

# EFECTOS DE LA INGESTA CRÓNICA DE ALCOHOL SOBRE LA PRÓSTATA DE LA RATA. ESTUDIO EXPERIMENTAL

L.A. RODRÍGUEZ TOVES\*, J.H. AMÓN SESMERO\*, C. VAQUERO PUERTA\*\*

\*Servicio de Urología. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid. \*\*Departamento de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

## **PALABRAS CLAVE:**

Rata. Próstata. Ingesta de alcohol.

## **KEY WORDS:**

Rat. Prostate. Alcohol intake.

Actas Urol Esp. 25 (3): 170-181, 2001

## **RESUMEN**

**OBJETIVO:** Estudio de las modificaciones morfológicas y morfométricas, que el alcohol induce en ratas sometidas a ingesta crónica de alcohol, y evaluar la reversibilidad de dichas alteraciones tras suprimir la ingesta de alcohol.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Los animales se sometieron a diversos esquemas de ingesta crónica de alcohol, y se valoraron diversos parámetros morfométricos prostáticos al nivel de microscopía óptica.

**RESULTADOS:** Se observaron dos patrones morfológicos prostáticos según el grupo de animales estudiado (experimental o control). Parece ser que la dosis de alcohol fue el factor que más influyó en las variaciones morfométricas celulares.

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** We have studied both the morphologic and morphometric modifications that the alcohol induces in subjected rats to chronic intake of alcohol and to evaluate the reversibility of these alterations after suppressing the intake of alcohol.

**MATERIAL AND METHODS:** The animals underwent diverse outlines of chronic intake of alcohol and diverse morphometric parameters of the prostate were valued at the level of optic microscopy.

**RESULTS:** Two morphologic prostatic patterns were observed according to the studied group of animals (experimental or control). It seems to be that the dose of alcohol was the factor that more it influenced in the morphometric variations of the cells.

Las alteraciones sexuales en alcohólicos crónicos han sido frecuentemente estudiadas, con prevalencias estimadas entre el 8 y el 58%<sup>1</sup>. Los pacientes con historia de etilismo crónico pueden presentar síntomas de disfunción sexual. Durante el examen clínico de los mismos, se ha encontrado atrofia testicular en la mitad

de aquellos que padecen cirrosis hepática y no es rara la ginecomastia. Esos signos se han relacionado con el abuso crónico del alcohol<sup>2</sup>. Varios estudios han demostrado que en los alcohólicos hay pérdida del deseo sexual, problemas en la erección o eyaculación durante la fase de abuso alcohólico<sup>3</sup>.

Según observaciones experimentales, el hipogonadismo que acompaña a estos casos es el principal responsable de la actividad sexual disminuida y de la impotencia<sup>4,5</sup>, y parcialmente responsable de los cambios morfológicos y bioquímicos de la composición del semen<sup>4,6</sup>.

Los resultados obtenidos por diversos autores en estudios experimentales, así como observaciones clínicas, indican que el alcoholismo crónico puede producir o contribuir a la alteración del funcionamiento normal de las hormonas sexuales, actuando a través de diferentes mecanismos<sup>2,4-7</sup>.

Estas investigaciones, encaminadas a dilucidar los efectos que pudiera tener el abuso crónico del alcohol sobre el aparato reproductor masculino, tanto desde un punto de vista funcional como estructural, han abarcado áreas diversas como son: la función hepática, la función hormonal a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, funciones secretoras al nivel de las gónadas, cambios estructurales y en el peso de las gónadas.

También es muy importante la afectación que puedan sufrir las glándulas sexuales accesorias, por el papel fundamental que éstas tienen en la composición del semen, ya que contribuyen a la formación de una elevada proporción del plasma seminal (el líquido espermático y los espermatozoides que provienen del testículo, representan menos del 1% del volumen eyaculado) fundamental para la viabilidad del espermatozoide, tanto en el tracto genital masculino como en el femenino<sup>8</sup>. La disminución de la producción de testosterona por las células de Leydig en alcohólicos crónicos altera la función de las glándulas sexuales accesorias, y a veces conduce a cambios estructurales de las mismas.

La función de la próstata, que produce la mayor parte de las sustancias del semen (ácido cítrico, fosfatasa ácida y alcalina, semina, poliaminas, calcio, zinc, magnesio, etc.) está regulada por los andrógenos<sup>9-13</sup>. En hombres infértiles se ha observado una disminución de los niveles de testosterona en sangre, junto con una disminución de las concentraciones de fructosa (secretada por vesículas seminales) y ácido cítrico (por la próstata) en el semen<sup>9,14</sup>. Se han observado anomalías similares en alcohólicos crónicos<sup>6</sup>.

Otros estudios revelan alteraciones enzimáticas en los órganos sexuales de ratas macho (incluida la próstata), debidas probablemente a la intoxicación por etanol<sup>15,16</sup>.

Asimismo se han detectado cambios en la composición lipídica de la próstata, concretamente en los lóbulos ventral y dorso-lateral. Saravanan et al.<sup>17</sup> encontraron, en experimentos realizados con ratas albinas, un aumento del colesterol total y del glicerol en el lóbulo ventral y la tendencia inversa para los fosfolípidos. Los lípidos totales permanecían inalterados. En el lóbulo dorso-lateral se encontró un aumento de lípidos totales, glicerol y fosfolípidos y un descenso del colesterol total. La retirada del tratamiento con etanol durante 30 días devolvió a la normalidad la mayor parte de los cambios observados.

