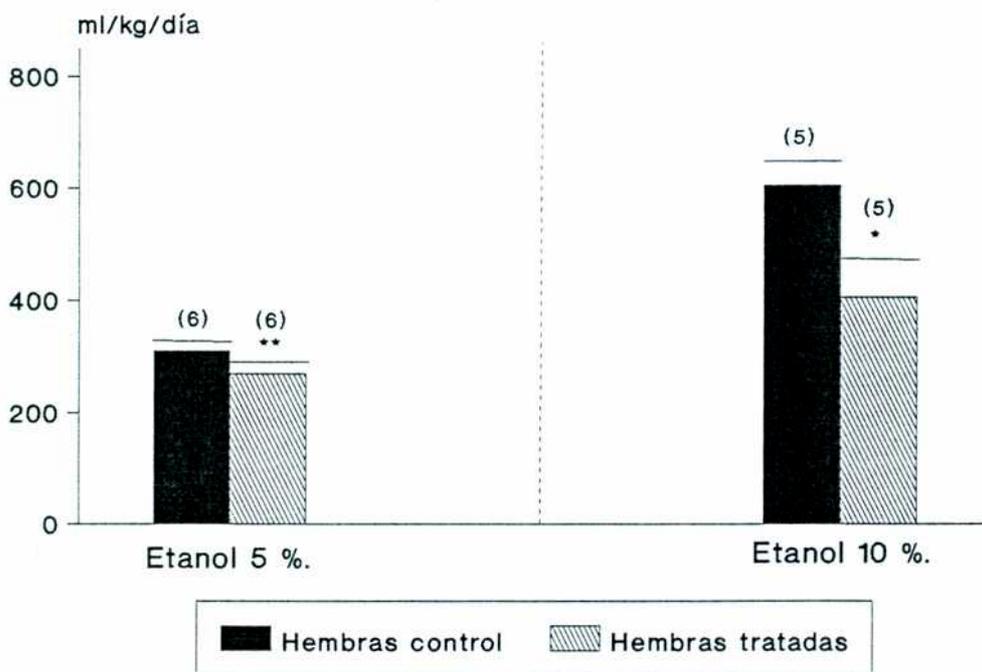
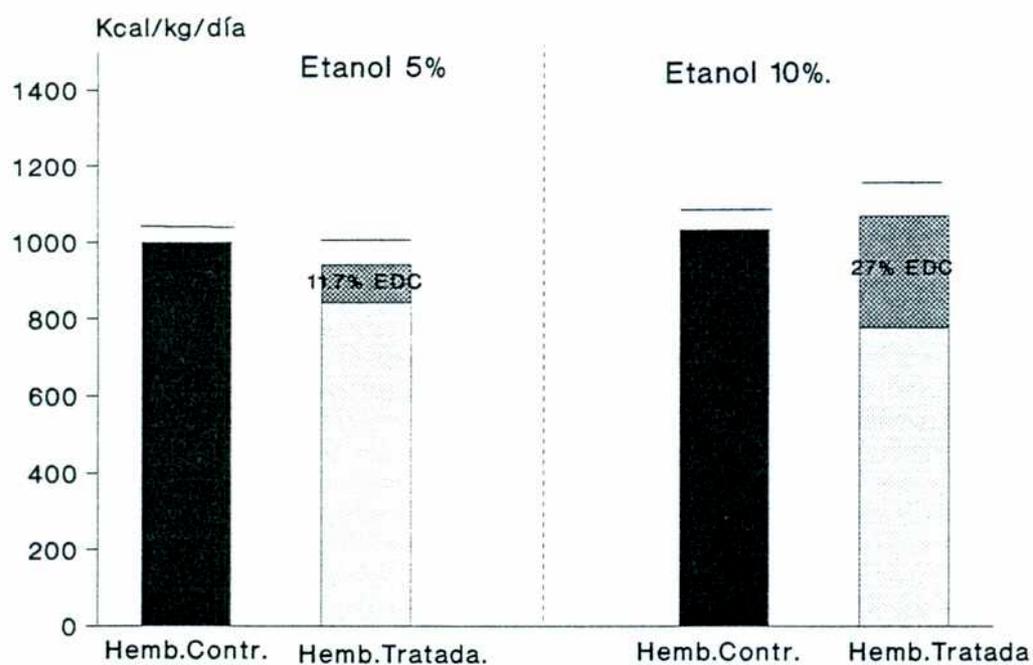


FIGURA III.2: Consumo calórico total y % de calorías derivadas del etanol (% EDC) en hembras tratadas con 5 y 10 % de etanol.



Se midió la cantidad total de calorías ingeridas por las hembras (kcal/kg/día), y se calculó el % EDC: en las tratadas con 5 % de etanol fue 11.7% y con 10 % de etanol 27%.

Comparando la cantidad de etanol ingerida (g/kg/día) entre las hembras y los machos tratados, se observó que las hembras tratadas con 10% de etanol ingirieron significativamente mayor cantidad de la droga que los machos (Figura III.5).

1.2. Peso corporal.

Se pesaron las hembras al comienzo del tratamiento, tomándose aquellas que teniendo 30 días de edad pesaron igual en forma aproximada. Entonces, 3-4 veces por semana se midió el peso corporal. No se observó reducción en el peso de las hembras tratadas con 5% de etanol, solamente una leve caída en la última parte del tratamiento (Figura III.6.A), mientras que en los machos no se observaron diferencias respecto a los controles (Figura III.6.B).

Cuando se administró 10% de etanol, las hembras tampoco disminuyeron de peso comparando con los controles, y solamente en el último día del tratamiento (figura III.7.A).

Los machos tratados con 10% mantuvieron constante el peso hasta la última etapa del tratamiento, que es cuando se observó una caída significativa respecto de sus controles (Figura III.7.B).

1.3. Alcoholemia.

Las mediciones de la concentración de alcohol en sangre (mg/dl) fueron realizadas en los machos (4). Primero se sacrificaron los animales a las 6:00 del día 30 de tratamiento con 5 y 10% (estando los animales con actividad nocturna y consecuente alto consumo), y se encontró que los niveles de alcoholemia fueron apenas detectados en los tratados con el 10%, y no detectados en los tratados con 5% de etanol (Tabla III.1). Estos resultados permitieron suponer que en las primeras horas de oscuridad los animales incrementarían el consumo y tendrían aún alcohol poco metabolizado en la sangre. Por ello se sacrificaron a las 22:00 del día 29 de tratamiento. Se detectaron niveles mayores de alcoholemia ($p < 0.001$) en los machos tratados con 10% de etanol a las 22:00 hs que a las 6:00 hs (Tabla III.1).

FIGURA III.3.A: Consumo sólido de machos tratados con etanol al 5 y 10%.

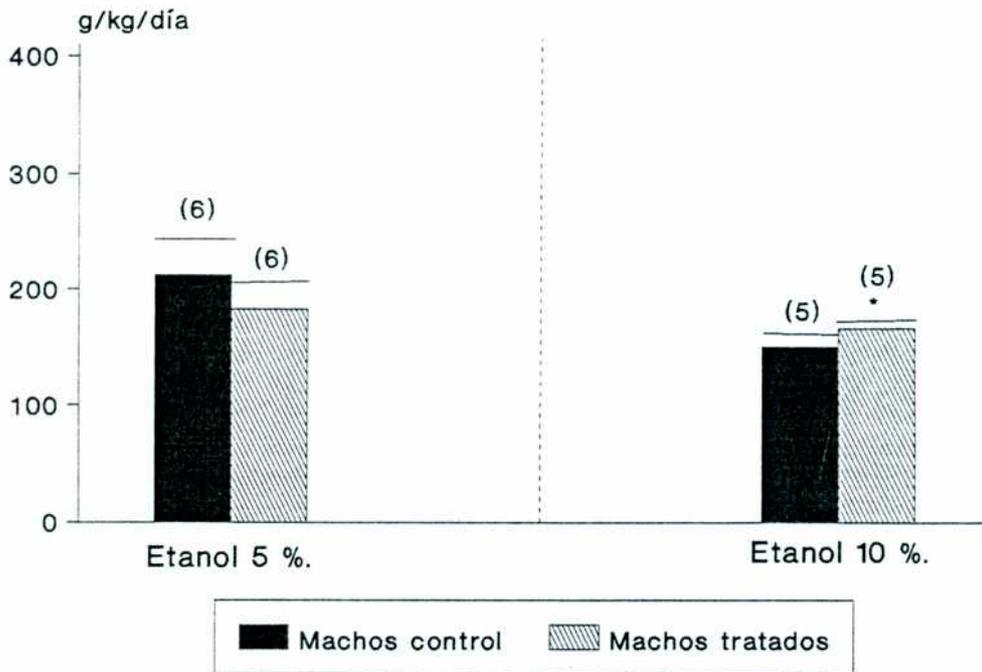


FIGURA III.3.B: Consumo líquido por machos tratados con etanol al 5 y 10%.

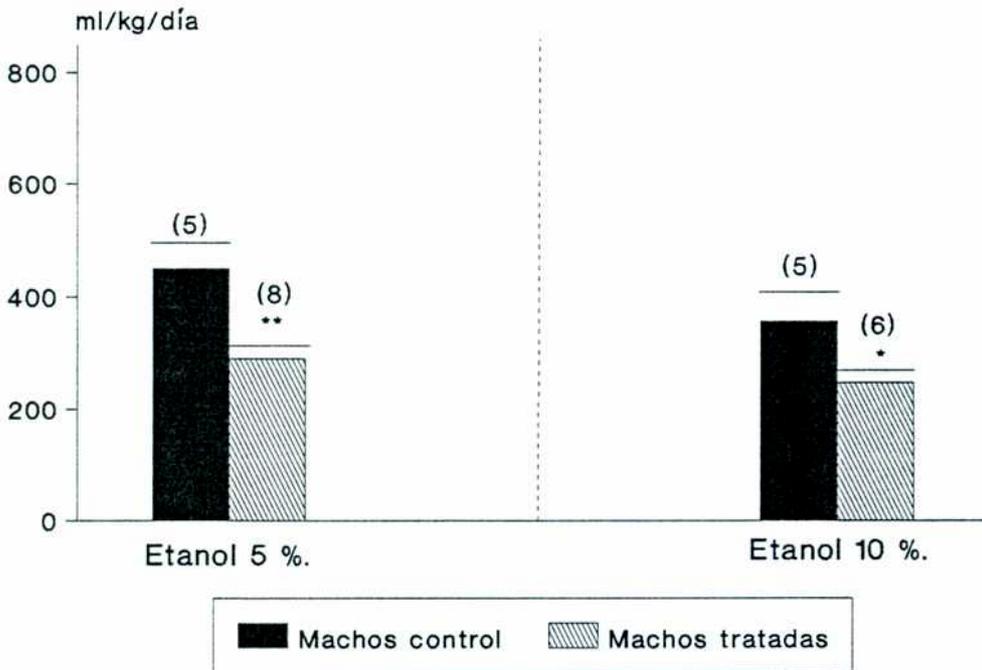
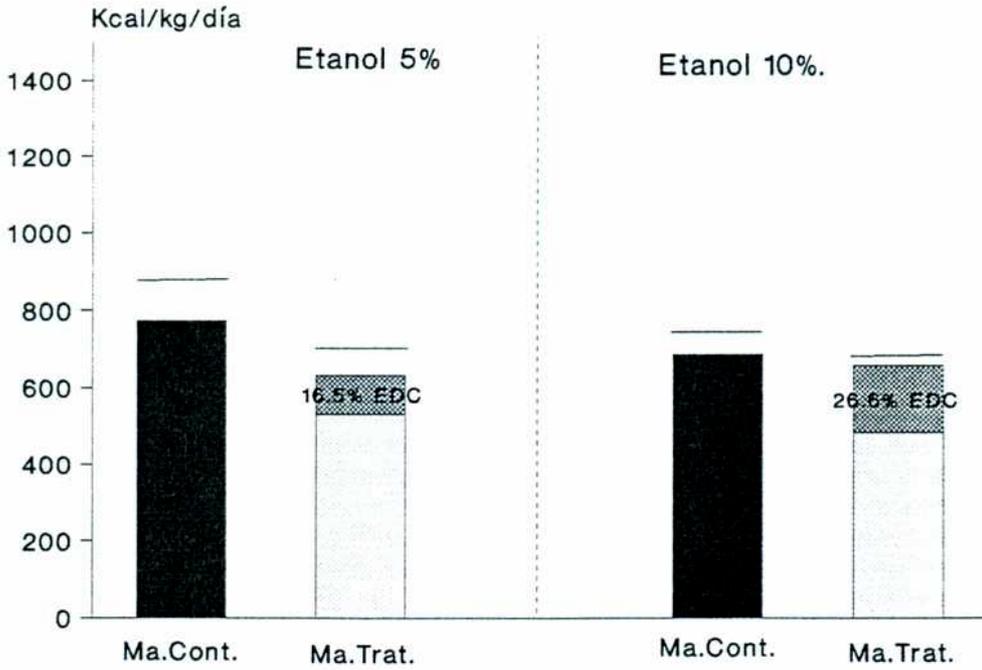
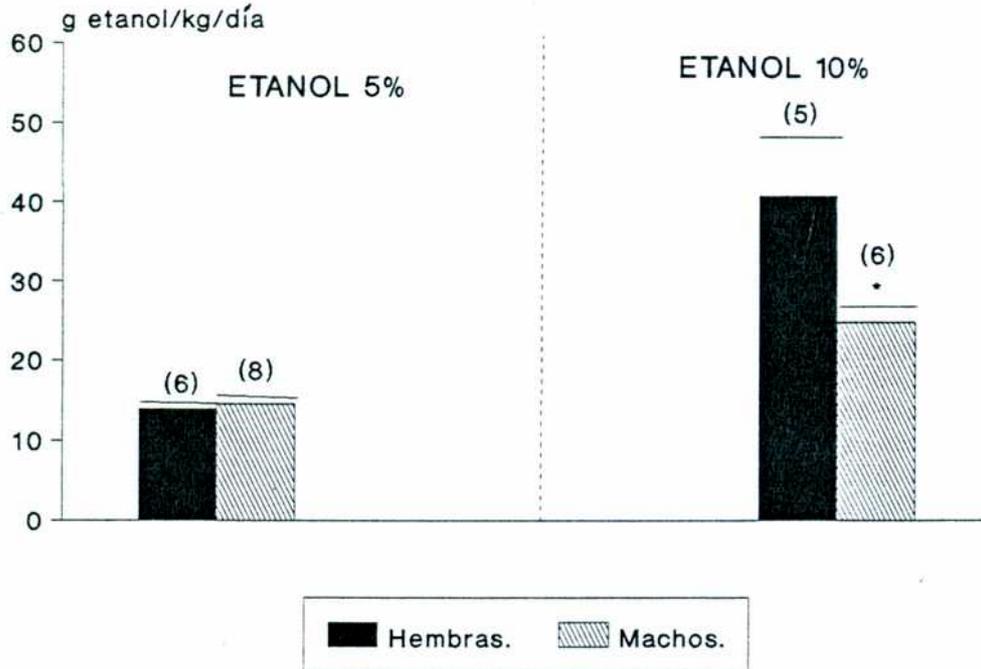


FIGURA III.4: Consumo calórico total y % EDC en machos tratados con 5 y 10% de etanol.



El % de EDC fue calculado en cada uno, y resultó del 16.5 % en los machos tratados con 5 % y del 26.6 % en los tratados con 10% de etanol.

FIGURA III.5: Cantidad total de etanol ingerido por machos y hembras.



Se calculó la cantidad de etanol consumido por la bebida preparada con etanol al 5 y 10%. Los machos tratados con 10% consumieron menos cantidad de etanol que las hembras ($p < 0.05$) (Test de Student't).

FIGURA III.6.A: Variación del peso corporal en hembras tratadas con etanol 5%.

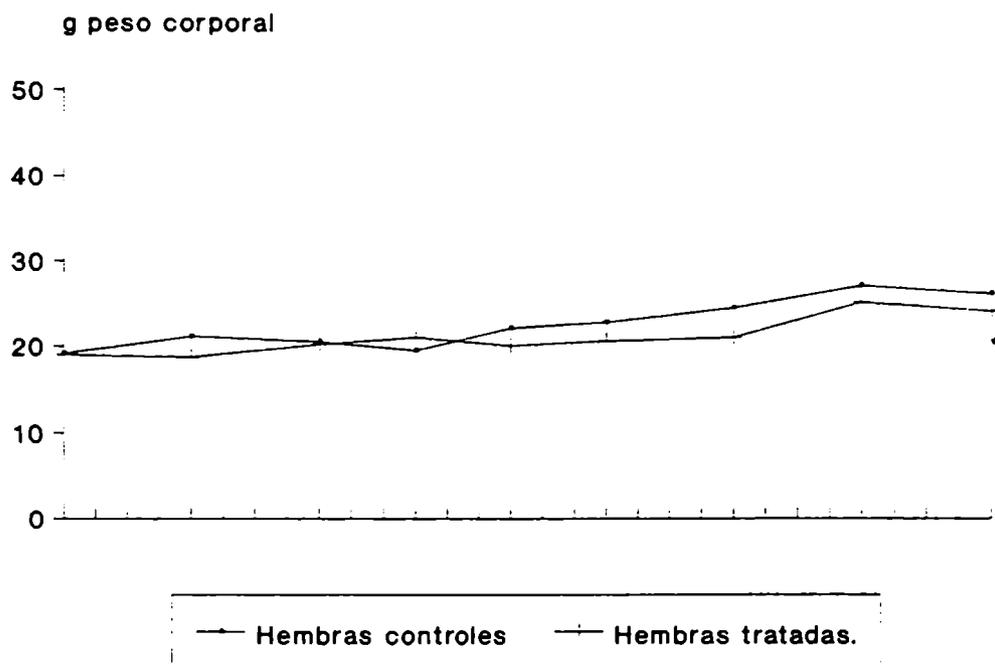


FIGURA III.6.B: Variación del peso corporal en machos tratados con etanol 5%.

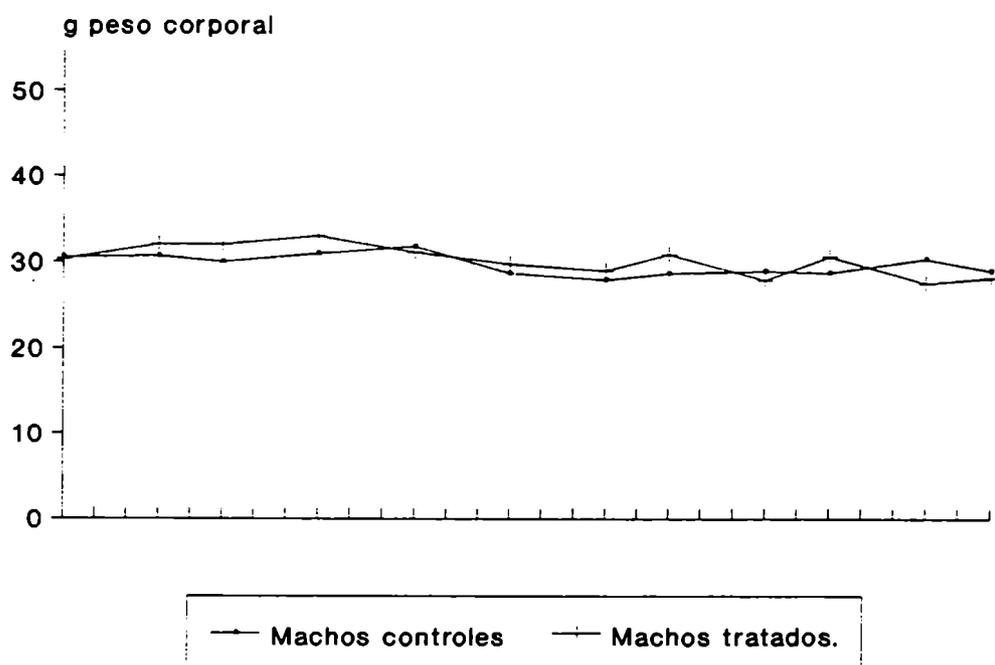


FIGURA III.7.A: Variación del peso corporal en hembras tratadas con etanol 10%.

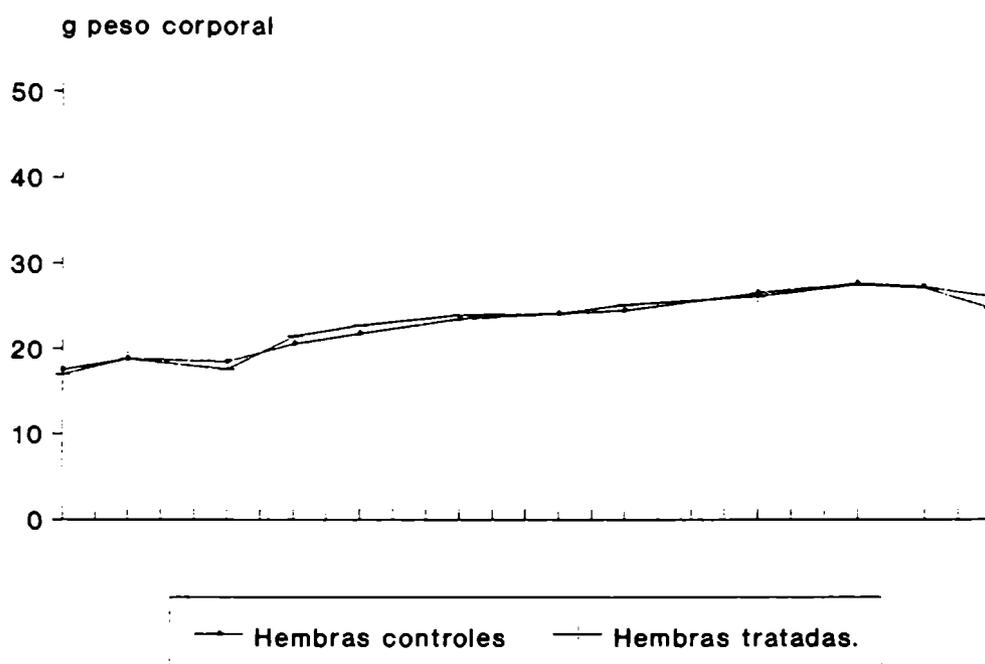


FIGURA III.7.B: Variación del peso corporal en machos tratados con etanol 10%.

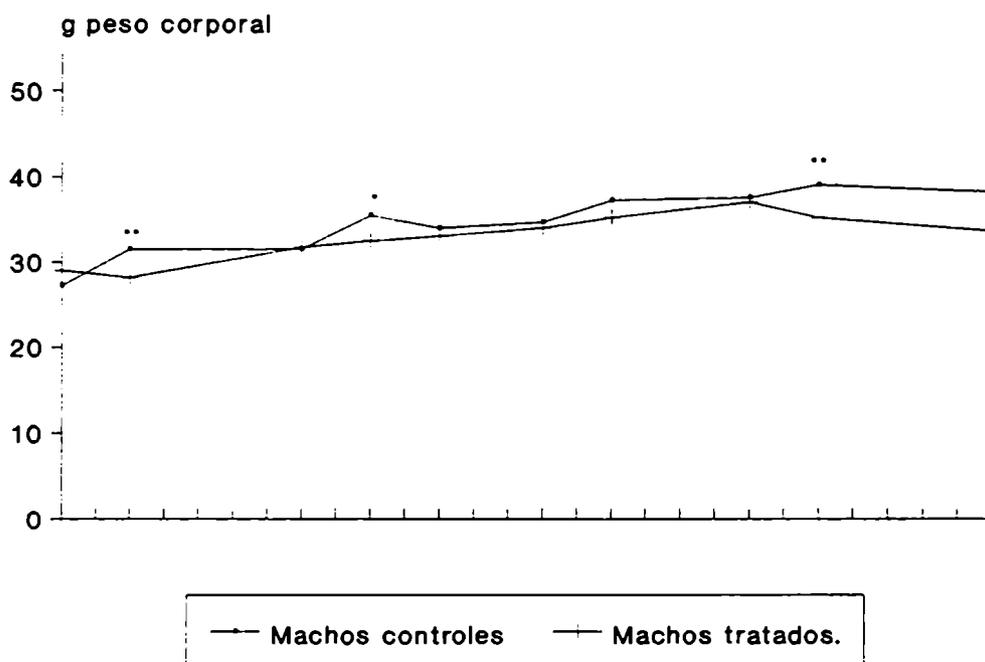


TABLA III.1: Alcholemia (mg/dl).

	Dia 29	Dia 30
	22:00 hs	6:00 hs
Machos controles	0	0
Machos Tratados 5%	no detectado	no detectado
Machos Tratados 10%	66.2 ± 2.7 (4)	45 ± 2.5 (4)***

2. GAMETA FEMENINA.

2.1 Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol sobre hembras inmaduras.

Dado que no fueron descriptas las alteraciones en el ovocito producidas por la ingesta crónica de alcohol por períodos prolongados y alrededor de la etapa ovulatoria, se estudió la respuesta ovulatoria que tenían hembras inmaduras al comienzo del tratamiento, cuando estas fueron superovuladas. También, buscando el límite inferior de concentración de etanol que pudiera producir un efecto, se probó primero una dosis moderada (10%) y luego se redujo a 5 y 2.5%.

2.1.1. Respuesta cuantitativa a la inducción ovulatoria.

A. Consumo de etanol al 10%.

Cuando se cuantificaron los folículos maduros intactos del ovario, a diferentes horas posthCG (14, 16 y 20 hs), en las hembras tratadas con 10% de etanol, se vio que el número de folículos maduros a las 14 hs posthCG fue similar en las hembras tratadas y en las controles. A las 16 hs posthCG, resultó un incremento significativo en la cantidad de folículos de las hembras tratadas comparando con las controles ($p < 0.05$). A las 20 hs, casi todos los folículos fueron ovulados en ambos grupos (Figura III.8).

Cuando se determinó el número de ovocitos retenidos en los folículos maduros, se observó que a las 14 hs posthCG, el contenido fue similar en ambas hembras. Sin embargo, a las 16 hs, un incremento de ovocitos foliculares fue encontrado en las hembras tratadas comparando con las controles. A las 20 hs posthCG, el número de ovocitos retenidos en los folículos de ambas hembras fue similar (Figura III.9.A). A las 14 y 16 hs, la cantidad de ovocitos ovulados de las hembras tratadas fue significativamente menor que en las hembras controles ($p < 0.05$), siendo luego a las 20 hs posthCG, la cantidad ovulatoria similar en ambos grupos (Figura III.9.B).

Estos resultados sugieren que la tasa de ovulación de las hembras tratadas está afectada (disminuída) a las 16 hs posthCG ya que un número alto de ovocitos es retenido en los folículos maduros no ovulados. El consumo crónico de etanol al 10% produciría maduración folicular retrasada y ovulación retrasada.

B. Consumo de etanol al 5%.

Dado que la administración de etanol al 10% produjo menor tasa ovulatoria a las 16 hs

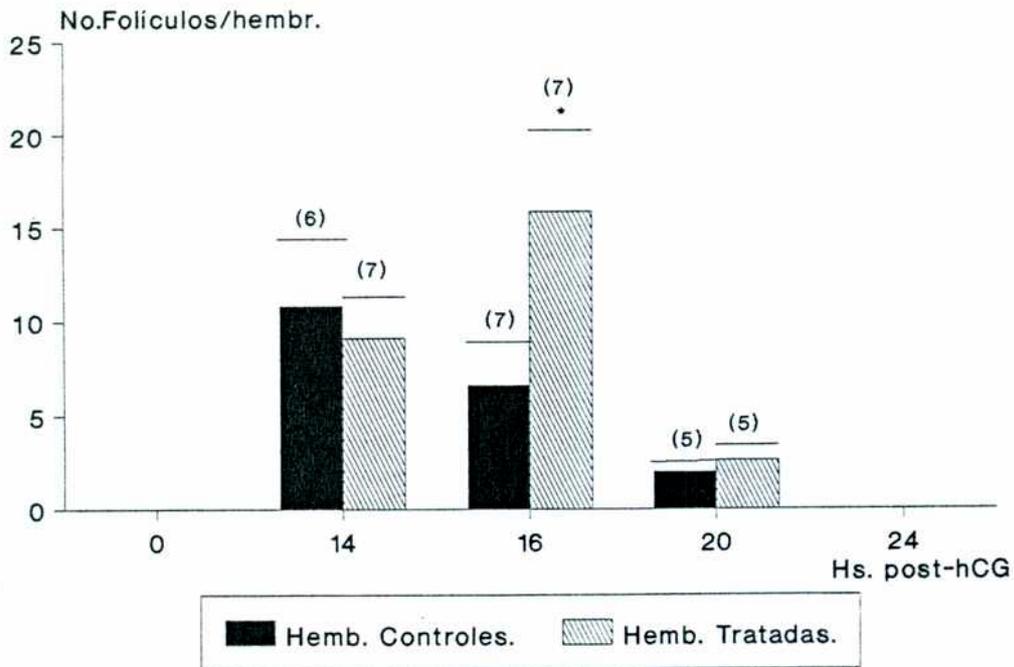
posthCG, comparando con los controles, se disminuyó a la mitad la concentración de etanol en el agua de bebida. Y se midió solamente a las 16 hs la cantidad de ovocitos oviductales por hembra. Entonces, se encontró que las hembras tratadas con 5% de etanol ovularon menor cantidad de ovocitos respecto de las controles ($p < 0.05$) (Figura III.10.A).

El tratamiento con 5% de etanol también produce una caída en la cantidad ovulatoria a las 16 hs posthCG.

C. Consumo de etanol al 2.5%.

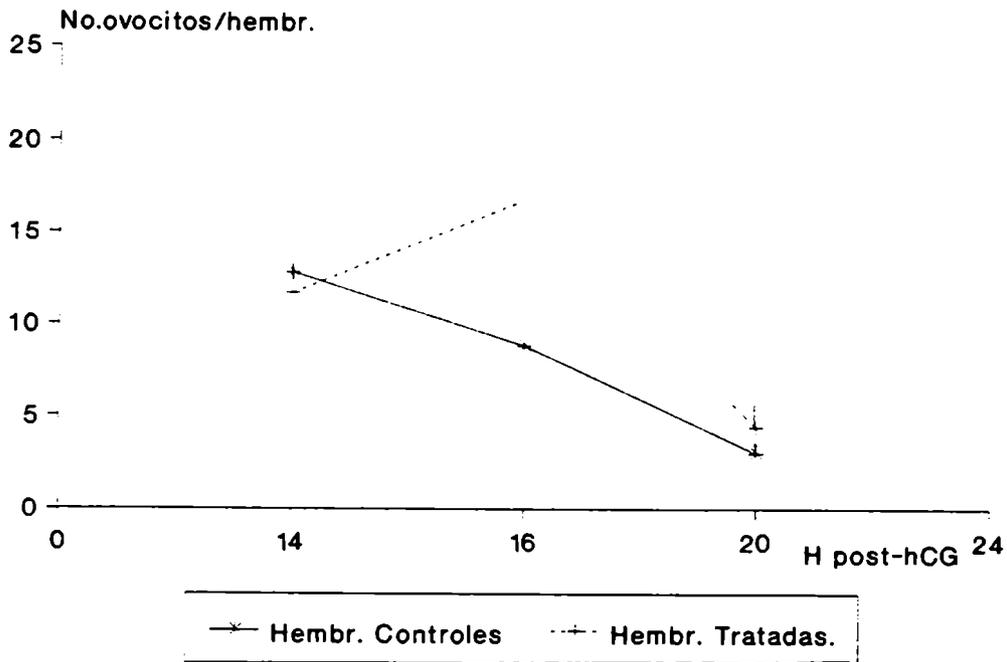
Se prosiguió disminuyendo la concentración de etanol, y finalmente se halló que con 2.5% **no se encontraron diferencias significativas en la cantidad ovulatoria entre las hembras controles y tratadas** (Figura III.10.B).

FIGURA III.8: Número de folículos maduros en los ovarios por hembra.



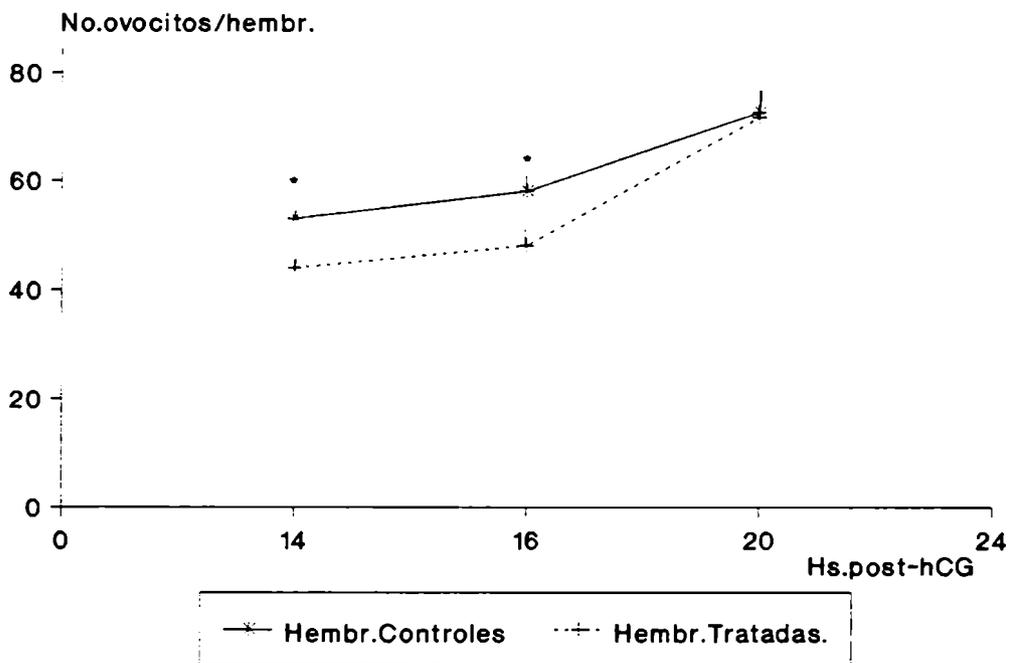
Las hembras controles y tratadas fueron inducidas para ovular al final del tratamiento. A las 14, 16 y 20 hs posthCG, se sacrificaron y los ovarios fueron removidos en medio de cultivo para cuantificar el número folicular bajo microscopio. Se calculó el promedio del número de folículos/hembra. *: $p < 0.05$ (tratadas vs. controles- Test de Student't).

FIGURA III.9.A: Número de ovocitos ováricos por hembra.



A las 14 y 16 hs posthCG, se utilizaron 7 hembras y a las 20 hs, 5 hembras.

FIGURA III.9.B: Número de ovocitos oviductales por hembra.



El número de hembras utilizadas fue el mismo que en la figura III.9.A. *:P<0.05

FIGURA III.10.A Respuesta ovulatoria cuantitativa a las 16 hs posthCG, de hembras tratadas con etanol al 5%.

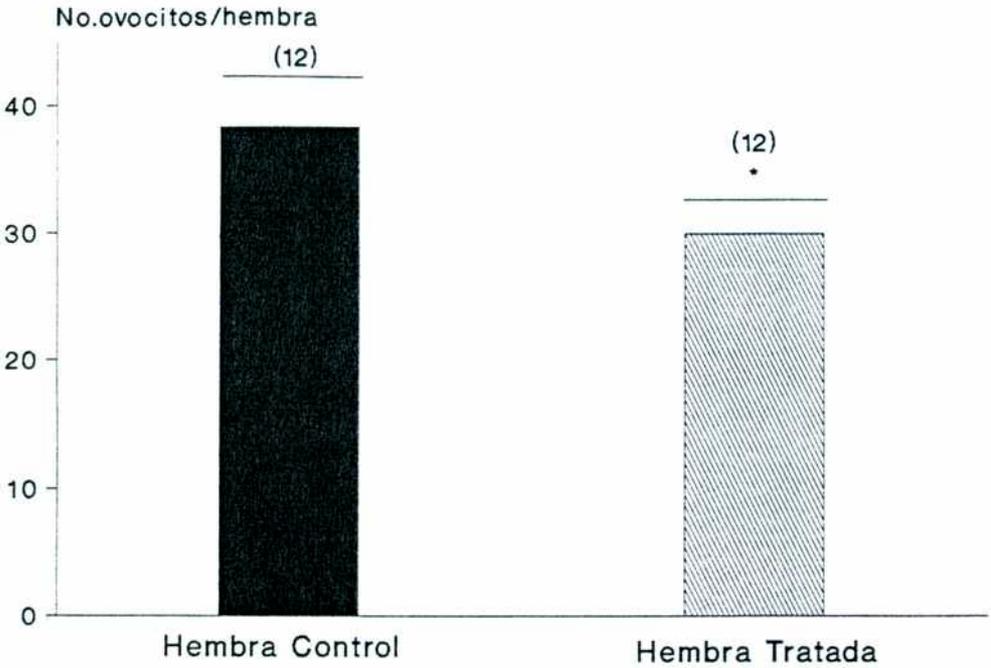
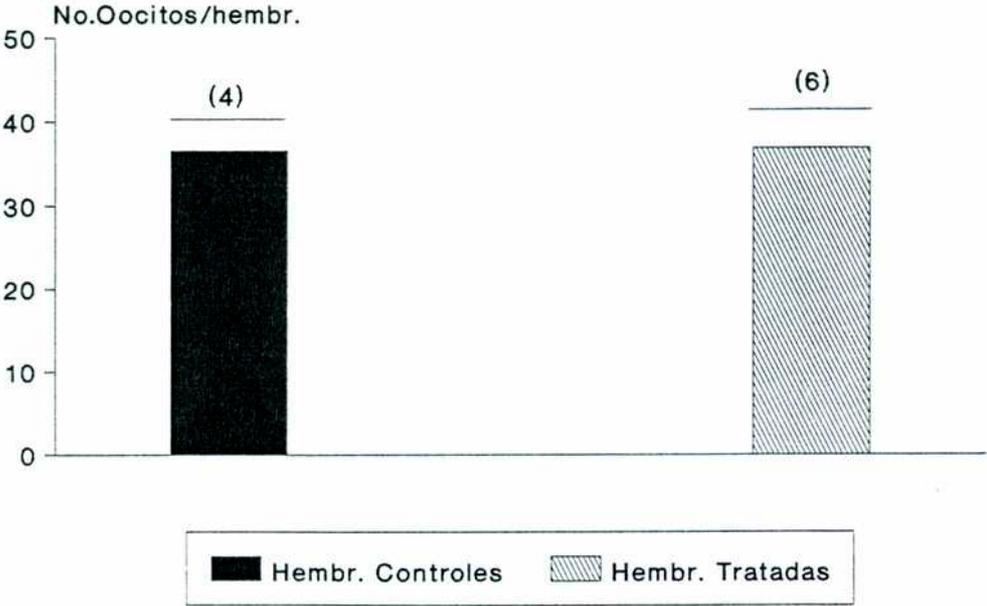


FIGURA III.10.B: Respuesta ovulatoria cuantitativa a las 16 hs posthCG, de hembras tratadas con etanol al 2.5%.



2.1.2. Respuesta cualitativa a la inducción ovulatoria.

Encontradas las tasas ovulatorias disminuídas en las hembras tratadas con concentración moderada y baja de etanol, en forma crónica, a las 16 hs, se postuló que estas alteraciones podrían estar acompañadas de anomalías en los ovocitos recuperados, o por lo menos podrían indicar algún tipo de efecto deletéreo sobre la gameta. Entonces, se estudió esencialmente la calidad citológica en cuanto a la morfología ovocitaria, la calidad del complejo cumulo-ovocito (CCO) representada por la capacidad de síntesis de PGE y los ovocitos contenidos, y eventualmente la tipología nuclear de los ovocitos oviductales.

Los tipos ovocitarios encontrados son mostrados en la figura III.11 y III.12.

A. Consumo de etanol al 10%.

A.1. Calidad de los ovocitos libres.

Cuando los ovocitos ováricos y oviductales se recuperaron a las 14 hs posthCG de las hembras tratadas y controles, se vio que los porcentajes de los tipos de ovocitos ováricos fueron similares entre ambas. Pero en los oviductos de las hembras tratadas se halló mayor porcentaje de ovocitos inmaduros que en las hembras controles ($p < 0.05$), y una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fragmentados y/o necróticos (Tabla III.2) (Figura II.1).

A las 16 hs posthCG, se encontró en el ovario que el porcentaje de ovocitos intactos (morfológicamente normales) en las hembras tratadas estuvo elevado respecto del control ($p < 0.05$), y por lo tanto, aumento que estuvo acompañado de una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos inmaduros. Es decir, los ovocitos que quedan retenidos en los folículos en las hembras controles son mayoritariamente inmaduros, mientras que en las hembras tratadas los ovocitos maduros o intactos son casi la mitad de la población encontrada (Tabla III.3.A). En los oviductos de las hembras tratadas el porcentaje de ovocitos activados espontáneamente (partenogénéticos) fue alto respecto del control ($p < 0.05$), lo cual demostraría una "sobremaduración" de los ovocitos de la hembra tratada. Cuando los ovocitos oviductales libres de las células del cúmulo se incubaron con el fluorocromo Hoechst 33342, se observaron los tipos nucleares que presentaron los ovocitos normales, anormales y activados (con II CP). El porcentaje de ovocitos con placa metafásica anormal, es decir con los cromosomas dispersos en el citoplasma, aunque bajo, se evidenció aumentado en las hembras tratadas comparado con la ausencia en las controles ($p < 0.01$). Estos ovocitos en general fueron anormales morfológicamente. Dentro de los tipos activados, se encontró que los ovocitos con II CP y I

pronúcleo (PN) eran los más corrientes y entonces el porcentaje fue elevado con respecto a los controles ($p < 0.05$) (Tabla III.3.B).

A las 20 hs posthCG, se pudo observar en los ovarios de las hembras tratadas un aumento significativo de ovocitos intactos ($p < 0.01$) y activados ($p < 0.05$) comparando con los de los controles, donde estas variantes fueron nulas ya que la mayoría se mantuvieron inmaduros. Entonces, en las hembras tratadas el porcentaje de inmaduros fue más bajo que en los controles ($p < 0.05$). Apoyando estas observaciones, en los oviductos de las hembras tratadas se encontró alta cantidad de ovocitos activados respecto de los controles ($p < 0.05$) (Tabla III.4).

A.2. Calidad del complejo cúmulo-ovocitario (CCO).

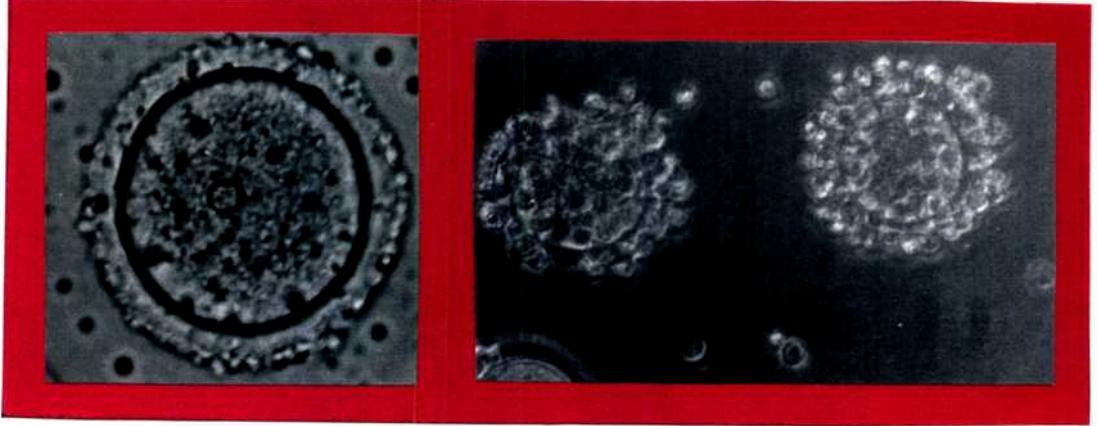
Los CCOs se recuperaron de las ampollas oviductales a las 16 hs posthCG, por punción en medio de cultivo, para llevar a cabo dos estudios: a) calidad de los ovocitos contenidos luego de 6 hs de incubación del complejo entero en estufa de cultivo, b) capacidad de síntesis de PGE por el complejo entero, al momento de su recuperación (16 hs posthCG).

a). Calidad de los ovocitos del CCO (Tabla III.5).

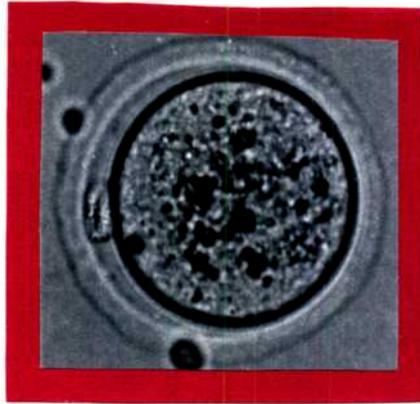
A fin de conocer si los ovocitos contenidos en la masa de células de la granulosa del complejo CCO sufrían algún tipo de alteración citológica luego de permanecer en cultivo 5-6 hs (sin las influencias de factores oviductales), y suponiendo que las células del cúmulo pudieran estar afectadas por el tratamiento en cuanto a la regulación que ejercen sobre la maduración de los ovocitos, los CCO recuperados de cada hembra se incubaron en estufa de cultivo. Luego, los ovocitos sin las células del cúmulo y lavados fueron observados y clasificados como antes. Se encontró que el porcentaje de ovocitos intactos en las hembras tratadas se redujo ampliamente ($p < 0.001$) comparándolo con el de las hembras controles, debido a que la mayoría de los ovocitos parecen haberse activado espontáneamente y otros fragmentado ($p < 0.001$ y $p < 0.05$), comparando con los controles donde estos permanecieron en valores semejantes a los encontrados a las 20 hs posthCG.

FIGURA III.11: Morfología celular de los ovocitos.

