

32.194

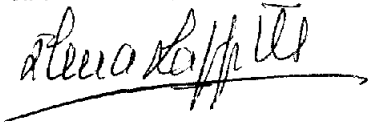
A/126

T.D.
A/126

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
REGISTRADO EN SEVILLA

Queda registrada en el Registro de Doctoral al
folio 4 del tomo 73 del libro
correspondiente.
Sevilla, **03 AGO. 2000**

El Jefe del Registro.


Papel Protector del Escualeno del Aceite de Oliva frente a los efectos teratogénicos producidos por el Etanol en el desarrollo de la Retina del Embrión de Pollo

Dña. Yolanda Aguilera García
Sevilla 2000

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



Tesis doctoral

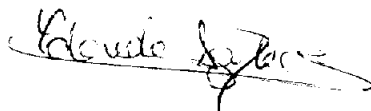
***PAPEL PROTECTOR DEL ESCUALENO DEL ACEITE
DE OLIVA FRENTE A LOS EFECTOS
TERATOGENICOS PRODUCIDOS POR EL ETANOL
EN EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL EMBRIÓN
DE POLLO***

**Trabajo que para optar al grado de Doctora en Ciencias
Biológicas presenta la Licenciada Dña. Yolanda Aguilera García.**



Sevilla, 2000

**“PAPEL PROTECTOR DEL ESCUALENO DEL ACEITE DE OLIVA
FRENTE A LOS EFECTOS TERATOGÉNICOS PRODUCIDOS POR EL
ETANOL EN EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL EMBRIÓN DE
POLLO”**

Trabajo presentado por la Licenciada Dña. Yolanda Aguilera García para optar al grado de Doctora por el programa de doctorado “Nuevas Perspectivas en Morfología” del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla



Fdo: Yolanda Aguilera García



DEPTO. CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Fdo: Juan Jiménez-Castellanos Ballesteros
Catedrático de Anatomía y Director del
Departamento de Ciencias Morfológicas
Universidad de Sevilla

Dña. VALENTINA RUIZ GUTIÉRREZ, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de la Grasa, y D. MANUEL E. DORADO OCAÑA, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla

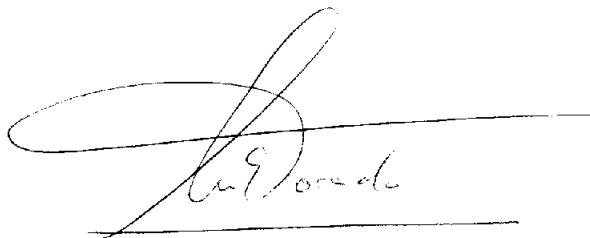
CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: *“PAPEL PROTECTOR DEL ESCUALENO DEL ACEITE DE OLIVA FRENTE A LOS EFECTOS TERATOGENICOS PRODUCIDOS POR EL ETANOL EN EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL EMBRIÓN DE POLLO”*, realizado por YOLANDA AGUILERA GARCIA, ha sido realizado en los laboratorios del Instituto de Biología del Desarrollo, en los laboratorios del Grupo de Nutrición y Metabolismo Lipídico del Instituto de la Grasa de Sevilla (CSIC) y en el Departamento de Ciencias Morfológicas, bajo nuestra dirección.

En Sevilla, a 11 Julio de 2000



Fdo: Dra. Valentina Ruiz-Gutiérrez



Fdo: Dr. Manuel Eugenio Dorado
Ocaña

A mis padres

A Juan

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas, que de alguna manera han ayudado en este trabajo:

A mis directores, la Dra. Valentina Ruiz-Gutiérrez y el Dr. Manuel E. Dorado Ocaña, por su interés, dirección y consejos durante la realización de la tesis.

Al Dr. Francisco A. Prada Elena, director del Departamento de Ciencias Morfológicas cuando se realizó la mayor parte de esta tesis, por su orientación y asesoramiento y por el interés que ha mostrado por mí. Al Dr. Juan Jiménez-Castellanos, actual director del Departamento, por todas las facilidades en la finalización de esta tesis.

A la Dra. Adela Quesada, directora del Instituto de Biología del Desarrollo y al Dr. José Angel Armengol, director del Instituto cuando se inició este trabajo, por haberme permitido realizarlo.

A los profesores del Departamento de Ciencias Morfológicas, quienes nunca me negaron su colaboración.

A Juan J. Martínez Quesada, tanto por su apoyo moral y entusiasta, como por su crítica siempre constructiva sobre este trabajo, así como por el asesoramiento informático y estadístico, por las largas horas de discusión; por haber sido un compañero excelente, desde los comienzos cuando me animó para realizar este trabajo, hasta su finalización y por haberme dado ánimos cuando más lo necesitaba.

A Carmen Guzmán, por su asesoramiento técnico, e Inma Polo, por todos esos viajes que realizó por mi culpa. A Ana Mosquero, por su ayuda en

la realización de las fotografías y por su gran profesionalidad. A Nati y Natalia, por su ayuda en el trámite de la tesis y por su paciencia.

A la Dra. Rocío Abia, a Fernanda Leone, Javier Sánchez y Yolanda Pacheco, por sus enseñanzas, dedicación, afecto y todo su tiempo robado.

Al Dr. Marcelino Bilbao, por el asesoramiento estadístico de los resultados.

Al personal de la Hemeroteca de la Facultad de Medicina, auténticos profesionales, que a veces parecían obrar milagros, y al personal de la Biblioteca del Instituto de la Grasa, por su interés y colaboración.

Y, en general, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me prestaron su ayuda de manera desinteresada.

INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Estructura e histogénesis de la retina	11
2.1.1. La retina del pollo	11
2.1.1.1. Tipología celular en adultos	16
2.1.1.1.1. Células fotorreceptoras	16
2.1.1.1.2. Células horizontales	17
2.1.1.1.3. Células bipolares	19
2.1.1.1.4. Células amacrinas	20
2.1.1.1.5. Células ganglionares	21
2.1.1.1.6. Células de Müller	23
2.1.2. Histogénesis de la retina del pollo	24
2.1.2.1. Ciclo mitótico	25
2.1.2.2. Cronología en el nacimiento de células retinianas	32
2.1.2.2.1. Células ganglionares	32
2.1.2.2.2. Células fotorreceptoras	32
2.1.2.2.3. Células horizontales y amacrinas	34
2.1.2.2.4. Células bipolares	37
2.1.2.2.5. Células de Müller	38
2.1.2.3. Sinaptogénesis	39
2.2. Composición lipídica de la retina	40
2.2.1. Lípidos en la retina adulta	41
2.2.1.1. Lípidos neutros	42
2.2.1.2. Lípidos polares	44
2.2.1.3. Ácidos grasos	46
2.2.2. Lípidos en la retina embrionaria	53
2.2.2.1. Lípidos neutros	53
2.2.2.2. Lípidos polares	54

2.2.2.3. Ácidos grasos	55
2.3. Efectos del etanol sobre la histogénesis de la retina	57
2.4. Componentes minoritarios del aceite de oliva: escualeno	70
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	78
4. MATERIAL Y MÉTODOS	82
4.1. Preparación y tratamiento de los embriones "in ovo"	83
4.2. Determinación de lípidos	85
4.2.1. Extracción de retinas	85
4.2.2. Extracción y separación de lípidos	85
4.2.2.1. Análisis de ácidos grasos	87
4.2.3. Tratamiento estadístico de los resultados	91
4.3. Estudio al microscopio óptico	91
4.3.1. Estudio de semífinos	91
4.3.2. Preparación de células disociadas	93
4.3.3. Estudio inmunohistoquímico	95
5. RESULTADOS	97
5.1. Estudio de la composición lipídica de la retina en el embrión de pollo en grupos control, grupos tratados con alcohol y grupos tratados con alcohol + escualeno	99
5.1.1. Análisis de los lípidos totales	99
5.1.2. Principales clases de fosfolípidos	108
5.1.3. Composición en ácidos grasos de los lípidos totales	118
5.2. Estudio estructural e inmunohistoquímico de los efectos que produce el alcohol y el alcohol + escualeno en la retina del pollo	128
5.2.1. Estudio estructural	128
5.2.2. Estudio inmunohistoquímico	130

6. DISCUSIÓN	136
7. CONCLUSIONES	154
8. BIBLIOGRAFÍA	158

NOMENCLATURA DE ÁCIDOS GRASOS

Además de la nomenclatura sistemática y de los nombres triviales, habitualmente los ácidos grasos son denominados según la nomenclatura abreviada. La notación genérica de un ácido graso, según esta nomenclatura es A : B (n-x), donde:

- A es el número de átomos de carbono de la molécula
- B es el número de dobles enlaces presentes en la molécula
- X es el número de átomos de carbono entre el extremo opuesto al grupo carboxilo y el primer doble enlace de la molécula.

En la siguiente tabla se recogen los nombres sistemáticos, triviales y abreviados de los ácidos grasos nombrados en el presente trabajo.

Nombre sistemático	Nombre vulgar	Nombre abreviado
Tetradecanoico	Mirístico	14:0
Hexadecanoico	Palmítico	16:0
(Z)-9-Hexadecenoico	Palmitoleico	16:1(n-7)
(Z)-11-Hexadecenoico	—	16:1(n-5)
Todo-(Z)-4,7,10,13-Hexadecatetraenoico	—	16:4(n-3)
Octadecanoico	Esteárico	18:0
(Z)-9-Octadecenoico	Oleico	18:1(n-9)
Trans-7-Octadecenoico	Elaídico	18:1(n-9)t
(Z)-11-Octadecenoico	cis-Vaccénico o Ascléptico	18:1(n-7)
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoico	Linoleico	18:2(n-6)
Todo-(Z)-6,9,12-Octadecatrienoico	γ -Linolénico	18:3(n-6)
Todo-(Z)-9,12,15-Octadecatrienoico	α -Linolénico	18:3(n-3)
Eicosanoico	Araquídico	20:0
(Z)-11-Eicosenoico	Gadoleico	20:1(n-9)
(Z)-13-Eicosenoico	—	20:1(n-7)
Todo-(Z)-5,8,11-Eicosatrienoico	—	20:3(n-9)
Todo-(Z)-8,11,14-Eicosatrienoico	di-homo- γ -Linolénico	20:3(n-6)
Todo-(Z)-5,8,11,14-Eicosatetraenoico	Araquidónico	20:4(n-6)
Docosanoico	Behénico	22:0
Todo-(Z)-10,13,16-Docosatrienoico	—	22:3(n-6)
Todo-(Z)-7,10,13,16-Docosatetraenoico	Clupandónico	22:4(n-6)
Todo-(Z)-4,7,10,13,16-Docosapentaenoico	—	22:5(n-6)
Todo-(Z)-7,10,13,16,19-Docosapentaenoico	—	22:5(n-3)
Todo-(Z)-1,4,7,10,13,16-Docosahexaenoico	—	22:6(n-6)
Todo-(Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico	—	22:6(n-3)
Todo-(Z)-9,12,15,18,21-Tetracosapentaenoico	Lignocérico	24:5(n-3)
Todo-(Z)-6,9,12,15,18,21-Tetracosahexaenoico	—	24:6(n-3)

1.- RESUMEN

El escualeno, principal hidrocarburo del aceite de oliva, posee una actividad promotora antitumor (Murakoshi y col., 1992; Katdare y col., 1997) y potencia los efectos de diversos agentes anticancerígenos (Yamaguchi y col., 1985; Ikikawa y col., 1986; y, Ohkima y col., 1983); inhibe la actividad HMG-CoA reductasa e incrementa la actividad de la ACAT (Strandberg y col., 1989) y parece ser un eficaz captador de oxígeno libre en la peroxidación lipídica (Kohno y col., 1995).

En el presente trabajo se ha estudiado el papel del escualeno frente a los daños ocasionados por el alcohol en el desarrollo de la retina del embrión de pollo.

En primer lugar, se ha analizado la composición lipídica de la retina de pollos en desarrollo para determinar que cambios, si había alguno, ocurrían en los niveles relativos de lípidos totales, principales clases de fosfolípidos y ácidos grasos de embriones de pollo control, embriones tratados con alcohol y embriones tratados alcohol + escualeno. Los embriones de pollo fueron inyectados al 6º día de desarrollo (E6) y sacrificados en E7, E11, E15 y E18. Los lípidos totales y fosfolípidos fueron analizados por medio de la técnica de latroscan TLC/FID y los ácidos grasos, mediante cromatografía de gases.

En segundo lugar, se ha realizado un estudio morfológico para comprobar si esos cambios observados en la composición lipídica de la retina se manifestaban a nivel morfológico. Para ello los embriones de pollo fueron tratados en E6 y sacrificados en E7 y E11 (para el estudio de semifinos) y en E19 (para el estudio inmunohistoquímico).

A nivel lipídico, una comparación entre los distintos grupos de trabajo reveló que el alcohol producía alteraciones en los lípidos totales, en las principales clases de fosfolípidos y en los ácidos grasos, que se regeneraban a partir del 18º día de incubación (E18), salvo en el caso de los ácidos grasos donde la recuperación es anterior. En los embriones tratados con alcohol+escualeno, esta regeneración era mucho más rápida, asemejándose los resultados a los embriones control en estadíos más tempranos.

A nivel morfológico, el alcohol provoca alteraciones evidentes en las retinas de los embriones de pollo; así podemos observar: un aumento de los espacios intercelulares en todas las capas de la misma, picnosis en la capa nuclear interna y capa de células ganglionares y pérdida de celularidad, retraso en la migración celular, sobre todo a nivel de ganglionares y amacrinas, pérdida de verticalidad celular y pérdida de inmunorreactividad para MOSP y glutamina sintetasa. En embriones tratados con alcohol + escualeno existe una enorme recuperación, pareciéndose morfológicamente a los embriones control.

Nuestros resultados sugieren que el escualeno podría proporcionar una protección contra el daño que provoca el alcohol.

2.-INTRODUCCIÓN

2.1. ESTRUCTURA E HISTOGÉNESIS DE LA RETINA

2.1.1. LA RETINA DEL POLLO

La principal y más importante aportación al conocimiento de la retina de las aves, fue realizada por Ramón y Cajal (1893) en su obra "La retina de los vertebrados". Utilizando fundamentalmente el método de tinción de Golgi, Ramón y Cajal analizó la retina del pollo y realizó una clasificación morfológica de los componentes retinianos, tanto neurales como gliales. Sus trabajos tienen plena vigencia y son escasos los datos morfológicos que escaparon a su estudio.

La retina de los vertebrados y, por tanto la del pollo, se encuentra constituida por seis elementos derivados del primitivo neuroepitelio, entre los que se pueden distinguir un elemento transductor, encargado de transformar la energía lumínica en eléctrica, representado por los fotorreceptores. Elementos de unión, nutrición y sostén que son las células gliales. Los restantes constituyentes de la retina son las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares, que refuerzan las débiles ondas generadas en los conos y bastones y las transmiten, conducen y encauzan hasta los centros o estaciones secundarias del encéfalo (Fliesler y Anderson, 1983a).

La citoarquitectura retiniana del pollo se encuentra organizada en tres capas nucleares entre las que se disponen dos capas sinápticas, denominadas capas plexiformes por su naturaleza fibrilar. (Figura 1).

La capa nuclear externa está formada por los cuerpos de las células fotorreceptoras (conos y bastones), mientras que la capa nuclear interna se encuentra ocupada por los cuerpos de las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares desplazadas o de Dogiel; la tercera capa nuclear es aún más interna y la constituyen los cuerpos de las células ganglionares.

La capa plexiforme externa, situada entre las capas nuclear externa e interna, recibe los terminales presinápticos de los fotorreceptores y las dendritas de las células horizontales y bipolares, así como los terminales axónicos de las

horizontales; en la capa plexiforme interna, ubicada entre la capa nuclear interna y la de células ganglionares, sinaptan las dendritas de estas células con los terminales de las células bipolares, así como las expansiones de las células amacrinas. Por último, la capa de fibras del nervio óptico está formada por los axones de todas las células ganglionares y ganglionares desplazadas que están orientados hacia la salida del nervio óptico.

Las células neurogliales retinianas en el pollo están representadas por dos especies de elementos: las células de Müller, que cruzan perpendicularmente el órgano desde la superficie anterior hasta la capa basal externa; y las células neuróglicas o astrocitos. En las retinas vasculares de otras especies, principalmente de mamíferos, se encuentran todos los tipos de células gliales: microglía, astrogía y oligodendrogía.

Esta citoarquitectura se complementa con dos membranas limitantes, externa e interna. La membrana limitante externa aparece al microscopio electrónico como una línea densa formada por uniones desmosómicas de las prolongaciones externas de las células de Müller con las mazas de Landolt de las células bipolares y los segmentos internos de los fotorreceptores, mientras que la membrana limitante interna está formada a partir de los pies de las prolongaciones descendentes de las células de Muller, sin mostrar uniones especializadas (Prada y col., 1989a).

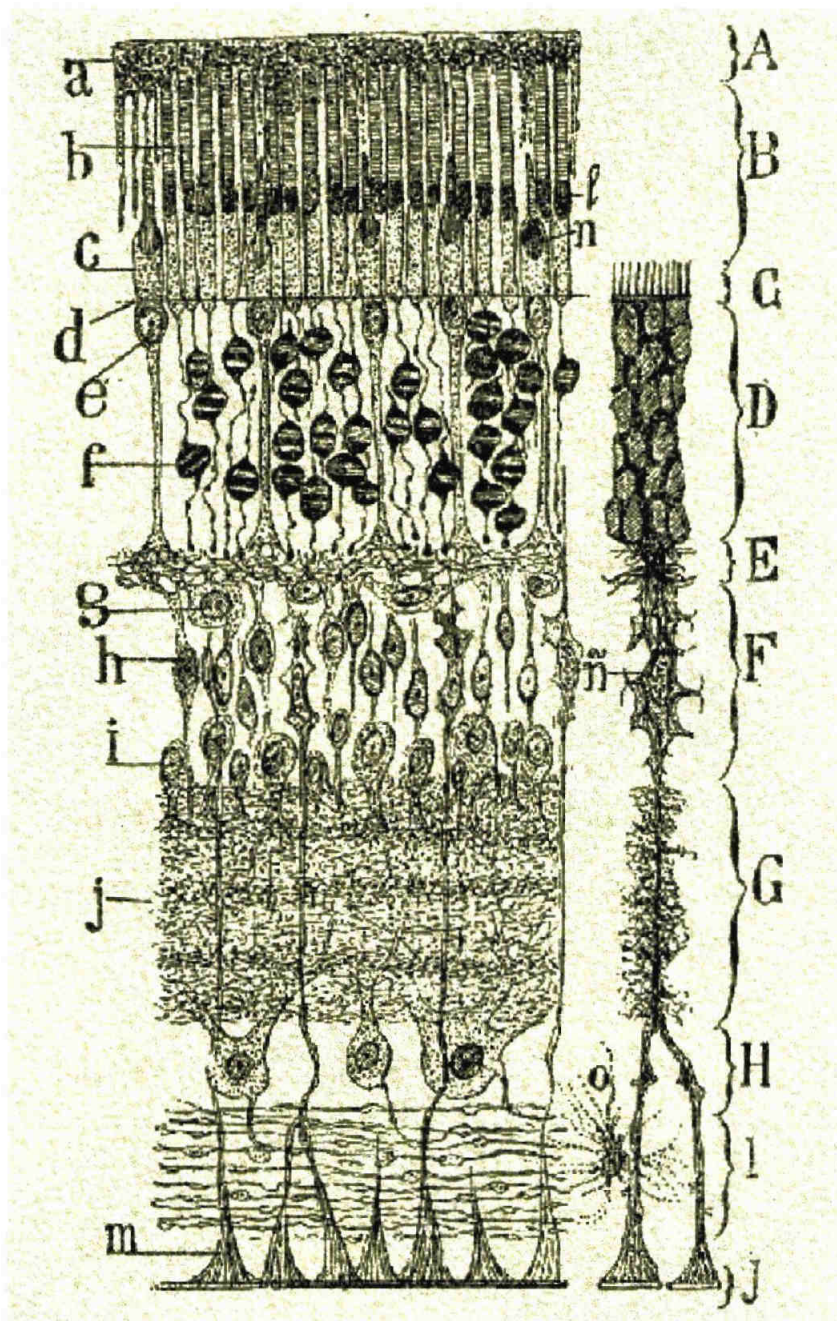


Figura 1. Sección vertical de retina. A, capa pigmentaria; B, de los bastones y conos; C, limitante externa; D, nuclear externa; E, plexiforme externa; F, nuclear interna; G, plexiforme interna; H, de las células ganglionares; I, de las fibras del nervio óptico; J, capa limitante interna; a, células pigmentarias; b, segmento externo de un bastón; c, cono; d, limitante externa; e, núcleo del cuerpo del cono; f, núcleo del cuerpo del bastón; g, célula horizontal; h, célula bipolar; i, célula amacrina; j, pisos de la plexiforme interna; m, cono terminal de una célula de Müller; o, célula de neuroglía; ñ, núcleo de la célula de Müller. A la derecha se ve una célula de Müller. Adaptado de Ramón y Cajal (1893), *La retina de vertebrés*.

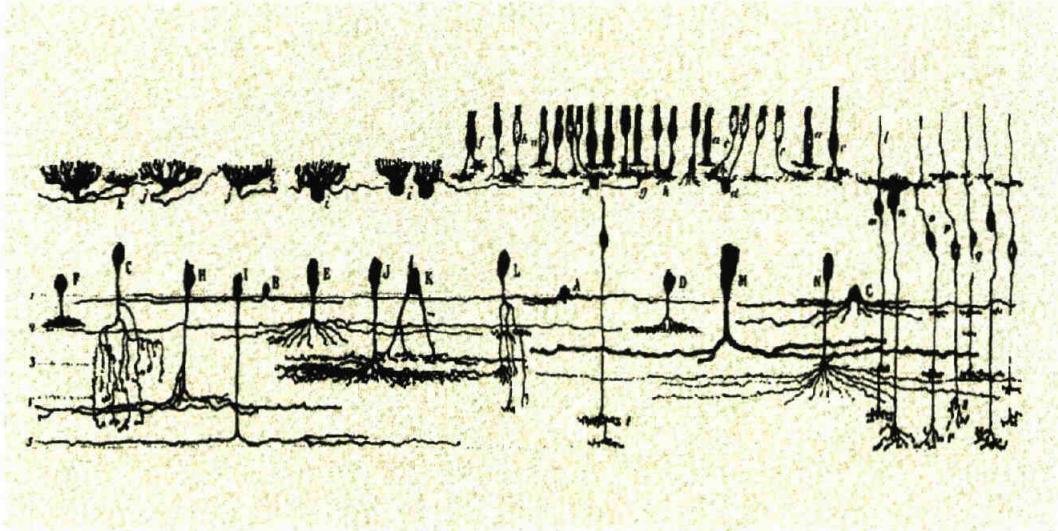


Figura 2. Neuronas de la retina de pollo. (a), bastón; (b), cono recto; (c), cono oblicuo; (d), cono cuyos pedículos se extienden bajo la capa plexiforme; (e),(f), conos dobles; (g), arborización terminal de un axón procedente de una célula horizontal “en brocha”; (h), conos con el filamento basal descendiendo en haces; (i) célula horizontal “en brocha”; (j), célula horizontal “estrellada”; (k), arborización terminal de un axón procedente de una célula horizontal “en brocha”; (l), maza de Landolt; (n), bipolar mayor o externa; (o),(p),(q), bipolares internas o delgadas; (s), arborización terminal de células bipolares; (t), arborización extendiéndose en dos planos opuestos; (A), células amacrinas pequeñas del primer nivel; (B), una célula más pequeña del mismo tipo; (C), otra célula amacrina mayor; (D),(F), célula amacrina con las dendritas empaquetadas estrechamente en el segundo nivel; (E), células amacrinas con dendritas extendiéndose en el segundo nivel; (G),(L), células amacrinas difusas. Los números indican los niveles de la capa plexiforme; (H),(N), células amacrinas del cuarto nivel; (I), células amacrinas con las dendritas extendiéndose en el quinto nivel; (J),(K), células amacrinas con dendritas sinuosas en el tercer nivel; (M), células amacrinas gigantes del tercer nivel. Dibujado a partir de Ramón y Cajal (1893), *La rétine de vertebrés*.

2.1.1.1. Tipología celular en adultos

Véase figura 2.

2.1.1.1.1. Células fotorreceptoras

Las células visuales o fotorreceptores de los vertebrados se han dividido en dos tipos morfológicos bien definidos (Ramón y Cajal, 1893):

A) Bastones: localizan su núcleo en el estrato más interno de la capa nuclear externa. Sus procesos ascendente y descendente, parten de cada uno de los polos del perikario, siendo ambos bastante gruesos. El proceso ascendente se remonta hasta la limitante externa, encima de la cual se engruesa para formar el bastoncito, y el proceso descendente baja hasta la capa plexiforme externa y finaliza en una superficie aplanada, de la que emergen en sus bordes finos filamentos laterales, que se distribuye por el estrato más externo de la capa plexiforme externa.

B) Conos; se distinguen tres tipos de conos:

- Conos rectos: se localizan, en el pollo, inmediatamente por debajo de la membrana limitante externa, tienen forma ovoidea y poseen un apéndice descendente que termina en el estrato medio de la capa plexiforme externa, en un engrosamiento cuya base se adorna con filamentos horizontales que ocasionalmente regresan hacia arriba.

- Conos oblicuos: se caracterizan por que su apéndice descendente se inclina más y más durante su trayecto, de tal manera, que al alcanzar la capa plexiforme externa están casi en disposición horizontal y vienen a terminar en el

estrato más interno de esta capa, en un engrosamiento del que surgen numerosas ramas que terminan en forma de pequeños botones. Ramón y Cajal (1893) describe también otros conos cuyos engrosamientos terminan en el otro estrato de la capa plexiforme externa y es curioso el hecho de que los filamentos basilares de estos conos asciendan y se distribuyan en el mismo estrato que los procedentes de otros conos.

- Conos dobles: son, a pesar de estar unidos, dos células individuales, el mayor presenta indentación en la que el más pequeño está parcialmente alojado; sus apéndices descendentes son de distinta longitud, llegando el procedente del cono más grande a alcanzar el estrato inferior de la capa plexiforme externa y el procedente del menor, solo alcanza el estrato superior o medio de esta capa; ambos terminan en un engrosamiento del que parten cortas y finas prolongaciones que se distribuyen en los correspondientes estratos de la capa plexiforme externa.

2.1.1.1.2. Células horizontales

De acuerdo con su descripción general de la retina de los vertebrados, Ramón y Cajal (1893; 1933) consideró que en las aves existían dos tipos de células horizontales:

A) Células "en brocha": poseen expansiones protoplásmicas cortas y abundantes que alcanzan la porción más alta de la capa plexiforme externa. Su axón se extiende horizontalmente, por debajo de la capa plexiforme, terminando por una arborización espesa y aplastada cuyas ramillas ofrecen un aspecto de

espinas divergentes. Estas células se corresponden con las células horizontales internas de otros vertebrados.

B) Células "estrelladas": elementos aplastados provistos de prolongaciones menos apretadas y más largas que terminan libremente en la porción más superficial de la capa plexiforme externa. El axón, primero grueso y descendente, se hace enseguida horizontal y se adelgaza progresivamente recorriendo una gran extensión por debajo de la capa mencionada. Estas células corresponderían a las horizontales externas de otros vertebrados.

Gallego (1978) describe tres tipos de células horizontales en los falcónidos:

A) Tipo I: células de axón corto que coincide con la célula en brocha de Ramón y Cajal (1893) y de Marianii y Leure du Préé (1977).

B) Tipo II: célula con el perikario situado más escleralmente. Sus dendritas se originan generalmente de tres o cuatro expansiones primarias y suelen ser cortas, finas y poco numerosas; los botones sinápticos finalizan en el estrato intermedio de la capa plexiforme externa, en contacto con los conos rectos. Esta célula coincide con la célula tipo II de Mariani y Leure du Préé (1977) aunque estos autores, describen las terminales del árbol dendrítico en el estrato interno de la capa plexiforme externa, sinaptando con los conos situados a este nivel.

C) Tipo III: se trata de una célula con el soma redondeado del que parten de cinco a siete expansiones dendríticas orientadas en diferentes direcciones,

dándole a la célula un aspecto bipeinado. La longitud de tales procesos es del orden de 50 a 60 micras, distribuyéndose por un área de 20 micras de diámetro. De las expansiones principales se desprenden finas colaterales que sin dividirse alcanzan los niveles más esclerales de la capa plexiforme externa donde terminan en ramitos de pequeñas espinas, en número de dos a cuatro. Estas espinas sinaptan con los conos dobles y sencillos del primer estrato.

Genis-Gálvez y col. (1979) describen un nuevo tipo de célula horizontal a la que denominan “célula en candelabro” y a la que atribuyen contactos sinápticos tanto con los conos como con los bastones, lo que quizás se deba a una organización citológica distinta en la retina de las falcónidas y de las gallináceas.

Prada y col. (1984) señalan la existencia de una célula horizontal desplazada de su normal localización, en la capa plexiforme externa, hacia la capa plexiforme interna.

2.1.1.1.3. Células bipolares

Ramón y Cajal (1893) las clasifica en dos tipos: un primer tipo, las bipolares externas, localizadas bajo la capa plexiforme externa y un segundo tipo de bipolares internas o delgadas que vienen a ocupar la parte más interna de la capa nuclear interna. El campo dendrítico de las primeras es extenso y rico en terminales y deriva directamente del cuerpo celular, mientras que, en las

bipolares internas o delgadas, lo hace a partir de su prolongación ascendente; este campo dendrítico está formado por un número limitado de ramas horizontales que se disponen en uno de los tres estratos de la capa plexiforme externa; la prolongación externa de estas células bipolares se continúa externamente para formar la maza de Landolt. La prolongación descendente origina a menudo, ramas colaterales a diferentes niveles de la capa plexiforme interna y termina por medio de ramificaciones varicosas que ocasionalmente se rompen en dos arborizaciones cerradas.

2.1.1.1.4. Células amacrinas

La tipología de las células amacrinas del pollo es bastante compleja. Ramón y Cajal (1893) distingue tres tipos principales:

A) Células amacrinas difusas: son pequeñas células piriformes. Su apéndice descendente está formado por una arborización de ramas delicadas y varicosas que, a lo largo de su trayectoria, originan cortos procesos extremadamente sinuosos, que se distribuyen por casi todo el espesor de la capa plexiforme interna, lo que le da a esta célula un aspecto pluriestratificado.

B) Células amacrinas estratificadas: son células de variado tamaño y forma, así, encontramos células piriformes, en semiluna y con apéndices finos o gruesos. Los apéndices descendentes de estas células, van a terminar a un nivel determinado de las cuatro o cinco pisos de arborización que contiene la capa plexiforme interna.

C) Células amacrinas de asociación: son células piriformes que originan

un apéndice descendente que termina en un ramo de dendritas cortas y gruesas. Del extremo inferior de este apéndice, parte un axón que alcanzando el límite externo de la capa plexiforme interna contacta con los apéndices descendentes de las células amacrinas ordinarias.

