


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

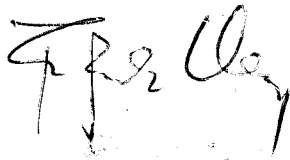
AVDA/SÁNCHEZ PIZJUAN Nº 4 41009-SEVILLA.SPAIN
TELÉFONOS-4552865;95-4552866.FAX: 4381662

**"ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS
ESTRUCTURALES DEL ALCOHOL DURANTE EL
DESARROLLO INICIAL DEL EMBRIÓN DE POLLO.
ESTUDIO COMPARATIVO CON EL SÍNDROME
ALCOHÓLICO FETAL (SAF)".**

Trabajo presentado por el Licenciado **D. Filiberto Ramírez Gurruchaga**, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por el programa de doctorado "Nuevas Perspectivas en Morfología" del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla.



Fdo.: Filiberto Ramírez Gurruchaga



Dr.D. Francisco A. Prada Elena
Director del Departamento de
Ciencias Morfológicas
Universidad de Sevilla

INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

***ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LOS
EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN EL
DESARROLLO EMBRIONARIO***

Trabajo que para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía presenta
el Licenciado Filiberto Ramirez Gurruchaga.

Sevilla, 1996

FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DOCENTE DE FARMACOLOGIA, PEDIATRIA
Y RADIOLOGIA
CATEDRA DE PEDIATRIA Y PUERICULTURA

Catedrático: Prof. JOSE GONZALEZ HACHERO

PROFESORES TITULARES:

PROF. CASTO ESTEFANIA GALLARDO
PROF. FEDERICO ARGÜELLES MARTIN
PROF. MARTIN NAVARRO MERINO

T.D.
R/151

HOSPITAL UNIVERSITARIO
«VIRGEN MACARENA»
AVDA. DR. FEDRIANI S/N
41009-SEVILLA

TELEFS. { 455 74 00, EXT 1364
437 08 92
455 17 79
FAX 437 08 92

DR. D. FRANCISCO ANDRES PRADA ELENA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

DR. D. FEDERICO ARGÜELLES MARTIN, PROFESOR TITULAR DEL AREA DE PEDIATRIA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, PEDIATRIA Y RADIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

C E R T I F I C A N

Que D. **FILIBERTO RAMIREZ GURRUCHAGA**, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado "**ANALISIS EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS ESTRUCTURALES DEL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DEL EMBRION DE POLLO. ESTUDIO COMPARATIVO CON EL SINDROME ALCOHOLICO FETAL (SAF)**", que consideramos satisfactorio para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste así y surta los efectos oportunos, firmanos la presente en Sevilla a veintidos de Abril de mil novecientos y seis.

Fdo: Prof. F.A. Prada Elena
Director de la Tesis

Fdo: Prof. F. Argüelles Martín
Director de la Tesis

Fdo: Dr. F. Ramírez Gurruchaga
Doctorando

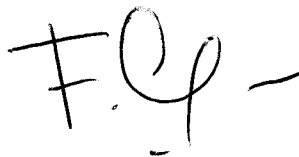
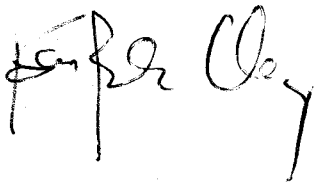
CATEDRA DE PEDIATRIA
Y PUERICULTURA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA

R. 24084

DR.D. FRANCISCO ANDRÉS PRADA ELENA Y DR.D. FEDERICO ARGÜELLES MARTÍN, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS Y DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA, RESPECTIVAMENTE, DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que el trabajo titulado "ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS ESTRUCTURALES DEL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DEL EMBRION DE POLLO. ESTUDIO COMPARATIVO CON EL SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL (SAF)", ha sido realizado en estos Departamentos por D. Filiberto Ramírez Gurruchaga, bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Sevilla a veintidos de Abril de mil novecientos noventa y seis.



Dpto. Farmacología,
Pediatria y Radiología
Facultad de Medicina

15 06. 96

15 de Junio de 1996

DIRECTOR DEL DPTO.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
CARRER DE LAS MEDICINAS DEPTO. DE
210 CARRERA 265 del Marco
SEVILLA, 15 JUNIO 1996

El Jefe del Departamento de Tesis,

Elena Caffre

AGRADECIMIENTOS

Quisiera hacer constar mi agradecimiento a aquellas personas que han contribuido de forma específica a la realización de esta obra. Me refiero al Profesor Dr. D. Francisco Andrés Prada Elena, Profesora Dra. Dña. Adela Quesada Ruiz y a la Profesora Dra. Dña. Carola Chmielewski Alvarez.

También quisiera agradecer a Dña. Ana Mosquero por su incansable ayuda técnica.

A mi familia

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	22
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	33
ICONOGRAFÍA	43
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	75

RESUMEN

El propósito de este trabajo ha sido estudiar experimentalmente los efectos que tiene el alcohol sobre el desarrollo del embrión de pollo.

El análisis de las malformaciones celulares se ha realizado en órganos donde no se había estudiado estos efectos con anterioridad (vesícula óptica, tectum óptico, derivados de la cresta neural a nivel facial, somitos y corazón), y en estructuras del SNC (retina y cerebelo) que sí habían sido previamente utilizados como modelos experimentales para estudiar los efectos del alcohol. Los estudios se han realizado utilizando técnicas de Golgi, tinciones con hematoxilina-eosina, tinciones de cortes semifinos para microscopía electrónica y técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales 3CB2 y 3BA8 y policlonales contra GABA.

Hemos observado que el alcohol altera las células nerviosas durante la migración y diferenciación, desorienta los axones que se están desarrollando y bloquea la expresión de neurotransmisor GABA en la población de neuronas que posee receptores GABA-A. En la retina, la mayor alteración se observó en células

ganglionares produciéndose una hipoplasia de la capa de fibras del nervio óptico. El resto de las alteraciones citológicas del alcohol fueron observadas en células del ectomesénquima, miotomo y miocardio. En todas estas estructuras el alcohol disminuye o bloquea la expresión de una proteína asociada a filamentos intermedios que es reconocida por el anticuerpo monoclonal 3CB2. Por lo tanto, se puede concluir que el alcohol interfiere con el normal desarrollo del citoesqueleto celular.

Además de estos resultados, se comenta y discute los mecanismos causales que provocan la falta de formación de la cavidad vítrea y el desplazamiento del cristalino hacia el fondo de la vesícula óptica en los embriones sometidos al efecto del alcohol.

INTRODUCCIÓN

El alcohol es una sustancia psicoactiva de efectos neuronales depresivos o narcóticos (Ewing y Rouse, 1976; Kissin, 1979; Berry, 1979), que produce dependencia y que, por hallarse institucionalizada, nuestra sociedad consume con entera libertad.

El consumo de bebidas alcohólicas ha sido considerado como uno de los principales indicadores del estado de salud de la población, estando incluido en la lista de indicadores elaborada por el Comité Regional para Europa de la O.M.S., dentro de la estrategia Mundial de "Salud para todos en el año 2000". Su importancia como problema de salud pública radica no sólo en su frecuencia y en los problemas sociales y sanitarios que ocasiona, sino también en la dificultad de modificar sus pautas de consumo (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1991).

En los últimos años se ha producido un incremento de la ingesta de alcohol en jóvenes y adolescentes y una disminución en la edad de inicio del consumo (Plan Nacional sobre drogas, 1994). La progresión habitual es de la cerveza al vino y de éste

a las bebidas destiladas, aunque el patrón puede variar por regiones.

El crecimiento y desarrollo físico durante la pubertad puede verse afectado negativamente por el consumo de alcohol. Así, las calorías aportadas por el alcohol, durante el pico de crecimiento en la adolescencia pueden impedir el aporte proteico necesario para un crecimiento normal de los músculos. Además, la estimulación del retículo endoplásmico liso hepático por el alcohol puede acelerar el metabolismo y aumentar la excreción de sustancias glucuronizadas. Por esta razón, las mujeres jóvenes que tomen anticonceptivos orales que contienen estrógenos y abusen del alcohol, tienen mayor riesgo de embarazo (Nelson, 1989).

Por otra parte en las últimas décadas son cada vez más numerosos los embarazos entre las adolescentes (12-19 años). Los factores que favorecen el incremento de estos embarazos son: Biológicos (descenso de la edad de la menarquia, inicio cada vez más precoz de las relaciones sexuales); Sociales (mayor permisividad en relación a la sexualidad, desaparición de tabúes sexuales); Familiares (familias con relaciones interpersonales pobres, actitud imitativa con respecto a sus madres, falta de tutela materna por fallecimiento o divorcio); Personales (perfil característico) y Educativos (desconocimiento del ciclo sexual, escaso conocimientos de métodos anticonceptivos) (Neinstein y col., 1991).

El hecho de que el consumo de alcohol y el número de embarazos entre las adolescentes sea cada vez mayor, unido a que uno de los signos físicos de

alcoholismo en adolescentes, es que sexualmente son más activos que el término medio de sus compañeros (Neinstein y Scott, 1991), hace que aumente el número de adolescentes embarazadas que consumen alcohol. De esta forma, a los problemas clínicos que representa un embarazo en una adolescente, tanto para la madre (aumento de toxemia, mayor posibilidad de anemia, hipertensiones más frecuentes) como para el niño (menor peso al nacer, más frecuencia de niños prematuros)(Neinstein y col., 1991) se suman aquellos que representa el consumo de alcohol para la madre: afectación nutricional fundamentalmente, y para el niño: siendo la afección más grave el Síndrome Alcohólico Fetal (S.A.F.).

En 1968, Lemoine y col. y años más tarde, en 1973, Jones y col. aplican por primera vez el término S.A.F. referido a un conjunto de alteraciones características presentes en los niños de madres alcohólicas.

Según el Plan Nacional sobre drogas (1994) en España se registran de 1000 a 1500 casos nuevos al año de S.A.F. (prevalencia estimada de 1 a 3 por mil nacidos vivos). El S.A.F. es un síndrome irreversible y debe ser considerado, en sus diferentes presentaciones, como la malformación más frecuente en los países industrializados. Los síntomas agrupados por sistemas y frecuencia son:

- Retraso en el crecimiento intrauterino, microcefalia, retraso mental, hiperactividad, hipotonía muscular.
- Epicanto, ptosis, blefarofimosis, fisuras antimongoloides, nariz chata y

respingona, surcos nasolabiales, labios pequeños, hipoplasia mandibular, paladar muy arqueado, paladar hendido.

- Pliegues palmares anómalos, clinodactilia V, campodactilia, hipoplasia de falanges terminales, supinación limitada, luxación de cadera.

- Pectus excavatum, defectos cardíacos, anomalías genitales, fóvea sacra, hemangiomas, hernias, malformaciones genitourinarias.

Sin embargo, algunos autores (Majewski y col., 1976; Lieber y col., 1976) consideraron que esta denominación había sido elegida arbitrariamente y utilizaron el de "Embriopatía alcohólica", ya que describiría mejor la gran variabilidad de este proceso patológico que podría tener su origen en el período embrionario.

Sea cual fuese la terminología empleada, hasta 1980 no se publicaron por Rosett los "criterios mínimos" para su diagnóstico, basándose fundamentalmente en los estudios clínicos de Clarren y Smith (1978).

El diagnóstico de SAF sólo puede hacerse cuando el paciente exhibe los siguientes signos clínicos:

1) Retraso del crecimiento prenatal y/o postnatal (Peso, talla, perímetro cefálico por debajo del percentil 10).

2) Signos de participación del Sistema Nervioso Central: anomalías

neurológicas, retraso del desarrollo psicomotor, o déficit intelectual.

3) Facies dismórfica característica: siendo necesario para cumplir este requisito que el paciente exhiba al menos dos de los siguientes tres signos: perímetros cefálicos debajo del tercer percentil, para su edad; microftalmia y/o fisuras palpebrales cortas; Philtrum hipoplásico, bermellón labial superior delgado, y/o aplanamiento del área maxilar.

En 1985 Majewski propuso un esquema de diagnóstico que permite agrupar los casos según el dismorfismo, el grado de afectación neurológica y las malformaciones viscerales. Esta clasificación distingue:

EMBRIOPATÍA ALCOHÓLICA GRADO I (forma menos grave).

Retraso del crecimiento intrauterino y postnatal.

Microcefalia.

Pocas, o ninguna anomalía facial.

Ningún tipo de malformación visceral.

Inteligencia normal, o ligeramente disminuida.

EMBRIOPATÍA ALCOHÓLICA GRADO II (forma moderada).

Retraso del crecimiento intrauterino y postnatal.

Microcefalia.

Leves anomalías neurológicas.

Algunas anomalías faciales, no diagnósticas.

Escasa o nula participación visceral.

Retraso mental moderado.

EMBRIOPATÍA ALCOHÓLICA GRADO III (forma grave).

Retraso del crecimiento pre y post-natal.

Microcefalia.

Dismorfias faciales patentes, típicas y diagnósticas.

Alteraciones neurológicas graves.

Retraso mental pronunciado.

Malformaciones viscerales.

Anomalías de las extremidades y articulaciones.

Este mismo autor diseñó un sistema de puntuación, a partir de los 25 signos clínicos más frecuentemente asociados (Majewski, 1985):

<u>SINTOMA</u>	<u>Puntuación</u>
Retraso del crecimiento intrauterino	4
Microcefalia	4
Retraso mental	2/4/8
Hiperactividad	4
Hipotonía muscular	2
Epicanto	2

Ptosis palpebral	2
Blefarofimosis	2
Nariz pequeña y antevertida	3
Surcos naso-labiales pronunciados	1
Labios delgados	1
Hipoplasia mandibular	2
Arco palatino elevado	2
Paladar hendido	4
Crestas palmares anómalas	3
Clinodactilia del quinto dedo	4
Camptodactilia	2
Hipoplasia de las falanges terminales	1
Limitación de la supinación del codo	2
Luxación de cadera	2
Malformaciones cardíacas	4
Anomalías genitales	2/4
Fovea sacra	1
Hernias	2
Malformaciones del tracto urinario	4

Embriopatía alcohólica I: 10-29 puntos.

Embriopatía alcohólica II: 30-39 puntos.

Embriopatía alcohólica III: 40 o más puntos.

Posteriormente Sokol y col. (1989) fijan los criterios para el diagnóstico de S.A.F. si se hallan juntas tres de las características típicas de estos niños.

Podemos concretar los síntomas del S.A.F. y decir que los más frecuentes son aquellas anomalías producidas sobre el sistema nervioso central, derivado embriológicamente del tubo neural, y sobre el ectomesénquima de la cara, derivado de la cresta neural (Le Douarin, 1982).

Larroque y col. (1992) aplican el término "Efecto Alcohólico Fetal" (EAF) a aquellos niños de madres alcohólicas que presentan algunos de los signos mencionados anteriormente, pero no los suficientes como para ser clasificado como SAF.