No puede descartarse la posibilidad de una acción tóxica directa del alcohol sobre la glándula prostática; de hecho, se ha revelado la existencia de ADH (alcohol deshidrogenasa) en el tejido prostático, así como en otros órganos considerados como diana de los efectos tóxicos del etanol<sup>18</sup>. No hay que olvidar que se responsabiliza de los efectos tóxicos directos del etanol sobre los tejidos a los metabolitos derivados del catabolismo del etanol (acetaldehído y acetato).

Parece descartada, basándose en los numerosos estudios epidemiológicos que se han realizado<sup>19,21-27</sup>, la relación del cáncer prostático con el abuso del alcohol, aunque no faltan autores que afirman lo contrario<sup>28,29</sup>. Sin embargo, es más que probable la afectación de la próstata en el etilismo crónico, con alteraciones funcionales y tal vez morfológicas de la misma, y la influencia que esto conlleva sobre la función sexual y reproductora del paciente.

La próstata, como glándula accesoria, tiene un importante papel en la formación de plasma seminal, pues aporta gran parte de las sustancias que lo integran y una elevada proporción del volumen del mismo.

Por todo ello, decidimos estudiar las alteraciones morfológicas del tejido prostático que pudieran ser originadas por el consumo crónico de etanol y que pueden ser bien la consecuencia, bien la causa o ambas a la vez, de las alteraciones funcionales que diversos autores afirman haber observado.

Por lo tanto, los objetivos de nuestro estudio fueron los siguientes:

1. Estudio de los efectos que pudiera producir el etanol sobre la glándula prostática analizando, si las hubiera, las modificaciones morfológicas que pudieran observarse al microscopio óptico.
2. Realizar una valoración morfométrica de las células del epitelio glandular y de sus componentes, tal y como se ven al microscopio óptico.
3. Cuantificar las alteraciones estructurales observadas, si las hubiera.
4. Analizar, con la ayuda de métodos estadísticos, la validez e importancia de los datos obtenidos y estudiar las relaciones causa-efecto de la dosis de etanol, la duración del tratamiento y la desintoxicación.
5. Observar, si hubiera alteraciones, la reversibilidad de éstas con la retirada del agente tóxico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo experimental se han utilizado 72 ratas albinas de laboratorio raza Wistar-Lewis, machos con plena madurez somática y con pesos que oscilaban entre 195 y 363 gramos.

Las 72 ratas macho elegidas fueron distribuidas al azar en 12 subgrupos de 6 individuos. Dichos subgrupos, a su vez, fueron reunidos en 3 grandes grupos. Estas agrupaciones se hicieron basándose en las pautas de alcoholización seguidas y se diseñaron de la siguiente manera:

Grupo A: recibió etanol en solución al 10%. Se dividió en 4 subgrupos con mayor o menor duración del tratamiento seguido o no, por un periodo de desalcoholización.

Grupo B: recibió etanol en concentración máxima del 25%. Se dividió igualmente en 4 subgrupos, según la duración del tratamiento y de que éste fuera seguido o no por un periodo de desalcoholización.

Grupo C: que sirvió como control y que no recibió alcohol. Dividido en 4 subgrupos. En la Tabla I se puede ver con mayor detalle el protocolo seguido.

Las soluciones se prepararon diluyendo alcohol etílico absoluto (100%) en agua corriente a

**TABLA I**

GRUPOS Y PAUTAS DE ALCOHOLIZACIÓN

| <b>Grupo A: con un periodo de alcoholización de 12 días</b>              |   |
|--|---|
| <b>Subgrupo A<sub>1</sub></b>  | Más 25 días con etanol al 10%   |
| <b>Subgrupo A<sub>2</sub></b>  | Más 60 días con etanol al 10%   |
| <b>Subgrupo A<sub>3</sub></b>  | Más 25 días con etanol al 10% + periodo de desalcoholización de 10 días + 35 días de dieta libre, sin tratamiento |
| <b>Subgrupo A<sub>4</sub></b>  | Más 60 días con etanol al 10% + periodo de desalcoholización de 10 días + 35 días de dieta libre, sin tratamiento |
| <b>Grupo B: con periodo de alcoholización de 33 días</b>                 |   |
| <b>Subgrupo B<sub>1</sub></b>  | Más 25 días al 25%  |
| <b>Subgrupo B<sub>2</sub></b>  | Más 60 días al 25%  |
| <b>Subgrupo B<sub>3</sub></b>  | Más 25 días al 25% + periodo de desalcoholización de 10 días + 35 días de dieta libre, sin tratamiento            |
| <b>Subgrupo B<sub>4</sub></b>  | Más 60 días al 25% + periodo de desalcoholización de 10 días + 35 días de dieta libre, sin tratamiento            |
| <b>Grupo C: Grupo de Control. No se le administró ningún tratamiento</b> |   |
| <b>Subgrupo C<sub>1</sub></b>  | Sin tratamiento   |
| <b>Subgrupo C<sub>2</sub></b>  | Sin tratamiento   |
| <b>Subgrupo C<sub>3</sub></b>  | Sin tratamiento   |
| <b>Subgrupo C<sub>4</sub></b>  | Sin tratamiento   |

concentraciones iniciales del 2%, y aumentando en tramos del 2% de alcohol cada dos días dicha concentración de alcohol, hasta alcanzar la concentración deseada. La desalcoholización se realizó de igual manera, es decir, reduciendo un 2% de concentración alcohólica cada dos días.

Al término de su correspondiente periodo de experimentación se procedió a la extracción de muestras prostáticas por laparotomía media xifopubiana, previa anestesia de las ratas con clorhidrato de ketamina por vía intraperitoneal. Posteriormente se sacrificaban los animales. Las muestras fueron procesadas para su observación microscópica con hematoxilina-eosina.