Genis-Gálvez y col. (1977) ponen de manifiesto la existencia de células amacrinas invertidas o desplazadas a la capa de células ganglionares y describen al mismo tiempo su proceso morfohistogenético y su migración.

2.1.1.1.5. Células ganglionares

En la retina de las aves, Ramón y Cajal (1893) distingue dos tipos de células ganglionares dependiendo de que sus arborizaciones dendríticas se dirijan hacia uno o varios niveles de la capa plexiforme interna:

A) Células ganglionares monoestratificadas. Dentro de este tipo se distinguen varios subtipos según el nivel de estratificación y su forma:

- Células ganglionares gigantes piriformes: presentan una arborización plana y muy sinuosa hacia el primer nivel.

- Células medianas piriformes: presentan una arborización muy varicosa hacia el segundo nivel.

- Células medianas multipolares: su arborización alcanza el segundo nivel.

- Células pequeñas piriformes: presentan una arborización granular extremadamente compacta, hacia el quinto nivel y que fueron consideradas por Ramón y Cajal (1893) como células amacrinas desplazadas.

B) Células ganglionares poliestratificadas. Dentro de este tipo, Ramón y Cajal (1893) distingue diversas variantes:

- Células multipolares con plexo horizontal hacia los niveles segundo, tercero y cuarto.
- Células multipolares más pequeñas que forman dos plexos horizontales, uno de ramas gruesas hacia la parte externa del quinto nivel y otro hacia el tercer nivel
- Células multipolares pequeñas que forman tres plexos hacia los niveles segundo, cuarto y quinto.

En las retinas de otras especies de vertebrados (teleósteos, anfibios, reptiles y mamíferos) es bastante común encontrar algunas células multipolares cuyas dendritas se extienden a través de la capa plexiforme interna completa sin formar plexos horizontales. Se trata de las células ganglionares difusas.

Además de las células ganglionares clásicamente descritas, Dogiel (1888) y Ramón y Cajal (1893) describieron un tipo de célula desplazada a la capa nuclear interna. Las células ganglionares desplazadas se localizan a lo largo del borde más interno de la capa nuclear interna. El axón atraviesa la capa plexiforme interna, entrando en la capa de fibras del nervio óptico, para proyectarse hacia el tectum. Se trata de una célula que posee un núcleo de grandes dimensiones cuyo árbol dendrítico se extiende a través del primer estrato de la capa plexiforme interna aunque, en algunas células, las dendritas se

expanden a través de los tres primeros estratos de esta capa sináptica. Estas células se localizan, en su mayoría, en la retina periférica (Prada y col., 1989b)

2.1.1.1.6. Células de Müller

Fue observada por primera vez en retina de diversos vertebrados por Müller (1851). Esta célula atraviesa toda la retina, desde la porción inferior de los conos y bastones hasta la membrana limitante interna, disponiéndose más o menos paralelamente unas a otras.

La célula de Müller consta de un cuerpo celular y numerosas expansiones citoplasmáticas. El núcleo, de morfología variable aunque generalmente alargado, se sitúa en la capa nuclear interna y sus prolongaciones muestran una estructura fibrilar que se impregna intensamente con cromato de plata. El contorno de estas células es muy irregular, lo que unido a sus prolongaciones, le confiere un aspecto como el de una red.

En medio de esta especie de malla formada por las células de Müller, se disponen los corpúsculos nerviosos de la retina.

Prada (1981), describe tres tipos de células de Müller en la retina del pollo:

A) Tipo I: Se caracteriza por un ramillete de finas y numerosas prolongaciones que partiendo del polo interno del cuerpo celular, se dirige hacia

la membrana limitante interna. Fueron descritas por Ramón y Cajal (1893).

B) Tipo II: Es una célula con una única prolongación interna que se divide a la altura de la capa plexiforme interna en algunas ramas gruesas, para dirigirse oblicuamente hacia la membrana limitante interna, donde finaliza en gruesos pies.

C) Tipo III: Posee una prolongación accesoria que partiendo de los niveles interno, medio o externo de la célula, se dirige hacia la membrana limitante interna.

Recientemente, Prada y col. (1998) han descrito un nuevo tipo celular en la retina del embrión de pollo, se trata de células con apariencia de astrocito pero que tienen un penacho de apéndices vítreos como las células de Müller y se manifiestan a lo largo de la capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico.

2.1.2. HISTOGÉNESIS DE LA RETINA DEL POLLO

La retina es, entre los distintos componentes estructurales del ojo, la primera en esbozarse. En íntima relación con la evolución de la retina se desarrolla el cristalino, así como las restantes partes y membranas del globo ocular (Genis-Gálvez, 1970)

La retina es una parte del SNC, que se desarrolla a partir de una prolongación del prosencéfalo y que posteriormente se diferencia en el

diencéfalo embrionario. En la parte anterior ventral de esta porción del SNC y a cada lado de la línea media, se produce una evaginación que da origen a la vesícula óptica. A su vez, del neuroepitelio de la vesícula óptica surge una invaginación secundaria, con lo que la vesícula óptica se transforma en la copa óptica, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y posteriormente por el nervio óptico (Rodiek, 1973). Entre las dos paredes de la copa óptica queda el ventrículo óptico que es un espacio continuo con los ventrículos del cerebro. Posteriormente, este espacio se colapsa y se convierte en un espacio virtual.

El epitelio interno de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina, del que se formará la retina neural adulta, auténtico tejido nervioso. El epitelio externo permanece con una sola capa de células y va a constituir el epitelio pigmentario de la retina, el cual no se diferencia como tejido nervioso, sino que queda como un epitelio de células de forma poligonal con abundantes invaginaciones en su cara externa y numerosas y largas prolongaciones en su cara interna, la cual contacta con la retina neural.

2.1.2.1. Ciclo mitótico

La retina es, en estadíos muy tempranos del desarrollo, un epitelio columnar pseudoestratificado, al igual que lo es el tubo neural antes de comenzar su diferenciación. Los estudios autorradiográficos han demostrado que el neuroepitelio está formado inicialmente sólo por células con capacidad para

dividirse, a las que se le denominan células matrices o germinales.

Los trabajos que más han aportado sobre el problema de la diferenciación retiniana han sido los de Sidman (1961) y los de Fujita y Horii (1963). Dichos autores utilizaron técnicas autorradiográficas para el estudio de la histogénesis retiniana, el primero en la rata, los segundos en el pollo. Gracias a estos trabajos sabemos que los núcleos celulares sintetizan ADN cuando están situados en la zona interna del epitelio retiniano o "zona de síntesis de ADN". Después migran hacia la "zona intermedia", la atraviesan y pasan a alcanzar la zona externa llamada "zona de mitosis" o zona ventricular, donde se dividen formando dos células hijas, las cuales regresan hacia la "zona intermedia" hasta alcanzar la zona de síntesis de ADN, a partir de la cual comienzan un nuevo ciclo. Las células que abandonan el ciclo para diferenciarse lo hacen después de realizar la mitosis (Fujita, 1963; Sauer, 1935; Sauer y Walker, 1959; Sidman, 1970; Fujita, 1964; y, Fujita y Fujita, 1964).

Los estudios sobre los aspectos morfológicos de la mitosis en el Sistema Nervioso, se remontan a los trabajos de Babuchin (1863) y Ramón y Cajal (1893). Los citados autores describieron las células neuroepiteliales de la retina embrionaria, como células fusiformes cuyas prolongaciones alcanzan las dos superficies que limitan el grosor del epitelio.

Las características de los núcleos de las células neuroepiteliales en las

distintas fases del ciclo mitótico, son las mismas que en el resto de los sistemas. (Sauer, 1935) (Smart, 1970) (Hinds y Ruffett, 1971).

Hinds y Ruffett (1971) fueron los primeros en realizar un estudio morfológico y ultraestructural del ciclo de división celular en la vesícula cerebral de la rata de 13 días de gestación. Sus resultados indican que la profase y prometafase tienen el soma en posición adyacente al ventrículo y poseen una prolongación vítrea que alcanza la superficie limitante interna. La metafase y anafase, carecen de prolongación vítrea, son redondas y sus somas están en posición adyacente al ventrículo. La telofase temprana se caracteriza, porque las dos nuevas células se hallan conectadas por un cuerpo medio adyacente al ventrículo; el cuerpo medio se halla agarrado por complejos de unión a las prolongaciones de células vecinas, y se caracteriza por presentar material filamentoso inmediatamente por debajo de la porción de membrana que participa en la escotadura. Figura 3.

La duración de la mitosis se va prolongando progresivamente a medida que transcurre el desarrollo del tubo neural del embrión de pollo. (Jelinek, 1959)

Con embriones de pollo incubados de los seis a los catorce días, Shen y col. (1956) realizaron un estudio sobre la diferenciación de los distintos tipos neuronales. Procesaron los embriones con tinción de Golgi y lo correlacionaron con el estudio histoquímico de la aparición de actividad acetilcolinesterasa

concluyendo que existe un gradiente de diferenciación que permanece durante todo el desarrollo en la retina del pollo, desde el fundus a la periferia y desde la superficie vítrea a la escleral.

Estudios autorradiográficos, llevados a cabo por Prada y col. (1991), han demostrado que la neurogénesis de la retina comienza al segundo día de incubación en el área dorsotemporal de la retina central, cercano al polo posterior y a la cabeza del nervio óptico, habiendo un gradiente de neurogénesis que se expande desde el área central a la periferia, donde finaliza después del doceavo día de incubación, cuando las últimas células bipolares se retiran del ciclo celular. En todos los sectores de la retina, las células ganglionares son las primeras en comenzar a retirarse del ciclo seguidas por amacrinas, horizontales, fotorreceptores más células de Müller y neuroblastos bipolares, abandonando completamente el ciclo celular simultáneamente las células ganglionares, horizontales y fotorreceptores, seguido por las amacrinas, luego células de Müller y, por último, células bipolares. Véase figura 4.

Los estudios autorradiográficos de Morris (1973) y Kahn (1974), muestran que las primeras células que abandonan el ciclo mitótico, en la retina del pollo, son las células ganglionares, hacia el 5º día de incubación, y que en un período corto de tiempo, comprendido entre el 3º y el 8º día de incubación, nacen el resto de las células retinianas. Así, las células horizontales surgen entre el 3º y el 6º día de incubación, las células amacrinas entre el 3º y el 8º día y los

fotorreceptores entre el 5,5° y el 6,5° día de incubación. Las últimas en abandonar el ciclo mitótico son las células de Müller y las células bipolares. Fujita y Horii (1963) aún cuando están de acuerdo con el orden de los sucesos no lo están con la fecha de aparición de estos fenómenos.

Es posible hallar una relación entre los tiempos en que las células neuroepiteliales de la retina completan su actividad mitótica y la formación de las capas sinápticas (Kahn, 1974) ya que suele existir un intervalo de tiempo, de ocho a once días, entre el momento en que las células completan el ciclo mitótico y el momento en que forman las conexiones sinápticas. De este modo, la mayoría de las células cesan su actividad mitótica entre el 3° (E3) y el 6° (E6) día de incubación, no observándose la capa plexiforme interna hasta el 8° día (E8), y la capa plexiforme externa uno o dos días más tarde (Coulombre, 1955). Sin embargo, la sinapsis no llega a ser funcional hasta el 14° día (E14) (Sheffield y Fishman, 1970; Kahn, 1974). Estos datos son coincidentes, con ciertas discrepancias, con los aportados por Hughes y Lavelle (1974) en embriones de pollo. Para estos autores las células ganglionares nacen al 3° día de incubación (E3), más tarde al 7° día (E7) se demarca la capa plexiforme interna, al 9° día (E9) aparece la capa plexiforme externa, mientras que las sinapsis en estas capas no se realizan hasta el 14° y 16° día (E14 y E16) respectivamente.

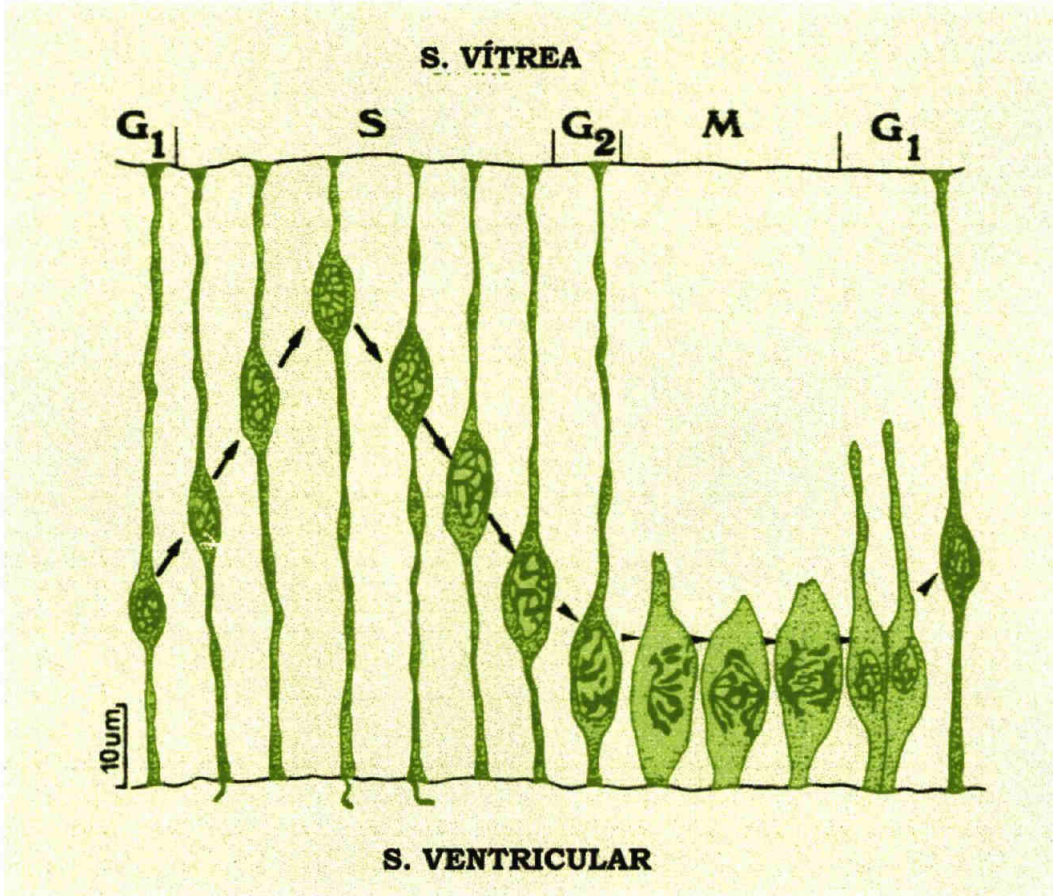


Figura 3. Representación esquemática de una sección del tubo neural del embrión de pollo, donde se muestra la secuencia de migración intermitente de los núcleos de las células germinales neuroepiteliales, con un intervalo aproximado de 30 minutos. G₁, período entre el final de mitosis y el comienzo de síntesis de ADN; S, período de síntesis de ADN; G₂, intervalo entre final de síntesis de ADN y principio de mitosis; M, mitosis. Tomado y modificado de Dorado (1986).

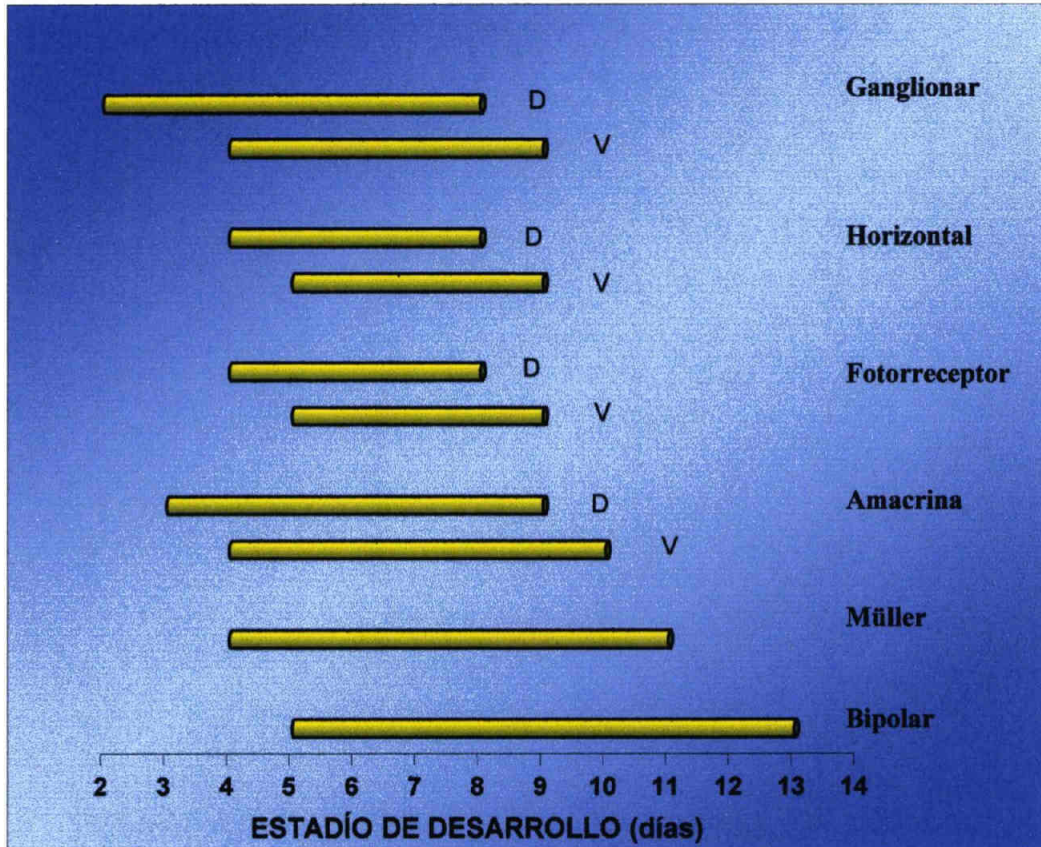


Figura 4. Periodos totales de neurogénesis de los diferentes tipos celulares de la retina del pollo, estimado con timidina tritiada. Para las células ganglionares, horizontales, los fotorreceptores y las células amacrinas, aparecen los intervalos de neurogénesis, de la región dorsal y ventral de la retina, por separado. Para las células bipolares y de Müller, aparece solo un diagrama por tipo celular, porque los periodos de neurogénesis se han estudiado en células disociadas de retina completa. Dibujado a partir de Prada y col., (1991). *Eur. J. Neurosci.*, 3: 563

2.1.2.2. Cronología en el nacimiento de células retinianas

2.1.2.2.1. Células ganglionares

Según Shen y col. (1956) la fecha de nacimiento de las células ganglionares está comprendida entre el 5,5 día (E5,5) o el 6,5 día (E6,5) de incubación y describen el desarrollo de las células ganglionares entre el 7º y el 9º día de incubación (E7 y E9).

Estas células siguen un patrón de diferenciación, cuyo primer acontecimiento es el crecimiento de los axones de las células que lo proyectarán dentro del tracto óptico, el segundo es el traslado de los cuerpos a través de la prolongación primitiva hasta el origen del axón. El tercero es la reabsorción o retracción de la prolongación primitiva. El cuarto es la diferenciación de las dendritas de las células ganglionares y el quinto, la elaboración de sus relaciones sinápticas en la capa plexiforme interna (Morest 1970).

2.1.2.2.2. Células fotorreceptoras

El proceso histogenético de los fotorreceptores está marcado por cuatro grandes etapas: salida del ciclo mitótico, fase de espiculación desorganizada, fase de reorganización de expansiones y fase de maduración, con el establecimiento de conexiones sinápticas efectivas (Armengol, 1983).

Las células fotorreceptoras muestran, como primer cambio de su diferenciación morfológica, la modificación de su morfología a nivel de la

membrana limitante externa. De este modo, los fotorreceptores de las retinas de 6 y 7 días de incubación (E6 y E7) presentan una forma bipolar con una prolongación interna más delgada que la externa. A su vez, la prolongación externa es más gruesa y uniforme en todo su recorrido excepto a nivel de la membrana limitante externa, donde se estrecha formando una ranura semejante a la que muestran los cuellos de botella. Por fuera de la membrana limitante externa incrementa su calibre y la citada prolongación hace protusión hacia el ventrículo óptico.

En retinas de 8 y 9 días de incubación (E8 y E9), los fotorreceptores muestran, a nivel de la membrana limitante externa, unas características similares a las descritas anteriormente; sin embargo, la prolongación externa es menos gruesa, el estrangulamiento a nivel de la membrana limitante externa está más marcado y la estructura que hace protusión hacia el ventrículo óptico adquiere forma de bola.

Aunque el proceso de diferenciación de los fotorreceptores tiene lugar de manera ininterrumpida, la forma de madurar estas células sigue un comportamiento distinto unas de otras, al menos desde el punto de vista morfológico. Esta circunstancia hace posible distinguir dos poblaciones distintas de células fotorreceptoras. Una de aparición temprana (E6-E9 días de incubación) y cuya morfología inicial es bipolar; la otra de aparición tardía (E9-E15 días de incubación), se muestra como una célula polimorfa con numerosas

expansiones que se originan preferentemente de las zonas externas del cuerpo.

La maduración sináptica de los fotorreceptores comienza una vez que se han establecido los iniciales contactos sinápticos, hacia el 16° día de incubación (E16).

La maduración de los fotorreceptores finaliza hacia el 20° día de incubación (E20), fecha en la que tanto estas células como la capa plexiforme externa, poseen todas sus características adultas.

2.1.2.2.3. Células horizontales y amacrinas

Según Genis-Gálvez y col. (1978) es posible detectar la libre migración de elementos celulares que se desplazan desde los estratos superficiales a los profundos; algunos jóvenes neuroblastos podrían quedar retenidos en la vecindad de la capa plexiforme externa donde se diferenciarían en células horizontales y en cambio, otras células continuarían hasta estratos más profundos para transformarse en células amacrinas. Cuando se estudia la retina de un embrión de pollo de 6,5-7 días de incubación (E6,5-7), se observa la existencia de jóvenes neuronas en forma de cometa, con la cola externa y el cuerpo interno, desde la membrana limitante externa, hasta niveles cercanos a la capa de células ganglionares.

Entre el 8° y 9° día de incubación (E8 y E9) las células en cometa más

externas, se diferencian en elementos estrellados que disponen sus ramas verticalmente y conectan con las células bipolares que se diferencian simultáneamente en este período. A esta fase de desorientación dendrítica le sigue una fase de orientación tangencial, que se acusa entre el 11° y 14° día de incubación (E11 y E14), durante la cual dichos filopodios se retraen, proliferando cortas expansiones ascendentes así como, en algunas células, una típica expansión axónica. Esta expansión axónica comienza a desarrollarse hacia el 14° día de incubación (E14) formando un delicado cono terminal hacia el 15° día (E15). Esta estructura terminal se transforma en una típica terminal axónica durante el 16° día del desarrollo (E16).

A partir del 14° día de incubación (E14) se modelan tres tipos de células horizontales. Así, el primer tipo que puede diferenciarse es el tipo de célula horizontal en brocha o célula horizontal tipo I de Mariani y Leure du Préé. El segundo tipo que sigue cronológicamente en aparición es la célula horizontal estrellada o tipo II de Mariani y Leure du Préé. A partir del 15° día (E15), aparece el tipo III de célula horizontal con forma de candelabro. (Genis-Gálvez y col., 1977; García-Lomas y col., 1986)

Se han encontrado dos formas de migración libre de los neuroblastos de células amacrinas. Una población (neuroblastos amacrinos lisos) migran sin cambiar su forma lisa monopolar o bipolar y forman los apéndices solo después de alcanzar la capa plexiforme interna. La segunda población (neuroblastos

amacrinos multipodiales), que incluye neuroblastos multipolares con abundantes apéndices filiformes o lameliformes en varias direcciones, son células altamente plásticas que comienzan a modificar su forma a la vez que son liberadas desde la línea ventricular y lo continúan haciendo hasta su localización definitiva. (Prada y col., 1987).

Los neuroblastos amacrinos lisos se localizan a diferentes niveles del neuroepitelio entre los días 5 y 7 de incubación, mostrando una expansión citoplasmática externa o interna o bien ambas (donde la expansión externa es más gruesa que la interna, mostrando esta última un rudimentario cono de crecimiento). Solo a partir del 6º día, los neuroblastos lisos más internos comienzan a ramificarse a nivel de la futura capa plexiforme interna, mientras que van retrayéndose progresivamente sus expansiones citoplasmáticas más externas, comenzando a asociarse con axones terminales de células bipolares inmaduras a partir del 8º día de incubación.

El segundo grupo de migración, encontrado entre los 5 y 7 días de incubación, muestra una gran variedad de formas. A partir del 8º día de incubación (E8), los jóvenes neuroblastos amacrinos se ubican en las zonas interiores de la capa nuclear interna, van retrayendo sus expansiones externas o ventriculares mientras que sus prolongaciones vítreas se ramifican progresivamente, esbozándose a partir de dicha fecha una rudimentaria capa plexiforme interna (Genis-Gálvez, 1977).

Algunas células, precursoras de las células amacrinas invertidas, entre el 8º y 9º día de incubación (E8 y E9), desarrollan una gran cantidad de expansiones multipodiales y transfieren su soma a la capa de células ganglionares y desarrollan un tallo entre el cuerpo celular y la arborización intraplexiforme en los siguientes estadios (10-12 días de incubación).

2.1.2.2.4. Células bipolares

Las células bipolares, después de abandonar el ciclo mitótico, migran mediante la traslocación que realiza su núcleo hacia la capa nuclear interna, sin desconectarse de la superficie ventricular.

A los 7 días de incubación (E7), la prolongación interna de las células bipolares se encuentra siempre unida a la membrana limitante externa. La prolongación vítrea o interna termina libremente en un engrosamiento en la incipiente capa plexiforme interna o en la capa de células ganglionares.

En el 8º día de incubación (E8), se observa la aparición de pequeños bastoncillos, numerosos e irregulares, en la prolongación externa de la célula bipolar y a nivel de la capa plexiforme externa. A continuación, ocurre una reorganización en el espacio de las expansiones primitivas, mientras que al mismo tiempo se forman nuevas expansiones bien orientadas que destacan más claramente en el día 9º de la incubación (E9).

Entre el 8° y 9° día del desarrollo (E8 y E9), la maza de Landolt se desconecta de la membrana limitante externa en algunas células, llegando a veces al extremo de desaparecer completamente.

La prolongación de la célula bipolar hacia el cuerpo vítreo se ramifica poco a poco junto a la prolongación externa. A partir de los 18 días y hasta el momento de la eclosión, las células bipolares solo experimentan un ligero crecimiento sin que existan grandes cambios en el desarrollo embriológico (Quesada y col., 1981; Quesada, 1982).

2.1.2.2.5. Células de Müller

Al 6° día de incubación (E6), las células de Müller son difíciles de distinguir de las células ventriculares debido a su apariencia similar (Prada y col., 1989a).

El desarrollo de una célula de Müller es, hasta el 7° (E7) u 8° día (E8), como un elemento bipolar de cuerpo fusiforme, localizado a diferentes niveles de la capa nuclear interna y con una acusada inflexión a nivel de la capa plexiforme externa, aunque en estos días ocurren los primeros cambios morfológicos que consisten en la emisión de finas y numerosas espículas radiales a nivel de la capa plexiforme interna.

El 9º día de incubación (E9) se aprecian las mismas características señaladas, aunque el engrosamiento a nivel de la capa plexiforme externa es más evidente y el cuerpo se localiza en el tercio medio de la capa nuclear interna. Entre los días 9º y 12º (E9 y E12) la célula de Müller desarrolla, a nivel de la capa de fibras del nervio óptico, una serie de expansiones radiales que acompañan a los axones de las células ganglionares. En los días 10º y 11º (E10 y E11) emite pequeñas expansiones que coinciden con el estrato de células amacrinas, a la vez que la primitiva bifurcación a nivel de las células ganglionares comienza a aumentar el número de sus expansiones. Durante el día 14º (E14), las células de Müller próximas a la papila óptica, desarrollan prolongaciones accesorias a nivel de la capa de fibras del nervio óptico, de las que en dirección vítrea parten expansiones que terminan mediante pies de fijación en la membrana limitante interna.

A partir de 14º (E14) ó 15º (E15) día de incubación, las células de Müller están prácticamente formadas, realizando a partir de este momento un crecimiento de sus expansiones preexistentes y un aumento del número de las mismas, alcanzando al día 18º (E18) su morfología característica.

2.1.2.3. Sinaptogénesis

La sinaptogénesis no ocurre simultáneamente en toda la retina, ni en la capa plexiforme interna, ni en la capa plexiforme externa, ni en ambas a la vez. La sinaptogénesis comienza en la capa plexiforme interna al 9º día de

incubación (E9) y en la capa plexiforme externa al 12º día de incubación (E12) en el área dorsocentral-temporal, y luego se expande al resto de la retina, siguiendo tres gradientes espaciales: central a periferia, dorsal a ventral y temporal a nasal. En el día 18 (E18), estas capas presentan una morfología similar al adulto en la región dorsocentral temporal teniendo en los días 20-21 la misma apariencia en toda la retina (Prada y col, 1998).

2.2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA RETINA

Los lípidos son constituyentes cuantitativamente significativos de la retina y el metabolismo lipídico es indudablemente esencial para la función fisiológica de la retina, especialmente con relación a los fotorreceptores.

Los lípidos fueron reconocidos por primera vez como constituyentes de la retina por Kuhne, en 1878, durante sus estudios pioneros sobre la rodopsina. Aunque su investigación sobre lípidos fue sólo superficial, Kuhne identificó la lecitina (fosfatidilcolina) en extractos en etanol-éter de retinas bovinas y de rana.

La primera separación verdadera de algunas clases de lípidos retinales, así como su cuantificación parcial, fue registrada por Leinfelder y Salit (1934) al estudiar la composición lipídica de la retina, cerebro completo y sangre. Las distintas clases de lípidos fueron separadas por su solubilidad diferencial en solventes orgánicos y fueron cuantificados por métodos gravimétricos y/o colorimétricos. Estos estudios tempranos revelaron que la fosfatidilcolina y la

fosfatidiletanolamina eran los principales constituyentes de la retina bovina.

Estudios comparativos de varios tejidos oculares del ojo bovino han indicado que cada tejido ocular es distinto en su composición lipídica (Broekhuysse, 1968). La retina tiene un alto contenido en lípidos (por peso), así como el más alto contenido en fosfolípidos de los tejidos oculares. La concentración de fosfolípidos (μg por gramo de tejido) es relativamente alto en tejido ocular bien vascularizado y/o bien innervado (retina, iris y coroides). La concentración de fosfolípidos de la retina es similar a la de otros tejidos como por ejemplo el hígado, el pulmón, el corazón y el riñón.

Lowry y col. (1956) realizaron la extraordinaria proeza de separar la retina de mono en sus diferentes capas y analizaron el contenido en lípidos por cada capa. Encontraron que el porcentaje más bajo de lípidos (12%) se encontraba en la capa nuclear externa, mientras que el más alto (34%) estaba en la capa de fibras nerviosas. El contenido en lípidos de la capa más externa (fotorreceptores) constituía un 22-25% del total del peso seco.