Actualmente hay claras evidencias de que el alcohol tiene efectos severos sobre el desarrollo del Sistema Nervioso. La disfunción del Sistema Nervioso Central es una de las anomalías clínicas más graves observadas en niños de madres que han consumido alcohol durante el embarazo, así como la causa más común de las conocidas de deficiencia mental en el mundo occidental (Jarlstedt, 1972; Clarren y Smith, 1978; Begleiter, 1981; Abraham y Hunter, 1982; Lieber y Schenker, 1982; Abel y Sokol, 1987; Hannigan y col., 1992).

El hecho de que el daño del SNC pueda ocurrir en ausencia de otras alteraciones fetales, sugiere que su desarrollo es especialmente vulnerable a la

ingesta de alcohol (Jarlstedt, 1972; Clarren y col., 1978; Begleiter, 1981; Abraham y col., 1982; Lieber y col., 1982; Abel y col., 1987; Hannigan y col., 1992).

West (1986) divide los efectos del alcohol sobre el desarrollo del sistema nervioso en tres grupos:

1. Efectos sobre el comportamiento
2. Efectos neuromorfológicos
3. Efectos químicos

Una de las alteraciones del comportamiento más comunmente observadas, tanto en humanos como en animales expuestos al alcohol intraútero, es la hiperactividad (Bond, 1984; Streissguth, 1986). Bond (1986) usando técnicas neurofarmacológicas, concluye que el responsable del incremento en la actividad es el retraso en el desarrollo del sistema septohipocampal colinérgico.

Por otra parte Riley y col. (1986), estudian la similitud entre los déficits conductuales de la exposición prenatal al alcohol con los daños del hipocampo. Su hipótesis apunta a que la alteración del aprendizaje en animales con exposición intraútero al alcohol, se puede catalogar como un déficit en la respuesta inhibitoria. Este punto de vista está sustentado en los daños neuromorfológicos del hipocampo producidos en animales expuestos al alcohol en diferentes estadios evolutivos del sistema nervioso (Barnes y Walker, 1981; West y col., 1981; Abel y col., 1983; Dewy y West, 1984).

Las alteraciones neuromorfológicas más evidentes inducida por el alcohol en el desarrollo del Sistema Nervioso, tanto en humanos como en animales, es el retraso del crecimiento cerebral (Dobbing, 1974; Dobbing, 1976; Clarren y Smith, 1978; Burns y col., 1984; Samson, 1986), que es independiente del retraso del crecimiento general (Dobbing, 1974; Dobbing, 1976)..

De los estudios realizados en neocórtex (Rawat, 1977; Hammer, 1986; Miller, 1986), hipocampo (Barnes y Walker, 1981; Davies y Smith, 1981; Abel y col., 1983), cerebelo (Quesada y col., 1990 b; Hammer, 1983; Philip, 1986) y retina (Chmielewski y col., en prensa), se concluye que en los embriones expuestos al alcohol hay numerosas mitosis neuronales, decrecimiento del número de células progenitoras, retraso en el desarrollo neuronal, disminución en la arborización dendrítica, disminución de la densidad de las espinas dendríticas, disminución de los niveles de neurotransmisores y retraso de la sinaptogénesis.

Los mecanismos por los que el alcohol induce las alteraciones anteriormente comentadas no estan claros. Se ha sugerido una disminución de la síntesis proteica (Henderson y col., 1982), descenso de los factores tróficos (Heaton y col, 1992; Vallés y col., 1994) y también se ha detectado alteraciones en diversas proteínas del citoesqueleto (Clarren y col., 1978; Murray y col., 1981; Sulik y col., 1981; Hammer y Scheibel, 1981; Banningan y Cattel, 1984; Dow y Riopelle, 1985; Hassler y Moran, 1986a, b; Renau-Piqueras y col, 1989; Saez y col., 1991; Rovasio y Battiato, 1995).

El momento de exposición prenatal al alcohol es un determinante mayor de los efectos adversos observados. De tal forma que el retraso de crecimiento intrauterino puede modificarse favorablemente si la gestante evita o disminuye la ingesta etílica durante el último trimestre de embarazo (Rosett y col., 1983), si bien, hay que reseñar que según Majewski (1985) la severidad del mismo es independiente de la gravedad de la embriopatía. Está reconocido por la mayoría de los autores, ya por experimentación animal "in vivo" (Sulik, 1984) e "in vitro" (Brown, 1979) como por estudios en humanos (Ernhart, 1987) que el período de embriogénesis es el más crítico para la inducción de anomalías estructurales.

El umbral ingesta etanol -síndrome alcohólico prenatal- sigue siendo un tema no resuelto. En 1983 Nobel intentó resumir la problemática estableciendo, que existe un riesgo importante para el feto cuando la gestante ingiere habitualmente más de 90 gramos de alcohol absoluto al día; un riesgo existente pero incierto cuando el consumo de alcohol se sitúa entre 30 y 90 gramos de alcohol absoluto al día; mientras que aún se desconoce la cantidad de alcohol que puede ser consumida por la mujer sin exponer al embrión. Ese mismo año Webster y col. (1983) en un estudio en ratones sugieren que uno o más episodios de consumo "excesivo" durante la organogénesis puede afectar seriamente al embrión y producir muchas de las características del síndrome. En 1987 Ernhart y col. en un trabajo prospectivo en 359 recién nacidos establecieron la cantidad de más de 70 gramos de alcohol absoluto al día como de riesgo franco para la aparición de malformaciones estructurales, pero como con ingestas menores también se obserban, concluyeron que no era posible

definir un "umbral de seguridad".

En el presente trabajo realizamos un estudio experimental en el embrión de pollo sobre las alteraciones que produce el alcohol en los tejidos derivados del tubo neural y de la cresta neural; intentando esclarecer algunos de los mecanismos causales de las malformaciones que produce este tóxico.

PLANTEAMIENTO

Y

JUSTIFICACIÓN

Desde que Lemoine y col. (1968) y Jones y col. (1973) identificaron el S.A.F. han sido numerosos los trabajos de investigación que han estudiado los efectos de la exposición prenatal al alcohol en humanos y en modelos animales, concluyendo que el alcohol y su metabolito el acetaldehído son teratogénicos (Zajac y Abel, 1992). Estos estudios quedan limitados en humanos por causas éticas y por la existencia de variables incontroladas como son: la dificultad para determinar la cantidad de alcohol consumida (Larroque, 1992); que la mayoría de las mujeres que abusan del alcohol, abusan también de otras drogas (nicotina, cafeína, cocaína, ect.) (kaminski y col., 1976; Wricht y col., 1983); y que las influencias genéticas que podrían interactuar con el alcohol son desconocidas (Zajac y Abel, 1992). Por lo tanto los estudios experimentales acerca del efecto del alcohol en el periodo embrionario y fetal, se desarrollan en modelos animales.

Nosotros hemos empleado el embrión de pollo como modelo animal de experimentación, ya que es fácil de conseguir, el desarrollo embrionario se conoce bien, y tiene independencia de factores placentarios y de interacciones maternas que

permiten analizar de forma directa los efectos del alcohol.

La mayoría de los trabajos que se han realizado sobre el efecto del alcohol, han tenido como base y atractivo especial el estudio del efecto de esta sustancia sobre el desarrollo del SNC, especialmente a nivel del cerebro; y existen muy pocos trabajos que se hayan ocupado de los efectos que produce el alcohol sobre la cara o sobre el corazón. Así, alteraciones morfológicas que clínicamente llaman la atención como el epicanto, la hipoplasia de mandíbula, el paladar muy arqueado; defectos internos como las malformaciones cardíacas o deficiencias funcionales como la hipotonía que muestran los niños afectados de SAF, no han sido muy tratados experimentalmente. En el presente estudio, además de analizar los efectos del alcohol sobre las poblaciones neurogliales que se desarrollan en distintas zonas y órganos derivados del SNC, le hemos prestado especial atención al efecto de este tóxico sobre los derivados de la cresta neural y estructuras mesodérmicas. Para ello hemos contado con una herramienta excepcional, un anticuerpo monoclonal (3CB2) que reconoce una proteína asociada a filamentos intermedios del citoesqueleto de células neurogliales, células del ectomesénquima y células mesoblásticas (Prada y col., 1995). Por lo tanto, la ejecución del mismo ha requerido el empleo de una amplia batería de técnicas: técnicas histológicas clásicas (impregnación argéntica, secciones de semifinos para microscopía óptica) y técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas, para la caracterización de la proteína que reconoce 3CB2.

MATERIAL

Y

MÉTODOS

1. Preparación y tratamiento de los embriones "in ovo":

Se incubaron 150 huevos fértiles de pollo de la raza White Leghorn en estufa eléctrica a 37°C con una humedad relativa del 80-90%.

El tratamiento de los embriones se hizo al 2° y al 6° días de incubación, inyectando directamente en saco vitelino una dosis de 100 μ l de una solución de etanol (Merck, Ref. 983) al 50% V:V en suero fisiológico estéril, siguiendo los trabajos de Means y col. (1988).

En idénticas condiciones que las experimentales se inyectaron los embriones control con una dosis de 100 μ l de solución fisiológica estéril.

Tras su tratamiento se dejaron los embriones en incubación hasta el momento del sacrificio que se realizó en estadios sucesivos desde E-3 a E-18. Se determinó

sistemáticamente el estadio del desarrollo en el momento de la inyección y de la extracción mediante las tablas de Hamburger y Hamilton (1951).

En ningún estadio de los procesos experimentales se utilizaron antibióticos, antimitóticos ni suero fetal vacuno, puesto que se conoce la acción teratogénica de dichos agentes (Shepard, 1980).

2. Preparación del material para inmunohistoquímica.

Los embriones una vez tabulados según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), fueron fijados con paraformaldehído 4% en fosfato 0.1 M buffer a pH 7.6. Los especímenes permanecieron inmersos en fijador durante 1 día a temperatura ambiente. Una vez fijados se procedió a realizar el proceso de crioprotección en pasos sucesivos de sacarosa al 15% y 30% durante 24 horas cada paso para, posteriormente, ser incluidas las muestras en un medio de inclusión para criostato (Tissue Tek).

Las secciones en criostato se realizaron entre 10 y 20 μ y se montaron en portas gelatinizados.

Para la técnica inmunohistoquímica se utilizó, en algunos embriones, como primer anticuerpo un antiGABA policlonal de conejo (Sigma) y como segundo anticuerpo un anti-rabbit IgG marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), y en otros se utilizó como primer anticuerpo 3CB2 y 3BA8 y como segundo anticuerpo un anti-mouse IgM conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma). Los portas con los cortes de tejido se preincubaron en PBS con suero de pollo 10% y 0.25% de triton X-100, y posteriormente se incubaron en el primer anticuerpo, a una dilución 1/200 en PBS con 0.1% de triton X-100 y 1% suero de pollo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno en

PBS con 0.1% de triton X-100, se procedió a la incubación del segundo anticuerpo marcado con fluoresceína a una dilución de 1/100 en PBS con 0.1% de triton X-100, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos en PBS con 0.1% de triton-100 se procedió a cubrir los portas con una disolución de PBS-Glicerol 1/9.

Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss Axioplan con equipo de epifluorescencia y con cámara fotográfica incorporada. Las fotografías de fluorescencia se realizaron con una película de 400 ASA TMAX de Kodak.

3. Preparación del material para tinción con hematoxilina-eosina.

Las preparaciones tratadas para el estudio de inmunohistoquímica fueron teñidas posteriormente según la técnica de hematoxilina-eosina para cortes en congelación.

Tras lavado con agua destilada, se colorearon las preparaciones con solución de hematoxilina de Harris (Carlo Erba, Ref. 446461) durante 7 minutos, seguido de lavado con agua destilada, un paso por alcohol-ácido al 1% (alcohol etílico 70% - ácido clorhídrico 35%) y tratamiento con solución de hidróxido amónico 28% hasta azulear. Posteriormente, después de lavar con agua destilada, se hizo contratinción con eosina Y de Putt (5 g. de eosina Y, 2.5 g. de dicromato potásico, 50 ml. de solución saturada de ácido pícrico, 50 ml. de alcohol etílico absoluto y 400 ml. de agua destilada) durante 5 minutos, lavados en agua destilada, deshidratación con alcohol absoluto en tres pasos de 2 minutos de duración cada uno, un paso de 2 minutos en alcohol-xilol al 50% y aclarado con xilol en tres pasos de 2 minutos cada uno. Las preparaciones se montaron en medio histológico Entellan neu (Merck, Ref. 7961).

Las observaciones se realizaron en microscopio óptico Zeiss Axioplan con cámara fotográfica incorporada. Las fotografías se realizaron con película TMAX 400 ASA de Kodak.

4. Preparación del material para tinción de Golgi.

Las preparaciones histológicas se realizaron siguiendo los métodos de tinción argentica de Golgi variante Stensaas (1967). Los embriones de pollo fueron inmersos en una solución fijadora consistente en: 100 ml de agua destilada, 5 g. de dicromato potásico, 5 g. de hidrato de cloral, 5 ml de glutaraldehido, 25%, 5 ml de formaldehido 40%, 5 gotas de dimetilsulfóxido. La duración de este paso oscilaba entre 24 a 48 horas según el tamaño de la pieza. A continuación, después de un lavado en agua destilada se pasaron a una solución de nitrato de plata 0.75% donde permanecieron de 2 a 3 días. Una vez finalizada la impregnación se realizó una deshidratación en una serie creciente de alcoholes para pasarlo, a través de una mezcla alcohol-eter, en partes iguales, a las soluciones de nitrocelulosa de baja viscosidad al 5%, 10% y 20%, donde finalmente se incluyeron. Los bloque permanecieron conservados en cloroformo a 4°C hasta el momento de seccionarlos, en el que sumergieron en aceite de cedro para aclarar el tejido. Posteriormente el bloque se colocó en un microtomo Galileo realizando los cortes seriados a 90 μ , recogiéndose éstos en tolueno para su ulterior montaje bajo cubre objetos en un medio neutro, DPX. Las preparaciones que se obtuvieron fueron observadas en un microscopio ZEIS marca AF EOAR 65-19, que posee cámara fotográfica incorporada.

Dado que el grosor de los cortes, 90 μ , incluye varias capas de células, las observaciones siempre se hicieron asegurándonos que la célula estudiada se hallara en una plano medio en el grosor del corte. Sólo éstas fueron fotografiadas.

5. Preparación del material para semifinos.

Los embriones de pollo destinados al estudio semifino fueron procesados según la técnica para microscopía electrónica descrita por Palay y Chan Palay (1974) para el SNC: se disecaron las retinas a 4°C en solución fijadora con 2.5% paraformaldehído, 2.5% glutaraldehído, tampón fosfato 0.4M, 0.5% cloruro cálcico y agua destilada, donde permanecieron durante 24 horas.

Posteriormente pasaron a una solución de lavado, fueron postfijadora durante 2 horas a 4°C con tetróxido de osmio y deshidratadas en soluciones progresivamente concentradas de etanol. A continuación permanecieron durante 30 minutos en una mezcla de óxido de propileno y resina TAAB a partes iguales y, otra de óxido de propileno y resina en proporción 1:2 durante una noche.

Las retinas se incluyeron en resina epóxica de baja densidad según la fórmula propuesta por Spurr (1969): 10g VCD, 6g DER-76, 20g NS, 0.4g Dimetil-Amino-Etanol.