La observación de las preparaciones, así como el estudio morfométrico, se llevaron a cabo con la ayuda de un microscopio óptico Nikon Labophot.

Con él se observó el aspecto que presentan las muestras.

Se valoraron los siguientes parámetros morfométricos:

1. Área celular.
2. Perímetro celular.
3. Factor de forma celular.
4. Área nuclear.
5. Perímetro nuclear.
6. Factor de forma nuclear.
7. Área de la región supranuclear.
8. Perímetro de la región supranuclear.

Se utilizó un sistema semiautomático analizador de imágenes para el estudio morfométrico.

Con los datos cuantificados, se procedió a su análisis estadístico.

Los factores o variables independientes cuya variación hemos controlado, y las variables morfométricas cuya variación queríamos estudiar fueron:

| Factores          | Valores posibles |         |         |
|-------------------|------------------|---------|---------|
|                   | Control (0%)     | 10%     | 25%     |
| Dosis             | Control          | 25 días | 60 días |
| Tiempo            | Control          | Sí      | No      |
| Desalcoholización | Control          | Sí      | No      |

#### Variables morfométricas

|                     |      |                 |           |
|---------------------|------|-----------------|-----------|
| Célula              | Área | Factor de forma | Perímetro |
| Núcleo              | Área | Factor de forma | Perímetro |
| Región Supranuclear | Área | Perímetro       |           |

Se procedió a calcular las medias muestrales que estiman las tendencias centrales en las muestras- y las desviaciones estándar -que reflejan la variabilidad observada en las muestras- de todas las variables estudiadas, agrupando sus valores de acuerdo con los factores dosis ingerida de alcohol, tiempo de alcoholización y si hubo periodo de desalcoholización. También se realizó el estudio agrupando los valores por los subgrupos definidos en el protocolo. Así mismo, se analizó si la distribución de dichos valores cumplía los criterios de normalidad calculando los índices de asimetría y apuntamiento, así como sus errores estándar, y

comprobando que el 99,7% de las observaciones estuvieron dentro del intervalo.

Para las pruebas del contraste de hipótesis se realizaron los tests del análisis de la varianza y multivarianza.

## RESULTADOS

Al término del experimento no se produjo la muerte de ninguno de los animales sometidos al mismo. La tasa de mortalidad pues fue de cero.

### OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA

Macroscópicamente, las observaciones del volumen prostático de los grupos de ratas alcoholizadas no diferían de las del grupo control.

Al microscopio óptico se pudo observar dos patrones morfológicos completamente distintos, y que nosotros denominamos patrón rugoso (patrón I) y patrón liso (patrón L).

Patrón rugoso (patrón I): a pequeños aumentos (40x) los acini presentaban contornos irregulares, con indentaciones y pliegues hacia la luz del mismo y con un espacio interior muy reducido. La pared del acini (epitelio, membrana basal y cápsula acinar) aparece engrosada y arrugada, formando pliegues (Fig. 1).

### FIGURA 1

A 400 observamos un epitelio columnar simple de células altas, aunque de longitud variable, con núcleo redondeado-oval en posición basal y con la porción luminal de la membrana celular turgente.

A 1.000 aumentos las células presentaban en su corte longitudinal forma rectangular, aunque muy irregular, y eran muy alargadas. La membrana celular presentaba irregularidades en

todas sus porciones. El núcleo se hallaba en posición generalmente basal o en el tercio basal del citoplasma, era redondeado u oval y con 1 ó 2 nucleolos (Fig. 2).

Patrón L: A 40 aumentos se observaron acini de contornos mucho más uniformes y redondeados, con un espacio interno mucho más amplio y con la pared del acini (epitelio, membrana basal y cápsula acinar) más fina y lisa (Fig. 3).

A 400 se observaba epitelio columnar simple de células cortas, cuadradas, con núcleo redondeado-oval en posición basal. El epitelio presentaba forma y grosor muy uniforme, sin pliegue, con la superficie luminal del acini muy regular y lisa.

A 1.000 aumentos las células presentaban al corte longitudinal forma cuadrada, mucho más cortas que las del patrón I. La membrana celular presentaba un aspecto mucho menos irregular y en su porción luminal era muy uniforme, recta y lisa. El núcleo no presentaba diferencias respecto al otro modelo (Fig. 4).

**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**

En nuestro trabajo hemos encontrado en todos los grupos experimentales una mezcla de ambos patrones, pero con una clara tendencia al patrón L en los grupos alcoholizados y por otra parte, un claro comportamiento de patrón I en el grupo control.

#### VALORACIÓN MORFOMÉTRICA

Los parámetros morfométricos que habíamos elegido para su estudio fueron los siguientes:

- Área celular
- Perímetro celular
- Factor de forma celular
- Área nuclear
- Perímetro nuclear
- Factor de forma nuclear
- Área supranuclear
- Perímetro de la zona supranuclear

A continuación se procedió a investigar cómo influían cada uno de los 3 factores (dosis, tiempo y desalcoholización) sobre las variables morfométricas estudiadas, así como sus interrelaciones. Para conseguirlo procedimos a realizar el análisis multivariante de la varianza.

#### I-DOSIS

*Célula:* los resultados obtenidos respecto al factor dosis se pueden observar en la Tabla II.

*Área celular:* se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ); además se pudo observar que el área celular aumentaba al aumentar la dosis.

*Factor de forma celular:* se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ); pero si bien aumentaba en el grupo alcoholizado al 10%, posteriormente disminuía en el grupo al 25%.