2.2.1. LÍPIDOS EN LA RETINA ADULTA

Los lípidos representan aproximadamente el 20% en peso seco de la retina, del cual, cerca de dos tercios son fosfolípidos. Los lípidos neutros (acil glicéridos, esteroides y ácidos grasos libres) constituyen un cuarto de los lípidos totales de la retina. En general, la razón (peso/peso) de lípidos neutros a

fosfolípidos está en el rango de 0,3-0,5. Una excepción llamativa aparece en ciertos peces antárticos, que presentan una relación de triglicéridos/fosfolípidos (peso/peso) del orden de 2,8-4,8. Presumiblemente, el resto de los lípidos (5-10% del peso) sean debidos a constituyentes polares (por ejemplo, cerebrósidos, gangliosidos, sulfátidos, etc.) (Fliesler y Anderson, 1983a).

2.2.1.1. Lípidos neutros

Los lípidos de la retina están compuestos, en gran parte, de colesterol, con cantidades menores de di- y triglicéridos y muy pequeñas cantidades de ácidos grasos libres. La cantidad de monoglicéridos es insignificante (Fliesler y Anderson, 1983a).

Los niveles de colesterol para retina bovina y para la membrana del segmento externo de los bastones son los más bajos registrados en tejido de vertebrados siendo la proporción colesterol/fosfolípidos de 0,06 (Fliesler y Schroeffer, 1982) aunque se han detectado valores mayores para el pollo, del orden de 0,27 (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996).

El colesterol, principal lípido neutro, representa el 1-2% por peso seco de la membrana del segmento externo de los bastones (Fliesler y Anderson, 1983a), pero su distribución no es uniforme, con concentraciones más altas en los discos basales (Boesze-Battaglia y col., 1989). Sin embargo, el papel de la síntesis *de novo* para el mantenimiento de los niveles de colesterol en el segmento externo

de los bastones o la retina no ha sido establecido.

Estudios realizados *in vitro* con homogenados de retinas bovinos (Fliesler y Schroepfer, 1983b) y con retinas aisladas de bovino (Fliesler y Schroepfer, 1986) y de ranas (Keller y col., 1988) han indicado que el escualeno es el principal lípido isoprenoide sintetizado *de novo* en la retina con poca biosíntesis de colesterol y otros esteroides. En cambio, la retina de rata es capaz de sintetizar *de novo*, relativamente rápido, colesterol *in vivo* (Fliesler y col., 1993). La mayor parte del escualeno recién sintetizado en la retina se dirige al segmento externo de los bastones (Keller y Fliesler, 1990).

El escualeno, un hidrocarburo isoprenoide, es un intermediario obligatorio, pero transitorio, en la síntesis de esteroides en todas las células eucariotas (Schroepfer, 1981). Fliesler y colaboradores (1997) localizaron cantidades apreciables de escualeno en las membranas del segmento externo de los bastones en la rana. El escualeno también se encuentra en las membranas del segmento externo de los bastones bovinos pero en una proporción 100 veces menor que en la rana.

El segmento externo de los fotorreceptores en la retina de vertebrados es continuamente renovado (Young, 1976). Los discos recién sintetizados son agrupados en la base de los segmentos externos y los segmentos más viejos son desplazados apicalmente (Chen, 1992a). El escualeno parece estar implicado en

el proceso de morfohistogénesis y en el desplazamiento de los discos de membrana de los bastoncillos (Fliesler y col., 1997).

El escualeno, recién sintetizado en la retina, es incorporado en las membranas del ROS (segmento externo de los bastones) quedando distribuido homogéneamente a través de los discos del segmento externo. La velocidad de síntesis *de novo* es coherente con los requerimientos para la renovación de la membrana del ROS (Keller y Fliesler, 1990).

La distribución del escualeno en tejidos humanos es ubícua, encontrándose las mayores concentraciones en la piel y el tejido adiposo, mientras que en lugares activos de síntesis de colesterol (hígado y duodeno) se encuentran cantidades moderadas (Liu y col., 1976)

El contenido de diglicéridos, triglicéridos y ácidos grasos libres ha sido estudiado en diferentes especies. Los glicéridos neutros suponen el 1% del peso seco de la retina y menos del 5% de los lípidos totales. Los ácidos grasos libres representan el 0.1-0.2% del peso seco de la retina y cerca del 1% de los lípidos totales (Fliesler y Anderson, 1983a).

2.2.1.2. Lípidos polares

Datos recogidos sobre la composición de los distintos tipos de fosfolípidos de la retina de varias especies de vertebrados, muestran que la fosfatidilcolina y

fosfatidiletanolamina forman la mayoría de los fosfolípidos presentes junto con cantidades menores de fosfatidilserina, fosfatidilinositol y esfingomiélin. El porcentaje relativo de esfingomiélin en retina de aves es ligeramente más alto que en mamíferos (Fliesler y Schroepfer, 1983b).

La fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina constituyen más del 80% de la fracción de fosfolípidos totales. En la retina de pollos adultos y de ternera se ha observado que más de la mitad son fosfatidilcolina y, aproximadamente, un tercio lo forma la fosfatidiletanolamina. La fosfatidilserina y el fosfatidilinositol tienen proporciones similares (alrededor del 5%), mientras que la esfingomiélin supone el 7,5% en retina de pollo y 4,3% en retina de ternera (Dorman y col., 1977).

En las retinas del pollo y la ternera, la diacilglicerofosfocolina constituye el 90% de la fracción de fosfatidilcolina. Aparecen niveles más altos de éteres lipídicos en fosfoglicéridos de etanolamina que en fosfoglicéridos de colina (Dorman y col., 1977).

Aunque otros tejidos neurales, como el cerebro y la médula espinal, contienen cantidades importantes de gangliósidos, la retina es relativamente pobre a este respecto. El contenido de gangliósidos de la retina es aproximadamente el 10-15% (dependiendo de la especie) del cerebro completo. Los gangliósidos suponen solo el 1-2% de los lípidos totales de la retina (Fliesler

y Anderson, 1983a).

El gangliósido GD3 es el principal glucolípido de la retina de mamíferos (Matsui y col., 1987; Holm y col., 1972) y de pollo (Edel-Harth y col., 1973).

La predominancia de GD3 en retina de mamíferos es poco común ya que este gangliósido es, normalmente, solo un componente minoritario del tejido nervioso adulto (Fliesler y Anderson, 1983a).

La retina contiene galactosilceramida, glucosilceramida, lactosilceramida y sulfátidos. La glucosilceramida supone el 25% de los cerebrósidos encontrándose en mayor cantidad que en el cerebro mientras que los sulfátidos se encuentran en menor proporción (Matsui y col., 1987).

2.2.1.3. Ácidos grasos

Los ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1(n-9)), araquidónico (C20:4(n-6)) y docosahexaenoico (C22:6(n-3)) constituyen la mayoría (>80%) de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la retina (Johnston y Hudson, 1974).

La retina de ratones adultos contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente, ácido araquidónico (C20:4(n-6)) y ácido docosahexaenoico (C22:6(n-3)). Particularmente, el C22:6(n-3) se concentra en

las membranas del segmento externo de los bastones de los fotorreceptores y en las membranas sinápticas de las neuronas (Scott y col., 1988). Los ácidos grasos poliinsaturados pueden mantener la fluidez de la membrana en los discos de membrana de los fotorreceptores y también sirven como precursores de metabolitos activos, como las prostaglandinas (Lands, 1979; Corey y col., 1980), leucotrienos (Samuelsson, 1983) y docosahexanoides (Aveldaño y Sprecher, 1983; Bazan y col., 1984).

La fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas puede estar determinada por la composición en ácidos grasos de sus fosfolípidos (Stubbs y Smith, 1984). Una disminución en la longitud de las cadenas o un mayor grado de insaturación induce un incremento en la fluidez (Ruiz-Gutiérrez y col., 1992).

La composición de ácidos grasos de la retina, así como en otros tejidos neurales, es extraordinariamente alta en ácidos grasos poliinsaturados, particularmente la familia (n-3). En la retina, la concentración de ácidos grasos (n-3) es más alta en el segmento externo de los fotorreceptores, donde solo el C22:6(n-3) constituye cerca del 50% de los ácidos grasos presentes en fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina y un 30% en fosfatidilcolina (Fliesler y Anderson, 1983a). Dentro de los fosfolípidos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son más abundantes en diacil-GPE que en diacil-GPC. Por ejemplo, en la retina de pollo adulto, los PUFAs constituyen el 48,5% de los ácidos grasos en diacil-GPE, pero solo el 4,5% en diacil-GPC (Johnston y Hudson, 1974).

La estructura principal de los glicerofosfolípidos del tejido neural de vertebrados contiene grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (C22:6(n-3)). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son retenidos muy tenazmente por el tejido neural (Tinoco, 1982) y son necesarias de dos a tres generaciones de privación de la dieta para reducir significativamente el contenido de PUFA(n-3) del cerebro de rata (Bourre y col., 1984) y cerebro y retina de mono rhesus (Neuringer y col., 1984). El agotamiento de PUFA(n-3) en cerebro y retina da por resultado una reducción de las habilidades visuales y cognitivas en el mono rhesus (Neuringer y col., 1984).

Niveles reducidos de PUFAs (n-3) de cadena larga en el cerebro y el Sistema Nervioso Central están relacionados con reducción de la agudeza visual (Connor y col., 1990) y habilidad de aprendizaje (Bourre y col., 1989; Connor y col., 1990; Jensen y col., 1996; Horrocks y Yeo, 1999)

Deficiencias de C22:6(n-3) están relacionadas con síndrome alcohólico fetal, déficit de atención por hiperactividad, fibrosis cística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva y adrenoleucodistrofia. Una disminución del ácido docosahexaenoico, en cerebro, está asociado con una disminución cognitiva durante el envejecimiento y con el comienzo de la enfermedad de Alzheimer (Horrocks y Yeo, 1999). Por el contrario, un aporte en la dieta de ácido docosahexaenoico, durante la infancia, fue el principal

determinante de una mejoría en la escala cognitiva y escala motora del Índice de Desarrollo Mental (MDI) que permaneció a largo plazo (Birch y col., 2000).

La presencia de grandes cantidades de di22:6glicerofosfolípidos en la retina de un amplio rango de animales, como el bacalao (Bell y Dick, 1991) y la trucha (Bell y Tocher, 1989), nos sugiere un papel especial de estas moléculas, como el indicado por Aveldaño (1988), según el cual, estos lípidos juegan un papel estructural por interacción con la rodopsina de la membrana del segmento externo de los bastones mientras, también, mantienen una membrana muy fluida en la cual pueden ocurrir los cambios conformacionales durante el ciclo de excitación.

El enriquecimiento preferente de C22:6(n-3) en las membranas sinápticas (Breckenridge y col., 1972) sugiere un papel importante de este ácido graso en la neurotransmisión, y su concentración en el segmento externo de los bastones de la retina está ligado a los movimientos de la rodopsina en el proceso fotorreceptivo (Anderson y col., 1974).

El ácido docosahexaenoico es el ácido graso (n-3) más abundante que existe en los tejidos animales. Este ácido graso poliinsaturado es esencial para el metabolismo animal ya que no puede ser sintetizado *de novo*, por lo que debe ser obtenido a partir de la dieta. Además, la retina posee un mecanismo para conservar el C22:6(n-3) cuando la dieta es deficiente, de manera que es

reciclado dentro de la retina (Chen y col., 1992a) o entre la retina y el epitelio pigmentario de la retina (Stinson y col., 1991; Wiegand y col., 1991). Los fotorreceptores toman este ácido graso selectivamente y lo usan en la esterificación del colesterol, formación de fosfolípidos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y en la biogénesis de los discos de membrana del segmento externo de los bastones (Rodríguez de Turco, 1990).

El hígado es el primer lugar en el cual se forma el C22:6(n-3), a partir del C18:3(n-3) y de la dieta, para posteriormente ser enviado a su órgano de destino a través de la circulación (Scott y Bazan, 1989). Por otro lado, las células endoteliales de la retina sintetizan C22:6(n-3) mediante una vía independiente de la $\Delta 4$ -desaturasa, que consiste en la elongación de C22:5(n-3) a C24:5(n-3), seguido por $\Delta 6$ -desaturación del C24:5(n-3), para producir C24:6(n-3) que finalmente se acorta a C22:6(n-3) (Innis y col., 1999; Delton-Vandenbroucke y col., 1997; Rotstein y col., 1996; Voss y col., 1991). Basado en este modelo, el retículo endoplásmico podría aportar, particularmente, C22:6(n-3) a los segmentos de los bastones a través del epitelio pigmentario de la retina (Wang y Anderson, 1993).

La retina de pollo es, en general, cono dominante, mientras que la retina de muchos otros vertebrados, de los que se ha obtenido la composición de ácidos grasos de la retina son bastón dominantes (Fliesler y Anderson, 1983a). Esto puede explicar, en parte, porque los ácidos grasos poliinsaturados, en

especial C22:6(n-3), forman una gran proporción de las especies acilo en las retinas de tales vertebrados, como en humanos (Martínez y col., 1988), ratón (Scott y col., 1988) y ranas (Chen y Anderson, 1992b) mientras que en la retina de pollo, las especies acilo son principalmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996).

El ácido araquidónico es el principal ácido graso de las membranas biológicas y es un precursor de eicosanoides, que tienen una gran variedad de papeles reguladores en funciones fisiológicas. Puede ser sintetizado a partir del ácido linoleico (C18:2(n-6)) en la mayoría de los animales a través de la $\Delta 6$ desaturasa, la elongasa y la $\Delta 5$ desaturasa (Figura 5). Una deficiencia de ácido araquidónico impide el crecimiento, causa dermatosis y gran variedad de desórdenes metabólicos en animales, incluyendo humanos. Está asumido que los humanos pueden sintetizar bastante ácido araquidónico a partir de ácido linoleico para completar su requerimiento diario (Holman, 1976).

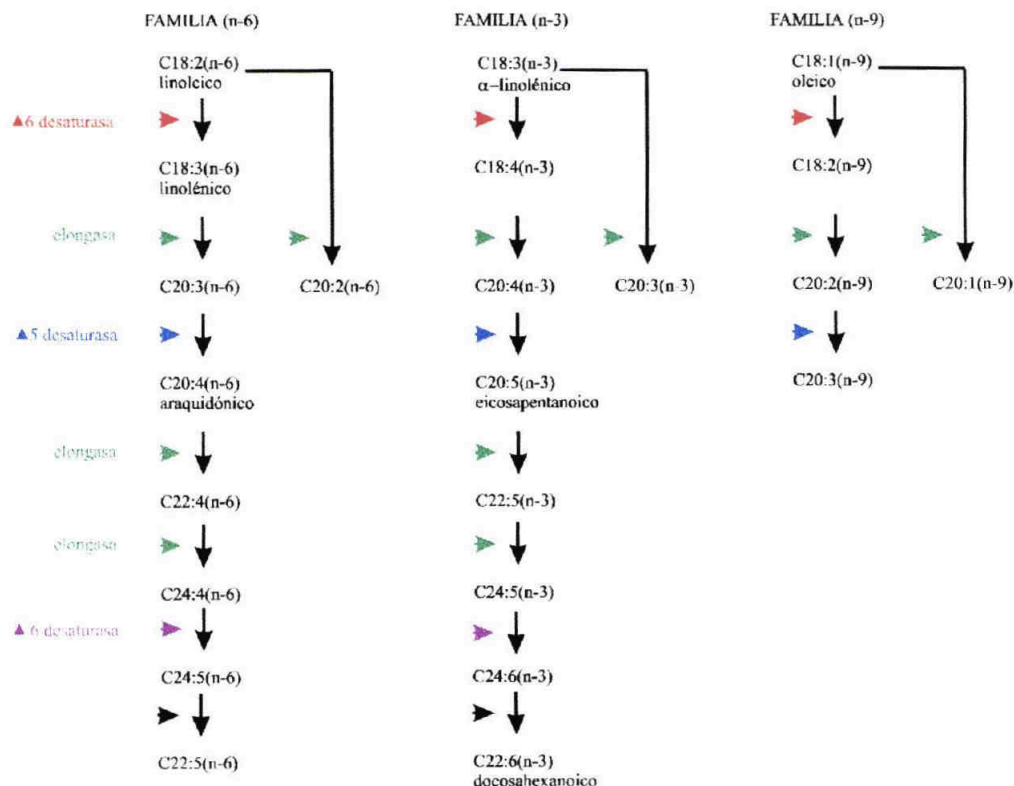


Figura 5. Vía anabólica de ácidos grasos de cadena larga. Modificado de Innis y col. (1999). Las flechas con tallo muestran la conversión entre ácidos grasos. Las cabezas de flecha muestran los puntos de actuación de los enzimas nombrados a la izquierda de la columna.

2.2.2. LÍPIDOS EN LA RETINA EMBRIONARIA

A nivel de retina embrionaria, existen pocos estudios sobre su composición lipídica. Los principales análisis de los lípidos de la retina del pollo durante el desarrollo midieron los cambios en niveles de fosfolípidos y gangliósidos (Dreyfus y col., 1975; Mandel y col., 1977), la composición de ácidos grasos (Sellner y Clough, 1992) y cambios en los niveles de lípidos totales, principales clases de fosfolípidos y ácidos grasos (Ruiz-Gutiérrez y col. 1996).

La última semana del periodo embriogénico de 21 días del pollo se caracteriza por una rápida transferencia de componentes lipídicos desde la yema al embrión (Noble y Cocchi, 1990). Los lípidos de la yema son tomados por las membranas del saco de la yema, donde se juntan con partículas lipoprotéicas para liberarse a la circulación embrionaria (Noble y Cocchi, 1990; Shand y col., 1993). La acción de la lipoproteinlipasa, localizada en varios tejidos, sobre las lipoproteínas del plasma da lugar a la ingesta y utilización de los ácidos grasos constituyentes por el tejido embrionario (Speake y col., 1993). Los restos de lipoproteínas resultantes son tomados por el hígado embrionario, con la consecuente acumulación de grandes cantidades de colesterol esterificado en este tejido (Shand y col., 1994).

2.2.2.1. Lípidos neutros

Entre los lípidos neutros, el contenido medio de colesterol hasta los

quince días de desarrollo en el embrión de pollo, suponen el 8.06% de los lípidos totales y el 38.18% de lípidos neutros extraídos de retinas. Sin embargo, en los últimos estadios de desarrollo embrionario, estos valores aumentan considerablemente a un 19.6% del total de lípidos y un 67.9% de los lípidos neutros en el nacimiento (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996).

Según los resultados de Ruiz-Gutiérrez y col. (1996), hay una producción significativa de diglicéridos, entre los días 7 y 15 del desarrollo de la retina del embrión de pollo, y es seguido por una disminución imprevista en pollos recién nacidos.

2.2.2.2. Lípidos polares

El análisis de los niveles de fosfolípidos y gangliósidos durante el desarrollo del embrión de pollo reveló grandes cambios en el contenido de gangliósidos pero solo pequeñas fluctuaciones en las diferentes clases de fosfolípidos (Dreyfus y col., 1975). Estas fluctuaciones están correlacionadas con algunas de las variaciones en el contenido de PUFA.

La proporción de fosfatidiletanolamina/fosfatidilcolina se incrementa durante el desarrollo. Sin embargo, la proporción de plasmalógenos de etanolamina de la retina, disminuye durante el desarrollo debido a que los segmentos externos de los bastones están desprovistos de plasmalógenos, mientras que en el cerebro aumenta debido a la mielinización (Martínez y col.,

1988; Anderson y col., 1975)

2.2.2.3. Ácidos grasos

Los cambios registrados en la retina durante el desarrollo son, básicamente, los mismos que en los tejidos neurales, específicamente en la proporción (n-3):(n-6), paralela a la que aparece durante el desarrollo del cerebro (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996; Martínez y col., 1974). El balance entre los ácidos grasos (n-6) y (n-3) juega un papel importante en la regulación de las características físicoquímicas de la membrana lipídica y puede contribuir también a la función de la membrana con el envejecimiento (Alvarez y col., 1993; Yehuda y col., 1998).

El contenido en ácidos grasos de la retina cambia durante el desarrollo y está correlacionado con estadios morfológicos de diferenciación (Sellner y Clough, 1992).

Niveles altos de C22:6(n-3) son incorporados en los fosfolípidos del cerebro y la retina del embrión de pollo (Anderson y col., 1989) y de la mayoría de otros vertebrados (Neuringer y col., 1988) durante el desarrollo, siendo necesario un aporte adecuado de este ácido graso para que la maduración funcional sea óptima en estos tejidos (Neuringer y col., 1988).

Los ácidos grasos poliinsaturados C₂₀₋₂₂ son liberados preferencialmente

desde el tejido adiposo del embrión de pollo en forma de ácidos grasos libres, hacia el tejido neural en desarrollo (Farkas y col., 1996; Speake y col., 1997) dado que no hay lipoproteinlipasa en el cerebro (Speake y col., 1993).

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el cerebro y el ojo de pollo es constante durante la vida embrionaria y la actividad de síntesis comienza de forma significativa solo durante la última semana (Bordoni y col., 1986). Datos disponibles en el ratón nos indican que los PUFA se encuentran en cantidades moderadas antes de la aparición del segmento externo, después del cual, el contenido en PUFA, particularmente C22:6(n-3) se incrementa marcadamente (Scott y col., 1988).

Se ha visto que en la retina de ratones (Scott y col., 1988) y en la retina y el cerebro de humanos (Martínez y col., 1988), la proporción de ácido araquidónico disminuye con la maduración, principalmente en plasmalógenos de etanolamina.

En el ojo del embrión de pollo hay una disminución significativa de C20:3(n-6), C20:4(n-6), C22:5(n-3) y C22:6(n-3) alrededor de los días 16-18 del desarrollo embrionario, a la vez que se detecta la primera actividad eléctrica de la retina y la primera respuesta de comportamiento a la luz (Bordoni y col., 1986)

Johnston y Hudson (1974) registraron que la fosfatidiletanolamina era el fosfolípido con el nivel más alto de C22:6(n-3) en la retina de pollos adultos y en el segmento externo de los bastones, y en ambos incrementa desde E15 del desarrollo embrionario hasta el nacimiento (Sellner y Clough, 1992; Ruiz-Gutiérrez y col., 1996). El C22:6(n-3) juega un papel en la síntesis y fluidez de la membrana de los fotorreceptores, particularmente del segmento externo cuyo desarrollo morfológico comienza a la mitad de la tercera semana de incubación (Grün, 1982; Armengol, 1983); y de la membrana sinaptosómica, la cual se forma activamente entre los días 13 y 21 (Meller, 1984), particularmente la capa plexiforme externa, cuyas sinápsis pueden ser distinguidas hacia el día 17 del desarrollo embrionario (Vogel y Nirenberg, 1976). Realmente el contenido de este ácido graso poliinsaturado es el más alto en todas estas estructuras histológicas (Neuringer y col., 1986).

El hecho de que el contenido en PUFA de la retina de 6 días de desarrollo sea mucho mayor que el de la yema recogida en el mismo estadio, indica que la retina embrionaria tiene ya la habilidad de sintetizar, transportar y/o incorporar PUFA selectivamente en la membrana lipídica (Sellner y Clough, 1992).

2.3. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA HISTOGÉNESIS DE LA RETINA

El alcohol es una sustancia psicoactiva de efectos neuronales depresivos o

narcóticos (Ewing y Rouse, 1976; Kissin, 1979; y, Berry y col., 1980), que produce dependencia y que, por hallarse institucionalizada, nuestra sociedad consume con entera libertad.

El alcohol etílico tiene primeramente un efecto depresor continuado sobre el Sistema Nervioso Central. La estimulación que provoca el alcohol depende de la actividad que ejerce sobre ciertas partes del cerebro, cuya liberación sobreviene al ser "deprimidos" los mecanismos de control inhibitorios. Los primeros efectos depresores no los ejerce el alcohol sobre la corteza, sino sobre las estructuras cerebrales más profundas, especialmente el sistema reticular activador (Kissin, 1979; Berry y Pentreath, 1980).

Con el aumento del consumo de alcohol en mujeres jóvenes, de 16 a 34 años, edades en las que se dan los mayores índices de gestación, se han detectado numerosas alteraciones en el desarrollo de embriones y fetos, entre las que destaca por su importancia el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF).

El SAF se ha caracterizado clínicamente como la posesión de un grupo típico de características faciales dismórficas asociadas con retraso en el crecimiento somático y mental (Jones y Smith, 1973).

El SNC es especialmente vulnerable a los efectos teratogénicos del alcohol durante el desarrollo. El rendimiento subóptimo del SNC en niños

expuestos a altos niveles de alcohol durante el embarazo es indudablemente la consecuencia más devastadora y costosa del consumo de alcohol (Pettigrew, 1986).

La exposición a alcohol, en roedores en desarrollo temprano (equivalente al primer trimestre en humanos), provoca defectos en el tubo neural y alteración de la proliferación neuronal. La exposición a alcohol en roedores, durante el equivalente al segundo trimestre en humanos, interfiere con la diferenciación neural y la migración, dando lugar a una disminución del tejido neural, desorganización y retraso en el desarrollo que provoca microcefalia. Es durante el equivalente al tercer trimestre en humanos (el temprano periodo neonatal en roedores), cuando tiene lugar la proporción más rápida de crecimiento en el cerebro. La exposición a alcohol durante este periodo afecta negativamente a la glía, así como a la proliferación dendrítica y sináptica (Zajac y Abel, 1992).

La exposición prenatal a etanol reduce el número de neuronas piramidales en el hipocampo de la rata (Barnes y Walker, 1981), altera profundamente la proliferación y la migración de neuronas corticales (Miller, 1986; Quesada y col., 1990), reduce los niveles de neurotransmisores (Rawat, 1977), retrasa la sinaptogénesis (Means y col., 1988) y disminuye la ramificación dendrítica durante el desarrollo (Davies y Smith, 1981).

Modelos animales de SAF ponen de manifiesto disminución del peso y

tamaño del cerebro, además de sutiles cambios en la maduración (Hammer y Scheibel, 1981), mielinización (Druse y Hofteig, 1977; Samorajski y col., 1986; Phillips y col., 1991) y proliferación (Kennedy y Elliott, 1986; Miller y Nowakowski, 1991) de las neuronas del SNC.

De los defectos registrados en el SNC, el más sencillo de contemplar en el periodo postnatal y, a menudo, el único signo aparentemente visible de daño son aquellos del sistema visual (Pettigrew, 1986). Cerca del 90% de los niños con SAF tiene defectos del sistema visual y la mitad de ellos posee hipoplasia de la cabeza del nervio óptico (Strömmland, 1985; Strömmland, 1987; Chan y col., 1991). Esta hipoplasia se cree que está relacionada con una pérdida de axones mielinizados del nervio óptico y la capa de células ganglionares de la retina y se piensa que conduce a una pérdida de la agudeza visual y nistagmo en humanos (Zeki y Dutton, 1990; Ashwell y Zhang, 1994).

Mediante el uso de técnicas de análisis digital de imagen, Hellstrom (1999) observó que niños con FAS presentaban un área de disco óptico por debajo de lo normal y un aumento de tortuosidad en venas y arterias.

La pérdida de axones mielinizados en el nervio óptico de jóvenes ratones adultos, resultado de una exposición embrionaria al alcohol (Parson y col., 1995a), se mantiene más tarde en el adulto y es específico del SNC (Parson y Sojitra, 1995b). Esta pérdida de axones parece ser debida a una atrofia tardía

más que a una hipoplasia (Parson y Sojitra, 1995b). Por el contrario, Kjellström y Conradi (1992), al someter a ratas adultas a un tratamiento crónico con alcohol, llegaron a la conclusión de que provoca una disminución en el calibre del axón sin pérdida de axones en el nervio óptico.

Strömmland y Pinazo-Durán (1994) realizaron un estudio acerca de las anomalías oculares en niños afectados del SAF. Estas incluyen anomalías del ojo y sus anexos (estrabismo, blefaroptosis, epicanto), así como defectos intraoculares (catarata, glaucoma y anomalías retinianas y del nervio óptico). Más de la mitad de los niños estudiados tenían una hipoplasia del nervio óptico. Haciendo un estudio comparativo en ratas expuestas al alcohol pre y perinatalmente, encontraron que el nervio estaba seriamente afectado y presentaba las siguientes alteraciones:

- 1.- Las células macrogliales y los axones ópticos estaban dañados ultraestructuralmente.

- 2.- El diámetro de la sección del nervio óptico, el área nuclear de la célula glial, el diámetro axonal y el número total de axones del nervio óptico, mostraban valores significativamente menores que en el grupo control.

- 3.- La retina de los animales expuestos al alcohol, mostraban menor grosor y menor volumen del área nuclear en las células ganglionares que las retinas controles.

En los estudios realizados por Hernández (1994) para la realización de su

tesis doctoral, utilizando el embrión de pollo como modelo animal, se concluye que el etanol produce en la retina un incremento de los espacios intercelulares en todas las capas de la misma, una disminución del número de neuronas, tanto en la capa nuclear externa como en la capa nuclear interna y gran vacuolización tanto de la capa de células ganglionares como en la capa de fibras del nervio óptico y la presencia de material degenerativo procedente de células picnóticas. También ha podido describir un retraso de la diferenciación de las capas sinápticas y una disminución final del número de sinapsis. Según la autora, la migración neuronal no se ve alterada, al menos, desde el punto de vista del posicionamiento final de las células; no obstante, en los embriones tratados con etanol, detecta un retraso migratorio de, aproximadamente, dos días (Hernández, 1994).

En los estudios realizados por Berraquero, en 1983, sobre los efectos del etanol suministrado a embriones de pollo a partir del 4º día de incubación (E4) y en dosis de 5 y 10 μ l, se afirmaba que producía un retraso de 2-4 estadios de desarrollo sobre los procesos de migración y diferenciación celular de la retina. Los trabajos realizados por Rodríguez (1985) no solo corroboran dichos datos sino que confirman que el retraso producido por el etanol durante el desarrollo de la retina en embriones de pollo es progresivo. Estos datos están justificados, por la autora, en el hecho de que embriones tratados con la misma dosis de etanol al 4º día de incubación (E4) y sacrificados al 20º día de incubación (E20) todavía no han comenzado en este último estadio el proceso de sinaptogénesis y

al hecho de que es frecuente observar cuerpos de células amacrinas invertidas que no han alcanzado aún, en su proceso migratorio, la capa de células ganglionares.

Brodie y Vernadakis (1990) mostraron que los sistemas de neurotransmisores podían alterarse en el embrión de pollo con un tratamiento de alcohol en estadios iniciales. De esta forma demuestran que el etanol, administrado a embriones con 1 (E1) ó 2 (E2) días de incubación, disminuye significativamente la actividad de la enzima colinérgica Colin Acetil Transferasa (CAT). No obstante es importante matizar que pequeños cambios en los niveles de neurotransmisores pueden causar dramáticos efectos en el desarrollo cerebral (Druse, 1986).