1- INMADURO (VG)



2- INTACTO NORMAL



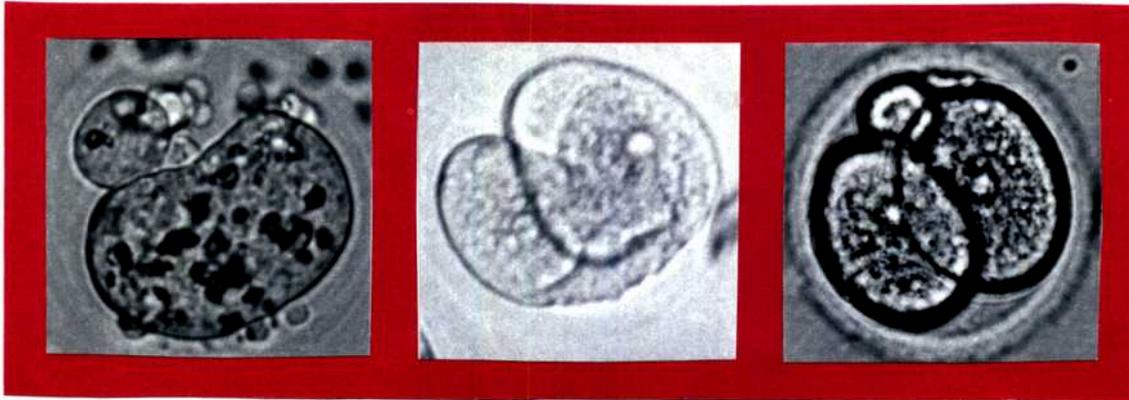
3- INTACTO ANORMAL



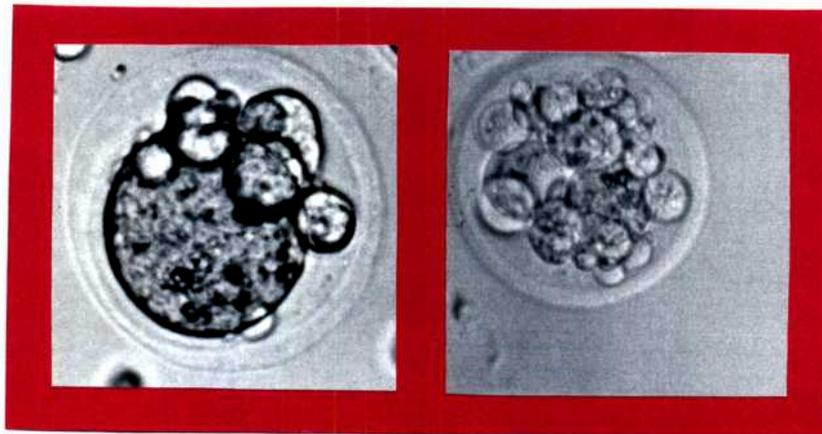
4- ACTIVADO



5- EMBRION DE 2 CELULAS DE CLIVAJE INMEDIATO



6- FRAGMENTADOS



7- NECROTICOS

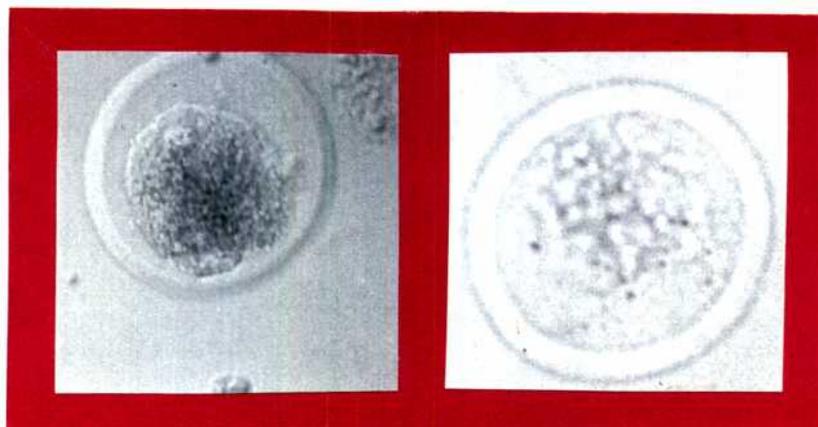
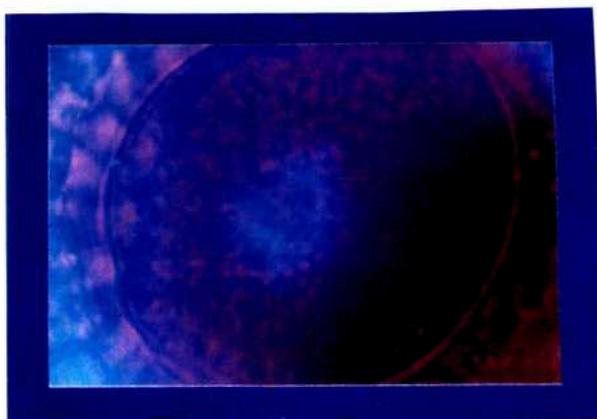
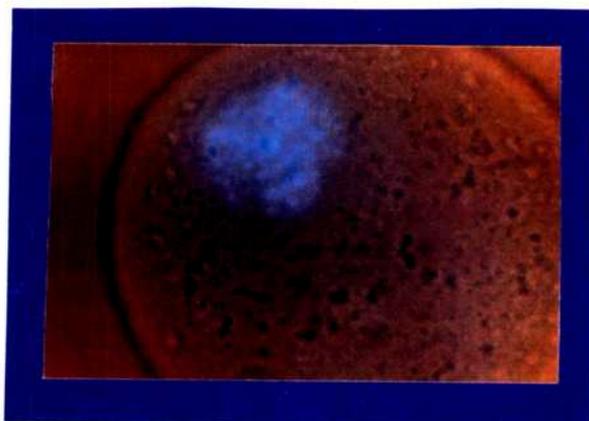


FIGURA III.12: Morfología nuclear.

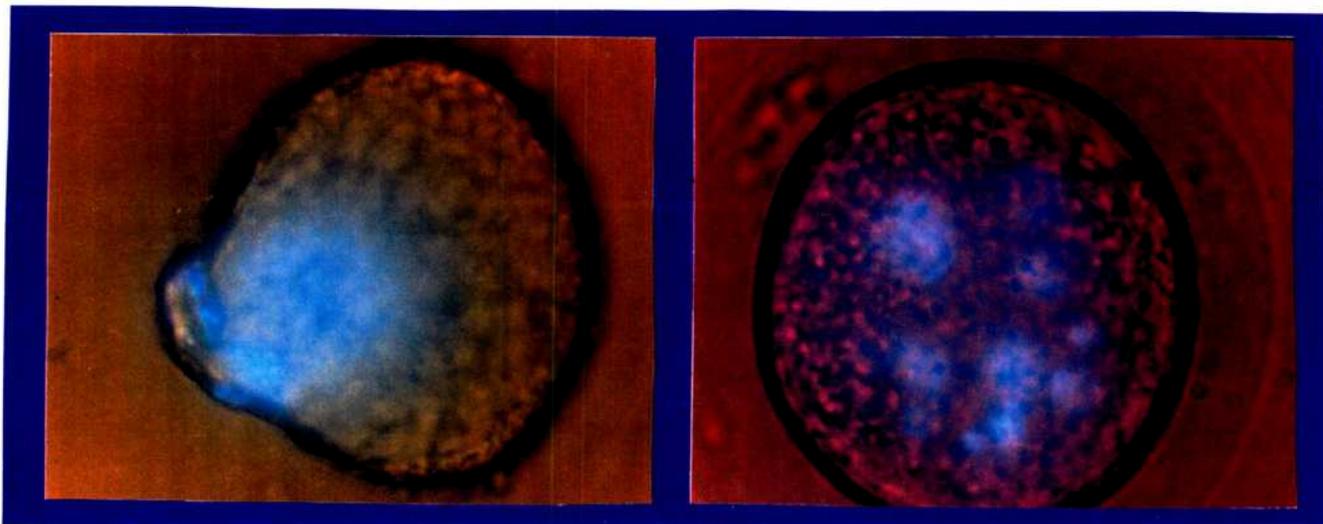
1- INMADURO (VG).



2- PLACA METAFASICA NORMAL
(Metafase II)

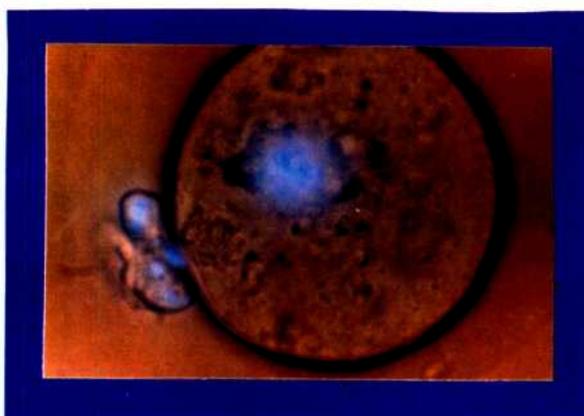


3- PLACA METASICA ANORMAL

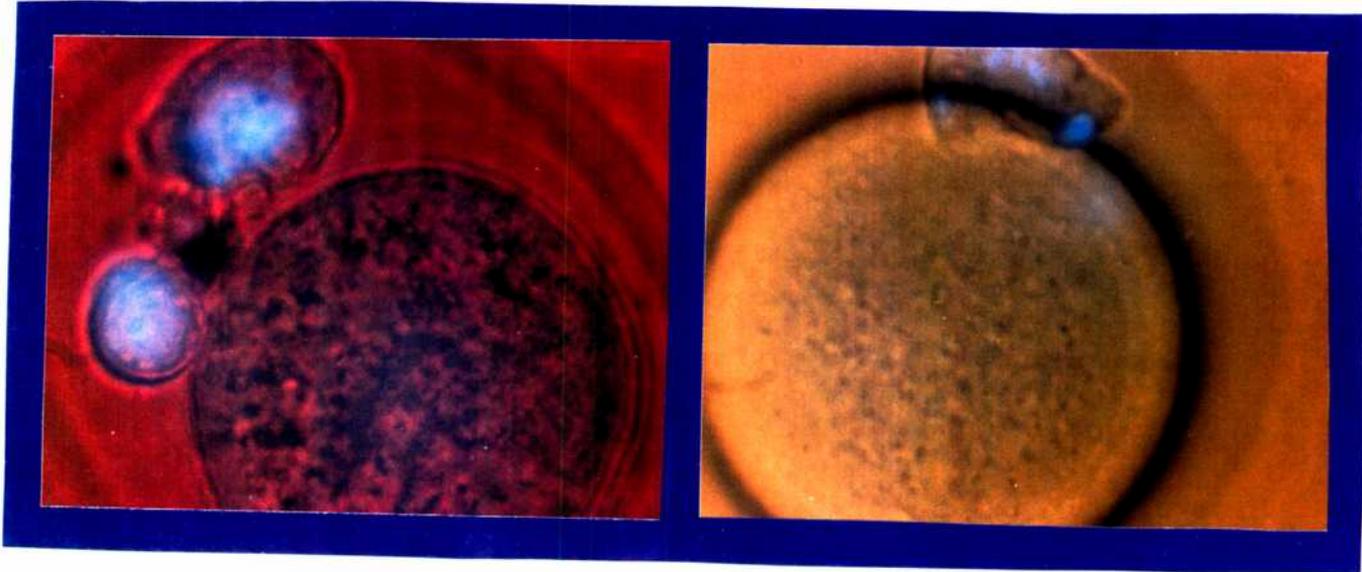


4- ACTIVADOS:

1- II CP + 1 PN (pronuclear).



2. II CP + 0 PN (anucleado).



3. 0 PN + 1 PN (diploidizado).

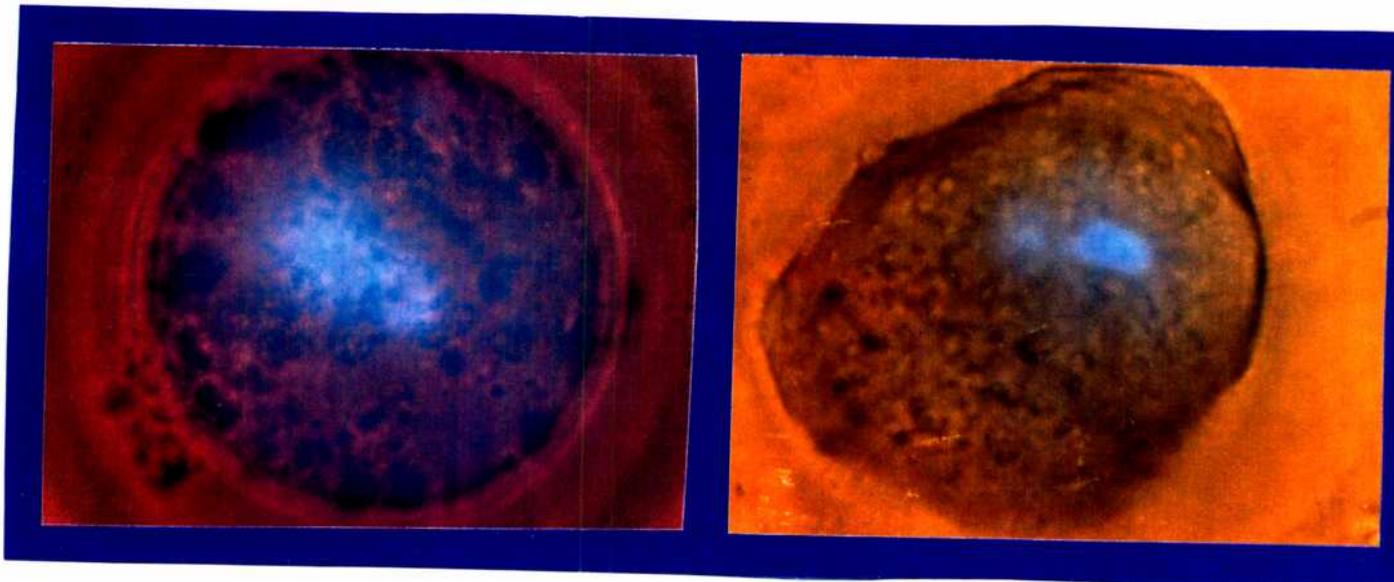


TABLA III.2: Calidad de los ovocitos libres a las 14 hs posthCG. Etanol al 10%.

	OVARIOS		OVIDUCTOS	
	Hemb.Contr.	Hemb.Trat.	Hemb.Cont.	Hemb.Trat.
N	5	5	5	5
Intactos	6.8±2.4	11.8±7.8	69.7±4.6	62.6±4.9
Anormales	8.2±2.9	3.7±1.8	2.4±1.5	3.6±1.5
Activados	6.1±4.6	6.3±2.4	17.0±3.8	18.8±2.5
Fragm./Mu		3.8±3.7	7.1±1.5	3.8±0.5 *
Inmaduros	78.7±8.8	72.1±11.0	3.2±1.5	10.3±3.4 *

Luego de la administración de etanol al 10% durante 30 días, las hembras fueron superovuladas y sacrificadas a las 14 hs posthCG. Los folículos maduros se punzaron y los ovocitos se recuperaron, para ser observados en microscopía de contraste de fase. Se clasificaron en: intactos (ovocitos normales maduros), anormales (con morfología citológica alterada), activados (con segundo cuerpo polar, o embriones de 2 células de clivaje inmediato), fragmentados/muertos, inmaduros (presencia de vesícula germinal). Los porcentajes y errores (SEM) fueron calculados con el total de ovocitos recuperados por hembra (N: número de animales utilizados).

Hemb.C.: hembra control. Trat. : tratada.

*: $p < 0.05$ (test de Student't).

TABLA III.3: Calidad de los ovocitos libres a las 16 hs posthCG. Etanol al 10%

III.3.A. Morfología citológica.

	Ovarios		Oviductos	
	Hembras Control	Hembras Tratadas	Hembras Control	Hembras Tratadas
N	7	7	7	7
Intactos	9.8 ± 6.4	37.0 ± 8.5 *	77.8 ± 3.0	76.9 ± 2.1
Anormales	3.2 ± 3.2	2.8 ± 2.8	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.4
Activados	4.7 ± 3.9	11.5 ± 5.6	10.1 ± 1.5	13.6 ± 1.3*
Fragm/Muertos	5.5 ± 4.6	7.8 ± 2.4	7.4 ± 1.6	6.1 ± 2.0
Inmaduros	71.4 ± 12.2	40.2 ± 11.0*	3.4 ± 1.3	2.6 ± 0.6

Los ovocitos recuperados a las 16 hs posthCG, de las hembras controles y tratadas fueron observados bajo microscopio invertido y clasificados como antes (detalle en la tabla III.2).

*: $p < 0.05$, test de Student's.

TABLA III.3 : Calidad de los ovocitos libres a las 16 hs posthCG

III.3:B: Morfología Nuclear

Hembras			
Citológico	Nuclear		
		controles	tratadas
Intactos y anormales	placa metafásica normal (MII)	78.9 ± 3.5	76.2 ± 4.4
	placa metafásica anormal	0	1.5 ± 0.3 **
Activados	IIICP + 1PN	7.1 ± 1.0	10.6 ± 1.4 *
	MIII	1.8 ± 1.2	1.7 ± 0.8
	IIICP + 0PN	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.8
	2 células (CI)	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.4

Los ovocitos libres de las células de la granulosa, provenientes de CCOs recuperados a las 16 hs posthCG de los oviductos, se incubaron en medio con el fluorocromo vital Hoechst 33342 durante 1 h en estufa de cultivo, para ser observados bajo microscopía de fluorescencia. Como fue descrito en M y M, los ovocitos intactos y anormales (deformados) podían presentar placa metafásica normal (M II: metafase II) o placa anormal o cromosomas dispersos en el citoplasma. Los tipos nucleares de los activados fueron: de segundo cuerpo polar + 1 pronúcleo (PN), metafase III: (MIII) y con II CP, segundo cuerpo polar anucleado (OPN) o con cromosomas dispersos, embrión de clivaje inmediato (CI). Se utilizaron 6 hembras controles y 7 tratadas.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test de Student't.

TABLA III.4: Calidad de los ovocitos libres a las 20 hs posthCG. Etanol al 10%.

	Ovarios		Oviductos	
	Hembras Control	Hembras Tratadas	Hembras Control	Hembras Tratadas
N	5	5	5	5
Intactos		23.6 ± 6.8 **	75.0 ± 1.8	78.2 ± 2.9
Anormales	6.6 ± 6.0		0.5 ± 0.5	
Activados		13.0 ± 5.3*	11.7 ± 1.5	18.9 ± 2.4 *
Fragm/Muertos			11.2 ± 2.8	7.3 ± 1.4
Inmaduros	93.3 ± 6.6	63.3 ± 10.0 *	0.5 ± 0.5	

Los ovocitos recuperados del CCO a las 20 hs posthCG se clasificaron bajo microscopía como ya fue indicado.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test de Student't.

TABLA III.5: Calidad del complejo cúmulo-ovocitario. Etanol al 10%.

a. Calidad de los ovocitos.

	Hembras controles	Hembras tratadas
N	6	6
Intactos	84.5 ± 4.2	38.9 ± 6.6 ***
Activados	7.7 ± 2.1	36.5 ± 2.9 ***
Fragm./Mu.	7.6 ± 3.0	24.5 ± 5.8 *

Las hembras fueron sacrificadas a las 16 hs posthCG, y los CCO de los oviductos fueron recuperados y colocados en medio de cultivo, para ser incubados por 5-6 hs en estufa gaseada. Luego las células de la granulosa se dispersaron con hialuronidasa y los ovocitos libres lavados se observaron bajo microscopio de contraste de fase. Se clasificaron como fue descripto antes.

N: número de hembras utilizado.

***: $p < 0.001$, *: $p < 0.01$, Test de Student't.

b). Capacidad de síntesis de prostaglandina E (Figura III.13).

Se ha propuesto al valor de síntesis de PGE como indicador de la calidad del complejo cúmulo-ovocitos. Por tal motivo se ha medido la PGE de los CCOs en el medio de incubación. Se ha encontrado que los CCOs de las hembras tratadas tienen la capacidad de síntesis de PGE disminuída respecto de las controles ($p < 0.01$).

Estos resultados estarían indicando que el tratamiento con etanol al 10% puede afectar la fisiología de las células de la granulosa del complejo y por ende la regulación de la calidad ovocitaria.

B. Consumo de etanol al 5%.

Se analizó la calidad de los ovocitos oviductales en las hembras tratadas con etanol al 5% sólo a las 16 hs posthCG. Se tomó como antecedente la aparición de alteraciones en la cantidad ovulatoria de las hembras tratadas con 10% de etanol en ese mismo horario, teniendo en cuenta que el número ovocitario de los oviductos es indicador de la cantidad retenida en los ovarios.

B.1. Calidad de los ovocitos libres.

De las hembras sacrificadas a las 16 hs posthCG, se extrajeron los oviductos, para recolectar los CCOs de las ampollas en medio de cultivo. Luego de dispersar las células de la granulosa, se encontró que había un alto porcentaje de ovocitos activados partenogenéticamente en las hembras tratadas respecto de las controles, en detrimento de la cantidad de inmaduros ($p < 0.05$) (tabla III.6.A). Además, aumentó el porcentaje de ovocitos anormales comparando con las hembras controles. Cuando se revisó la morfología nuclear de los ovocitos aislados, se encontró que una alta tasa de ovocitos anucleados (II CP + 0PN) y embriones de 2 células de clivaje inmediato eran evidentes en las hembras tratadas ($p < 0.05$), comparando con los porcentajes de las controles (Tabla III.6.B).

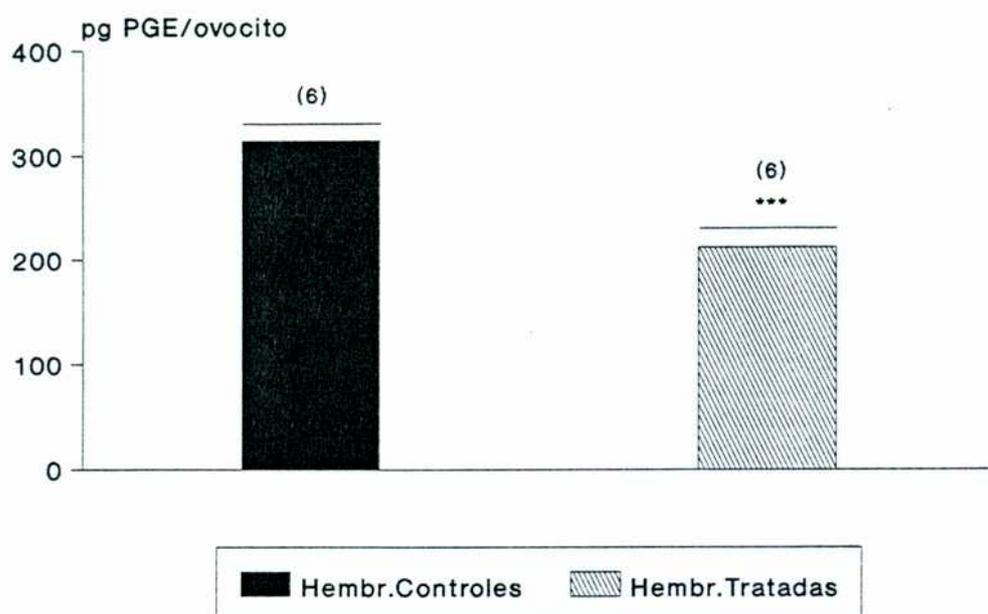
B.2. Calidad del complejo cúmulo-ovocitos.

a). Calidad de los ovocitos del CCO.

Cuando los ovocitos estuvieron con las células del cúmulo en cultivo por 5 hs, se encontró que las hembras tratadas con 5% de etanol, tenían alto porcentaje de ovocitos fragmentados ($p < 0.01$) respecto del control, los que justifica el descenso en la cantidad de intactos y la similitud en el porcentaje de activados con el control (tabla III.7).

FIGURA III.13: Calidad del complejo cúmulo-ovocitario. Etanol al 10%.

b). Capacidad de síntesis de PGE.



Los CCOs de las hembras recuperados a las 16 hs se incubaron por 1 h en medio Krebs para medir la síntesis y liberación de PGE en el medio de incubación por RIA. Se cuantificó la cantidad de PGE en pg por ovocito, ya que el número de ovocitos contenido en el cúmulo es indicador de su tamaño.

***: $p < 0.001$.

TABLA III.6: Calidad de los ovocitos libres a las 16 hs posthCG. Etanol al 5%.

III.6.A: Morfología citológica.

	OVIDUCTO	
	Hembras Controles	Hembras Tratadas
N	6	5
Intactos	77.8 ± 4.5	67.4 ± 9
Anormales	0.8 ± 0.7	4.5 ± 1.7 *
Activados	9.6 ± 1.3	18.4 ± 4.5 *
Fragm./Mu	7.3 ± 2.6	8.9 ± 5.7
Inmaduros	4.6 ± 1.5	0.6 ± 0.6 *

Las hembras se sacrificaron a las 16 hs posthCG y los ovocitos oviductales fueron recuperados y observados bajo microscopía de contraste de fase. Se clasificaron como antes.

*: $p < 0.05$, Test de Student't.

Es decir, si los ovocitos de las hembras tratadas permanecían con las células del cúmulo in vitro por varias horas, la calidad ovocitaria también es alterada: el % de activados disminuye debido a que la cantidad de fragmentados se eleva.

b). Capacidad de síntesis de PGE (Figura III.14).

Como se ve en la figura, la cantidad de PGE sintetizada por los CCOs de las hembras tratadas fue elevada significativa-mente respecto de la de las controles.

C. Consumo de etanol al 2.5%

Cuando las hembras se trataron con etanol al 2.5%, y se procedió de la misma manera para analizar los ovocitos recuperados de los oviductos, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los tipos morfológicos y nucleares clasificados, comparando con los controles (datos no mostrados).

Los resultados hasta aquí presentados, indicarían que existe un límite inferior para la concentración de etanol, consumido crónicamente en forma de bebida, que puede producir efectos deletéreos en la tasa ovulatoria y en la calidad del ovocito (morfológica y nuclear). La concentración mínima tóxica para el ratón hembra es del 5% de etanol, administrado durante 30 días y comenzando la ingesta en edad prepuberal.

2.2. Respuesta ovulatoria en el consumo de corto término. Efectos comparativos.

Debido a que se indujo la ovulación dentro de los últimos días del tratamiento crónico, se pensó que ese rango de tiempo de consumo (desde el día 27 al 30) sería el que ejerciera los efectos deletéreos y que las alteraciones encontradas anteriormente se deberían específicamente a la acción del etanol consumido en ese plazo. Es decir, que los efectos se debieran al consumo de etanol en los momentos de la ovulación y no a la ingesta de largo término.

Como se encontró que la concentración de etanol al 5% administrada crónicamente a hembras que eran prepúberes al comienzo del tratamiento, producía alteraciones en la ovulación y era capaz de activar los ovocitos, analizados a los 30 días de ingesta, se procedió a tratar en forma subcrónica a las hembras con la dosis del 5%.

TABLA III.6: Calidad de los ovocitos libres a las 16 hs posthCG. Etanol al 5%.

III.6.B: Morfología nuclear.

Hembras			
Citológico	Nuclear	controles	tratadas
Intactos y anormales	placa metafásica normal (MII)	78.6 ± 4.5	71.1 ± 5.0
	placa metafásica anormal	0	0.75 ± 0.6
Activados	IICP + 1PN	6.2 ± 1.0	4.3 ± 2.5
	MIII	1.8 ± 1.2	2.2 ± 1.3
	IICP + 0PN	1.2 ± 1.2	7.6 ± 2.3 *
	2 células (CI)	0.4 ± 0.4	4.2 ± 1.8 *

Los ovocitos libres fueron incubados con Hoechst 33342 por una h en estufa de cultivo, y luego montados para ser observados bajo microscopía de fluorescencia. Los normales y anormales morfológicamente pudieron contener placa metafásica normal (metafase II: M II) o placa anormal. Los activados pudieron ser también de varios tipos, como se indicó en la figura II.2. Se analizaron 6 hembras controles y 4 tratadas.

*: $p < 0.05$, test de Student't.

TABLA III.7: Calidad del complejo cúmulo-ovocitario.

a). Calidad de los ovocitos.

	Hembras Controles	Hembras Tratadas.
N	6	5
Intactos	86.5 ± 2.6	74.8 ± 1.9 **
Activados	9.8 ± 1.8	14.2 ± 2.6
Fragm./Mu.	3.4 ± 1.2	11.0 ± 2.5 **

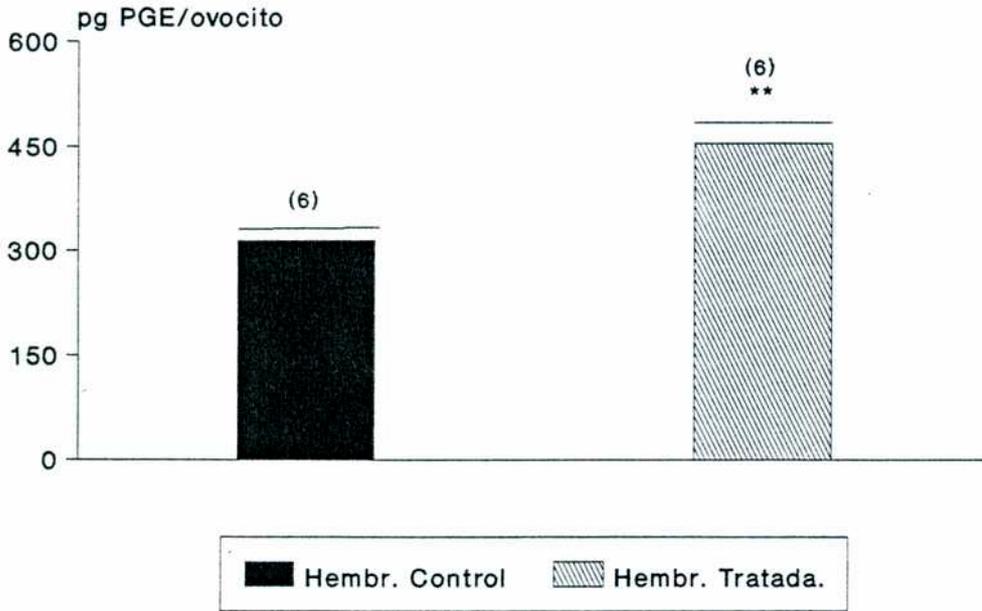
Los ovocitos del complejo cúmulo-ovocitario fueron analizados luego que éste fue incubado en estufa de cultivo por 5 hs.

N: número de hembras utilizado

** : $p < 0.01$, test de Student't.

FIGURA III.14: Calidad del complejo cúmulo-ovocitario.

b). Capacidad de síntesis de PGE.



Los CCOs de las hembras recuperados a las 16 hs se incubaron por 1 h en medio Krebs para medir la síntesis y liberación de PGE en el medio de incubación por RIA. Se cuantificó la cantidad de PGE en pg por ovocito. **: $p < 0.01$ (test de Student 't')

Entonces, se tomaron hembras adultas (de 60 días) para homologar a la edad alcanzada al cabo del tratamiento crónico. El tratamiento comenzó a la mañana cuando se suministró la bebida con etanol al 5%. A las 18:00 hs se indujo la ovulación con PMSG y 48 hs más tarde con hCG. A las 16 hs posthCG, se sacrificaron los animales, de tal manera que éstas consumieron etanol por 72 hs (subcrónico). Los ovarios y oviductos se recuperaron, para analizar los parámetros de ovulación y calidad ovocitaria.

A. Tasa ovulatoria.

En la figura III.15 se muestra que la cantidad de folículos maduros sin ovular está elevado en las hembras tratadas respecto de las controles ($p < 0.05$). También, cuando se analizó la cantidad de ovocitos oviductales se vio que estaba significativamente disminuída en las tratadas, ya que se retuvieron muchos en los folículos maduros no ovulados, comparando con la cantidad de las controles (figura III.16).

B. Calidad ovocitaria.

El tratamiento de corto término produjo altos porcentajes de activación espontánea y fragmentación en los ovocitos de las hembras tratadas, por lo cual resultó baja la cantidad de ovocitos intactos, en el oviducto (Tabla III.8), comparando con los controles. Y también, se evidenció activación ovocitaria elevada en los ovarios ($p < 0.05$) de las hembras tratadas.

Estos resultados sugirieron que la presencia del etanol durante 72 hs y mientras la ovulación es inducida, puede afectar la cantidad y calidad de ovocitos, y que también podría ser crítico el tiempo y período de consumo de etanol.

FIGURA III.15: Folículos maduros a las 16 hs posthCG en hembras tratadas con etanol al 5% en forma subcrónica.

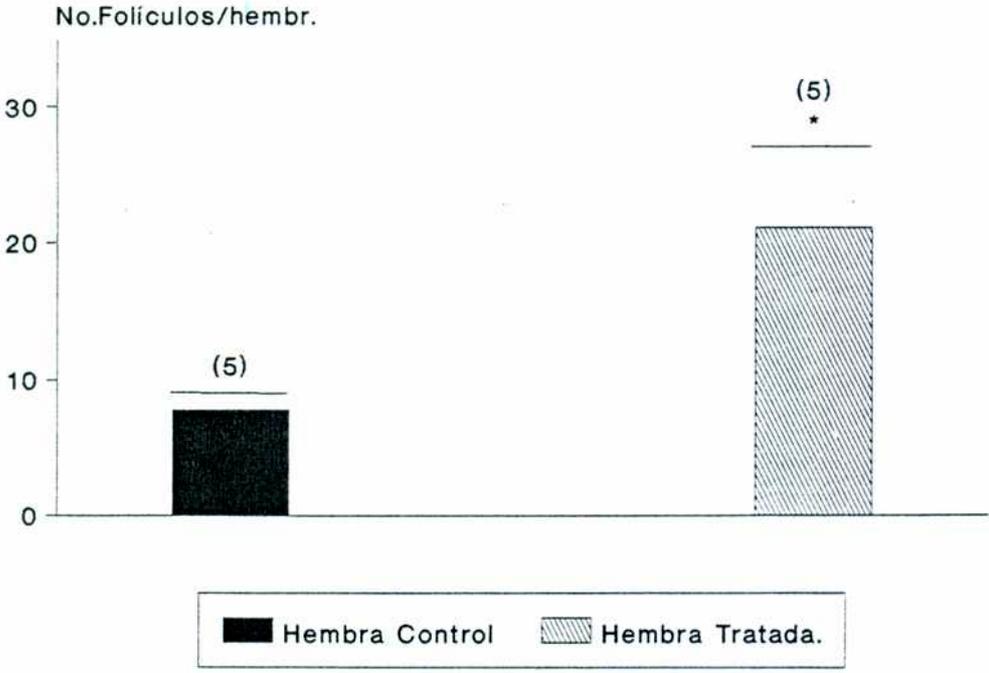


FIGURA III.16: Cantidad ovocitaria ovárica y oviductal de hembras tratadas con etanol al 5% en forma subcrónica

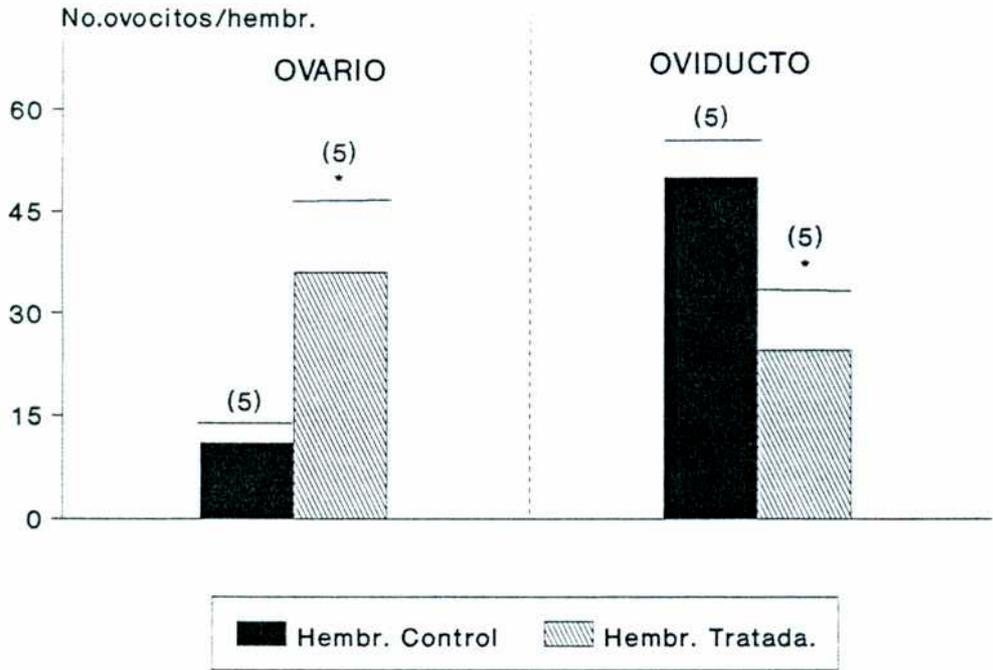


TABLA III.8: Calidad de los ovocitos ovaricos y oviductales de hembras tratadas con 5% de etanol en forma subcrónica.

	OVARIOS		OVIDUCTOS	
	Hembras Control	Hembras Tratadas	Hembras Control	Hembras Tratadas
N	5	5	5	5
Intactos	10.6 ± 7.4	11.6 ± 5.0	76.8 ± 3.7	44.8 ± 9.1**
Anormales	8.0 ± 5.1	7.9 ± 2.9	1.60 ± 0.6	5.70 ± 3.3
Activados	2.60 ± 1.6	14.3 ± 4.6*	10.9 ± 1.6	32.0 ± 10*
Frag/Muertos	4.20 ± 4.2	12.3 ± 5.5	6.80 ± 1.4	15.4 ± 4.40*
Inmaduros	74.4 ± 8.0	53.7 ± 7.5*	3.70 ± 2.3	1.80 ± 1.80

Los ovocitos recuperados de los folículos maduros no ovulados y los de las ampollas oviductales fueron analizados bajo microscopía de contraste de fase, y clasificados y contados como antes.

N: número de hembras utilizadas

** : p<0.01, * : p<0.05, Test de Student't.

. Conclusiones Parciales: gameta femenina.

- La tasa de ovulación de las hembras tratadas con etanol al 10% fue reducida a las 16 hs posthCG porque se produjo retraso en la maduración folicular y en la ruptura de los folículos maduros.
- La tasa de ovulación a las 16 hs posthCG de las hembras tratadas con etanol al 5% resultó disminuída, siendo esta dosis la mínima que produjo alteración en la cantidad ovulatoria.
- El consumo de etanol al 10%, produjo sobremaduración ovocitaria, evidenciada por altas tasas de activación partenogenética (II CP + 1PN), además, de incrementar la tasa de fragmentación a las 20 hs posthCG. Los ovocitos intactos de las 16 hs posthCG tuvieron placa metafásica anormal. La síntesis de PGE por el CCO fue reducida comparando con el control.
- El consumo de etanol al 5% produjo alta tasa de activación partenogenética, siendo estos anucleados con II CP y embriones de 2 células de clivaje inmediato. La cantidad de PGE sintetizada por el CCO fue incrementada comparando con el control.
- El consumo subcrónico de etanol al 5% (72 hs) produjo alteraciones en la tasa ovulatoria (disminuída) y incrementos mayores de la cantidad de ovocitos activados que en los tratamientos crónico. El consumo subcrónico de etanol en el período periovulatorio parece ser más severo en cuanto a los efectos tóxicos sobre la gameta femenina.

3- GAMETA MASCULINA

Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol en machos adultos.

Algunos estudios previos analizaron los efectos del consumo crónico de etanol sobre ratones machos desde el comienzo de la pubertad, viéndose que la ingesta prolongada afectaba la maduración sexual y la función reproductiva. Entonces, se evaluaron parámetros de la fisiología espermática en machos que fueron adultos al comienzo del tratamiento. También, de modo comparativo, se utilizaron las concentraciones de etanol al 10 y 5 % en el agua de bebida administradas durante 30 días.

3.1 Concentración espermática del epididimo.

Cuando los animales fueron tratados con 10% de etanol, el contenido espermático del cauda no fue afectado por el tratamiento, comparando con los machos controles (Figura III.17.A). Cuando se utilizó 5% de etanol como tratamiento, se analizó la concentración espermática en la cabeza, cuerpo y cola epididimarios, de modo de verificar la falta de efecto con la dosis mayor. No se hallaron entonces, diferencias significativas entre los animales tratados y controles (Figura III.17.B).

3.2. Morfología espermática.

No se encontraron alteraciones en la calidad de los espermatozoides de los machos tratados respecto de los controles, en cuanto a malformaciones de cabeza, cuello o cola, con ambos tratamientos (datos no mostrados).

3.3. Motilidad espermática epididimaria.

La figura III.18.A y B muestran que ninguna dosis de etanol administrada a los machos pudo disminuir el porcentaje de motilidad espermática caudal. Sin embargo, con 5% de etanol los machos tratados manifestaron motilidad reducida en la cabeza epididimaria respecto de los controles (III.18.B).

FIGURA III.17.A: Concentración espermática en el cauda de machos tratados con 10% de etanol

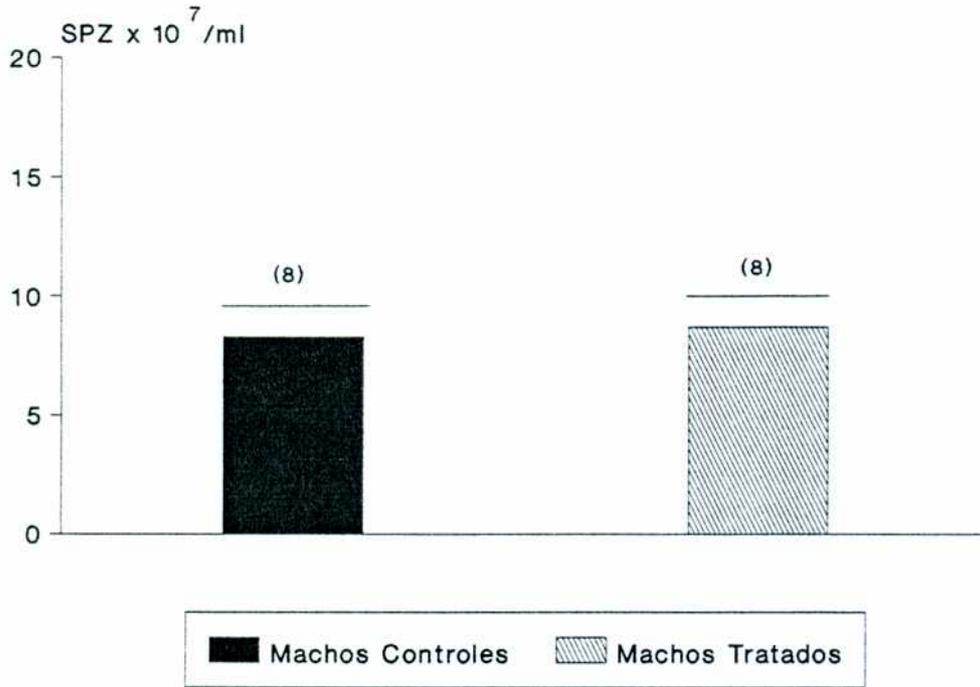


FIGURA III.17.B: Concentración espermática en el epididimo de machos tratados con 5% de etanol

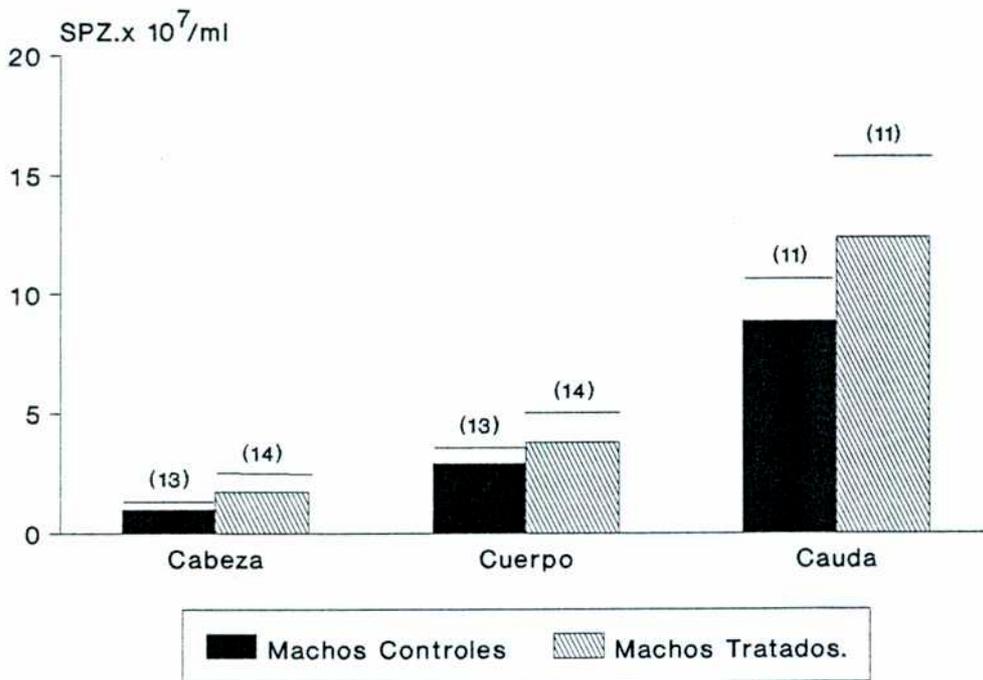


FIGURA III.18.A: Motilidad espermática en el cauda de machos tratados con 10% de etanol

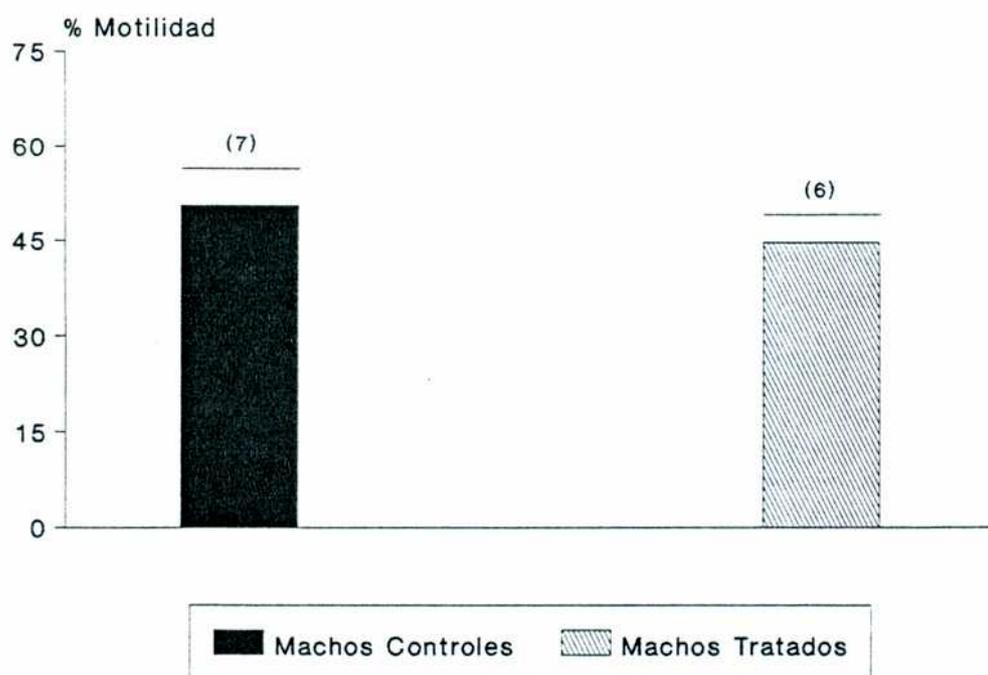
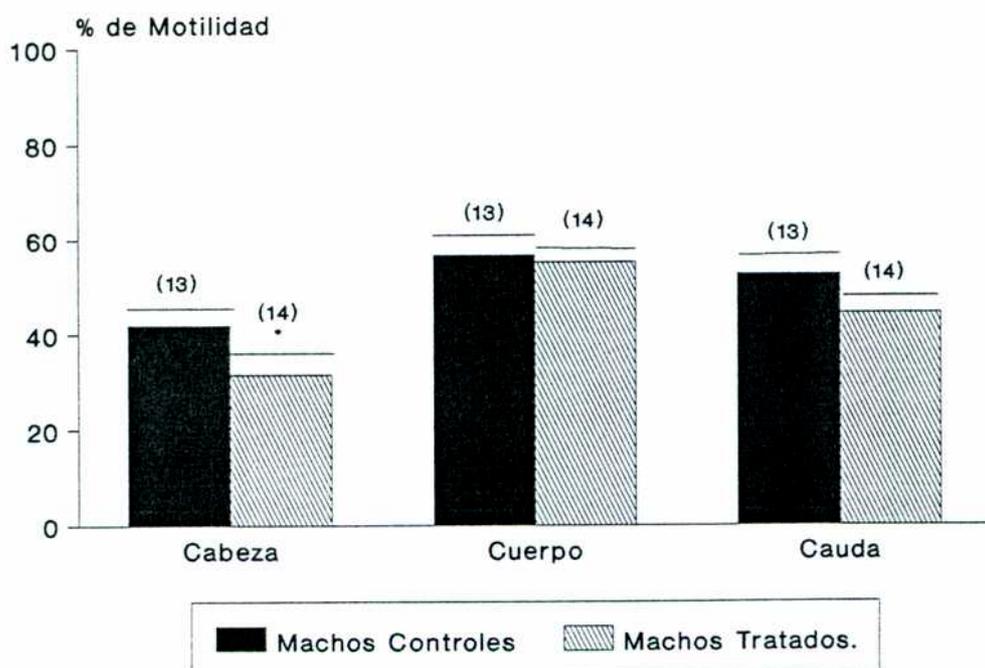


FIGURA III.18.B: Motilidad espermática del cauda de machos tratados con 5% de etanol.



. Conclusiones Parciales: gameta masculina

. Estos resultados sugieren que el consumo moderado y bajo de etanol en forma crónica, no altera de modo importante o significativo los parámetros de concentración y motilidad espermática en el epididimo.

. Estos datos no anularían otros estudios ya que puede existir la posibilidad de que se evidencien alteraciones en la fisiología espermática relacionada con la capacitación y la fecundación en otro sistema de incubación (a menores concentraciones espermáticas).

4- FECUNDACION

Efecto del consumo crónico moderado y bajo de etanol en hembras inmaduras y machos adultos.

Debido a que los resultados encontrados sugirieron que el consumo crónico con 10 y 5% de etanol produce alteraciones en la calidad de los ovocitos, cuando las hembras ingerían alcohol desde la edad prepuberal, se propuso que la tasa de fecundación estaría afectada por los tratamientos. Tampoco se sabía si los porcentajes de fecundidad podían ser reducidos en forma significativa, dependiendo de la dosis empleada. Entonces, se evaluó si estas alteraciones ovocitarias representaban alguna barrera para ser fecundados, o si la calidad ovocitaria postinseminación estaba afectada posteriormente a la interacción gamética. Además, se analizó en el sistema de capacitación *in vitro*, como parte del proceso de fecundación, si algunas funciones espermáticas estaban modificadas.