**TABLA II**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA CELULAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DOSIS

| <b>Célula</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Dosis</b>                     | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0%)</b>              | 0,0144 $\pm$ 0,0027                         | 0,6360 $\pm$ 0,0823                                    | 0,5337 $\pm$ 0,0627                              |
| <b>10%</b>                       | 0,0153 $\pm$ 0,0044                         | 0,6414 $\pm$ 0,0831                                    | 0,5462 $\pm$ 0,0816                              |
| <b>25%</b>                       | 0,0156 $\pm$ 0,0040                         | 0,6306 $\pm$ 0,0846                                    | 0,5569 $\pm$ 0,0756                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 10,28                                       | 3,05   | 3,13   |
| <b>P</b>                         | 0,0000                                      | 0,048  | 0,045  |

Perímetro celular: paralelamente al comportamiento del área celular ocurrió un aumento en el perímetro al aumentar la dosis, existiendo diferencias estadísticamente significativas.

**Núcleo:** al estudiar la morfometría nuclear considerando la dosis como factor, se pudo observar los resultados contenidos en la Tabla III.

Área nuclear: se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ); aumenta en los grupos alcoholizados con respecto al control y lo hacen en la misma cuantía. No hay diferencia entre los grupos alcoholizados.

Factor de forma nuclear: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ); siendo este factor similar en todos los grupos.

Perímetro nuclear: se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) aumentando también en función de la dosis.

Región supranuclear: los efectos sobre la región supranuclear de la dosis fueron los mostrados en la Tabla IV.

Área supranuclear: no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) aunque la tendencia observada fue hacia el aumento del área, lo que sería congruente con el aumento del área y perímetro celulares.

Perímetro supranuclear: no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

**TABLA III**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA NUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DOSIS

| <b>Núcleo</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Dosis</b>                     | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0%)</b>              | 0,0030 $\pm$ 0,0007                         | 0,9279 $\pm$ 0,0342                                    | 0,2011 $\pm$ 0,0218                              |
| <b>10%</b>                       | 0,0034 $\pm$ 0,0027                         | 0,9302 $\pm$ 0,0308                                    | 0,2066 $\pm$ 0,0227                              |
| <b>25%</b>                       | 0,0034 $\pm$ 0,001                          | 0,9228 $\pm$ 0,0338                                    | 0,2135 $\pm$ 0,0295                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 6,9174                                      | 0,7024   | 20,93  |
| <b>P</b>                         | 0,001                                       | 0,496  | 0,000  |

**TABLA IV**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA Y PERÍMETRO DE LA REGIÓN SUPRANUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DOSIS

| <b>Región Supranuclear</b>       |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| <b>Dosis</b>                     | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0%)</b>              | 0,0096 $\pm$ 0,0032                         | 0,4155 $\pm$ 0,0645                              |
| <b>10%</b>                       | 0,0098 $\pm$ 0,0028                         | 0,4123 $\pm$ 0,0605                              |
| <b>25%</b>                       | 0,0101 $\pm$ 0,0033                         | 0,4189 $\pm$ 0,0770                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |
| <b>F</b>                         | 0,256                                       | 1,175  |
| <b>P</b>                         | 0,774                                       | 0,310  |

## II-TIEMPO

**Célula:** los resultados obtenidos respecto al factor tiempo se pueden observar en la Tabla V.

**Área celular:** si bien hubo aumento en dicho parámetro, éste no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

**Factor de forma celular:** se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) disminuyendo en el grupo alcoholizado 25 días, para aumentar luego en el grupo alcoholizado 60 días.

**Perímetro celular:** no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) al estudiar este parámetro, si bien existió un aumento en relación con el grupo control.

**Núcleo:** el estudio del factor tiempo en la morfometría nuclear mostró (Tabla VI): no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) ni en el área ni en el perímetro nuclear, pero sí en el factor de forma nuclear aumentando en el grupo alcoholizado 25 días, y disminuyendo por debajo del grupo control en el grupo alcoholizado 60 días.

**Región supranuclear:** la influencia del tiempo sobre la zona supranuclear se expone en la Tabla VII.

**Área supranuclear:** no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

**Perímetro supranuclear:** se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) aumentando en el grupo alcoholizado durante 25 días, y disminuyendo respecto del grupo control en el grupo alcoholizado 60 días.

## III-DESALCOHOLIZACIÓN

**Célula:** los resultados obtenidos respecto al factor desalcoholización se pueden observar en la Tabla VIII.

**Área celular:** no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) aunque en ambos grupos alcoholizados hubo aumento del área celular.

**Factor de forma celular:** se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) al estudiar el factor de forma celular, siendo éste mayor en el grupo no desalcoholizado.

**TABLA V**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA CELULAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR TIEMPO

| <b>Núcleo</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Tiempo</b>                    | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0%)</b>              | 0,0144 $\pm$ 0,0027                         | 0,6360 $\pm$ 0,0823                                    | 0,5337 $\pm$ 0,0627                              |
| <b>25 días</b>                   | 0,0157 $\pm$ 0,0040                         | 0,6269 $\pm$ 0,0903                                    | 0,5606 $\pm$ 0,0742                              |
| <b>60 días</b>                   | 0,0151 $\pm$ 0,0045                         | 0,6500 $\pm$ 0,0724                                    | 0,5376 $\pm$ 0,0742                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 2,49  | 17,83  | 1,30   |
| <b>P</b>                         | 0,115                                       | 0,000  | 0,255  |