El alcohol altera las células nerviosas durante la migración y diferenciación, desorienta los axones que se están desarrollando, bloquea la expresión de neurotransmisor GABA en la población de neuronas que posee receptores GABA-A y bloquea la expresión de una proteína asociada a filamentos intermedios que es reconocida por el anticuerpo monoclonal 3CB2. Las células ganglionares son las más alteradas, produciéndose una hipoplasia de la capa de fibras del nervio óptico (Chmielewski y col., 1996).

Perry (1982) estudió el efecto del etanol en los niveles de aminoácidos cerebrales y entre otros efectos, encuentra que el etanol reduce los niveles de

GABA en el cerebro.

Rodríguez (1985) observa que los embriones tratados con 10 μ l de etanol:

A) al 6° día de incubación (E6) muestran ultraestructuralmente un gran retraso en la diferenciación de los fotorreceptores, que se aprecia por el retraso o la falta de formación de sus segmentos externo e interno y de las gotas de grasa.

B) gran retraso en desarrollo glial según pone de manifiesto la ausencia de microvilli gliales por fuera de la membrana limitante externa.

C) carecen al 20° día de incubación (E20) de sinapsis a nivel de sus capas plexiforme externa e interna

D) en las capas plexiformes de los embriones experimentales de 20 días de incubación (E20), se observan numerosos conos de crecimiento que ponen de manifiesto la gran inmadurez de los citados embriones.

E) mayor número de degeneraciones y picnosis en los estratos más profundos de la capa nuclear interna, siendo las células que más se alteran aquellas estirpes que se forman a partir del elemento horizonto-amacrino, el cual dará lugar a las células horizontales, células amacrinas y células amacrinas invertidas.

F) retraso en el proceso migratorio celular al observarse un gran número de células ubicadas en la capa plexiforme interna y un menor número de neuronas a nivel de la capa de células ganglionares.

Según Rodríguez (1985), junto a las anomalías específicas en su histogénesis, las neuronas retinianas de los embriones tratados con 10 μ l de etanol muestran las alteraciones subcelulares similares a las que diversos autores (Armengol y col., 1979) (Sandor y Amels, 1971) encuentran en otras partes del Sistema Nervioso Central, entre las que destaca la degeneración mitocondrial así como la presencia de cuerpos multivesiculares y alteraciones del aparato de Golgi.

Una inyección de etanol en saco vitelino al comienzo de la diferenciación celular de la retina retrasa la sinaptogénesis en la capa plexiforme interna y produce una abundante muerte de células ganglionares y una gran disminución de axones mielínicos (Chmielewski y col., 1997).

El alcohol interactúa con la membrana celular modificando las propiedades de varias proteínas e inhibiendo la síntesis proteica. Los niveles de actividad enzimática, en la membrana celular de animales expuestos a alcohol, son más bajos; muchos de estas enzimas son importantes en el control de la composición del líquido extracelular y en el transporte a través de la membrana, además de, en mantener la viabilidad celular. Al alterar la habilidad de la célula para controlar su ambiente interno, los procesos normales relativos del desarrollo, no pueden llevarse a cabo (Zajac y Abel, 1992).

La exposición a etanol durante el desarrollo neural conduce a una

pérdida neuronal considerable, en muchas regiones del cerebro. El etanol induce un incremento en la apoptosis y en la necrosis, dependiendo de la dosis (McAlhany y col., 2000).

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular, regulado intrínsecamente, que capacita al organismo para eliminar activamente células dañadas, envejecidas o superfluas durante la embriogénesis, la maduración del sistema inmune y el recambio de tejido adulto (Kerr y col., 1972; Steller, 1995).

La apoptosis puede ser inducida por estímulos fisiológicos y patológicos (Thomson, 1995); el último incluye el alcohol (Nanji, 1998). Se ha demostrado que el consumo de alcohol incrementa la apoptosis en ratones (Goldin y col., 1993), ratas (Slomiany y col., 1999; Mi y col., 2000), cobayas (Halsted y col., 1996) y humanos (Zhao y col., 1997).

Elías y Mary Michaelis (1986) estudian las alteraciones moleculares que provocan el efecto del alcohol en el Sistema Nervioso Central Fetal. Su hipótesis es que la exposición prenatal al alcohol conlleva unos elevados niveles intracelulares de calcio que producen la muerte celular.

Una intoxicación aguda por etanol provoca un estrés oxidativo y cambios perjudiciales para la estructura celular, localizados mayormente en los microsomas del hígado pero, a continuación, se produce una rápida reparación;

si este abuso es repetido más a menudo, estos cambios pueden conducir a un daño alcohólico severo en el tejido hepático (Zloch, 1994).

La adaptación de la membrana celular al alcohol *in vivo* da lugar a la modificación de su fluidez (Chin y Goldstein, 1977), debido a la reducción del contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Littleton y John, 1977). Por otra parte, el etanol incrementa el contenido de colesterol en las membranas (Chin y col., 1978) y este incremento conduce a una disminución de su fluidez (Johnson y col., 1979). Entre los lípidos de membrana, el colesterol juega un papel importante en el desarrollo y crecimiento celular (Chin y col., 1978; Chin y Goldstein, 1984; Johnson y col., 1979). La modulación de gran variedad de funciones de la membrana plasmática son consecuencia de cambios en el colesterol. Se ha observado un incremento del contenido de colesterol en las membranas celulares del cerebro, eritrocitos y hepatocitos de ratones y ratas, tratadas con etanol (Chin y col., 1978).

Una exposición prolongada con alcohol incrementa la cantidad de grasa en el hígado y altera la composición en ácidos grasos del plasma, hígado, cerebro y retinas de gatos (Pawlosky y Salem, 1995).

Durante la intoxicación crónica con etanol, se puede encontrar en varias partes del SNC y en el hígado de animales experimentales, cambios oxidativos de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y otras bioestructuras, por un lado

(Nordmann y col., 1990), así como una disminución en el potencial antioxidativo protector, por otro lado (Chen y col., 1992; Zidenberg-Cherr y col., 1990). Los resultados de experimentos en animales y estudios sobre las condiciones de salud de personas, demostraron que en la etiopatogénesis de un daño inducido por el alcohol en un órgano, la destrucción oxidativa de las membranas juega un papel destacado, manifestándose, sobre todo, por el incremento de la peroxidación de los lípidos de las membranas (Bautista y Spitzer, 1992; Rashba-Step y col., 1993).

La toxicidad del alcohol está causada, ante todo, por la generación de radicales libres en varios tejidos (Mantle y Preedy, 1999). La peroxidación lipídica es el mecanismo de lesión de membrana inducido por radicales libres mejor conocido. Este proceso incrementa la rigidez de la bicapa lipídica, disminuye la permeabilidad de la membrana celular a iones monovalentes (Slater, 1984), modifica la actividad de algunas enzimas ligadas a ésta y altera el funcionamiento de receptores anclados en la membrana, produciendo un daño irreversible que conduce a la muerte celular. (Figura 6).

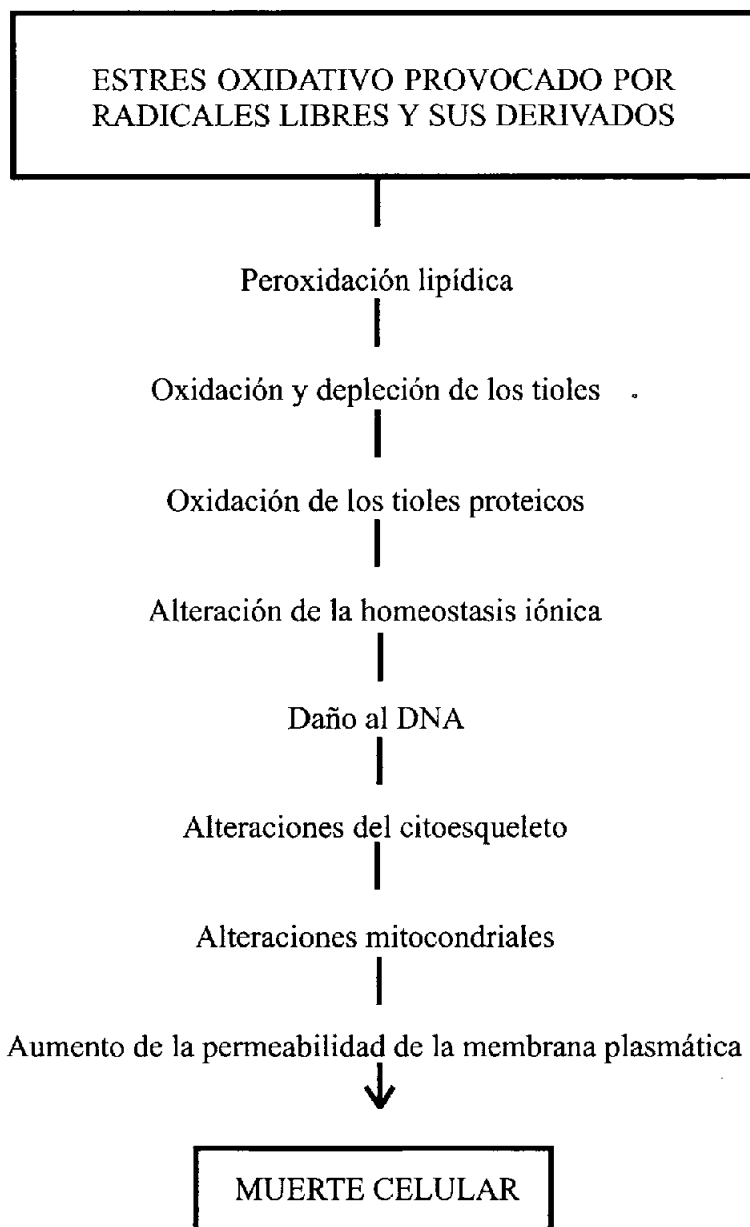


Figura 6. Esquema del daño celular producido por la peroxidación lipídica

El hígado de cobayos alcohólicos no presentó un cambio significativo en el perfil de triglicéridos y fosfolípidos; por el contrario, sí incremento significativamente el porcentaje de C18:1(n-9) y C18:2(n-6) y disminuyó en el porcentaje de C16:0, C20:3(n-6), C20:4(n-6), C22:4(n-6), C22:5(n-6), C22:5(n-3) y C22:6(n-3) en comparación con los controles (Hidiroglou y Madere, 1999)

En cobayos alimentados con etanol, se demostró que el C20:4(n-6) disminuye con un concomitante incremento del C18:1(n-9) en el hígado, el suero y el músculo; debido a una disminución de la actividad desaturasa y al desplazamiento competitivo del C20:4(n-6) de la fracción lipídica por otros ácidos grasos, principalmente ácido oleico y linoleico (Nakamura y col., 1992).

En el cerebro y la retina de gatos expuestos a un tratamiento crónico de alcohol, C22:6(n-3) disminuyó habiendo un incremento compensatorio de C22:5(n-3) (Pawlosky y Salem, 1995). Bajas concentraciones de C22:6(n-3) están asociadas con pérdida de función visual o cerebral (funciones del Sistema Nervioso) (Neuringer y col., 1984).

2.4. COMPONENTES MINORITARIOS DEL ACEITE DE OLIVA: ESCUALENO

El aceite de oliva es un líquido comestible y de gran valor nutritivo, elemento fundamental de la denominada "dieta mediterránea" y al que cada día se le adjudican mayores beneficios dietéticos.

A partir de la aceituna una vez madura, se extrae por simple presión un líquido grasiento, verde amarillento, transparente y aromático que adereza y conserva los alimentos y que permite un especial cocimiento de los mismos denominado "fritura".

El aceite de oliva es el símbolo característico de la gastronomía mediterránea y posee un indiscutible valor comercial y dietético al ser la única grasa vegetal que se obtiene del fruto y no de la semilla, y que no necesita tratamientos posteriores al de su extracción natural para ser consumido directamente por el hombre.

Pero, tradicionalmente, el aceite de oliva ha sido muy apreciado no solo por sus virtudes alimenticias sino también por sus virtudes curativas; al aceite de oliva se le han considerado propiedades antisépticas (formaba y sigue formando parte de la composición de ungüentos y pomadas), propiedades hipotensoras y propiedades digestivas.

Desde el punto de vista químico, el aceite de oliva lo podemos dividir en dos fracciones (Saenz y col., 1998): una fracción saponificable, es decir, aquella fracción que se convierte en jabones cuando es tratada con una base fuerte y que constituye del 98 al 99% del aceite, formada por los triglicéridos y otra parte que son los componentes menores que constituyen ese 2% (formado por el

insaponificable y los polifenoles) y que, aún cuando es pequeña en proporción, confieren al aceite actividades biológicas muy específicas.

Las fracciones que constituyen los componentes menores por orden creciente de su polaridad en cromatografía de capa fina son: hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes grasos, alcoholes triterpénicos, 4-metilesteroles, esteroides, dialcoholes triterpénicos, pigmentos coloreados polares (clorofilas y feofitinas) y polifenoles.

Una de las grandes diferencias entre los aceites de oliva virgen y los demás aceites vegetales la constituye el contenido de hidrocarburos. Mientras que en el aceite de oliva virgen esta fracción supone aproximadamente el 50% del insaponificable, en los demás aceites esta fracción es menor del 5%.

El hidrocarburo de mayor importancia en el aceite de oliva virgen es el escualeno, triterpeno poliinsaturado constituido por la condensación de seis unidades de isopreno que constituye un precursor, no se sabe con certeza si obligado, en la biosíntesis del colesterol y de todas las hormonas esteroideas (Figura 7). Supone más del 90% de la fracción de hidrocarburos y se halla en una cuantía de 1250 a 7500 mg/kg de aceite. El contenido de escualeno en el aceite depende de la variedad de oliva cultivada (Manzi y col., 1998), de la tecnología de extracción del aceite (Nergiz y Ünal, 1990) y se reduce de forma espectacular durante el tratamiento de refinación (Lanzón y col, 1994).

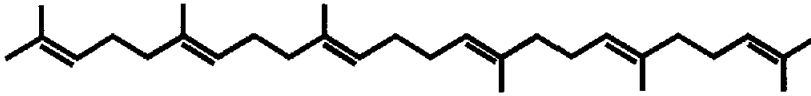


Figura 7. Estructura del escualeno. $C_{30}H_{50}$. 2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosanohexano. Tomado de Gunstone y col.(1986) *The lipid handbook*.

La presencia de escualeno y compuestos fenólicos en el aceite de oliva son los responsables de la baja susceptibilidad del aceite de oliva a la oxidación (Gerber, 1994; Psomiadou y Tsimidou, 1999).

El escualeno es un inhibidor de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Strandberg y col., 1989) y se ha propuesto que inhibe la famesilación de las oncoproteínas *ras* (Newmark, 1997). Se ha mostrado que el escualeno posee una actividad promotora antitumor en roedores (Murakoshi y col., 1992), inhibe la hiperproliferación en líneas celulares mamarias (Katdare y col., 1997) y tiene un efecto radioprotector en ratones expuestos a irradiación letal de cuerpo completo (Storm y col., 1993).

Estudios epidemiológicos y experimentales han sugerido que un incremento, en la dieta, de la ingesta de aceite de oliva juega un papel beneficioso en la prevención de ciertos tipos de cáncer (Gerber, 1994). Estudios

con modelos animales de laboratorio han mostrado que el aceite de oliva o no tiene efectos, o tiene un efecto protector, sobre la prevención de una variedad de tumores inducidos químicamente, como el cáncer de pulmón (Smith y col., 1998), el cáncer de colon (Chinthalapally y col., 1998), el cáncer de piel (Murakoshi y col., 1992). Además, algunos estudios han revelado que el escualeno potencia los efectos de diversos agentes anticancerígenos (Yamaguchi y col., 1985; Ikikawa y col., 1986; Ohkima y col., 1983).

La actividad beneficiosa del aceite de oliva ha sido atribuida a su alto contenido (entre un 55-85%) de ácido oleico (C18:1(n-9)). Pero la mayoría de los estudios realizados con grasas animales que son ricas en ácido oleico, como la carne de vaca y aves de corral (35-45% de la grasa) y con grasas vegetales, como el aceite de maíz (25-35%), oleínas de palma (43%), aceite de cacahuete (45-52%), aceite de soja (25%) y aceite de semilla de girasol (30-35%), han sido, en gran parte, asociadas con un incremento en el riesgo de cáncer de colon y cáncer de mama en humanos. También, estos tipos de grasas mostraron ser, generalmente, promotores de tumores inducidos químicamente en animales (Cohen y col., 1986; Reddy, 1986; Reddy, 1992). Entonces parece que el ácido oleico contenido en el aceite de oliva no puede justificar su efecto protector o la ausencia de efecto promotor en el desarrollo del cáncer.

El escualeno, hallado por vez primera en el hígado de los tiburones, se encuentra en pequeñas cantidades en el hígado de la mayoría de animales

superiores (Lehninger, 1982). Está presente en el aceite de oliva en concentraciones entre el 0.2-0.7%. En otras grasas y aceites comunes de la dieta humana constituye solo el 0.002-0.03% (Liu y col., 1976). Agencias reguladoras en la legislación de alimentos confían a menudo en el contenido de escualeno para determinar la diferencia entre aceites de oliva vírgenes y refinados.

El tiburón, que es resistente al cáncer (Mathews, 1992), tiene niveles de escualeno inusualmente altos en los tejidos. El aceite de hígado del tiburón contiene un 40% o más escualeno (Liu y col., 1976; Becker, 1989), siendo particularmente alto en el aceite de hígado del cazón (*Centrophorus atromaginitus Garman*), donde se ha registrado sobre un 90% de escualeno (Becker, 1989).

Strandberg y col. (1989) han registrado que ratas alimentadas con una dieta de 1% de escualeno durante 5 días suprimían fuertemente (80% aproximadamente) la actividad HMG-CoA reductasa en los microsomas del hígado, por lo que la síntesis de colesterol a partir de acetato y mevalonato es inhibida por el escualeno de la dieta. La inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa, un paso control limitante en la vía de la biosíntesis del colesterol, puede conducir a la reducción de una serie de intermediarios, tales como el mevalonato, geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato. El farnesil pirofosfato es una fuente para la prenilación de oncogenes. Muchos oncogenes, tales como *ras*, codifican proteínas producidas en el ambiente acuoso del citosol celular pero

requieren trasladarse a la membrana plasmática celular para activarse. Esto es realizado por unión del farnesol, aportado a partir del farnesil pirofosfato, por medio de un sistema enzimático especializado (Kato y col., 1992). La prevención de la farnesilación impide la activación de proteínas de oncogenes como agentes de la señal de transducción en la regulación de la actividad transformante de la célula (Kohl y col., 1995)

Experimentos en ratas mostraron que el escualeno incrementaba significativamente la actividad hepática de la ACAT (acil coenzima A:colesterol aciltransferasa) y el colesterol esterificado en el hígado en experimentos a corto plazo, como consecuencia de un incremento del contenido de colesterol y escualeno en los tejidos (Strandberg y col., 1989; Strandberg y col., 1990).

En ratas, un suplemento de escualeno en la dieta da lugar a la activación de las vías de síntesis del colesterol (Strandberg y col., 1990). En otros trabajos, un 1% de escualeno en la dieta por periodos de 10 a 21 días, se ha visto que incrementaba los niveles de escualeno en los tejidos, específicamente en el suero, la mucosa intestinal, el hígado y el tejido adiposo (Tilvis y Miettinen, 1983)

El escualeno en la dieta puede ser convertido a colesterol en el hígado y en la mucosa intestinal y entonces aumentar la producción de colesterol y ácidos biliares (Miettinen, 1984). Sin embargo, a pesar de una producción de colesterol

incrementada, una alta ingesta de escualeno no parece estar asociada con un alto riesgo de aterosclerosis, ni en estudios epidemiológicos (Keys y col., 1986), ni en estudios experimentales tempranos (Kritchevsky y col., 1954). En una dieta rica en escualeno, éste es absorbido y convertido a colesterol en el tejido (Strandberg y col., 1989), pero este incremento, en colesterol, no está asociado con un aumento en los niveles del mismo en suero (Miettinen, 1986; Strandberg y col., 1990).

El escualeno es uno de los lípidos principales de la piel en humanos. Bajo la exposición a la luz solar, parece ser el primer lípido diana en la superficie de la piel, actuando como un eficaz captador de oxígeno libre o especies reactivas de oxígeno en la peroxidación lipídica (Kohno y col., 1995). El efecto radioprotector del escualeno en ratones irradiados y la actividad antitumoral en el cáncer de piel parece deberse a sus propiedades antioxidantes (Murakoshi y col., 1992; Storm y col., 1993).

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

El aceite de oliva es el aceite consumido, por excelencia, en la zona mediterránea y posee un indiscutible valor comercial y dietético. Tradicionalmente se le han atribuido propiedades hipotensoras y propiedades antisépticas, relacionándolo con una disminución en las enfermedades cardiovasculares.

Los efectos beneficiosos de este aceite, hasta ahora han sido atribuidos a las altas concentraciones de ácido oleico que tiene el aceite de oliva (70-85%). Sin embargo debemos señalar que el aceite de oliva virgen contiene otros componentes minoritarios cuya actividad biológica no está aún bien estudiada, tal es el caso del escualeno, cuya concentración varía de 1250 a 7500 mg/kg de aceite. Hasta ahora todos los estudios antiguos habían indicado que el

escualeno, al ser un precursor hepático del colesterol, podría ser un elemento negativo, ya que podría aumentar los niveles de éste en todos los tejidos.

Nuestro objetivo fue demostrar la actuación del escualeno a otro nivel. Elegimos ver si era capaz de reparar los daños provocados por el alcohol. Para ello, se requería en primer lugar conocer la interacción del etanol sobre la morfohistogénesis y la composición lipídica de la retina y, a continuación, observar que cambios se producían en los embriones al aplicarles alcohol y escualeno.

Después de una amplia revisión bibliográfica, se utilizó, como modelo comparativo, embriones de pollo tratados con alcohol, dado la especial vulnerabilidad del SNC a la ingesta de éste y a que plantea una mayor problemática social dentro del Síndrome Alcohólico Fetal.

Se diseñó estudiar los cambios en la composición lipídica de la retina dado que los lípidos son constituyentes esenciales de la retina y el metabolismo lipídico es de suma importancia para la función fisiológica de la retina y, además, es la que estaría más relacionada con la ingestión de escualeno (Fliesler y col., 1983a).

Ha sido elegido el embrión de pollo como modelo de experimentación animal porque facilita el análisis de los efectos directos, tanto del etanol como

del escualeno, sobre el crecimiento con la independencia de factores placentarios y de interacciones maternas. Además, el embrión de pollo permite estudios sobre desarrollo embrionario temprano debido a la fácil accesibilidad y las grandes dimensiones de los embriones jóvenes.

La retina es un magnífico "campo de pruebas" para el estudio del Sistema Nervioso Central, con una perfecta organización estructural, relativamente simple comparada con otras partes del cerebro, y de gran accesibilidad, siendo la porción más accesible del SNC.

En nuestros laboratorios, anteriormente, se ha estudiado la morfología adulta, morfohistogénesis y diferenciación de las células de la retina, así como estudios inmunohistoquímicos de neurotransmisores y marcadores celulares, de los cuales, conocemos su patrón de diferenciación. De igual manera se han estudiado las alteraciones morfológicas que el alcohol induce sobre la retina, pero nunca se había relacionado estas alteraciones con el nivel de lípidos. Estas bases nos han servido de elementos comparativos para el estudio de los efectos que el escualeno induce sobre la retina.

Con todo ello se pretende lograr un mayor conocimiento que sea fundamento real de los planteamientos preventivos para la ingesta de alcohol. Si bien los resultados no se pueden extrapolar a humanos por razones evidentes, si es nuestra intención lograr un mayor conocimiento sobre el tratamiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS EMBRIONES

"IN OVO"

Para la realización del presente trabajo, incubamos huevos fértiles de pollo de la raza White Leghorn en estufa eléctrica de incubación a una temperatura de 37°C y con una humedad relativa del 80-90%.

El tratamiento de los embriones se hizo al 6º día de incubación (E6), inyectando directamente en saco vitelino. Para el estudio de lípidos se llevaron a cabo tres grupos de trabajo: un grupo control, al que se les inyectó una dosis de

10 μ l de una solución salina fisiológica estéril; un grupo alcohol, al que se les inyectó 10 μ l de Etanol absoluto (Merck, Ref. 983); y por último, el grupo A+E, al que se les inyectó 10 μ l de etanol absoluto y 10 μ l de escualeno (Sigma Ref. 3626), siguiendo los trabajos de Means y col. (1988). Para el estudio morfológico se utilizaron, de nuevo, tres grupos de trabajo, pero en este caso se realizó una nueva experiencia, duplicando la dosis empleada en el estudio lipídico. Dichas inyecciones se realizaron en saco vitelino, intentando de este modo asemejar esta experiencia con los casos descritos de intoxicación alcohólica de la madre en mamíferos.

Tras su tratamiento se dejaron los embriones en incubación hasta el momento del sacrificio que se realizó en los siguientes estadios: E7, E11, E15 y E18 para el estudio de la composición lipídica de la retina; en E7 y E11 para el estudio al óptico de semifinos y E19 para la técnica de inmunohistoquímica. 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).

4.2. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS

4.2.1. Extracción de retinas

Las retinas se obtuvieron a partir del globo ocular a una temperatura de 4°C. Después de la disección de la cornea y el cristalino, se eliminó el humor vítreo y se hizo una incisión longitudinalmente en el globo ocular para retirar la retina neural (teniendo un cuidado especial para minimizar la contaminación debida a la capa pigmentaria y la coroides; aún así, la presencia de pequeños restos fue inevitable). Las retinas fueron colocadas en solución salina en un tubo Eppendorf y centrifugadas a 6000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y las retinas fueron pesadas y congeladas en nitrógeno líquido.

4.2.2. Extracción y separación de lípidos

Los lípidos se extrajeron según el método de Folch y col. (1957), en presencia de BHT (butilhidroxi-tolueno) como antioxidante. La disociación del tejido se realizó mediante homogenización en una mezcla fría de cloroformo/metanol (2:1, v/v). El extracto de lípidos se conservó en tubos de vidrio con cierre teflón en una atmósfera de nitrógeno a -30°C hasta su uso. El esquema queda detallado en la figura 8.

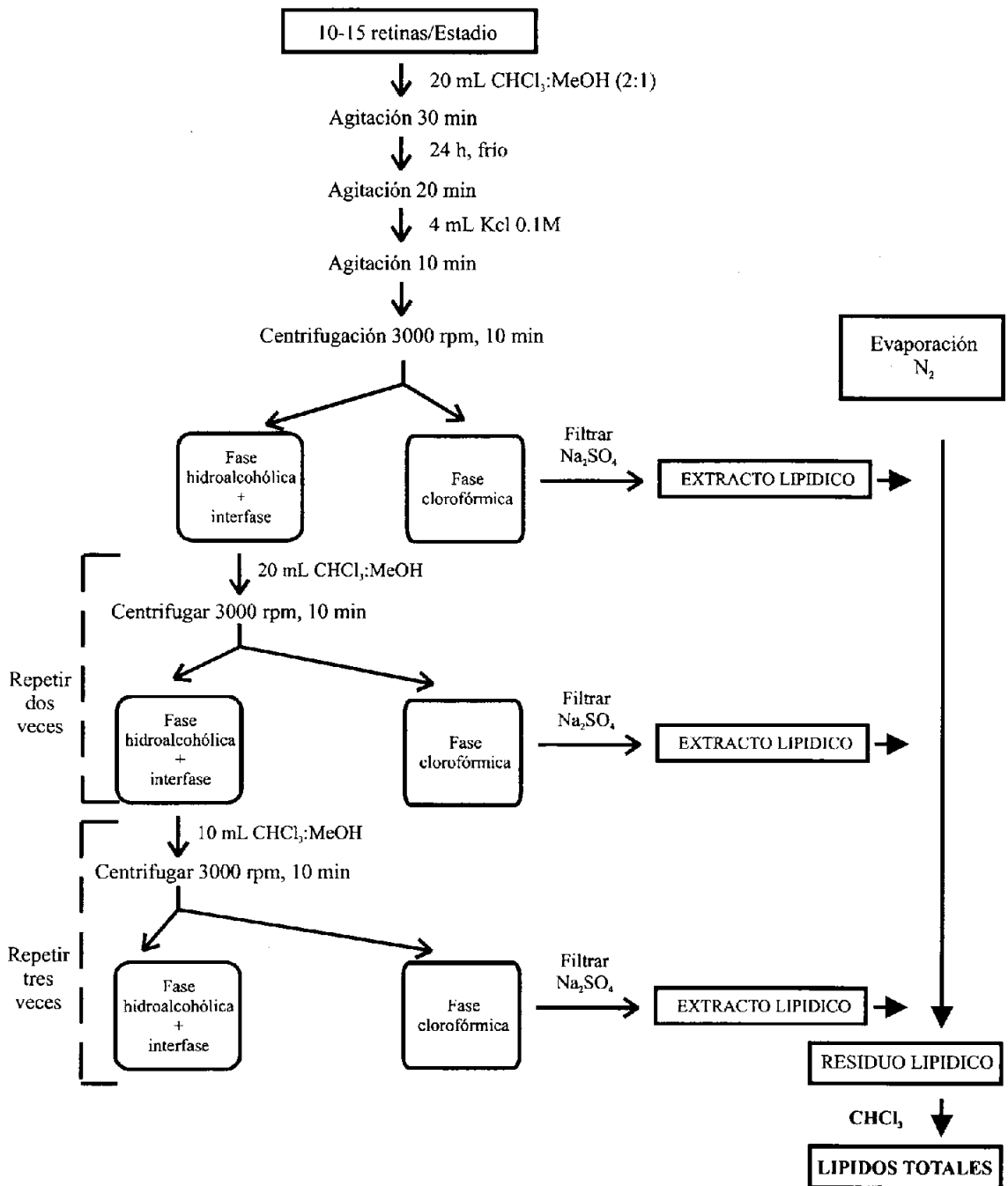


Figura 8. Extracción de lípidos de retina de pollo

La composición de lípidos y fosfolípidos se obtuvo por medio de la técnica de Iatroscan TLC/FID (Muriana y col., 1993, 1995; Ruiz-Gutiérrez y col., 1995). El Iatroscan MK-5 se usó en combinación con un Chromarods S (microvarillas de cuarzo recubiertas con una delgada capa de sílica activa). Los Chromarods S se guardaban de forma rutinaria en ácido sulfúrico 4,5M. Antes de su uso, las varillas se lavaban con agua destilada, se secaban a 110°C durante 15 minutos y se activaban haciéndolas pasar a través de la llama del detector Iatroscan. Tres μL de fosfolípidos o lípidos totales se colocaban sobre cada varilla usando una jeringa Hamilton de 10 μL . Para separar los lípidos totales, las varillas se desarrollaron en hexano/dietil éter/ácido fórmico (90:10:2 v/v/v). Los fosfolípidos se determinaron en dos pasos, empezando con un desarrollo inicial en cloroformo/metanol/ácido acético/agua (67:28:2:3, v/v/v/v), secados a 70°C durante 10 minutos, y seguido por un segundo desarrollo en hexano/dietil éter/ácido fórmico (90:10:2, v/v/v). Las varillas se examinaron bajo las siguientes condiciones: flujo de hidrógeno, 175 mL/min; flujo de aire, 1850 mL/min; velocidad del escáner, 47 mm/seg; velocidad de carta, 42 mm/min. Se utilizó un integrador Iatroscorder TC-11 para registrar e integrar las áreas pico.