Los bloques se cortaron a 1μ con cuchilla de diamante. Estos cortes fueron teñidos según la técnica de Richardson y col. (1960) : Azur II 1%-Azul de metileno 1% a partes iguales, durante 2 minutos a 60°C y fotografiadas con microscopio Zeiss Axioplan con cámara fotográfica incorporada.

RESULTADOS

1. Malformaciones de la vesícula óptica.

Tanto en humanos como en animales de experimentación, se ha demostrado que el alcohol produce defectos durante el desarrollo facial. Estos defectos han llamado la atención, sobre todo, cuando se han manifestado con malformaciones externas. En nuestro estudio, hemos comprobado algunas de estas malformaciones, así la Figura 1a recoge una panorámica de una sección sagital de la vesícula óptica de un embrión que fue tratado durante el 2º día del desarrollo (E-2) y sacrificado en E-5. Se puede observar como el cristalino se está desarrollando pegado a la pared posterior de la vesícula óptica en total aposición con la cara interna de la retina, a la cual presiona (Fig. 1a, asteriscos). La cavidad natural que debiera ocupar el vítreo, se ha convertido en una cavidad virtual y el espacio equivalente al interior de la vesícula óptica es ocupado por células del ectomesénquima que constituyen en este estadio las estructuras faciales (Fig. 1a, estrella grande y estrellas pequeñas). En la figura 1c recogemos otra sección de otro embrión experimental, tratado con las mismas características que el anterior. El interés añadido de esta imagen esta representado por la posible relación que el cuerpo del cristalino (Fig. 1c, cr) mantiene con la cabeza del nervio óptico (Fig. 1c, no).

Como elemento comparativo de esta alteración experimental, se puede observar la Figura 1b que corresponde a una sección sagital de la vesícula óptica de un embrión normal del estadio E-2. Obsérvese que el cristalino presenta una ubicación relacionada con el polo anterior de la vesícula y por delante del mismo se

observa una banda de células ectoblásticas que le recubre (Fig. 1b, flechas) cerrando por esta zona la vesícula óptica. Es importante resaltar que ya en este estadio inicial del desarrollo, existe una auténtica cavidad ocular (Fig. 1b, asteriscos); y que el grosor de la futura retina central se mantiene uniforme en toda su extensión.

2. Alteraciones neurogliales durante la diferenciación del SNC.

Alteraciones neuronales.

Hemos empleado la técnica de Golgi-Stensaas para reconocer la morfología completa de las neuronas en desarrollo tratadas con alcohol. La Figura 2 muestra distintas imágenes de neuroblastos del tectum óptico de pollos, inyectados en E-2 y sacrificados entre E-5 y E-7. Las principales alteraciones que hemos reconocido en estas células han sido: 1) Desorientación axónica de las células arciformes. En la Figura 2d (a) la flecha muestra el recorrido tangencial por la capa marginal del tectum que realiza ; compárese con los embriones controles (Figs. 2a y 2c (a)) 2) Engrosamientos botonosos de las prolongaciones dendríticas que se están diferenciando. Estos engrosamientos se localizan tanto en células ventriculares (Fig. 2b, cabezas de flecha) como en células tangenciales (Fig. 2e, 2f y 2g, cabezas de flecha). 3) Fraccionamiento de las prolongaciones verticales de las células tectales (fig. 2h, flechas) que representan un estadio degenerativo del citoplasma celular.

Algunas de estas alteraciones ya han sido descritas en otras zonas del SNC, como son en las células grano del cerebelo (Quesada y col., 1990), o en las células ganglionares de la retina (Chmielewski y col., En prensa). Igualmente, hemos podido comprobar que, en efecto, el alcohol produce grandes alteraciones en la capa de células ganglionares de la retina, con abundantes imágenes de vacuolización y

picnosis (Fig. 3a y 3b, asteriscos y cabezas de flecha). Estos defectos producen en muchos de los casos una desestructuración amplia de la citada capa e hipoplasia de la capa de fibras del nervio óptico.

Uno de los objetivos básicos de nuestro estudio, a nivel del SNC, es comprobar el efecto del alcohol sobre las interneuronas o neuronas de asociación. En la retina las interneuronas están representadas por las células horizontales y las células amacrinas, que son las que se encargan de realizar la transmisión lateral a nivel de las capas plexiformes externa e interna respectivamente. Además, estas neuronas presentan una característica común interesante en nuestro estudio y es que durante el desarrollo expresan GABA. Por ello, hemos podido estudiar el efecto del alcohol sobre estas poblaciones neuronales, utilizando un anticuerpo policlonal contra el GABA. Los resultados que hemos obtenido demuestran que el alcohol produce un retraso del proceso de migración neuronal en las células horizontales. Así, las flechas de las Figuras 5f y 5g muestran células horizontales todavía localizadas a nivel de la capa nuclear externa en el estadio E-14. En condiciones normales estas células finalizan su proceso de migración entre E-9 y E-10.

Las células amacrinas son las interneuronas que más se afectan por el efecto del alcohol. A este respecto nuestros resultados son concluyentes, y podemos afirmar que cuando menos el alcohol inhibe la expresión de GABA por parte de estas células; pues en ningún caso hemos encontrado inmunorreactividad para el GABA en el tercio interno de la capa nuclear interna (Fig. 5a, 5b, 5c y 5f, 5g y 5i,

asteriscos). También hay que resaltar que los embriones tratados con alcohol en E-6 y sacrificados en E-14 muestran un abundante número de picnosis en la zona de la capa nuclear interna donde se localizan las células amacrinas (Fig. 5h, cabezas de flecha). Esta alteración que acabamos de citar genera una pregunta ¿Se mueren todas las células GABAérgicas de la capa nuclear interna, o dejan de expresar GABA?. Para intentar aclarar esta cuestión utilizamos un anticuerpo monoclonal, 3BA8, que reconoce específicamente un epítipo de una proteína localizada en las células amacrinas; como se observa en las Figuras 5d y 5e, que corresponden a secciones verticales de retina de animales experimentales en E-18, las células amacrinas aparecen marcadas (cabezas de flecha) y su morfología es similar a la que poseen las células de los embriones control.

Alteraciones gliales

Como señalamos en nuestros objetivos, hemos analizado los efectos del alcohol sobre las células gliales a través de las alteraciones que se producen en el patrón de expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3CB2. Este anticuerpo reconoce una proteína asociada a filamentos intermedios que se localiza entre otras células, en las células de Müller de la retina, en la glia radial de prácticamente todo el SNC y en los astrocitos (Prada y col., 1995). Los embriones tratados con alcohol durante el desarrollo producen un descenso de la inmunorreactividad 3CB2 en las células de Müller de la retina. Compárese las Figuras 3c, 3d y 3e, que corresponden a embriones tratados con alcohol durante E-6

y sacrificados en E-18, con las Figuras 3f y 3g, que corresponden a embriones control. Durante el desarrollo normal, 3CB2 se expresa en los procesos radiales de las células de Müller (fig. 3f, cabezas de flecha), alcanzando la mayor inmunorreactividad en la parte interna de la retina a nivel de las células ganglionares (flechas gruesas) y en la capa plexiforme externa (flechas finas). Esta última localización del antígeno ha sido demostrado que corresponde a los axones de las células horizontales. El alcohol produce una importante disminución de la inmunorreactividad para 3CB2 en los procesos de las células de Müller, y una pérdida completa de la inmunorreactividad para 3CB2 en los axones de las células horizontales (Figs. 3c, 3d y 3e, flechas finas).

El mismo patron alterado que acabamos de describir en la retina, se observa a nivel de la corteza del cerebelo. La figura 4 en conjunto demuestra que el alcohol disminuye la inmunorreactividad para 3CB2 a nivel de la glia radial de la capa molecular y en los astrocitos localizados en la capa granular interna (compárese las Figuras 4a y 4c, flechas con 4b y 4d).

3. Alteraciones del ectomesénquima craneofacial y derivados mesodérmicos.

Durante el desarrollo normal, la proteína que reconoce 3CB2 se localiza, además de en el SNC, en los fibroblastos craneofaciales (Fig. 6a, 6c y 6e), en las células mesodérmicas que rodean a la notocorda y en general en los fibroblastos del esqueleto en desarrollo (Figs. 7a y 7c, flechas), en el dermatomiotomo de los somitos (Figs. 8a, 8c, 8f y 9a; mi) y en las células del mesocardio y miocardio (Figs. 10a, 10b y 10e). En los embriones tratados con alcohol en E-2 y sacrificados en E-5, observamos en general, una disminución de la inmunorreactividad para 3CB2 en todas las células que expresan este antígeno. Así se puede observar, disminución de esta proteína en los fibroblastos del ectomesénquima (Figs. 6b y 6d) y ausencia de ella a nivel del septum nasal (Fig. 6f). El tejido paranotocordal muestra una disminución importante de la expresión de esta proteína (compárese las Figuras 7b y 7d, asteriscos con las imágenes control 7a y 7c). El dermatomiotomo de los somitos revela también una disminución o ausencia de la proteína en los embriones tratados con alcohol (Figs. 8e, asteriscos y 9b y 9c; s). Esta pérdida también afecta al miocardio (compárese la Figura 10c y a mayor aumento su recuadro, Figura 10d; con la Figura 10a y su recuadro, Figura 10b; en esta última las cabezas de flecha señalan las prolongaciones de las células miocárdicas que expresan inmunorreactividad para 3CB2).

La proteína reconocida por 3CB2 no muestra alteración inmunorreactiva ni en el epicardio (Figs. 10a y 10c triángulos y 10e y 10f) ni a nivel de las raíces anteriores de los nervios raquídeos (Figs. 9c y 9d, asteriscos).

4. Otras alteraciones.

Además de las alteraciones anteriormente descritas, el alcohol produce sobre el tubo neural, un retraso del cierre del mismo, como demuestra la Figura 8b (flecha) si se compara con la figura 8a. A nivel del miocardio también observamos un aumento de la trabeculación por incremento de los espacios intercelulares (Fig. 10c respecto a fig. 10a, asteriscos).

ICONOGRAFÍA

Figura 1:

a: vesícula óptica de un embrión tratado con alcohol en E-2 y sacrificado en E-5. Se produjo una malformación de la cavidad ocular por la que la cavidad vítrea es virtual (asteriscos) y el cristalino (cr) se pega al fondo de la citada cavidad. Las estrellas muestran la invasión de células del ectomesénquima que ocupan la cavidad secundariamente formada por el efecto de la malformación. X 100.

b: vesícula óptica de un embrión normal en E-.2. Los asteriscos señalan la cavidad vítrea; cr, cristalino; las flechas señalan la banda de tejido ectoblástico que recubre el polo anterior del cristalino y la vesícula (este tejido falta en la figura 3a). X 100.

c: Detalle ampliado del cristalino (cr) y nervio óptico (no) de otro embrión experimental similar al de la figura 3a. X 200.

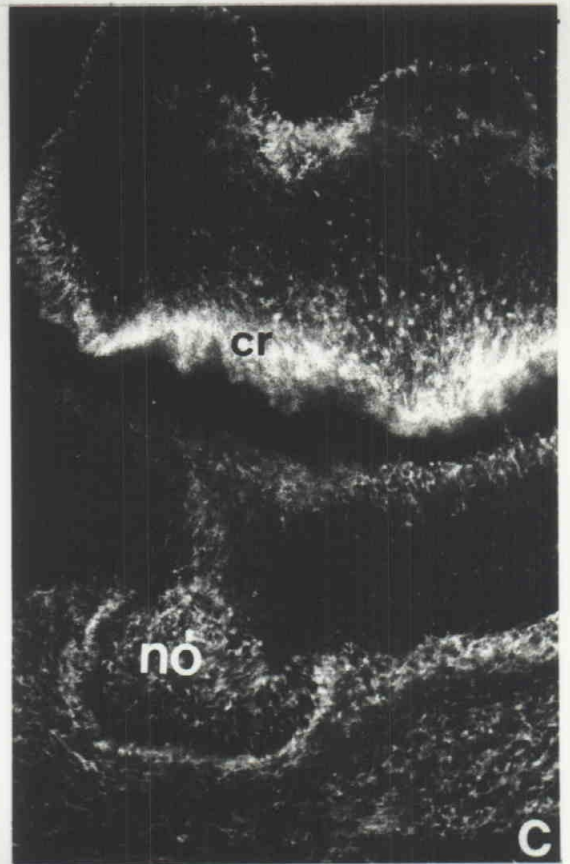
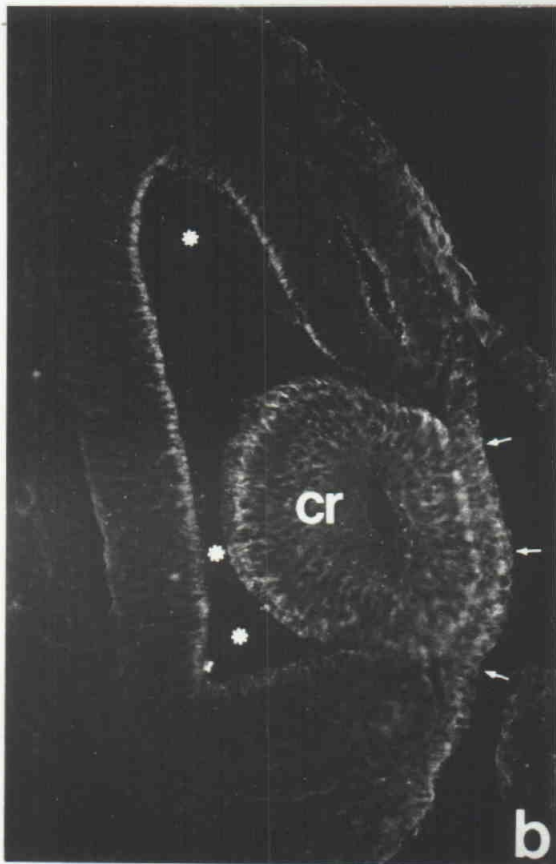
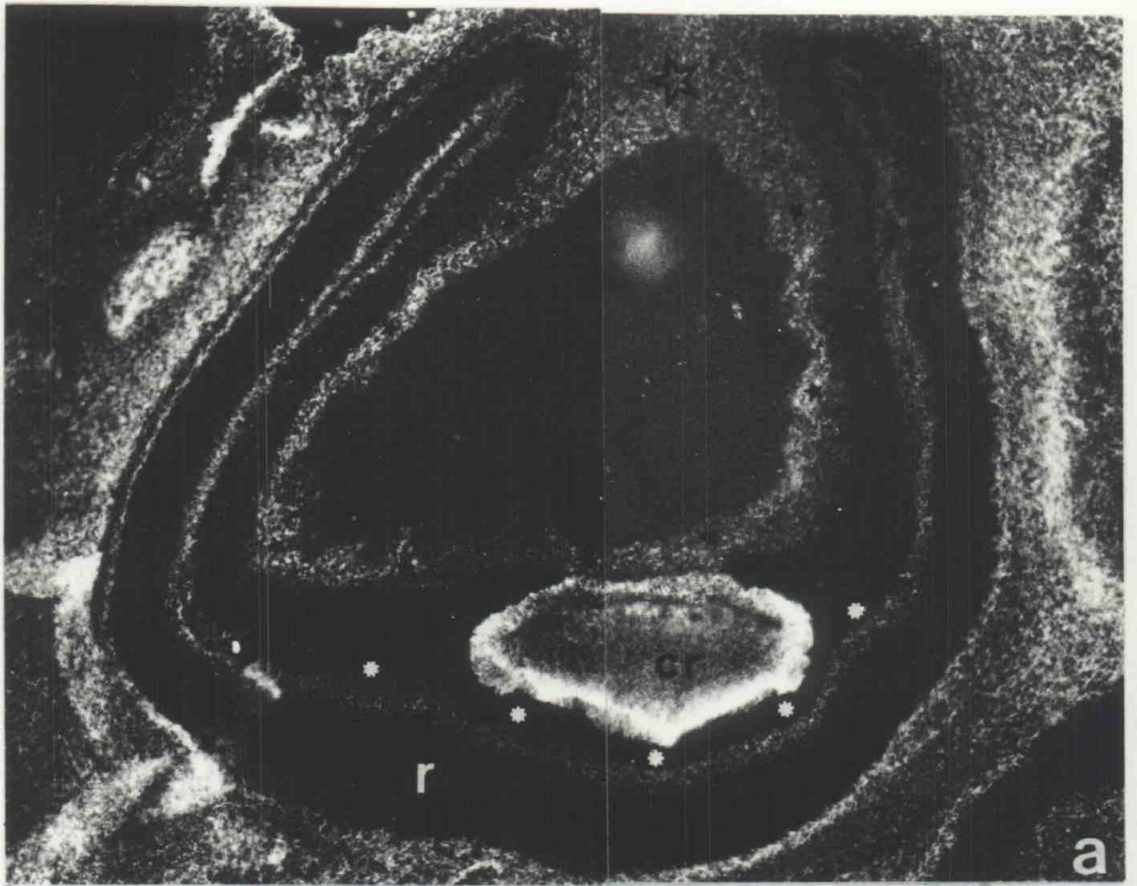