**TABLA VI**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA NUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR TIEMPO

| <b>Núcleo</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Tiempo</b>                    | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0%)</b>              | 0,0030 $\pm$ 0,0007                         | 0,9279 $\pm$ 0,0342                                    | 0,2011 $\pm$ 0,0218                              |
| <b>25 días</b>                   | 0,0036 $\pm$ 0,0027                         | 0,9331 $\pm$ 0,0264                                    | 0,2133 $\pm$ 0,0270                              |
| <b>60 días</b>                   | 0,0031 $\pm$ 0,0008                         | 0,9190 $\pm$ 0,0373                                    | 0,2046 $\pm$ 0,0238                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 0,2473                                      | 4,97   | 2,50   |
| <b>P</b>                         | 0,619                                       | 0,026  | 0,115  |

**TABLA VII**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA Y PERÍMETRO DE LA REGIÓN SUPRANUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR TIEMPO

| <b>Región Supranuclear</b>       |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| <b>Tiempo</b>                    | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (0)</b>               | 0,0096 $\pm$ 0,0032                         | 0,4155 $\pm$ 0,0645                              |
| <b>25 días</b>                   | 0,0102 $\pm$ 0,003                          | 0,4225 $\pm$ 0,0685                              |
| <b>60 días</b>                   | 0,0096 $\pm$ 0,0030                         | 0,4053 $\pm$ 0,0662                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |
| <b>F</b>                         | 2,07  | 10,207   |
| <b>P</b>                         | 0,150                                       | 0,002  |

Perímetro celular: no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

*Núcleo*: la desalcoholización influyó en la morfometría nuclear del siguiendo modo (Tabla IX):

Área nuclear: de igual manera que ocurrió con el área celular hubo aumento en los grupos alcoholizados, si bien dicho aumento no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

Factor de forma nuclear: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Perímetro nuclear: se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Aumentó en los dos grupos alcoholizados si bien más en el grupo que no sufrió desalcoholización.

**TABLA VIII**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA CELULAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DESALCOHOLIZACIÓN

| <b>Célula</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Desalcoholización</b>         | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (no)</b>              | 0,0144 $\pm$ 0,0027                         | 0,6360 $\pm$ 0,0823                                    | 0,5337 $\pm$ 0,0627                              |
| <b>Sí</b>                        | 0,0157 $\pm$ 0,0042                         | 0,6354 $\pm$ 0,0849                                    | 0,5554 $\pm$ 0,0790                              |
| <b>No</b>                        | 0,0152 $\pm$ 0,0042                         | 0,6387 $\pm$ 0,0826                                    | 0,5446 $\pm$ 0,0791                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 2,89  | 8,7  | 0,05   |
| <b>P</b>                         | 0,089                                       | 0,003  | 0,809  |



**TABLA IX**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA, PERÍMETRO Y FACTOR DE FORMA NUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DESALCOHOLIZACIÓN

| <b>Núcleo</b>                    |   |  |  |
|----------------------------------|---|--|--|
| <b>Desalcoholización</b>         | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Factor de Forma<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (no)</b>              | 0,0030 $\pm$ 0,0007                         | 0,9279 $\pm$ 0,0342                                    | 0,2011 $\pm$ 0,0218                              |
| <b>Sí</b>                        | 0,0035 $\pm$ 0,0027                         | 0,9269 $\pm$ 0,0345                                    | 0,2089 $\pm$ 0,0269                              |
| <b>No</b>                        | 0,0033 $\pm$ 0,0008                         | 0,9272 $\pm$ 0,0291                                    | 0,2104 $\pm$ 0,0249                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |  |
| <b>F</b>                         | 2,9297                                      | 0,0079   | 14,82  |
| <b>P</b>                         | 0,088                                       | 0,929  | 0,000  |

*Región supranuclear:* los resultados se muestran en la Tabla X.

Área supranuclear: no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Perímetro supranuclear: se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), aumentando en el grupo desalcoholizado y disminuyendo en el no desalcoholizado.

## DISCUSIÓN

Algunos estudios en humanos y en animales han sugerido que la administración crónica de etanol reduce la fertilidad<sup>30</sup>, pero ha sido difícil separar el

efecto directo del alcohol en la función reproductora de los efectos asociados con el consumo crónico, como son el déficit nutritivo o el estrés.

Varios trabajos han demostrado la asociación del abuso crónico de etanol, disfunción sexual y fallo en la fertilidad masculina<sup>23,31,32</sup>. En animales de laboratorio se han demostrado cambios patológicos en la función reproductora masculina subsecuente a la administración crónica de etanol<sup>33</sup>.

Así pues, el problema de los efectos crónicos del alcohol sobre el aparato reproductor masculino ha sido objeto de atención desde hace mucho tiempo, y ha sido estudiado especialmente sobre el testículo asociándose a impotencia sexual, feminización, ginecomastia, hipogonadismo y esterilidad.

También se han observado alteraciones en la composición del semen de los alcohólicos crónicos, debidas a la alteración funcional de la próstata y de las vesículas seminales<sup>5</sup>. Otros estudios han demostrado alteraciones enzimáticas de la próstata debidas probablemente a la intoxicación por etanol<sup>15,16</sup>, pero no puede descartarse la posibilidad de una acción directa del alcohol sobre la glándula prostática, ya que se ha revelado la existencia de ADH en el tejido prostático, así como en otros órganos considerados como diana de los efectos tóxicos del etanol<sup>18</sup>.