4.1. Fecundación *in vitro*.

4.2.1. Capacitación *in vitro*.

La motilidad espermática, la reacción acrosomal en especial, además de la concentración de inseminación, la viabilidad y factores espermáticos, se sabe que son parámetros importantes que intervienen en el proceso de fecundación del ovocito. Nos hemos propuesto el estudio de algunos de estos eventos como parte de la etapa de capacitación *in vitro*. Determinamos los efectos de la ingesta de etanol al 5 y 10% sobre las funciones espermáticas.

4.2.1.a. Motilidad.

Los espermatozoides se incubaron en MF, en estufa y se evaluó a los 60 y 120 min la motilidad e hiperactivación espermática. El número de animales utilizados se muestra en cada figura.

A. Consumo de etanol al 10% (Figura III.19).

Se pudo observar que la motilidad general y los porcentajes de hiperactivación (que fue aumentando con el tiempo) fueron similares entre los machos controles y los tratados (Fig.19.A y B).

B. Consumo de etanol al 5% (Figura III.20).

También en este caso, los valores de motilidad e hiperactivación no variaron en los machos tratados respecto de los controles (Fig. A y B).

4.2.1.b. Reacción acrosomal (Figura III.21).

Del mismo sistema de incubación se tomaron alícuotas de la suspensión para medir la reacción acrosomal espontánea.

A. Consumo de etanol al 10% (21.A).

El porcentaje de espermatozoides reaccionados vivos en los machos tratados fue similar al de los controles a pesar que al tiempo 0 min se detectó un incremento significativo en el porcentaje de reaccionados, respecto del control.

B. Consumo de etanol al 5% (21.B).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los animales controles y tratados.

4.2.1.c. Vitalidad y viabilidad (Figura III.22).

A. Consumo de etanol al 10% (22.A).

El porcentaje de espermatozoides vivos (vitalidad) en los machos controles fue alrededor del 60%, manteniéndose estos valores a lo largo de 240 min (viabilidad por 240 min). Se pudo observar que los machos tratados tuvieron semejantes valores de vitalidad en los primeros tiempos de incubación, pero luego caen en forma significativa en los últimos (180 y 240 min) respecto de los controles. Entonces, la viabilidad fue menor para los tratados.

B. Consumo de etanol al 5% (22.B).

Cuando se administró menor concentración de etanol, la vitalidad espermática de los machos tratados se mantuvo semejante a la de los controles hasta los 180 min, pero luego se observó una reducción significativa en la cantidad de espermatozoides vivos (240 min).

FIGURA III.19.A: Motilidad espermática en los machos tratados con etanol al 10%.

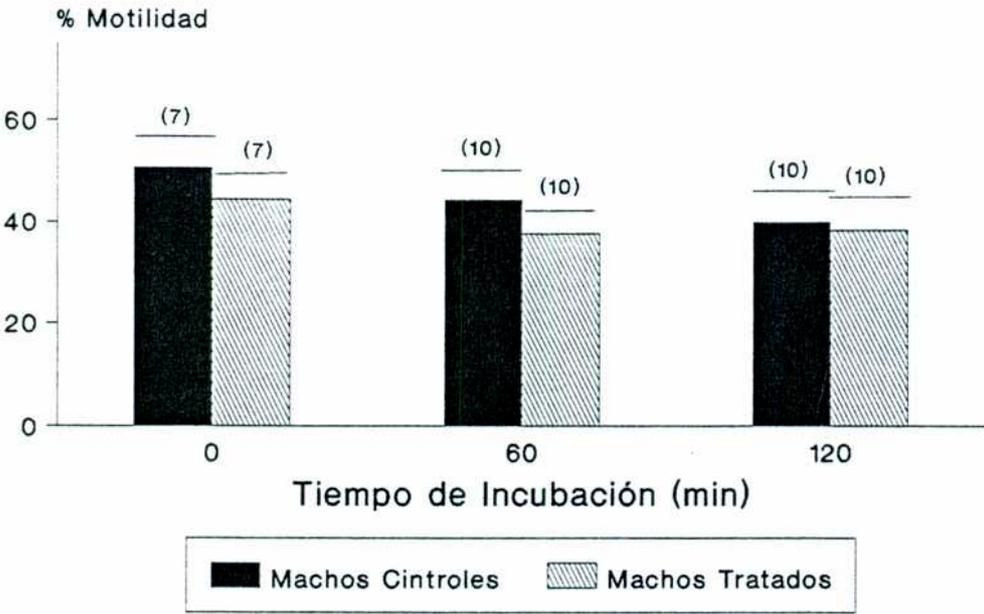


FIGURA III.19.B: Hiperactivación espermática en machos tratados con etanol al 10%.

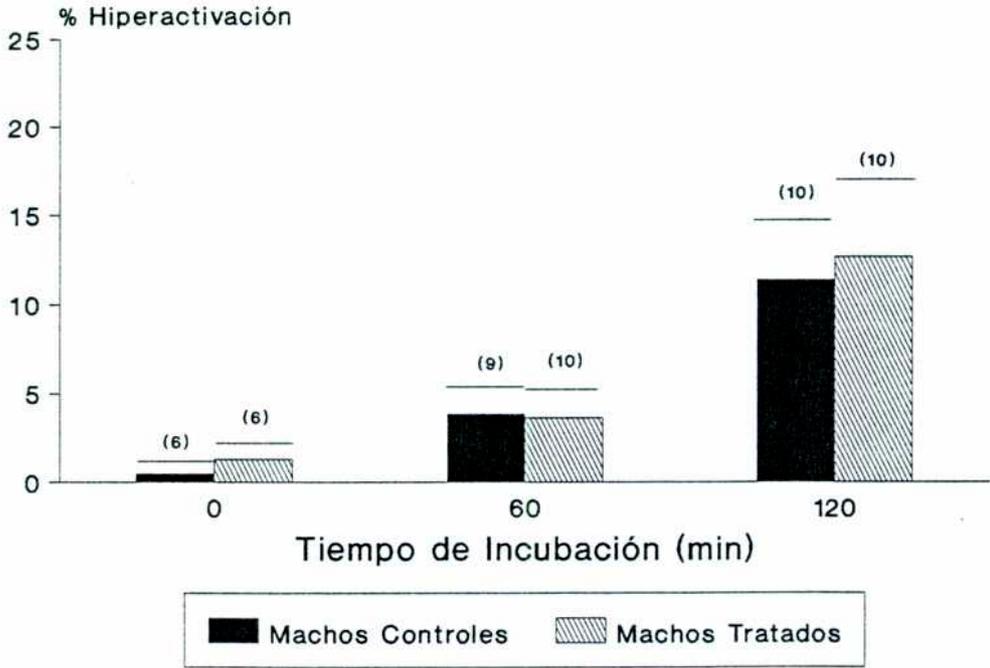


FIGURA III.20.A: Motilidad espermática en machos tratados con etanol al 5%.

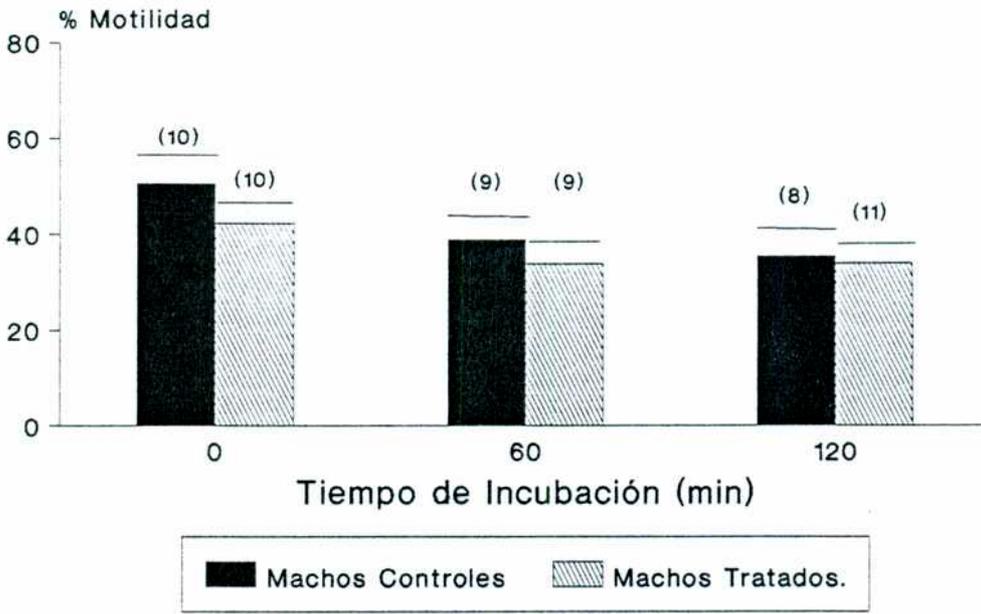


FIGURA III.20.B: Hiperactivación espermática en machos tratados con etanol al 5%.

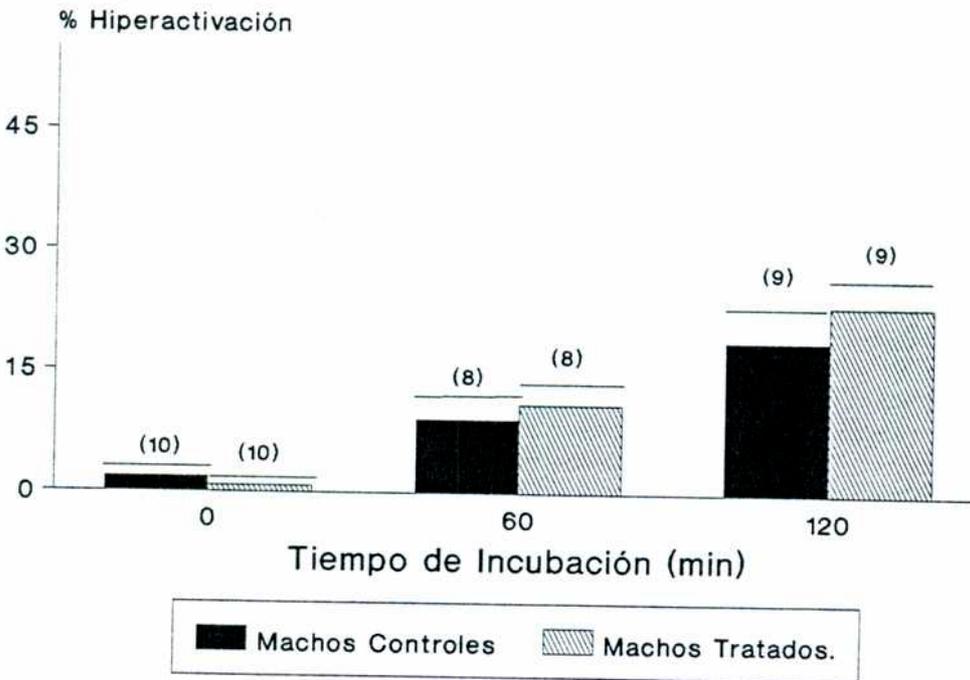


FIGURA III.21.A: Reacción acrosomal en machos tratados con etanol al 10%.

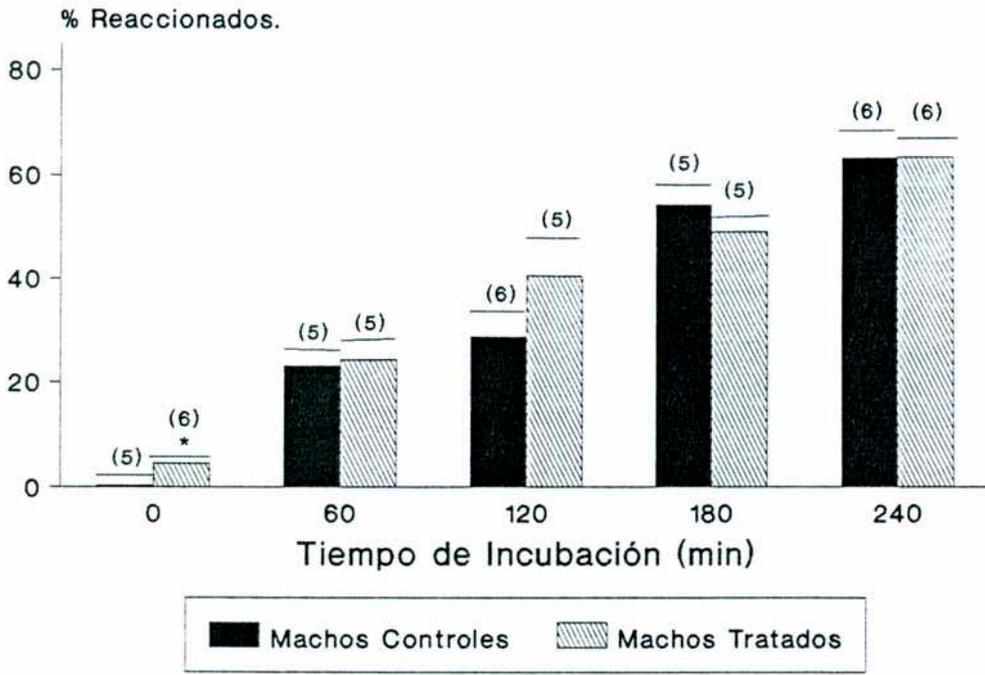


FIGURA III.21.B: Reacción acrosomal en machos tratados con etanol al 5%.

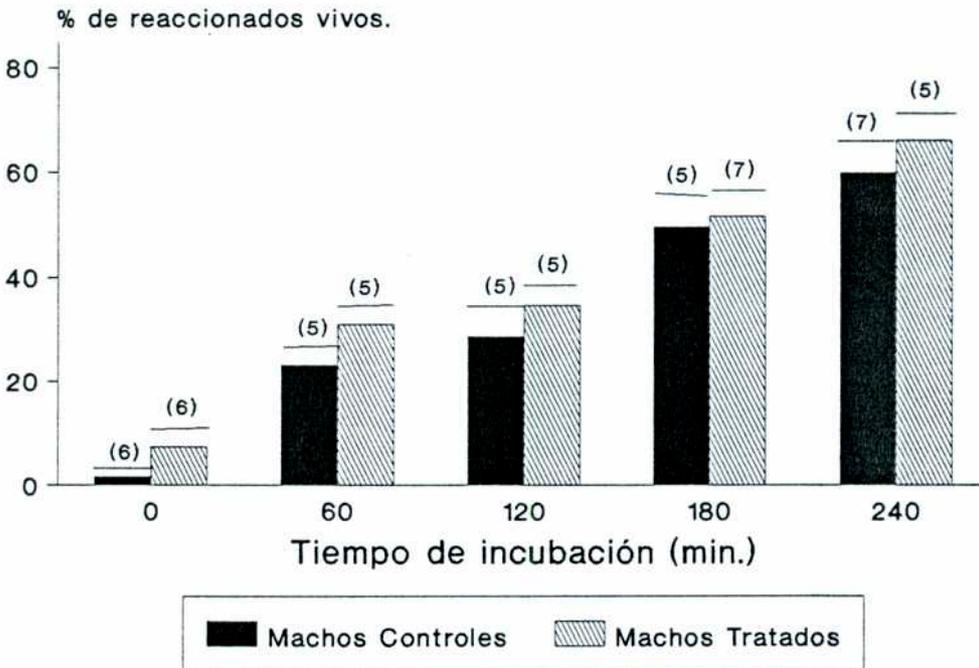


FIGURA III.22.A: Vitalidad y viabilidad en machos tratados con etanol al 10%.

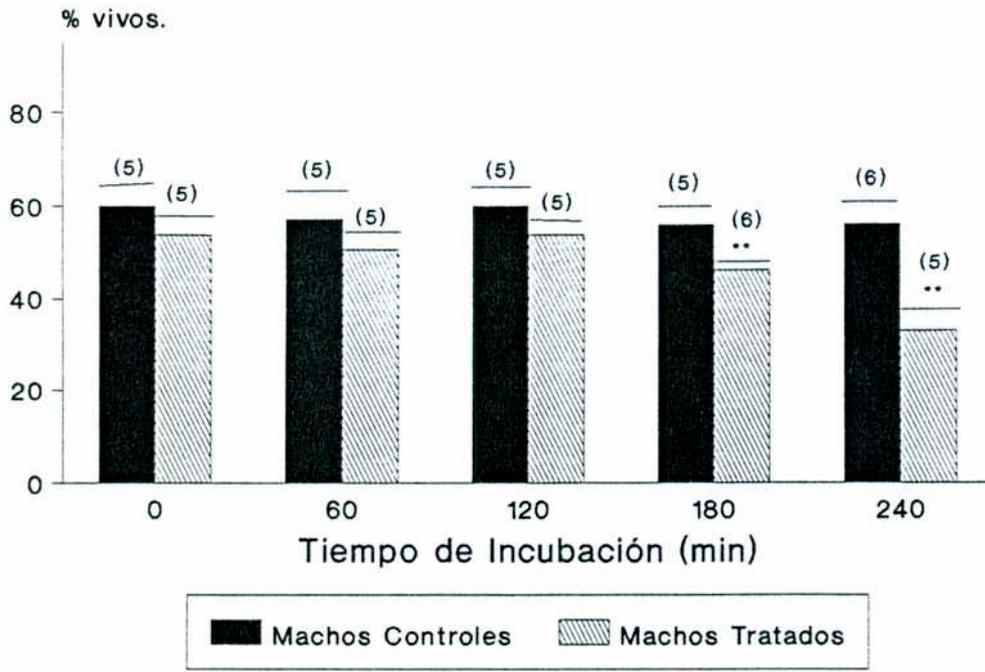
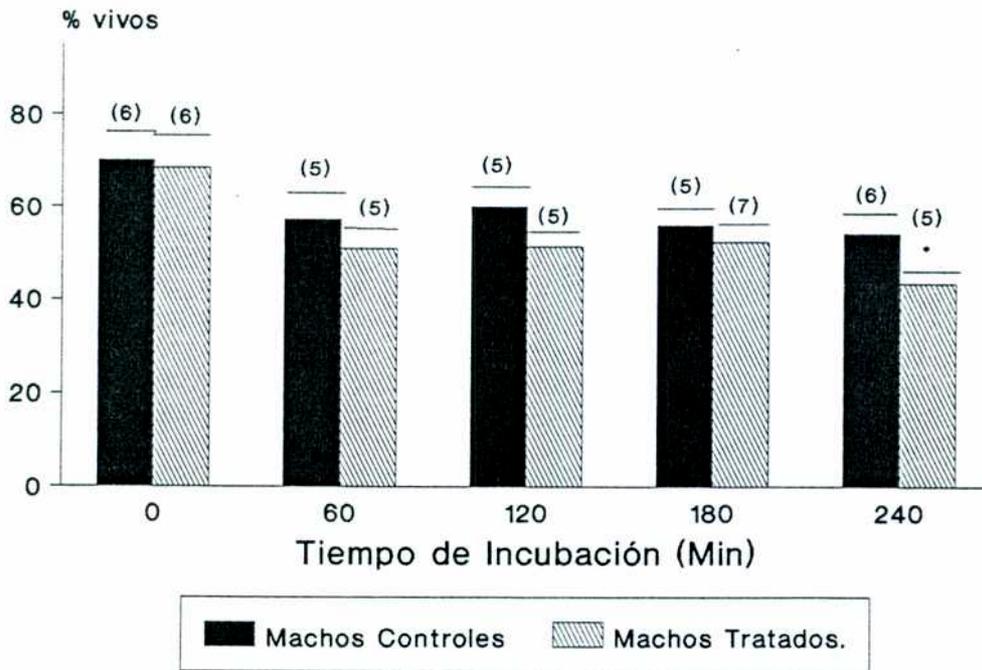


FIGURA III.22.B: Vitalidad y viabilidad en machos tratados con etanol al 5%.



4.2.1.d. Biosíntesis de eicosanoides (Figura III.23).

Se había demostrado que las prostaglandinas ovocitarias participan en proceso de fecundación, interviniendo específicamente en la reacción acrosomal. También, se pudo determinar que los espermatozoides de ratón son capaces de sintetizar PGs e hidroxiácidos. Los productos mayoritarios encontrados fueron la PGE₂, producto derivado de la ciclooxigenasa, y el 5-HETE producto derivado de la lipoxigenasa.

Con el propósito de estudiar si las diferentes dosis de etanol eran capaces de producir efectos deletéreos sobre la síntesis de eicosanoides espermáticos, los espermatozoides caudales se incubaron durante 60 min en MF. El metabolismo del ácido araquidónico exógeno se determinó luego de otros 60 in de incubación. La síntesis de eicosanoides se consideró significativa cuando el porcentaje de cpm en la placa fue superior al 1%.

A. Consumo de etanol al 10% (23.A).

Los espermatozoides de los machos tratados con 10% de etanol, mostraron porcentajes de síntesis de 5-HETE mayores que en el control ($p < 0.05$). La síntesis de PGE₂ fue similar al control.

B. Consumo de etanol al 5%. (23.B).

Tampoco fue alterada la síntesis espermática de PGE₂ por el tratamiento, comparando con los controles. Sin embargo, el porcentaje de síntesis de 5-HETE fue reducido en forma significativa en los machos tratados respecto de los controles.

. Conclusiones Parciales: capacitación in vitro.

Estos resultados demostrarían que, en los sistemas de capacitación estudiados, no se evidenciaron alteraciones espermáticas en cuanto a la motilidad, reacción acrosomal espontánea, la viabilidad temprana y síntesis de prostaglandina E₂ con las dosis de etanol del 10 y 5%. Solamente se encontró afectada la síntesis del producto de la lipoxigenasa (5-HETE) con ambos tratamientos. En este caso, se podría pensar en algún tipo de respuesta bifásica dependiente de la dosis ingerida de etanol.

FIGURA III.23.A: Síntesis de eicosanoides espermáticos en machos tratados con etanol al 10%.

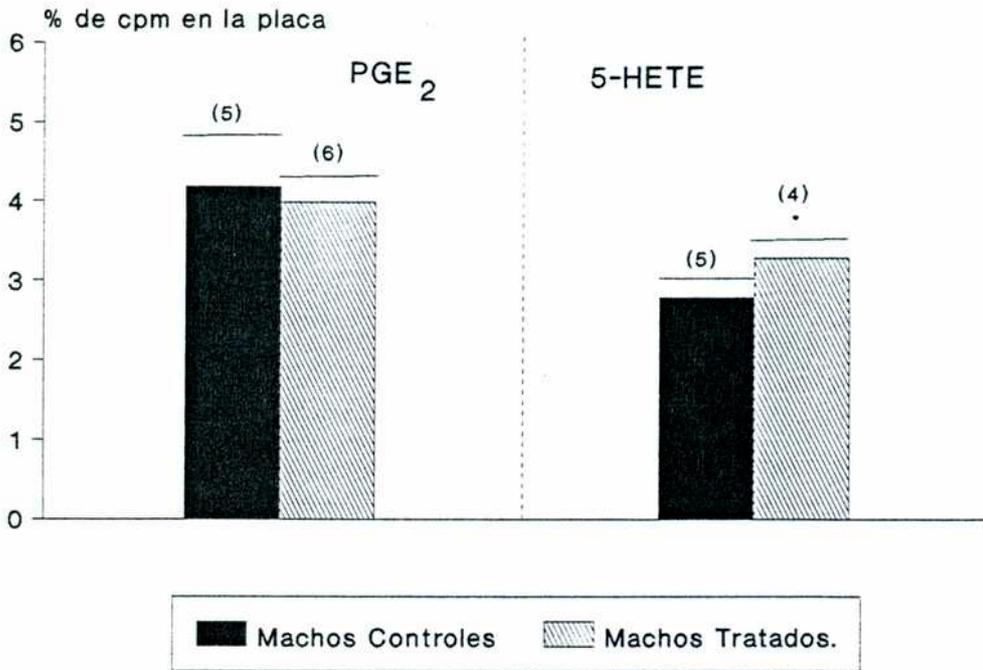


FIGURA III.23.B: Síntesis de eicosanoides espermáticos en machos tratados con etanol al 5%.

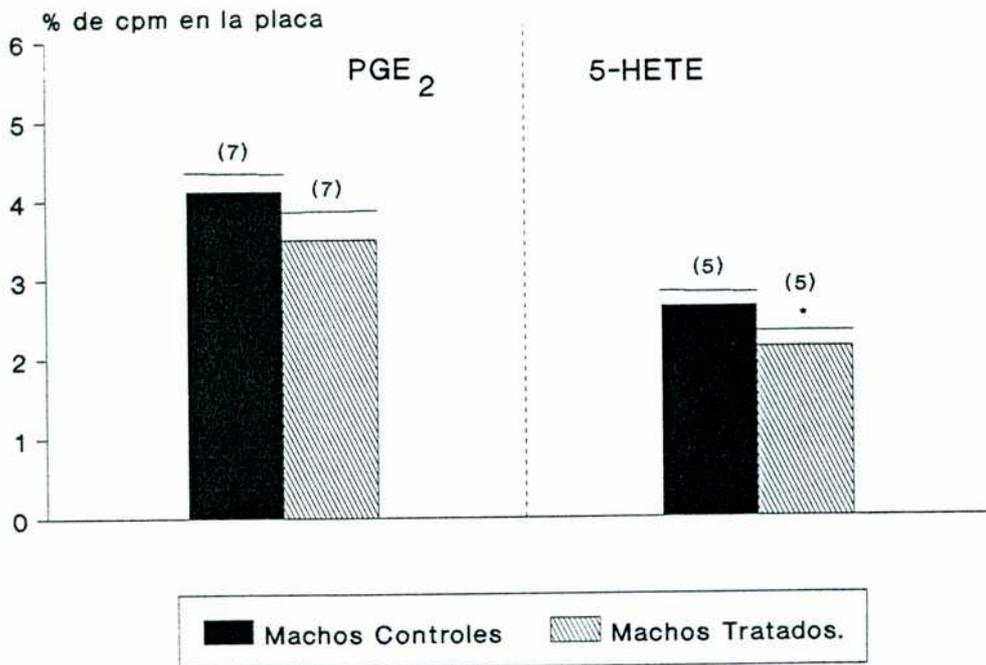


FIGURA III.24.3: Evaluación de la fecundación

A. 5 hs post-inseminación.

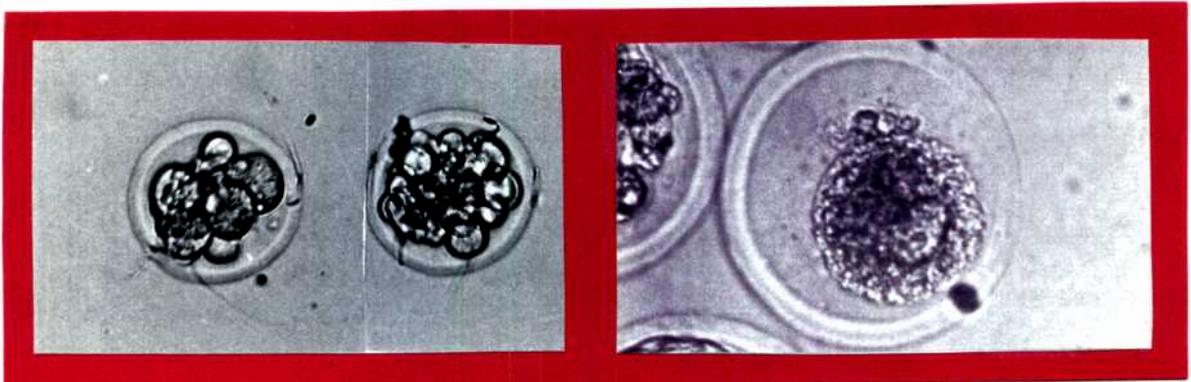
Ovocito intacto
(sin fecundar)

Ovocito activado
(con II CP)



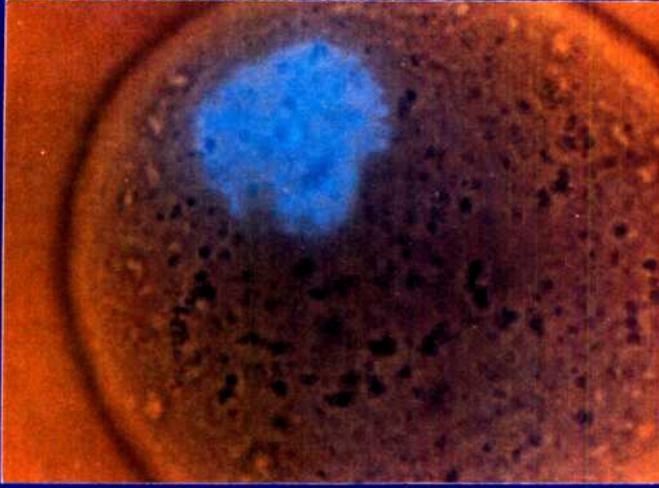
Ovocito Fragmentado

Ovocito necrótico

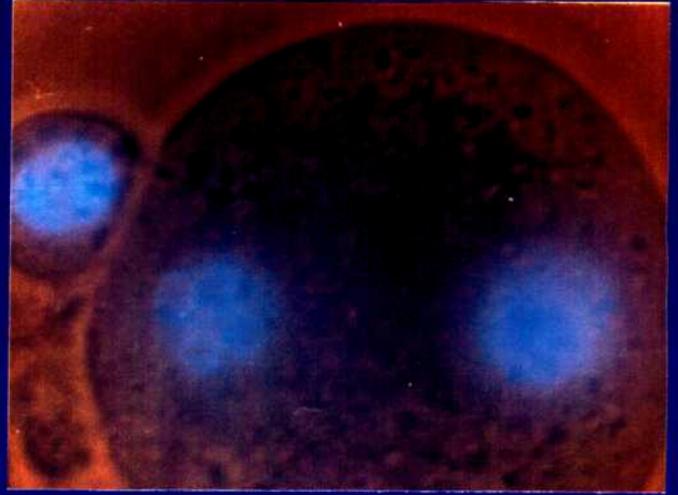


III.24.B. 7 hs post-inseminación (Fluorescencia: Hoechst 33342)

Ovocito no fecundado
(arrestado en metafase II)

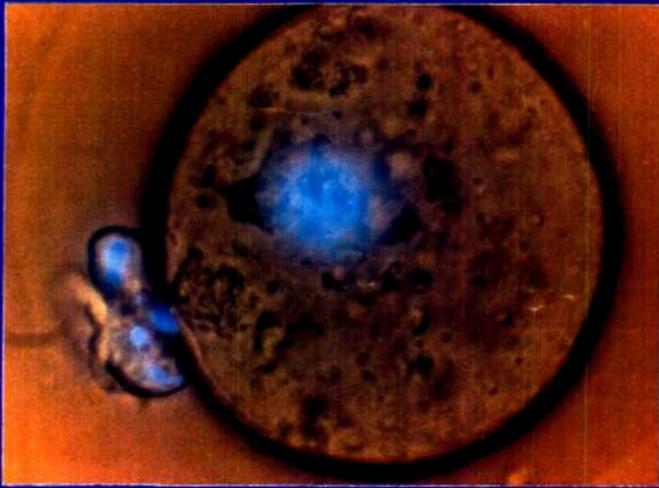


Ovocito fecundado
(II CP + 2 PN).

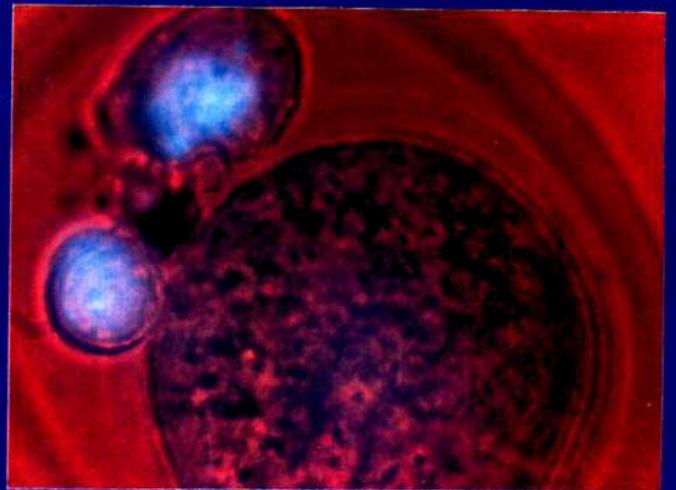


Ovocitos activados

1- II CP + 1PN



2- II CP + 0PN



4.2.2. Fecundación: evaluación de los eventos postinseminación.

4.2.2.a. Activación ovocitaria.

En la figura III.24.A se muestran los tipos de ovocitos evaluados a las 5 horas postinseminación.

Los resultados se detallan en la tabla III.9. A las 5 hs postinseminación, se examinó la extrusión del segundo cuerpo polar (II CP) (activación) en los ovocitos de una hembra, inseminados con espermatozoides de un macho. Se vio que el porcentaje de activación decrece significativamente cuando los ovocitos de hembras tratadas con **etanol al 10%** fueron inseminados con espermatozoides de machos controles o tratados (grupos A x C y A x A), respecto del grupo control. También, cuando se administró **etanol al 5%**, la tasa de activación ovocitaria disminuyó significativamente cuando las hembras fueron tratadas (A x C y A x A). Dado que con **etanol al 2.5%** no se observaron diferencias entre el control y el grupo de hembras tratadas (A x C), tampoco se analizaron los grupos C x A y A x A.

4.2.2.b. Formación de pronúcleos (Tabla III.10).

A las 8 hs postinseminación, los ovocitos activados fueron incubados con fluorocromo Hoechst 33342 durante 1 h, y observados bajo microscopio de fluorescencia. La presencia de 3PN (triploides o poliespérmicos) y anucleados (OPN) fue baja en todos los grupos con los tres tratamientos. Cuando las hembras fueron tratadas con **etanol al 10%** el porcentaje de ovocitos verdaderamente fecundados (II CP + 2PN) fue menor que en el grupo control ($p < 0.01$), aunque estos ovocitos estuvieran inseminados con espermatozoides de machos controles o tratados. El porcentaje de ovocitos activados haploides (1PN) estuvo aumentado en estos dos grupos. También, cuando se administró etanol al 5%, se observó mayor tasa de activación partenogénica en los grupos con hembras tratadas (A x C y A x A) respecto del control, disminuyendo por eso la tasa de fecundación efectiva ($p < 0.01$). Con **etanol al 2.5%** no se encontraron diferencias entre grupo control y el de hembras tratadas (A x C).

4.2.2.c. Calidad ovocitaria postinseminación (tabla III.11).

Cuando se recuperaron los ovocitos a las 5 hs postinseminación, se evaluó la cantidad de fragmentados y/o ovocitos necróticos o muertos. Con etanol al 10% el porcentaje de ovocitos degenerados, estuvo incrementado significativa-mente en el grupo A x A respecto del control. Lo mismo ocurrió con la cantidad de fragmentados/necróticos con etanol al 5% ($p < 0.05$). Es de

notar que la cantidad registrada de ovocitos fragmentados en la hembras tratadas con 10% fue algo mayor que con la dosis de etanol de 5%. Con etanol al 2.5 % no se observaron diferencias en el grupo estudiado (datos no mostrados).

. Conclusiones Parciales: fecundación *in vitro*.

Estos resultados estarían mostrando que el consumo crónico de etanol al 10 y 5%, produce menores tasas de fecundación *in vitro* cuando las hembras fueron tratadas, debido a que:

1) muchos ovocitos de hembras tratadas no pueden ser activados por espermatozoides (inseminación) (reducción en la tasa de activación global)

2) una parte importante y significativa de los que presentaron activación (extrusión de II CP) fueron haploides (1PN) y no fecundados (2PN). La menor dosis de etanol que afecta la tasa de fecundación fue 5%.

4.2. Fecundación *in vivo*.

Luego de estudiar si las diferentes dosis de etanol administradas en forma crónica afectaba la tasa de fecundación *in vitro* (FIV), nos cuestionamos si la fecundación *in vivo* también estaría afectada de alguna manera, pensando que estos eventos reproductivos son más efectivos y exitosos cuando ocurren en las condiciones fisiológicas (*in vivo*) y que, entonces, las anomalías ovocitarias encontradas podrían no ser barreras reproductivas y que las tasas de fertilidad podrían ser similares a las normales. Por eso, se determinaron los porcentajes de fecundación *in vivo* de hembras tratadas con etanol al 10 y 5%, utilizando machos controles solamente.

4.2.1. Tasa de apareo.

Tanto con la concentración del 10 como del 5% de etanol, no se observaron diferencias en cuanto al número de apareamientos registrados en los grupos controles y tratados (detallados en ítem 4.1.2) (datos no mostrados).

TABLA III.9: Activación ovocitaria (presencia de II CP).

Grupo	Etanol 10 %	Etanol 5%	Etanol 2.5%
C x C	79.2 ± 3.3 (14)	76.6 ± 3.4 (15)	87.7 ± 2.1 (4)
C x A	75.5 ± 5.9 (7)	67.7 ± 5.0 (12)	
A x C	49.6 ± 3.7 (19)**	56.1 ± 6.3 (13)*	88.5 ± 3.3 (6)
A x A	54.9 ± 10.4 (7)*	57.3 ± 6.7 (10)*	

Los complejos cúmulo-ovocitarios provenientes de una hembra fueron inseminados en gotas de MF con 10⁶ espermatozoides/ml proveniente de un macho, de tal manera que el número entre parentesis representa la cantidad de animales utilizados. A las 5 hs postinseminación, los ovocitos fueron lavados y colocados en medio M16 para ser observados en cuanto a la presencia de segundo cuerpo polar (II CP) o índice de activación, bajo microscopía de invertida de contraste de fase. Las cantidades son el promedio de los porcentajes mas el error (SEM).

C x C: grupo control: ovocitos de hembras controles inseminados con espermatozoides de machos controles.

C: control, A: tratado.

*: p<0.05, **: p<0.01, test de Dunnett (vs. control).

TABLA III.10: Formación de pronúcleos (PN).

Grupo	N	3PN	2PN	1PN	0PN
A. Etanol 10%					
C x C	5	1.5 ± 0.5	71.1 ± 4.2	6.2 ± 1.5	1.2 ± 0.4
C x A	5	2.1 ± 1.2	65.7 ± 3.2	4.1 ± 2.1	3.1 ± 1.2
A x C	5	1.4 ± 0.8	29.2 ± 2.8**	13.3 ± 2.8*	4.2 ± 1.6
A x A	5	3.2 ± 1.5	33.9 ± 3.6**	12.4 ± 2.6	3.5 ± 1.3
B. Etanol 5%					
C x C	6	1.7 ± 0.8	74.9 ± 3.3	4.1 ± 1.6	0.9 ± 0.6
C x A	5	2.5 ± 1.0	56.1 ± 2.7	6.4 ± 1.7	1.1 ± 0.7
A x C	5	1.5 ± 0.9	32.2 ± 9.4 **	16.6 ± 6.4 *	3.5 ± 1.5
A x A	6	1.5 ± 0.9	39.3 ± 5.1 **	16.0 ± 1.6 *	1.9 ± 0.9
C. Etanol 2.5%					
C x C	4	1.9 ± 0.8	81.0 ± 5.4	4.0 ± 2.1	0.8 ± 0.6
C x A					
A x C	6	2.1 ± 0.6	80.0 ± 6.1	5.1 ± 2.7	1.2 ± 0.5
A x A					

A las 8 hs postinseminación, los ovocitos activados, con II CP, fueron transferidos a medio con el fluorocromo Hoechst 33342 e incubados durante 1 h en estufa. Luego, de lavados, fueron montados para ser clasificados en cuanto al número de pronúcleos bajo microscopía de fluorescencia a 1000x (figura II.3). Los ovocitos fragmentados, necróticos y no activados no fueron incluidos en este análisis.

N: número de animales utilizados, PN: porcentaje de ovocitos activados con pronúcleo (promedio y error SEM).

C x C: grupo control, C: control, A: tratado. *: p<0.05, **: p<0.01, Test de Dunnett.

TABLA III.11: Calidad de los ovocitos postfecundación: ovocitos degenerados.

Grupo	Etanol 10%	Etanol 5%
C x C	8.2 ± 2.8 (14)	8.7 ± 1.6 (15)
C x A	13.0 ± 4.3 (7)	14.7 ± 1.8 (12)
A x C	20.9 ± 4.4 (19)	7.9 ± 0.8 (13)
A x A	32.2 ± 9.1 (7)	22.2 ± 6.7 (10)**

A las 5 hs postinseminación, los ovocitos se transfieren a M16 para examinar la activación, los ovocitos fragmentados y/o necróticos y los intactos (no fecundados) bajo microscopio invertido de contraste de fase. El número de animales utilizados es indicado entre paréntesis.

C: control, A: tratado.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, test de Dunnett (Vs. control).

4.2.2. Tasa de fecundación *in vivo*

A. Consumo de etanol al 10% (tabla III.12).

Se analizaron los efectos de la ingesta crónica en los grupos: control (C x C) (hembras y machos controles) y de hembras tratadas apareadas con machos controles (A x C).

La tasa de fecundación *in vivo* de las hembras tratadas apareadas con machos controles (A x C) decreció significativamente respecto del porcentaje de los controles. Y se registró un aumento significativo en la cantidad de ovocitos activados en el grupo tratado, respecto del control. Cuando se analizaron las variantes de activación espontánea se encontró que la mayoría de los ovocitos de las hembras tratadas tenían un II CP y 1 PN ($p < 0.01$). También, se encontraron diferencias en la tasa general de ovocitos no fecundados entre ambos grupos, y al analizar la morfología nuclear de estos, se vio un leve incremento significativo en la cantidad de ovocitos con placa metafásica anormal (cromosomas dispersos o un núcleo central (PN)) en A x C, lo cual fue coincidente con la morfología nuclear de los ovocitos libres estudiados a las 16 hs posthCG (Tabla III.3). No se hallaron diferencias significativas en la cantidad de ovocitos degenerados en el grupo de hembras tratadas respecto del control.

B. Consumo de etanol al 5% (Tabla III.13).

Las hembras tratadas apareadas con machos controles (A x C) presentaron menor porcentaje de ovocitos fecundados respecto de los controles ($p < 0.01$). También, con etanol al 5%, se vio que la cantidad de ovocitos activados con II CP y 1 PN fue incrementado por el tratamiento. En este caso, la cantidad de ovocitos no fecundados no fue cambiada en las hembras tratadas respecto del grupo control. Tampoco la tasa de fragmentados fue diferente del control.

. Conclusiones Parciales: fecundación in vivo.

Estos resultados muestran que las mejores condiciones de fecundación dadas por el ambiente fisiológico de la ampolla oviductal no es suficiente para obtener buenos resultados de fecundación en las hembras alcohólicas. Los resultados no dependen rígidamente de la dosis de etanol consumida, ya que las anomalías ovocitarias postfecundación fueron similares con ambas dosis de etanol utilizadas. La ingesta crónica de etanol redujo significativamente la fecundación *in vivo* de las hembras alcohólicas.

TABLA III.12: Evaluación de la fecundación *in vivo* de hembras tratadas con 10% de etanol apareadas con machos controles.

		C x C	A x C
	Nuclear	6	5
Fecundados	II CP + 2PN	78.5 ± 2.6	70.5 ± 3.6*
	II CP + 3PN	0	0
Activados	II CP + 1PN	1.0 ± 0.6	10.4 ± 2.7 **
	II CP + 0PN	0.4 ± 0.4	0
	2 células (CI)	0.6 ± 0.6	1.7 ± 1.3
	Total	2.1 ± 0.1	12.1 ± 3.5 **
No Fecundados	Placa Normal	2.0 ± 0.9	2.8 ± 2.0
	Placa Anormal	0	2.6 ± 0.8 **
	Total	2.0 ± 0.5	5.4 ± 1.9 *
Frag./Muertos		15.7 ± 1.5	11.6 ± 3.3

A las 24-30 hs posthCG, las hembras tratadas y controles apareadas con machos controles, se sacrificaron, y los embriones y ovocitos recuperados de los oviductos incubaron durante 1 h con el fluorocromo Hoechst 33342 para ser analizados bajo microscopio de fluorescencia. Los totales también se cuantificaron. N: número de hembras utilizadas.

C x C: hembras controles apareadas con machos controles.

A x C: hembras tratadas apareadas con machos controles.

II CP: segundo cuerpo polar, PN: pronúcleo; CI: clivaje inmediato. Placa normal: metafase II; placa anormal: anucleado o cromosomos dispersos en el citoplasma. *: p<0.05, **: p<0.01.

TABLA III.13: Evaluación de la fecundación *in vivo* de hembras tratadas con 5% de etanol apareadas con machos controles.

	Nuclear	C x C	A x C
		6	6
Fecundados	II CP + 2PN	80.5 ± 2.6	67.9 ± 2.5 **
	II CP + 3PN	0	0
Activados	II CP + 1PN	2.6 ± 0.8	12.5 ± 1.9 **
	II CP + 0PN	2.7 ± 0.3	1.8 ± 0.8
	2 células (CI)	0.8 ± 0.8	1.9 ± 1.0
	Total	4.8 ± 1.3	15.8 ± 3.8 **
No Fecundados	Placa Normal	2.4 ± 1.0	2.6 ± 1.5
	Placa Anormal	0	1.0 ± 1.0
	Total	2.4 ± 1.0	3.8 ± 2.3
Frag/Muertos		16.2 ± 3.6	12.1 ± 2.7

A las 24-30 hs posthCG, las hembras tratadas con etanol al 5% y las controles apareadas con machos controles, se sacrificaron, y los embriones y ovocitos recuperados de los oviductos se los analizó como antes. N: número de hembras utilizadas.

C x C: hembras controles apareadas con machos controles.

A x C: hembras tratadas apareadas con machos controles.

II CP: segundo cuerpo polar, PN: pronúcleo; CI: clivaje inmediato.

** : p<0.01, ***: p<0.001, test de Student't.

5- EMBRIOGENESIS DE PREIMPLANTACION.

Efecto del consumo crónico moderado y bajo en hembras inmaduras y machos adultos.

Posteriormente a los estudios de fecundación (*in vitro* e *in vivo*), nos cuestionamos si las alteraciones observadas en la fecundación y en la calidad de la gameta femenina, tenían consecuencias deletéreas para el desarrollo temprano del embrión, si el consumo crónico de etanol pregestacional afectaba el crecimiento embrionario, en cuanto a la morfología y la síntesis de prostaglandinas (como señales embrionarias). Fue así que estudiamos el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los embriones derivados de animales tratados con etanol al 10 y 5%, de modo de definir también la dosis mínima de etanol ingerida crónicamente capaz de producir toxicidad en el desarrollo.

5.1. Desarrollo *in vitro* (hasta día 7 posthCG).

5.1.1. Aspectos cuantitativos.

5.1.1.a. Tasa de desarrollo embrionario preimplantacional.

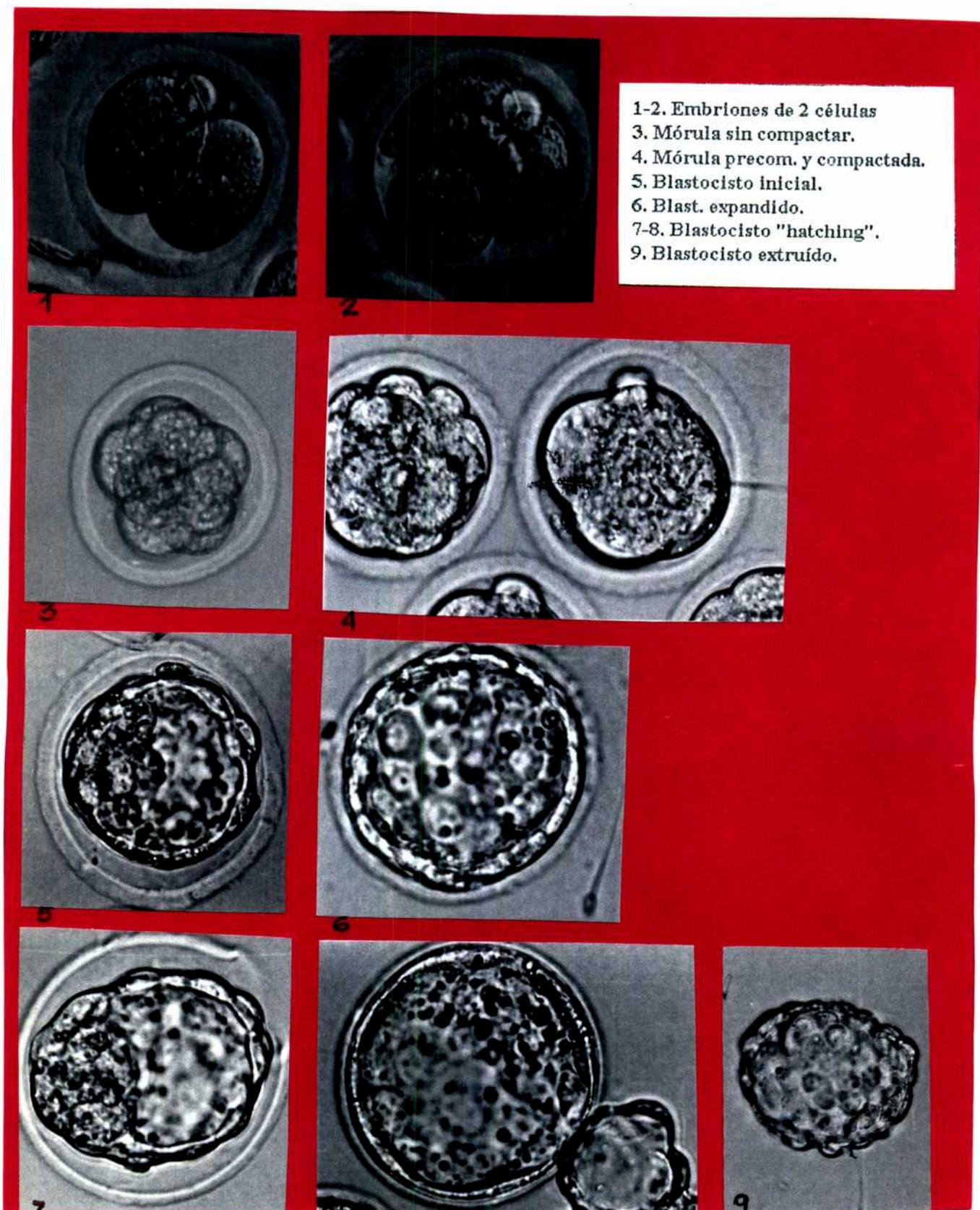
Para comparar los resultados con el desarrollo *in vivo*, el día de la fecundación *in vitro* (FIV) fue considerado como el día 1 de preñez, siendo a las 8 hs postinseminación las 24 hs aprox. posthCG. Entonces, los embriones obtenidos de la FIV y desarrollados *in vitro* fueron evaluados desde el día 2 (48 hs posthCG) hasta el día 7.