Figura 1



Figura 2:

Muestra distintos aspectos morfológicos de las alteraciones que produce el alcohol sobre las células del tectum óptico de pollo durante E-5 y E-6 (figs. b, d, e, f, g y h). Las células de los embriones control, aparecen recogidas en las figuras a y c. Las cabezas de flecha señalan signos degenerativos botonosos de las neuronas tectales. Las flechas muestran un estado más avanzado de la degeneración celular que es el fraccionamiento de las prolongaciones dendríticas. X 200.

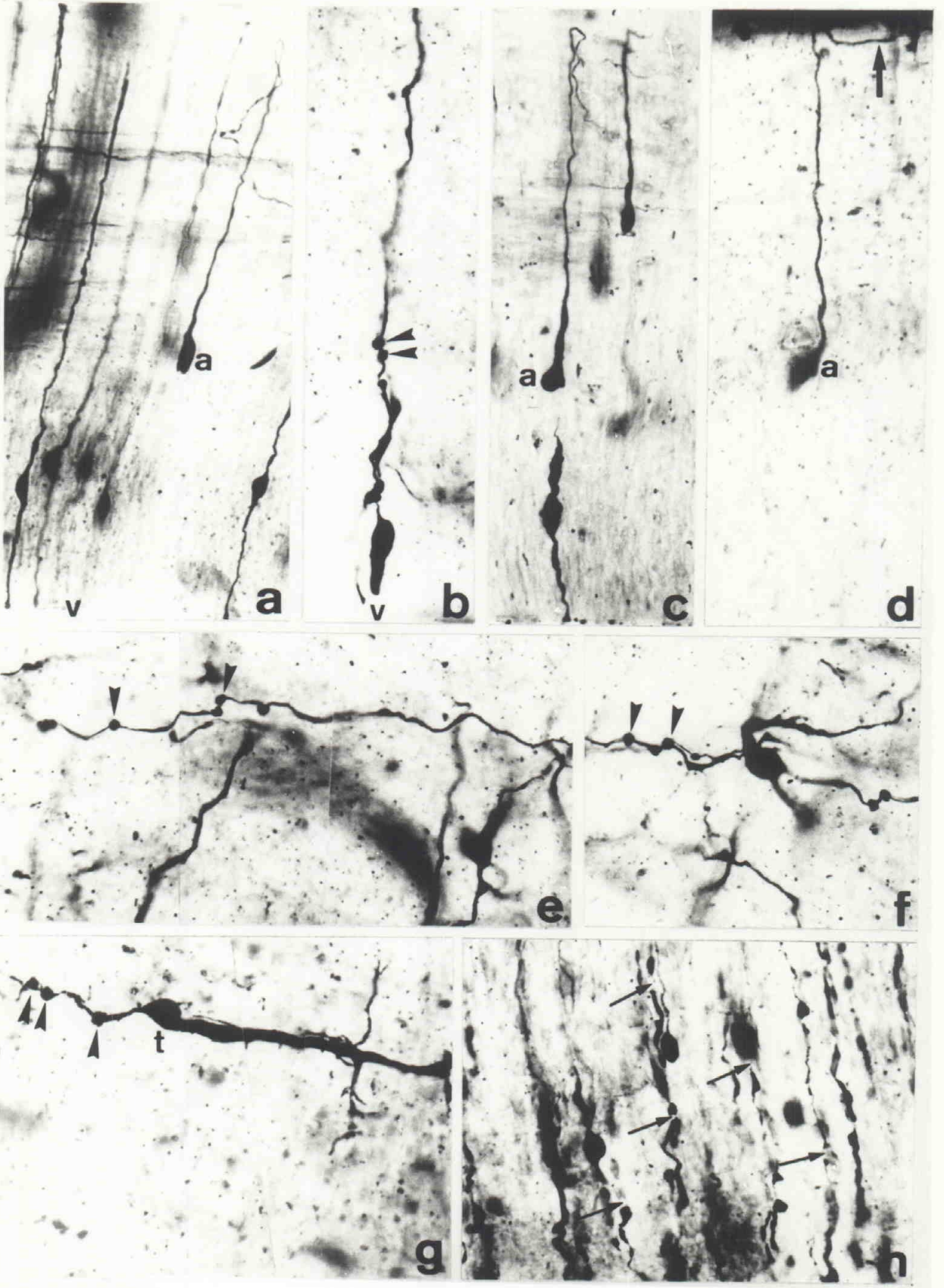


Figura 2

Figura 3:

a y b: Retina en E-18 tratada en E-6 con alcohol. La mayor alteración se localiza en la capa de células ganglionares (CG; cabezas de flecha). Los recuadros señalan dos zonas iguales de un mismo corte histológico. Los asteriscos muestran numerosas vacuolas y espacios intercelulares agrandados. La flecha grande en (a) señala a la capa plexiforme externa, muy agrandada por el efecto del alcohol. CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. a X 200; b X 400.

c, d y e: corresponden a secciones verticales de retina de embriones del pollo en E-18, tratados en E-6 con alcohol. Estas secciones fueron procesadas inmunohistoquímicamente con 3CB2. Obsérvese que sólo hay un leve marcaje de las prolongaciones más internas de las células de Müller. Las flechas señalan la zona donde tendrían que haberse marcado los axones de las células horizontales. X 200.

f y g: Retinas idénticas a la de las figuras anteriores, pero de embriones control. En ellas se puede apreciar el patron de marcaje de 3CB2 sobre las células de Müller (cabezas de flecha y flechas grandes) y sobre los axones de las neuronas horizontales, flechas finas. X 200.

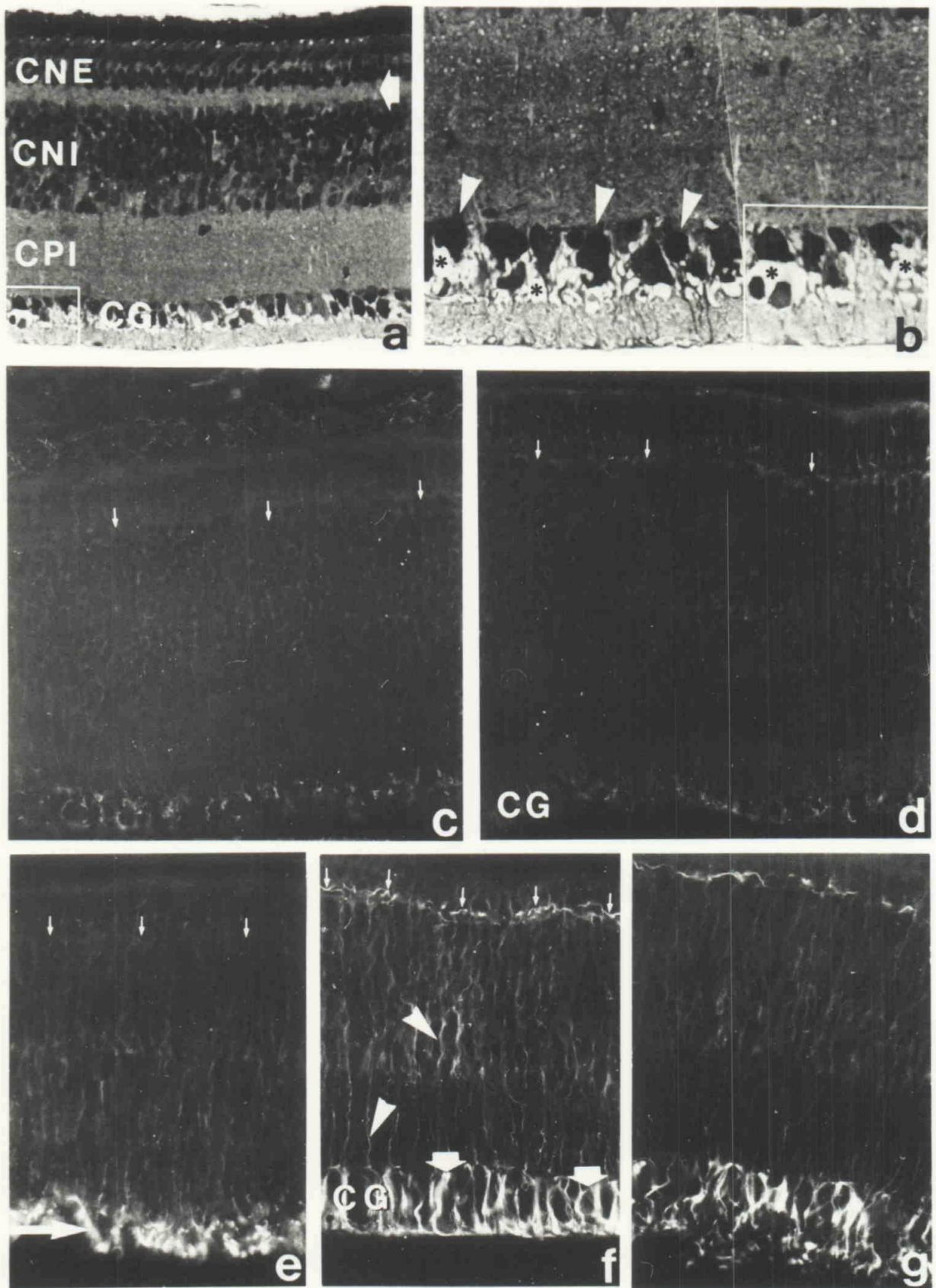


Figura 3

Figura 4:

a y b: secciones de la corteza cerebelosa de un embrión de pollo control en E-18.
c y d: son idénticas a las anteriores pero de un embrión tratado con alcohol. mol, capa molecular; p, capa de células de Purkinje; gr, capa granular interna. Las flechas señalan las prolongaciones gliales que se marcan con 3CB2. En los embriones experimentales la tinción está ausente. a y b X 100, c y d X 200.

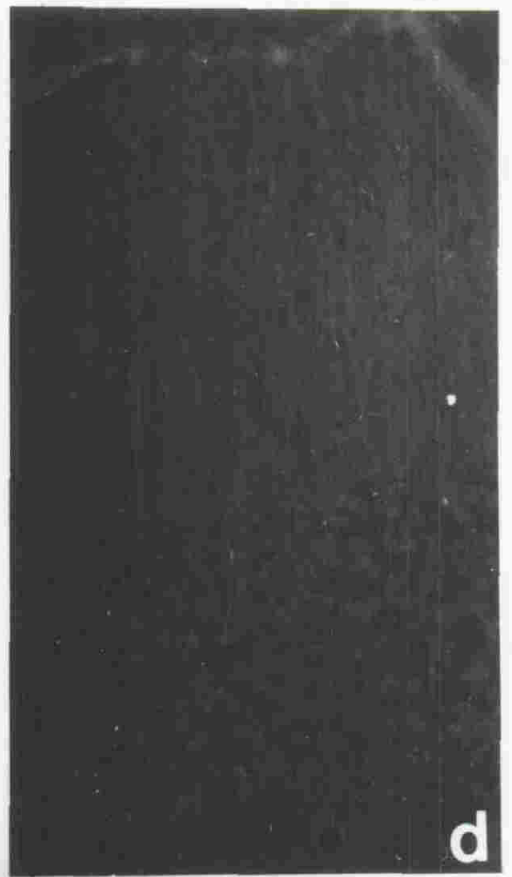
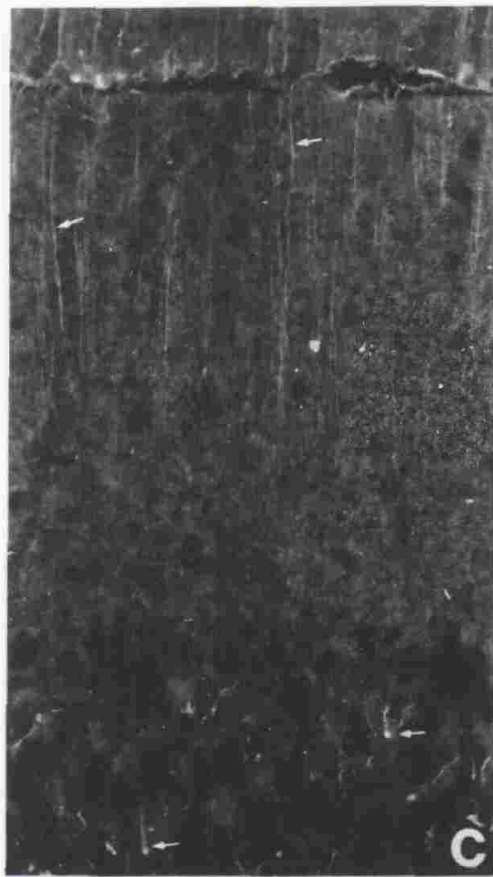
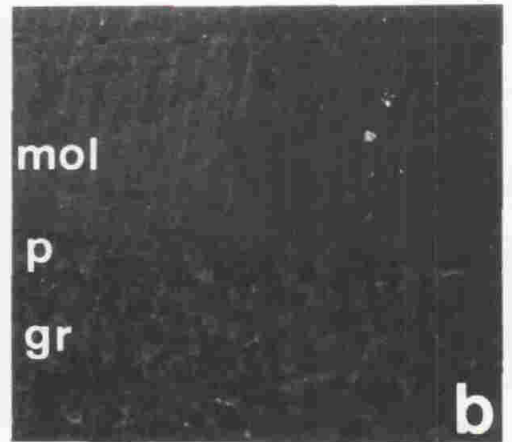
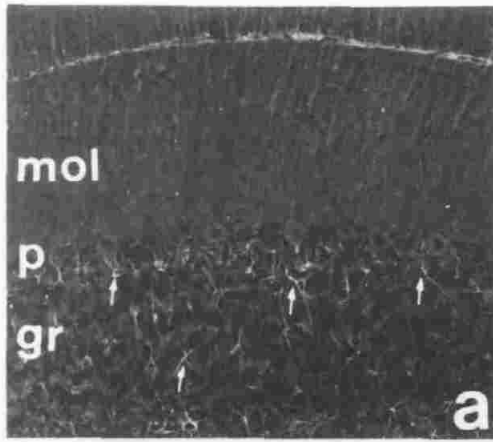


Figura 4

Figura 5:

a, b, c, f, g, i: muestran la población de células horizontales de retinas en E-14 tratadas con alcohol y teñidas con un anticuerpo policlonal contra el GABA. Las flechas en f y g señalan neuronas que no han finalizado el proceso de migración hasta la capa de células horizontales (ch). El asterisco muestra la zona de ubicación de las células amacrinas que en los embriones tratados con alcohol no se marcan.