4.2.2.1. Análisis de ácidos grasos

El estudio de la composición y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996). Las muestras eran saponificadas por calentamiento a 120°C durante 20 minutos con 5 ml de metilato sódico 0.2M y calentándolas de nuevo a 120°C durante 20 minutos con

ácido sulfúrico al 6% en metilato anhidro. Con la finalidad de extraer los ésteres metílicos formados se añadió hexano y agua saturada de sal. La operación se repitió hasta cinco veces con el fin de extraer todos los ésteres metílicos. El proceso queda detallado en la figura 9. Los ésteres metílicos fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II equipado con un detector de llama ionizada y usando una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (60m X 0.32mm ID y espesor de membrana 0.25 μ m). La temperatura del inyector y detector fue de 250°C. La temperatura del horno fue programada de 180-210°C a una velocidad de 2°C/min. Como gas portador se utilizó helio con una velocidad de 2ml/min y 250 KPa de presión en cabeza de columna. Los metil éster de ácidos grasos individuales, se identificaron según describe Ruiz-Gutiérrez y col. (1992).

Para obtener el espectro de masas, se usó un sistema que consistía en un cromatógrafo de gases HP-5890 conectado a un espectrómetro de masas AEI MS-30 VG/70 y a un analizador de datos VG-11/250 (VG-Analytical, Manchester, UK). El análisis se llevó a cabo en una columna de sílica Supelcowax-10 (60m X 0.25mm ID y espesor de membrana 0,25 μ m) con helio como transportador del gas. La temperatura de la columna se programó de 130 a 200°C con un incremento de 2°C/min, con lo que el tiempo total fue de 100 minutos. La temperatura del inyector fue de 250°C, y las condiciones del espectrómetro de masas fueron: impacto de ionización del electrón, 70eV; voltaje de aceleración, 4kV; corriente de emisión, 100 μ A; temperatura de la

fuelle de iones, 200°C. Cada metil éster de ácido graso presente en el extracto se identificó por comparación con el tiempo de retención y el espectro de masas de componentes conocidos.

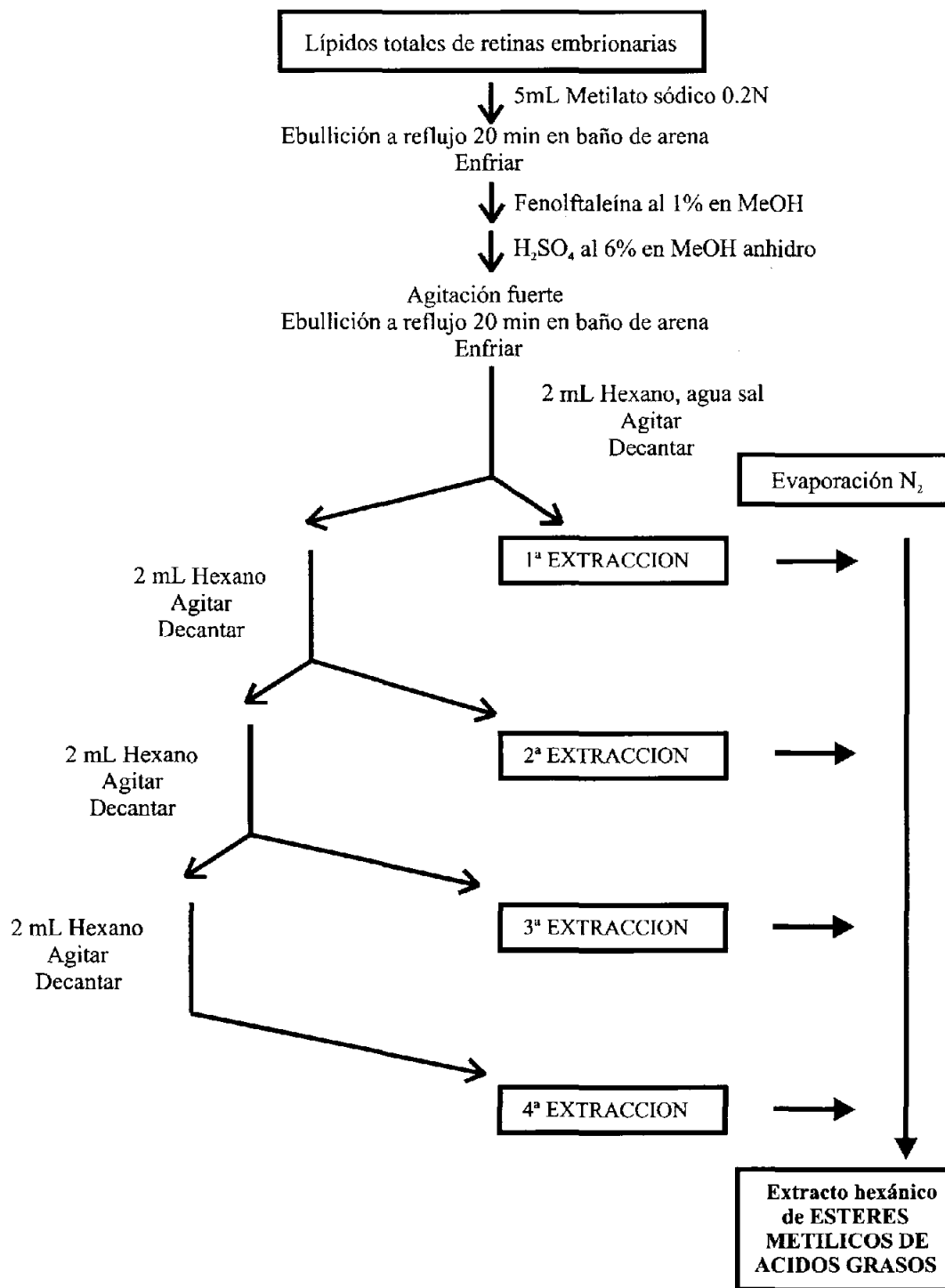


Figura 9. Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos

4.2.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

Para poner de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos se realizó un análisis de la varianza ANOVA (Gutiérrez, 1978), seguido de una prueba de mínima diferencia significativa LSD (*least significant difference*) propuesta por Fisher (Box, 1978) que pone en evidencia de manera sencilla la disparidad entre los valores analizados, siempre que la F de Snedecor del ANOVA sea significativa.

La diferencia entre los valores experimentales se ha considerado significativa desde $p < 0.05$. La simbología adoptada para denotar la existencia de diferencias significativas entre los lotes es la siguiente:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus Control

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, versus Alcohol

4.3. ESTUDIO AL MICROSCOPIO ÓPTICO

4.3.1. ESTUDIO DE SEMIFINOS

Las retinas embrionarias fueron extraídas bajo microscopio estereoscópico, estando inmerso el globo ocular en la solución fijadora a 4°C y en un recipiente rodeado de agua-hielo, para mantener dicha temperatura constante durante la disección.

Una vez extraídas las retinas, fueron fijadas según el proceder propuesto para el estudio del SNC del embrión de pollo por Palay y Chan-Palay en 1974: se disecaron las retinas a 4°C en fijador con 2.5% paraformaldehído, 25% glutaraldehído, tampón fosfato 0.4M, 0.5% cloruro cálcico y agua destilada, donde permanecieron durante 24 horas.

Posteriormente, las piezas de tejido fueron lavadas mediante 3 pasos de 10 minutos cada uno a 4°C, en solución de lavado con tampón fosfato 0.12M, 8% sacarosa y cloruro cálcico 0.02mM. Posteriormente, fueron postfijados en tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0.12M y con sacarosa al 7%, durante 2 horas a 4°C y preservado de la luz.

Una vez finalizada la fijación, las retinas fueron deshidratadas en una serie creciente de alcohol. Tras la deshidratación, las piezas de retinas 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 en 1969, compuesto por: 10gr VCD (dióxido de vinilciclohexano), 6gr DER-76, 26gr NSA (anhídrido nonenilsuccínico), 0.4gr Dimetilaminoetanol.

La inclusión se realizó en Easy-molds LKB 2208-180, siendo el tiempo de polimerización de 24 horas a 70°C.

Para su estudio al microscopio óptico se realizaron secciones semifinas de 1-2 micras de espesor con cuchilla de vidrio, que fueron teñidas según la técnica de Richardson y col., (1960): Azur 1%-Azul de metileno 1% a partes iguales, durante 2 minutos a 60°C y fotografiadas con un microscopio Zeiss Axioplan con cámara fotográfica incorporada.

4.3.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS DISOCIADAS

Las retinas fueron extraídas y disociadas según el método descrito por Prada y col. (1991). Se llevó a cabo una disgregación mixta: mecánica y enzimática. Las retinas, extraídas del globo ocular, se trocearon finamente con tijeras en 200µl de sacarosa al 6%. Inmediatamente antes de comenzar la disociación, se preparó una solución stock de proteasa en sacarosa al 6%, con una concentración de 0.4mg. proteasa/ml.

La proteasa utilizada no está comercializada y fue extraída de *Streptomyces* y facilitada por el Departamento de Investigación de Fermentaciones y Síntesis Española S.A. Se trata de una preparación cruda con un amplio espectro de actividad proteolítica. Es parcialmente inhibida por inhibidores de la tripsina, y fuertemente inhibida por bajas concentraciones de diisopropilfluorofosfato, un inhibidor específico de serín proteasas. Técnicamente

es descrita como un complejo de serin-proteasas y queratinasas. La preparación no contiene lipasas, nucleasas, amilasas ni glicosidasas.

Las retinas bien troceadas se incubaban en una solución de sacarosa al 6% que contenía entre 0.035 y 0.1 mg/ml de proteasa, tomados en alícuotas de la solución stock. El volumen del medio de disociación variaba de 300 a 800 μ l por retina. La disociación enzimática se realizó a 34°C y fue completada con una disociación mecánica. Esta consistió en pipetear 10 veces, muy suavemente, el medio de incubación al comienzo de la disociación y cada 10 minutos. El proceso era seguido visualmente por observación de pequeñas alícuotas en un fotomicroscopio Zeiss equipado con contraste de fases. La disociación era detenida entre los 60 y los 150 minutos, cuando obteníamos una concentración idónea de las células que nos interesaban, bien preservadas morfológicamente.

La suspensión celular obtenida podía utilizarse para estudiar la morfología de las células directamente, por contraste de fases, o bien podía extenderse en cubres o portas y fijarse. Para el estudio de la forma de las células *in vivo* se disponían de alícuotas de la suspensión celular sobre portaobjetos y se cubrían con cubreobjetos. La suspensión también se extendió sobre portas gelatinizado para, una vez secadas con aire, ser fijadas. Como fijador para observar la morfología celular empleamos paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.6 durante 30 minutos, seguido de tres lavados de 15 minutos en agua destilada. Los portas fueron secados nuevamente a

temperatura ambiente.

4.3.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Para la técnica inmunohistoquímica, se utilizaron dos marcadores: MOSP que reconoce una proteína específica de mielina que se expresa en oligodendrocitos y anti-glutamina sintetasa que reconoce el enzima glutamina sintetasa (GS) que se localiza en las células de Müller y, aparentemente, también en una población de células gliales, posiblemente astrocitos, localizados a nivel de la capa de células ganglionares.

Se realizó un doble marcaje, utilizando como primeros anticuerpos: MOSP (Chemicon International Inc., Ref. MAB328) y antiglutamina sintetasa (Transduction Laboratories, Ref. G45020); y como segundos anticuerpos: un antimouse IgM conjugado con isocianato de fluoresceína (Sigma, Ref. F9259) y un antimouse IgG marcado con rodamina (Sigma, Ref. T7782).

Los portas con las células disociadas se preincubaron en suero de pollo al 10% en PBS con triton X-100 al 0.25% durante 30 minutos y posteriormente se incubaron con los primeros anticuerpos, a una dilución 1/100 en PBS con 0.15% de triton X-100, durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos en PBS con 0.15% de triton X-100, las secciones fueron incubadas con los segundos anticuerpos marcados con fluoresceína y rodamina, respectivamente, a una dilución 1/50 con 0.15% de triton X-100,

durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron tres lavados, de nuevo, en PBS con 0.15% de triton X-100, y 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 400ASA TMAX de Kodak.

5. RESULTADOS

Clasificamos los resultados de nuestras observaciones en dos apartados que corresponden a los objetivos planteados al comienzo de nuestro estudio y a las distintas técnicas empleadas:

1. Composición lipídica de la retina en embriones control, embriones experimentales tratados con alcohol y embriones experimentales tratados con alcohol y escualeno, conjuntamente, en distintos estadios del desarrollo.

2. Efectos estructurales y funcionales que produce el alcohol, por un lado, y el alcohol y el escualeno, por otro lado, en la retina del embrión de pollo.

5.1 ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA RETINA EN EL EMBRIÓN DE POLLO EN GRUPOS CONTROL, GRUPOS TRATADOS CON ALCOHOL Y GRUPOS TRATADOS CON ALCOHOL + ESCUALENO

5.1.1. ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS TOTALES

La Tabla I muestra los efectos en los distintos estadios del desarrollo sobre el contenido total de lípidos de la retina del pollo en grupos control, grupos tratados con alcohol y grupos tratados con alcohol y escualeno (A+E), expresados como la media \pm la desviación estándar.

Una comparación sobre la composición de fosfolípidos en los distintos grupos de trabajo a lo largo del desarrollo nos muestra que aunque existen diferencias en los distintos grupos, éstas no son significativas (salvo en E7 y E15). Las diferencias más llamativas las encontramos a nivel del colesterol, tanto libre como esterificado. Esto hace que la relación colesterol/fosfolípidos pase del orden de 0.10 en el grupo control, a 0.21 en grupos tratados con alcohol, mientras que la diferencia es menor en grupos tratados con alcohol + escualeno (0.14), como media en los estadios E11, E15 y E18.

TABLA I. Composición lipídica de la retina neural del embrión de pollo en grupos control, grupos alcohol y grupos tratados con alcohol + escualeno.

Lípidos Totales	Grupo Animal	Estadio			
		E7	E11	E15	E18
Fosfolípidos	Control	77.38±0.11	78.65±0.85	81.01±1.68	80.28±0.27
	Alcohol	79.45±0.17**	72.79±5.65	73.64±0.54*	76.62±0.79
	A+E	80.59±0.85**.*#	80.69±0.89	79.00±0.99#	79.19±3.13
Colesterol libre	Control	9.42±0.25	8.38±0.53	6.68±0.06	8.73±0.13
	Alcohol	6.71±0.91	21.16±4.17*	18.80±0.48**	15.18±0.36*
	A+E	6.88±0.55	10.02±0.42#	14.04±0.28**.*#	10.38±1.57#
Colesterol esterificado	Control	11.89±0.21	11.66±0.36	10.92±1.90	9.73±0.13
	Alcohol	7.81±1.26*	0.33±0.13**	0.96±0.04*	2.18±0.06**
	A+E	7.61±0.11*	6.17±0.08**.*#	4.05±2.80*	6.09±0.35**.*#
Diglicéridos	Control	0.99±0.06	1.03±0.01	1.16±0.24	1.04±0.01
	Alcohol	1.89±0.01**	3.72±1.03*	6.32±0.01*	2.51±0.03*
	A+E	2.13±0.06**.*#	2.55±0.30	2.45±1.42#	1.01±0.56#
Acidos grasos libres	Control	0.32±0.01	0.28±0.04	0.23±0.03	0.24±0.01
	Alcohol	4.15±0.17**	1.99±1.12	0.28±0.08	3.52±0.34*
	A+E	2.78±0.36**.*#	0.57±0.08	0.48±0.13*.*#	3.35±0.63*

Los resultados se expresan como: media ± desviación estándar.

* p<0.05, ** p<0.01, versus Control; # p<0.05, ## p<0.01, versus Alcohol (Prueba de mínima diferencia significativa, LSD)

De manera que al estudiar la composición de fosfolípidos respecto a lípidos totales, en E7 se observa un incremento de un 2.68% y un 4.15% en embriones tratados con alcohol y embriones tratados con alcohol + escualeno, respectivamente, con respecto a los grupos control. Mientras que al avanzar el desarrollo, hubo una disminución aproximada del 7% en grupos tratados con alcohol que no fue tan marcada en grupos tratados con alcohol + escualeno (2%, aproximadamente). Véase los gráficos 1.1 y 1.2.

El contenido de colesterol libre disminuyó cerca de un 30% en E7 tanto en embriones tratados con alcohol como en embriones tratados con alcohol y escualeno, después de lo cual se produjo un incremento muy acusado (152% en E11, 181% en E15 y 73% en E18) en embriones tratados con alcohol; mientras que en embriones que recibieron alcohol + escualeno, el incremento no fue tan marcado. Obsérvese los gráficos 2.1 y 2.2.

El colesterol esterificado disminuyó cerca de un 35% en los dos grupos experimentales de 7 días de desarrollo. Esta diferencia se hizo mucho más marcada en los embriones tratados con alcohol de 11 y 15 días de desarrollo (97% y 91%, respectivamente), disminuyendo a un 78% en E18. Los embriones tratados con alcohol + escualeno tuvieron una disminución mucho menor con respecto al grupo control (47% en E11, 63% en E15 y 37% en E18). Véase los gráficos 3.1 y 3.2.

Los niveles de diglicéridos en grupos tratados con alcohol se incrementaron desde un 91% en E7 hasta un 445% en E15 con respecto a los grupos control, para disminuir esta diferencia en un incremento de un 141% en E18 con respecto al control. Estas diferencias no fueron tan significativas en los embriones tratados con alcohol + escualeno, llegando a aproximarse hasta un 3% con respecto al control en E18. Véase los gráficos 4.1 y 4.2.

Los ácidos grasos libres tuvieron un incremento de 1200% en E7 en embriones tratados con alcohol que disminuyó hasta un 22% en E15 para volver a incrementar de nuevo a niveles similares. En embriones tratados con alcohol + escualeno, aunque en un principio la diferencia fue menor 769% en E7, su comportamiento fue similar al de embriones tratados con alcohol. Obsérvese los gráficos 5.1 y 5.2.

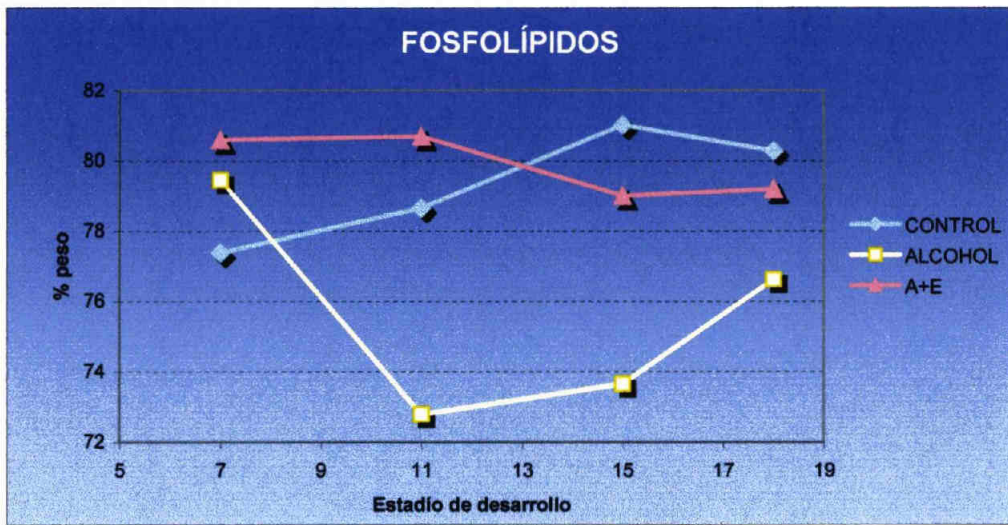


Gráfico 1.1.

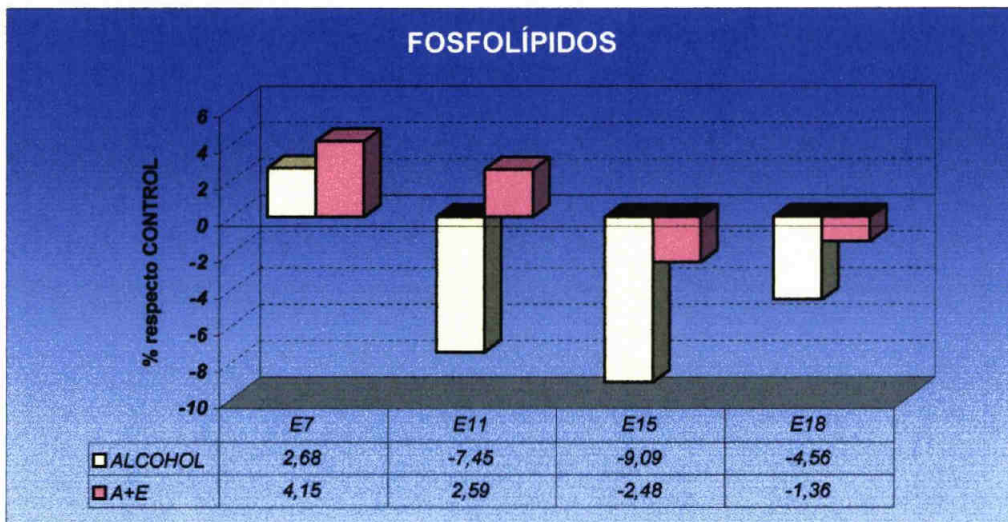


Gráfico 1.2.

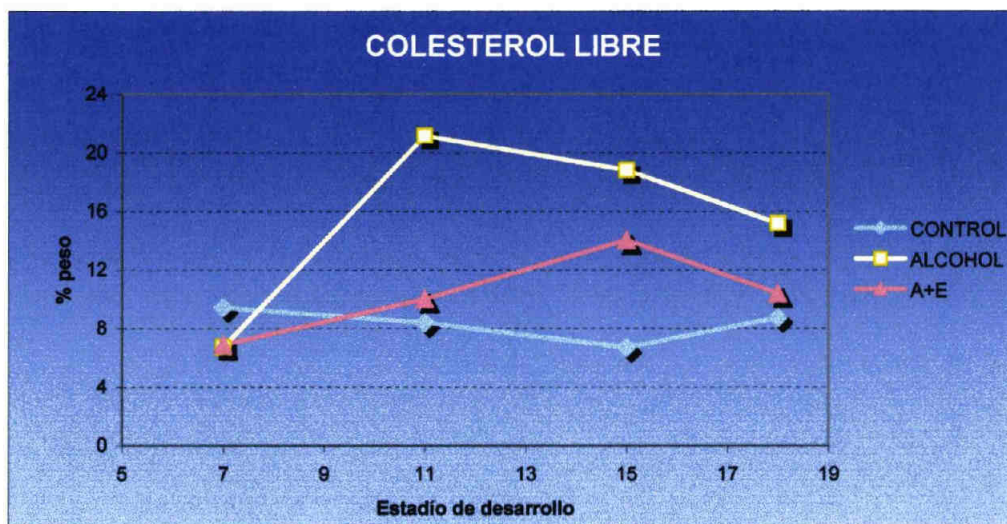


Gráfico 2.1

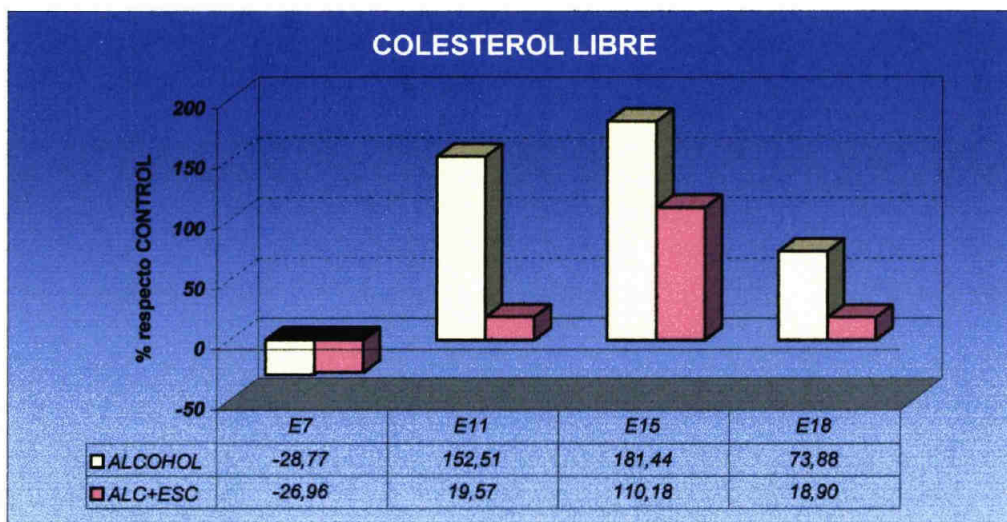


Gráfico 2.2.

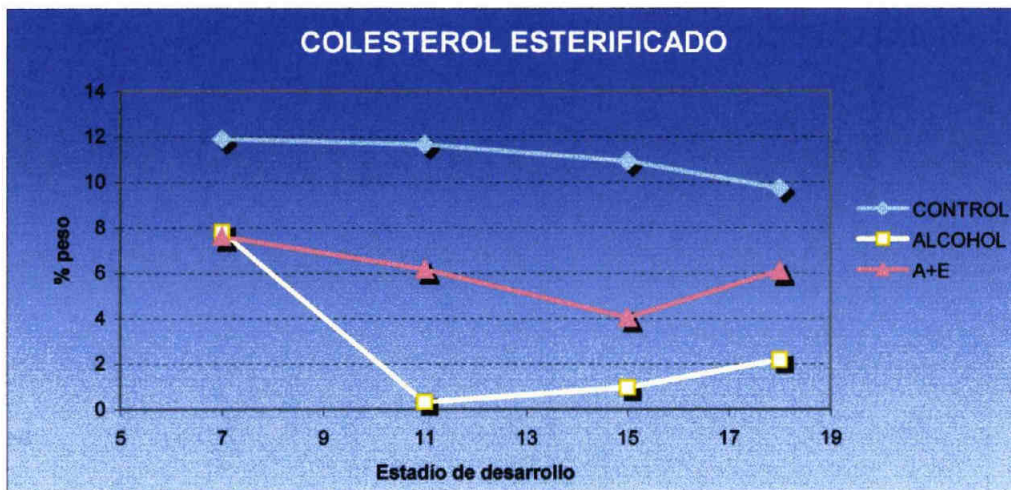


Gráfico 3.1.

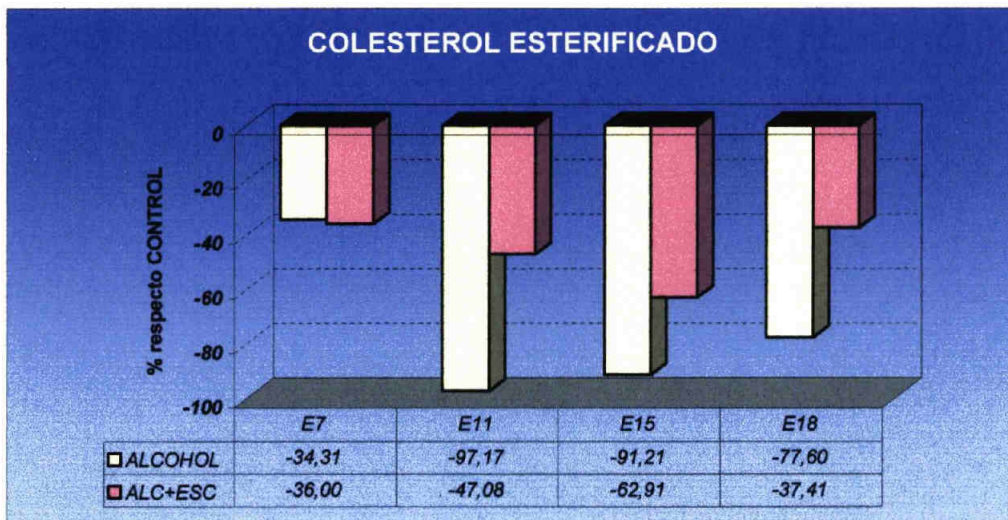


Gráfico 3.2.

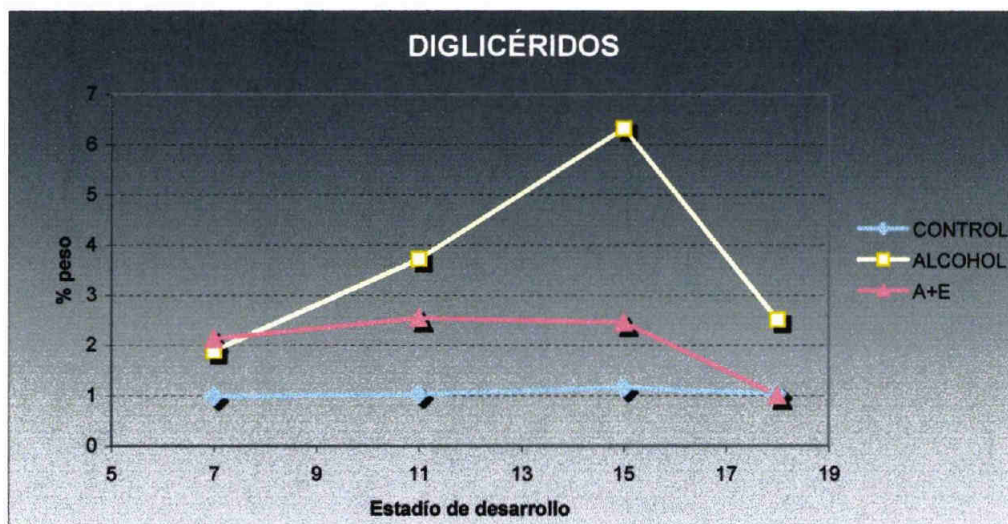


Gráfico 4.1.

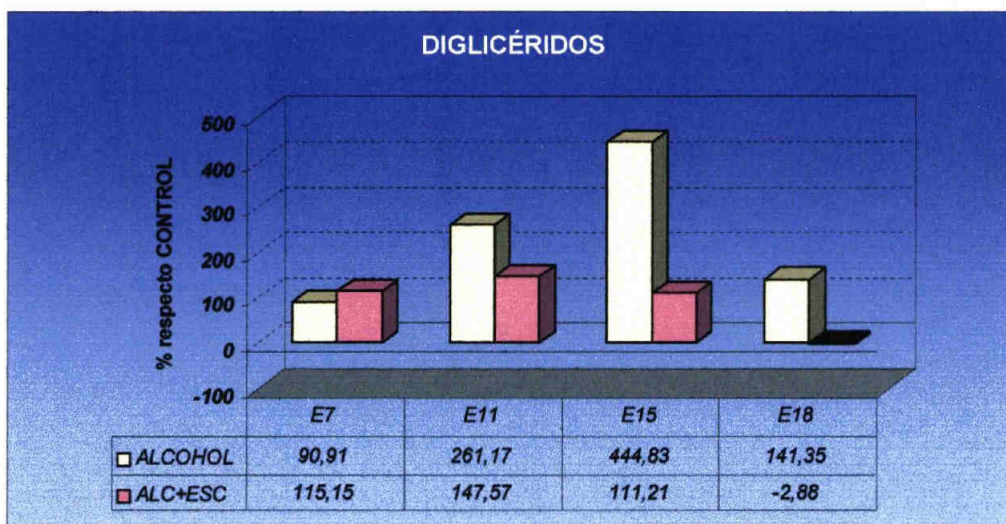


Gráfico 4.2.