No hemos encontrado literatura que aborde los efectos tóxicos directos de los metabolitos derivados del catabolismo del etanol en la próstata,

**TABLA X**

VALORES CORRESPONDIENTES AL ÁREA Y PERÍMETRO DE LA REGIÓN SUPRANUCLEAR DE LOS DISTINTOS GRUPOS EN FUNCIÓN DEL FACTOR DESALCOHOLIZACIÓN

| <b>Región Supranuclear</b>       |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| <b>Desalcoholización</b>         | <b>Área<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> | <b>Perímetro<br/><math>\bar{x} \pm SD</math></b> |
| <b>Control (no)</b>              | 0,0096 $\pm$ 0,0032                         | 0,4155 $\pm$ 0,0645                              |
| <b>Sí</b>                        | 0,0101 $\pm$ 0,0030                         | 0,4217 $\pm$ 0,0666                              |
| <b>No</b>                        | 0,0097 $\pm$ 0,0030                         | 0,4065 $\pm$ 0,0691                              |
| <b>Análisis de Multivarianza</b> |   |  |
| <b>F</b>                         | 1,14  | 9,16   |
| <b>P</b>                         | 0,285                                       | 0,003  |

excepto en el aspecto de la carcinogénesis, existiendo controversia, pues mientras que algunos autores han encontrado una relación clara entre consumo crónico y aumento del riesgo de padecer cáncer de próstata<sup>20</sup>, otros no la encuentran<sup>21,22</sup>.

Así pues nos pareció interesante realizar un estudio sobre los efectos tóxicos del alcohol sobre la próstata, dada la gran importancia de la patología de esta glándula, y del predominante papel que juega en la fertilidad por dotar al líquido espermático de sustancias esenciales para la viabilidad del espermatozoide<sup>8</sup>.

Para tal fin se decidió realizar un trabajo experimental con animales de laboratorio, a los cuales se sometería a una dieta con etanol para tratar de reproducir los efectos que éste pudiera tener sobre la próstata. Posteriormente, tras sacrificar los animales, se procedería a reseca la glándula e incluirla para su estudio histológico.

El análisis de los resultados requeriría, por otra parte, la existencia de un grupo de animales que, no habiendo sido tratados con etanol, tuvieran cualidades similares a los tratados y hubieran vivido bajo las mismas circunstancias. Serviría como grupo control para comparar resultados y poder eliminar los efectos indeseados de otros factores ajenos al experimento.

Hemos empleado la rata como reactivo biológico. Las razones para ello son múltiples. En primer lugar es un animal dócil y sencillo de manipular. Su estabulación en gran número, como es el caso, no precisa de grandes superficies. Todos sus parámetros biológicos se hallan perfectamente estudiados y poseen una gran resistencia a las condiciones experimentales.

Por otro lado, su coste es relativamente económico y su estabulación no requiere unas condiciones especialmente exigentes. Asimismo es un animal empleado previamente en protocolos de alcoholización.

Para este trabajo se ha elegido el estudio cualitativo y cuantitativo histológico. El uso de la histología prostática como intento de definir el resultado final de un cúmulo de circunstancias desencadenadas por la ingesta crónica de alcohol. Para ello se ha empleado la microscopía óptica con tinción de hematoxilina-eosina, técnica usada en estudios similares<sup>34,35</sup>. Pero nuestro estudio habría sido incompleto y potencialmente incorrecto si no

hubiese sido cuantificado de alguna manera. A tal fin, nos hemos servido de la morfometría, la cual constituye una de las más recientes aportaciones al campo de la morfología. Dicha cuantificación se ha venido realizando en las últimas décadas mediante métodos más o menos engorrosos, laboriosos y complejos. El advenimiento por una parte de los métodos informáticos y por otra la perfección del procesamiento de imágenes, han dado paso a la aparición de analizadores de imágenes que realizan semiautomáticamente las mediciones y contajes. Al presente nivel de perfeccionamiento científico es evidente que la mera descripción morfológica se debe perfeccionar con los resultados numéricos, tanto en el ámbito de cuantificación de las estructuras como de la medición de las mismas. El método morfométrico ha de cumplir una serie de condiciones mínimas como son: precisión, es decir, que sea un fiel estimador de la realidad; simplicidad, con una correcta relación esfuerzo/beneficio; versatilidad y posibilidad de aplicación a las variadas y diferentes estructuras; por último, su facilidad de contrastación en diferentes ocasiones o por otros métodos.

El empleo de la morfometría en estudios prostáticos está ampliamente aceptada y difundida así como estandarizada<sup>34</sup>.

En cuanto al estudio morfológico macroscópico, podemos decir que no se hallaron diferencias groseras en cuanto al volumen prostático entre ninguno de los grupos. Estos hallazgos son similares a los descritos por otros autores<sup>35</sup>, los cuales emplearon técnicas distintas de alcoholización crónica obteniendo los mismos resultados.

La observación microscópica a pequeño aumento (40x) mostró dos patrones estructurales definidos de los acinis prostáticos que coexisten en el mismo espécimen, pero que se manifiestan en mayor o menor proporción según los grupos experimentales. En el grupo control se observó un predominio del denominado patrón I (acinis de contornos irregulares, pared engrosada, con indentaciones y pliegues hacia la luz) y en los grupos alcoholizados, un predominio del patrón L (acinis de contornos lisos, redondeados, con paredes más finas y con espacio interno más amplio) más marcado en el grupo de mayor tasa de alcoholización (25%). Estos hallazgos están en consonancia con los descritos por otros autores<sup>35</sup>.