En h las cabezas de flecha señalan sobre una sección de retina de E-14 tratada con alcohol, las numerosas picnosis que se producen en el tercio interno de la capa nuclear interna (cni) y que corresponden a células amacrinas.

Las figuras d y e muestran el patrón de tinción de las células amacrinas (cabezas de flecha), reconocidas por un anticuerpo monoclonal 3BA8 en retinas de E-14 tratadas con alcohol. a y b X 100, c-i X 200.

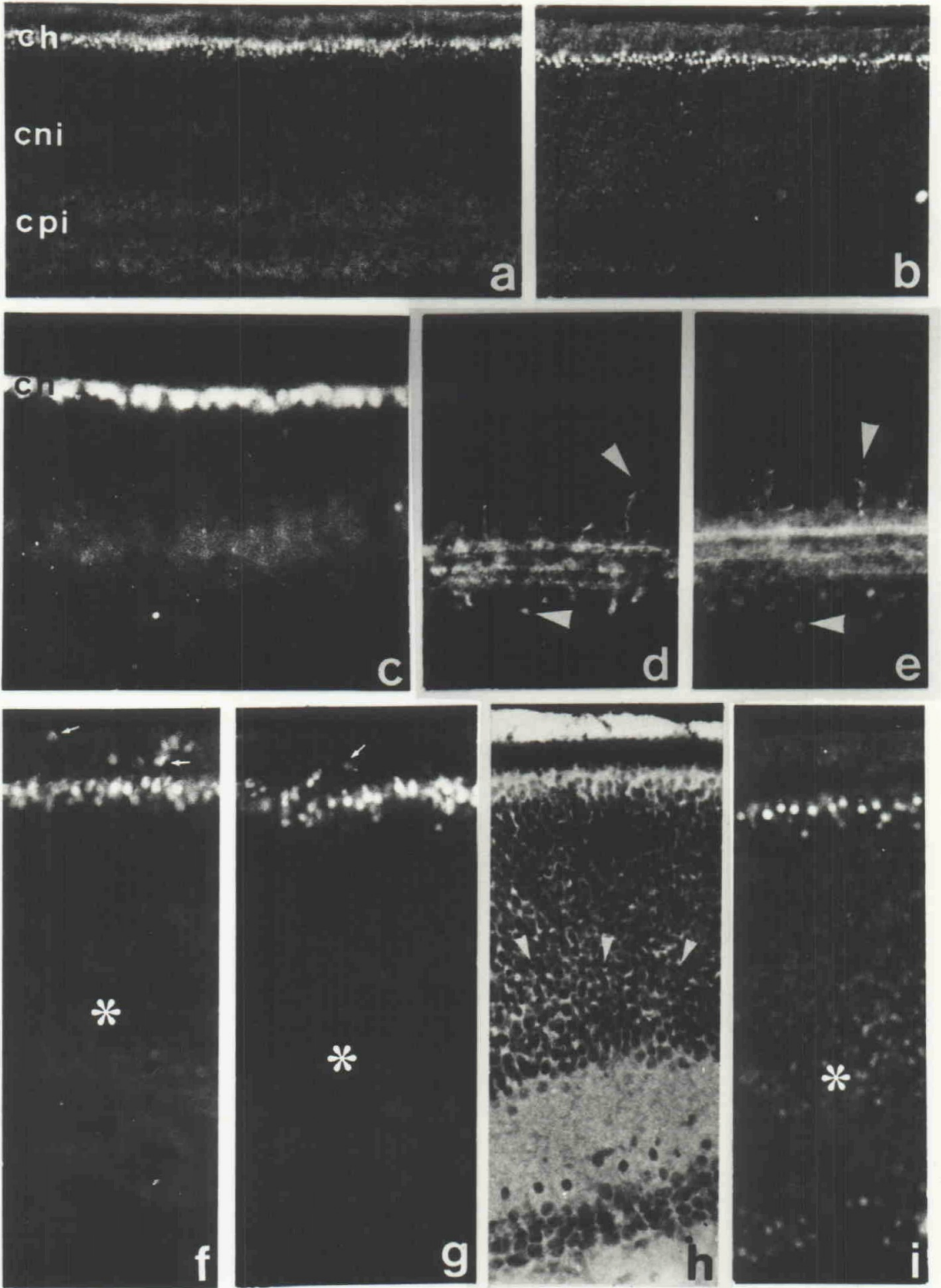


Figura 5

Figura 6:

a, b y e: células del ectomesénquima craneofacial de embriones de pollo control, en E-5. Se puede apreciar el patrón de marcaje positivo para 3CB2, que expresan las células respecto a las de las figuras b, d y f que se muestran negativas y corresponden a embriones tratados con etanol en E-2 y sacrificados en E-5. e y f corresponden al septum nasal del pollo. a,b, c, d X 200, e, f X100.

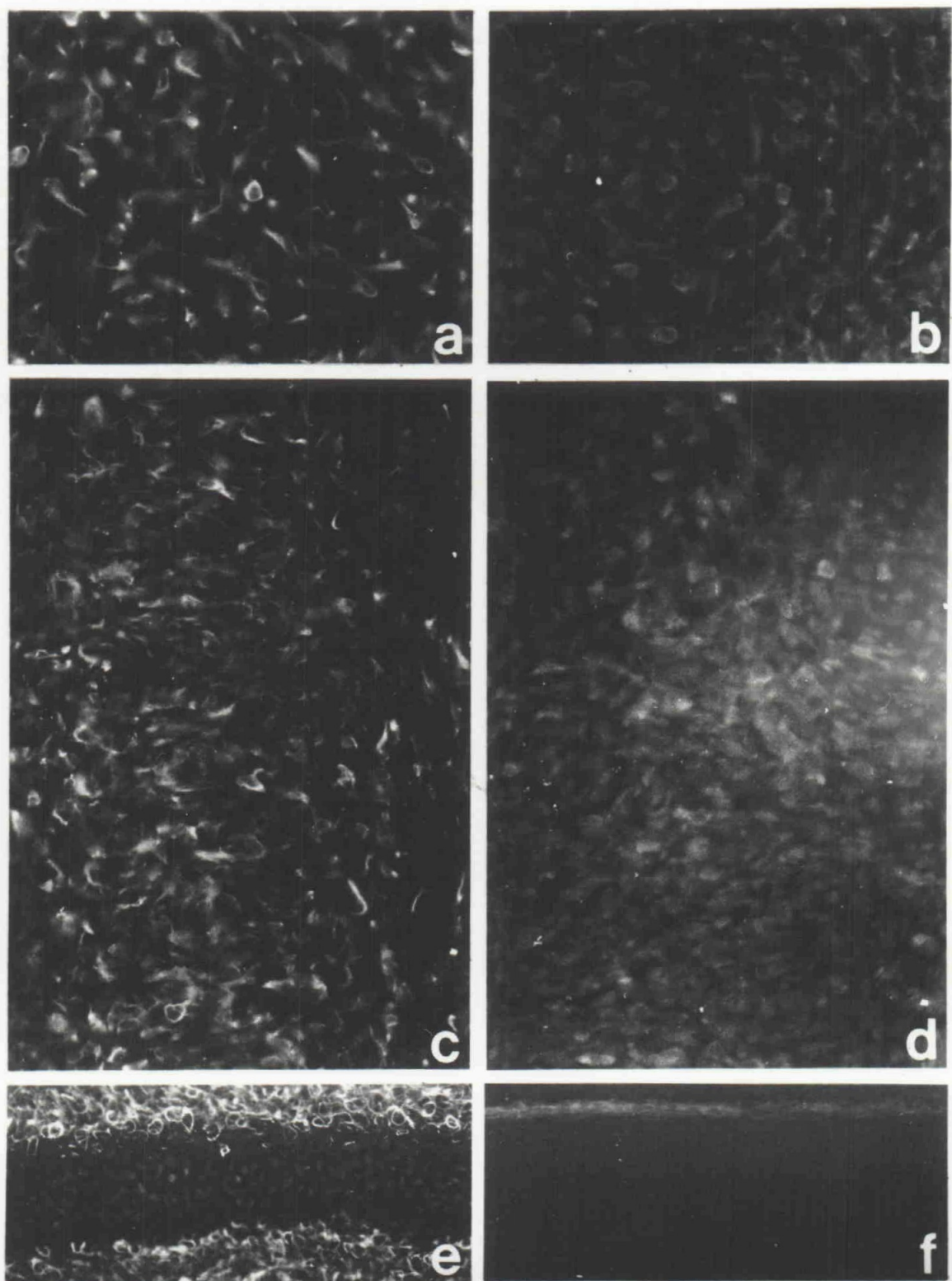


Figura 6

Figura 7:

a, b: tinción con 3CB2 de fibroblastos de pollo control (flechas) a nivel de la notocorda (h) y tronco del encéfalo (t) en E-5.

c, d: lo mismo que en las anteriores pero corresponden a pollos tratados con alcohol en E-2 y sacrificados en E-5. El asterisco señala la ausencia o debilidad del marcaje inmunohistoquímico. X 200.

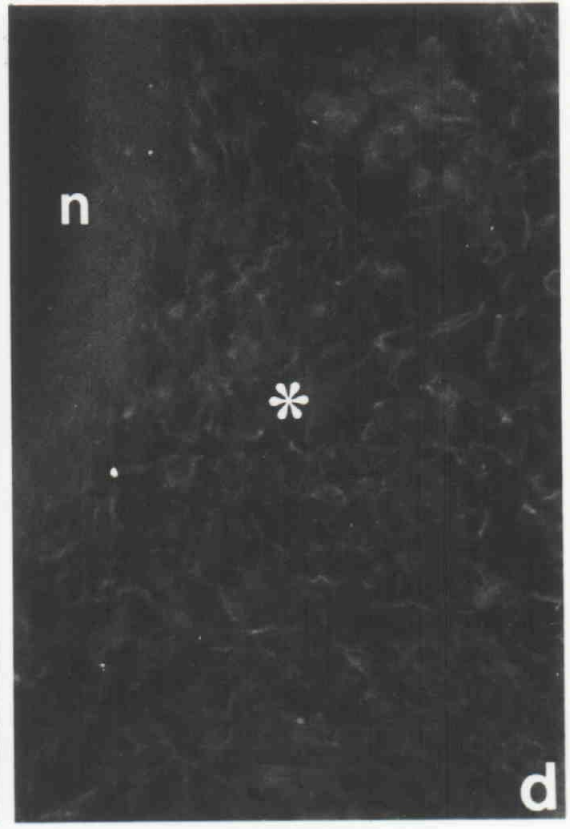
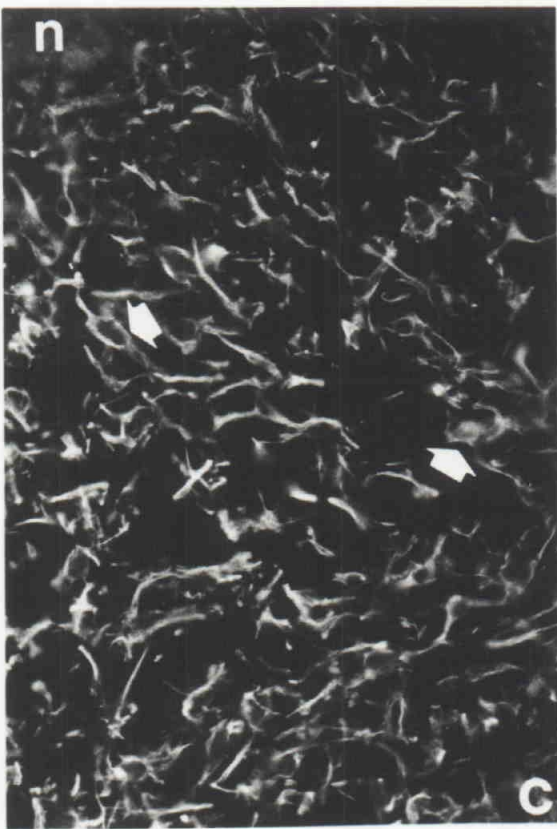
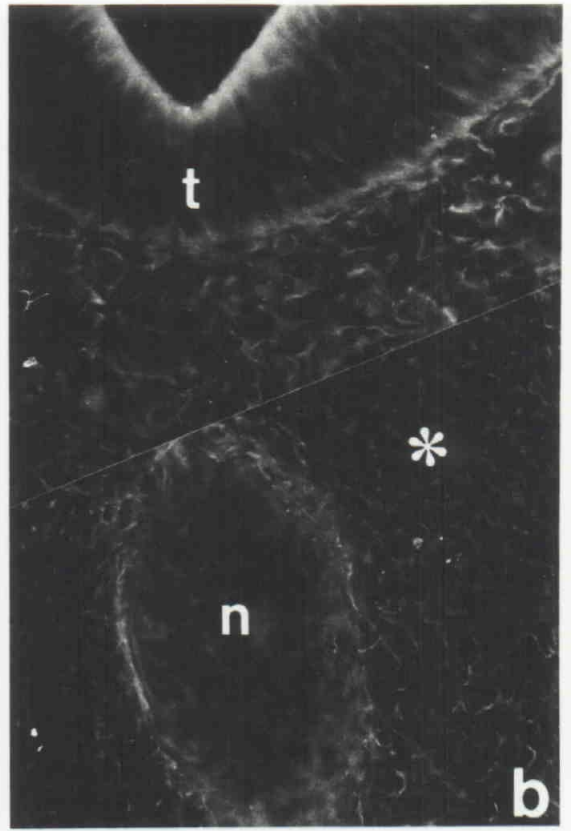
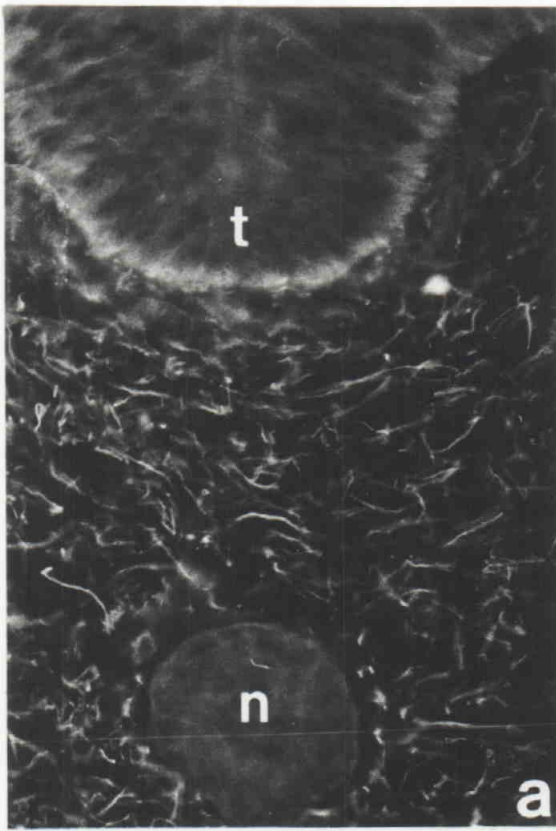


Figura 7

Figura 8:

Marcaje inmunohistoquímico de 3CB2 sobre secciones transversales de embrión de pollo control en E-5 (a y c) y tratados con alcohol (b y d). f y g corresponden a secciones frontales de pollo control y e es una sección frontal de un embrión en E-5 tratado con alcohol. mi, y los asteriscos señalan el dermatomiotomo; me, médula; n, notocorda. La flecha grande en b señala la apertura que todavía posee el tubo neural en su región posterior. Las flechas en f muestran fibras nerviosas del nervio raquídeo. Las flechas en g señalan células en ciclo mitótico. a, b, e, f y g X 100, c y d X 200.