Los tipos embrionarios observados fueron fotografiados y cuantificados, y se muestran en la figura III.25.

A. Consumo de etanol al 10% (Figura III.26).

El porcentaje de embriones de 2 células obtenidos al día 2 de cultivo, provenientes del grupo A x C (embriones de hembras tratadas (A) inseminadas con machos controles (C)) y del grupo A x A (embriones de hembras tratadas inseminadas con machos tratados) fue significativamente menor que el del control (C x C) (Fig.III.26.A). Al día 3 (26.B), la mayoría de los embriones del control estuvieron en 4 células pero el porcentaje obtenido para los grupos con algún animal tratado (C x A, A x C y A x A) decreció significativamente respecto del

FIGURA III.25: Tipología embrionaria en el desarrollo *in vitro* preimplantacional:
secuencia de aspectos normales



control. Al día 4 (26.C), se obtuvieron mórulas compactadas en C x C, y también se observó una caída significativa del porcentaje de mórulas compactadas en los grupos tratados, comparando con el control, habiendo una cantidad mayor de mórulas precompactadas (5-8 células) en el grupo A x C respecto del control. Al día 5 (26.D), la mayoría de los embriones del control alcanzaron el estadio de blastocisto inicial (temprano) y algunos menos blastocisto expandido. En el grupo C x A, se observó disminución significativa de blastocistos (inicial y expandido) respecto del control, pero no mayor cantidad de mórulas (estadio anterior). En A x C, los porcentajes bajos de blastocistos parecen deberse a que la mayoría de los embriones estuvieron en mórulas, con lo cual se podría pensar en un retraso en el desarrollo. En A x A se observaron cantidades muy bajas de blastocistos ($p < 0.01$) y también de mórulas, comparando con el control, esto indicaría pérdida embrionaria. Al día 6 (26.E), el estadio característico marcado por el desarrollo del control, fue el de blastocisto expandido, algunos de los cuales comenzaron a salir de la zona pelúcida (extrusión o hatching). El porcentaje de blastocistos expandidos y también de los "hatching" disminuyó significativamente en el grupo C x A respecto del control, ya que un porcentaje quedó en blastocisto inicial (anterior). El mismo patrón se obtuvo en el grupo A x C, siendo menor el porcentaje de blastocistos expandido y hatching, comparando con el control ($p < 0.01$). Al día 7 (26.F), los embriones del control pudieron extruirse de la zona pelúcida ("hatched"), pero muy pocos embriones "hatching" y "hatched" se obtuvieron en los grupos tratados (C x A, A x C y A x A) ($p < 0.01$).

B. Consumo de etanol al 5% (Figura III.27).

Los embriones de 2 células al día 2, disminuyó significativamente en el grupo (A x A) comparando con el grupo control (C x C) (figura III.27.A). Al día 3 (27.B), se observó una caída importante en el porcentaje de embriones de 4 células en los grupos A x C y A x A respecto del control ($p < 0.05$ y $p < 0.01$). Al día 4 (27.C), también en A x C y A x A, el porcentaje de mórulas compactadas cayó significativamente comparando con el control, no detectándose aumentos de mórulas precompactadas. Al día 5 (27.D), en el grupo C x A (machos tratados), se encontró menor porcentaje de blastocistos iniciales respecto del control, ya que algunos estuvieron aun en mórulas. El grupo A x C (hembras tratadas) mostró aumento significativo de mórulas y menores cantidades de blastocistos, demostrándose otra vez algún retraso y posible pérdida embrionaria. Al día 6 (27.E), se obtuvieron porcentajes bajos de blastocistos expandidos en todos los grupos tratados (C x A, A x C y A x A) respecto del control. Al día 7 (27.F), estos grupos tuvieron pocos blastocistos "hatching" ($p < 0.05$ y $p < 0.01$).

. Conclusiones parciales: desarrollo in vitro (general).

Estos resultados sugieren que tanto con la dosis del 10 como del 5% de etanol, el desarrollo *in vitro* de los embriones de los grupos tratados mostró índices de retraso en el crecimiento y pérdida embrionaria manifestada por porcentajes disminuidos en los estadios de desarrollo preimplantativo, observándose mayores efectos tóxicos o deletéreos en el grupo con hembras y machos tratados (A x A), desde los estadios más tempranos.

5.1.1.b. Tasa de fragmentación diaria.

Para estudiar el proceso de fragmentación embrionario durante el desarrollo in vitro, se observaron aquellos embriones que presentaron más del 30-40% de fragmentación y/o lisis celular (necrosis) (figura III.28). Los porcentajes fueron calculados para cada día, en los cuales se descontaron los embriones u ovocitos fragmentados y/o muertos (degenerados) que se habían obtenido en la FIV. De esta manera se intentó mostrar solamente la fragmentación que ocurre durante el desarrollo.

A. Consumo de etanol al 10% (Figura III.29.A).

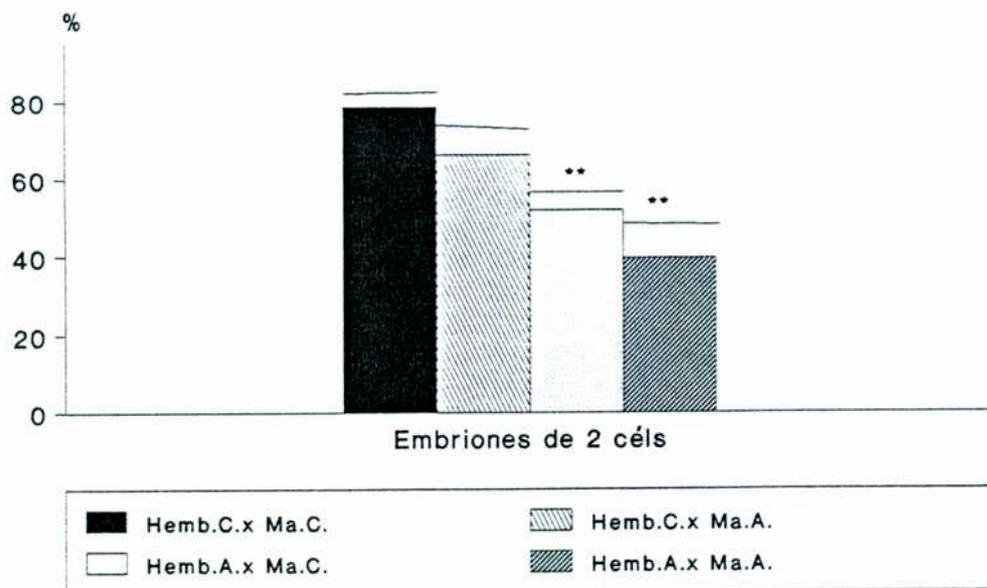
Se observaron altas tasas de fragmentación en los grupos A x C y A x A desde el día 2 (estadio de embrión de 2 células) ($p < 0.01$). Al día 3 (estadio de mórulas), el grupo A x A presentó elevado porcentaje de fragmentación respecto del control. Al día 4 (blastocistos), otra vez los grupos A x C y A x A mostraron aumentos significativos de fragmentados respecto del control. A pesar de continuar elevada la tasa de fragmentación en estos grupos en los días 5 y 6 no se observaron diferencias con el control.

B. Consumo de etanol al 5% (Figura III.29.B).

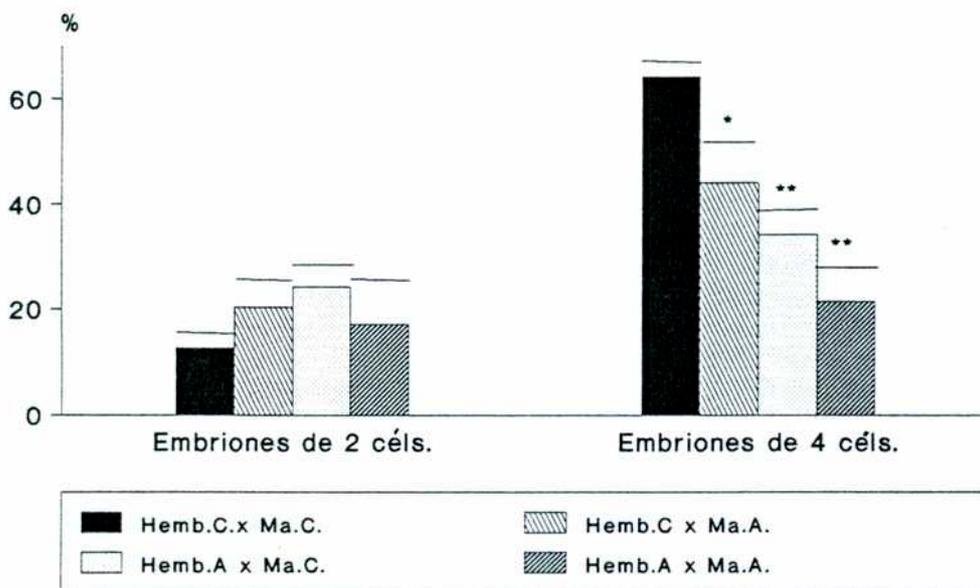
Al día 2 solamente el grupo A x A mostró elevada cantidad de fragmentados respecto del control ($p < 0.01$), aumento que se mantuvo en los días posteriores (3,4 y 5). El grupo A x C tuvo porcentaje elevado de fragmentación al día 4 (blastocistos) comparando con el control ($p < 0.05$).

FIGURA III.26: Cuantificación del desarrollo *in vitro* preimplantacional en el consumo de etanol al 10%.

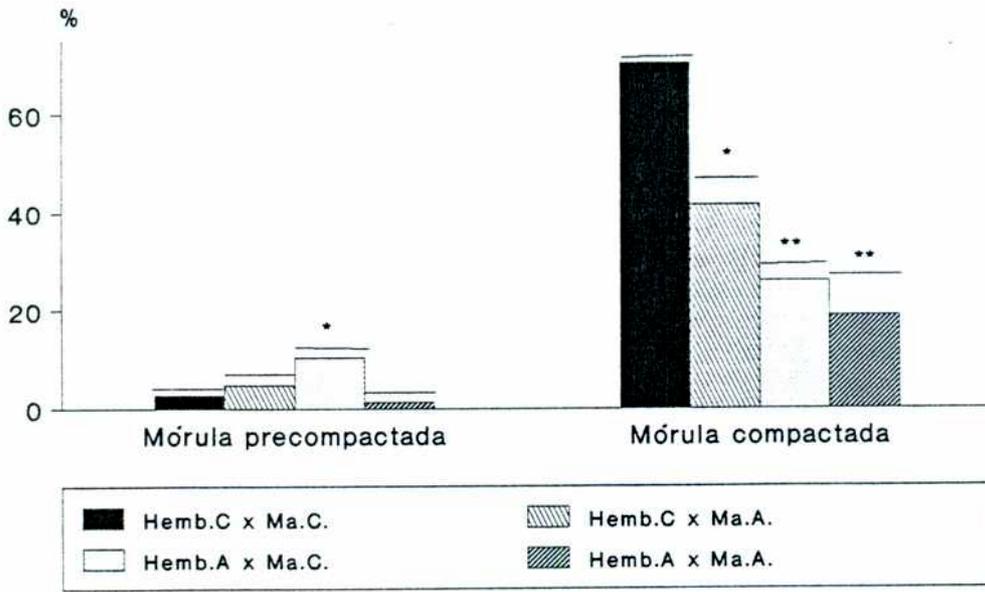
III.26.A.DIA 2



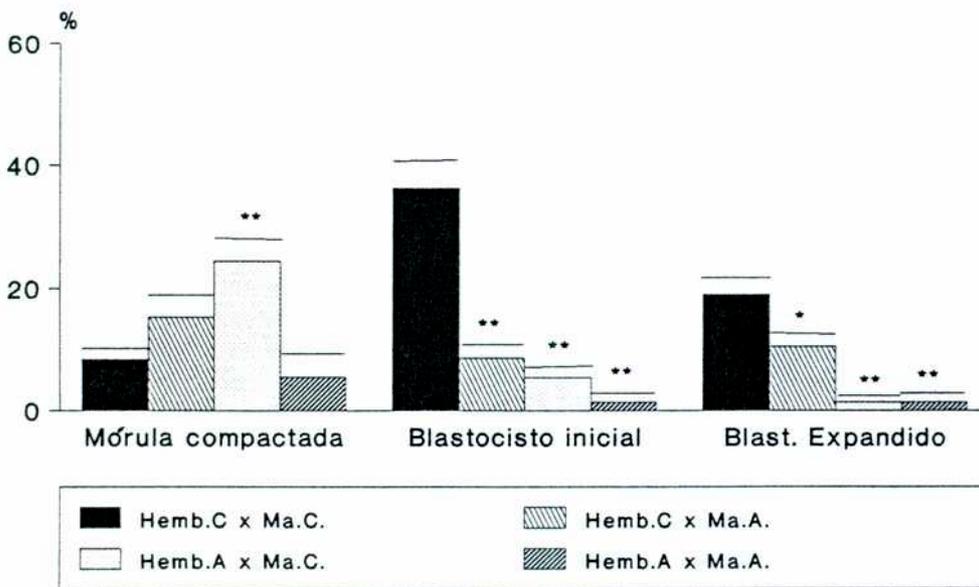
III.26.B. DIA 3



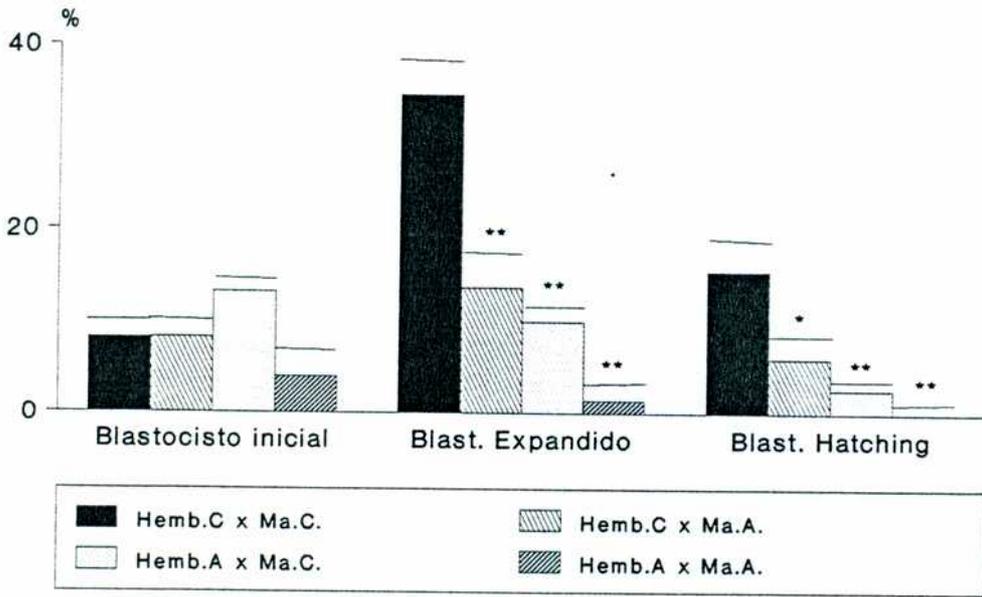
III.26.C. DIA 4



III.26.D DIA 5



III.26.E DIA 6



III.26.F DIA 7

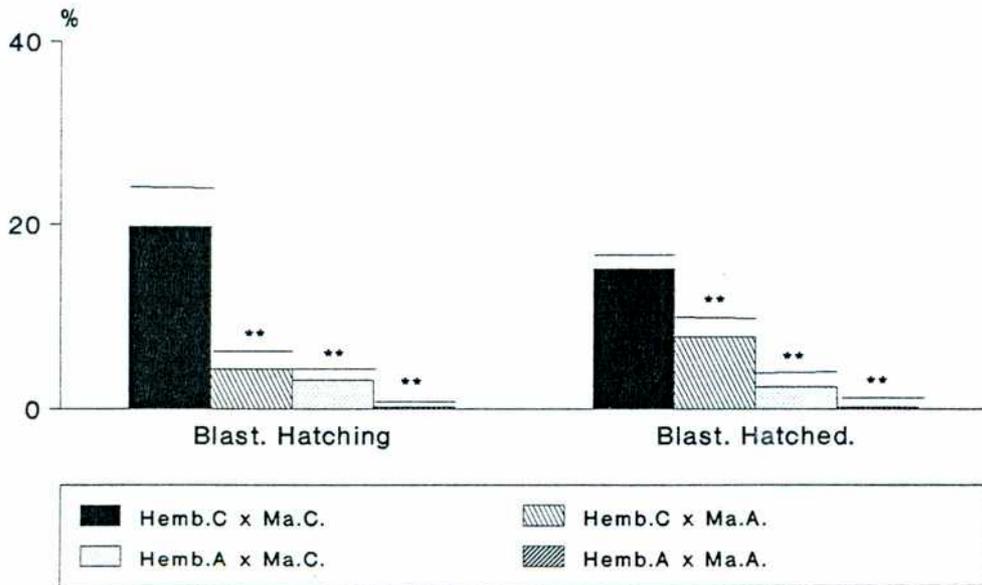
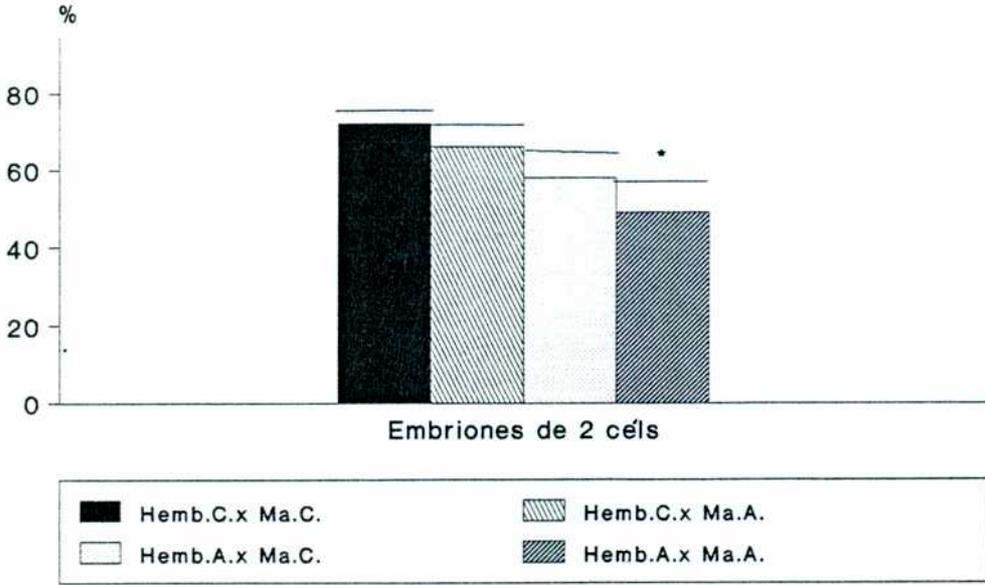
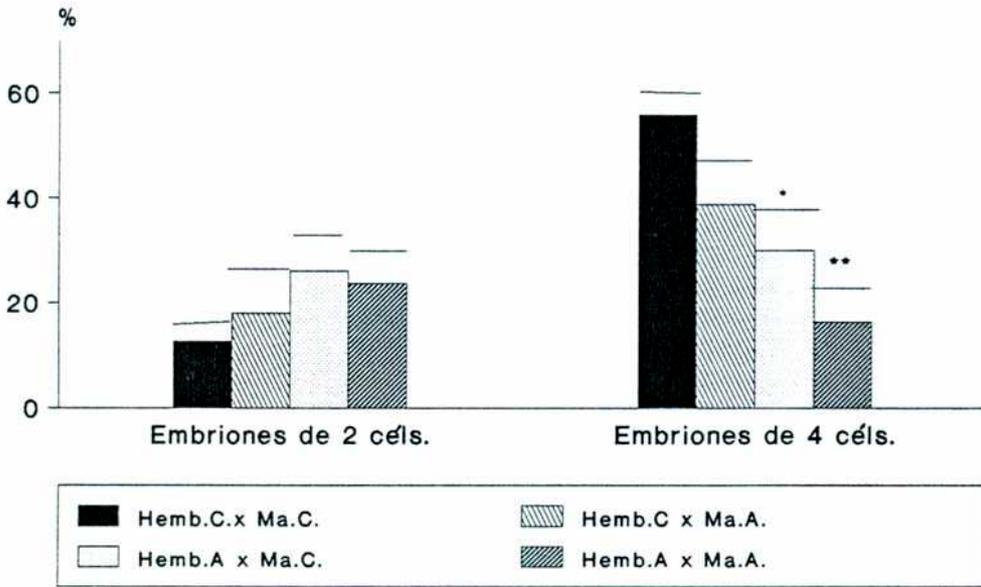


FIGURA III.27: Cuantificación del desarrollo *in vitro* preimplantacional en el consumo de etanol al 5%.

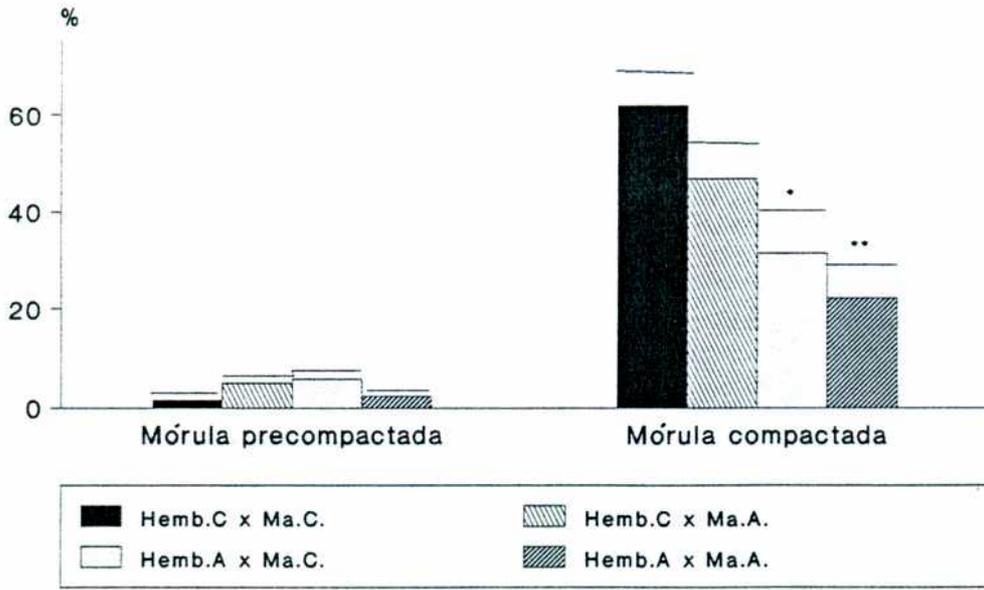
III.27.A. DIA 2



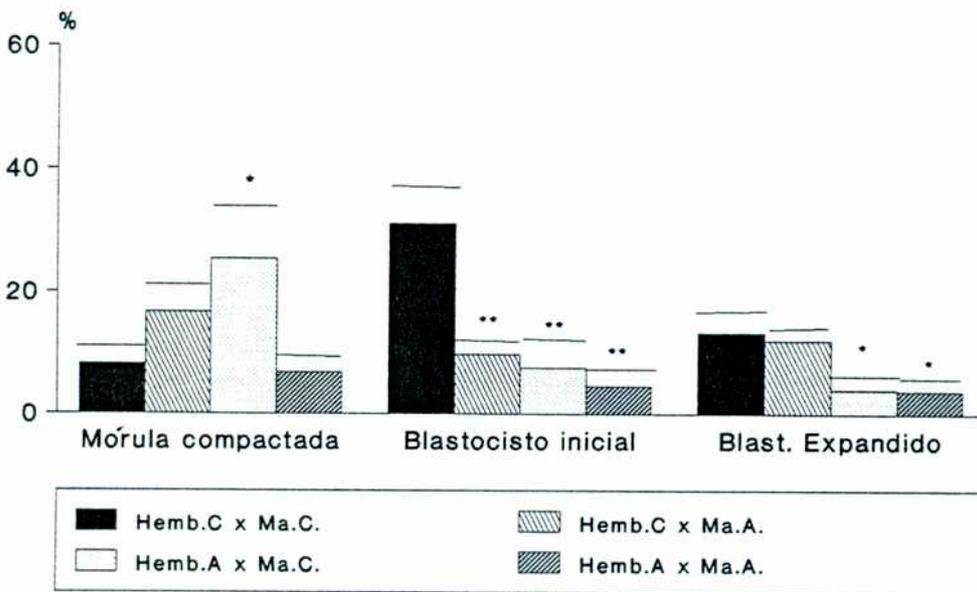
III.27.B. DIA 3



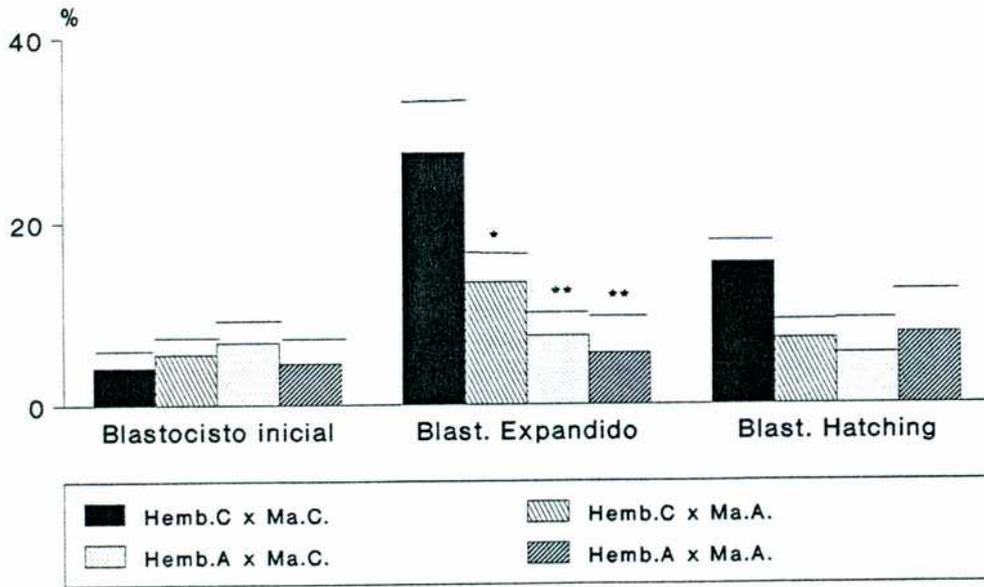
III.27.C. DIA 4



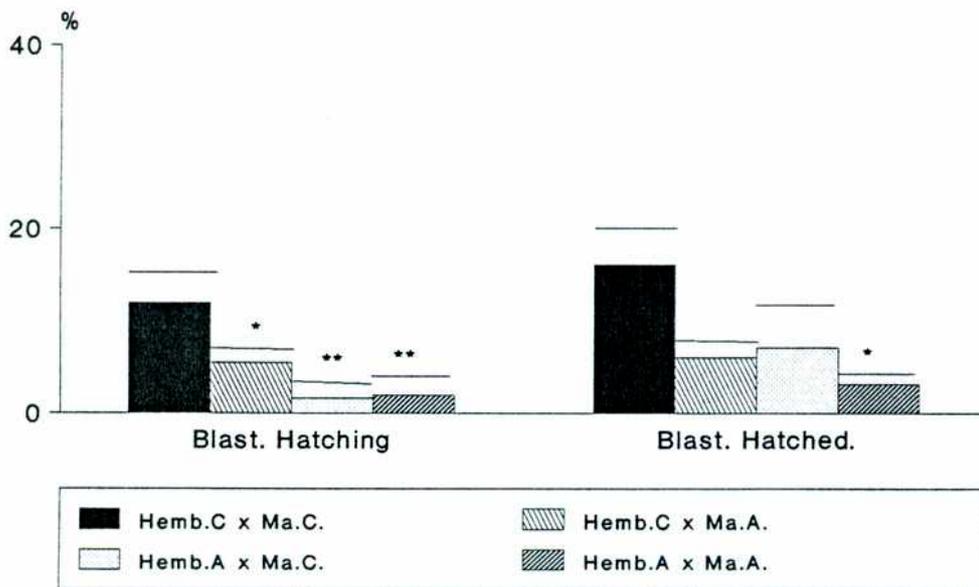
III.27.D DIA 5



III.27.E DIA 6



III.27.F DIA 7



. Conclusiones parciales: pérdida embrionaria en el desarrollo in vitro.

Estos resultados indicarían que el consumo crónico de etanol al 10 y 5% por las hembras y machos produce fragmentación embrionaria desde el primer día de desarrollo *in vitro* hasta los estadios de blastocistos. Cuando sólo las hembras fueron tratadas con ambas dosis de etanol, fueron observados altos índices de fragmentación al día 4 (blastocistos).

5.1.2. Aspectos cualitativos.

Para analizar algunos aspectos de la calidad embrionaria, los embriones cultivados en estufa fueron observados minuciosamente con microscopio invertido, con lo cual se determinaron las morfologías anormales presentes y se midió la síntesis de PGE liberadas por el embrión.

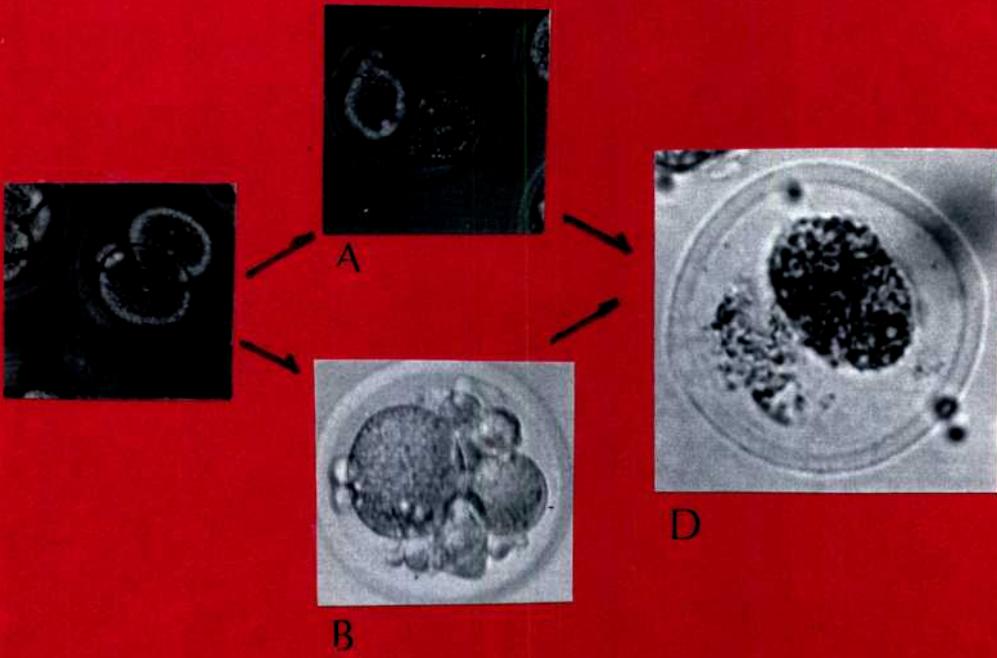
5.1.2.a. Morfología embrionaria.

Para cuantificar la tasa de embriones anormales se analizó la presencia de algún índice de malformación (figura III.30). Los cálculos fueron realizados sobre el total de embriones del cultivo (figura III.31).

Cuando se administró etanol al 10%, se detectaron altos porcentajes de embriones anormales en los grupos C x A, A x C y A x A (con algun animal tratado) en los días 5 y 6, respecto del control. Es decir, al día 5 estos grupos tuvieron elevada cantidad de morulas atrésicas (retrasadas) y también blastocistos iniciales pequeños o con formación del blastocele anormal. Al día 6, los blastocistos anormales encontrados fueron expandidos con lisis citoplasmáticas o escasa formación del MCI.

Cuando se administró etanol al 5%, las hembras tratadas inseminadas con machos controles (A x C) mostraron aumento de embriones anormales al día 5 (blastocistos), respecto del control ($p < 0.05$).

FIGURA III.28: Fragmentación y necrosis embrionaria: aspectos.



En el proceso de fragmentación y muerte embrionaria se distinguen varias etapas. El embrión se puede fragmentar primero por regiones (b y c) para luego lisarse, hasta la necrosis general (d y g). La necrosis puede ocurrir inicialmente sin fragmentación (a).

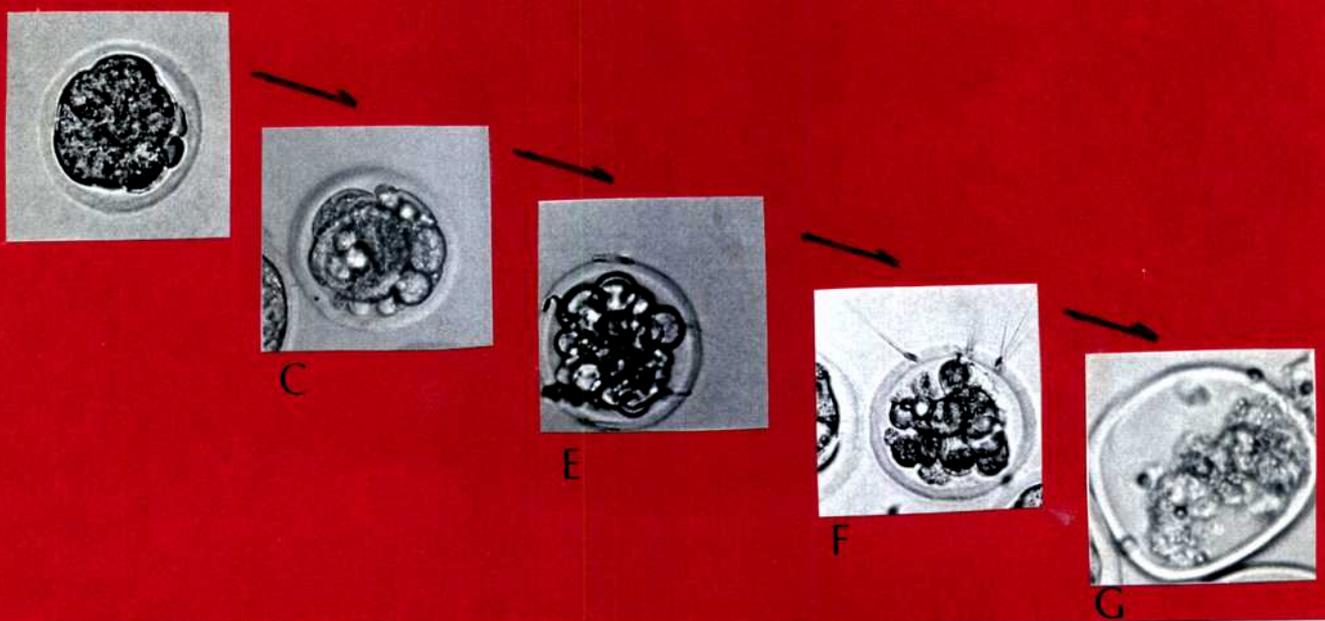
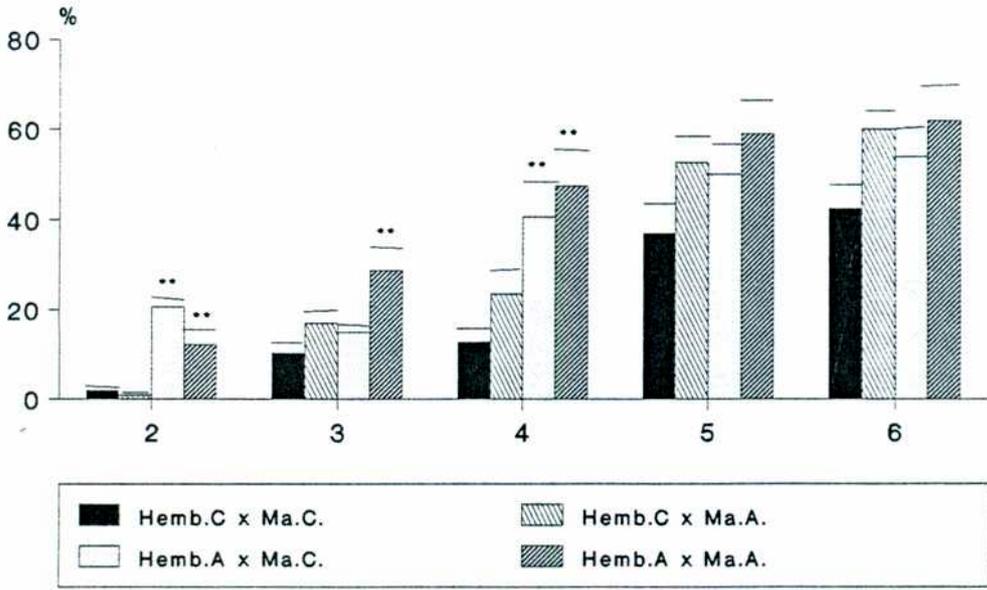
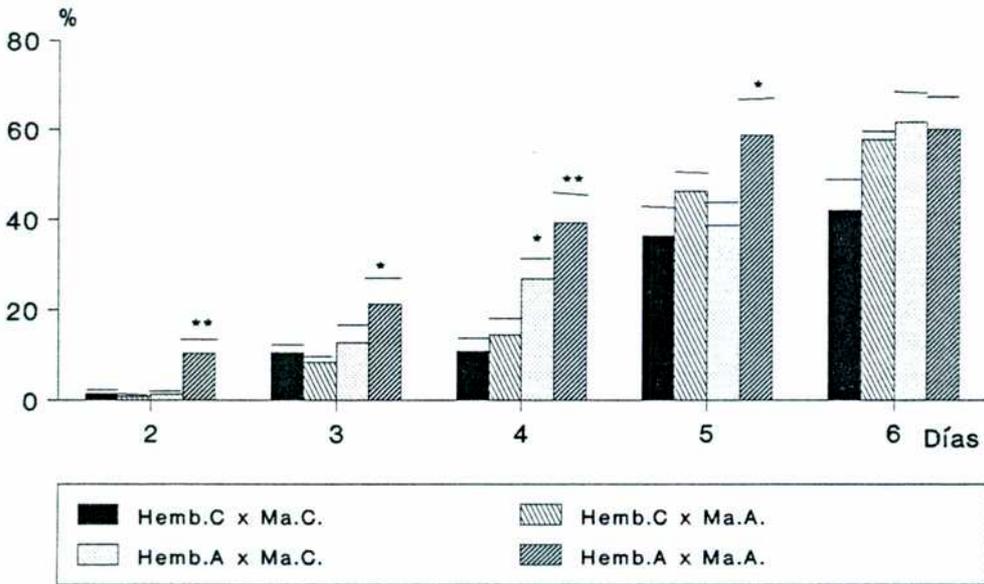


FIGURA III.29: Cuantificación del proceso de fragmentación embrionario por día

III.29.A: Consumo de etanol al 10%.



III.29.B: Consumo de etanol al 5%.



5.1.2.b. Biosíntesis de prostaglandina E.

De modo de estudiar si la cantidad de PGE sintetizada podía ser un índice de calidad embrionaria, y habiéndose visto que tanto con 10 como con 5% de etanol se obtenían embriones anormales (blastocistos) cuando las hembras fueron tratadas, se midió solamente la PGE liberada de los embriones cultivados, de día 2 (2 células), de día 3 (mórula) y día 4 (blastocistos), provenientes de **hembras tratadas con etanol al 5%** inseminadas con machos controles.

Se encontró que los embriones de 2 células del grupo tratado (A x C) sintetizan menores cantidades de PGE por embrión que el control ($P < 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la capacidad de síntesis de PGE de los blastocistos del grupo A x C comparando con el control (figura III.32).

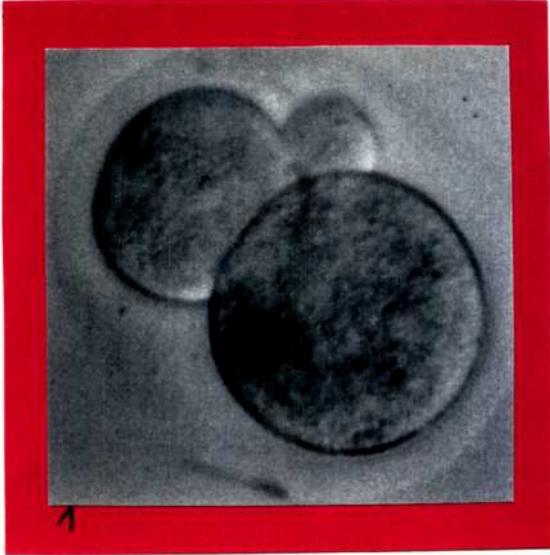
5.2. Desarrollo *in vivo* (hasta día 4 posthCG).

Dado que el estudio del desarrollo *in vitro* mostró que las hembras tratadas con etanol al 10 o al 5% tenían afectado el crecimiento embrionario hasta días avanzados, y también la calidad morfológica embrionaria, y que las hembras y machos igualmente tratados con ambas dosis de etanol, también mostraron patrones similares anormales en el desarrollo, se decidió analizar solamente los efectos del consumo de etanol al 10 y 5% sobre las hembras. Con tal fin los machos que se utilizaron para el apareamiento, fueron controles adultos de probada fertilidad.

5.2.1. Aspectos cuantitativos.

Los embriones desarrollados *in vivo* fueron recuperados al día 2 de preñez (46 hs posthCG: estadio de 2 células) del oviducto, al día 3 (72-76 hs posthCG) del oviducto y al día 4 (96-99 hs posthCG) del oviducto y del útero de las hembras preñadas. Los tipos de embriones de 2 células y las mórulas (día 3) tuvieron el mismo aspecto morfológico que los desarrollados *in vitro*. Las mórulas de día 4 fueron cuantificadas como tales cuando el número de células presentes no fue mayor que 32. Cuando se observó vesículas citoplasmáticas en los embriones de aspecto de mórula (comienzo de la formación del blastocele), el número de células fue algo mayor que 32, y se cuantificó este embrión como "blastocisto inicial sin cavidad". Cuando se formó la cavidad (por coalescencia de las vacuolas) el blastocisto inicial fue "con cavidad" y presentó desde 40 células. Luego, los blastocistos expandidos se observaron semejantes a los desarrollados *in vitro* y presentaron aprox. 50 células. Los blastocistos "hatched" (extruídos), diferentes de los desarrollados *in vitro*, se observaron con cavidad y sin cavidad,

FIGURA III.30: Aspectos morfológicos anormales en el desarrollo embrionario preimplantativo.



1. Embrión de 2 células con blastómeros desiguales.
2. Mórula con blastómeros decompactados.
3. Mórulas anormales, con lisis en espacio perivitelino.
- 4-5-6. Blastocistos iniciales con cavitación anormal.
7. Blastocistos expandidos con lisis celular.

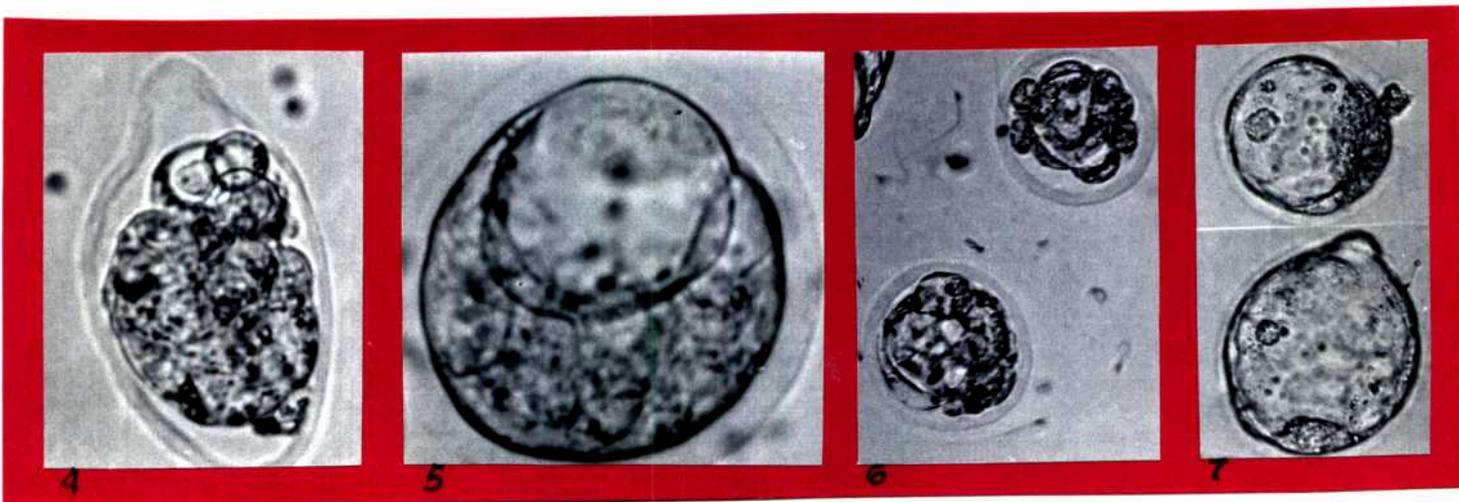
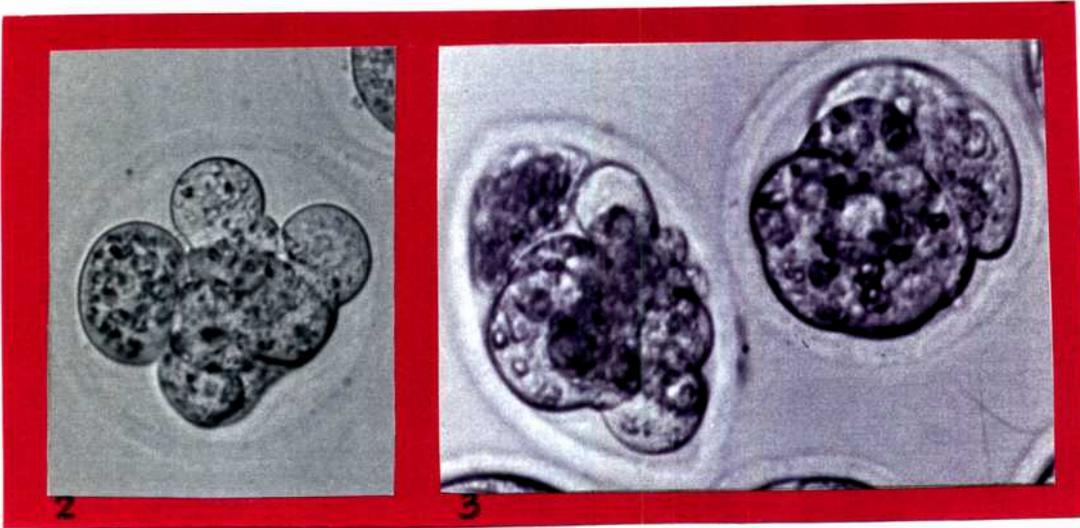
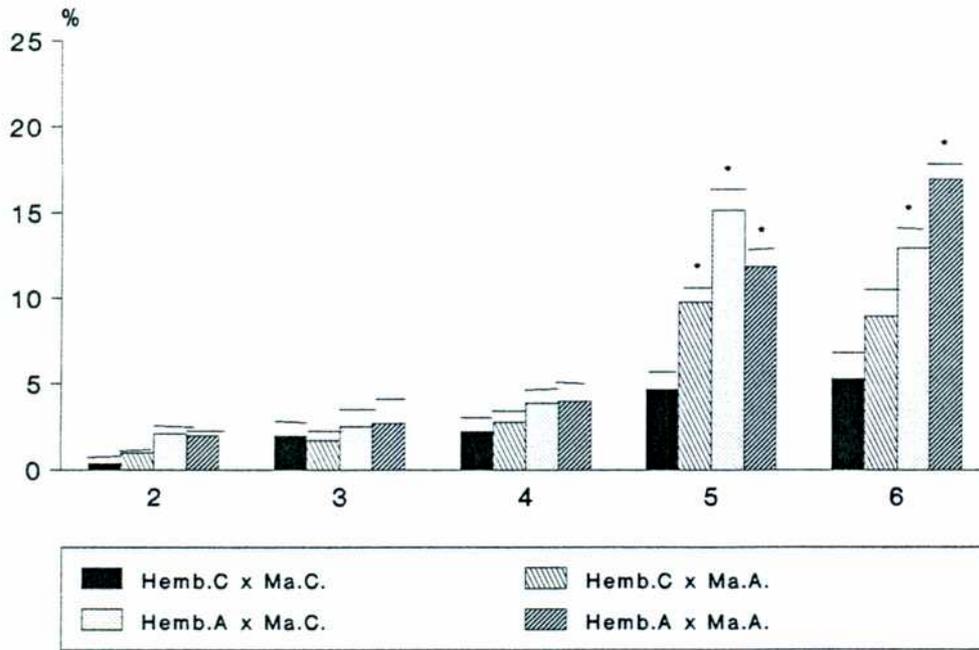


FIGURA III.31: Tasa de morfología anormal diaria.