A mayores aumentos (400x) se pudo observar otras diferencias a escala celular. El epitelio del acini en el patrón I era de tipo columnar con células alargadas. Dichas células eran muy irregulares en su porción luminal y presentaban el núcleo en posición basal, mientras que en el patrón L las células presentaban forma cuadrada-cuboidea, con la membrana celular de aspecto menos irregular y su porción luminal lisa.

En ningún momento se observaron alteraciones o cambios estructurales sugestivos de neoplasias, en contra de lo sugerido por autores<sup>20,28,29</sup> que defienden un aumento en el riesgo de cáncer prostático asociado al consumo de alcohol.

Como antes se ha mencionado, se empleó la técnica morfométrica para analizar con profundidad los resultados de la alcoholización sobre los parámetros descritos en material y métodos. El análisis implicaba la dificultad de discernir el grado de la influencia de distintos factores (dosis de alcoholización, tiempo de alcoholización y existencia o no de desalcoholización) que se imbricaban en el estudio, así como sus interrelaciones. Con este fin empleamos el procedimiento estadístico del análisis multivariante de la varianza, lo que nos permitió cuantificar la importancia de cada factor en el resultado morfométrico final. En otras palabras, no sólo saber si existen diferencias, sino saber a qué son debidas.

Al analizar el efecto de la dosis sobre los parámetros morfométricos los resultados mostraron un aumento del área celular y nuclear, con su consiguiente aumento en el perímetro en ambos grupos alcoholizados. Sin embargo, la región supranuclear no mostró variaciones significativas. Estos hallazgos permiten inferir que existe un hinchamiento celular y nuclear en relación con el alcohol. Sin embargo, los resultados no sugieren que se modifique la región supranuclear de las células. Al analizar el factor de forma celular hubo diferencias significativas para el grupo alcoholizado al 10% con tendencia hacia la unidad, lo que indica cierto hinchamiento celular. En cambio, no hubo diferencias significativas en el factor de forma nuclear, aunque también se apreció una tendencia moderada a una mayor esfericidad en el grupo alcoholizado al 10%, pero todos los grupos presentaban un factor de forma nuclear cercano a la unidad, es decir, muy tendente a la forma esférica.

Al estudiar la influencia del factor tiempo sobre la morfometría vemos que las diferencias halladas no son estadísticamente significativas, excepto para los factores de forma celular y nuclear, así como para el perímetro de la región supranuclear. A primera vista estos resultados pueden parecer inconsistentes, pues tendemos a pensar que a más días los efectos de la alcoholización deberían ser mayores. Sin embargo, parece ser que si son mayores no es debido a este factor en sí mismo, sino a la mayor cantidad de dosis de alcohol ingerida por estar más tiempo expuestos a ella.

Por último, se vio que el factor desalcoholizado no influyó en gran medida sobre la morfometría. Aunque aumentaron el área y el perímetro celular de los grupos alcoholizados, no existieron diferencias significativas entre el grupo desalcoholizado y el no desalcoholizado, y entre éstos con el grupo control.

A modo de resumen, contemplamos los resultados morfométricos en su globalidad, podemos sugerir que es el factor dosis de alcoholización el principal responsable de las variaciones morfométricas encontradas. La alcoholización a altas dosis (25%) es factible de ser realizada en ratas sin que por ora parte suponga mortalidad.

Como conclusiones podríamos destacar:

1. El protocolo de alcoholización llevado a cabo es válido para el estudio de la patología morfológica de la próstata inducida por el alcohol.
2. El estudio histológico comprobó una tendencia hacia patrones lisos en los acinis prostáticos de los grupos alcoholizados, en relación proporcional con la dosis de alcoholización.
3. Se detectó predominio de células epiteliales cuboideas en los acinis de los grupos que sufrieron alcoholización.
4. El factor dosis fue el que más influyó en las variaciones morfométricas celulares.
5. Se comprobó un hinchamiento celular y nuclear en los grupos alcoholizados.

## REFERENCIAS

1. SCHIAVI RC: Chronic alcoholism and male sexual dysfunction. *J Sex Marital Ther* 1990; **16**: 23-33.
2. ADLER RA: Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **74**: 957-960.
3. ROSEN RC: Alcohol and drugs effects on sexual response: human experimental and clinical studies. *Annu Rev Sex Res* 1991; **2**: 119-179.