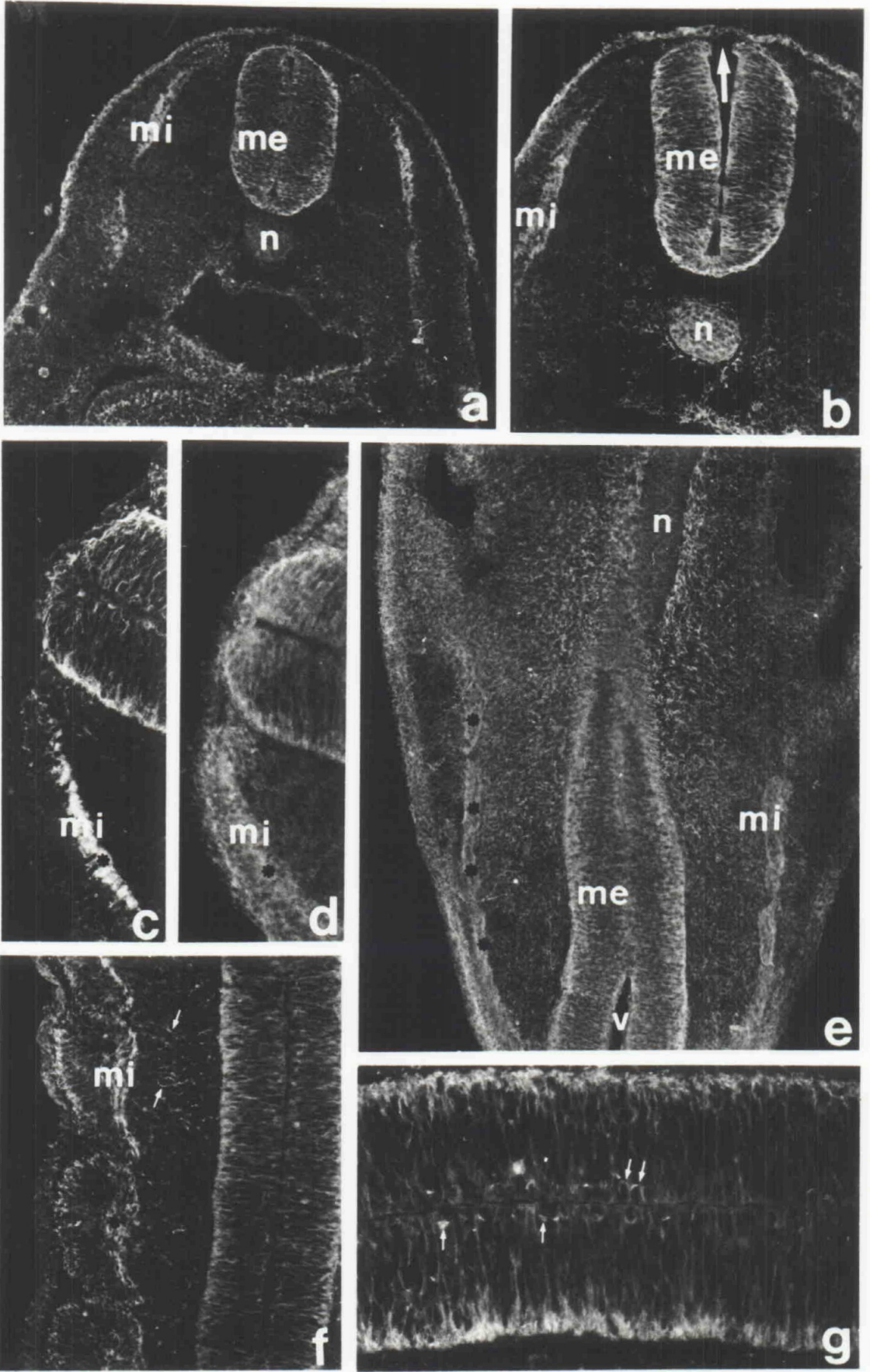


Figura 8

Figura 9:

a: tinción inmunohistoquímica con 3CB2 de una sección sagital de embrión control en E-5. mi, dermatomiotomo; s, somitos.

b, c y d: lo mismo que a pero tratado con alcohol. Los asteriscos señalan los nervios raquídeos. a, b y d X 200, c X 100.

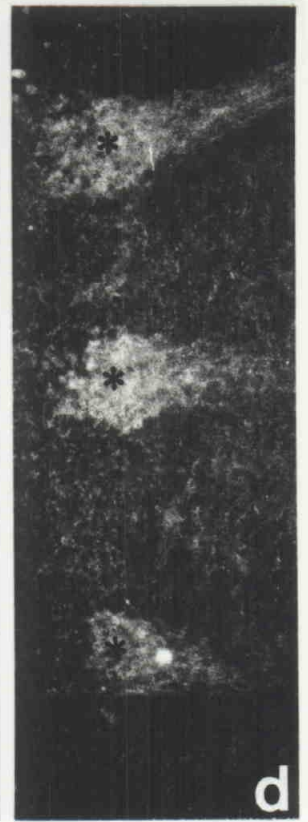
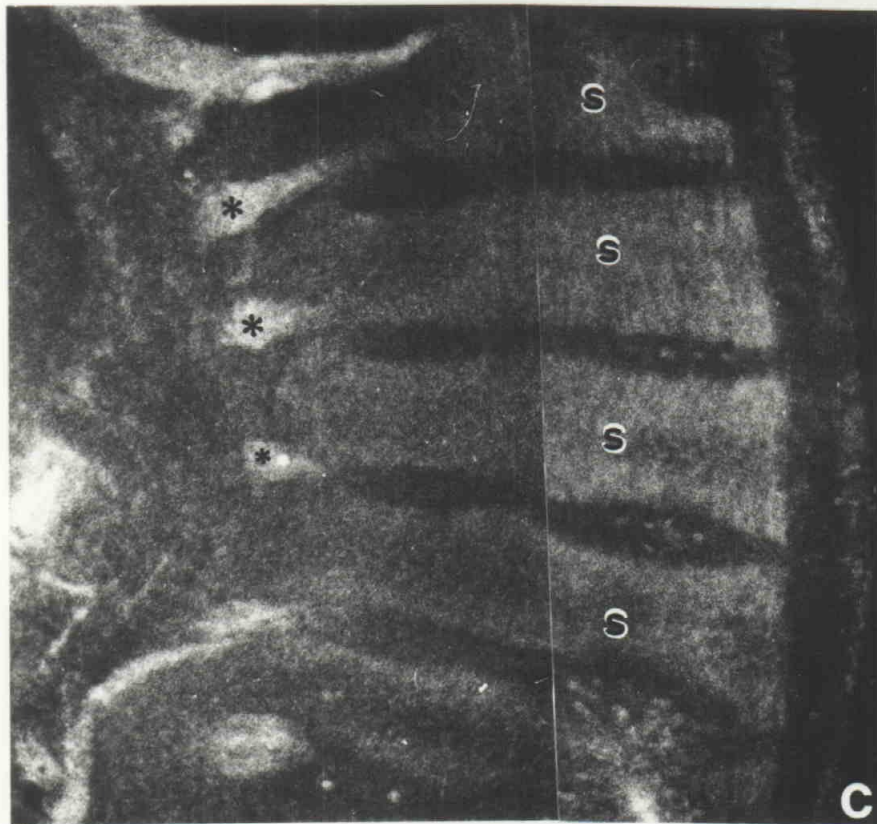
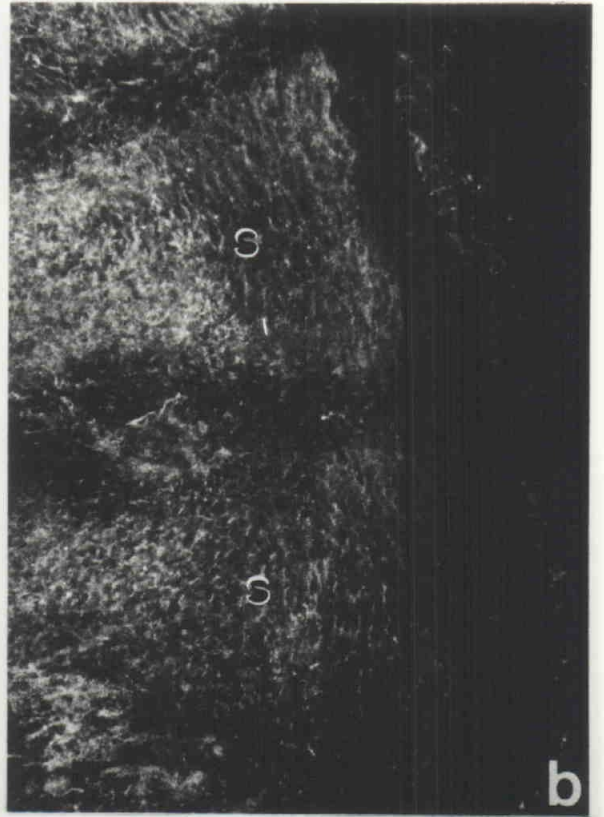
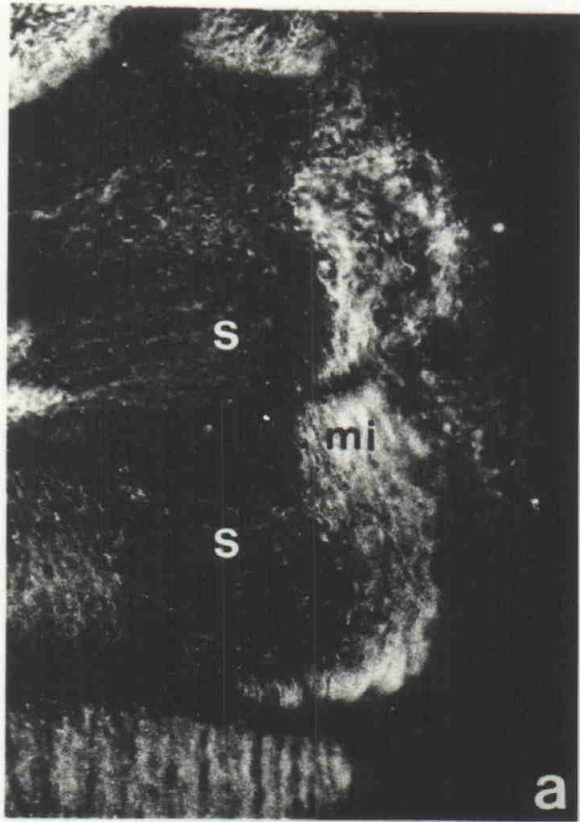


Figura 9

Figura 10:

Muestra distintas imágenes del corazón de embriones de pollo en E-5, teñidos inmunohistoquímicamente con 3CB2. a, b y e, corresponden a embriones control. c, d y f corresponden a embriones tratados con alcohol. b y d corresponden a los recuadros de a y c respectivamente. e y f son zonas marcadas con triángulos en a y c respectivamente. Las cabezas de flecha señalan el marcaje de 3CB2 en las células miocárdicas. Esta expresión falta en los embriones tratados con alcohol. Los asteriscos señalan cavidades entre las trabéculas del miocardio. a y c X 100, b, d, e, f X 200.