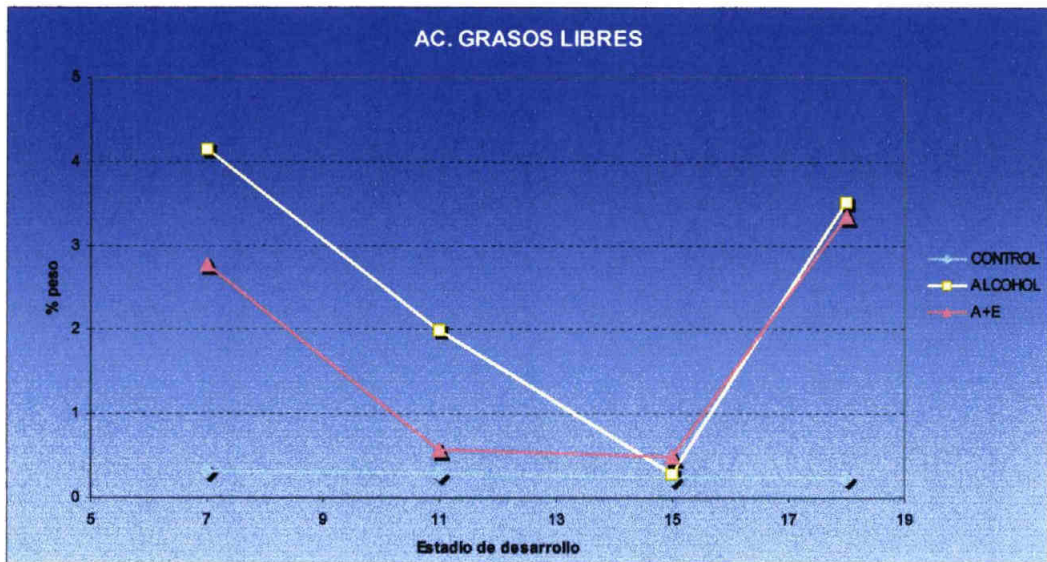


Gráfico 5.1.

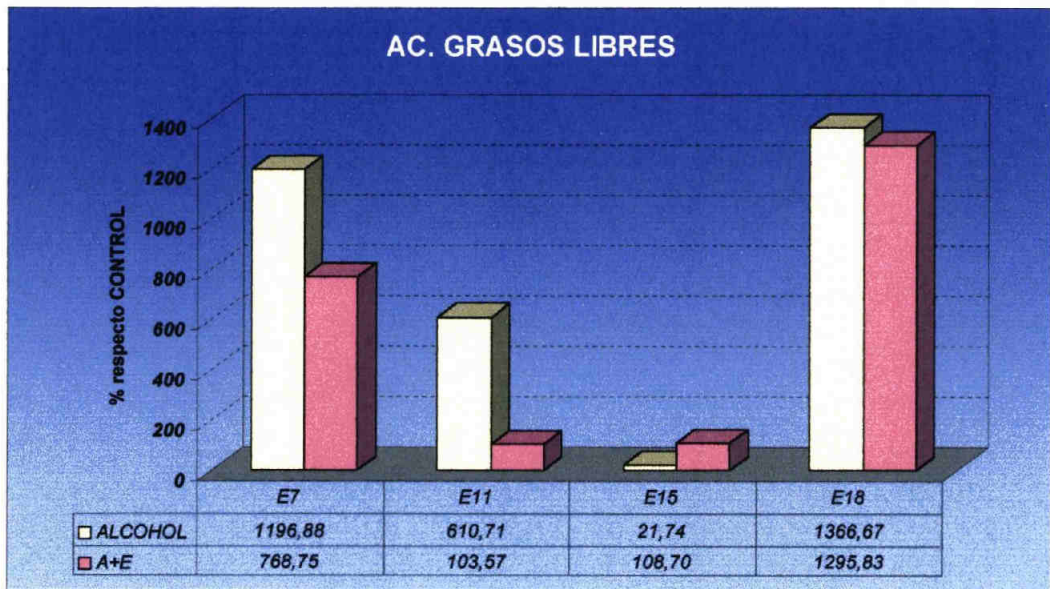


Gráfico 5.2.

5.1.2. PRINCIPALES CLASES DE FOSFOLÍPIDOS

Para determinar si la composición de fosfolípidos de la retina del embrión de pollo cambió durante la ontogénesis al suministrar alcohol, por un lado, y alcohol y escualeno, por otro lado, se cuantificaron las principales clases de fosfolípidos usando la técnica de *in situ* TLC/FID. Los resultados se dan en la Tabla II.

Fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) justificaron el 86-92% del contenido total de fosfolípidos. Véase el gráfico 6. El porcentaje de PC fue más alto que el porcentaje de PE a lo largo del desarrollo del embrión de pollo, tanto en los grupos control como en los grupos tratados con alcohol + escualeno (excepto en E7 de los grupos tratados con alcohol + escualeno, donde fue menor), no cumpliéndose esta regla en los grupos tratados con alcohol, donde la PE fue más alta que la PC, salvo en E18 donde se nota una recuperación. Obsérvese los gráficos 7.1, 7.2, 8.1 y 8.2.

Los niveles de fosfatidilinositol de grupos tratados con alcohol incrementaron una media de 124% con respecto al grupo control a lo largo del desarrollo; pero ya en E18 se produce una disminución acercándose a los valores del grupo control. En los embriones tratados con alcohol + escualeno esta diferencia no es tan llamativa, con un incremento medio del 62%, pero a diferencia de los grupos tratados con alcohol, en E18 se mantiene ese incremento. Véase los gráficos 9.1 y 9.2.

TABLA II. Principales grupos de fosfolípidos de la retina neural del embrión de pollo en grupos control, grupos alcohol y grupos tratados con alcohol + escualeno.

Fracción de Fosfolípidos	Grupo Animal	Estadio			
		E7	E11	E15	E18
Fosfatidiletanolamina	Control	40,46±2,08	34,07±0,43	33,74±1,48	36,72±3,63
	Alcohol	31,47±1,44*	25,98±0,00**	37,79±0,21	39,38±0,79
	A+E	45,42±1,73#	31,84±0,53*.**	33,66±0,10#	35,52±2,23
Fosfatidilcolina	Control	45,9±4,80	57,6±0,06	57,86±0,78	53,76±3,73
	Alcohol	29,23±1,09*	24,57±0,00**	23,78±1,12**	52,54±1,07
	A+E	30,62±0,33*	39,07±0,90**.**	58,73±0,12**	55,94±2,84
Fosfatidilinositol	Control	1,77±0,77	1,26±0,13	1,2±0,00	0,94±0,21
	Alcohol	3,51±3,57	3,25±0,00**	2,59±0,06**	1±0,00*
	A+E	2,82±2,35	1,64±0,21**	2,28±0,06**.*	1,6±0,25
Fosfatidilserina	Control	5,25±4,26	3,54±0,57	3,27±0,05	3,17±0,14
	Alcohol	17,84±1,07	17,46±0,00**	15,64±0,07**	3,43±0,18
	A+E	3,39±3,04	11,76±2,08*	2,55±0,25**	3,45±0,35
Esfingomielina	Control	5,53±3,44	2,81±0,01	3,66±0,69	3,05±0,11
	Alcohol	16,73±0,11*	27,26±0,06**	18,19±0,82**	3,15±0,00
	A+E	16,85±0,36*	15,7±0,45**.**	2,79±0,09**	3,06±0,36
Lisofosfatidilcolina	Control	1,11±0,05	0,73±0,35	0,27±0,03	0,67±0,04
	Alcohol	1,23±0,23	1,43±0,00	2,02±0,09**	0,49±0,10
	A+E	1,41±0,35	n.d.*	n.d.**	0,45±0,16

n.d.: no detectado

Los resultados se expresan como: media ± desviación estándar.

* p<0.05, ** p<0.01, versus Control; # p<0.05, ## p<0.01, versus Alcohol (Prueba de mínima diferencia significativa, LSD)

Al estudiar la fosfatidilserina, podemos apreciar que se producen grandes diferencias con un incremento de hasta un 378% de los embriones tratados con alcohol en E15 respecto al grupo control, para producirse una

recuperación en E18, encontrándose tan solo un incremento del 8%, respecto al grupo control. En embriones tratados con alcohol + escualeno se produce un incremento del 232% en E11 con respecto al grupo control pero, a diferencia de los embriones tratados con alcohol, ya en E15 se produce una recuperación (disminución del 22% respecto al grupo control), que se hace totalmente patente en E18. Véase los gráficos 10.1 y 10.2. En el gráfico 11.1 y 11.2 podemos apreciar como la esfingomielina sigue un comportamiento similar a la fosfatidilserina.

Al estudiar el fosfolípido lisofosfatidilcolina en los embriones tratados con alcohol podemos observar que en un principio no hay apenas variación respecto al grupo control, pero ya en E11 aparece un incremento que se hace mucho más agudo, hasta un 648% en E15. Tanto en E11 como en E15 de embriones tratados con alcohol + escualeno, las cantidades de lisofosfatidilcolina no fueron detectables. Aún así es llamativo el hecho de que en los dos grupos de trabajo, al alcanzar los 18 días de trabajo los resultados se asemejaban entre sí y eran muy parecidos a los del grupo control (con una disminución entre un 27-32% respecto al control). Obsérvese los gráficos 12.1 y 12.2.

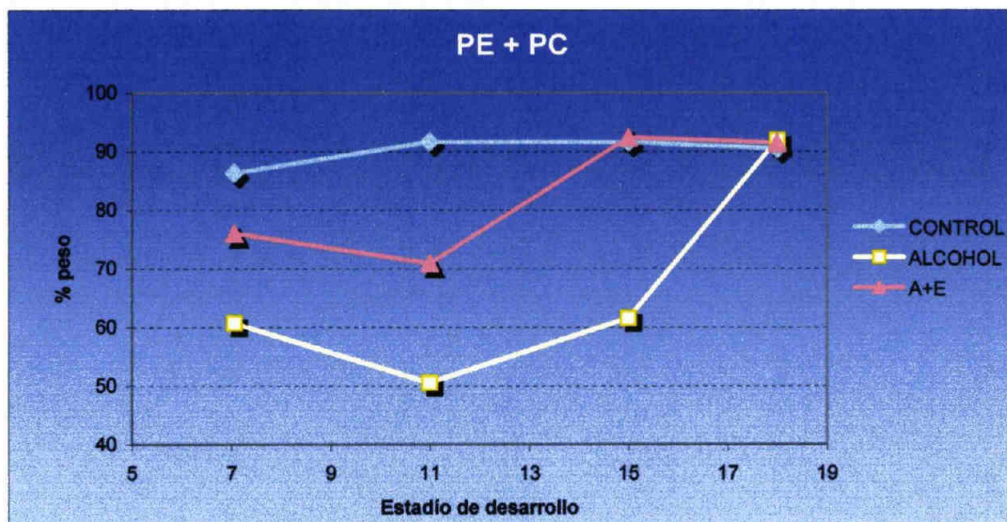


Gráfico 6

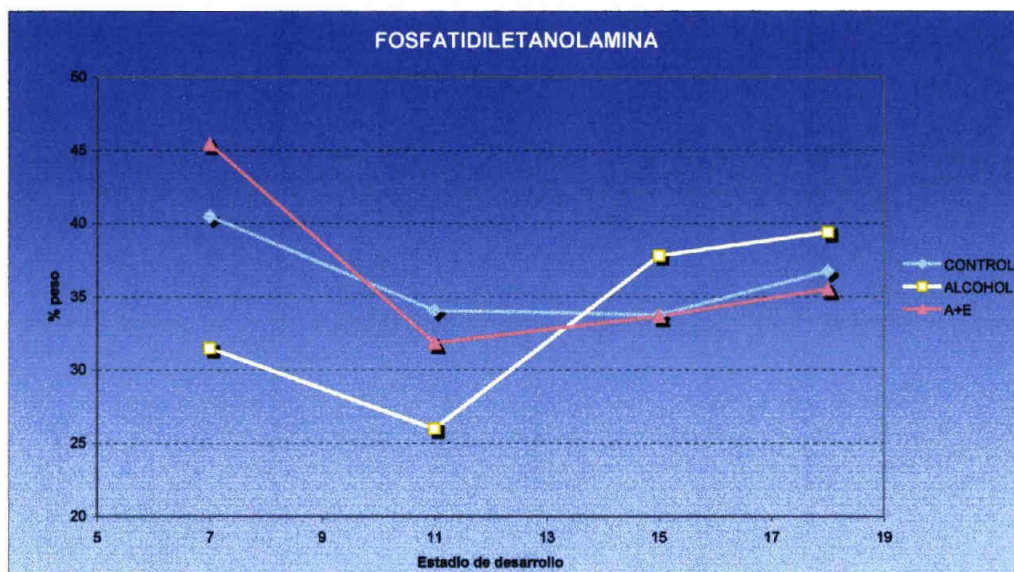


Gráfico 7.1

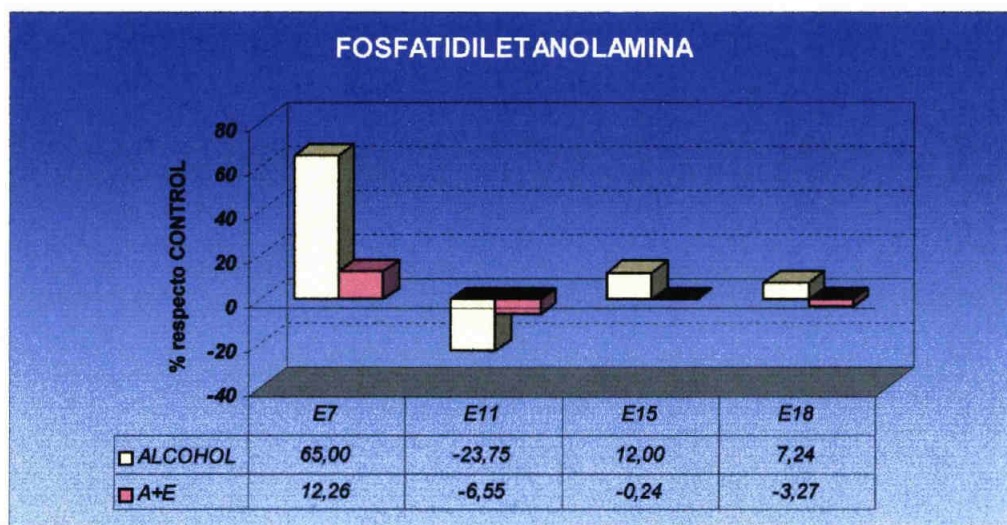


Gráfico 7.2

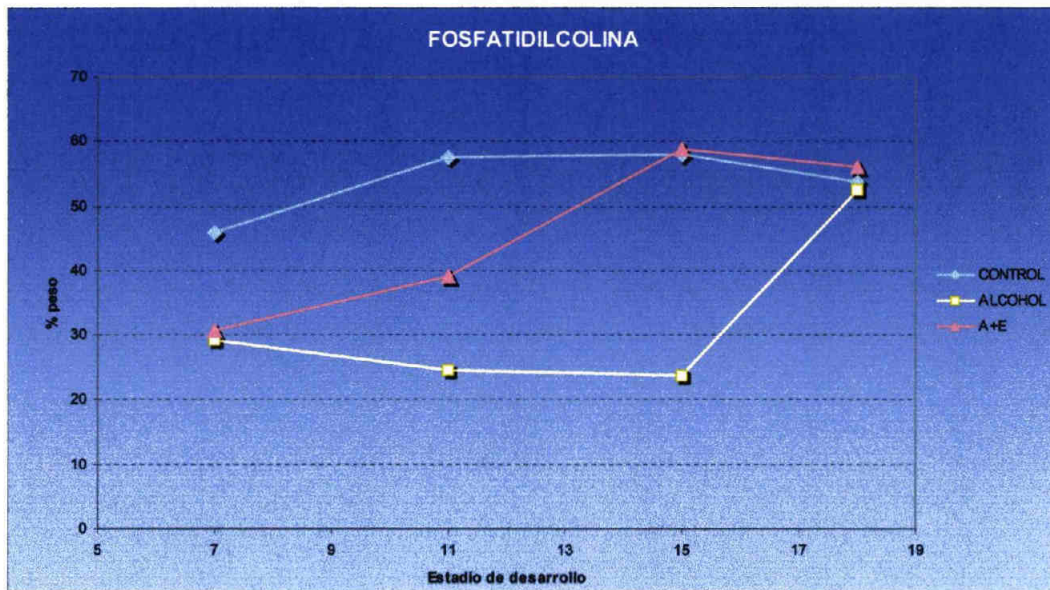


Gráfico 8.1

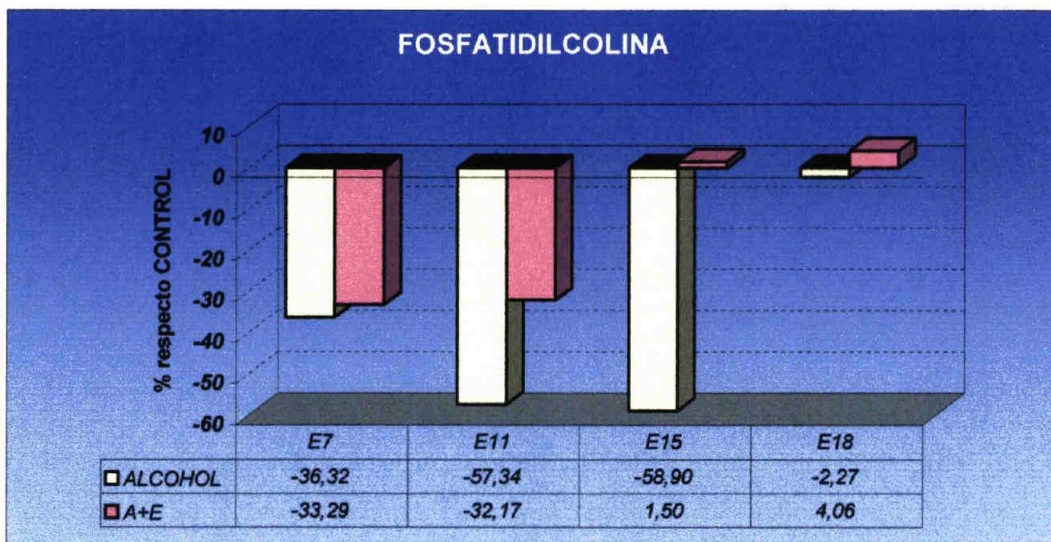


Gráfico 8.2

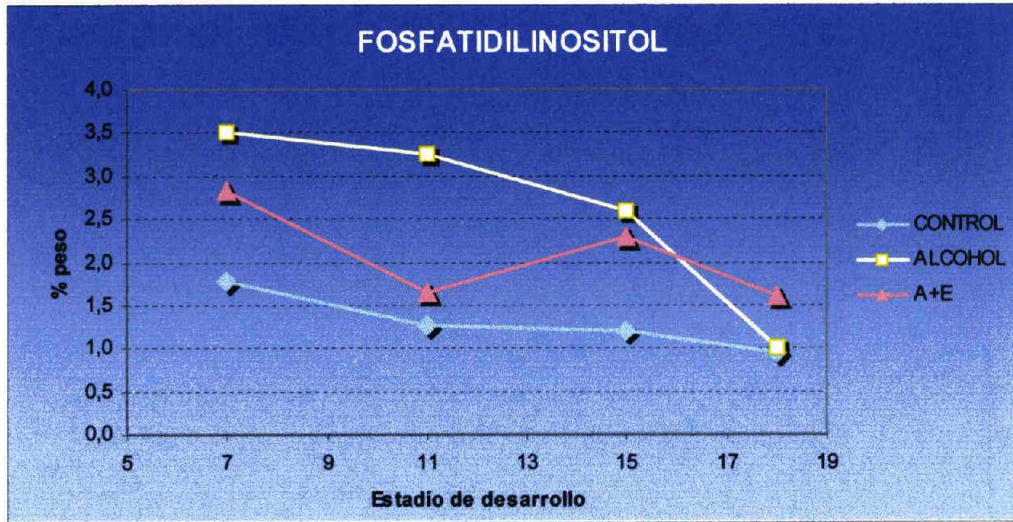


Gráfico 9.1

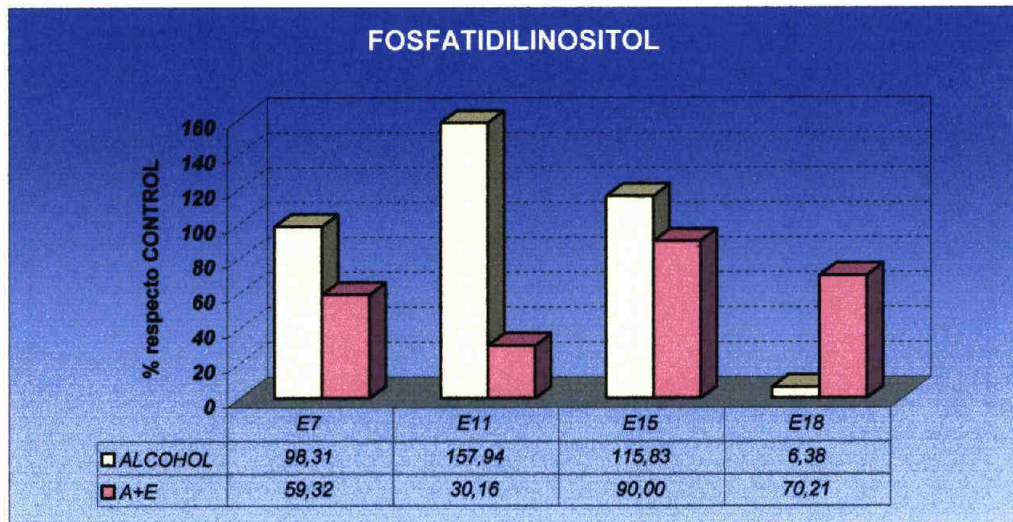


Gráfico 9.2

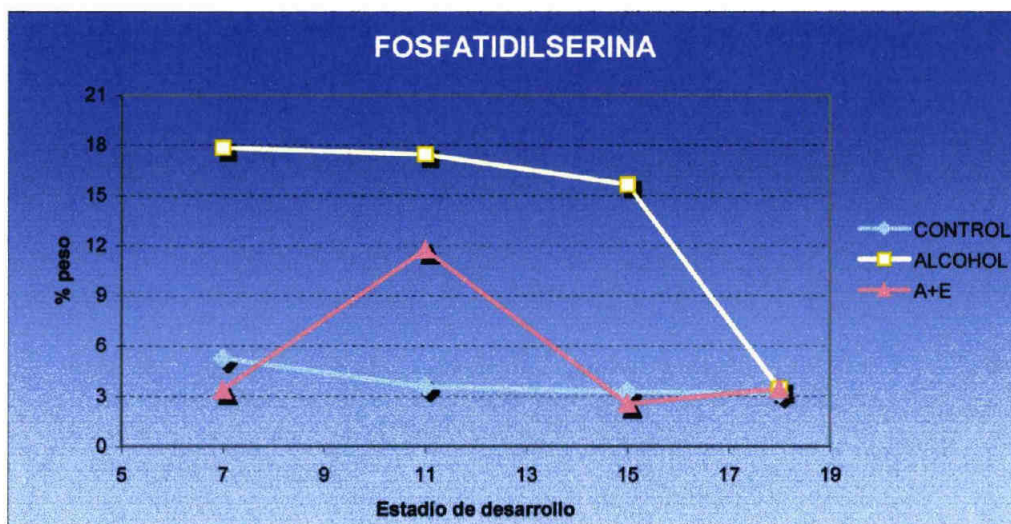


Gráfico 10.1

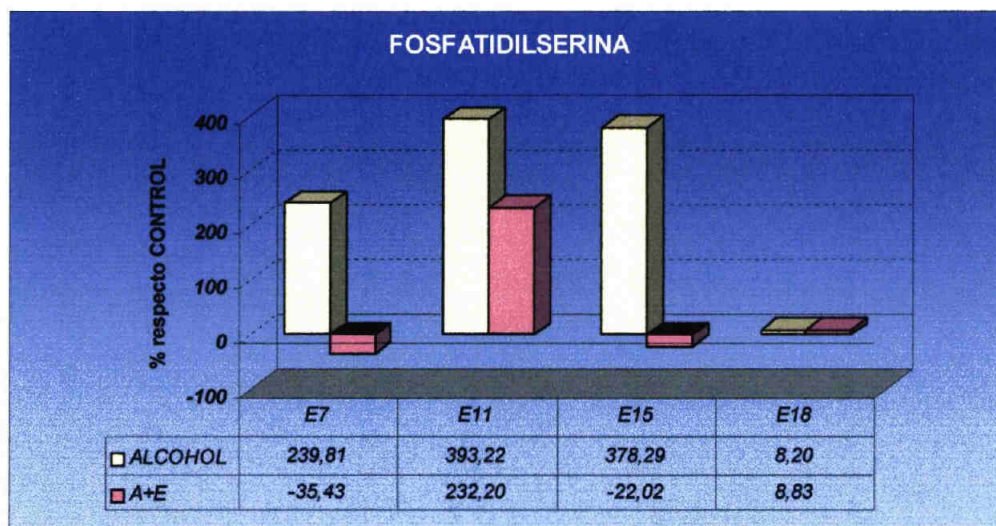


Gráfico 10.2

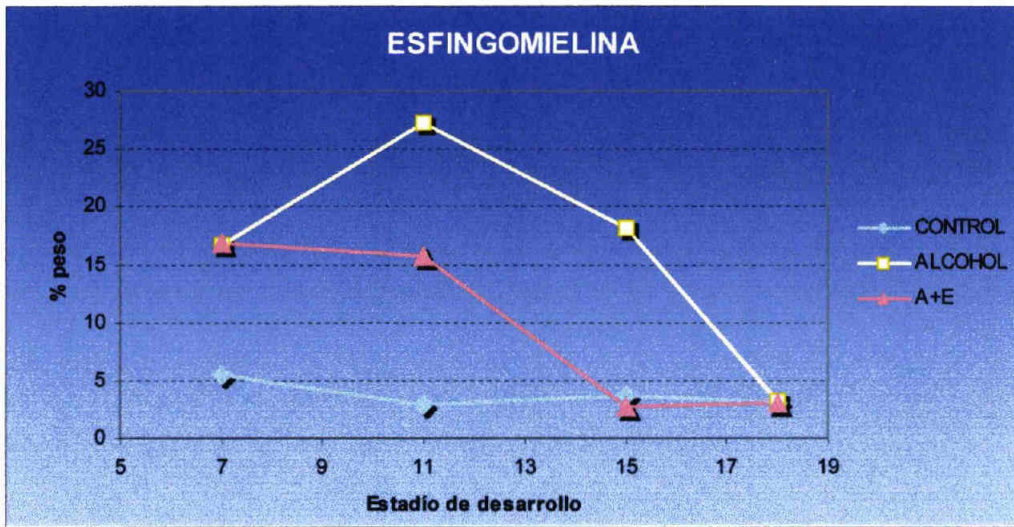


Gráfico 11.1

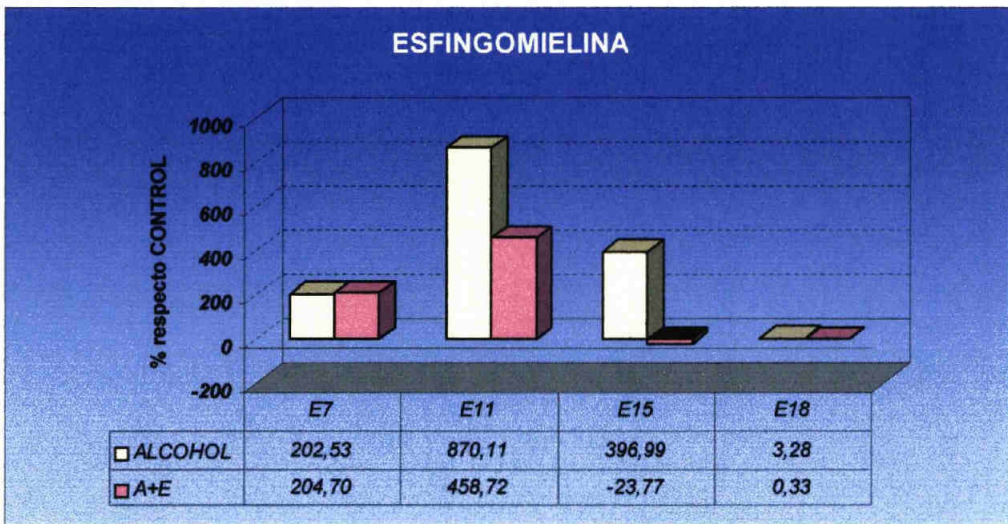


Gráfico 11.2

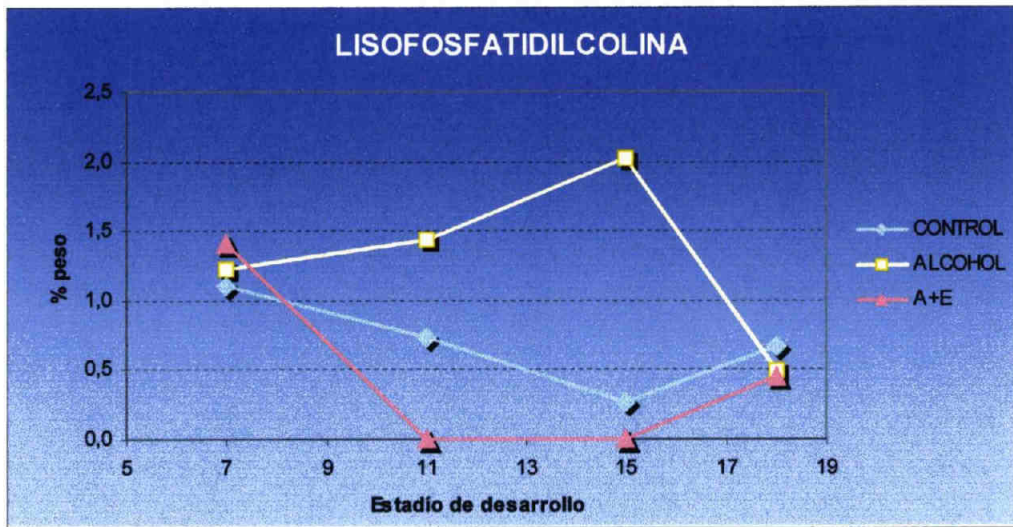


Gráfico 12.1

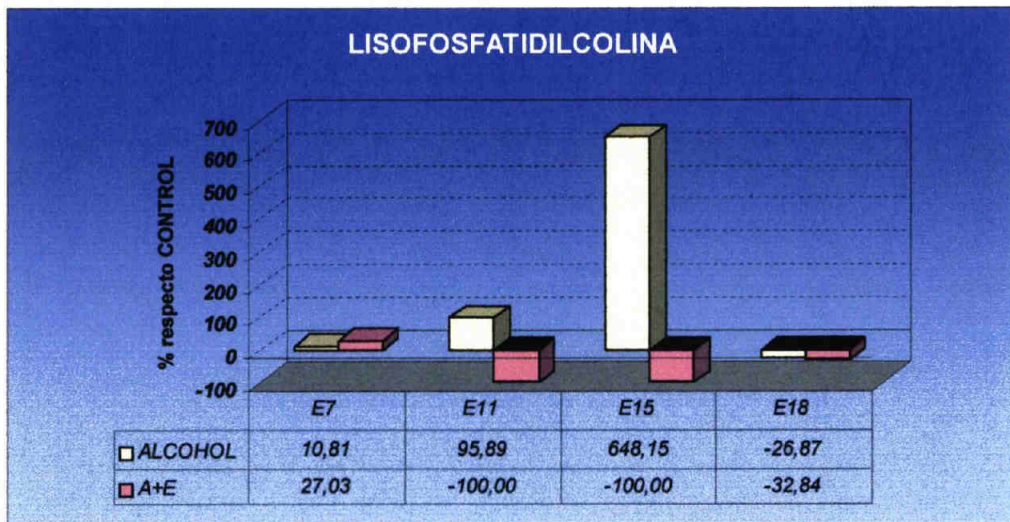


Gráfico 12.2

5.1.3. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LOS LÍPIDOS TOTALES

El resultado de los análisis de ácidos grasos dio los valores mostrados en la Tabla III.