4. VAN THIEL DH, LESTER R, SHERINS RJ: Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterol* 1974; **67**: 1.188-1.199.
5. VAN THIEL DH, GAVALER JS, LESTER R, GOODMAN MD: Alcohol-induced testicular atrophy. An experimental model for hypogonadism occurring in chronic alcoholic men. *Gastroenterol* 1975; **69**: 326-332.
6. SEMCZUK M, RZESZOWSKA G: Chronic alcohol intoxication and the morphological state of seminal vesicles and prostate gland in a white rat. *Mater Med Pol* 1981; **13**: 130-135.
7. VAN THIEL DH, LESTER R: Alcoholism: its effect on hypothalamic pituitary gonadal function. *Gastroenterol* 1976; **71**: 318-327.
8. MORENO PARDO B, MARTÍNEZ-JABALOYAS JM, JIMÉNEZ CRUZ JF: Fisiología del aparato genital masculino. En: Tratado de Urología. Jiménez Cruz JF, Rioja Sanz LA (Eds.). *JR Prous Editores*. Barcelona, 1993.
9. DONDERO F, SCIARA F, ISIDORI A: Evaluation of relationship between plasma testosterone and human seminal citric acid. *Fertil Steril* 1972; **23**: 168-171.
10. FLICKINGER ChJ: The influence of progestin and androgen on the fine structure of the male reproductive tract of the rat. I. General effects and observations on the testis. *Anat Rec* 1977; **187**: 405-430.
11. FLICKINGER ChJ: The influence of progestin and androgen on the fine structure of the male reproductive tract of the rat. II. Epididymis and sex accessory glands. *Anat Rec* 1977; **187**: 431-462.
12. KLANN RC, BURKEL WE, FISCHER TV, HERWIG R, KAHN RH: Ultrastructural effects of hormones and vitamin A on the canine prostate in vitro. *Anat Rec* 1977; **187**: 626.
13. KLEY HK, KRUSKEMPER HL: Androgens. Biochemistry, pharmacodynamics and therapeutic use. *Med Klin* 1973; **68**: 295-305.
14. PHADKE AM, SAMANT NR, DEVAL D, SHUBHABDA: Significance of seminal fructose studies in male infertility. *Fertil Steril* 1973; **24**: 894-903.
15. DE RONDINA DC, MASTRONARDI IO, CARBONE SE, SZWARCFARB B, SCACCHI P: Effects of acute administration or chronic ethanol ingestion on sexual organs monoamine levels in male rats. *Gen Pharmacol* 1989; **20**: 161-163.
16. VITTEK J, GORDON GG, SOUTHERN AL, RAPAPORT SC, MUNNANGI PR, LIEBER CS: Effect of ethanol intake on cellular regulation of testosterone-5 alpha-reductase in rat oral tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; **217**: 411-415.
17. SARAVANAN R, SARATHA J, BALASUBRAMANIAN K, ARUNAKARAN J, GOVINDARAJULU P: Ethanol induced changes in prostatic lipid profiles of albino rats. *Biochem Mol Biol Int* 1994; **32**: 387-398.
18. BUHLER R, PESTALOZZI D, HESS M, VON WARTBURG JP: Immunohistochemical localization of alcohol dehydrogenase in human kidney, endocrine organs and brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; **18 Suppl 1**: 55-59.
19. HSING AW, McLAUGHLIN JK, SCHUMAN LM, BJELKE E, GRIDLEY G, WACHOLDER S, CHIEN HT, BLOT WJ: Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Cancer Res* 1990; **50**: 6.836-6.840.
20. HAYES RB, BROWN LM, SCHOENBERG JB, GREENBERG RS, SILVERMAN DT, SCHWARTZ AAG, SWANSON GM, BENICHOU J, LIFF JM, HOOVER RN, POTTERN LM: Alcohol use and prostate cancer risk in US blacks and whites. *Am J Epidemiol* 1996; **143**: 692-697.
21. VAN DER GULDEN JW, VERBEEK AL, KOLK JJ: Smoking and drinking habits in relation to prostate cancer. *Br J Urol* 1994; **73**: 382-389.
22. POLLACK ES, NOMURA AM, HEILBRUN LK, STEMMERMANN GN, GREEN SB: Prospective study of alcohol consumption and cancer. *N Engl J Med* 1984; **310**: 617-621.
23. STEMMERMANN GN, NOMURAAM, CHYOU PH, YOSHIZAWA C: Prospective study of alcohol intake and large bowel cancer. *Dig Dis Sci* 1990; **35**: 1.414-1.420.
24. LE MARCHAND L, KOLONEL LN, WILKENS LR, MYERS BC, HIROHATA T: Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology* 1994; **5**: 276-282.
25. TAVANI A, NEGRI E, FRANCESCHI S, TALAMINI R, LA VECCHIA C: Alcohol consumption and risk of prostate cancer. *Nutr Cancer* 1994; **21**: 24-31.
26. HIATT RA, ARMSTRONG MA, KLATSKY AL, SIDNEY S: Alcohol consumption, smoking, and other risk factors and prostate cancer in a large health plan cohort in California (United States). *Cancer Causes Control* 1994; **5**: 66-72.
27. SLATTERY ML, WEST DW: Smoking, alcohol, coffee, tea, caffeine, and theobromine: risk of prostate cancer in Utah (United States). *Cancer Causes Control* 1993; **4**: 559-563.
28. HIRAYAMA T: Life-style and cancer: from epidemiological evidence to public behavior change to mortality reduction of target cancers. *Monogr Natl Cancer Inst* 1992; **12**: 65-74.
29. TONNESEN H, MOLLER H, ANDERSEN JR, JENSEN E, JUEL K: Cancer morbidity in alcohol abusers. *Br J Cancer* 1994; **69**: 327-332.
30. LIEBER CS, DECARLI LM, SORREL MF: Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 1989; **10 (4)**: 501-510.
31. BURK HC: Técnica histológica. Madrid, 1969. Paz Montalvo.
32. VAQUERO C, GUTIÉRREZ V: Valoración de la morfometría en la investigación morfológica. *Anal Acad Med y Cir Valladolid* 1991; **29**: 2: 37-43.
33. KLASSEN RW, PERSAUD TVN: The influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. *Int J Fertil* 1978; **23**: 326-332.
34. PRAHALADA SR, KEENAN KP, HERTZOG PR, GORDON LR, PETER CP, SOPER KA, VAN ZWIETEN MJ, BOKELMAN DL: Qualitative and quantitative evaluation of prostatic histomorphology in rats following chronic treatment with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Urology* 1994; **43**: 680-685.
35. VAN THIEL DH, GAVALER JS, COBB CB, SHERINS RJ, LESTER R: Alcohol induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology* 1979; **105**: 886-895.

---

Dr. L.A. Rodríguez Toves  
Avda. de la Estación, 9 - 4º A  
47140 Laguna de Duero (Valladolid)

(Trabajo recibido el 25 Enero de 2000)