III.31.A. Consumo de etanol al 10%.



III.31.B. Consumo de etanol al 5%.

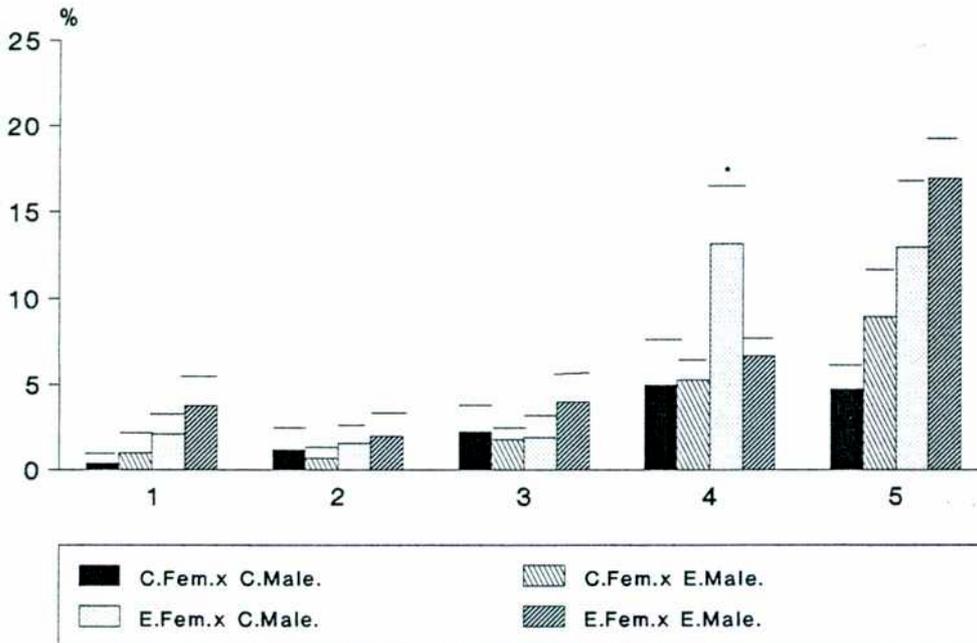
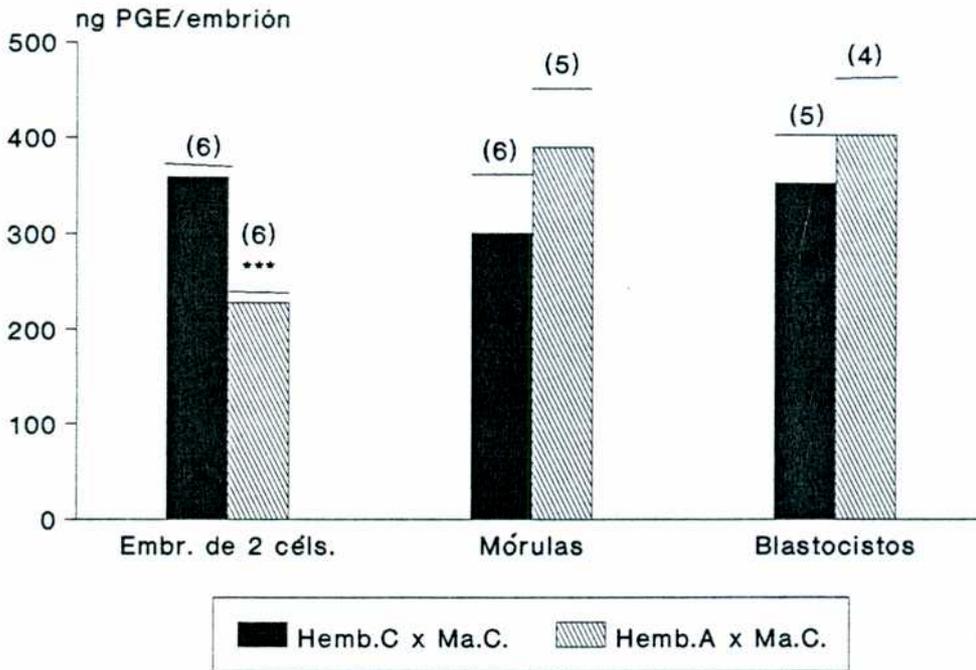


FIGURA III.32: Biosíntesis de PGE por embriones desarrollados in vitro.
Análisis en el consumo de etanol al 5%.



Los embriones obtenidos por FIV y cultivados en estufa se recuperaron y fueron incubados en Krebs para medir por RIA síntesis y liberación al medio de PGE. El número de animales utilizado se indica entre parentesis. ***: $p < 0.001$, test de Student't.

describiéndose este tipo como el "blastocisto implantativo", que fue mayoritariamente recuperado a las 98-99 hs posthCG del útero. Estos blastocistos presentaron más de 60-70 células. (Figura III.33 y 38). El número de animales utilizados está indicado en cada figura entre paréntesis. Los datos fueron analizados con el test de Student't.

5.2.1.a. Tasa embrionaria general diaria (Figura III.34).

Se calculó el porcentaje total de embriones recuperados: al día 2 (2 células), al día 3 (mórulas) y al día 4 (mórulas y blastocistos). Cuando las hembras fueron tratadas con etanol al 10% el porcentaje de embriones disminuyó significativamente al día 3 y 4 de preñez, comparando con el control (fig. III.34.A). Cuando las hembras fueron tratadas con etanol al 5%, solamente se observó una caída en la cantidad embrionaria al día 4 ($p < 0.05$) (fig.III.34.B).

5.2.1.b. Tasa de desarrollo por tipo embrionario.

Se quiso analizar cuáles embriones presentaban cantidades alteradas por día, para así detectar las diferencias presentes en el desarrollo *in vivo*.

A. Consumo de etanol al 10% (figura III.35).

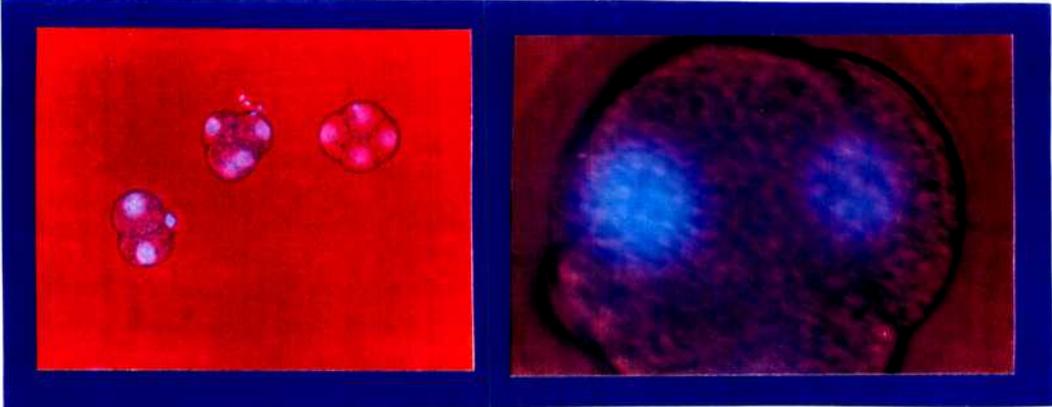
Al día 2, el porcentaje de embriones de 2 células del grupo A x C (hembras tratadas apareadas con machos controles) no fue diferente del control (figura III.35.A). Cuando se analizaron los porcentajes de embriones al día 3, se encontró que el grupo tratado A x C tuvo menor cantidad de mórulas compactadas que el control ($P < 0.001$), y porcentaje bajo de mórulas precompactadas semejante al control (III.35.B). Al día 4, se cuantificaron los embriones recuperados desde las 96 hasta las 98 hs posthCG, de modo de evidenciar modificaciones en el crecimiento en el corto término (3 hs). Así, se encontró que entre las 96 y 99 hs, el porcentaje de mórulas del grupo A x C estuvo aumentado comparando con el control ($p < 0.05$), mientras que el porcentaje de blastocistos extruídos fue significativamente menor que el control (III.35.C). Sin embargo, a las 98-99 hs posthCG, los mismos porcentajes y patrones de embriones se mantuvieron, aumentando las mórulas y los blastocistos no extruídos respecto del control, y porcentajes bajos de blastocisto "hatched" en A x C, comparando con el control ($p < 0.05$) (III.35.D).

Cuando se analizaron los tipos de blastocistos a las 98-99 hs posthCG, se vio que A x C (hembra tratada) alto porcentaje de blastocistos iniciales (con cavidad) respecto del control ($p < 0.01$), y disminución significativa de blastocistos extruídos sin cavidad (implantativos) comparando con el control (fig III.35.E).

FIGURA III.33: Tipología embrionaria en el desarrollo *in vivo* preimplantacional: aspectos morfológicos y viabilidad embrionaria.

DIA 2 Y 3.

Viabilidad embrionaria (observación de fluorescencia vital).



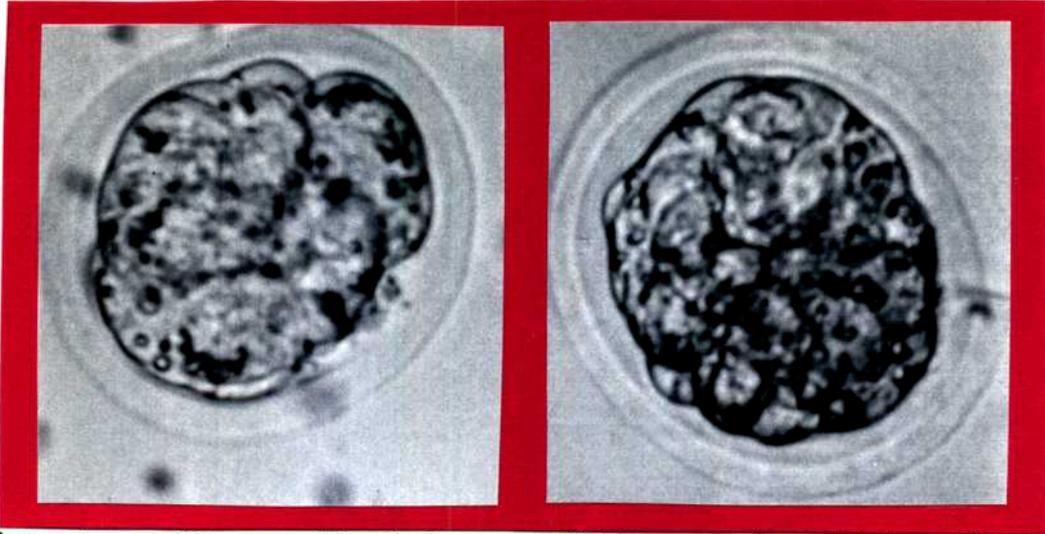
Mórulas: aspectos morfológicos (compárese con los obtenidos por desarrollo *in vitro*, fig.III.25).



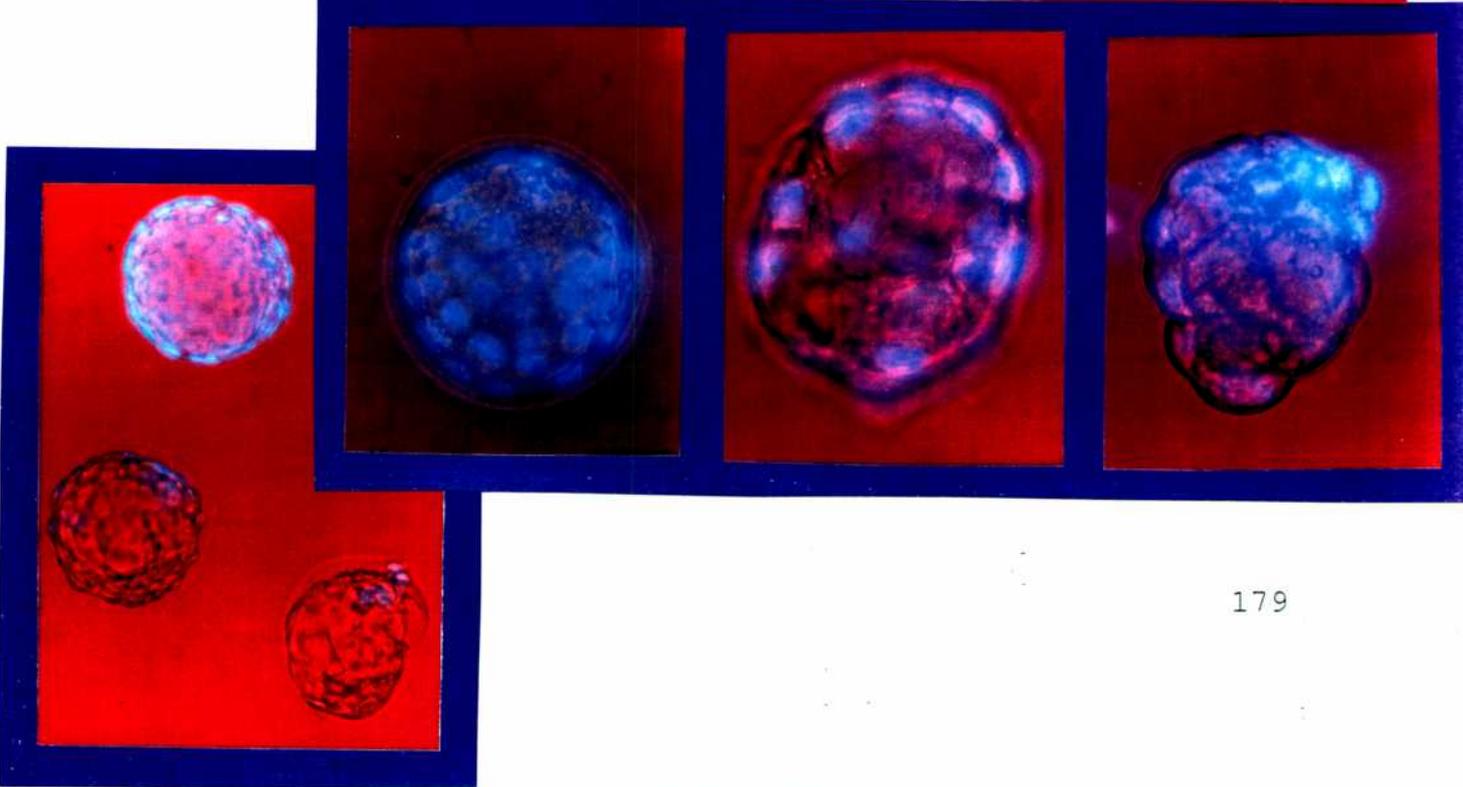
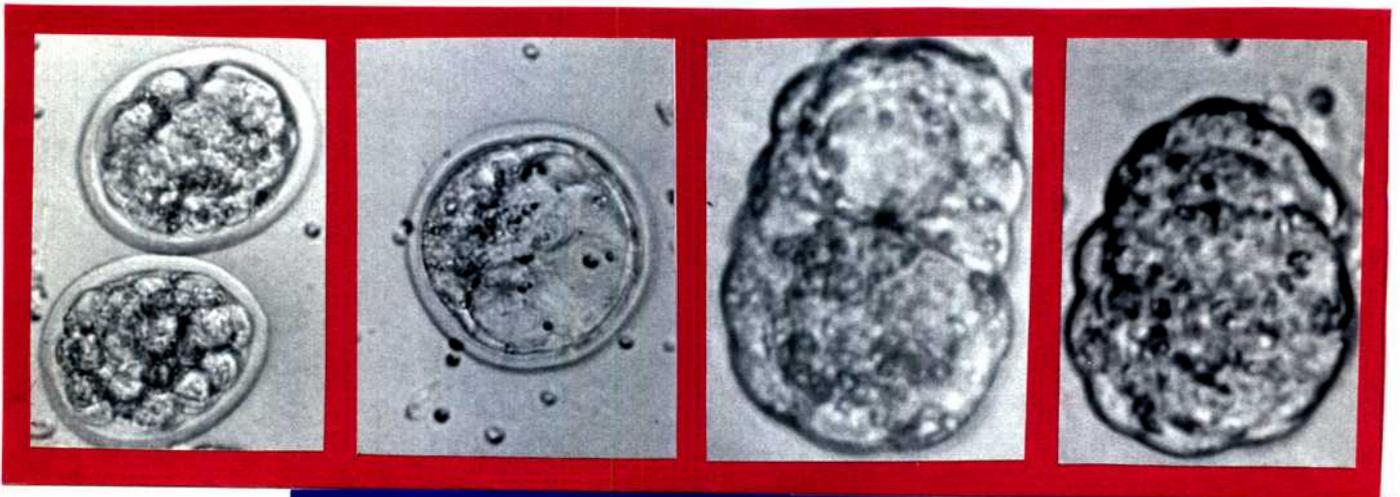
FIG.III.33.

DIA 4

Mórula compactada (dos estadios de desarrollo: b:tardía)



Blastocistos (expandidos, extruidos de la zona pelúcida, con y sin cavidad: morfologías y viabilidad)



B. Consumo de etanol al 5% (figura III.36).

El porcentaje de embriones de 2 células provenientes de A x C (hembras tratadas) fue similar al control (figura III.36.A). Al día 3 (III.36.B) la cantidad de mórulas compactadas esta decrecida en el grupo A x C, respecto del control, debido a que muchos embriones están en mórula precompactada (anterior) ($p < 0.05$). Al día 4, entre las 96-99 hs posthCG (III.37.C) aumentó el porcentaje de mórulas y blastocistos no extruidos en A x C respecto del control ($p < 0.05$), en detrimento del porcentaje de blastocistos extruidos o "hatched", que cayó significativamente. A las 98-99 hs posthCG (III.36.D), se obtuvieron en A x C elevada cantidad de blastocistos no extruidos respecto del control, el cual fue menor porque la mayoría de los embriones llegaron a ser extruidos de la zona pelúcida. Por eso, el porcentaje de blastocistos hatched del grupo A x C cayó significativamente comparando con el control, y fue menor aún que entre las 96-98 hs posthCG. Cuando se analizaron los tipos de blastocistos obtenidos, del porcentaje total de blastocistos no extruidos del grupo A x C, la mayoría quedaron en blastocistos iniciales (sin cavidad o muy tempranos y con cavidad), siendo los porcentajes significativos con el control (III.36.E). El porcentaje de blastocistos extruidos sin cavidad fue casi nulo en A x C, comparando con el control ($p < 0.001$).

. Conclusiones parciales: tasa de desarrollo diaria.

- Con el consumo de etanol al 10%, se produce un retraso y arresto en el crecimiento, acompañado por pérdida embrionaria importante desde el día 3, y dentro de las 3 hs que anteceden al comienzo de la implantación.
- Con el consumo de etanol al 5%, se produce retraso en el desarrollo *in vivo* desde el día 3 (mórulas), arresto en día 4 (blastocistos iniciales) y/o incapacidad de extrusión de la zona pelúcida a las 98-99 hs posthCG.

5.2.1.c. Distribución embrionaria utero-tubárica.

A las 98-99 hs posthCG, los embriones se recuperaron de los oviductos y los úteros por igual mediante lavados con medio. Se excluyeron los fragmentados y muertos.

Cuando las hembras fueron tratadas con etanol al 10%, la mayoría de los embriones fueron recuperados del útero, pero en menor porcentaje que en el control ($p < 0.05$) (Figura III.35.F). Con 5% de etanol, el porcentaje de embriones de los úteros del grupo A x C, también decreció respecto del control ($p < 0.05$), mientras que un aumento significativo se vio en los oviductos (Figura III.36.F).

Es de notar que el porcentaje de embriones recuperados del útero de hembras tratadas con etanol al 10% fue mayor que el porcentaje para las tratadas con etanol al 5%, aunque ambos valores fueron menores que los controles. Y esto se debió a que las hembras tratadas con etanol al 5% tuvieron sus embriones distribuidos también en el oviducto.

5.2.1.d. Tasa de fragmentación (figura III.37).

Con la administración de etanol al 10%, el porcentaje de embriones fragmentados y/o necróticos de A x C resultó significativamente mayor que el del control en los días 3 y 4 de desarrollo (III.37.A). Cuando las hembras se trataron con etanol al 5%, no se vieron diferencias en la cantidad de fragmentados respecto de los controles durante los días 2 y 3 de desarrollo, pero si hubo un incremento significativo en la tasa de fragmentación de día 4 (III.37.B).

. Conclusiones parciales: tasa de fragmentación *in vivo*.

Estos resultados demostrarían que la administración de etanol al 10% tiene mayor severidad para el desarrollo *in vivo* de día 3 y 4, indicando que ocurre pérdida embrionaria en la etapa preimplantatoria, mientras que el etanol al 5% produciría retraso y arresto en el crecimiento con pérdida embrionaria menos acentuada y más tardía.

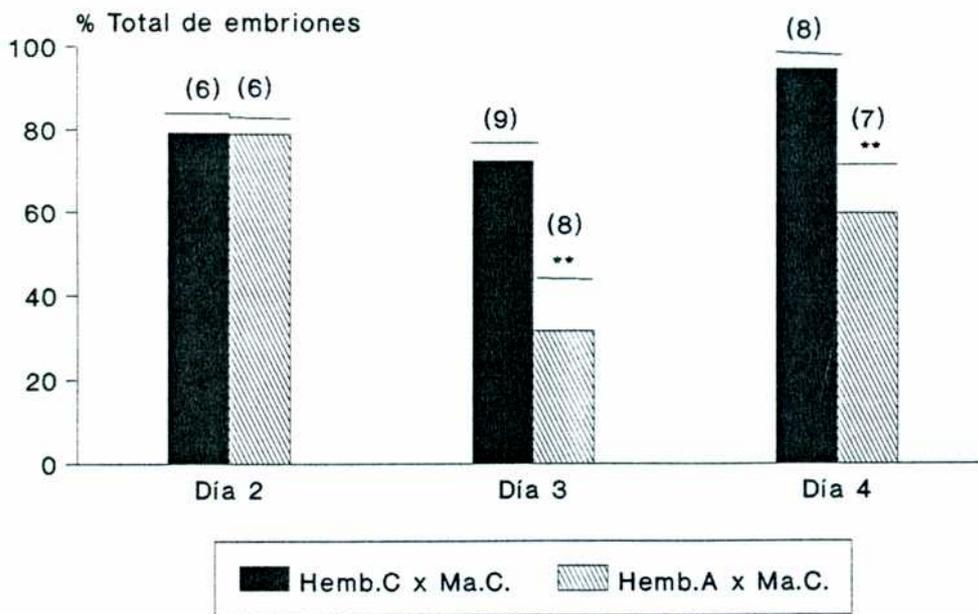
5.2.1.e. Número de núcleos embrionarios e índice mitótico.

Con el fin de establecer si los embriones de día 3 y 4 de las hembras tratadas con *etanol al 10%* presentaban alteraciones en el crecimiento individual, se midió el número de células (o núcleos) por embrión en mórulas y blastocistos de ambos días (Figura III.38). Al día 3 (tabla III.14), cada mórula obtenida en el grupo A x C mostró menor número de células, en promedio, que el control ($p < 0.05$). A pesar que la media de mitosis por embrión y el porcentaje de embriones con mitosis en A x C no fue diferente del control, se encontró que el índice mitótico fue significativamente mayor que en el control. Es decir, de la cantidad total de núcleos contados, el número de mitosis (metafases) halladas fue mayor en A x C.

Estos resultados demuestran que, a pesar del aspecto normal de las mórulas del grupo A x C, el tratamiento produjo embriones con menor crecimiento (número de núcleos), y que siendo mayor el índice mitótico, la división celular esta retrasada respecto del control.

FIGURA III.34: Tasa embrionaria general diaria.

III.34.A: Consumo de etanol al 10%.



III.34.B: Consumo de etanol al 5%.

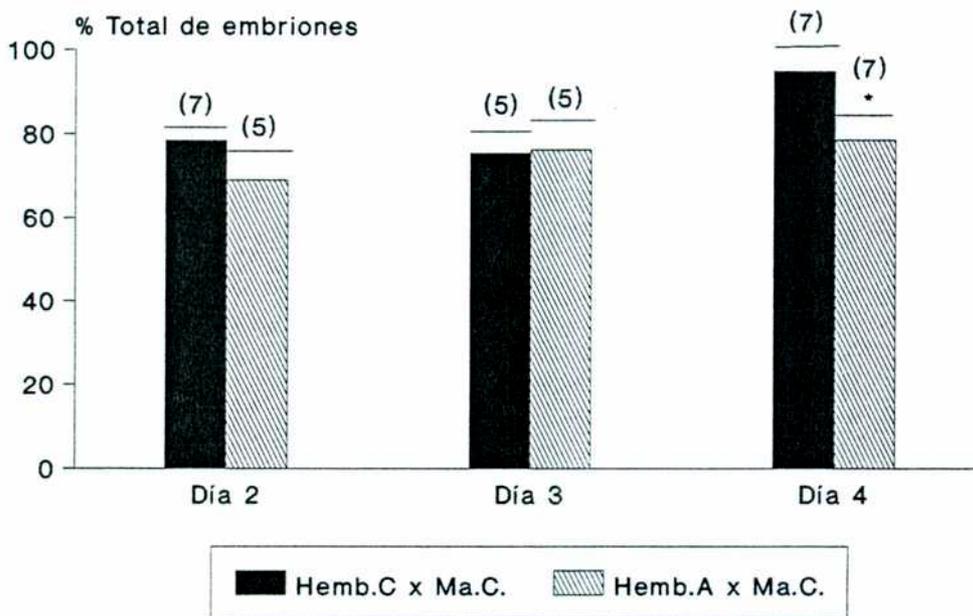
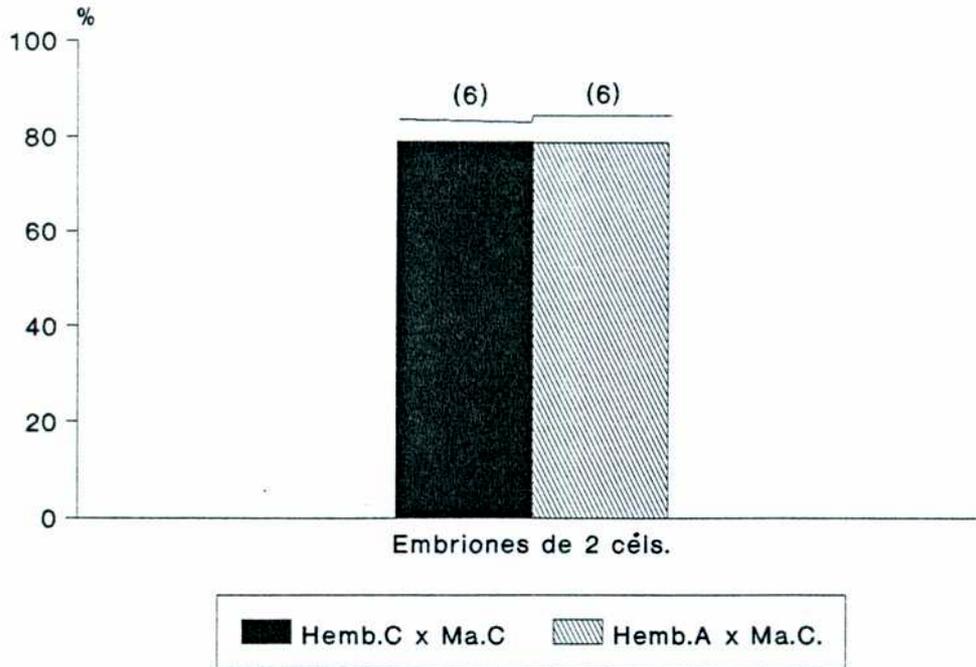
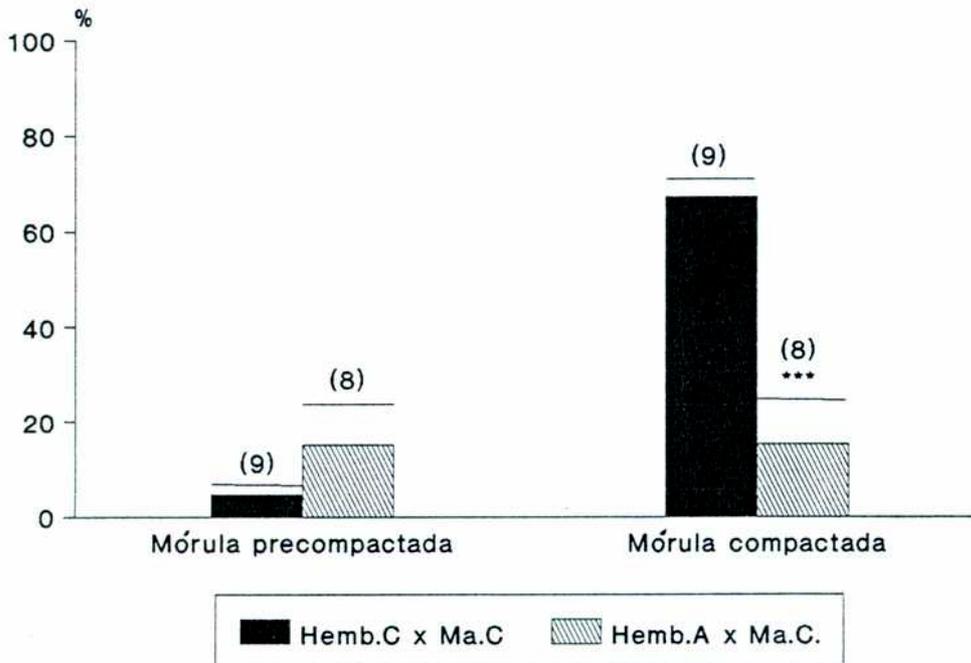


FIGURA III.35: Cuantificación del desarrollo *in vivo* en el consumo de etanol al 10%.

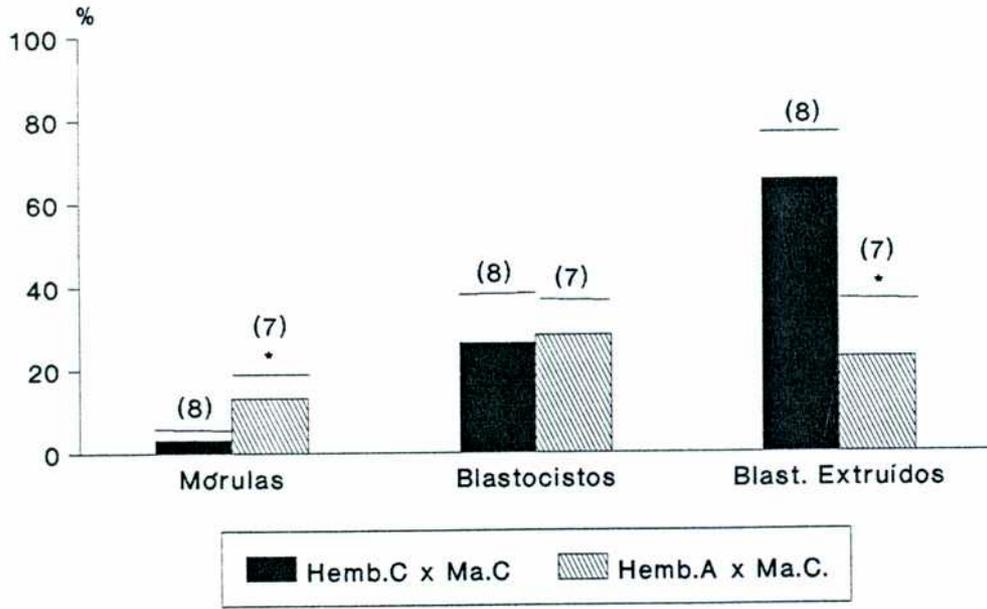
III.35.A: DIA 2



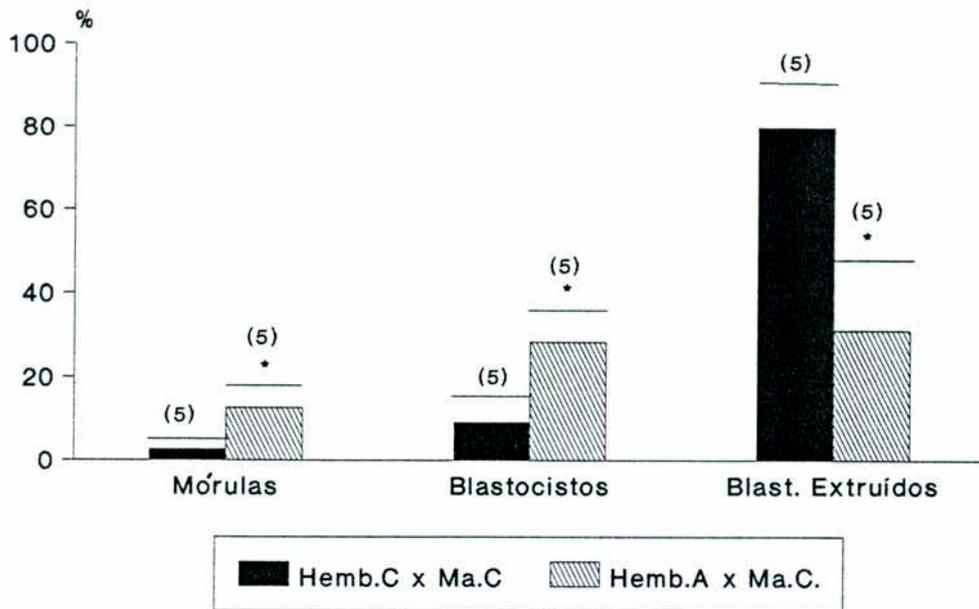
III.35.B: DIA 3



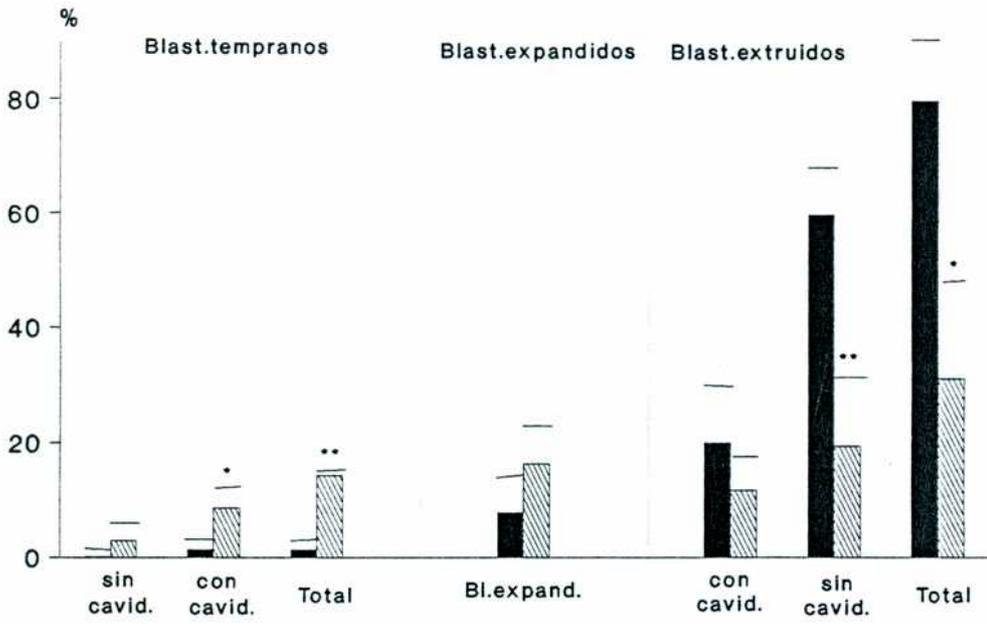
III.35.C: DIA 4: 96-99 hs posthCG.



III.35.D: DIA 4: 98-99 hs posthCG.



III.35.E: DIA 4: tipos de blastocistos en las 98-99 hs posthCG.



III.35.F: Distribución embrionaria utero-tubárica a las 98-99 hs posthCG.

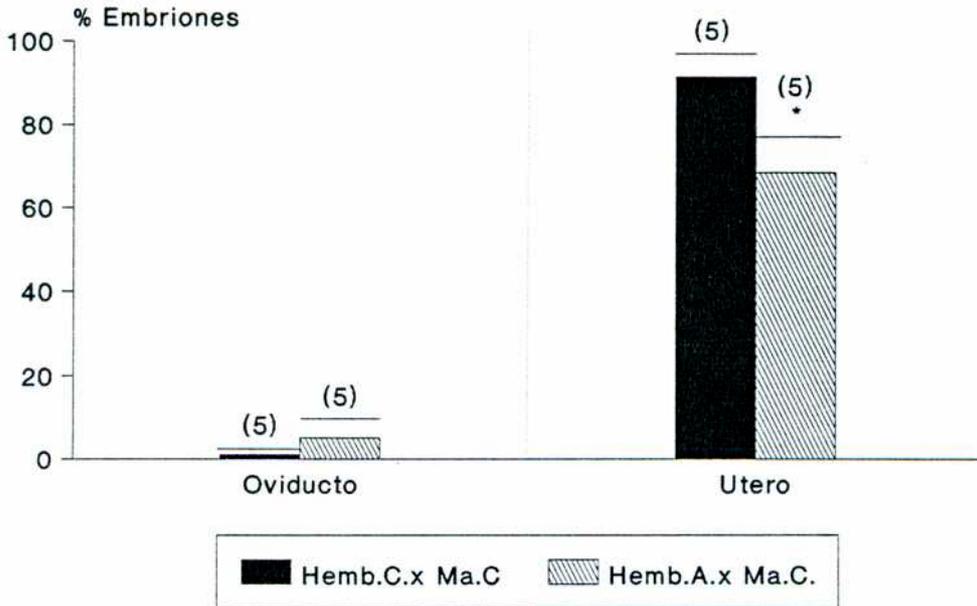
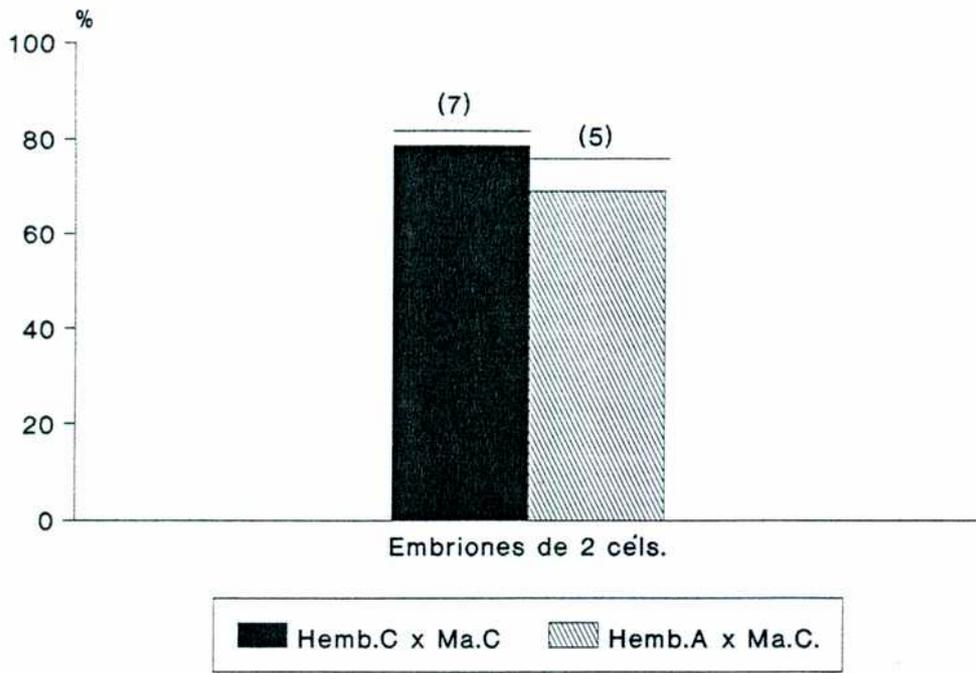
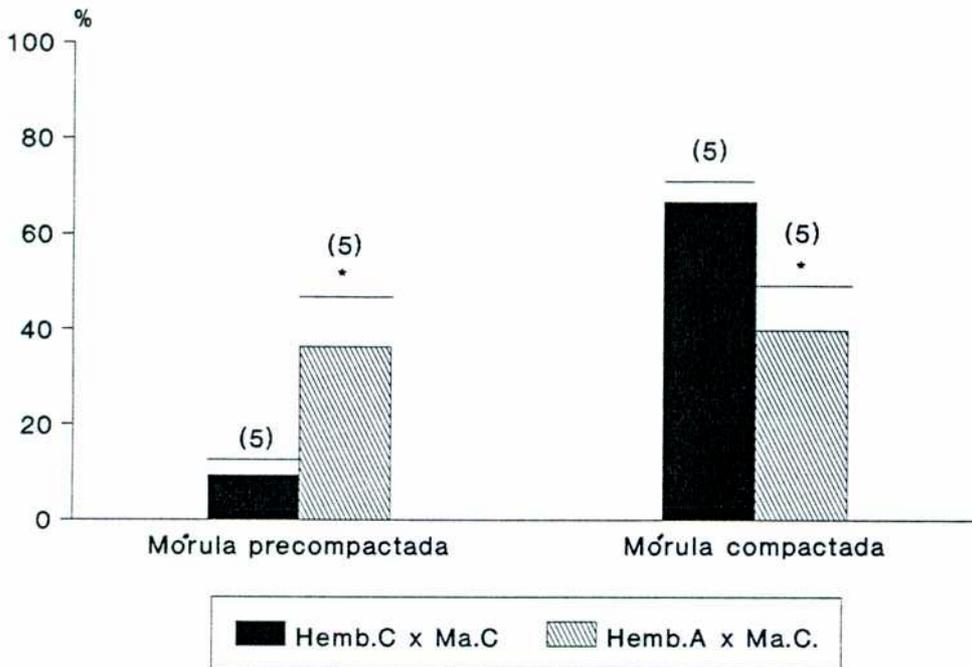


FIGURA III.36: Cuantificación del desarrollo *in vivo* en el consumo de etanol al 5%

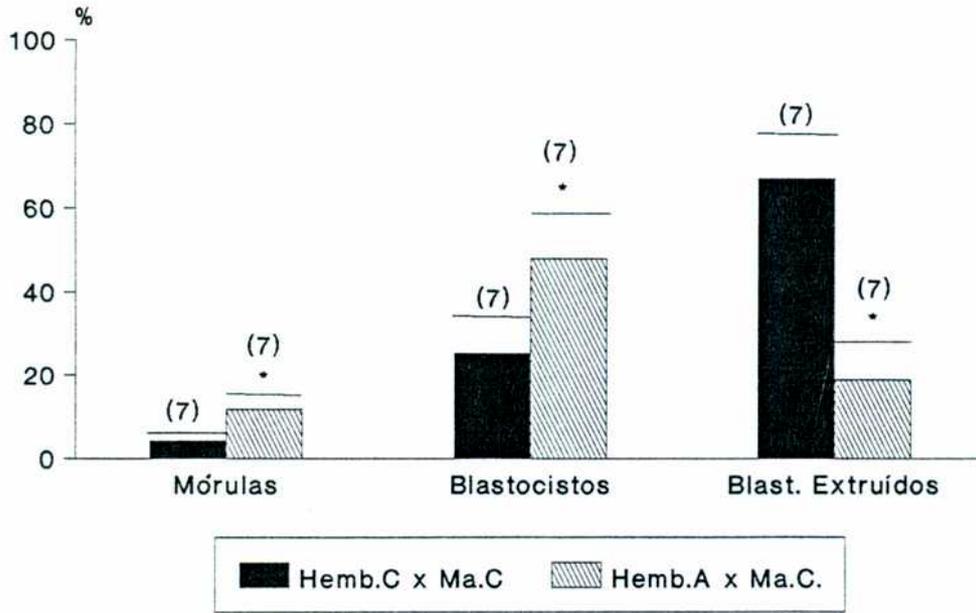
III.36.A: DIA 2



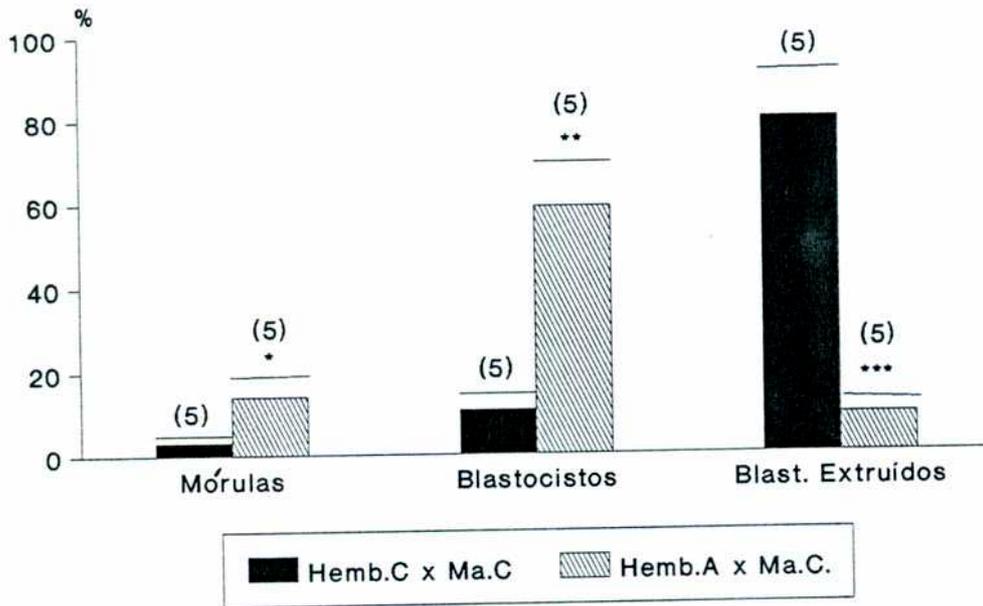
III.36.B: DIA 3



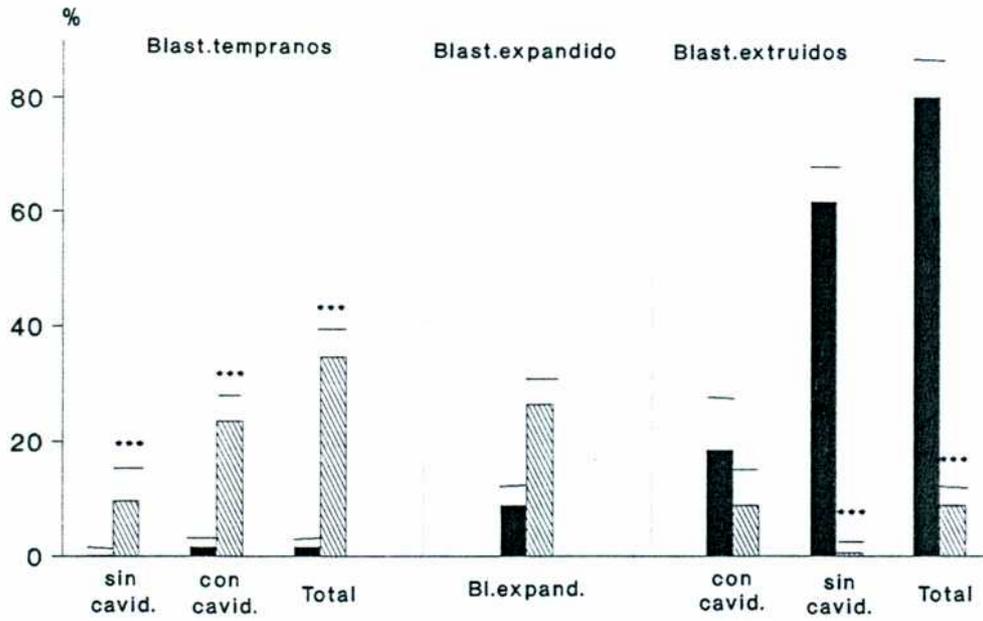
III.36.C: DIA 4: 96-99 hs posthCG.