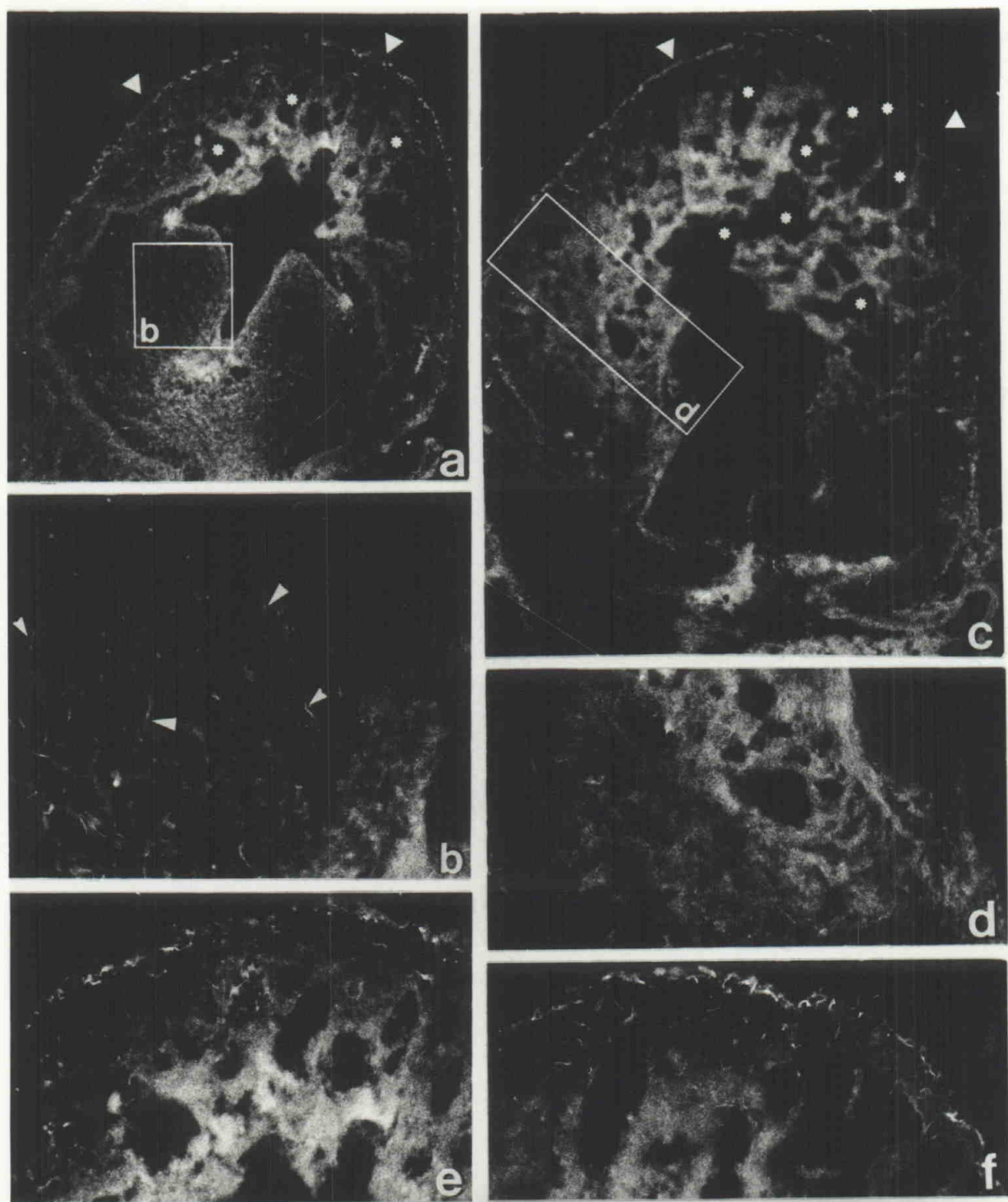


Figura 10

DISCUSIÓN

Hemos mostrado como el alcohol puede malformar la vesícula óptica durante el desarrollo. En nuestro caso, la alteración se ha centrado fundamentalmente en la ausencia de la cavidad vítrea y la ocupación del espacio que le corresponde a ésta por material del ectomesénquima de la cara. Este hecho plantea una cuestión: ¿por qué no se ha formado el tejido ectodérmico que recubre en esta fase del desarrollo el polo anterior de la vesícula óptica (fig. 1b, flechas)? Pensamos que esta es la causa que genera globalmente la malformación, porque si no hay cierre anterior, o bien se produce una hipotensión en el interior de la vesícula o bien se produce un desplazamiento del cristalino hacia el fondo de la vesícula. En cualquier caso, la ausencia de esa barrera ectoblástica facilita el camino migratorio que las células del ectomesénquima utilizando como sustrato el mesoepitelio retiniano, rellenan la cavidad que se ha formado. Esta última aseveración no parece ofrecer dudas, pues todas las células del ectomesénquima rodean la vesícula óptica y ninguna migra o se esparce libremente por el interior de la cavidad ocular formada secundariamente (fig. 1a, estrellas). Una vez puesto en marcha el mecanismo malformativo (el cual

pensamos que es desencadenado por el efecto del alcohol, pues no es producto del azar ya que se repite con asiduidad en los embriones experimentales), se desencadenan una serie de hechos que tienen importancia para entender globalmente la malformación. Por un lado, si observamos mas detenidamente la figura 1a, se puede apreciar que el desarrollo de la retina se ha sobredimensionado. La medición de la retina en este tipo de corte, demuestra que la longitud de ésta es equivalente a la de un ojo en aproximadamente E-12. Podríamos especular que el crecimiento magnificado de esta estructura está inducido por el arrastre que el cristalino realiza desde su posición anterior hacia el fondo de la vesícula. Por otro lado, al quedar reducida la cavidad ocular a una cavidad virtual, el cuerpo del cristalino a medida que crece, va realizando presión sobre la zona de la retina en la que descansa (fig. 1a, estrellas). Este hecho produce una dificultad en el proceso de crecimiento y diferenciación de la retina. La figura 1c muestra una sección ampliada de otro embrión experimental en la que se observa que el cristalino puede producir una compresión directa sobre la cabeza del nervio óptico a nivel de la papila, lo que produciría una atrofia del nervio óptico. Este hecho pensamos que tiene mucho interés, pues se han descrito hipoplasias del nervio óptico y atrofas del mismo en niños que padecían el Síndrome Alcohólico Fetal (Strömmland y Pinazo-Durán, 1994). Finalmente hay que resaltar en relación con esta malformación, que el cristalino es deforme, lo que hace pensar en que la hipotensión interna de la vesícula óptica induce un desarrollo alterado de la lente.

Los estudios experimentales que se han realizado en los últimos 15 años, han

permitido conocer más profundamente algunas de las anomalías que produce el alcohol, bien relacionados con el SAF o descritas aisladamente.

Sobre el SNC se sabe que el alcohol produce un retraso del desarrollo, generado a partir de las alteraciones de la migración neuronal (Miller, 1986; Quesada y col., 1990), de la elongación axónica (Hassler y Moran, 1986 a), de la arborización dendrítica (Davies y Smmith, 1981) y de la sinaptogénesis (Leonard, 1987). Sin embargo, el conocimiento profundo del retraso que produce el alcohol requiere un conocimiento más detallado y completo de los efectos de este tóxico en todas y cada una de las regiones del SN. Los resultados que hemos obtenido en este estudio amplían algunas cuestiones sobre los efectos del alcohol, que pasaremos a discutir, y abren caminos para comprender algunos mecanismos de acción del mismo.

En el tectum óptico hemos mostrado que el alcohol produce alteraciones sobre todo en las neuronas tipo I descritas por Puelles y Bendala (1978). Estas alteraciones consisten en desorientación axónica, y signos degenerativos en sus prolongaciones consistentes en botones citoplásmicos y fraccionamiento de las prolongaciones. En la retina hemos constatado, de acuerdo con Chmielewski y col. (en prensa), que el alcohol altera fundamentalmente las neuronas glanglionares y los axones de estas células, provocando a altas dosis una destrucción máxima de las capas donde se ubican. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe distinto grado de labilidad y sensibilidad para el alcohol por parte de los distintos tipos de neuronas del SNC. Esta sensibilidad también cambia en función del momento

cronológico del desarrollo en que se encuentren las células. En cualquier caso, parece que las neuronas de proyección o neuronas tipo I (clasificadas así por el tipo que migración que realizan) son más vulnerables al alcohol. Quizás la razón esté en que el alcohol altera especialmente los axones mielínicos de las células retrasando el proceso de mielinización (Pinazo-Durán y col., 1992; Strömmland y Pinazo-Durán, 1994). Todos los defectos que hemos encontrado en nuestro estudio experimental son achacables al alcohol y no a su metabolito el acetaldehído como ha sido sugerido por Zajac y Abel (1992). Los estudios de Chmielewski y col. (en prensa) demuestran que en la retina de los animales experimentales no se detectó acetaldehído, lo que demuestra que en el pollo el alcohol no se metaboliza.

Como antes hemos comentado, existen signos que hemos interpretado como degenerativos en las neuronas tectales que hemos estudiado con el método de Gogli-Stensaas (1967). Es verdad que se puede decir que las técnicas argénticas clásicamente no se han considerado técnicas apropiadas para los estudios degenerativos. Sin embargo, la mucha experiencia que hemos adquirido observando incontables preparaciones teñidas con este método nos han facilitado la capacidad interpretativa. Nosotros pensamos que los engrosamientos de la prolongaciones, representan la etapa previa al fraccionamiento de las mismas. En todo caso, imágenes como la recogida en la figura 2h (flechas) demuestran que las células están deterioradas y las prolongaciones son escombros celulares. La otra alteración observada con la técnica de Golgi es la desorientación axónica. En este caso la metodología si está acorde con la necesidad experimental. Sólo esta técnica garantiza

la tinción y la imagen completa de la morfología de la célula. Nosotros hemos observado desorientación de los axones de las células arciformes del tetum. Hechos como éste han sido observados durante el desarrollo de las células grano del cerebelo del pollo (Quesada y col., 1990). Por lo tanto, este nuevo hallazgo viene a constatar el efecto del alcohol sobre la célula que está elongando el axon o sobre el substrato por donde éste migra. Ha sido sugerido que el alcohol inhibe la arborización dendrítica y la elongación axónica, alterando los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto (Hassler y Morán, 1986 b), otra posibilidad es que el alcohol dañe las células neurogliales y con ello disminuya la posibilidad de guiar a los axones hasta sus células diana. La desorientación axónica puede justificar dos posibles hechos: o la célula realiza una inadecuada conexión o la célula muere por no realizar sus conexiones diana.

También en este trabajo hemos analizado el efecto del alcohol sobre las interneuronas de la retina, y hemos comprobado que este tóxico altera su normal desarrollo. Si la dosis de alcohol se suministra en el estadio inmediatamente anterior al comienzo de la migración neuronal, éste proceso se puede ver alterado. Así hemos constatado que algunas células horizontales retrasan su normal patron de migración y en E-14 estan todavía migrando (fig. 5f y 5g, flechas), cuando lo normal es que en E-11 ya lo hubieran finalizado. Retraso y alteraciones del normal proceso de migración por el efecto del alcohol, también han sido observados en los granos del cerebelo (Quesada y col., 1990) y en la corteza del cerebro (Miller, 1986). La otra población de interneuronas de la retina también han sido estudiadas y hemos

comprobado que el mayor número de picnosis se produce en células amacrinas localizadas en la capa nuclear interna. En los últimos años, numerosos trabajos han prestado atención a los mecanismos de unión del alcohol con los receptores GABA (Soldo y col., 1994). Gracias a estos estudios, hoy sabemos que el alcohol se une a algunas subunidades de los receptores GABA-A. Este hecho explica porqué en los pollos tratados con alcohol, la expresión de GABA en la población de células amacrinas colinérgicas está ausente. En este caso el alcohol podría jugar un papel similar al que realizan algunas sustancias inhibitoras de los receptores GABA-A como la bicuculina.

El resto de las alteraciones que produce el alcohol, en nuestro estudio se han detectado sobre las células derivadas del mesodermo. Así, la utilización de un antígeno monoclonal que específicamente se une a un epítipo de una proteína localizada en los filamentos intermedios de las células (Prada y col., 1995) nos da una idea aproximada del efecto que el alcohol tiene sobre el citoesqueleto celular. Como hemos demostrado en los resultados, el alcohol disminuye el patrón de expresión inmunológico de la proteína reconocida por el 3CB2. Este hecho puede significar dos cosas: que el alcohol interfiera con algún mecanismo sobre la síntesis de esta proteína o acelere su degradación, o que el alcohol modifique la zona de unión del anticuerpo sobre el epítipo y por ello, el anticuerpo no es capaz de reconocerlo. Nosotros nos inclinamos por la primera de las posibilidades, pues existen argumentos consistentes con este criterio. Así, se ha sugerido que el alcohol produce una disminución de la síntesis proteica (Henderson y col., 1982). Por otro

lado, se ha comprobado en estudios experimentales realizados con cultivos celulares, que el alcohol produce cambios morfológicos que afectan a la estructura y organización de los microtúbulos y microfilamentos. Estas comprobaciones se han realizado en células de la cresta neural, usando anticuerpo monoclonales contra tubulina y actina (Hassler y Morán, 1986 b). Un estudio reciente también sugiere que el alcohol altera la migración de las células de la cresta neural y provoca malformaciones cardíacas (Ravassio y Battiato, 1995). Por otro lado, muchas de las malformaciones y alteraciones que el etanol produce sobre el tubo neural, los fibroblastos, las células del dermatomiotomo, las células del miocardio y las células de la pared muscular del intestino y capas serosas, podrían encontrar soporte teratógeno en el efecto que el alcohol produce sobre el citoesqueleto de estas células durante el desarrollo. Las malformaciones experimentales que hemos obtenido en nuestro estudio y que acabamos de citar, son concordantes con los hallazgos clínicos que se han descrito sobre el SAF. Nuestro trabajo representa el primer estudio experimental in vivo que analiza el efecto del alcohol sobre los derivados celulares del ectomesénquima y del mesodermo (somitos y corazón).

CONCLUSIONES

1. Experimentalmente hemos demostrado que el alcohol interfiere la migración de las interneuronas y altera el recorrido de los axones de las neuronas de proyección.
2. Produce un gran daño y muerte celular sobre las neuronas ganglionares de la retina, lo que condiciona una hipoplasia o atrofia del nervio óptico.
3. Las preparaciones de inmunohistoquímica donde utilizamos un anticuerpo monoclonal antiGABA como marcador celular, nos permiten poder afirmar que el alcohol produce:
 - un retraso en el proceso de migración de las células horizontales.
 - inhibe la expresión GABA en la capa de células amacrinias.
4. Interfiere en el normal desarrollo del citoesqueleto celular al alterar la expresión de una proteína asociada a filamentos intermedios del citoesqueleto celular, haciendo que ésta llegue a desaparecer en muchos órganos afectados.
5. Esta proteína en condiciones normales está presente en: los axones de algunas neuronas, las células macrogliales, los fibroblastos, células miocárdicas y células de dermatomiotomo. Por lo tanto deducimos del efecto sobre esta proteína, que el citoesqueleto celular es sensible al alcohol. Este hallazgo es de gran importancia para correlacionar muchas alteraciones experimentales con las malformaciones descritas en el SAF.

6. Cuando el alcohol actúa al inicio del desarrollo de la vesícula óptica, impide que se forme el tejido ectoblástico que recubre el polo anterior del futuro ojo. Este hecho desencadena una serie de mecanismos que bloquean la formación de la cavidad vítrea y el cristalino se desarrolla deforme y pegado a la retina, en el fondo de la cavidad ocular, y podría producir también una atrofia del nervio óptico.

7. La cavidad vítrea se convierte en una cavidad virtual, y el espacio existente en el interior de la vesícula óptica es ocupado por células del ectomesénquima que en este estadio constituyen las estructuras faciales.