TABLA III. Composición de ácidos grasos de lípidos totales en la retina neural del embrión de pollo en grupos control, grupos alcohol y grupos tratados con alcohol + escualeno.

Acido Graso	Grupo Animal	Estadio			
		E7	E11	E15	E18
C14:0	Control	2,40±0,04	2,39±0,30	2,25±0,08	2,02±0,02
	Alcohol	6,29±0,52**	2,25±0,03	2,94±0,10	1,71±0,05
	A+E	3,80±0,10*	2,76±0,07	2,74±0,17	2,54±0,12*.#
C16:0i	Control	0,17±0,02	0,11±0,01	0,10±0,00	0,15±0,05
	Alcohol	0,30±0,06	0,12±0,02	0,66±0,16	0,12±0,02
	A+E	0,38±0,25	0,37±0,26	0,23±0,12	0,19±0,04
C16:0	Control	33,23±1,77	33,76±0,74	33,27±0,49	32,90±1,91
	Alcohol	39,61±1,03	34,06±0,01	33,46±0,02	32,40±0,45
	A+E	32,69±0,20	33,08±1,69	29,86±0,70	29,24±1,40
C16:1(n-7)	Control	2,43±0,08	1,93±0,18	1,55±0,13	1,60±0,04
	Alcohol	4,19±0,01**	1,75±0,02	2,30±0,16	1,41±0,08
	A+E	3,49±0,21*.#	2,34±0,14*	2,63±0,15*	2,18±0,01*.#
C16:1(n-5)	Control	1,97±0,51	1,77±0,19	1,99±0,05	1,67±0,09
	Alcohol	1,10±0,06	1,89±0,14	1,73±0,02	1,75±0,07
	A+E	2,10±0,07	1,77±0,11	2,31±0,11#	1,45±0,10
C16:4(n-3)	Control	0,24±0,01	0,25±0,00	0,24±0,06	0,20±0,03
	Alcohol	0,52±0,01*	0,25±0,02	0,35±0,07	0,15±0,00
	A+E	0,38±0,05*.#	0,31±0,02	0,28±0,09	0,21±0,05
C18:0	Control	12,86±0,03	14,36±0,58	15,55±0,30	16,31±0,29
	Alcohol	13,26±0,11	13,91±0,10	15,28±0,59	17,27±0,62
	A+E	12,72±0,54	13,75±0,29	14,48±0,06	15,78±0,29#

C18:1(n-9)t	Control	0,31±0,16	0,40±0,30	0,38±0,23	0,30±0,20
	Alcohol	0,44±0,02	0,21±0,11	0,56±0,36	0,27±0,08
	A+E	0,66±0,06	0,26±0,10	0,32±0,22	0,28±0,16
C18:1(n-9)	Control	18,64±0,96	14,47±0,39	13,49±0,04	13,53±0,04
	Alcohol	11,52±0,17*	14,38±0,95	14,94±0,68	14,19±0,05
	A+E	16,97±0,25#	14,06±0,06	15,17±0,14	15,21±0,18**.#
C18:1(n-7)	Control	2,07±0,12	2,13±0,08	2,14±0,10	1,96±0,14
	Alcohol	1,03±0,05**	2,27±0,07	1,96±0,03	2,13±0,11
	A+E	2,03±0,00**	2,22±0,03	1,95±0,05	1,88±0,03
C18:2(n-6)	Control	2,61±1,10	1,25±0,16	1,07±0,02	1,22±0,02
	Alcohol	1,07±0,03	1,40±0,47	1,52±0,22	1,12±0,06
	A+E	1,35±0,16	1,27±0,14	1,53±0,17	1,43±0,10#
C18:3(n-6)	Control	0,36±0,07	0,18±0,04	0,39±0,05	0,73±0,15
	Alcohol	1,96±0,49	0,53±0,14	0,72±0,23	0,38±0,05
	A+E	1,43±0,11	0,92±0,16	0,82±0,11	1,15±0,21#
C18:3(n-3)	Control	0,40±0,03	0,25±0,09	0,25±0,15	0,27±0,16
	Alcohol	1,04±0,10*	0,22±0,06	0,67±0,03	0,15±0,02
	A+E	0,34±0,10#	0,45±0,35	0,58±0,48	0,24±0,09
C20:0	Control	0,41±0,08	0,21±0,06	0,17±0,02	0,27±0,06
	Alcohol	0,80±0,17	0,19±0,06	0,33±0,06*	0,25±0,07
	A+E	0,49±0,04	0,29±0,03	0,31±0,06*	0,68±0,04**.**#
C20:1(n-9)	Control	0,49±0,08	0,36±0,00	0,44±0,00	0,41±0,02
	Alcohol	0,90±0,05*	0,44±0,07	0,51±0,18	0,24±0,14
	A+E	1,00±0,01*	0,65±0,03*.#	0,50±0,01	0,47±0,18
C20:1(n-7)	Control	0,94±0,19	0,67±0,29	0,15±0,02	0,19±0,04
	Alcohol	0,71±0,52	0,41±0,06	0,51±0,27	0,12±0,02
	A+E	0,59±0,11	0,67±0,43	0,17±0,03	0,71±0,34
C20:3(n-9)	Control	0,26±0,00	0,30±0,02	0,15±0,00	0,29±0,00
	Alcohol	0,42±0,10	0,19±0,06	0,37±0,07	0,23±0,10
	A+E	0,36±0,10	0,18±0,03	0,21±0,06	0,31±0,02
C20:3(n-6)	Control	0,45±0,09	0,18±0,06	0,24±0,00	0,24±0,11
	Alcohol	0,42±0,15	0,25±0,07	0,24±0,07	0,19±0,09
	A+E	0,32±0,02	0,36±0,17	0,19±0,05	0,42±0,02
C20:4(n-6)	Control	6,35±1,13	8,59±1,02	8,27±0,09	7,15±0,06
	Alcohol	2,23±0,16	9,00±0,71	6,31±0,02**	7,08±0,02
	A+E	5,71±0,37	7,53±0,19	7,66±0,25#	7,22±0,14
C22:0	Control	1,51±0,07	0,32±0,05	0,49±0,06	0,75±0,12
	Alcohol	2,73±0,80	0,25±0,04	1,01±0,45	0,38±0,01
	A+E	0,89±0,01	0,66±0,01*.#	0,79±0,13	1,25±0,14*.#

C22:3(n-6)	Control	1,20±0,48	0,21±0,11	0,18±0,08	0,50±0,26
	Alcohol	0,81±0,17	0,10±0,00	0,41±0,19	0,12±0,02
	A+E	0,59±0,21	0,40±0,06	0,34±0,20	0,83±0,13
C22:4(n-6)	Control	0,62±0,02	0,12±0,02	0,19±0,08	0,12±0,02
	Alcohol	0,95±0,05*	0,11±0,01	0,61±0,09**	0,15±0,01
	A+E	0,75±0,05	0,16±0,05	0,28±0,10**	0,59±0,25
C22:5(n-6)	Control	1,00±0,65	3,06±0,05	3,14±0,84	2,19±0,26
	Alcohol	0,97±0,06	2,78±0,13	1,66±0,05	1,56±0,85
	A+E	2,09±0,40	3,04±0,07	2,37±0,07	2,02±0,21
C22:6(n-6)	Control	2,38±1,08	5,31±0,72	3,04±0,08	2,44±0,10
	Alcohol	3,21±0,23	3,47±0,19*	1,67±0,30	3,20±0,06*
	A+E	3,01±0,18	3,27±0,26*	2,70±0,48	3,62±0,10*
C22:5(n-3)	Control	0,48±0,10	0,34±0,07	0,57±0,02	0,48±0,03
	Alcohol	0,32±0,18	0,47±0,02	0,36±0,02*	0,49±0,01
	A+E	0,28±0,07	0,39±0,07	0,44±0,03	0,42±0,10
C22:6(n-3)	Control	6,27±0,32	7,15±0,09	10,42±0,07	12,19±0,75
	Alcohol	3,28±0,39*	9,12±0,07*	8,97±1,13	14,04±0,29*
	A+E	5,63±0,25#	8,83±0,40*	11,41±0,04	9,72±0,57*##

Los resultados se expresan como: media ± desviación estándar.

* p<0.05, ** p<0.01, versus Control; # p<0.05, ## p<0.01, versus Alcohol (Prueba de mínima diferencia significativa, LSD)

En general, los cambios más significativos entre los grupos control y grupos tratados con alcohol se encontraron a los 7 días de desarrollo.

El contenido de ácidos grasos saturados de la retina de pollo aumentó desde un 50.57% en el grupo control hasta una 63% en el grupo de trabajo tratado con alcohol en E7, mientras que en el grupo experimental tratado con alcohol + escualeno el resultado fue similar al del grupo control. Este incremento fue debido principalmente al aumento del contenido de C14 y C16 (Ver gráficos 13 y 14), los cuales subieron desde un 2.40% a un 6.29% y desde un 33.23% a

un 39.61% respectivamente, con respecto al control.

Por el contrario, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados en E7 disminuyó desde un 26.84%, en el grupo control, a un 19.88%, en los embriones tratados con alcohol. De nuevo, en los embriones tratados con alcohol + escualeno no hubo cambios con respecto al grupo control. Esta disminución fue debida, principalmente, a una caída en el contenido de C18:1(n-9) desde un 18.64% en el grupo control, hasta un 11.52% en el grupo tratado con alcohol, y, en menor medida, a una disminución de C18:1(n-7) que pasa de un 2.07% en el grupo control, a un 1.03% en el grupo alcohol. Véase los gráficos 15 y 16.

Finalmente, el contenido en ácidos grasos poliinsaturados disminuyó tanto en E7 como en E15, en los embriones tratados con alcohol (17.16% y 23.83% respectivamente) con respecto a los embriones control (22.59% y 28.11%, respectivamente). Este decremento fue como resultado de una disminución en las concentraciones de C20:4(n-6) y el C22:3(n-6). El ácido araquidónico en E7, disminuyó desde un 6.35% en el grupo control hasta un 2.23% en el grupo tratado con alcohol y en E15 desde un 8.27% a un 6.31%. En E7, el ácido docosahexanoico decreció desde un 6.27 en el control hasta un 3.28 en los embriones tratados con alcohol; en E15, bajó desde un 10.42 en los embriones control hasta un 8.97 en los animales tratados con alcohol. En el caso de embriones tratados con alcohol + escualeno no hubo variación con respecto

al control. Ver gráficos 17 y 18.

El contenido de ácidos grasos saturados totales (Tabla IV) en embriones tratados con alcohol aumentó en E7 un 12.42% con respecto al grupo control; mientras que el contenido de ácidos grasos monoinsaturados disminuyó en E7 un 6.96%, así como el contenido en ácidos grasos poliinsaturados que también disminuyó en E7 y en E15 un 5.43% y un 4.28%, respectivamente con respecto al control. De nuevo, en el caso de embriones tratados con alcohol + escualeno no hubo variación con respecto al control.

La razón (n-6)/(n-3) aumentó ligeramente en E7 (0.22% sobre el control) para luego disminuir en E11 (0.61% sobre el control). En el resto de los estadíos también disminuyó aunque las diferencias fueron menores (0.17% en E15 y 0.18% en E18) con respecto al control. Los embriones tratados con alcohol + escualeno tuvieron un comportamiento similar al de los grupos tratados con alcohol, salvo en E18 donde hubo un incremento respecto al control (0.52%).

Por el número de átomos de carbono, C-18 PUFAs justificaron, en E7, el 3.37% de los ácidos grasos totales; esta cifra fue mayor, 4.07%, en embriones tratados con alcohol, acercándose el grupo A+E (3.11%) al control; en E11 y E15, los grupos alcohol y A+E presentaron valores mayores que el grupo control mientras que en E18 la concentración de C-18 PUFAs fue menor en el grupos de embriones a los que se les suministró alcohol que en los grupos control y

A+E. Los C-20 PUFAs disminuyeron en los embriones tratados con alcohol tanto en E7 como en E15 con respecto a los grupos control y a los grupos A+E; en E18 todos los grupos de trabajo presentaron unos valores parecidos. Los C-22 PUFAs disminuyeron en los embriones tratados con alcohol tanto en E7 como en E15, por el contrario, en el último estadio analizado, el grupo alcohol sufrió un incremento; en los embriones tratados con alcohol + escualeno los resultados fueron similares a los del grupo control a lo largo de los estadios estudiados.

TABLA IV. Parámetros para las cadenas de ácidos grasos en lípidos totales de la retina neural del embrión de pollo.

Parámetro	Grupo Animal	Estadio			
		E7	E11	E15	E18
Total Sat	Control	50,57	51,15	51,83	52,4
	Alcohol	62,99	50,77	53,66	52,11
	A+E	50,96	50,9	48,41	49,67
Total Mono	Control	26,84	21,71	20,13	19,66
	Alcohol	19,88	21,35	22,49	20,08
	A+E	26,82	21,96	23,03	22,17
Total Poly	Control	22,59	27,15	28,11	27,98
	Alcohol	17,16	27,87	23,83	28,82
	A+E	22,21	27,11	28,78	28,16
C-18 PUFAs	Control	3,37	1,67	1,7	2,22
	Alcohol	4,07	2,15	2,9	1,64
	A+E	3,11	2,64	2,93	2,82
C-20 PUFAs	Control	7,06	9,06	8,65	7,67
	Alcohol	3,06	9,44	6,92	7,5
	A+E	6,39	8,07	8,05	7,94
C-22 PUFAs	Control	11,93	16,17	17,53	17,9
	Alcohol	9,52	16,04	13,66	19,54
	A+E	12,34	16,09	17,53	17,2
TOTAL (n-6)	Control	14,95	18,87	16,49	14,56
	Alcohol	11,6	17,63	13,12	13,78
	A+E	15,24	16,95	15,87	17,27
TOTAL (n-3)	Control	7,38	7,99	11,47	13,13
	Alcohol	5,15	10,06	10,34	14,82
	A+E	6,62	9,98	12,71	10,59
(n-6)/(n-3)	Control	2,03	2,36	1,44	1,11
	Alcohol	2,25	1,75	1,27	0,93
	A+E	2,3	1,7	1,25	1,63
Sat/UnSat	Control	1,02	1,05	1,07	1,1
	Alcohol	1,7	1,03	1,16	1,07
	A+E	1,04	1,04	0,93	0,99

Los valores de los parámetros están calculados a partir de la Tabla III. La desviación estándar ha sido omitida. Sat: ácidos grasos saturados. Mono: ácidos grasos monoinsaturados. Poly: ácidos grasos poliinsaturados.

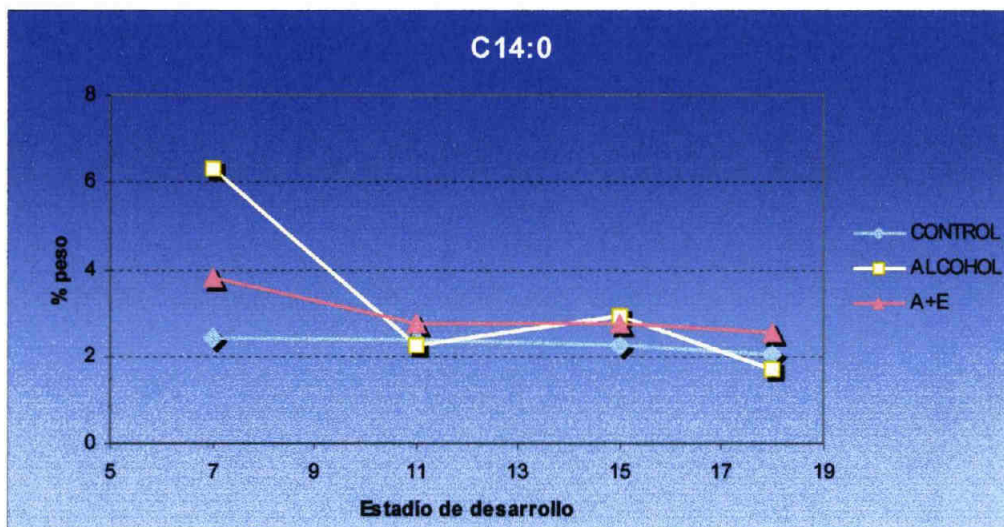


Gráfico 13.

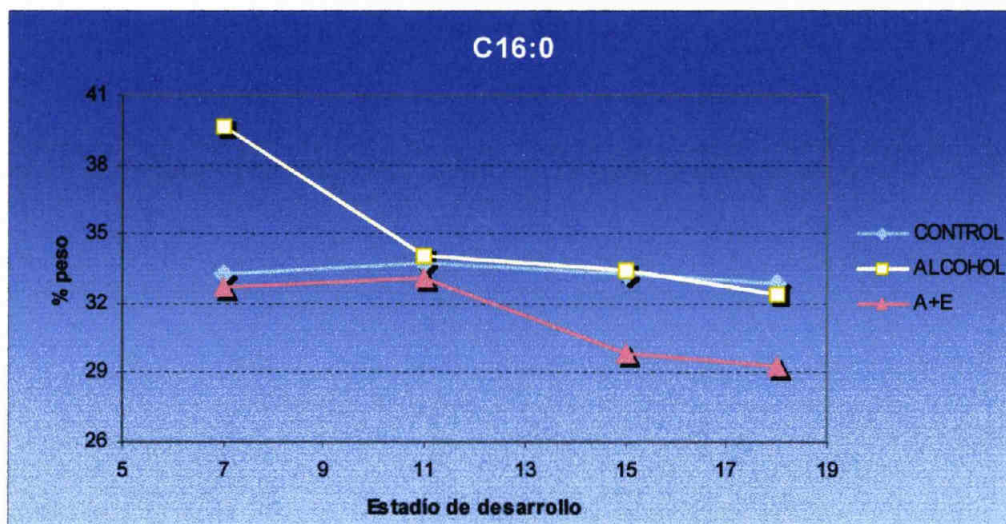


Gráfico 14.

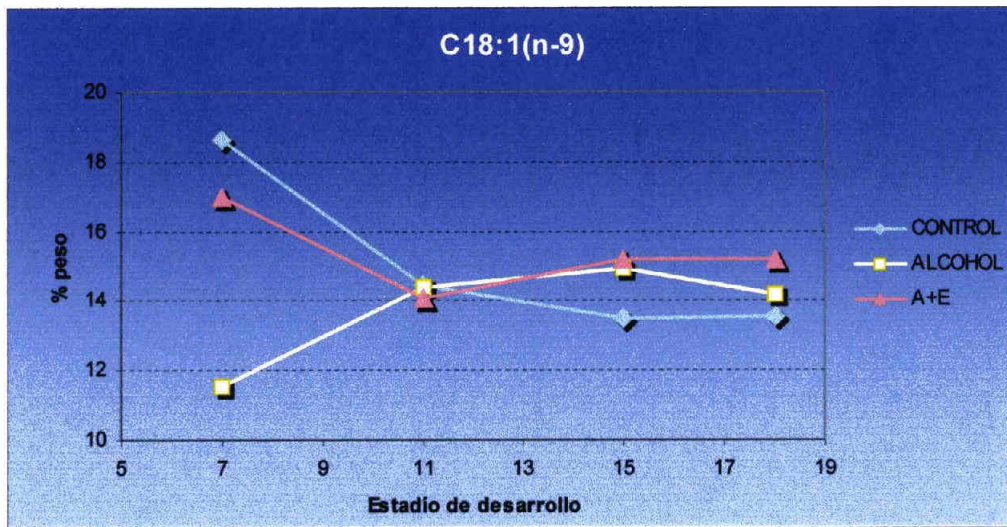


Gráfico 15

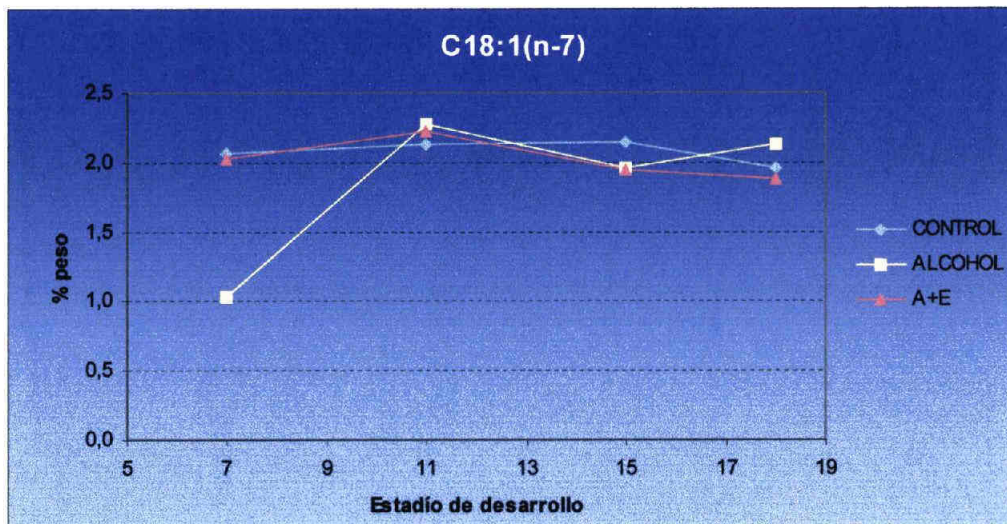


Gráfico 16.

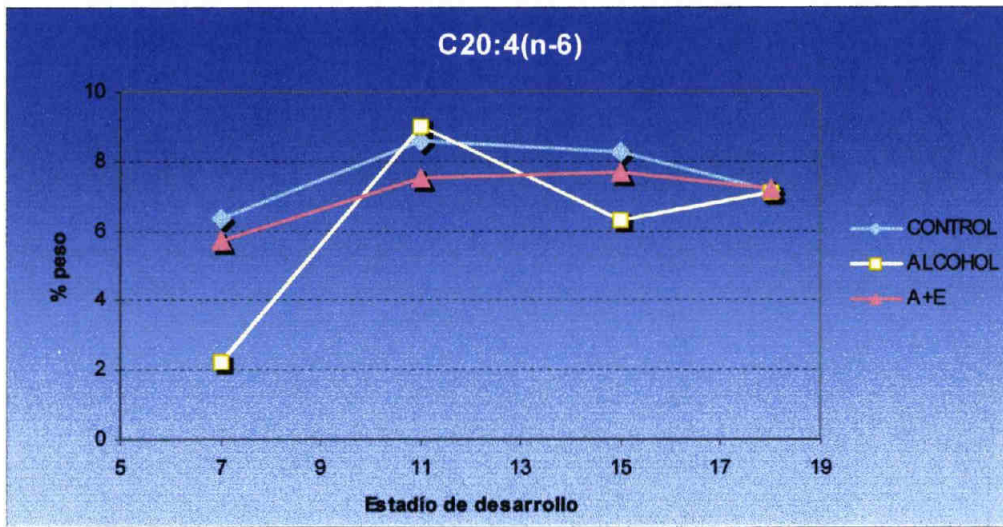


Gráfico 17.

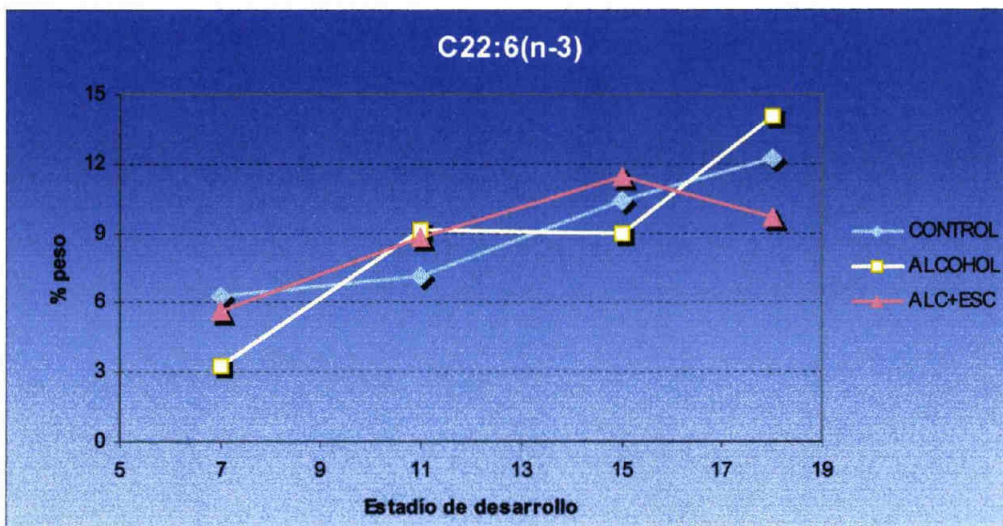


Gráfico 18.

5.2. ESTUDIO ESTRUCTURAL E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE EL ALCOHOL Y EL ALCOHOL + ESCUALENO EN LA RETINA DEL POLLO

5.2.1. ESTUDIO ESTRUCTURAL

Para el estudio de los efectos que el alcohol (Figuras 10.b y 10.e), por una parte, y el alcohol + escualeno (Figuras 10.c y 10.f), por otra, producen en la retina frente a retinas de embriones control (Figuras 10.a y 10.d) hemos utilizado el microscopio óptico empleando cortes semifinos de una micra de grosor.

En primer lugar, realizamos el experimento utilizando una dosis de 10 μ l de alcohol, por un lado, y de 10 μ l de alcohol + 10 μ l de escualeno, por otro, al igual que se había hecho para el estudio de lípidos. Al analizar los resultados morfológicos pudimos ver que, aunque se observaban variaciones en el grupo de alcohol con respecto al grupo control y al grupo A+E, éstas no eran muy acusadas. Es por ello que realizamos un segundo experimento en el cual aumentamos la dosis de trabajo, siendo la nueva: 20 μ l de alcohol y 20 μ l de alcohol + 20 μ l de escualeno.

Así, el etanol produce en la retina de 7 días de desarrollo un aumento de los espacios intercelulares en todas las capas de la misma; picnosis en la capa nuclear interna y una pérdida de celularidad; un retraso en la migración celular,

sobre todo a nivel de ganglionares y amacrinas, con células migrando masivamente en la capa nuclear interna y con un retraso en la formación de la capa plexiforme interna. También podemos apreciar en las retinas de embriones tratados con etanol como hay una pérdida de verticalidad celular.

En los embriones de pollo tratados en E6 con 20 μ l de alcohol + 20 μ l de escualeno, y sacrificados en E7, se observa un aumento de los espacios intercelulares en todas las capas de la retina, quizás porque los grupos celulares están más organizados y, aunque aparentemente el retraso es mayor, si podemos apreciar como las células ganglionares son más grandes, más definidas y están más alineadas que en los embriones tratados con etanol, así como una capa de fibras del nervio óptico más grande; siendo lo más llamativo el hecho de una mayor organización citológica, al efecto de formación de capas y el hecho de que la migración se altera menos. También es patente el aumento de verticalidad celular por la recuperación de la forma fusiforme de los somas de las células bipolares.

Esta alteración de la retina obtenida en los embriones de pollo tratados con 20 μ l de alcohol y la escasa recuperación de los embriones de pollo tratados con 20 μ l de alcohol + 20 μ l de escualeno, nos ha llevado a estudiar con mayor detenimiento los efectos que esta dosis de etanol, así como de etanol + escualeno, tiene en los estadios posteriores (E11).

A los 11 días de desarrollo, las imágenes hablan por sí solas. Aún así cabe destacar como en los embriones tratados con 20 μ l de alcohol, las alteraciones observadas en E7 siguen apareciendo. Las retinas mostraron alteraciones evidentes en sus capas celulares más internas con un incremento de los espacios intercelulares, con abundantes imágenes de células en picnosis, estando la capa de células ganglionares reducida a una sola hilera de células (mientras que en el grupo A+E y en el grupo control existen del orden de dos a tres hileras) y con un menor número de células migrando a nivel de la capa plexiforme interna.

Pero más llamativo aún es la enorme recuperación que se observa en los embriones tratados con alcohol + escualeno. En la figura 10.f, podemos observar una retina de 11 días de desarrollo tratada con alcohol + escualeno que posee un gran parecido con la figura 10.d correspondiente a un embrión control en el mismo estadio de desarrollo. Podemos apreciar de nuevo, una mayor organización columnar y, aunque hay picnosis probablemente por el efecto del alcohol, trata de restablecer un patrón de regularidad.

5.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El estudio inmunohistoquímico lo hemos centrado en el efecto que el alcohol, por un lado, y el alcohol + escualeno, por otro, producen en la retina sobre la expresión de inmunoreactividad para MOSP (reconoce una proteína específica de mielina que se expresa en oligodendrocito) y sobre la expresión de inmunoreactividad para glutamina sintetasa (GS, enzima que se localiza en las

células de Müller y aparentemente también en una población de células gliales, posiblemente astrocitos, localizados a nivel de la capa de células ganglionares).

Los embriones experimentales fueron tratados en E6 y sacrificados en E19. Al visualizar las células de Müller en el microscopio de fluorescencia pudimos observar que los embriones tratados con 10 μ l de alcohol tenían una disminución en la expresión de los dos antígenos, como se puede observar en las figuras 11.b y 11.e, en las que aparecen agregados celulares marcados con MOSP y GS, respectivamente. En embriones tratados con el doble de dosis no existía expresión, de forma tajante, para ninguno de los dos marcadores.