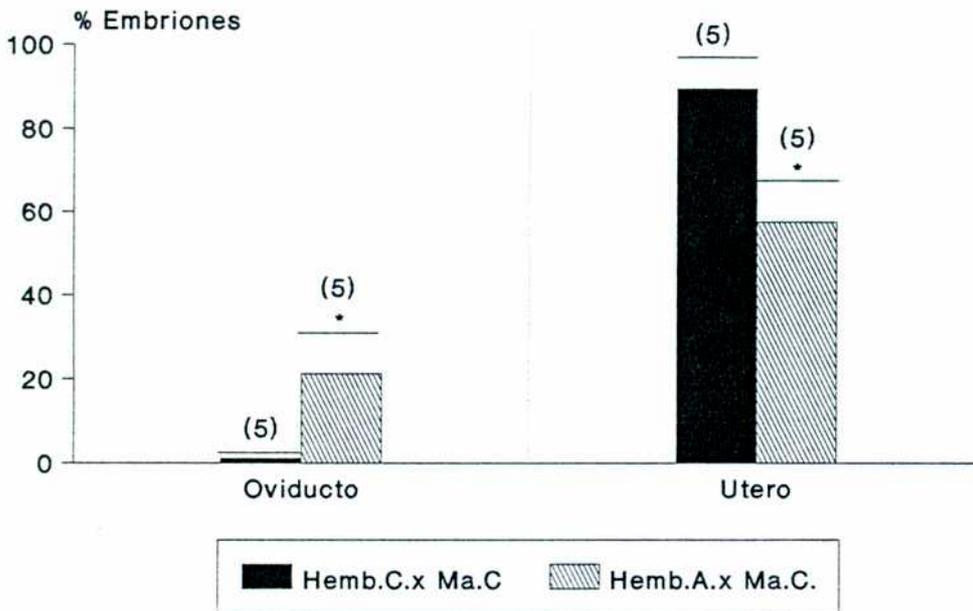
III.36.D: DIA 4: 98-99 hs posthCG



III.36.E: DIA 4: tipos de blastocistos en las 98-99 hs posthCG.



III.36.F: Distribución embrionaria utero-tubárica a las 98-99 hs posthCG.



Al día 4 (figura III.39), se encontraron en A x C altos porcentajes de embriones con 30-40 células por embrión, respecto de los controles, mientras que el porcentaje de embriones con más de 60 céls. fue significativamente menor que el control. **Esto indicaría disminución en el crecimiento y escaso desarrollo embrionario.**

5.2.2. Aspectos cualitativos.

5.2.2.a. Morfología embrionaria y viabilidad.

De modo de definir si el consumo de *etanol al 10%* también producía anomalías morfológicas semejantes a las del desarrollo *in vitro*, los embriones recuperados se observaron con microscopía de contraste de fase y/o bajo fluorescencia (luego de tinción con Hoechst 33342) para probar la viabilidad embrionaria (figura III.33).

Se obtuvo elevado porcentaje de embriones de 2 células normales al día 2 en A x C respecto del control ($p < 0.05$), y al día 4 la morfología anormal fue la predominante en este grupo (figura III.40). Al analizar la viabilidad, se encontró que la mayoría de los embriones (inclusive aquellos con fragmentaciones) del grupo A x C estuvieron vivos al momento de su recuperación, no habiendo diferencias con el control.

5.2.2.b. Biosíntesis de PGE (figura III.41).

Se midió la capacidad de síntesis de prostaglandina producida por embriones de día 2, 3 y 4 provenientes de hembras tratadas con etanol al 5%. Se vio una disminución significativa en la cantidad de PGE sintetizada por embriones de 2 células y blastocistos del grupo A x C, comparando con el control.

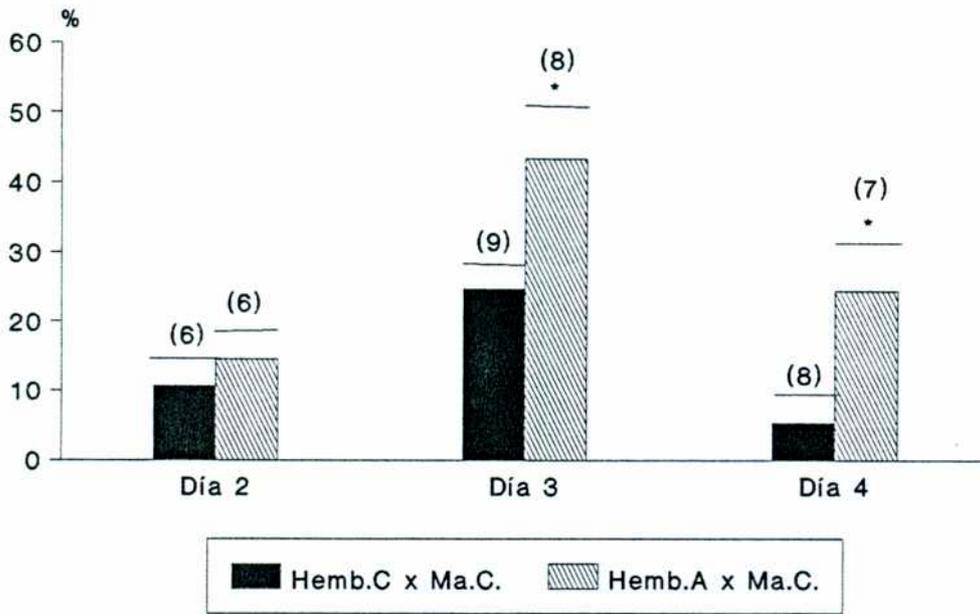
. Conclusiones parciales: aspectos cualitativos del desarrollo in vivo.

- Con el consumo de etanol al 10%, las hembras mostraron aumento de embriones morfológicamente anormales, de 2 células y blastocistos.

- Con el consumo de etanol al 5%, los embriones de 2 células y blastocistos desarrollados *in vivo* sintetizaron menores cantidades de PGE.

FIGURA III.37: Tasa de fragmentación embrionaria diaria.

III.37.A: Consumo de etanol al 10%.



III.37.B: Consumo de etanol al 5%.

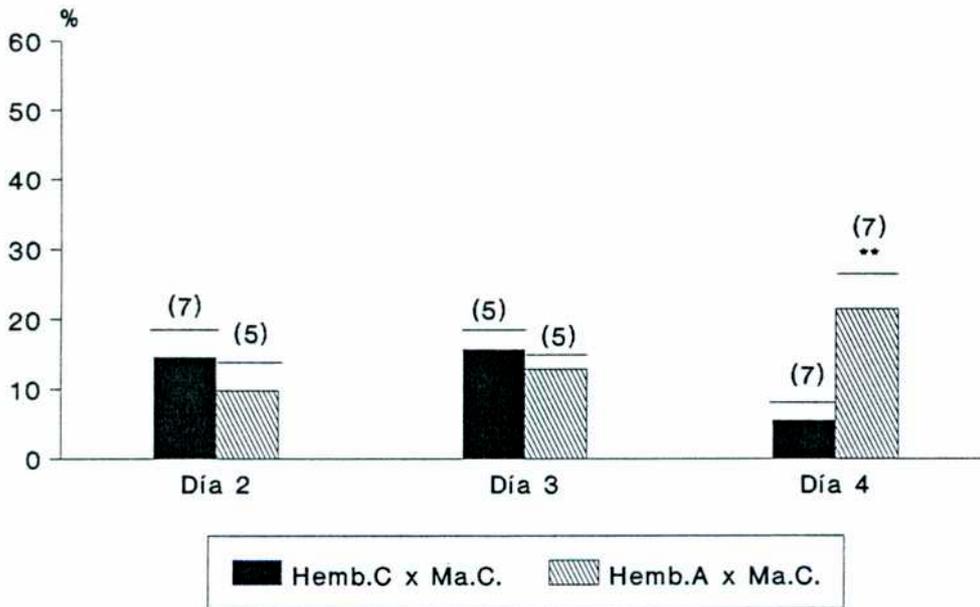
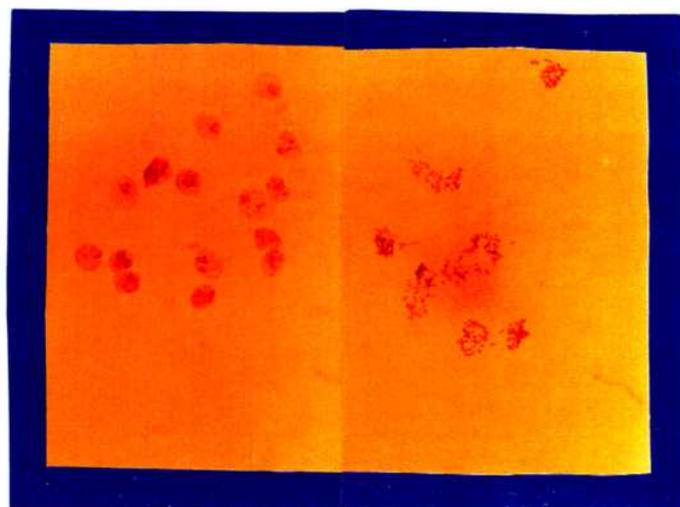
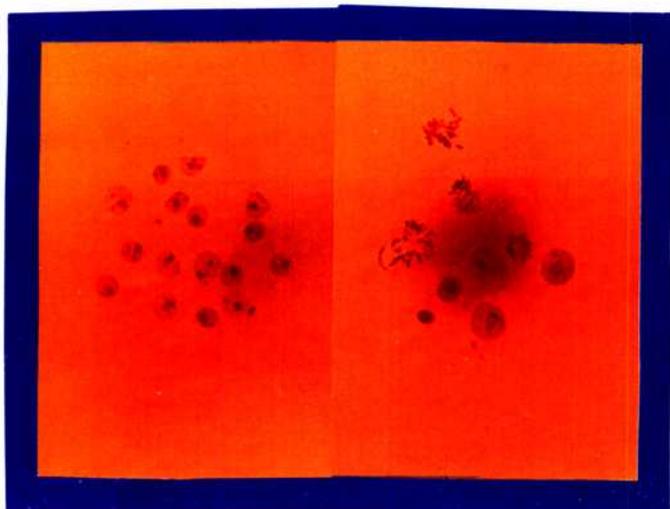


FIGURA III.38: Núcleos embrionarios: núcleos interfásicos y células en división (metafases).

Embriones de día 3:

Hembra Control x Machos Controles.

Hembra Alcohólica x Machos Controles



Embriones de día 4.

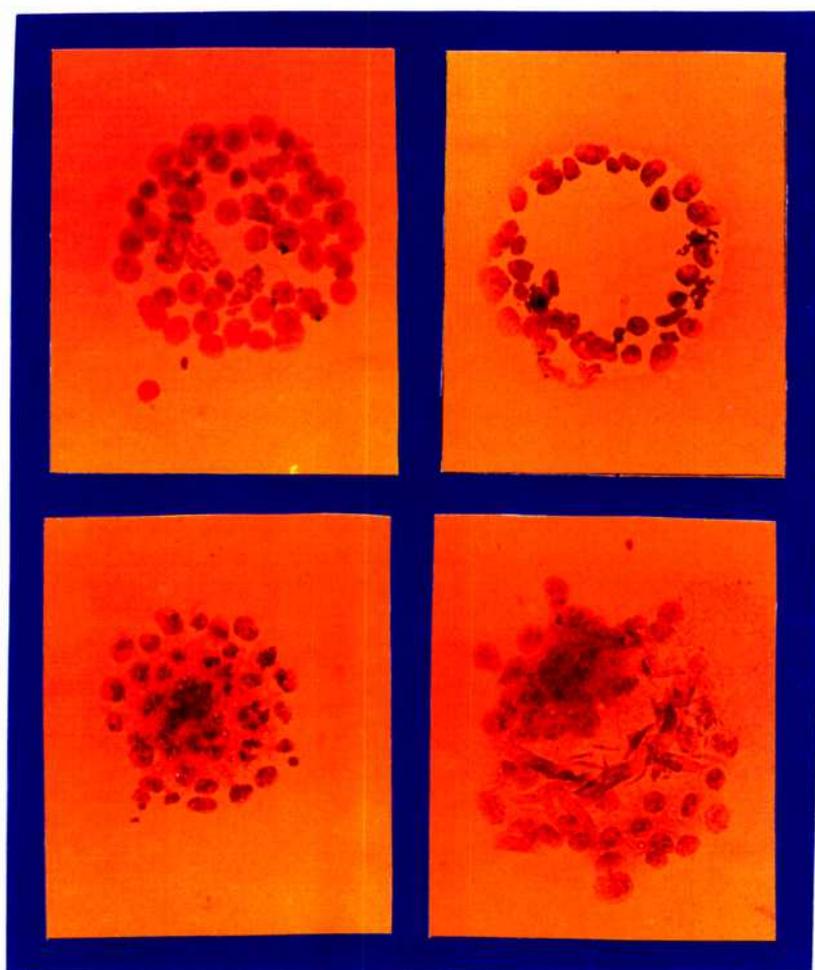
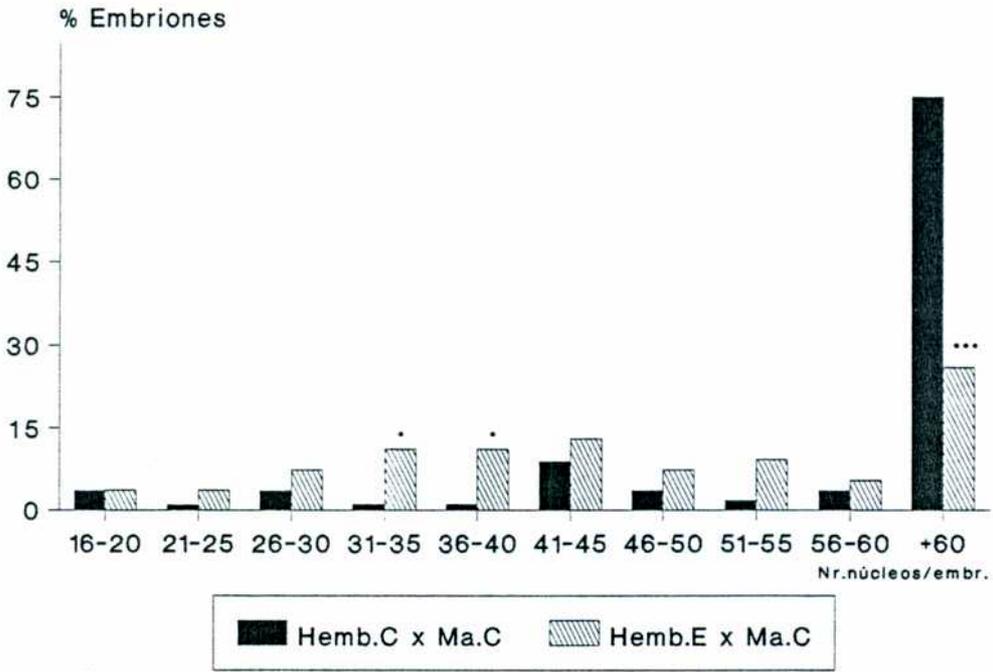


TABLA III.14: Análisis del número nuclear en embriones de día 3 (mórulas), con etanol al 10%.

Grupo	N	Células/Embr	Mitosis/Embr	Embr con Mitosis (%)	Indice Mitótico
C x C	60	13.2 ± 0.5	0.8 ± 0.2	21/60 (35%)	49/781 (0.06)
A x C	39	11.4 ± 0.6 *	1.1 ± 0.3	16/39 (41%)	42/447 (0.09)*

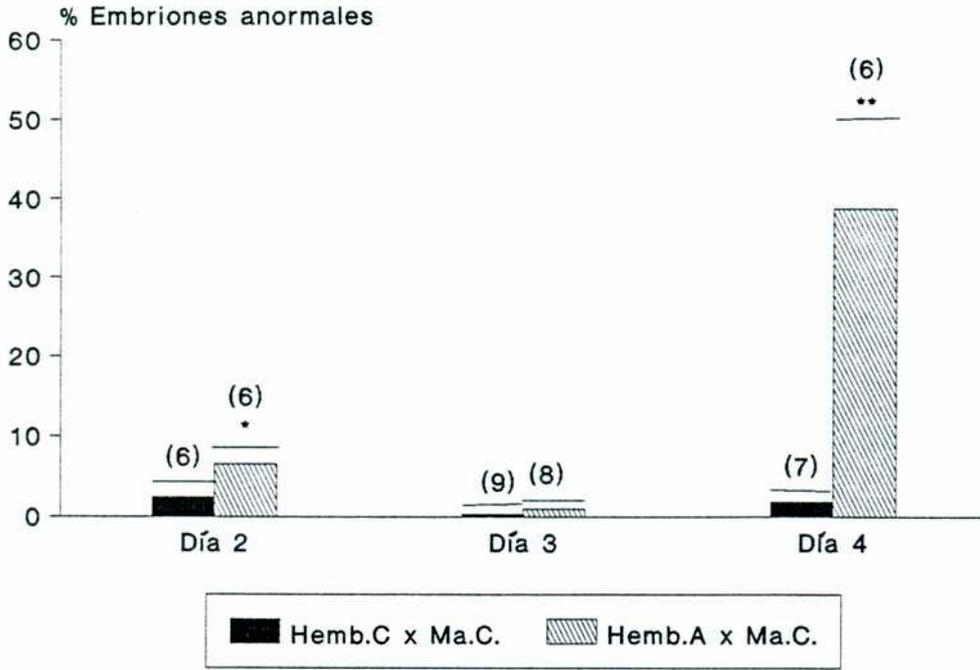
Todos los embriones fueron aislados a las 74-76 hs posthCG. Cada mórula fue analizada con la técnica de tincién nuclear de Tarkowski, en cuanto al número de núcleos interfásicos y mitóticos (con metafases). Se calculó el IM (índice mitótico) como nro.total de metafases/nro.total de núcleos, utilizando el test X^2 . Para el grupo control (C x C) se utilizaron 6 hembras (número de embriones recuperados: 97), para el grupo de hembra tratada (A x C) se utilizaron 4 hembras (nro. de embriones recup.:61). El promedio de células (céls.) y de mitosis (mit.) por embrión (embr.) fue calculado con su error (SEM), siendo N el número de embriones analizados (test de Student't). *: $p < 0.05$.

FIGURA III.39: Cuantificación de núcleos en embriones de día 4 (etanol al 10%).



La cantidad total de núcleos por embrión fue determinada en un total de embriones analizados. Se aplicó el test de X^2 . *: $p < 0.05$.

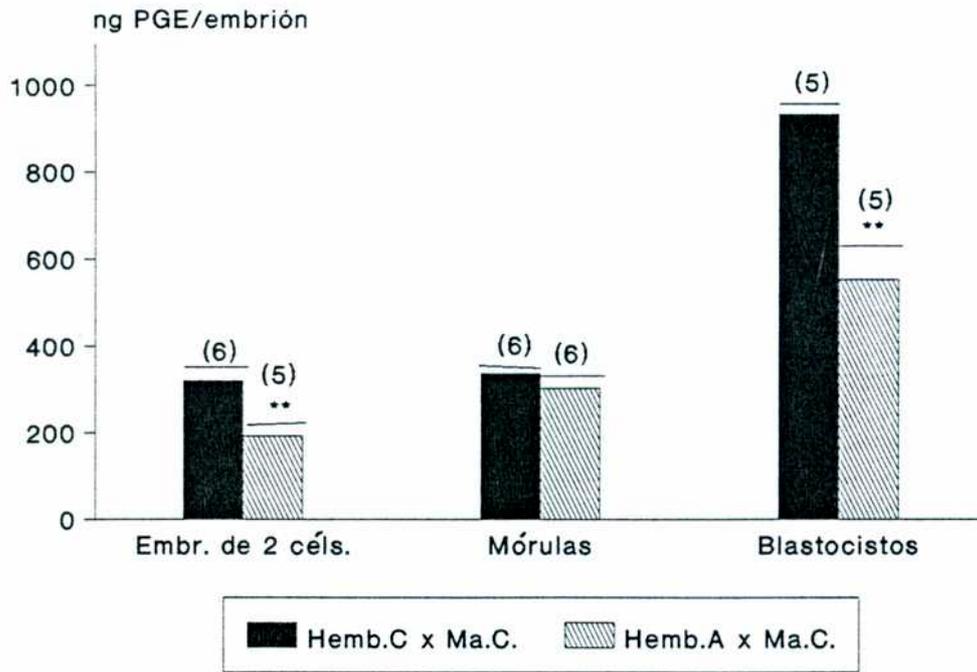
FIGURA III.40: Tasa de morfología anormal, con etanol al 10%.



Los embriones recuperados del útero y/o del oviducto fueron colocados en medio limpio para ser observados bajo microscopía de contraste de fase y de fluorescencia.

*: $p < 0.05$, test de Student't.

FIGURA III.41: Biosíntesis de PGE en el desarrollo *in vivo*, con etanol al 5%.



Los embriones recuperados de las hembras controles y tratadas con etanol al 5%, fueron incubados en medio Krebs, para determinar por RIA la síntesis de PGE liberada al medio al cabo de 1 h. *:p<0.05, **:p<0.01, test de Student't.

CAPITULO IV

DISCUSION

Los factores genéticos (anormalidades cromosómicas o genes mutantes (15%) y/o los factores ambientales (10%) son responsables de la mayoría de las malformaciones congénitas, y juntos involucran una herencia multifactorial (20-25%) (Nelson, 1994; Sadler, 1995; Webster y col., 1993). Mientras que la causa de la mayoría de las malformaciones (40-60%) no se conocen, hay bastante evidencia acerca de los defectos de nacimiento humano conectados con el consumo de drogas o químicos, como el etanol, durante la preñez (Nelson, 1994; Mirmiran y Boer, 1988; Webster y col., 1993). La mayoría de los estudios sobre alcoholismo en la reproducción se orientaron a estudiar los efectos crónicos o agudos en diferentes períodos de la gestación. Es así que se ha descrito el síndrome de alcoholismo fetal (FAS) fundamentalmente dado por la ingesta fuerte durante la organogénesis embrionaria. Sin embargo, pocos datos se tienen acerca de la toxicidad del consumo de alcohol en períodos pregestacionales, o los efectos sobre las gametas y la posible herencia en el desarrollo embrionario.

Generalmente, el ratón proveyó un modelo experimental adecuado para dilucidar los efectos embrio-fetotóxicos del etanol. Así, se han utilizado las gametas de ratón, sus embriones y al mismo animal, ya que es un buen modelo para el desarrollo embrionario (Anderson y col., 1978, Anderson y col., 1980a). Por eso, los animales utilizados ((C57 CBA)F1) fueron expuestos a dosis de etanol en el agua de bebida en forma crónica previo a la concepción. El presente estudio fue llevado a cabo con hembras prepúberes (30 días) al comienzo de los tratamientos, para establecer si se afectaba la maduración sexual, la calidad de la gameta y la capacidad fecundante. Como se han descrito estudios con macho prepúberes tratados con regímenes crónicos de etanol, en este trabajo se utilizaron machos adultos. Esto también permitió establecer una variable fija para analizar más profundamente los efectos del etanol sobre la gameta y la herencia femenina.

1. Intoxicación

Como datos adicionales a este estudio, se investigó el grado de intoxicación de los animales, por lo cual se midió la ingesta, las calorías consumidas, el peso corporal y la alcoholemia. Las hembras tratadas con 5 o 10 % de etanol beben cantidades menores que las controles, y la falta calórica es completada con mayor consumo de alimento sólido. Esto se vio bien representado en la hembra tratada con etanol al 10%, donde la cantidad de calorías derivadas del etanol (%EDC) fue del 27%. Las hembras tratadas con etanol al 5% mostraron un consumo calórico (% EDC) del 11.7%, siendo este valor insuficiente para definir una mayor ingesta sólida.

El consumo observado en los machos adultos siguió el mismo patrón que el de las hembras. A pesar que hay una relativa reducción en el consumo de etanol al 10%, los % EDC fueron similares a los de las hembras, porque los machos consumieron menos alimento que las hembras. Se pudo ver que la cantidad total de etanol ingerido por hembras y machos tratados

con etanol al 5% fue similar, pero con el 10% los machos consumieron muchos menos etanol que las hembras. Estos resultados indicarían que el grado de consumo depende de varios factores: la edad de los animales durante la cual fueron expuestos, del sexo del individuo, la concentración de la droga utilizado (a igual período y tiempo de exposición). Las dosis de etanol administradas produjeron grados de alcoholemia muy bajos, casi indetectables. Es así, que con 10% de etanol la alcoholemia de los machos fue del orden de 40-60 mg/dl al cabo de los 30 días de intoxicación. Es importante destacar que, dado que la mayoría de los estudios previos se realizaron con regímenes que producen altas alcoholemias, las patologías humanas asociadas al consumo de alcohol necesitan ser definidas en cuanto a las dosis mínimas adversas, y especialmente, se necesita información de los efectos en los rangos bajos de alcoholemia (50-100 mg/dl).

El alcoholismo generalmente esta acompañado de malnutrición, siendo esta uno de los factores que afecta el crecimiento fetal y el desarrollo (Henderson y Schenker, 1977, Ouellette y col., 1977, Clarren y Smith, 1978, Phillipps y col., 1989, Schenker, 1990). Los resultados presentados en este trabajo de tesis, y el análisis de la intoxicación (consumo, alcoholemia, peso corporal) demuestran que las alteraciones reproductivas encontradas no se debieron a los efectos de la desnutrición, sino que las respuestas se pueden atribuir a la exposición con etanol, en diferentes dosis. Estudios epidemiológicos mostraron que la dieta no contribuye en forma importante al desarrollo del síndrome de alcoholismo fetal (FAS) (Ouellette, 1977), y que los hijos de mujeres no alcohólicas malnutridas no presentaban las características craniofaciales y las anomalías congénitas propias del FAS. En el presente estudio, la exposición crónica de etanol al 5% no produjo reducción de peso en los machos tratados, pero en las hembras se observó una caída en el último día del tratamiento. Con etanol al 10%, los machos presentaron disminuciones relativas fluctuantes en el peso corporal, comparando con los controles. En las hembras tratadas con el 10%, ocurrió lo mismo que con las tratadas con el 5% de etanol (el peso cayó el último día). Hay que remarcar que la cantidad de energía calórica total consumida fue similar en machos y hembras tratadas respecto de los controles, con ambas dosis. Los efectos observados son atribuibles a la ingesta del etanol en sí mismo y/o a su metabolito el acetaldehído.

2. Efectos sobre la gameta femenina.

Se comenzó con el estudio de los efectos del consumo crónico de etanol, en dosis moderada primero y luego bajas, sobre la gameta femenina de hembras prepúberes en su etapa de crecimiento y maduración sexual.

Los estudios sobre los efectos del consumo crónico de alcohol sobre la función femenina, realizados con diferentes modelos, arrojaron resultados muy diversos y algunos dispares, por lo

que se establece que las acciones del etanol dependen de la ruta de administración, la dosis de etanol, el tiempo y frecuencia de la exposición, las variables individuales (peso, edad, sexo, genética) y otros.

Las hembras tratadas con etanol al 10% en estos estudios, debieron tener alcoholemias del orden de los 50-60 mg/dl. La mayor anormalidad observada en mujeres con alcoholemias entre 27 y 233 mg/dl fueron ciclos anovulatorios caracterizados por pequeños incrementos en los niveles de estrógenos, ausencia de pico de LH, falta de incremento de progesterona plasmática y persistente hiperprolactinemia (Mendelson y Mello, 1988). La administración intragástrica de 4-8 g/kg de peso diario de etanol (20% m/v) por 12 días consecutivos produjo ciclo estral anormal en las ratas hembras. Desde que los niveles de LH plasmática no cambiaron en estos estudios, los autores sugirieron que, con alcoholemias de 50-100 mg/dl, el etanol actúa sólo como una toxina gonadal directa (Eskay y col., 1981). También, se ha visto que cuando se administró etanol que produjo 36% del total calórico (%EDC) (con alcoholemia de 110 mg/dl), el peso ovárico fue reducido en 60% en ratas hembras tratadas con alcohol comparando con las controles (Van Thiel y col., 1978).

En este modelo de alcoholismo, cuando las hembras se trataron con etanol al 10% (27% EDC), la maduración folicular sufrió un retraso, que se evidenció a las 16 hs posthCG, para luego producirse la ovulación. Este hecho está sostenido por el incremento de ovocitos foliculares solamente a las 16 hs posthCG, y disminución de los ovulados.

A las 14 hs posthCG, pocos ovocitos se ovularon en las hembras tratadas comparando con los controles. La tasa ovulatoria decreció solamente a las 16 hs posthCG en las hembras tratadas porque una alta cantidad de ovocitos se retuvo en los folículos maduros.

Estudios previos (Ramalay, 1982; Les Dees y Skelley, 1990) demostraron que el consumo de etanol retrasa el establecimiento de la pubertad en ambos sexos. Los efectos deletéreos del consumo de etanol por largo término en ratas hembras inmaduras, incluyó retraso en la apertura vaginal, y menor peso ovárico y uterino (Bo y col., 1982). Estos efectos fueron asociados con deficiencia de secreción de GH y LH (Ojeda y col., 1986), cuando los niveles de alcohol en la sangre fueron de 134 mg/dl. Los autores sugieren que los efectos supresores del etanol consumido crónicamente, sobre la superovulación, pueden ser debidos a fallas a nivel de las funciones hipotálamo-hipofisarias (Bo y col., 1983; Sundberg y col., 1987).

En el presente estudio, la liberación de los ovocitos de las hembras controles es a las 14-16 hs posthCG, y a las 20 hs todos los ovocitos fueron ovulados. Sin embargo, en las hembras tratadas con etanol al 10%, la ruptura folicular fue afectada pues ovularon más tarde (20 hs posthCG).

Aunque en las hembras tratadas con 10% de etanol el número de ovocitos oviductales a las 20 hs fue similar al del control, se pudo demostrar, luego estudiando la calidad ovocitaria, que este retraso en la ruptura folicular produce alteraciones morfológicas y otras en los ovocitos.

También, con el tratamiento con etanol al 5%, se produjo una caída en la tasa ovulatoria a las 16 hs posthCG, comparando con los controles, mientras que con el 2.5% de etanol las hembras tratadas no mostraron índices de alteración en la ovulación. **El 5% de etanol fue la dosis mínima que afectó la tasa ovulatoria.**

Los efectos de la administración crónica de etanol sobre los ovocitos es poco conocida. Por eso estudiamos las alteraciones en la **respuesta cualitativa** a la inducción ovulatoria.

Normalmente, un ovocito inmaduro llega al estadio maduro, en el cual se presenta con el primer cuerpo polar (I CP) y arrestado en metafase II. Luego de la acción de un estímulo, puede ocurrir activación espontánea, y el ovocito maduro o intacto pasa al estado haploide con la expulsión del segundo cuerpo polar (II CP). Entonces, puede continuar al estadio de embrión de 2 células o fragmentarse y/o lisarse, proceso este último de necrosis (muerte celular) que puede ocurrir independientemente de la fragmentación. También, alteraciones morfológicas pueden aparecer en los ovocitos maduros, que los conducen a la fragmentación. Cuando los ovocitos son activados por la exposición directa del etanol, pueden continuar el desarrollo por cuatro vías de activación, una de las cuales produce ovocitos con extrusión del II CP y formación de 1PN. Por otro lado, anomalías morfológicas del ovoplasma y fragmentación citoplasmática puede ocurrir en los ovocitos activados partenogénéticos, lo cual sugiere que la apoptosis es un proceso relacionado con la partenogénesis (Takase, K. y col., 1995). La activación partenogénica también fue descrita en ovocitos humanos (Pickering y col., 1988; Winston y col., 1991). Estos ovocitos se pueden dividir y desarrollar hasta estadios de postimplantación antes que falle la preñez (Kaufman, 1973).

A las 14 hs posthCG, se encontró en las hembras tratadas con etanol al 10%, un alto porcentaje de ovocitos oviductales inmaduros, junto con disminución de los fragmentados, posiblemente debido a que los ovocitos inmaduros se fragmentan posteriormente. Esto es lo que fue observado a las 16 hs posthCG, siendo similares los valores de fragmentación en las dos hembras. Pero en el ovario de las hembras tratadas con etanol al 10%, el porcentaje de ovocitos inmaduros decreció porque algunos de ellos se fragmentaron y otros permanecieron intactos. Estos resultados indicarían que el efecto del tratamiento de etanol a nivel ovárico es modificar el tiempo de maduración ovocitario. Esto explica la presencia en el ovario de una pequeña cantidad de ovocitos inmaduros en relación con la gran cantidad de ovocitos intactos. Más aún, en los oviductos los porcentajes de ovocitos activados incrementaron en las hembras tratadas con etanol al 10%. A las 20 hs posthCG, un aumento de ovocitos activados se observó en los oviductos de las hembras tratadas con etanol al 10%. Lo mismo se vio en los ovarios, los que contuvieron por lo tanto bajos niveles de ovocitos inmaduros. El efecto del etanol persistió hasta las 20 hs posthCG, cuando se recuperan los ovocitos.

No se realizaron estudios a las 14 y 20 hs posthCG con las hembras tratadas con etanol al 5%,

porque las mayores diferencias en los efectos del etanol al 10% se encontraron a las 16 hs posthCG. Entonces, pudimos constatar una similitud en los efectos del consumo de etanol sobre la calidad de los ovocitos, con la dosis del 10%. A las 16 hs posthCG, también se encontró aumento en la tasa de ovocitos activados en las hembras tratadas respecto de las controles, pero elevados porcentajes de anormalidad. Además, como la cantidad de ovocitos inmaduros que se recuperaron fue menor en las hembras tratadas, la tasa de activación resultó mayor que con la dosis del 10% de etanol.

Estos resultados sugieren que los ovocitos retenidos en los ovarios pasadas las 16 hs posthCG, estuvieron expuestos a las influencias del etanol. Se ha descrito que los ovocitos presentan alta sensibilidad en los días previos a la ovulación (Paul y Himmelstein, 1988). También, el retraso en la ovulación y la sobremaduración de los ovocitos resulta en anormalidades cromosómicas que llevan a la muerte embrionaria temprana (Butcher y Fugo, 1967). Si los ovocitos permanecen en los folículos de Graaf pasada la mitad del ciclo, se incrementa la incidencia de anormalidades ovocitarias (Hertig, 1967). Por eso, postulamos que la exposición al etanol puede alterar o comprometer la maduración y calidad de los ovocitos y así la fecundación, la cual normalmente ocurre entre las 14 y 17 hs posthCG.

La maduración ovocitaria prematura se ve reflejada luego en una pobre reproducción (Doods y col., 1989). Postulamos que los efectos del consumo de etanol sobre los ovocitos pueden ser la inducción de la reasunción meiótica en momentos incorrectos, y así el pasaje desde la inmadurez (VG) a la madurez (metafase II), y de ésta a la activación (II CP).

La **morfología nuclear** de los ovocitos liberados a las 16 hs posthCG se estudió en los intactos, anormales y activados, de modo de conocer el estado nuclear. En las hembras tratadas con etanol al 10%, se puso en evidencia que la mayoría de los ovocitos anormales presentó placa metafásica anormal, la cual fue referida a la presencia de cromosomas dispersos en el citoplasma. Pero, lo más importante pareció ser la elevada tasa de ovocitos activados con II CP y I PN. En las hembras tratadas con etanol al 5%, se encontró alta cantidad de ovocitos anormales aunque la placa metafásica resultó normal. A diferencia de los ovocitos activados con el tratamiento de etanol al 10%, con el 5% los activados fueron anucleados (OPN) con II CP. Los resultados presentados demostrarían que el etanol puede afectar los elementos del aparato del huso o/y del citoesqueleto. La exposición al etanol induce anomalías cromosómicas en las mitosis espermatogoniales, aneuploidías y activación partenogenética en los ovocitos expuestos durante la meiosis I y II (Kaufman, 1985), y husos multipolares asociados con alineamientos desorganizados de cromosomas (Kaufman, 1997).

Por otro lado, del análisis de los resultados presentados, se podría pensar que los ovocitos activados espontáneamente encontrados en los oviductos de las hembras, a las 16 hs posthCG son los que habían sido ovulados antes, a las 14 hs posthCG. El alto porcentaje de activación ovocitaria de las 14 hs, en controles y tratadas, se reduce posteriormente a las 16 hs porque

muchos ovocitos se fragmentan, equiparándose los valores de fragmentación en ambas hembras, pero quedando elevada la cantidad de activados en las tratadas respecto del control. Esto se podría inferir de las observaciones en el **ovario**, donde las hembras tratadas, a las 14 hs posthCG, mostraron pocos ovocitos activados, y a las 16 hs una tendencia al aumento de la activación, pero no significativa al comparar con las hembras controles.

En el **oviducto**, de las hembras tratadas con etanol al 10%, se mantuvo un grado alto de ovocitos activados a las 16 hs posthCG. Como, a las 20 hs posthCG, aumentó en el oviducto de las hembras tratadas, la cantidad de ovocitos activados respecto de los controles y de las 16 hs posthCG, suponemos que provienen, una parte de los mismos activados oviductales, y otra de los intactos oviductales con placa metafásica anormal y de la activación de los intactos del ovario (proceso que pudo estar transcurriendo desde las 16 hasta las 20 hs). Esto estaría sostenido por el hecho que en el ovario de las hembras tratadas, a las 20 hs posthCG, se encontró alta tasa de activación y aún de ovocitos intactos (maduros), en detrimento de la cantidad de inmaduros.

A las 16 hs posthCG, en las hembras tratadas con etanol al 5%, se vio un incremento en la cantidad de ovocitos anormales morfológicamente. Podría pensarse que estos provienen de ovocitos intactos con placa metafásica anormal, presentes en el oviducto a las 14 hs, y que luego pueden activarse (de allí el aumento en ovocitos sin núcleo o con cromosomas dispersos, y II CP) o deformarse y aparecer así a las 16 hs. Los embriones de clivaje inmediato también podrían provenir de ovocitos deformados o activados a las 14 hs. Para esclarecer estas hipótesis será necesario la continuación de estas líneas de investigación.

Por otro lado, se sabe que las vías dependientes del AMPc juegan un rol importante en los mecanismos que controlan la maduración meiótica en los ovocitos (Yoshimura y col., 1992). La maduración (arresto y reasunción) del ovocito es mediada por niveles bajos o disminuidos de AMPc (Bavister, 1982; Ben-Yosef y col., 1993; Downs, 1993). El AMPc propio del ovocito parece provenir del compartimiento del cúmulo (Bornslaeger y Schultz, 1985). También, se ha demostrado que el incremento de calcio libre intracelular es esencial para la reasunción meiótica de los ovocitos de ratón (De Felici y col., 1991; Kline, 1996). Los ovocitos extruyen el II CP luego de la exposición directa al etanol con incremento en el calcio intracelular (Cuthbertson, 1983; Chatot y col., 1989). Los presentes resultados demuestran que la ingesta crónica de etanol puede liberar la meiosis II y extruirse el II CP. Quizás, los mecanismos involucrados en este proceso esten relacionados con la liberación de calcio de los depósitos internos.

Las células del cúmulo juegan un rol importante en la activación y nutrición ovocitaria (Eppig, 1982, Brower y Schultz, 1982). La expansión de la masa celular del complejo CO es importante en la regulación de la maduración del ovocito (Dekel, 1988). Los resultados

muestran que los ovocitos contenidos en la masa de células de la granulosa, de las hembras tratadas con etanol al 10%, tiene alta activación ovocitaria cuando el CCO es incubado 6 hs, es decir aislado del ovario, comparando con los niveles de activados encontrados a las 16 y 20 hs posthCG (*in vivo*). Posiblemente, la fisiología y el control meiótico de la granulosa del complejo haya sido alterado por el tratamiento con etanol, siendo estos efectos evidenciados cuando los CCOs son aislados de las hembras. La reasunción de la maduración puede ocurrir cuando las células foliculares pierden su habilidad para mantener el arresto meiótico (Byskov, 1978).

También, el detrimento de la calidad del CCO de las hembras tratadas, se manifestó por la cantidad de síntesis de PGE. Debido a que las PGs están involucradas en la reasunción de la meiosis de los ovocitos a través de la expansión del cúmulo, posiblemente participan en la activación ovocitaria. Se ha descrito que la PGE estimula el aumento del AMPc intracelular y por eso suprime la división meiótica de ovocitos aislados (Salustri y col., 1985; Cho, 1976). Además, como los ovocitos del CO aislados del oviducto en el medio de cultivo, presentaron mayor activación, incluso que los ovocitos oviductales de las 20 hs posthCG, se analizó la capacidad de síntesis de PGE por el complejo cúmulo-ovocitario extraído de las hembras a las 16 hs posthCG con el fin de relacionar la calidad de los ovocitos contenidos con la producción de PGE. Entonces, pensamos que la disminución de PGE medida en el CCO, de las hembras tratadas con 10% de etanol, debe estar relacionada con alta tasa de activación espontánea de los ovocitos contenidos, y que también, la síntesis reducida de PGE puede indicar niveles bajos de AMPc.

Por otro lado, el porcentaje de ovocitos activados del CCO con el 5% de etanol, no se encontró más alto que el control. La síntesis de PGE por el complejo cúmulo ovocitario de las tratadas con etanol al 5% fue más alta que el control. Esto puede sugerir que la exposición crónica de etanol interfiere con los mecanismos de regulación y control de la gameta por las células del cúmulo. Los efectos de la ingesta de las dos dosis de etanol resultaron diferentes y antagónicos en CCO, pero igualmente tóxicos.

Entonces, el consumo crónico de etanol al 10 y 5%, tendría dos efectos: a nivel ovárico: retardando la maduración y ruptura folicular, y a nivel gamético: sobremadurando los ovocitos y alterando la calidad y fisiología del CCO.

Para esclarecer la posibilidad de que la presencia de etanol durante la ovulación pueda afectar la cantidad y calidad de los ovocitos, se administró etanol al 5% por 72 hs, durante el período de inducción ovulatoria.

A las 16 hs posthCG las hembras tratadas en forma subcrónica con etanol al 5%, ovulan menos ovocitos que las controles, y estos fueron activados en porcentajes muy altos respecto del control. En las hembras tratadas, una alta cantidad de fragmentados en el oviducto. De allí

que el porcentaje de ovocitos intactos descienda a niveles inferiores al control. Encontramos entonces que este régimen podía también producir efectos sobre la calidad de los ovocitos en forma similar al tratamiento crónico. Estos resultados sugieren que, no sólo la dosis de etanol es crítica sino también el tiempo en el cual el etanol es consumido. Con estos estudios podemos decir que posiblemente haya un efecto "agudo" o "subcrónico" dentro del tratamiento crónico, sobre la respuesta ovulatoria de las hembras tratadas, aunque bien se sabe que el metabolismo de la ingesta crónica de etanol es diferente de la aguda y de la subcrónica, y por eso con esta última, los efectos (tasa de activación espontánea) fueron mayores.

3. Efectos sobre el espermatozoide.

Se plantearon estudios sobre las funciones espermáticas de la gameta en el epididimo, de modo preliminar a los ensayos de fecundación *in vitro*, para tratar de establecer cambios a nivel de la concentración, motilidad y morfología de espermatozoide caudal.

Los mecanismos por los que el etanol ejerce sus efectos sobre la fertilidad masculina y la descendencia no son bien conocidos. Existen varias posibilidades: 1) que reduzca directamente el contenido espermático, la viabilidad y la capacidad fecundante. 2) que el alcohol, o su metabolito, pueda acumularse en el semen y transportarse hasta el ovocito via eyaculación, con lo que afectaría directamente la fecundación *in vivo*. 3) que el alcohol pueda inducir alteraciones en los factores bioquímicos secretados en el semen, influenciando la actividad espermática en el semen y la subsecuente fecundación. Estas hipótesis están sostenidas por diversos estudios en los que se demostró que el etanol influye, bajo ciertas circunstancias, el contenido espermático, induce anomalías espermáticas y perjudica la capacidad de penetración al ovocito (Anderson y col., 1982; Rogers y col., 1986; Van der Colf y col., 1991; Badr y Badr, 1975). Es muy posible que los efectos del etanol sean a nivel del metabolismo espermático, siendo este muy importante en el proceso de capacitación (Rogers y Yanagimachi, 1975).

Los resultados presentes demostraron que ninguna de las dos dosis de etanol administradas en los machos adultos produjeron modificaciones en la concentración espermática ni en la morfología.

4. Efectos sobre la fecundación.

Como parte del proceso de fecundación, primero se han evaluado parámetros de la fisiología espermática en el sistema de capacitación *in vitro* (medio de incubación). Siendo los machos adultos, el consumo de etanol al 10 y 5% no indujo alteraciones evidentes en la motilidad e

hiperactivación, la reacción acrosomal espontánea y la viabilidad temprana de espermatozoides de los animales tratados. Anderson y col., (1983) describieron que 5 y 10 semanas de exposición a etanol al 5% (v/v) es el tratamiento menos severo comparado con la exposición por 20 semanas a 5% de etanol, o 5 semanas a etanol al 6% (v/v) de etanol. El primer tratamiento no produjo cambios significativos en el número relativo de espermatozoides dismórficos, pero los últimos tratamientos produjeron una reducción del contenido espermático, daño testicular y pobre calidad de espermatogénesis. En este estudio, los tratamientos con etanol al 10 y 5% por 30 días (4 semanas) pudieron ser considerados de baja severidad, comparando con los trabajos previos. Esto es porque no se observaron modificaciones, no sólo en la concentración espermática y la morfología, sino que tampoco en los otros parámetros medidos en la capacitación *in vitro* y en las tasas de fecundación *in vitro*, realizadas con machos tratados con ambas dosis de etanol, y hembras controles.

Solamente, se pudieron evidenciar diferencias en la síntesis espermática del producto de la lipoxigenasa (5-HETE). Poco se sabe sobre la producción de eicosanoides por los espermatozoides, siendo los trabajos de nuestro laboratorio los que realizaron algunos aportes sobre los eicosanoides espermáticos y mecanismos celulares implicados (Herrero y col., 1995).

Por otro lado, se han descrito resultados contradictorios acerca de los efectos de las PGs sobre la fisiología espermática. Parece que las PGs inhiben la motilidad espermática (Cohen y col., 1977), mientras que también se observó estimulación (Schlegel y col., 1981). Para Shalev y col. (1994) la presencia de un inhibidor de la ciclooxigenasa como la indometacina no produce cambios en la motilidad espermática. También se ha descrito que las PGs están involucradas en la reacción acrosomal (Zaneveld y col., 1991, Breitbart y col., 1995), y la PGE₂ aumenta el porcentaje de penetración en el test de hamster (Aitken y Kelly, 1985). También, se encontró que los productos de la lipoxigenasa aumentan la reacción acrosomal de espermatozoides de hamster (Meizel y Turner, 1984). Recientemente se sabe que el espermatozoide murino es capaz de sintetizar PGs, ya que se ha evidenciado la actividad de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa (Herrero y col. 1995). Sin embargo no existen datos aún sobre los efectos del etanol sobre los eicosanoides sintetizados por el espermatozoide y por eso estos resultados son las primeras evidencias sobre alteraciones en la síntesis de los productos de la lipoxigenasa espermática. Sería interesante investigar la relación entre la exposición directa del etanol en el medio capacitante y la síntesis de PGs y LTs, o los efectos del tratamiento crónico con ambas dosis de etanol sobre la reacción acrosomal inducida y la síntesis de eicosanoides. Hasta el momento sólo podemos marcar la existencia de un efecto diferencial producido por los tratamientos sobre el producto de la lipoxigenasa espermática dependiente de la dosis de etanol dado en forma crónica.