8. El alcohol produce sobre el tubo neural un retraso en el cierre del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abel, E.L., Jacobson, S. and Sherwin, B.T. "In utero alcohol exposure produced functional and structural damage". *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5, 363-366, 1983.
2. Abel, E.L. and Sokol, R.J. "Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS-related anomalies". *Drug Alcohol Dependence*, 19: 51-70, 1987.
3. Abraham, W.C. and Hunter, B.E. "An electrophysiological analysis of chronic ethanol neurotoxicity in the dentate gyrus: distribution of eutorbinal afferents". *Exp. Brain Res.*, 47: 61-68, 1982.
4. Bannigan, G. and Cottell, D. "Ethanol teratogenicity in mice: an electron microscope study". *Teratology*, 30: 283-290, 1984.
5. Barnes, D.E. and Walker, S.W. "Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus". *Develop. Brain Res.*, 1: 330, 1981.
6. Begleiter, H. "Brain dysfunction and alcoholism: problems and prospects. Alcoholism". *Clin. Exp. Res.*, 5: 264-2266, 1981.
7. Berry, M. "Regeneration in the central nervous system". In: Recent advances in neuropathology. W.T. Smith and J.B. Cavanagh, eds. *Churchill Livingstone, Edinburgh*, 67-11, 1979.
8. Bond, N.W. "Behavioural teratology: fetal alcohol exposure and hyperactivity". In: N.W. Bond, Ed., *Animal models of psychopathology. Sidney and New York: Academic Press*, 279-311, 1984.
9. Bond, N.W. "Fetal alcohol exposure and hyperactivity in rats: the role of the neurotransmitter systems involved in arousal and inhibition". In: J.R. West, ed.,

- Alcohol and brain developmten. *New York: Oxford Universtiy Press*, 45-66, 1986.
10. Brown, N.A., Goulding, E.H. and Fabro, S. "Ethanol embryotoxicity: Direct effects on mamalian embryos in vitro". *Science*, 206: 573, 1979.
 11. Burns, E.M., Druckeberg, T.W., Stibler, H., Gerver, E. and Borg, S. "The effects of ethanol exposure during the brain growth spurt in rats". *Teratology*, 29: 251-258, 1984.
 12. Clarren, S.K. and Smith, D.W. "The fetal alcohol syndorme" *N. Engl. J.M.*, 298: 1063-1067, 1978 a.
 13. Clarren, S.K.; Alvord E.C.; Sumi, M.; Streissguth, A.P. and Smith, D.M. "Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol". *J. Pedriatr.*, 92: 64-67, 1978 b.
 14. Cmielewski, C.E., Hernandez, L.M., Quesada, A., Pozas, J.A. Picabez, L. and Prada, F.A. "Effects of alcohol on the inner layers of chick retina during development". En prensa.
 15. Davies, K.L. and Smith, D.E. "A Golgi study of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurrons following perinatal ethanol exposure". *Neurosci. Lett.*, 26: 49-54, 1981.
 16. Dewy, S.L. and West, J.R. "Evidence for altered lesion-induced sprouting in the dentate gyrus of adult rats exposed to ethanol in utero". *Alcohol*, 1: 81-88, 1984.
 17. Dobbing, J. "The later development of the brain and its vulnerability". In: Davis, J.A. and J. Dobbing, Ed. *Scientific foundation of pediatrics*. London. *Heinemann and Philadelphia: Saunders*, 565-577, 1974.

18. Dobbing, J. "Vulnerable periods in brain growth and somatic growth". In: Roberts, D.F. and Tompson, A.M. Ed.: *The biology of human fetal growth. London; Taylor and Francis Press, 137-194, 1976.*
19. Dow, K.E. and Riopelle, R.J. "Ethanol toxicity: effects on neurite formation and neurotrophic factor production in vitro". *Science*, 228: 591-593, 1982.
20. Enhart, C.B., Sokol, R.J, Martier, S., Moron, P., Nadler, D., Ager, J.W. and Wolf, A. "Alcohol teratogenicity in the human: A detailed assessment of specificity, critical period, and threshold". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 33, 1987.
21. Ewing, J.A. and Rouse, B. "Alcohol as an euphoriant drug: rearching for a neurochemical basis". *Annals New York Academic Sciences.* 273: 159-166, 1976.
22. Hamburger, V. and Hamilton, H.L. "A series of normal stages in the development of the chick embryo". *J. Morphol.*, 88: 48-92, 1951.
23. Hammer, R.P. and Scheibel, A.B. "Morphologic evidence for a delay of neuronal maturation in fetal alcohol exposure". *Exp. Neurol.*, 74: 587-596, 1981.
24. Hammer, R.P. "Alcohol effects developing neuronal structure".. In: West, J.R., Ed. *Alcohol and brain development. New York: Oxford University Press, 204-219, 1986.*
25. Hannigan, J.H. Welch, R.A. and Sokol, R.J. "Recognition of Fetal Alcohol Syndrome (FAS) and alcohol-related birth defects (ARBD). In Mendellson JI, Mello, N. (eds). *Clinical aspects of alcoholism, Vol. III. New York: McGraw Hill, 1992.*
26. Hassler, J.A. and Moran, D.J. "The effects of ethanol on embryonic actin: a

- possible teratogenic factor". *Experientia*, 42: 575-577, 1986 a.
27. Hassler, J.A. and Moran, D.J. "Effects of ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: possible role in teratogenesis". *J. Craniofac. Gen. and Develop. Biol.* (suppl. 2), 129-136, 1986 b.
28. Heaton, M.B., Swason, H.P. and Walker, D.W. "Ethanol exposure affects trophic factor activity and responsiveness in chick embryo". *Alcohol*, 9: 161-166, 1992.
29. Henderson, G.I., Hoyumpa, A.M. and Schenker, S. "Effect of chronic and acute maternal ethanol consumption on fetal growth parameters and protein synthesis in fetal tissues". In Abel, E., Ed. *Fetal Alcohol Syndrome. Vol. III. Animal studies. Boca Raton. FL: CRC Press*, 151-167, 1982.
30. Jarlstedt, J. "Experimental alcoholism in rats: protein synthesis in subcellular fraction from cerebellum, cerebellar cortex and liver after long-term treatment". *J. Neurochem.*, 19: 603-608, 1972.
31. Jones, K.L. and Smith, D.W. "Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy". *Lancet*, 2: 999-1001, 1973.
32. Kaminski, M., Rumeau-Rouquette, C. and Schartz, D. "Consommation d'alcool chez les femmes enceintes et issue de la grossesse". *Rev. Epidemiol. Santé Publique*, 24: 27-40, 1976.
33. Kissin, B. "Biological investigations in alcohol research". *Quart. J. Studies Alcohol*. 40: 146-181, 1979.
34. Larroque, B. "Alcohol and the fetus". *International Journal of Epidemiology*, Vol. 21, N° 4 (suppl.1), 1992.

35. Le Douarin, N.M. "The neural crest". *Cambrikge University Press*, Cambridge, 1982.
36. Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.P. and Menuet, J.C. "Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées. A propos de 127 cas". *Quesst Mmedical*, 25: 476-482, 1968.
37. Leonard, B.E. "Ethanol as a neurotoxin". *Biochem. Pharmacol.*, 36: 2055-2059, 1987.
38. Lieber, C.S. and De Carli, L.M. "Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons". *Fed. Proc.*, 35: 1232, 1976.
39. Lieber, C.S. and Schenker, S. "Effects of alcohol on the brain: clinical features, pathogenesis and treatment". In: *Medical disorders of alcoholism: pathogenesis and treatment V. XXII Major problems in internal Medicine*. Ed.: L.H. Smithe Jr. *Sanders Company, W.B. Philadelphia*, 480-525, 1982.
40. Majeswski, F. "Sintomatología clínica de la embriopatía alcohólica". *Jornadas Internacionales sobre el Síndrome Alcohólico Fetal. Fundación Valgrande. Serie Científica.*, 61: 15, 1985.
41. Means, L., Burnette, M. and Pennington S. "The effecto of embrryonic ethanol exposure on detour learning in the chick". *Alcohol*, 5: 305-308, 1988.
42. Ministerio de Sanidad y Consumo . "Indicadores de Salud". Madrid, 1991.
43. Miller, M.W. "Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neruons". *Science*, 233: 1308-1311, 1986.
44. Murray, H.M., Saland, L.C. and Reys, E. "Golgi and electron microscope studies of sensoorimotor cortex in rats with fetal alcohol syndrome". *Anat. Rec.*, 199:

- 178A, 1981.
45. Neinstein, L.S. y Scott, D.L. "Alcohol". En: Neinstein, L.S.: *Salud del adolescente*. Ed: J.R. Prous Editores. 767-773, 1991.
 46. Neinstein, L.S., Rabinovitz, S. y Schneir, A. "El embarazo en la adolescente". En: Neinstein, L.S.: *Salud del adolescente*. Ed: J.R. Prous Editores. 495-506, 1991.
 47. Nelson, Behrman, R.I. y Vaughan, V.C. "Problemas de salud relacionados con la adolescencia". En: *Tratado de Pediatría.*, 13ª Ed. (1ªed, 1989).
 48. Nobel, E.P. "Alcohol and the fetus, a clinical perspective". *Oxford University Press*, 1983.
 49. Palay, S.L. and Chan Palay, V. "Cerebellar cortex; cytology and organization". *Springer-Verlag*. Berlín, Meiderberg. New York, 1974.
 50. Pinazo-Durán, M.D., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. "Morphometric myelinogenesis on the optic nerve of the wistar rat". *Sr. Ophthalmol.*, 11: 31-34, 1992.
 51. Phillips, S.C. "Alcohol and histology of the developing cerebellum". In: West, J.R., Ed. *Alcohol and brain development*. *New York: Oxford University Press*, 204-219, 1986
 52. Plan Nacional sobre Drogas. "Los problemas de algunos grupos específicos. Actuar es posible". En: *El profesional de atención primaria de Salud ante los problemas derivados del consumo de alcohol.*, 1994.
 53. Prada, F.A., Dorado, M.E., Quesada, A., Prada, C., Schwarz, U. and de la Rosa, E.J. "Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo". *Glia*,

- 15: 389-400, 1995.
54. Puellas, L. and Bendala, C. "Differentiation of neuroblast in the chick optic tectum up to eight days of incubation. A Golgi study". *Neuroscience*, 3: 307-319.
55. Quesada, A., Prada, F.A., Espinar, A. and Génis-Gálvez, J.M. "Effect of ethanol on morphohistogenesis and differentiation of cerebellar granule cells in the chick embryo". *Alcohol*, vol. 7, 419-428, 1990.
56. Rawat, A.K. "Developmental changes in the brain levels of neurotransmitter as influenced by maternal ethanol consumption in the rat". *J. Neurochem.* 28: 1175-1177, 1977.
57. Renau-Piqueras, J.R., Zaragoza P. de Paz, Baguena-Cervellera, R., Megias, L. and Guerri, C. "effects of prolonged ethanol exposure filaments of astrocytes in primary culture: A quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study". *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 229-240, 1989.
58. Richardson, K.C.; Jarett, L. and Finke, E.H. "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy". *Stain Technol.*, 35: 313-323, 1960.
59. Riley, E.P., Barron, S. and Hannigan, J.H. "Response inhibition deficits following prenatal alcohol exposure: a comparison to the effects of hippocampal lesions in rats". In: J.R. West, ed., *Alcohol and brain development*. New York: Oxford University Press, 45-66, 1986.
60. Rosett, H.L. "A clinical perspective of the Fetal Alcohol Syndrome". *Alc. Clin. Exp. Res.*, 4: 119, 1980.
61. Rosett, H.L., Weiner, L. Lee, A., Zuckerman, B., Dooling, E. and Oppenheimer E. "Patterns of alcohol consumption and fetal development". *Obstet.*

- Gynecol.*,61:539, 1983.
62. Rovasio, R.A. and Battiato, N.L. "Role of early migratory neural crest cells in developmental anomalies induced by ethanol". *Int. J. Dv. Biol.*, 39: 421-422, 1995.
 63. Saez, R., Burgal, M., Renau-Piqueras, J., Marqués, . and Guerri, C. "Evolution of several cytoskeletal proteins of astrocytes in primary cculture: effect of prenatal alcohol exposure". *Neurochem. Res.*, 737-747, 1991.
 64. Samson, H. "Microcephaly and Fetal Alcohol Syndrome: human and animal studies". In: West, J.R., Ed. Alcohol and brain development. *New York: Oxford University Press*, 167-179, 1986.
 65. Shepard, T.H. "Catalogue of teratogenic agents" 3rd. Ed. Maryland: Johns Hopkins University Press., 1980.
 66. Sokol, R.J. and Clarren, S.K. "Guidelines for use of temminology describing the impact of prenatal alcohol on the offspring". *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 4: 579-598, 1989.
 67. Soldo, B.L., Proctor, W.R. and Dunwiddie, T.V. "Etahol differentially modulates GABA-A receptor-mediated chloride currents in hippocampal, cortical and septal neurons in rat brain sllices". *Synapse*, 18: 94-103, 1994.
 68. Spurr, A.R. "A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy". *J. Ultraestruct. Res.*, 26: 31-43.
 69. Stensaas, L. "The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of cerebral hemisphere in fetal rabbits". *J. Commp. Neurol.*, 129, 59, 1967.
 70. Steissguth, A.P. "The behavioural teratology of alcohol: performance,

- behavioural, and intellectual deficits in prenatally exposed children". In: J.R. West, ed., *Alcohol and brain development*. New York: Oxford University Press, 3-39, 1986.
71. Strömmland, K. and Pinazo-Durán, M.D. "Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy". *Teratology*, 50: 100-111, 1994.
72. Sulik, K.; Johnston, M and Webb, M. "Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model". *Science*, 214: 936-938, 1981.
73. Sulik, K. "Critical periods for alcohol teratogenesis in mice, with special reference to the gastrulation stage of embryogenesis/discussion". Mechanism of alcohol damage in utero. *Ciba Foundation Symposium*, 105: 139, 1984.
74. Vallés, S., Lindo, L., Montilin, C., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. "Prenatal exposure to ethanol induces changes in the nerve growth factor and its receptor in proliferating astrocytes in primary culture". *Brain Res.*, 656: 281-286, 1994.
75. Webster, W.S., Walsh, D.A., Mc. Ewen, S.E. and Lipson, A.H. "Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57/B/6J mice: implications for the study of the Fetal Alcohol Syndrome". *Teratology*, 27: 231, 1983.
76. West, J.R. "Alcohol and brain development". New York: Oxford University Press, 1986.
77. West, J.R., Hodges, C.A. and Black, A.C. "Prenatal exposure to ethanol alters the origin of hippocampal mossy fibers in rats". *Science*, 211: 957-959, 1981.
78. Wricht, J.T., Waterson, E.J. and Barrison, I.C. "Alcohol consumption pregnancy

and low birtaweight". *Lancet*, 6663-665, 1983.

79. Zajac, C.S. and Abel, E.L. "Animal models of prenatal alcohol exposure".

Interrnat. J. Epidem., 21, 4 (supl. 1): 24-32, 1992.

Elaborado por

Elaborado en el mes de

Filiberto Ramirez Guzmán

"Análisis experimental de los efectos estructurales del alcohol durante el desarrollo inicial del embrión de pollo. Estudio comparativo con el Síndrome alcohólico fetal apto con banda"


27

JUNIO

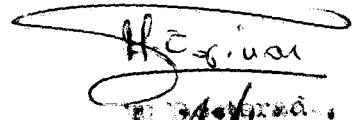
96

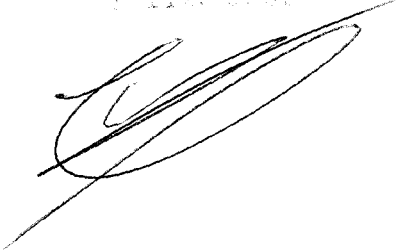
El Vocal

El Vocal









A. Fabian