Los resultados presentados destacan que la ingesta crónica de etanol moderado y bajo por hembras en etapa de maduración sexual produce anomalías en la fecundación de sus gametas.

Los porcentajes de activación ovocitaria estuvieron reducidos cuando los ovocitos provenían de las hembras prepuberales tratadas. Cuando los espermatozoides eran de machos adultos tratados los porcentajes no se alteraron. A las 8 hs postinseminación una fracción de los ovocitos activados tuvieron 1 PN (haploides), la cual fue significativamente elevada cuando provenían de las hembras tratadas. Se sabe que los ovocitos de la mayoría de los mamíferos están detenidos en metafase II de la meiosis después de la ovulación, pero pueden ser activados por espermatozoides u otros agentes y formar cigotas diploides o haploides (Shiina y col., 1993, Balakier y Casper, 1993). Para inducir activación partenogénica *in vitro* de ovocitos con etanol se requieren dosis desde el 5% (Gulyas y Yuan, 1985, Kubiak, 1989, Marcus, 1990). *In vivo*, Dyban y Khozhai (1980) han demostrado que una inyección intraperitoneal de 0.35 ml de 25% de etanol dada en apropiados tiempos luego de la ovulación espontánea puede activar los ovocitos. Cuthbertson (1983) demostró en ratón que las concentraciones de etanol menores o iguales que el 1% son incapaces de producir activación ovocitaria. Estos datos sugieren que la exposición prolongada de etanol, por ingesta crónica, podría inducir activación partenogénica de los ovocitos, y que los ovocitos de las hembras prepuberales podrían ser más sensibles. Esta hipótesis pudo ser comprobada ya que se encontraron ovocitos activados en las hembras tratadas con 10 y 5% de etanol.

Se sabe que los ovocitos con **alteraciones morfológicas** y/o daño en la membrana plasmática terminan en la fragmentación y muerte. Más aún, se ha descrito que el alcohol puede aumentar la generación de radicales libres en los ovocitos (Dawson y col., 1994, Henderson y col., 1995, Mira y col., 1995), y causar daño actuando sobre los fosfolípidos, carbohidratos, metaloproteínas y DNA (Nordmann, 1994, Santiard y col., 1995). Así, el tratamiento con etanol puede afectar la viabilidad de ovocitos aparentemente normales y/o la tasa de fecundación por el incremento de las especies reactivas, o por otros daños a nivel de las cubiertas del ovocito. Esto explicaría porque una parte de los ovocitos no activados permaneció sin ser fecundados.

Los ensayos de fecundación *in vitro* evidenciaron: a) disminución de la activación inducida por espermatozoides, y notable aumento en la cantidad de ovocitos intactos. b) reducción de la fecundación por alto porcentaje de ovocitos haploides partenogénicos (con un pronúcleo).

Relacionando estos resultados con los referentes a los tipos ovocitarios del oviducto encontrados a las 16 hs posthCG, se puede decir que los ovocitos activados postfecundación

proviene de los ovulados presentes en la ampolla oviductal, y no estaría involucrado un proceso de activación partenogénica postinseminación. También, corresponde notar que las tasas de fecundación *in vitro* y porcentajes de ovocitos haploides (activados) fue semejante con ambos tratamientos.

El número de ovocitos fragmentados en la fecundación *in vitro* fue elevado en el grupo A x A (ambos animales tratados). Posiblemente, tuvo mayor tasa de fragmentación debido a que ambas gametas provenían de animales tratados, y que esta conjunción pueda haber producido mayores efectos deletéreos aumentados postfecundación.

Si la fecundación no ocurre dentro del corto período programado, el ovocito pierde su capacidad de ser fecundado y comienza la degeneración (Takase y col., 1995). Pero se conoce poco acerca de los mecanismos que generan la fragmentación de los ovocitos. La fragmentación citoplasmática y del ADN son consecuencias de la "muerte celular programada" que tiene características típicas de apoptosis (Gavrieli y col., 1992, Gorczyca y col., 1992, Jurisicova y col., 1996). La fragmentación puede ocurrir tanto en ovocitos no fecundados que sufrieron activación partenogénica (Takase y col., 1995), como cuando la fecundación está retrasada. Por otra parte, el retraso en la fecundación puede derivar de polispermia, de ovocitos penetrados pero sin desarrollo del núcleo masculino, de condensación cromosómica prematura sin activación ovocitaria, falla en la unión a la zona pelúcida de un espermatozoide aparentemente normal (Bedford y Kim, 1993), y/o anomalías cromosómicas (alto grado de aneuploidía) (Zenzes y Casper, 1992, Munne y Cohen, 1994). En este estudio se ha observado pocos ovocitos polispermicos (3PN) independientemente de los grupos analizados. Pero no sabemos si los ovocitos fragmentados observados en el grupo A x A fueron polispermicos después de la inseminación *in vitro* y antes de fragmentarse.

Los resultados presentes confirman los efectos tóxicos y deletéreos del consumo de etanol por las hembras sobre la calidad postovulatoria de la gameta femenina.

El tratamiento crónico de etanol altera el comportamiento sexual ya que disminuye la actividad copulatoria en los machos, generando apareos no exitosos (Anderson y col., 1983). Los estudios aquí presentados de fecundación *in vivo* se realizaron con hembras tratadas, de modo de profundizar el conocimiento de la reproducción femenina, y tomando en cuenta que la mayoría de los estudios previos fueron realizados con machos.

En la evaluación de la fecundación *in vivo* (24 hs posthCG o día 1 de preñez), el tratamiento con ambas dosis de etanol, produjo efectos adversos semejantes. Se evidenciaron porcentajes elevados de ovocitos activados (II CP + 1PN) en detrimento de la tasa de fecundados (II CP + 2PN) en las hembras tratadas con las dos dosis de etanol. Aunque la tasa de fecundación *in vivo* fue más alta que la de fecundación *in vitro*, la primera cayó significativamente en las hembras tratadas con etanol al 10 y 5%. Con etanol al 10%, los ovocitos no fecundados activados

partenogenéticamente parecen provenir también de los ya presentes en la ampolla y ovulados a las 16 hs posthCG, porque los valores fueron similares a los allí encontrados. Este estudio se completó con el análisis del estado nuclear de los ovocitos no fecundados intactos. Se puso en evidencia que con etanol al 10%, las hembras contuvieron muchos ovocitos con placa metafásica anormal (cromosomas dispersos o 1 PN central), notándose que valores levemente elevados de estos tipos ovocitarios fueron encontrados también a las 16 hs posthCG en el oviducto. Entonces, una parte de los ovocitos intactos que tuvieron metafase II (placa metafásica normal) fueron fecundados y la otra parte pudo sufrir interrupción de la placa y/o fragmentarse. Esta hipótesis surge de la comparación de los valores de calidad de los ovocitos ovulados. Con etanol al 5% algunos ovocitos intactos maduros no fueron fecundados, pero no se puede decir que la anomalía de placa fuera la causa de la disminución de la fecundación, porque estos valores resultaron semejantes a los del control. Por otro lado, se puede destacar que el aumento de ovocitos activados con 1 PN en la fecundación *in vivo*, pudo deberse a: la preexistencia de estos, a ovocitos en metafase III (presencia de II CP + una metafase II, que se descondensa y forma 1 pronúcleo) y los ovocitos anucleados con II CP que posiblemente fueron penetrados por un espermatozoide, siendo todos tipos de ovocitos los encontrados en el oviducto de las hembras, a las 16 hs posthCG. Además, se sabe que los embriones de 2 células de clivaje inmediato, pueden continuar el desarrollo hasta estadios tempranos, o arrestarse y seguir la vía apoptótica de fragmentación. Si fuera el primer caso lo que ocurre con los embriones de 2 células (incrementados) encontrados a las 16 hs posthCG en las hembras tratadas con 5%, estos se hubieran observado como de 4 células en el momento de la evaluación de la fecundación *in vivo*. Sin embargo, como no se observaron embriones de 4 células ni un porcentaje elevado de 2 células como antes, podemos afirmar que la mayoría de los embriones de las 16 hs se fragmentaron y así incrementaron el pool de fragmentados encontrado postfecundación.

5. Efectos sobre el desarrollo preimplantativo.

El período de preimplantación embrionario es el menos sensible a los efectos adversos de la exposición a agentes mutagénicos, como el etanol. La exposición a tóxicos durante esta etapa generalmente causa aborto y resorción embrionaria, además de malformaciones (Webster, 1989). Sin embargo, un teratógeno puede ser embriotóxico y matar tantas células que el embrión no sobrevive durante este período. Los disturbios en el ambiente fisiológico durante el primer período luego de la fecundación, pueden interferir con la implantación del blastocisto o causar muerte temprana y aborto embrionario, sin causar generalmente malformaciones congénitas embrionarias (Abel, 1989). Es así que la mayoría de los estudios realizados con etanol fueron durante la gestación inclusive desde la fase de preimplantación (Checiu y Sandor,

1981).

En esta tesis se demostró que la ingesta crónica de etanol previamente a la fecundación afecta el desarrollo embrionario preimplantativo *in vitro*. Se ha postulado que las malformaciones congénitas raramente se pueden originar durante el período preimplantativo (Karkinen-Jaaskelainen, 1985). Sin embargo, mujeres que han tenido una exposición simple de gran volumen de alcohol durante la preñez temprana pudieron tener hijos con las características del síndrome de alcoholismo fetal (FAS) (Padmanabhan y Hameed, 1988). Estudios en ratas mostraron que el consumo crónico de etanol por lo menos un mes previo del apareo y durante el período preimplantativo resultó en retraso embrionario (Checiu y Sander, 1982). En ratón, el mismo experimento, causó incremento de embriones anormales. Otros estudios mostraron que el alcohol consumido solo durante el período preimplantativo no tiene efecto sobre la tasa de preñez (Randall, 1987), a pesar que la administración aguda de alcohol materna en los estadios tempranos produjo efectos deletéreos en el embrión murino en desarrollo (Padmanabhan y Hameed, 1988). Más aún, se ha descrito que el consumo materno de etanol en día 4 de preñez induce retraso en la cavitación e incremento del número de embriones patológicos (Checiu, 1993).

El estudio del **desarrollo embrionario *in vitro*** mostró que la cantidad de embriones de 2 y 4 células y mórulas que se obtienen cuando solamente las hembras fueron tratadas con etanol al 10 y 5% (A x C), o cuando hembras y machos fueron tratados (A x A) con ambas dosis, decreció en el cultivo respecto del grupo control (hembras y machos controles). Sin embargo, cuando los machos se trataron con 10% de etanol (C x A), se produjo una caída en el desarrollo de mórulas compactadas, lo que sugiere que este tratamiento en los machos pudo producir efectos que se evidencian a largo plazo, en el desarrollo temprano. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado una reducción de los pesos de nacidos de padres alcohólicos (Little y col., 1987; Sokol y col., 1993). También, se ha visto en animales y humanos que la administración crónica prolongada de alcohol a los machos reduce la fertilidad (Lieber, 1990; Thompson y Woodhouse, 1987) e induce anomalías fetales (Abel, 1993, Cicero, 1994). Otros autores demostraron que la administración de dosis altas de alcohol en forma aguda a machos 24 hs antes del apareo no afecta el comportamiento reproductivo, pero resulta en reducción de la tasa de fecundación y en disminución de la tasa de preñez y en fetos menos viables, siendo el mayor efecto observado la pérdida en la etapa preimplantativa (Cicero y col., 1994). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos por los que el alcohol afecta la fertilidad masculina y el desarrollo fetal. Se ha hipotetizado que el alcohol podría acumularse en el semen y ser transportado al ovocito vía eyaculación afectado luego el desarrollo embrionario (Yazigi y Polakoski, 1992).

Los embriones de hembras tratadas con etanol al 10% (A x C), sufrieron un retraso en su

desarrollo desde los primeros días, que también se evidencio en las hembras tratadas con etanol al 5%, las cuales presentaron además, a partir del día 4 crecimiento mas seriamente afectado.

Al día 5, incremento la cantidad de mórulas compactadas en el grupo de hembras tratadas con etanol al 10 y 5%. Además, se observó una menor tasa de embriones en blastocisto inicial y expandido en los grupos con algún animal tratado con ambas dosis, lo cual se debería tanto al retraso observado como a la pérdida embrionaria, esta última especialmente observada en el grupo A x C y A x A del tratamiento con etanol al 10%. En consecuencia se observaron pocos blastocistos expandidos en los grupos tratados. Estos embriones retrasados podrían posteriormente detener su desarrollo en ese estadio, para finalmente comenzar el proceso apoptótico de fragmentación y muerte celular. Esto podría explicar lo que ocurre al día 6. Los embriones de los grupos tratados (C x A, A x C y A x A) con etanol al 10 y 5%, son incapaces de desarrollar a blastocisto expandido y aún producir la extrusión de la zona pelúcida (hatching). Esto evidencia que se arrestaron en blastocisto inicial al día anterior, como fue observado. Al día 6, el patrón de desarrollo que mostraron los blastocistos "hatching" de los grupos tratados con la dosis del 10% de etanol fue similar al de la dosis del 5%, pero en este caso algunos más pueden alcanzar este estadio. Al día 7 con etanol al 10% se obtienen pocos blastocistos avanzados, debido primero al arresto y segundo, a la pérdida embrionaria. En consecuencia, de los pocos embriones que llegan a blastocistos expandidos, algunos comienzan la salida de la zona pelúcida mientras que una reducida cantidad alcanzan el estadio extruído. En el caso de la dosis de etanol al 5%, los mismos patrones de reducción embrionaria en estadios avanzados se obtienen, pero en grados menos severos. Esta idea se confirma con el estudio de la fragmentación diaria de los embriones. Con etanol al 10%, los embriones de los grupos A x A y A x C, se fragmentaron desde el día 2 hasta el día 4, mientras que no ocurrió con la dosis del 5%, en la cual sólo el grupo A x C mostró aumento de fragmentación al día 4. Esto demuestra que la pérdida embrionaria es más importante a mayor dosis, con lo cual la pérdida se produce desde el inicio del desarrollo.

Un embrión arrestado puede presentar morfología normal o anormal, pero en cualquier caso posteriormente se fragmentará. Esto es lo que se demuestra con el aumento de embriones anormales al día 5 en los grupos tratados con etanol al 10 y 5%, en donde el número de mórulas fue elevado en A x C debido al retraso observado, y pocos blastocistos son obtenidos. Con etanol al 10% la morfología embrionaria anormal se extendió a los blastocistos de los grupos C x A, A x C y A x A. En varias mórulas anormales se observaron blastómeros descompactados, algunos embriones con fragmentaciones en el espacio perivitelino. También se encontraron pequeños blastocistos con lisis dentro de la cavidad blastocélica o alrededor del MCI, blastocistos tempranos con formación anormal del blastocele (dos cavidades). Se sabe que la transición de mórula a blastocisto es dependiente del funcionamiento de la Na⁺/K⁺

ATPasa, la cual esta implicada en la formación del blastocele (Biggers y col., 1988, Leese y col., 1991). Se ha demostrado que la exposición directa de etanol produce una reducción o inhibición de la actividad placentaria de la Na⁺/K⁺ ATPasa (Swann, 1990). Desde que los mecanismos de transporte estan asociados con la compactación y la formación del blastocele (Biggers, 1988, Kaye y col., 1982), se puede pensar que los embriones que provienen de hembras tratadas pueden tener la función de transporte alterada. La severidad de estas anomalías como su frecuencia, dependería de la dosis administrada.

Cuando ambos animales fueron tratados (A x A) con ambas dosis de etanol, el desarrollo embrionario anormal comparado con el control fue mayor. Pero, desde que se incrementó la fragmentación embrionaria, no se encontraron altas cantidades de embriones anormales. El porcentaje de mórulas compactadas fue también menor que en el control, y pocos embriones llegan hasta blastocistos. Por eso el porcentaje de blastocistos iniciales en día 5, de expandidos en día 6 y extruídos en día 7 fueron muy pocos con la dosis del 5% y casi ninguno con 10% de etanol.

Aunque el síndrome de alcoholismo fetal generalmente es atribuído a madres consumidoras de alcohol durante la preñez, alrededor del 75% de los niños con FAS tuvieron padres alcohólicos (Abel, 1983). Algunas anomalías en la preñez antes atribuídas al consumo materno podrían, entonces, deberse al consumo paterno (Abel, 1993). Los resultados presentados en esta tesis avalan y ratifican los estudios previos, ya que cuando el macho fue consumidor, la tasa de desarrollo embrionario esta afectada, siendo más severo el efecto si ambos padres fueron alcohólicos.

Inicialmente se pensó que, aunque las sustancias contenidas en el fluido uterotubárico pasan facilmente al espacio intercelular del embrión, los tóxicos para el desarrollo no tienen efecto teratogénico durante el período preimplantativo. Pero se ha visto que la administración de altas dosis de alcohol a hembras durante la preñez temprana causa reducción de la tasa de desarrollo (Webster, 1989). Así, podía ser posible que los efectos del consumo previo de alcohol sobre el embrión estuvieran mediados por alteraciones en el ambiente y en la fisiología oviductal y uterina, por lo cual el desarrollo preimplantativo *in vivo* resultaría diferente del desarrollo *in vitro*. Esta hipótesis sostuvo los estudios *in vivo*.

La tasa embrionaria general de **desarrollo *in vivo***, decreció desde el día 3 con el tratamiento de las hembras con etanol al 10%. Pero con el 5% de etanol se observó reducción de la cantidad de embriones de día 4, y los porcentajes fueron mayores inclusive que los obtenidos con etanol al 10% en ese día. Nuevamente, estos resultados confirman que la severidad del consumo de etanol sobre el desarrollo embrionario es dependiente de la dosis ingerida en forma crónica.

Cuando se analizó el desarrollo diariamente, en cuanto a los tipos embrionarios, no se observó

una caída en la cantidad de embriones de 2 células (día 2) en las hembras tratadas con ambas dosis de etanol. Esto se podría explicar con el análisis de los resultados de la fecundación *in vivo*. A las 24 hs posthCG (día 1), con etanol al 10 y 5%, el porcentaje de ovocitos fecundados (II CP + 2PN) del grupo A x C fue menor que en los controles, porque se obtuvieron cantidades elevadas de ovocitos activados partenogenéticamente (II CP + 1PN). Se sabe que estos embriones haploides pueden desarrollar hasta estadios incluso postimplantativos tempranos (Graaham, 1974; Kaufman, 1990; Pickering y col., 1988). Entonces, a las 48 hs posthCG (día 2) de desarrollo, una parte de los embriones de 2 células encontrados podrían corresponder a aquellos haploide. Al día 3 (72-76 hs posthCG), pocas mórulas precompactadas y también escasa cantidad de mórulas compactadas, se desarrollaron en el grupo A x C tratado con 10% de etanol, comparando con el control. Mientras, que el grupo A x C tratado con el 5% de etanol, mostró alta cantidad de morulas no compactadas y disminución de mórulas compactadas, lo cual bien indica que ocurrió un retraso importante en vez de pérdida. Del análisis del número nuclear por embrión, las mórulas de las hembras tratadas con etanol al 10% presentaron disminución en el número de células embrionario, es decir, inhibición del crecimiento individual. Además, la evaluación el índice mitótico dentro de las 74-76 hs posthCG, resultó aumentado, lo cual indica que muchos embriones de las hembras tratadas presentaron división celular (células con metafases), mientras en los controles no. Este parámetro elevado evidencia que la división celular esta retrasada en los embriones de las hembras tratadas respecto de los controles.

Se ha observado que los embriones partenogenéticos parecen morfológicamente fecundados en las primeras divisiones celulares, pero los estadios de mórulas y más aún de blastocistos comienzan a ser anormales (Kaufman, 1990), con fragmentos citoplasmáticos perivitelinos extruidos (Witowska, 1973), y crecimiento retrasado (Kaufman, 1990; Tada y Takagi, 1992). Estas características pueden reflejar el grado de inestabilidad de la membrana plasmática del ovocito. Por eso, postulamos que una fracción de los embriones provienen de los ovocitos activados haploides de las hembras alcohólicas.

La exacta razón/es por la cual una proporción de partenogenones haploides fallan en la blastulación no se conoce. Se sugirió que una posibilidad puede ser que estos embriones contienen alta cantidad de blastómeros retardados (Kaufman, 1990). El menor número de blastómeros encontrados en las mórulas del día 3 del desarrollo *in vivo* con la dosis de etanol del 10%, y el hecho que estos embriones tuvieran alto índice mitótico comparado con los controles, puede indicar ese retardo en los blastómeros del estadio embrionario del día 3.

Al día 4, los embriones fueron recuperados desde las 96 hasta las 99 hs posthCG, lavando los oviductos y úteros. Analizando el desarrollo durante estas 3 horas, se vio que en las hembras tratadas con etanol al 10 y 5% se incrementó la cantidad de mórulas, respecto del

control, mientras la cantidad de blastocistos fue reducida respecto del control. La cuantificación de los blastocistos extruídos de la zona pelúcida mostró que las hembras tratadas con ambas dosis de etanol sufrieron una caída de este estadio. En las hembras tratadas con 5% de etanol se vio una disminución de los blastocistos extruídos, debida al aumento de estadios anteriores: blastocistos no extruídos (comparando con el control), aunque también se detectaron índices de fragmentación elevados. En el caso del 10% de etanol, las hembras tratadas tuvieron cantidades similares al control de blastocistos no extruídos, y reducción de blastocistos extruídos. **Así, comparando con la dosis del 5%, el tratamiento con etanol al 10% produjo pérdida embrionaria, que fue más acentuada que con etanol bajo.**

Cuando fue estudiado el desarrollo en las últimas horas preimplantativas (98-99 hs posthCG), se vio que con *etanol al 10%*, las hembras seguían teniendo alta cantidad de mórulas y baja de blastocistos extruídos. Pero a estas horas, se encontró que los blastocistos no extruídos de las hembras tratadas aumentaron comparando con el control, porque la mayoría de los embriones del control alcanzaron el estadio de blastocisto extruído (más avanzado). Lo importante es notar que en estas hembras tratadas con 10% de etanol no cambia ni el patrón de desarrollo ni las cantidades relativas de embriones tanto en el lapso de 97-99 hs posthCG (3 hs) como a las 98-99 hs. Esto podría indicar que los embriones se retrasan o arrestan en esos estadios durante estas horas. Del análisis particular de cada embrión, se observó que las hembras tratadas tuvieron la mayoría de los blastocistos no extruídos en estadio temprano (inicial), y no hubo diferencias en la cantidad de blastocistos expandidos con el control. También en las hembras tratadas con etanol al 10%, se encontró reducida la cantidad de blastocistos extruídos sin cavidad comparando con las hembras controles, que presentaron la mayoría de los embriones en el estadio de blastocisto implantativo (sin cavidad).

Los estudios a las 98-99 hs posthCG, con hembras tratadas *con etanol al 5%* mostraron elevada cantidad de blastocistos no extruídos, pero mayor que con la dosis del 10%. Esta fue la causa por la que los porcentajes de blastocistos extruídos fueron muy bajos. Aún con esta dosis de etanol (5%), los embriones de las hembras tratadas siguen alcanzando los estadios de blastocistos no extruídos en esta etapa tardía. Los valores de estos aumentan comparando con las 96-99 hs posthCG, a pesar que los niveles de blastocistos extruídos no cambian respecto al tiempo anterior. Con esta dosis, las hembras tratadas presentaron la mayoría de los blastocistos en la etapa temprana o inicial, en cantidades mayores que con 10% de etanol. Esto destaca el hecho que se desarrollan mayores cantidades de embriones que con la dosis de etanol más alta a los mismos tiempos. Cabe señalar que los blastocistos extruídos sin cavidad (implantativos) casi fueron ausentes en las hembras tratadas, lo cual puede reforzar aun la idea de un retraso importante.

El tratamiento preconcepcional con etanol al 5% produce en las hembras, un retraso del

crecimiento embrionario más pronunciado que con etanol al 10%, en reemplazo de elevada pérdida embrionaria temprana, que es lo que principalmente produce la ingesta de etanol al 10%. Del análisis de los núcleos encontrados en los embriones de día 4 se desprende claramente que las hembras tratadas con etanol al 10% presentaron la mayoría de los embriones con menor número de células por embrión, que las controles, lo cual confirma que los procesos de arresto y fragmentación ocurren fuertemente con el tratamiento del 10% de etanol.

El análisis de la *distribución embrionaria a las 98-99 hs posthCG*, mostró que la mayoría de los embriones (no fragmentados) de las hembras tratadas **con etanol al 10%**, estuvieron en el útero, similarmente al control, mientras que en el oviducto no se encontraron embriones. Como esta cantidad fue menor que en las controles, se puede suponer que fragmentación y pérdida de embriones ocurre desde las 96 hs posthCG hasta inclusive más tarde, porque de lo contrario se hubieran encontrado embriones en el útero. En cambio, en las hembras tratadas con etanol al 5%, una parte elevada de embriones se encontró en el oviducto, y la otra fracción embrionaria estuvo en el útero, comparando con el control, siendo el porcentaje total de embriones encontrados a las 98-99 hs posthCG similar al control a estas horas. Esto demuestra que las hembras tienen un retraso en el transporte oviductal y en el crecimiento de sus embriones, y que a esas horas no se produce pérdida en el desarrollo en ninguno de estos dos órganos.

El desarrollo embrionario *in vitro* e *in vivo* fueron semejantes, dependiendo solamente de la dosis de etanol consumida previo a la fecundación, con lo cual queda claro que si existen alteraciones en la fisiología tubárica materna, esta no influye de modo decisivo en el desarrollo preimplantativo.

La localización ultraestructural de la PGH sintasa en embriones murinos fue recientemente demostrada, siendo la marcación inmunohistoquímica muy intensa en los embriones de 2 células, de 4 células y mórulas más que en los blastocistos (Van der Weiden y col., 1996). Los embriones de diferentes estadios obtenidos por fecundación *in vitro* o desarrollo *in vivo*, provenientes de hembras tratadas con etanol al 5%, presentaron producción alterada de PGE.

Los embriones de 2 células derivados de fecundación *in vitro* y desarrollo *in vivo* de hembras tratadas con etanol al 5% sintetizan menores cantidades de PGE. No se encontraron diferencias en las cantidades sintetizadas por las mórulas de hembras tratadas en ambos sistemas *in vitro* e *in vivo*. Los valores de PGE fueron similares debido probablemente a que este estadio contuvo mórulas precompactadas y compactadas, que no fueron separadas para la medición. No se sabe si los embriones de 5, 9 o 16 células (precompactadas) pueden sintetizar cantidades diferentes de PGE que las mórulas compactadas.

Los blastocistos obtenidos por fecundación y desarrollo *in vitro* derivados de hembras tratadas

y controles produjeron cantidades semejantes de PGE. Sin embargo, los blastocistos desarrollados *in vivo*, recuperados en día 4 de las hembras tratadas, tuvieron menor capacidad de síntesis de PGE que los controles. También se pudo observar que los blastocistos desarrollados *in vitro* liberaron menores cantidades de PGE que los desarrollados *in vivo*.

Como se sabe, el daño fetal es una de las consecuencias más importantes del consumo crónico fuerte de alcohol (Jones y col., 1973; Jones y Smith, 1973), y se ha postulado estar relacionado con la producción de PGE.

Cuando ratones preñados fueron inyectados con ácido acetilsalicílico (ASA) una hora antes de la administración de alcohol en día 10 de gestación, se produjo una caída significativa en el número de crías con anormalidades morfológicas (Randall y col., 1987). También, Randall y col (1991) demostraron que el pretratamiento con ASA puede reducir los defectos en fetos de día 19, debido a los niveles bajos de PGE en los tejidos embrio-uterinos de día 10 de gestación. A pesar de estos datos, el tratamiento crónico de etanol al 5% previo a la gestación produce bajas cantidades de PGE embrionaria.

Koes y col (1974) han demostrado que el consumo crónico de alcohol, aun en presencia de una dieta adecuada, reduce los depósitos de membrana de ácido araquidónico (AA), el principal precursor de la síntesis de PGs. Sin embargo, las influencias del etanol sobre la generación de PGs son difíciles de interpretar, porque se vio que el etanol incrementa (Karanian y col., 1985; Thomas y col., 1980) o reduce la síntesis de PGs (Hwang, 1982).

Mientras que en nuestro modelo de alcoholismo crónico, el consumo de etanol al 5% produjo en las hembras tratadas murinas el 12% EDC, las evidencias previas demostraron que la ingesta crónica de etanol por ratas hembras (35% EDC durante 29 días, pero mediante dieta líquida), produce elevada liberación de PGs por el útero en diestro (Franchi y col., 1988). Pero también, hay discrepancia acerca de las cantidades de PGE2 y/o PGE1 liberadas en medio de incubación por el útero de hembras tratadas crónicamente, dependiendo de la concentración de etanol, desde que la ingesta de 20% de etanol deprime la producción de PGE2 e incrementa la PGE1 (Chaud y col., 1991).

El síndrome de alcoholismo fetal (FAS) producido por el consumo crónico de alcohol, fue asociado con bajos niveles de dihomogammalinolénico (DGLA) y PGE1 (Horrobin, 1980). Resultados previos mostraron que la cantidad de PGE1 liberada por el embrión de rata de día 3 fue 5 veces mayor que la producción de PGE2 (Viggiano y col., 1990). Horrobin involucró a las PGs de la serie 1 como una de las bases bioquímicas de FAS (Horrobin, 1980). Sin embargo, otros autores afirmaron que el alcohol afecta la cascada del AA, llevando a la producción de PGs de la serie 2 (Anggard, 1983; Pennington y col., 1982). El efecto inicial del etanol sobre los tejidos con GLA o DGLA es el aumento de la formación de PGE1. Pero, desde que los depósitos de DGLA son limitados, este efecto inicial del etanol es probablemente

seguido de la caída en la formación de PGE1 mientras los depósitos se reducen (Horrobin, 1980).

Por otro lado, en el ratón, hay una reducción de PGE2 cuando los embriones son cultivados con indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa) (Niimura y Ishida, 1987). Además, elevada cantidad de PGE2 materna-fetal produce desarrollo fetal anormal (malformaciones y muerte fetal) (Abel, 1996). Aunque las PGs están implicadas en la teratogénesis, el rol en los defectos en el nacimiento inducidos por el etanol y en el FAS permanecen desconocidos. Por eso, generalmente se sabe que el alcohol altera los niveles de PGs, pero poco se sabe o no se conoce cómo y dónde el etanol lo provoca (Abel, 1996). Por otro lado, la extrusión completa del blastocisto es obligatoria para el éxito de la implantación (Van der Weiden y cols., 1993). Por eso pensamos que los blastocistos desarrollados *in vivo*, en las hembras tratadas con 5% de etanol, además de mostrar retraso en el crecimiento, tendrán bajas tasas de implantación relacionado con la baja producción de PGE.

Finalmente, aunque la medición de la síntesis de PGE por los embriones de día 2 y 4 (blastocistos) no se efectuó en las hembras tratadas con etanol al 10%, se podría suponer también alterada respecto de los controles, porque:

- Se sabe que el incremento de PGE está asociado a la existencia de anomalías embrio-fetales producidas por el consumo de etanol, proponiéndose a las alteraciones en los niveles de PGs como uno de los mecanismos, y/o causas, de los efectos tóxicos del etanol. Los resultados sobre morfología embrionaria muestran que el tratamiento con etanol al 10% incrementa la cantidad de embriones de 2 células y de blastocistos (día 4) con anomalías visibles. Entonces, asociado al incremento de anomalías, la cantidad de PGE embrionaria puede resultar elevada.
- Dado que la síntesis de PGE por el complejo cumulo-ovocitario (CCO) de las hembras tratadas con etanol al 5% fue elevada y la del CCO de las hembras con etanol al 10% fue baja, respecto de los controles (con valores similares), podemos suponer que existe una respuesta bipolar dependiente de la dosis de etanol consumida, y que así podría ocurrir con la PGE de los embriones de hembras tratadas con etanol al 10%.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Conclusiones.

Con este trabajo de tesis se demostró, en *términos generales*, que:

- 1- El grado de ingesta de etanol depende del sexo del animal, independientemente de la edad, y de la concentración administrada.
- 2- La severidad de la ingesta crónica de etanol se refleja de modo dependiente de la concentración de etanol solo en el caso del desarrollo embrionario preimplantativo de ratón.

En *términos particulares* podemos afirmar que:

a- En la función femenina:

- . La dosis de etanol al 5% (m/v) administrada en forma crónica (30 días) a hembras en la etapa de maduración sexual y preconcepcional, es la mínima capaz de producir efectos adversos sobre la calidad del ovocito, la fecundación y los embriones de preimplantación.
- . Los efectos del consumo crónico podrían deberse en parte a las acciones del etanol en los días periovulatorios (fase subcrónico), pero hay que notar que los efectos deletéreos producidos por la cronicidad fueron diferentes (menores) que los provocados por el consumo subcrónico. El tiempo y período de exposición al etanol es crítico en cuanto a la intensidad de sus efectos en la ovulación y la calidad de los ovocitos.
- . La respuesta cuantitativa a la inducción ovulatoria fue reducida en las hembras tratadas con etanol al 10 y 5%, produciéndose retraso en la maduración folicular.
- . La respuesta cualitativa se alteró con el consumo de etanol al 10 y 5%. Los ovocitos oviductales a las 16 hs posthCG, de las hembras tratadas con 10 y 5% de etanol, presentaron elevados índices de activación partenogenética, y la capacidad de síntesis de PGE por el CCO fue reducida con el consumo del 10% y aumentada con el consumo del 5%.

b- En la función masculina:

- . La concentración, motilidad y morfología espermática caudal de los machos tratados no fue alterada con etanol al 10 y 5%. Tampoco, fue modificada la motilidad e hiperactivación, la reacción acrosomal espontánea y la viabilidad temprana estudiadas en sistema de capacitación *in vitro*. Solamente la síntesis de 5-HETE (producto de la lipooxigenasa) se modificó en forma bifásica, con ambos tratamientos.

c- En la interacción gamética:

. La **fecundación *in vitro*** disminuye en las hembras tratadas con etanol al 10 y 5%. debido a que: 1) los ovocitos no pueden ser penetrados por los espermatozoides (reducción en la tasa de activación postinseminación). 2) los ovocitos activados espontáneamente (II CP + 1PN) tampoco son fecundados, permaneciendo en elevada cantidad. 3) incremento de la fragmentación ovocitaria postinseminación cuando las hembras y los machos fueron tratados con ambas dosis de etanol.

. La **fecundación *in vivo*** se reduce en las hembras tratadas con ambas dosis, siendo los motivos los mismos que ocurren en la fecundación *in vitro*. Estos resultados demuestran que el ambiente fisiológico de la ampolla oviductal no es suficiente para que las hembras tratadas tengan niveles normales de fecundación. La ingesta crónica de etanol al 10 y 5% puede afectar directamente al ovocito y producir anomalías morfológicas ovocitarias, que fueron semejantes para ambas dosis de exposición.

d- En el desarrollo preimplantativo:

. El consumo crónico de etanol produce, en el desarrollo **embrionario *in vitro* e *in vivo***: tasa embrionaria reducida, retraso en el crecimiento embrionario general y en el tiempo de división celular individual, arresto en estadios más tempranos con la dosis del 10% de etanol, pérdida embrionaria por fragmentación general, y pérdida individual por reducción del número de células por embrión, acompañado de alteraciones morfológicas más severas con el consumo de etanol al 10%.

Se pudo determinar que los efectos de la ingesta de etanol al 10% produce mayor toxicidad que la dosis del 5%, manifestada por la intensidad de la pérdida embrionaria temprana.

. Así, podemos afirmar que el consumo de etanol al 10% produce pérdida embrionaria en estadios más tempranos que con 5%, en el desarrollo *in vitro* e *in vivo*. El consumo crónico de etanol al 10% es más severo en sus efectos tardíos o de largo plazo relativos al desarrollo embrionario de preimplantación.

2. Perspectivas futuras.

A partir de este trabajo de tesis se plantearon nuevas perspectivas de investigación relativas al alcoholismo en la reproducción, que es un área poco estudiada en nuestro país a pesar de su impacto en lo socio-cultural. El diagnóstico y la prevención de las patologías inducidas por el consumo de alcohol son tan esenciales como la misma investigación básica de los mecanismos de acción del abuso de esta droga. En relación a este campo reproductivo, se propone continuar los estudios de toxicidad por el consumo de etanol, haciendo hincapie en los siguientes temas o tópicos que permitan:

- a). Elucidar el modo de activación partenogenética de los ovocitos de las hembras tratadas.
- b). Profundizar el conocimiento de los mecanismos de alteración de la calidad del complejo cúmulo-ovocitario en relación con la síntesis de PGs y AMPc.
- c). Evaluar el complemento cromosómico de los ovocitos y embriones tempranos, y la formación de aneuploidías (no disyunción).
- d). Evidenciar la existencia de anomalías en la fisiología espermática relacionada con el sistemas de capacitación *in vitro*.
- e). Establecer si existe una correlación entre los niveles de PGE embrionaria y las alteraciones morfológicas en el embrión de preimplantación.
- f). Estudiar los efectos del consumo crónico sobre la fisiología del útero en la preñez temprana.



CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- . Abe, H. y Oikawa, T. (1991). *Anat.Rec.* 229: 305.
- . Abel, E.L. (1980). *Drug-Alcohol Dep.* 5: 321.
- . Abel, E.L. (1982). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 6: 369.
- . Abel, E.L. (1993). *Alcohol* 10: 237.
- . Abel, E.L. (1996). En: *Fetal Alcohol Syndrome.* (Abel, E.L ed.). CRC Press, Boca Raton, New York, London. pp: 249-268.
- . Abel, E.L. y Sokol, R.J. (1987). *Drug Alcohol Depend.* 19: 51.
- Abraham, G.E., Odell, W.D., Swerdloff, R.S. y Hopper, K. (1972). *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 34: 312.
- . Acott, T., Katz, D. y Hoskins, D. (1983). *Biol.Reprod.* 29: 389.
- . Adams, M.L. y Cicero, T.J. (1991). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 15: 685.
- . Aitken, R.J. y Kelly, R.W. (1985). *J.Reprod.Fert.* 73: 139.
- . Allison, A.C. y Hartree, E.F. (1970). *J.Reprod.Fert.* 21: 501.
- . Allison, M.R. y Sarraf, C.E. (1992). *J.R.Coll.Physicians Lond.* 26: 25.
- . Alvarez, M.R., Cimino, L.E. y Pusateri, T.J. (1980). *Cytogen. Cell Genetics* 28: 173.
- . Anderson, E. y Albertini, D.F. (1976). *J.Cell Biol.* 71: 680.
- . Anderson, R.A., Beyler, S.A. y Zaneveld, L.J.D. (1978). *Fertil.Steril.* 30: 103.
- . Anderson, R.A., Furby, J.E., Oswald, C. y Zaneveld, L.J.D. (1981). *Neurobeh. Toxicol. Teratology* 3: 117.
- . Anderson, R.A., Reddy, J.M., Joyce, C., Willis, B.R., Van der Ven, H. y Zaneveld, L.J.D. (1982). *Biol.Reprod.* 27: 833.
- . Anderson, R.A., Reddy, J.M., Oswald, C., Willis, B. y Zaneveld, L.J.D. (1980a). *Fed.Proc.* 30: 542.
- . Anderson, R.A. y Willis, B.R. (1981). *Br.J.Alcohol Alcohol* 16: 179.
- . Anderson, R.A., Willis, B.R., Oswald, C., Reddy, J.M., Beyler, S.A. y Zaneveld, L.J.D. (1980). *Biochem.Pharmacol.* 29: 1409.
- . Anderson, R.A., Willis, B.R., Oswald, C. y Zaneveld, L.J.D. (1983). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 225(2): 479.
- Anderson, R.A., Willis, B.R., Phillips, J.F., Oswald, C. y Zaneveld, L.J.D. (1987). *Biochem.Pharmacol.* 36(13): 2157.
- . Anggard, E. (1983). *Pharmacol.Biochem.Behav.* 18 (suppl 1): 401.
- . Anton, RF, Becker, HC. y Randall, CL. (1990). *Life Sci.* 46: 1145.
- . Anton, RF., Randall, CL. y Becker, HC. (1988). *Prostaglandins* 36(6): 835
- . Austin, C. (1960). *J.Reprod.Fert.* 3: 310.
- . Austin, C.R. (1969). En: *Fertilization.Vol.2*, ed. Metz, C.B. y Monroy, A. New York: Academic Press. pp: 437-66.
- . Badr, F.M. y Badr, R.S. (1975). *Nature* 253: 134.

- . Balakier, H. y Casper, R.F. (1993). *Human Reprod.* 8: 740.
- . Bannister, P, y Lowosky, M.S. (1987). *Alcohol Alcohol* 22: 213.
- . Baranska, W., Dorywalski, K. y Kujawa, M. (1973). *Folia Histochem. Cytochem.* 11: 303.
- . Barilyak, I.R. y Kozachuk, S.Y. (1981). *Cytol.Genet.* 15: 24.
- . Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E. y Austin, C. (1967). *J.Cell Biol.* 34: C1.
- . Barros,C., Capote, C., Perez, C., Crosby, J.A., Becker, M. y De Ionannes, A. (1992). *Biol. Res. (Chile)* 25: 31.
- . Barton, S.C., Adams, C.A., Norris, M.L. y Surani, M.A.H. (1985). *J. Embryol.Exp.Morphol.* 90: 267.
- . Barth, LG. y Barth, LJ. (1972). *Dev.Biol.* 28: 18.
- . Barton, S.C., Surani, M.A.H y Norris, M.L. (1984). *Nature* 311: 374.
- . Baskar, JF., Torchiana, DF., Biggers, JD., Corey, EJ., Anderson, NH. y Subramanian, N. (1981). *J.Reprod. Fert.* 63: 359.
- . Bavister, B.D. (1982). *J.Androl.* 3: 365.
- . Bedford, J.M. y Kim, H.H. (1993). *Hum.Reprod.* 8(3): 453.
- . Behrman, H. y Romero, R. (1992). ed. por Jaffe y Yen, pp: 238.
- . Bendz, A., (1977). *Prostaglandins* 13: 355.
- . Ben-Yosef, D., Dekel, N., Phillips, D.M. y Shalgi, R. (1993). *Mol.and Cell Endocrinol.* 96: 61.
- . Bergstrom, S., Dressler, F.R., Hage, R., Samuelsson, S. y Sjoval, J. (1963). *J.J.Biol.Chem.* 238: 3555.
- . Bernal, A., Torres, J., Reyes, A. y Rosado, A. (1980). *Biol. Reprod.* 23: 290.
- . Berridge, M.J. (1984). *Bichem.J.* 220: 345.
- . Berrios, M. y Bedford, J.M. (1976). *J.Cell Sci.* 39: 1.
- . Biggers, J.D. (1988). *J.Reprod.Fert.* 82: 802.
- . Biggers, J.D., Bell, J.E. y Benos, D.J. (1988). *Am.J. Physiol.* 255: C419.
- . Biggers, JD., Leonov, BV., Baskar, JF. y Fried, J. (1978). *Biol.Reprod.* 19: 519.
- . Blakley, P.M. (1988). En Kohler, H. (ed): *Issues and Reviews in Teratology*, vol 4. New York, Plenum, pp 237-283.
- . Bleil, J.D.,Greve, J.M. y Wassarman, P.M. (1988). *Dev. Biol.* 128: 376.
- . Bo, W.J., Krueger, W.A., Rudeen, P.K. y col. (1982). *Anat. Rec.* 202: 255.
- . Bo, W.J., Krueger, W.A. and Rudeen, P.K. (1983). *Biol. Reprod.* 28: 956.
- . Boatman, D.E. y Robbins, R.S. (1991). *Mol.Reprod.Dev.*30:396.
- . Boell, E.J. (1985). *J.Exp.Zool.* 234: 105.
- . Bornslaeger, E.A. y Schultz, R.M. (1985). *Biol. Reprod.*33: 698.
- . Bosron, W.F., y Li. T.K. (1986). *Hepatplogy* 6: 502.
- . Boulton. A.A., Baker, G.B. y Wu, P.H. (1992). *Animals models of drug addiction. The*

Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 29-30.

- . Boyd, J., Kaalmus, G. y Pennington, S. (1984). *Alcohol.Clin. Exp.Res.* 8: 34.
- . Brackett, B. y Server, J. (1970). *Fertil. Steril.* 21: 687.
- . Brannigan, J. y Burke, P. (1982). *Teratology* 26: 247.
- . Brannigan, J. y Cotell, D. (1984). *Teratology* 30, 281-290.
- . Braude, P.R. (1979). *Dev.Biol.* 68: 440.
- . Breitbard, H., Shalev, Y., Marcus, S. y Shemesh, M. (1995). *Hum. Reprod.* 10: 2079.
- . Brennan, S.M. (1991). *Teratology* 43: 341.
- . Brien, J.F. y Smith, G.N. (1991). *J.Dev.Physiol.* 15(1): 21.
- . Brinster, R.L. (1971). En "Pathways to Conception". Ed. A. Sherman. Thomas, Springfield. pp. 247-277.
- . Brison, D.R. y Leese, H.J. (1994). *J.Reprod.Fertil.* 101: 305.
- . Brower, P.T. y Schultz, R.M. (1982). *Dev.Biol.* 90: 144.
- . Busa, W.B.y Nucatelli, R. (1984). *Am.J.Physiol.* 246: R409.
- . Butcher, R.L. and Fugo, N.W. (1967). *Fertil. Steril.* 18: 297.
- . Byskov, A.G. (1978). En: Jones, R.E (ed.), *The Vertebrate Ovary*. New York Plenum Press, pp. 533-562.
- . Chamberlin, M.E. y Dean, J. (1990). *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6014.
- . Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L. y Torres, I. (1989). *J.Reprod.Fertil.* 86: 679.
- . Chaud, M., Gonzalez, E., Franchi, A., Fernandez-Pardal, J., Gimeno, AL. y Gimeno, MAF. (1991). *Prost. Leuk. Essent. Fatty Ac.* 42: 119.
- . Checiu, M. (1993). *Rom. J. Morphol. Embryol.*39(1-2): 21.
- . Checiu, M. y Sandor, S. (1981). *Morphol. Embryol. Physiol.* 27: 117.
- . Checiu, M.C. y Sandor, S. (1982). *Morphol. Embryol.* 28: 127.
- . Checiu, M. y Sandor, S. (1986). *Morphol. Embryol.* 32: 5.
- . Chernoff, G.F. (1980). *Teratology* 22: 71.
- . Chiao, Y.B., Johnston, D.E., Gavaler, J.S. Van Thiel, D.H. (1981). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 5: 30.
- . Chisholm, J.C., Johnson. M.H., Warren, P.D., Fleming, T.P. y Pickering, S.J. (1985). *J.Embryol. Exp. Morphol.* 86: 311.
- . Cho, W.K. (1976). *J. Reprod.Fertil.* 47: 1.
- . Cicero, T.J. y Badger, J.R. (1977). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 201: 427.
- . Cicero, T.J., Bernstein, D.y Badger, T. (1978). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 2: 249.
- . Cicero, T.J., Bernard, J.D. y Newman, K. (1980). *J.Pharmacol.Exp.Therap.* 215: 317.
- . Cicero, T.J., Greenwald, J., Nock, B. y O'Connor, C. (1990). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 252: 456.
- . Cicero, T.J., Nock, B., O'Connor, L., Adams, M.L. y col. (1994). *Life Sci.* 12: 901.

- . Cicero, T.J., Nock, B., O'Connor, L., Adams, M.L., Sewing, B.N. y Meyer, E.R. (1994). *Life Sc.* 55(12): 901.
- . Clarren, S.K. y Smith, D.W. (1978). *N.Engl.J. Med.* 298: 1063.
- . Cohen, M.S., Colin, M.J., Golimbu, M. y Hotchkiss, R.S. (1977). *Fertil.Steril.* 28: 78.
- . Cooper, A.R. y Mac Queen, H.A. (1983). *Dev. Biol.* 96: 467.
- . Cooper, G.W., Overstreet, J.M. y Katz, D.F. (1979). *Gamete Res.* 2: 35.
- . Cooper, T.G. (1984). *Gamete Res.* 9: 55.
- . Coskun, S. y Lin, Y.C. (1992). *Biol.Reprod.* 46: 138.
- . Crabb, D.W., Bosron, W.F y Li, T.K. (1987). *Pharmacol.Ther.* 34: 59.
- . Cran, D.G., Moor, R.M. y Irvine, S. (1988). *J. Cell Sci.* 91: 139.
- . Crisp, T.M. (1992). *Mut.Res.* 296: 89.
- . Crozet, N. (1993). Ed. por Thibault, C., Levasseur, M.C. y Hunter, R.H. Paris, Elipses, pp: 327.
- . Cruz, Y.P. y Pedersen, R.A. (1985). *Dev.Biol.* 112: 73.
- . Cuasnicu, P., Echeverria, F., Piazza, A. y Blaquier, J. (1984). *J. Reprod. Fert.* 70: 541.
- . Cummins, J.M. y Yanagimachi, R. (1986). *Gamete Res.* 15: 187.
- . Cuthbertson, K.S.R. (1983). *J.Exp. Zool.* 226: 311.
- . Davis, S.R., Burger, H.G., Robertson, D.M., Farnworth, P. y col. (1988). *Endocrinol.* 123: 2399.
- . Dawson, T.L., Gores, G.J., Nieminen, A.L., Herman, B. y Lemaster, J.J. (1994). *Am.J.Physiol.* 264: C 961.
- . Day, N.L., Goldschmidt, L., Robles, N., Richardson, G., y col. (1991b). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 15: 914.
- . De Felici, M., Dolci, S. y Siracusa, G. (1991). *J.Exp.Zool.* 260: 401.
- . de Fiebre, N.C., de Fiebre, C.M., Booker, T.K., Nelson, S. y Collins, A.C. (1994). *Alcohol* 11 (4): 329.
- . Dees, W.L. y Skelley, C.W. (1990). *Neuroendocrinology*
- . Dees, W.L., Skelley, C.W., Hiney, J.K. y Johnston, C.A. (1990). *Alcohol* 7(1): 21.
- . Dekel, N. (1988). En: *Cell to cell communication in endocrinology*. Raven Press, pp. 181.
- . Dekel, N. (1988). En: *Progress in Clinical and Biological Research. Meiotic Inhibition: molecular control of meiosis*. (Haseltine y First, eds.) Alan R. Liss, Inc., New York, pp:87.
- . Deutch, D.S., Katz, D. y Overstreet, J. (1985). *Biol.Reprod.* 32: 865.
- . Dodds, W.G., Awadalla, S.G., Hixson, C., Roh, S.I. Friedman, C.I. y Kim, M.H. (1989). *Obstet.Gynecol.* 73: 191.
- . Downs, S., Coleman, D., Ward-Bailey, P. y Eppig, J. (1985). *PNAS (USA)* 82: 454.
- . Downs, S.M. (1990). En: *Fertilization in Mammalian*. (Bavister, B.D. y col. eds.), Serono Symposia, USA, Norwell, MA. pp: 5-16.

- . Downs, S.M. (1993). *Theriogenol.* 39: 65.
- . Downs, S.M., Daniel, S.A.J. y Eppig, J.J. (1988). *J.Exp.Zool.* 245: 86.
- . Dreosti, I., Ballard, F., Belling, G. Record, I., Manuel, S. y Hetzel, B. (1981). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 5: 357.
- . Droitte, I., Lamboeuf, Y. y de Saint Blanquat, G. (1984). *Life Sci.* 35: 1221.
- . DuBois, R.N., Awad, J., Morrow, J. y Roberts, L.J. (1994). *J.Clin.Invest.* 93: 493.
- . Ducibella, T., Albertini, D.F., Anderson, E. y Biggers, J. (1975). *Dev. Biol.* 45: 231.
- . Duncan, M. y Fraser, L.R. (1993). *J.Reprod. Fert.* 97: 287.
- . Dyban, A.P. y Khozai, L.I. (1980). *Bull. Exp.Biol.Medicin* 89: 528.
- . Eddy, E.M. (1988). *The Physiology of Reproduction.* Ed. Knobil, E. y col.,pp: 27, Raven Press, Ltd., New York.
- . Edwards, R.G. (1974). *J.Reprod.Fert.* 37: 189.
- . Edwards, R.G., Donahue, R.P., Baramki, T.A. y Jones, H.W. (1966). *Am.J.Obstet.Gynaecol.* 96: 192.
- . Edwards, H.G. y Dow-Edwards, D.L. (1991). *Teratology* 4(4): 373.
- . Ehrenwald, E., Parks, J. y Foote, R.H. (1988). *Gamete Res.* 20: 145
- . Eichenlaub-Ritter, U. (1994). En: *Curr. Topics Develop. Biol.* 29. (Pedersen, R.A. ed.). Acad.Press, San Diego, pp: 283-324.
- . Eichenlaub-Ritter, U., Schmiady, H., Kentenich, H. y Soewarto, D. (1995). *Hum.Reprod.* 9: 2343.
- . Epel, D. (1979). En: *Mechanisms of cell change.* Ed. por Ebert, J. y Okada, T. pp: 17-31, John Wiley y Sons, New York.
- . Epifano, O. y Dean, J. (1994). *Reprod.Fertil.* 6: 319.
- . Eppig, J.J. (1978). *Differentiation* 12: 111.
- . Eppig, J.J. (1981). *Biol.Reprod.* 25: 191.
- . Eppig, J.J. (1982). *Gamete Res.* 5: 229.
- . Eppig, J.J. y Downs, S.M. (1984). *Biol.Reprod.* 30: 1.
- . Eppig, J.J., Wigglesworth, K. y Chesnel, F. (1993). *Dev.Biol.* 158: 400.
- . Eskay, R.L., Ryback, R.S., Goldman, M. y col. (1981). *Alcoholism: Clin. and Exp. Res.* 5: 204.
- . Eskay, R.L., Ryback, R.S., Goldman, M. y Majchrowicz, E.
- . Ficher, M. y Levitt, D.R. (1980). *J.Steroid Bichem.* 13: 1089.
- . Fisher, S.E., Atkinson, M., Van Thiel, .H., Roseblum, E. y col. (1981). *Life Sci.* 20: 1283.
- . Flechon, J.E., Huneau, D., Solari, A. y Thibault, C. (1975). *Annl's Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 15: 9.
- . Flower, F.J. y Blackwell, G. (1976). *Biochem. Pharmacol.* 25: 285.
- . Forrest, F., Du Florey, C. y Taylor, D. (1992). *Int.J .Epidemiol.* 21: s17.

- . Fortune, J.E. (1994). *Biol.Reprod.* 50: 225.
- . Fowler, R.E., Fox, N.L., Edwards, R.G., Walters, D.E. y Steptoe, P.C. (1978). *J.Endocrinol.* 77: 171.
- Franchi, A.M., Faletti, A., Fernandez-Pardal, J., Gimeno, MAF. y Gimeno, A. (1988). *Prostagl. Leuk. and Essential Fatty Ac.* 33: 69.
- . Fraser, L.R. (1977). *J.Exp.Zool.* 202: 439.
- . Fraser, L.R. (1985). *J.Reprod.Fert.* 74: 185.
- . Fraser, L.R. y Drury, L.M. (1975). *Biol. Reprod.* 13: 513.
- . Fraser, L.R. y McDermott, C.A. (1992). *J.eprod. Fert.* 96: 363.
- . Fujii, T., Hoover, D.J. y Channing, C.P. (1983). *J.Reprod.Fert.* 69: 307.
- . Gallicano, G.I., Schwarz, S.M., McGaughery, R.W. y Capco, D.G. (1993). *Dev.Biol.* 156: 94.
- . Galsler, K.B., Mobilio, D., Chang, J. y Senko, N. (1993). *TIPS* 14: 92.
- . Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992). *J.cell Biol.* 19: 493.
- . Gilula, N.B., E[stein, M. y Beers, W. (1978). *J.Cell Biol.* 78: 58.
- . Ginsburg, K.A., Blacker, C.M., Abel, E.L. y Sokol, R.L. (1991). *Contrib.Gynecol.Obstet.* 18: 115.
- . Goodall, H. y Johnson, M.H. (1984). *J.Embyol.Exp.Morphol.* 79: 53.
- . Goodman y Gilman. *Bases Farmacológicas de la Terapeutica.* 7ma. Ed. Vol. I. pp: 411-417. Interamericana.
- . Goodman, D.R., James, R.C. y Harbison, R.D. (1985). En: *Reproductive Toxicology.* (Dixon, R.L ed.) Raven Press, New York, pp 267-285.
- . Gorczyca, W., Bruno, S. Darzynkiewicz, R.J., Goong, J. y Darzynkiewicz, Z. (1992). *Intern. J.Oncology* 1: 639.
- . Gordon, G.G., Altman, K., Southren, A.L., Rubin, E. y Lieber, C.S. (1976). *N.Engl.J.Med.* 295: 793.
- . Gordon, G.G., Southern, A.L. y Lieber, C.S. (1979). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 3: 310.
- . Gordon, G.G., Vittek, J., Southren, A.L., Munnangi, P. y Lieber, C.S. (1980). *Endocrinology* 106: 1880.
- . Graham, C.F. (1974). *Biological Reviews* 49: 399.
- . Greep, R.O., Van Dyke, H.B. y Chow, B.F. (1942). *Endocrinol.* 30: 635.
- . Grodstein, F., Goldman, M.B. y Cramer, C.W. (1994). *Am-J-Public-Health* 84(2): 1429.
- . Gulyas, B.J. (1980). *Int.Rev.Cytol.* 63: 357.
- . Gulyas, B.J. y Schemell, E.D. (1980). *Gamete Res.* 3: 267.
- . Gulyas, B.J. y Yuan, L.C. (1985). *J.Exp.Zool.* 233 (3): 269.
- . Halpin, D.M., Jones, A., Finks, G. y Charlton, H.M. (1986). *J.Reprod.Fertil.* 77: 287.
- . Hammond, J.M., Hsu, C.J., Klindt, J., Tsang, B.K. y Downey, B.R. (1988). *Biol.Reprod.* 38: 304.

- Handelr, J.A., Koop, D.R., Coon, M.J., Takei, Y y Thurman, R.G. (1988b). Arch.Biocehm.Biophys. 254: 114.
- . Handler, J.A., Forman, D.T., Glassman, E.B., Koop, D. y col. (1988a). En: Biomedical and social aspects of alcohol and alcoholism. (Kuriyama, K., Takada, A. y Ishii, H. eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, pp: 71-75.
- . Handyside, A.H. (1978). J.Embryol. Exp.Morphol. 45: 37.
- . Harlap, S. and Shiono, P.H. (1970). Lancet, 2: 173.
- . Harlow, G.M. y Quinn, P. (1982). Aust.J.Biol.Sci. 35: 187.
- . Harris, R., Ramwell, P. y Gimer, P (1979).J. Ann. Rew.Physiol. 41: 653.
- . Hartshorne, GM. y Edwards, RG. (1991). Bailliere's Clin. Obstet.Gynaecol. 5: 133.
- . Hashieh, I.A., Mathieu, Gerolami, A. (1992). Hepatology 15: 751.
- . Heine, M.W. (1981). Prog.Biochem.Pharmacol. 18: 75.
- . Helmond, F.A., Simons, P.A. y Hein, P.R. (1980). Endocrinol. 107: 478.
- . Henderson, G.I. y Schenker, S. (1997). Res. Comm.Chem.Pathol. Pharmacol. 16: 15.
- . Henery, C.C. y Kaufman, M.H. (1992). Mol. Reprod.Dev. 31: 258.
- . Herrero, M.B., Franchi, A.M. y Gimeno, M.A.F. (1995). Prost.Leuk.Ess. Fatty Ac. 53: 347.
- . Hertig, A.T. (1967). *Comparative Aspects of Reproductive Failure*. pp 11-14. K. Bernischke. Berlin.
- . Hillensjo, T., Magnusson, C., Svensson, U. y Thelander, H. (1981). Endocrinol. 108: 1920.
- . Edwards, R.G. (1974). J.Reprod.Fert. 37: 189.
- . Edwards, R.G., Donahue, R.P., Baramki, T.A. y Jones, H.W. (1966). Am.J.Obstet.Gynaecol. 96: 192.
- . Hillier, S.G.y De Zwart, F.A (1981). Endocrinol. 109: 1303.
- . Hillier, S.G., van der Boogaard, A.M.J., Reichert, L.E. y van Hall, E.V. (1980). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 50: 640.
- . Hirshfield, A.N. (1991). Internat.Rev.Cytol. 124: 43.
- . Hoek, J.B. y Rubin, E. (1990). Alcohol Alcohol 25: 143.
- . Hoffman, LH., Strong, GB., Davenport, GR. y Frolich, JC. (1977). J.Reprod.Fertil. 50: 231.
- . Holmes, PV. y Gordashko, BJ. (1977). Proc. Can. Fed. Biol. Soc. 20: 668.
- . Holmes, PV. y Gordashko, BJ. (1980). J.Embryol. Exp. Morph. 55: 109.
- . Holmes, PV., Sjogren, A. y Hambereger, L. (1990). J.Reprod. Immunol.17: 79.
- . Horrobin, DF. (1980). Med. Hypoth. 6: 929.
- . Howlett, S.K. y Bolton, V.N. (1985). J.Embryol. Exp. Morphol. 87:175.
- . Hubbard, C.J. y Terranova, P.F. (1982). Biol.Reprod. 26: 628.
- . Hughes, J.N., Coste, T., Perret, G., Jayle, M.F., Seboan, J. y Modigliani, E. (1980). Cli. Endocrinol. 12: 543.
- . Hughes, J.N., Coste, T., Perret, G. y col. (1980). Clin. Endocrinol. 12: 543.

- . Huie, JM., Magness, RR., Reynolds, LP., Hoyer, G., Huecksteadt, T., Colcord, M., Stalcup, B., Whysong, GL. y Weems, CW. (1981). *Prostaglandins* 21: 945.
- . Hunt, P.A. (1987). *Cytogen. Cell Genetics* 44: 7.
- . Hunter, R., Cook, B. y Poyser, N. (1983). *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 14: 225.
- . Hutz, R.J., Dierschke, D.J. y Wolf, R.C. (1990). *J. Med. Primatol.* 19: 553.
- . Hwang, PH. (1982). *Prost. Med.* 7: 511.
- . Hyne, R.V., Edwards, K.P. y Smith, J.D. (1985). 12: 65.
- . Ishijima, S., McCracken, J. y Witman, G. (1985). *J.*
- . Jackwoski, S., Leibo, S.P. y Mazur, P. (1988). *J. Exp. Zool.* 212: 329.
- . Jaffe, J.H. (1985). En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7th ed.). (Gilman, A.G y col. eds.) New York: Macmillan. pp: 532-581.
- . Jaffe, L.A., Sharp, A.P. y Wolf, D.P. (1983). *Dev. Biol.* 96: 317.
- . Jasen, R., (1978). *Science* 201: 349.
- . Johnson, DC. y Dey, SK. (1980). *Biol. Reprod.* 22: 1136.
- . Jones, KL. y Smith, DW. (1973). *Lancet* 2: 999.
- . Jones, K.L., Smith, D.W., Ulleland, C.N. y Streissguth, A.P. (1973). *Lancet* 1: 1267.
- . Jones, KL., Smith, DW., Ulleland, CW. y col. (1973). *Lancet* 1: 1267.
- . Joyce, C., Oswald, C. y Anderson, R.A. (1982). *Biol. Reprod.* 24: 85A.
- . Joyce, C.L., Nuzzo, N.A., Wilson, J.R. y Zaneveld, L.D.J. (1987). *J. Androl.* 8: 79.
- . Jurisicova, A., Varmuza, S. y Casper, R.F. (1996). *Mol. Hum. Reprod.* 2(2): 93.
- . Karanian, JW., Stojanov, M y Salem, NJ. (1985). *Prost. Leuk. Med.* 20: 175.
- . Karkinen-Jaaskelainen, M. (1985). En: *Occupational Hazards and Reproduction*, pp. 17-29. Eds. K. Hemminki, M. Sorsa y H. Vainio. McGraw-Hill, Washington.
- . Kato, S., Alderman, J. y Lieber, C.S. (1988). En: *Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism*. (Kuriyama, K., Takada, A. y Ishii, H. Eds.), *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp: 67-70.
- . Kaufman, M.H. (1973). *Nature* 242: 475.
- . Kaufman, M.H. (1978). En: Daniel J.C. Ed. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic Press, pp 21-47.
- . Kaufman, M.H. (1981). En R.J. Harrison, R.L. Holmes eds: "Progress in Anatomy", pp. 1-34. Cambridge University Press.
- . Kaufman, M.H. (1983). "Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies". Cambridge Univ. Press. London y New York.
- . Kaufman, M.H. (1984). *BioEssay* 1: 117.
- . Kaufman, M.H. (1985). *J. Med. Genet.* 22: 171.
- . Kaufman, M.H. (1990). *Early Mammalian development: parthenogenetic studies*. Cambridge and London, Cambridge University Press.

- . Kaufman, M.H. (1997). *Alcohol Alcoholism* 32(2): 113.
- . Kaufman, M.H. y Gardner, R.L. (1974). *J.Embryol. Exp. Morphol.* 31: 635.
- . Kaufman, M.H. y Sachs, L. (1976). *J.Embryol.Exp.Morphol.* 35: 179.
- . Kaye, P.L., Schultz, G.A., Johnson, M.H., Pratt, H.P. y Church, R.B. (1982). *J.Reprod.Fert.* 65: 367.
- . Kennedy, TG. (1977). *Biol.Reprod.* 16: 286.
- . Kennedy, TG. (1980). *Biol.Reprod.* 23: 955.
- . Kennedy, TG. y Doktorcik, PE. (1980). *Prostaglandins* 35: 207.
- . Kennedy, TG. y Lukash, LA. (1982). *Biol.Reprod.* 27: 253.
- . Kinoshita, K., Satoh, K., Ishihara, O. y col. (1985). *Adv. Prostagl. Tromboxane Leukot. Res.*15: 605.
- . Klassen R. W. y Persaud, T.V.N. (1978). *Int.J.Fertil.* 23: 176.
- . Kline, D. (1996). *Theriogenology* 45: 81.
- . Kline, D. y Kline, J.Y. (1992). *Dev.Biol.* 149: 80.
- . Knobil, E. (1974). *Recent Progr.Horm.Res.* 30: 1.
- . Koering, M.J., Danforth, D.R. y Hodgen, G.D. (1991). *Biol.Reprod.* 45: 890.
- . Koes, M., Ward, T. y Pennington, SN. (1974). *Lipids* 9: 899.
- . Kopf, G y Gerton, G.L. (1991). *The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction.* Ed Wassarman, P.M., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 153.
- . Kotch, L.E. y Sulik, K.K. (1992). *Am.J. Medicin and Genetic* 44(2): 168.
- . Kowalczyk, J.J., Stachecki, J.F., Schultz, R.E., Leach, D.R. y Armant, D.R. (1996). *Alcohol.Clin. Exp.Res.* 20: 3.
- . Krueger, A.W., Bo, W.J. and Rudeen, P.K. (1982). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 629.
- . Kubiak, J.Z. (1989). *Dev.Biol.* 136: 537.
- . Larroque, B. (1992). *Int.J.Epidemiol.* 21: S8.
- . Lau, IF. y Chang, MC. (1975). *Proc.Soc. Study Reprod.*10: 19.
- . Lau, IF., Saksena, SK. and Chang, MC. (1973). *Prostaglandins* 4: 795.
- . Leach, R.E., Stachecki, J.J. y Randall, A. (1993). *Teratology* 47: 57.
- . Lechene, C. (1982). *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 383: 513.
- . Ledig, M., Megias-Megias, L. y Tholey, G. (1991). *Alcohol and Alcohol* 26 (2): 169.
- . Ledig, M., Tholey, G., Kopp, P. y Mandel, P. (1989). *Neurochem.Res.* 6: 386.
- . Lee, M. y Wakabayashi, K. (1985). *Alcoh.Clin.Exp.Res.* 9: 417.
- . Leese, H.J. (1988). *J.Reprod.Fertil.* 82: 843.
- . Leese, H.J. (1991). *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 13: 35.
- . Leidig, M., Tholey, G., Kopp, P. y Mandel, P. (1989). *Alcohol-Alcohol* 24(3): 231.
- . LeMaire, W.J. (1989). *Steroids* 54: 455.
- . Les Dees, W. and Skelley, C.W. (1990). *Neuroendocrinol.* 51: 64.

- . Leung, A.Y. y Wong, P.Y. (1994). NIPS 9: 31.
- . Lewis, W.H. y Wright, E.S. (1935), Carnegie Instit. Contrib. Embryol. 25: 113
- . Lieber, C.S. (1983). Clin.Exp.Res. 7: 2.
- . Lieber, C.S. (1990). J.Stud.Alcohol. 51: 101.
- . Lieber, C.S. (1991). Alcohol.Clin.Exp.Res. 15: 573.
- . Lieber, C.S. (1994). Endocrinol. 4: 127.
- . Lieber, C.S., DeCarli, L.M. y Sorrell, M.F. (1989). Hepatology 10(4): 501.
- . Little, R.E. y Sing, C.F. (1987). Teratology 36: 59.
- Lochry, EA., Randall, CL., Goldsmith, AA. y Stker, PB. (1982). Neurobehav. Toxicol.Teratol. 4: 15.
- . Longo, F.J. (1980). Gamete Res. 3: 379.
- . Longo, F.J., Lynn, J.W., McCulloh, D.H. y Chambers, E.L. (1986). Dev.Biol. 118: 155.
- . Macara, I.G. (1975). Am.J.Physiol. (Cell Physiol.17) 248:C3.
- . Majumdar, S.K. (1979). Practitioner 222: 693.
- . Mankes, R.F., LeFevre, R., Benitz, K.F., Roseblum, I., Bates, H. y col. (1982). J.Toxicol. environ.Hlth 10: 871.
- . Mann, J.R. y Lovell-Badge, R.H. (1984). Nature 310: 66.
- March, C.M., Goebelsmann, U., Nakamura, R.M. y Mishell, D.R.Jr. (1979). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 49: 507.
- . Marcus, G.J. (1990). Mol.Reprod.Dev. 26: 159.
- . Marion, G.B. y Gier, H.T. (1971). J,aNIM.sCI. 32: 24.
- . Mattson, B.A. y Albertini, D.F. (1990). Mol.Reprod.Dev. 25: 374.
- . Maxwell, D.S. (1984). En: Alcoholism. (West, L.J. moderador). Ann.Intern.Med. 100: 405.
- . Mc Grath, J. y Solter, D. (1984). Cell 37: 179.
- McNatty, K.P., Makris, A., DeGrazia, C., Osathanondh, R. y Ryan, K.J. (1979). J.Endocrinol.Metabol. 49: 687.
- . McNatty, K.P., Makris, A., Osathanondh, R y Ryan, K.J. (1980). Steroids 36: 53.
- McNatty, K.P., Smith, D.M., Makris, A., Osathanondh, R. y Ryan, K.J. (1979). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 49: 851.
- . Meistrich, M.L. y Reid, B.O. (1976). Exp. Cell. Res. 99: 72.
- . Meizel, S. y Turner, K.O. (1984). J.Exp.Zool. 231: 283.
- . Mello, N.K. (1988). En: Recent Development in Alcoholism, ed, by M. Galanter, y col. Plenum Publishing Corp., New York, 6: 253-276,
- Mello, N.K. (1988). *Recent Developments in Alcoholism*, pp.253-276. Galanter, M.. y col.(ed.). New York.
- . Mello, N.K., Bree, M.P., Mendelson, J.H. y col. (1983). Science, 221: 677.
- . Mello, N.K., Mendelson, J.H. y Teoh, S.K. (1992). En: Medical Diagnosis and Treatment of

- alcoholism. (Mendelson, J.H. y col. eds.) New York: McGraw. pp: 575-621.
- . Mendelson, J.H. y Mello, N.K. (1988). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 245: 407.
- . Mendelson, J.H., Mello, N.K. y Ellingboe, J. (1977). *J.Pharmacol. Exp.Ther.* 202: 676.
- . Merz, E.A., Brinter, R.L., Brunner, S. y Chen, H.Y. (1981). *J.Reprod. Fertil.* 61: 415.
- . Mira, L., Maia, L., Barreira, L. y Manso, C.F. (1995). *Arch. Biochem. and Biophysis* 318: 53.
- . Mirmiran, M. y Boer, S. (1988). En: *Teratogens: chemicals which cause birth defects.* (Meyer, V.K. ed.) Elsevier Science Publishers Company, New York, pp 271-314.
- . Miyazaki, S. (1988). *Dev. Growth Differ.* 30: 603.
- . Moller, C.C. y Wassarman, P.M. (1989). *Dev.Biol.* 132: 103.
- . Monis, H. y Bavister, B.D. (1990). *Reprod.Fert.Dev.* 2: 1.
- . Moon, Y.S., Dorrington, J.H. y Armstrong, D.T. (1975). *Endocrinol.* 97: 244.
- . Moon, Y.S., Tsang, B.K., Simpson, C. y Armstrong, D.T. (1978). *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 47: 263.
- . Moore, H. (1979). *Int.J.Androl.* 2: 449.
- . Moos, J., Faundes, D. y Kopf, G. (1995). *Hum.Reprod.* 10: 2467.
- . Moreau, M. y Guerrier, P. (1979). En: *Detection and measurement of free Ca⁺⁺ in cells.* (Ashley, C.C. y Campbell, A.K. eds.). Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam, pp: 216-226.
- . Mori, M. y Marsh, J.M. (1982). *J.Biol.Chem.* 257: 6178.
- . Morse, D.E., Duncan, M., Hooker, N. y Morse, A. (1977). *Science* 196: 298.
- . Mortillo, S. y Wassarman, P.M. (1991). *Development* 113: 141.
- . Motlik, J., Nagai, T. y Kikuchi, K. (1991). *J.Exp.Zool.* 259: 386.
- . Muechler, E.K., Graham, M.C., Huang, K.E., Partridge, A.B. y Jones, K. (1989). *J.In Vitro Fertil. and Embryo Transfer.* 6: 335.
- . Mueller, P.L., Schreiber, J.R., Lucky, A.W., Schulman, J.D. y col. (1978). *Endocrinol.* 102: 824.
- . Mulnard, J. y Huygens, R. (1978). *J.Embryol Exp. Morphol.* 44: 121.
- . Munné, S. y Cohen, J. (1994). *Hum. Reprod.* 9: 506.
- . Murdoch, W.J. (1988). *Cell Tiss. Res.* 252: 459.
- . Nakano, J., Anggard, E. y Samuelsson, B. (1969). *B.Au.J.Biochem.* 11: 386.
- . Natarajan, A.T. y Obe, G. (1982). En: *Mutagenicity: New Horins in Genetic Toxicology.* (Heddler, J. ed.) Academic Press, New York, pp: 171.
- . Nelson, B.K. y Richard, K.J. (1994). En: *Trace Elements and free radicals in oxidative diseases,* (Favier, A.E. y col. eds.), AOCS Press, Illinois USA, pp 284-300.
- . Nicolson, G.L. (1976). *Biochem. Biophys. Acta* 457: 57.
- . Niimura, S. y Ishida, K. (1987). *J.Reprod.Fert.* 80: 505.
- . Nordmann, N. (1994). *Alcohol-Alcohol* 29: 513.

- . Randall, C.L. y Taylor, W.J. (1979). *Teratology* 19: 305.
- . Randall, CL, Anton, RF. y Becker, HC. (1987). *Life Sci.* 41: 361.
- . Randall, CL. y Anton, RF. (1984). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8: 513.
- . Randall, CL., Anton, RF. y Becker, HC. (1987). *Alcohol. Clin.Exp.Res.* 11: 32.
- . Randall, CL., Anton, RF., Becker, HC., Hale, RL. y Ekblad, U. (1991). *Teratology* 44: 521.
- . Ravnik, S.E., Albers, J.J. y Muller, C.H. (1993). *Fertil.Steril.* 59:629.
- . Reynolds, LP., Stigler, J., Hoyer, GL., Magness, RR., Huie, JM., Huecksteadt, TP., Whysong, GL., Behrman, HR. y Weems, CW. (1981). *Prostaglandins* 21: 957.
- . Richards, J.S. (1979). *Recent Progr.Horm.Res.* 35: 343.
- . Richards, J.S. y Williams, J.L. (1976). *Endocrinol.* 99: 1571.
- . Richards, J.S., Jahnsen, T., Hedin, L., Lifka, J., Ratoosh, S., Durica, J.M. y Goldrich. (1987). *Horm.Res.* 43: 231.
- . Richards, J.S., Midgley, A.R.Jr. (1976). *Biol.Reprod.* 14: 82.
- . Rivier, C., Imaki, T. y Vale, W. (1990). *Brain Res.* 520: 1.
- . Rivier, C., Rivier, J. y Vale, W. (1986). *Science* 234: 205.
- . Rochwerger, L. y Cuasnicu, P. (1992). *Mol.Reprod.Dev.* 31: 34.
- . Rogers, B.J. (1982). En: *Biochemistry of mammalian Reproduction.* (Zaneveld, L.J.D. y Chatterton, R.T. eds.). John Wiley, New York. pp: 203.
- . Rogers, B.J., Cash, M.K.M. y Vaughin, W.K. (1987). *Gamete Res.* 16: 97.
- . Rose, B. y Loewenstein, W.R. (1975). *Nature* 254: 250.
- . Rossant, J. y Lis, W.T. (1979). *Dev.Biol.* 70: 255.
- . Rossant, J. y Vijn, K.M. (1980). *Dev.Biol.* 76: 476.
- . Rosset, H.L. (1983). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 4: 119.
- . Rosset, H.L. y Weiner, L. (1984). En: *Alcohol and the fetus, a clinical perspective.* Oxford Univ.Press, Oxford, pp: 3-12.
- . Rotmensch, S., Dor, J., Furman, A., Rudak, E., Mashiach, S. y Amsterdam, A. (1986). *Fert.Steril.* 45: 671.
- . Ruknudin, A. y Silver, I.A. (1990). *Mol.Reprod. Dev.* 26: 63.
- . Sadler, T.W. (1995). En: *Langman's Medical Embryology,* &ma. Ed. Williams y Wilkins Press, Maryland, USA. pp: 122, 147, 165, 341, 344.
- . Salonen, I.y Huhtaniemi, I. (1990). *Biol.Reprod.* 42(1): 55. . Emanuele, M.A., Tentler, J., Reda, D., Kirstein, L., Emanuele, N. y Lawrence, A.M. (1990). *Endocrinol.Res.* 16: 313.
- . Salustri, A., Petrungaro, S. y Siracusa, G. (1985). *Biol.Reprod.*
- . Salustri, A., Yanagishita, M. y Hascall, V.C. (1990). *Dev.Biol.* 138: 26.
- . Samson, H.H. (1981). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 5: 67.
- . Samuelsson, B., Ganstrom.E., Green, L.C. y Hamberg, M. (1971). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 180: 138.

- . Sandor, S., Checiu, M., Fazakas-Todea, I. y Garban, Z. (1980). *Morphol. Embryol.* 26: 265.
- . Santiard, D., Ribiere, C., Nordmann, R. y Houee-Levin, C. (1995). *Free Radical Biol. and Medicin* 19: 121.
- . Sato, E. y Koide, S.S. (1987). *Intern.Rev.Cytol.* 106: 1.
- . Sato, K (1979). *J.Exp.Zool.* 210: 353.
- . Savard, K., Marsh, J.M. y Rice, B.F. (1965). *Rec.Prog.Horm.Res.* 21: 285.
- . Schelgel, W., Rotermund, S., Fraber, G. y Nieschlag, E. (1981). *Prostaglandins* 21: 87.
- . Schenker, S., Becker, H.C., Randall, C.L. y col. (1990). *Alcohol Clin.Exp.Res.* 14: 635.
- . Schiegel, W., Rotermund, S., Farber, G. y Nieschiag, E. (1981). *Prostaglandins* 21: 87.
- . Schreiner, C.A. y Holden, H.,E. (1983). En: *Teratogenesis and Reproductive Toxicology.* (Johnson, E.M. y Kochhar, D.M. ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp 135-168.
- . Schuetz, A.W. y Dubin, N.H. (1981). *Endocrinology* 108: 457.
- . Schultz, R., Wuster, M., Duka, T. y Herz, A. (1980). *Psychopharmacol.* 68: 221.
- . Schultz, R.M. (1986). En: *Experimental Approaches to mammalian embryonic development.* (Rossant J. y col. eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp: 195-237.
- . Schultz, R.M. (1991). En: *Elements of mammalian fertilization.* (Wassarman, ed.). Vol.I, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, pp: 77-104.
- . Schultz, R.M., Montgomery, R.R. y Belanoff, J.R. (1983). *Dev.Biol.* 97: 264.
- . Scialli, A.R. (1992). En: *A Clinical Guide to Reproductive and Development Toxicology,* (Scialli, E.R ed.) CRC Press, Inc. USA, pp 1-27, 95-99.
- . Scott, L. y Smith, S. (1995). *Fertil.Steril.* 63 (1): 166.
- Seilicovich, A., Rubio, M., Duvilanski, B., Munoz-Maines, V. y Rettori, V. (1985). *Psychopharmacol.* 87: 461.
- . Shalgi, R., Kaplan, R., Nebel, L. y Kraicer, P. (1981). *J.Exp.Zool.* 217: 399.
- Shiina, Y., Kaneda, M., Matsuyama, K., Tanaka, K., Hiroi, M., y Doi, K. (1993). *J.Reprod.Fert.* 97: 143.
- . Shire, J.G.M. y Whitten, W.K. (1980). *Biol.Reprod.* 23: 363.
- . Short, R.V. (1962). *J.Endocrinol.* 24: 59.
- . Shur, B.D. y Hall, N.G. (1982). *J.Cell Biol.* 95: 547.
- . Simm, B. y Murdoch, R.N. (1990). *Life Science* 47(2): 1051.
- . Singer, S.L., Lambert, H., Cross, N.L. y Overstreet, J. (1985). *Gamete Res.* 12: 291.
- . Smith, GN., Patrick, J. y Sinervo, KR. (1991). *Can.J. Physiol. Pharm.* 69(5): 550.
- . Smith, M.S., Freeman, M.E. y Neill, J.D. (1975). *Endocrinol.* 96: 219.
- . Smith, T.T y Yanagimachi, R. (1991). *J.Reprod.Fert.* 91: 567.
- . Soewarto, D., Schmiady, H. y Eichenlaub-Ritter, U. (1995). *Hum.Reprod.* 9: 2350.
- . Sokol, R.J., Martier, S.S., Ager, J.W., Abel, E.L. y col. (1993). *Am.J.Obstet.Gynecol.* 168:

48.

- . Sorensen, R.A. y Wassarman, P.M. (1976). *Dev.Biol.* 50: 531.
- . Soyka, M., Goring, M y Naber, D. (1991). *Psychoneuroendocrinol.* 16: 441.
- . Stachecki, J., Yelian, F.D., Leach, R.E. y Armant, D.R. (1994). *J.Reprod.Fert.* 101: 611.
- . Stachecki, J.J., Yelian, F.D., Schultz, J.F., Leach, R.E. y Armant, D.R. (1994). *Biol. Reprod.* 50: 1.
- . Steinhardt, R.A. y Aledrton, J.M. (1982). *Nature, Lond.* 295: 154.
- . Stevens, L.C. (1975). En: *Developmental Biology of Reproduction*. Ed. por Markert, C.L y col., pp: 13-106, Acad. Press, New York.
- . Stojanoff, A., Bourne, H., Andrews, A.G. y Hyne, R.V. (1988). *Gamete Res.* 21: 297.
- Streffler, C., van Beuningen, D., Molls, M., Zambogeon, N. y Schultz, Z. (1980). *Cell Tissue.Kinet.* 13: 135.
- . Streissguth, A.P., Aase, J.M., Clarren, S.K., Randels, S.P. y col. (1991). *JAMA* 265: 1961.
- . Streissguth, A.P., Landesman-Dwyer, S., Martin, J.C. y Smith, D.W. (1980). *Science* 209: 353.
- . Sulik, K.K. y Johnson, M.C. (1983). *Am.J.Anat.* 166: 257.
- . Sulik, K.S., Johnston, M.C. y Webb, M.A. (1981). *Science* 1981; 214: 936.
- . Sun, A.Y. (1972). En: *Biochemistry and Pharmacology of ethanol*. Vol.2. (Majchrowics, E. y Noble, E.R. eds.). New York: Plenum Press. pp: 81.
- . Sundberg, D.K. Bo, W.J. and Reilly, J. (1987). *Neuroendocrinol.* 46: 283.
- . Surani, M.A.H., Barton, S.C. y Norris, M.L. (1984). *Nature* 308: 548.
- . Surani, M.A.H., Reik, W., Norris, M.L. y Barton, S.C. (1986). *J. Embryol. Exp. Morphol.* (Suppl.) 97: 123.
- . Suwaki, H. y Ohara, H. (1985). *J.Studies on Alcohol* 46: 196.
- . Swann, A.C. (1990). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 14(6): 922.
- . Swann, K. (1990). *Development* 110: 2195.
- . Swann, K. (1996). *Reviews of Reproduction* 1: 33.
- . Swann, K. y Ozil, J.P. (1994). *Internat.Reviews Cytol.* 152:183.
- . Tada, T. y Takagi, N. (1992). *Mol.Reprod.Dev.*31(1): 20-7.
- . Takase, K., Ishikawa, M. y Hoshiai, H. (1995). *Tohoku J.Exp.Med.* 175: 69.
- . Tarin, J.J. y Trouson, A. (1994). *Reprod.Fert. Dev.* 6: 33.
- . Tarkowski, A.K. (1959). *Nature* 184: 1286.
- . Tarkowski, A.K. (1977). *Symp.Soc.Dev.Biol.* 33: 107.
- . Tarkowski, A.K. y Wroblewska, J. (1967). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18: 155.
- . Tarkowski, A.S., Witowska, A. y Nowicka, J. (1970). *Nature* 226: 162.
- . Tash, J.S. y Barcho, G. (1994). *J.Androl.* 15: 505.
- Teoh, S.K., Mendelson, J.H., Mello, N.K. Shupny, A. y Ellingboe, J. (1990).

- J.Pharmacol.Exp.Ther. 254: 407.
- . Terakawa, N., Kondo, K., Aono, T., Kurachi, K. y Matsumoto, K. (1978). J.Steroid.Biochem. 9: 307.
- . Terasawa, E., Rodriguez-Sierra, J.F., Dierschke, D.J., Bridson, W.E. y Goy, R.W. (1980). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 51: 1245.
- . Tesarik, J., Pilka, L., Drahorad, J., Cechova, D. y Veselsky, L. (1988). Hum.Reprod. 3: 129.
- . Thomas, M., Boura, A.L.A. y Vijijayakumar, R. (1980). Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. 7: 373.
- . Thompson, F.D. y Woodhouse, C.R.J. (1987). En: Disorders of the kidney and urinary tract. (Hobsley, M y col. eds.) London: Edward Arnold. pp: 136-151.
- . Tombes, R.M., Simerly, Borisy, C. y Schatten, G. (1992). J.Cell Biol. 117(4): 799.
- . Topel, H. (1985). Alcohol 2: 711.
- . Trouson, A.O., Mohr, L.R., Wood, C. y Leeton, J.F. (1982). J.Reprod.Fertil. 64: 285.
- . Tsafiriri, A. (1978). En: The vertebrate ovary. (Jones, R. ed.). New York, pp: 409-442.
- Tsafiriri, A. (1988). En: The Physiology of Reproduction. Vol.1. (Knobil, E.y Neill, eds.). Raven Press, New York, pp: 527-565.
- . Tsang, B.K., Armstrong, D.T.y Whitfield, J.F. (1980). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 51: 1407.
- . Tsukomoto y col., (1985). Hepatology 5: 224.
- . Tuma, D.L. y Sorell, M.F. (1988). Semin.Liver Dis. 8: 69.
- . Uehara, S., Vilee, CA. y Hoshiai, H. (1984). Tohoku J. Exp.Med. 143: 319.
- . Uehara, T. y Yanagimachi, R (1977). Biol.Reprod. 16: 315.
- Valimaki, M., Peljonen, R., Salaspuro, M., Harkonen, M. y col. (1984). J.Clin.Endocrinol.Metabol. 59: 133.
- Valimaki, M., Pelkonen, R., Harkonen, M., Tuomala, P., Koistinen, P. y col. (1990). Eur.J.Clin.Invest. 20: 177.
- . Valimaki, M., Pelkonen, R., Salaspuro, M., Harkonen, M., Hirvonen, E. y Ylikahri, R. (1984). J.Clin. Endocrinol. Metabol. 59: 133.
- . Van Blerkom, J. (1981). Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 78: 7629.
- . Van der Colf, A.P., Cole, A.P., Kruger, T.K., Menkvend, R. Seier, J.V. y col. (1991). Arch. Androl. 26: 25.
- Van der Weiden, RMF, Wisse, LJ., Helmerhost, FM., Keirse, MJNC. y Poelmann, RE. (1996). J.Reprod.Fertil. 107 (2):161.
- Van der Weiden, RMF., Verdijk, RM., Poelmann, RE., Helmehorst, FM. y Keirse, MJNC. (1993). Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Ac. 49: 683.
- . Van Thiel, D.H. y Lester, R. (1974). N.Engl.J.Med. 291: 251.
- . Van Thiel, D.H. y Loriaux, D.L. (1979). Metabol. 28: 536.
- . Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S. y Lester, R. (1978). J. Clin.Invest. 61: 624.
- Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S., Cobb, C.I., Sherins, R.J. y Lester, R. (1979). Endocrinology

105: 888.

- . Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S., Lester, R. y col. (1978). *J.Clin. Invest.* 61: 624.
- . Vanderhyden, B.C., Telfer, E.E. y Eppig, J.J. (1992). *Biol.Reprod.* 46: 1196.
- . Verkuyl, D. (1988). *Br.J.Obstet.Gynecol.* 95: 933.
- . Viggiano, J.M., Cebal, E., Gimeno, A.L. y Gimeno, M.A.F. (1992). *Prost.Leuk. and Ess. Fatty Ac.* 45: 211.
- . Viggiano, J.M., Herrero, M.B., Cebal, E., Boquet, M.G. y Gimeno, M.A.F. (1995). *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Ac.* 53: 261.
- . Viggiano, J.M., Zicari, J.L., Gimeno, A.L. y Gimeno, M.A.F. (1990). *Prost.Leuk. and Ess. Fatty Ac.* 41: 13.
- . Virji, N., Phillips, D. y Dunbar, B. (1990). *Mol.Reprod.Dev.* 25: 339.
- . Volglmayr, J.K. y Sawey, F.R. (1986). *J.Reprod.Fert.* 78: 315.
- . Von Euler, U.S. (1936). *J.Physiol.* 88: 213.
- . Vorbrodt, A., Kouwinski, M., Solter, D. y Koprowski, H. (1977). *Dev. Biol.* 55: 117.
- . Wallace, W.H.B., Shalet, S.M., Henry, P.H., Morris-Jones, P.H. y Gattamaneni, H.R. (1989). *British J.Radiol.* 62: 995.
- . Wang, C., Hsueh, A.J. y Erickson, G.F. (1979). *J.Biol.Chem.* 254: 11330.
- . Ward, L.C. (1987). *Drug-Alcohol Dep.* 19: 333.
- . Waring, A.J., Rottenberg, H., Ohnishi, T. y Rubin, E. (1982). *Arch.Biochem.Biophys.* 216: 51.
- . Wartiovaara, J., Leivo, I y Vaheri, A. (1979). *Dev.Biol.* 69: 247.
- . Wassarman, P.M. (1991). *Int.Rev.Cytol.* 130: 85.
- . Webb, M., Howlett, S.K. y Maro, B. (1986). *J. Embryol. Exp.Morphol.* 95: 131.
- . Webster, W.S. y Ritchie, H.E. (1991). *J.Craniofacial, Genetics and Dev. Biol.* 11(4): 296.
- . Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D.C. y Rochie, H.E. (1993). *Today's Life Sci.* 5(4): 10.
- . Weinberg, J. (1985). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 9: 49.
- . Weis, J.S y Weis, P. (1987). *Environ. Health Perspect.* 71: 77.
- . Weston, W.M., Greene, R.M., Uberti, M. y Pisano, M.M. (1994). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 18(1): 177.
- . Weston, W.M., Greene, R.M., Uberti, M. y Pisano, M.M. (1994). *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 18(1): 177.
- . Whitaker, M. y Patel, R. (1990). *Development* 108: 525.
- . Whittingham, D.G. (1971). *J.Reprod.Fert.* 14 (suppl): 7.
- . Whittingham, D.G. (1980). *The Oxford reviews of reproductive biology.* Finn, C.A., editor. New York: Academic Press, 1978, 21-47.
- . Whittingham, D.G. y Siracusa, G. (1978). *Expl. Cell Res.* 113: 311.
- . Whittingham, D.G., Siracusa, G. y Fulton, B.P. (1978). *Biol. cellulaire* 32: 149.

- . Wickramasinghe, D., Ebert, K.M. y Albertini, D.F. (1991). *Dev.Biol.* 143: 162.
- . Wickremasinghe, R.G. (1988). *Prost. Leuk. Ess. Fat. Acids.* 31: 171.
- . Wiebold, J.L. y Becker, W.C. (1987). *J.Reprod.Fertil.*80: 49.
- . Wiest, W.G., Kidwell, W.R. y Kirschbaum, T.H. (1963). *Steroids* 2: 617.
- . Willis, B.R., Anderson, R.A.J., Oswald, C. y Zaneveld, L.J.D. (1983). *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 225: 470.
- . Winston, N., Johnson, M., Pickering, S. y Braude, P. (1991). *Fertil.Steril.* 56(5): 904.
- . Witkowska, A. (1973). *J.Embryol.Exp.Morphol.* 30: 519.
- . Wong, P.Y. y Uchendu, C. (1990). *J.Endocrinol.* 125: 457.
- . Woodson, P. y Ritchey, S. (1979). *Nut.Rep.International.* 20: 225.
- . Wudl, L. y Chapman, V. (1976). *Dev. Biol.* 48: 104.
- . Yanagimachi, R. (1982). *Gamete Res.* 5: 323.
- . Yanagimachi, R. y Chang, M.C. (1961). *J.Exp.Zool.* 148: 185.
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, K., Mikano, K., Suzuki, F. y Yanagimachi, H. (1985). *Am.J.Anat.* 172: 317.
- . Yanagimachi, R. (1994). *Mammalian Fertilization*, ed Knobil, E. y Neill, J., Raven Press Ltd. New York, pp 189.
- . Yazigi, R.A. y Polakoski, K.L. (1992). *Arch.Pathol.Lab.Med.* 116: 1036.
- . Ylikahri, R., Huttunen, M., Harkonen, M., Leino, T. y col. (1978) *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 46: 715.
- Yoshimura, Y., Nakamura, Y., Ando, M., Jinno, M., Oda, T., Karube, M., Koyama, N. y Nanno, T. (1992). *Endocrinol.* 131: 351.
- . Young, J.R. y Jaffe, R.B. (1976). *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 42: 432.
- . Young, L., Hinton, B. y Gould, F. (1985). *Biol Reprod.* 32: 399.
- . Younghai, E.V. y Short, R.V. (1970). *J.Endocrinol.* 47: 321.
- . Yudin, A., Cherr, G.M. y Katz, D. (1988). *Cell.Tissue Res.* 251: 555.
- . Yung, J. y Russfield, A.B. (1972). *Arch.Pathol.* 94: 265.
- . Zaneveld, L.J.D., Mark, S.R., Han, H.L., DeJonge, C.J. y Basuray, R (1991). *Role of Arachidonic Acid metabolism in the Human sperm Acrosome Reaction*, ed. Baccetti, B., Raven Press, New York, pp 277.
- . Zeleznik, A.J. (1981). *Endocrinol.* 109: 352.
- . Zeleznik, A.J., Midgley, A.R. y Reichter, L.E.Jr. (1974). *Endocrinol.* 95: 818.
- . Zeleznik, A.J. y Kubik, C.J. (1986). *Endocrinol.* 119: 2025.
- . Zenzes, M.T. y Casper, R.F. (1992). *Hum.Genet.* 88: 367.
- . Ziomek, C.A. y Johnson, M.H. (1980). *Cell* 21: 935.
- . Ziomek, C.A., Johnson, M.H. y Handyside, A.H. (1982). *J.Exp. Zool.* 221: 345.
- . Zoller, L. y Weisz, J. (1979). *Histochemistry* 62: 125.

. Zucoloto, S., Rossi, M.A. y Wright, N.A. (1984). Internat.J. Vit.Nutr.Res. 54:387.

Elisa Cerebral
ELISA CEREAL.