Fue agradablemente sorprendente descubrir que sí existía expresión, tanto para MOSP como para GS, en los embriones tratados con 10 μ l de alcohol + 10 μ l de escualeno y en los embriones en los que duplicamos dicha dosis. En las figuras 11.c y 11.f podemos observar agregados celulares de retina marcados con MOSP y GS, respectivamente, de embriones tratados con 20 μ l de alcohol + 20 μ l de escualeno en los que se puede apreciar las células de Müller doblemente marcadas. Estas imágenes de agregados celulares de retinas tratadas con alcohol + escualeno son comparables a las figuras 11.a y 11.d que corresponden a agregados celulares de retinas control.

Figura 10:

a): Sección semifina de retina control en E7, X400

b): Sección semifina de retina experimental en E7 tratada con 20 μ L de etanol absoluto, X400.

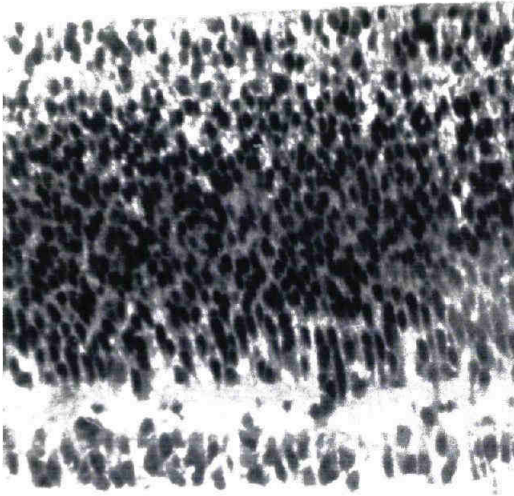
c): Sección semifina de retina experimental en E7 tratada con 20 μ L de etanol absoluto y 20 μ L de escualeno, X400.

d): Sección semifina de retina control en E11, X400.

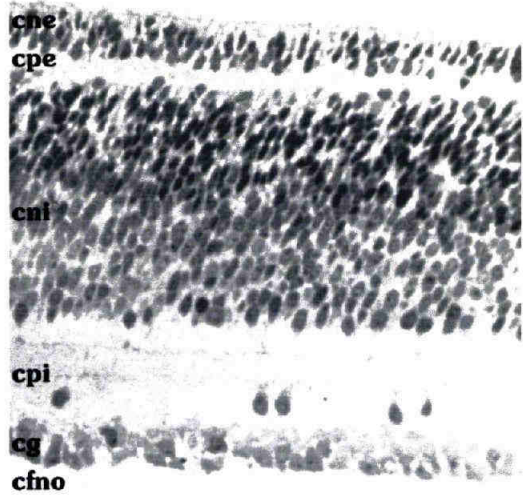
e): Sección semifina de retina experimental en E11 tratada con 20 μ L de etanol absoluto, X400.

f): Sección semifina de retina experimental en E11 tratada con 20 μ L de etanol absoluto y 20 μ L de escualeno, X400.

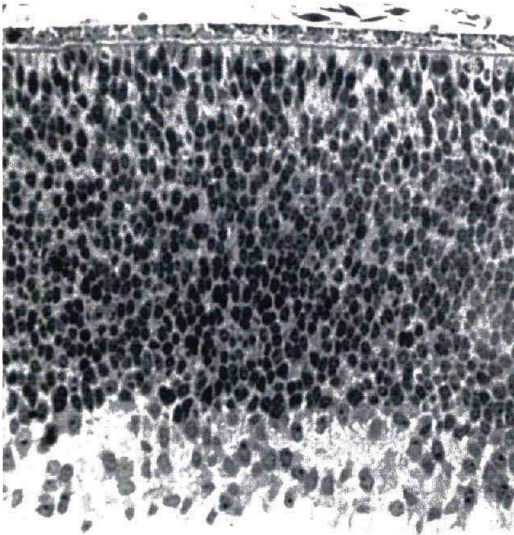
cne, capa nuclear externa; cpe, capa plexiforme externa; cni, capa nuclear interna; cpi, capa plexiforme interna; cg, capa de células ganglionares; cfno, capa de fibras del nervio óptico. Las flechas muestran un aumento de los espacios intercelulares. Las cabezas de flecha señalan células picnóticas.



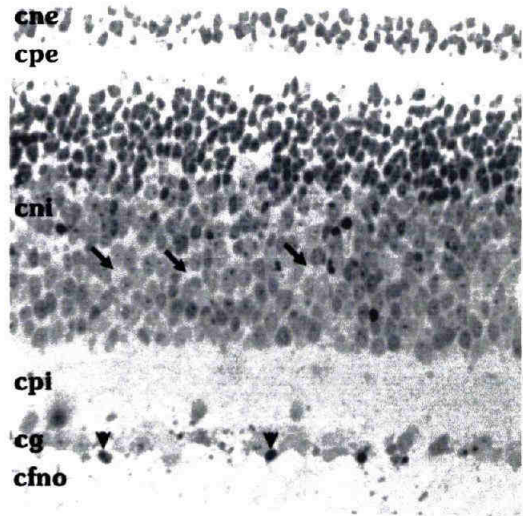
a



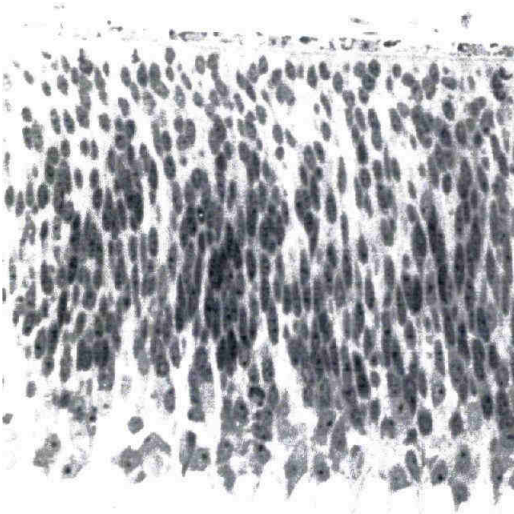
d



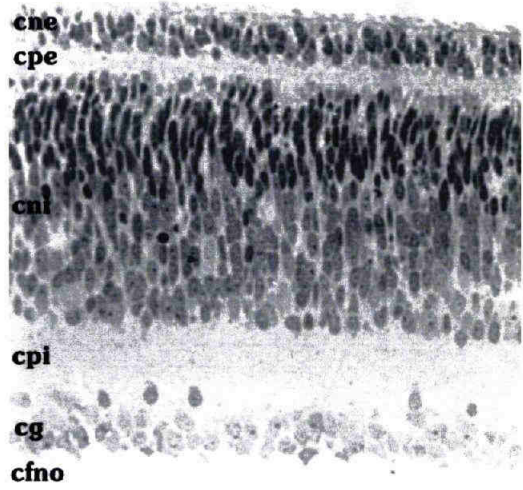
b



e



c



f

Figura 10

Figura 11:

- a): Expresión de MOSP en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19, X400.
- b): Expresión de MOSP en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19 tratado con 10 μ L de etanol absoluto, X400.
- c): Expresión de MOSP en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19 tratado con 20 μ L de etanol absoluto y 20 μ L de escualeno, X400.
- d): Expresión de GS en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19, X400.
- e): Expresión de GS en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19 tratado con 10 μ L de etanol absoluto, X400.
- f): Expresión de GS en agregados celulares de retina de embrión de pollo en E19 tratado con 20 μ L de etanol absoluto y 20 μ L de escualeno, X400.

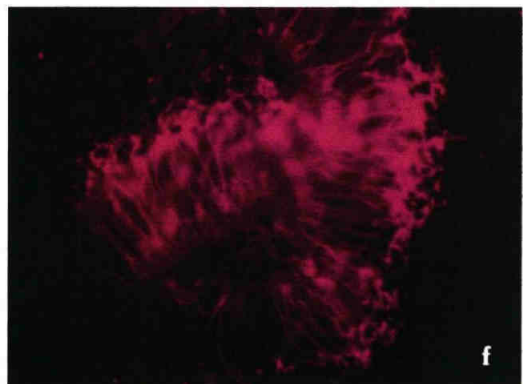
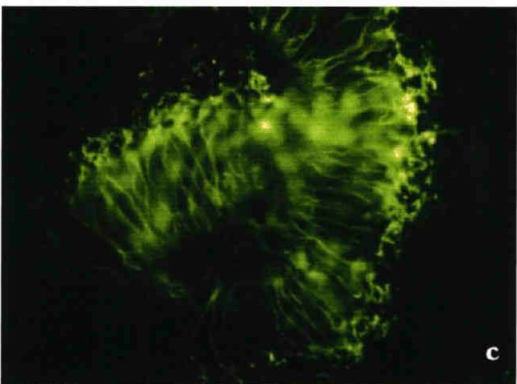
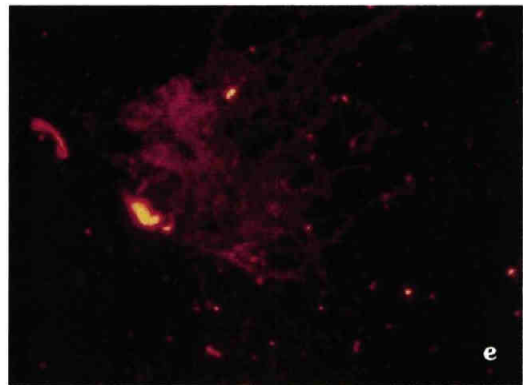
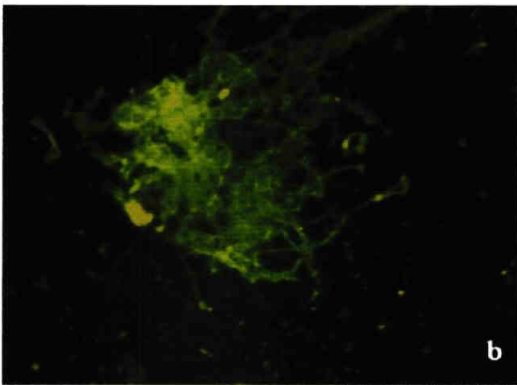
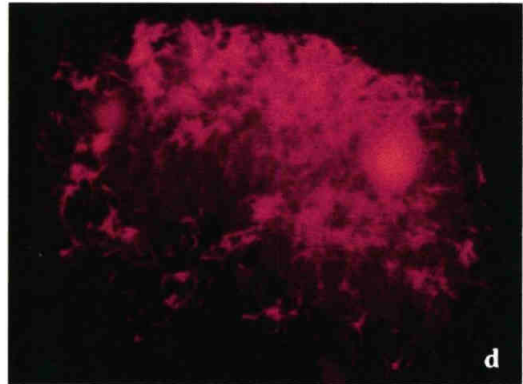
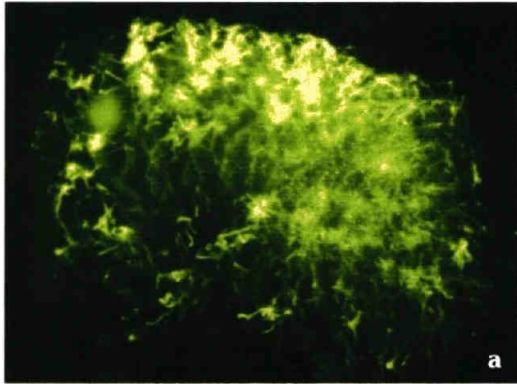


Figura 11

6.- DISCUSIÓN

En la retina del pollo, el contenido medio de colesterol a lo largo del desarrollo supone el 8.29% de los lípidos totales y el 40.13% de los lípidos neutros. Estos valores son similares a aquellos registrados por Ruiz-Gutiérrez y col. (1996) para los primeros estadios del desarrollo (8.06% y 38.18%, respectivamente) y aquellos dados por Johnston y Hudson (1974) para pollos adultos (9.7% y 37.3%, respectivamente).

El tratamiento agudo con etanol a embriones de pollo de seis días de desarrollo causó un marcado incremento del colesterol libre, así como una disminución drástica del colesterol esterificado en la retina, que se mantuvo a lo

largo del desarrollo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Marco y col. (1986), quienes encontraron que el contenido en colesterol libre de los microsomas, las mitocondrias y la mielina del cerebro de pollo aumentó en pollos recién nacidos sometidos a un tratamiento con etanol. Sin embargo, en estudios realizados por Sánchez-Amate y col. (1991), la síntesis y esterificación del colesterol disminuyen en el cerebro y aumentan en el hígado del pollo. También Field y col. (1985) observaron un aumento en los ésteres de colesterol al estudiar la composición lipídica del suero y el hígado de ratas tratadas con etanol, demostrando que estas membranas presentan un grado diferente de susceptibilidad frente al alcohol, reflejándose en su fluidez. Sin embargo, es conocido que un aumento de colesterol en membranas disminuye la fluidez de éstas, manifestándose por un incremento del parámetro de orden (de Kruyff y col., 1973); en nuestro caso, el incremento en los niveles de colesterol por el alcohol puede aumentar la rigidez de la membrana.

En general, en prácticamente todas las células, el aumento del colesterol libre así como la disminución en el colesterol esterificado, son debidos a un aumento en la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) así como una inhibición de la actividad de la acil coenzima A:colesterol acil transferasa (ACAT). Estos enzimas se ven afectados de forma diferente en los distintos órganos. Así, la ingestión crónica de etanol provocó un aumento en la actividad de los dos enzimas, HMG CoA reductasa y ACAT, en el hígado (en ratas, según Field y col., 1985 y en pollo, según

Sánchez-Amate y col., 1991), mientras en cerebro (Sánchez-Amate y col., 1991) se encontró una clara disminución de la actividad de estas enzimas. Nosotros hemos encontrado que en nuestro estudio sobre retina completa, hay un aumento de colesterol libre.

Hasta la fecha, no hemos encontrado en la bibliografía de forma específica, información en la retina sobre estos dos enzimas (HMG CoA reductasa y ACAT). Sin embargo, sí hemos encontrado que el enzima HMG CoA reductasa es el paso limitante en la biosíntesis del colesterol en células gliales C6 y en células de neuroblastoma en cultivo, consideradas como buenos modelos para el estudio del desarrollo de glía y de neuronas en cerebro (Volpe y Hennessy, 1977) y que la ACAT está implicada en la biosíntesis de colesterol esterificado en todas las células neurales, compartiendo células neurales y no neurales muchas características fundamentales en la formación de colesterol esterificado (Jeng y Klemm, 1984); así como que, existe una alta sensibilidad al etanol de la HMG CoA reductasa y ACAT del cerebro (Sánchez-Amate y col., 1991).

Un exceso de colesterol total es destructivo para la función de la membrana. Normalmente, las células mantienen un nivel constante del colesterol libre, almacenando el exceso en la forma esterificada. El exceso de colesterol libre puede ser potencialmente dañino si el metabolismo celular no puede esterificar el exceso de colesterol (Cooper, 1978; Gleason y col., 1991;

Bastiaanse y col., 1997).

No existen estudios, hasta el momento, que relacionen el papel del escualeno frente a los daños provocados por el alcohol, por tanto, nuestros datos aportan las primeras evidencias experimentales de que el escualeno aminora los efectos provocados por el alcohol.

Al tratar los embriones con alcohol + escualeno, observamos un incremento en los niveles de colesterol libre con respecto a los embriones control, pero este aumento no fue tan marcado como en los embriones tratados con alcohol, dándonos a entender que el escualeno reduce los daños provocados por el alcohol. El papel protector del escualeno no ha sido estudiado; por el contrario, si se ha visto que una dieta rica en escualeno, incrementa los niveles de colesterol en tejido hepático (Strandberg y col., 1989) pero no está asociado a un aumento del mismo en suero (Strandberg y col., 1990). Este efecto puede ser debido a que el escualeno reduzca la actividad de la HMG CoA reductasa y que estimule a la ACAT, como indicaron Strandberg y col. (1989) en el hígado de rata, aumentando los niveles de esterificación del colesterol como ocurre en el grupo alcohol + escualeno con respecto al grupo alcohol.

De acuerdo con nuestros resultados, hay una mayor producción de diglicéridos en embriones tratados con alcohol, produciéndose el mayor pico en

E15. En embriones A+E se produce una disminución en la producción de diglicéridos respecto al grupo anterior, acercándose sus valores más al grupo control. Los diglicéridos que son producidos por hidrólisis de PI o PC (Foster, 1993), son conocidos por actuar como segundos mensajeros en múltiples funciones metabólicas. El principal papel de los diglicéridos es activar a la proteína kinasa C, componente central para la activación de una gran cantidad de procesos biológicos, incluyendo el metabolismo, secreción, contracción, división, proliferación y diferenciación celular (Alberts y col., 1996). De acuerdo con la revisión bibliográfica hecha por Stubbs y Slater (1999), podemos indicar que un tratamiento agudo con etanol, probablemente, activa, de forma indirecta, a la proteína kinasa C.

Nuestros resultados muestran una ligera disminución en la proporción de fosfolípidos de la retina a lo largo del desarrollo del embrión de pollo tratado con etanol con respecto al embrión control, aún cuando, en el estadio E7 se observó un pequeño incremento en los mismos. Castro y col. (1987) registraron que una administración aguda de etanol estimulaba la síntesis de fosfolípidos en hepatocitos de rata, al igual que Marco y col. (1986) observaron un incremento en el contenido de fosfolípidos en la mitocondria y la mielina del cerebro de pollos recién nacidos sometidos a un tratamiento de dieciocho días con etanol. Estos resultados contrapuestos quizás sean debidos a que el etanol ejerce un efecto diferencial según el tejido y según el tipo de tratamiento o bien según la metodología aplicada. Al tratar los embriones con escualeno junto con etanol,

podimos observar que estos valores eran más cercanos a los resultados obtenidos en embriones control, lo que de nuevo nos apoya la teoría del efecto de amortiguamiento provocado por el escualeno.

Como consecuencia de los cambios producidos por el alcohol, la proporción de colesterol/fosfolípidos aumentó en los estadíos de 11 y 15 días de desarrollo con respecto a embriones control y embriones A+E, no siendo tanta la diferencia en el estadio E18. Lo que de nuevo nos corrobora un posible aumento en la rigidez de la membrana.

Se ha observado que fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son los fosfolípidos mayoritarios en las retinas de pájaros adultos, mamíferos y poiquilotermos (Fliesler y Anderson, 1983a), así como a lo largo del desarrollo del embrión de pollo (Ruiz-Gutiérrez y col., 1996). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con etanol causó una marcada disminución en la proporción de ambos fosfolípidos. Esta reducción observada en la síntesis de fosfatidilcolina está de acuerdo con la disminución encontrada por otros autores en los niveles de fosfatidilcolina hepática después del tratamiento crónico con etanol (Lieber y col., 1994; y Carrasco y col., 1996). Estudios realizados por Sánchez-Amate y col., (1991) indican que los niveles de fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y fosfatidilinositol aumentan en hígado mientras que en cerebro solo aumenta la cantidad de fosfatidilserina. Nuestros resultados indican que hay un aumento importante en fosfatidilserina y esfingomiélin en embriones tratados con etanol,

no siendo tan acusado el aumento de fosfatidilinositol. Estos resultados de nuevo nos indican que el etanol ejerce una acción diferencial en cerebro, hígado y retina.

Con el tratamiento agudo de etanol que hemos realizado, hemos encontrado que la alteración en la composición lipídica de la retina es superada a lo largo del desarrollo, de manera que las retinas de embriones tratados con etanol se regeneran a partir del 18 día de incubación. En embriones A+E esta regeneración es mucho más rápida, siendo los resultados comparables a los obtenidos para los embriones control en estadíos más tempranos. Probablemente, si hubiésemos trabajado con un tratamiento crónico o bien dosis más altas, los resultados hubieran sido más patentes de forma que el embrión no se hubiera recuperado a lo largo del desarrollo.

El estudio pormenorizado de la composición de ácidos grasos, a los 7 días de desarrollo, muestra que el incremento en C14:0 así como la pérdida de PUFAs de cadena larga, como C20:4(n-6) y C22:6(n-3) aumentarían la rigidez de la membrana. El tratamiento de los embriones con alcohol + escualeno hace que los resultados sean similares a los embriones control, con lo cual concluimos que el escualeno ayuda a mantener la fluidez de la membrana.

El ácido graso monoinsaturado principal en la retina es: el ácido oleico, C18:1(n-9). Este ácido graso disminuye espectacularmente en la retina de

embriones de pollo de 7 días de desarrollo tratados con alcohol; sin embargo estos resultados no estarían de acuerdo con los de Hidiroglou y Madere (1999) y Nakamura y col., (1992) que estudiaron los ácidos grasos en el hígado y a los de Gómez-Tubio y col., (1995) quienes vieron que este ácido graso aumentaba en tejido adiposo y plasma de ratas tratadas con etanol, probablemente porque este estudio estaba orientado hacia gotas lipídicas de adipocitos y no sobre las membranas de éstos. La disminución de este ácido graso monoinsaturado, junto con el incremento observado en la proporción saturado/monoinsaturado nos sugieren una inhibición de la actividad $\Delta 9$ -desaturasa. Por el contrario, los embriones tratados con alcohol + escualeno no presentan variación respecto al control, manifestándose de nuevo el papel protector del escualeno.

La proporción C18:1(n-9)/C16:0 disminuyó a los 7 días de desarrollo de embriones tratados con alcohol respecto a embriones control mientras que en el grupo A+E apenas hubo variación. Estas observaciones podrían ser debidas a una disminución en la elongación del ácido palmítico y la desaturación en la posición 9 del ácido esteárico resultante, en la retina de embriones tratados con etanol.

Los estudios de Cunningham y col. (1982) en mitocondrias y microsomas de hígado de ratas, demostraron que un incremento en la proporción de ácido linoleico, C18:2(n-6), es el cambio más observado (sugiriendo de este modo un reducción en la conversión de C18:2(n-6) a C20:4(n-6)). Cunningham y Spach

(1987) registraron una reducción en la proporción C20:4(n-6)/C18:2(n-6) en las mitocondrias del hígado de ratas alimentadas con etanol, sugiriendo una disminución en la elongación o desaturación para la familia de ácidos grasos esenciales. En nuestros resultados observamos como en E7 hay una disminución en la proporción de ácido linoleico y en la proporción C20:4(n-6)/C18:2(n-6), lo que nos indica que, proporcionalmente, es mayor la disminución de ácido araquidónico que de ácido linoleico.

En E7 se observa una marcada disminución de C22:6(n-3); podemos observar que al avanzar el desarrollo, la retina de embriones tratados con etanol, rápidamente eleva la cantidad de este ácido graso hasta valores próximos a la retina de embriones control. Dado el importante papel del C22:6(n-3) en la función de la retina, no es sorprendente que el Sistema Nervioso haya desarrollado mecanismos para la conservación de ácidos grasos (n-3) durante los momentos de déficit. De echo es bastante difícil reducir los niveles de C22:6(n-3) en cerebro de ratas (Boure y col.,1984) y cerebro y retina de mono rhesus (Neuringer y col., 1984a) sometidos a una privación de éste en la dieta. A la vista de los resultados de embriones tratados con alcohol y escualeno que en E7 presentan unos valores más cercanos a los embriones control, un aporte en la dieta de escualeno puede ser efectivo para prevenir una pérdida de PUFA que aparece en embriones tratados con alcohol.

En nuestro estudio mostramos que la administración de etanol está

asociado, en E7, con una reducción de productos de la vía (n-3), C22:5(n-3) y C22:6(n-3), con un concomitante incremento en el sustrato, C18:3(n-3). Estos cambios podrían estar causados por una reducción en la actividad de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa en el grupo tratado con etanol, como fue estudiado en el hígado de ratas alcohólicas (Zidenberg-Cherr y col., 1991).

El descenso, producido por el etanol, en la biosíntesis de PUFAs, puede deberse a una disminución de la actividad $\Delta 6$ desaturasa que convierte el ácido linoleico a ácido γ -linolénico y por una disminución de la desaturación $\Delta 5$ de ácidos grasos que convierte el ácido eicosa-8,11,14-trienoico a ácido araquidónico (Nervi y col., 1980). Según Miller y col. (2000), las reducciones inducidas por el etanol a nivel de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son producidas por peroxidación lipídica. La toxicidad del alcohol esta causada, ante todo, por la generación de radicales libres en varios tejidos (Mantle y Preedy, 1999). La peroxidación de las membranas lipídicas inducida por radicales libres producen un daño irreversible que conduce a la muerte celular. Los ácidos grasos presentes en las membranas, especialmente los que contienen dos o más insaturaciones como los poliinsaturados, se caracterizan por su especial labilidad en la cesión de átomos de hidrógeno alílico y pueden transformarse a su vez en radicales libres. Los radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados pueden por tanto reaccionar con el oxígeno molecular dando lugar a radicales libres peroxidados (ROO^*) que, seguidamente, por reacción en cadena, pueden propagar el proceso a otros ácidos grasos

insaturados y dar lugar así a nuevos radicales libres de los ácidos grasos (R^{\bullet}), a hidrolipoperóxidos (ROOH), los cuales en presencia de metales catalíticos como hierro y cobre, se descomponen formando mezclas de hidrocarburos y aldehidos citotóxicos (Derache y col., 1980) como malonildialdehido, que puede reaccionar a su vez con lípidos y proteínas, formando lipofusinas. La reacción finaliza con la formación de un polímero (RR) o con la intervención de sistemas antioxidantes (AntioxOH), los cuales permiten dentro de un cierto límite, mantener una situación de equilibrio. La retina tiene el más alto consumo de oxígeno por peso de cualquier tejido y también mantiene una enorme tensión de oxígeno, sin embargo, el oxígeno puede ser muy tóxico para la retina. Aunque la retina contiene ciertos componentes antioxidantes (por ejemplo la vitamina E, superóxido dismutasa, selenio), los niveles de glutatión peroxidasa y catalasa (enzimas que destruyen el peróxido de hidrógeno) son relativamente bajos en este tejido (Fliesler y Anderson, 1983a). En dicho caso, el escualeno ejercería un papel protector dado sus propiedades antioxidantes, ya que es un eficaz captador de oxígeno libre o especies reactivas de oxígeno en la peroxidación lipídica (Kohn y col., 1995). Según Heaton y col. (2000), el daño en el cerebelo de ratas, relacionado con el alcohol durante un periodo posnatal temprano (4 ó 5 días después del nacimiento), podría estar relacionado con procesos de estrés oxidativo o por la insuficiencia de antioxidantes protectores, por lo que un tratamiento con antioxidantes puede representar una terapia posible para prevenir o mejorar el daño en el Sistema Nervioso Central, observado en el Síndrome Alcohólico Fetal.

A partir de E11, la proporción C18:1(n-9)/C16:0 fue similar a lo largo del desarrollo tanto en grupos control como en grupos alcohol, lo que nos indica la capacidad del propio embrión para recuperarse de un daño agudo mientras que en los grupos A+E esta relación aumenta en E15 y E18 aumentando con ello el grado de insaturación.

En E11 y hasta los últimos estadios del desarrollo no se observa una variación apreciable en la razón saturado/monoinsaturado, lo que nos indica que, en cuanto a ácidos grasos se refiere, hay una adaptación al etanol por parte del embrión. Probablemente para obtener resultados que se mantuviesen a lo largo del tiempo habría que ingerir mayores dosis o bien seguir un tratamiento crónico de etanol.

A partir del estadio E11, el contenido de ácidos grasos fue similar en los tres grupos de trabajo (embriones control, embriones expuestos a alcohol y embriones expuestos a alcohol + escualeno), lo que sugiere que la disponibilidad de ácidos grasos en tejido embrionario no fue significativamente afectado ni por etanol, ni por etanol + escualeno.

Existen algunos trabajos que muestran que el alcohol produce alteraciones morfológicas en la estructura de la retina (Chmielewski y col., 1997; Parson y col. 1995; Parson y Sojitra, 1995b; Ashwell y Zhang, 1994; Strömland

y Pinazo-Duran, 1994). Sin embargo, estudios similares del efecto del alcohol junto con el escualeno no hemos encontrado en la bibliografía hasta la fecha.

Aunque a nivel bioquímico los cambios se manifestaron rápidamente, a nivel morfológico la célula es menos sensible, por lo que para que se manifestasen de forma patente duplicamos la dosis utilizada inicialmente para la obtención de los datos sobre la composición lipídica de la retina.

En nuestro estudio hemos podido constatar, de acuerdo con Chmielewski y col., (1997) y Hernández (1994) que el alcohol retrasa el desarrollo de la retina, hay una pérdida de celularidad y un aumento de los espacios intercelulares con incremento en el número de picnosis y retraso en la migración celular, observándose los mayores daños en la parte más interna de la retina (a nivel de amacrinas y ganglionares). Hay una pérdida de verticalidad celular. La degeneración de la retina no es uniforme, existen unas áreas más afectadas que otras, lo que nos sugiere, al igual que a Chmielewski y col. (1997), que existe distinto grado de labilidad y sensibilidad para el alcohol por parte de los distintos tipos de neuronas de la retina.

Hay un mayor número de degeneraciones y picnosis en los estratos más profundos de la capa nuclear interna, siendo las células que más se alteran aquella población celular que daría origen a diversas interneuronas, caracterizadas en su fase inicial por poseer un mecanismo de migración libre,

que dará lugar a las células horizontales, a algunas amacrinas y a las amacrinas invertidas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rodríguez en 1985, aunque utilizó diferentes dosis de trabajo.

También a nivel de la capa nuclear interna es llamativo la pérdida de verticalidad celular, en lo que parece una pérdida de la forma fusiforme de los somas de las células bipolares, quizás debido a una pérdida de la tensión interna por un aumento en la permeabilidad celular como consecuencia del cambio en la composición lipídica de la retina; o más bien, al cambiar la composición lipídica de la retina, se altera la estructura de la membrana y los puntos de anclaje del citoesqueleto a la misma. Como el citoesqueleto es conocido por regular la forma de la célula y, al menos en algunos casos, está enganchado a la superficie de la membrana celular, al quedar alterada la estructura de la membrana, se desorganizarían los puntos de anclaje del citoesqueleto a la misma. Ya otros autores determinaron que el alcohol alteraba la forma celular y sus contactos célula a célula en la cresta neural (Hassler y Moran, 1986). Sanders y col., (1987) mostraron que las células mesodérmicas de embriones de pollo tratados con alcohol fueron significativamente más redondeadas y, por lo tanto, menos expandidas que los controles y mostraron menos contactos filopódicos con la membrana basal.

La capa de células ganglionares también se ve seriamente afectada por el alcohol quedando reducida a una sola hilera de células con un gran número de

células vacuolizadas y en picnosis. Estos efectos producen en muchos de los casos una desestructuración amplia de la citada capa e hipoplasia de la capa de fibras del nervio óptico (Chmielewski y col., 1996).

Poco se conoce sobre los mecanismos que inducen estas alteraciones, pero es posible que los efectos teratogénicos del etanol sean debidos a los cambios que provoca en la composición lipídica de la membrana celular, que altera su fluidez, y eso cambia la capacidad del contacto célula a célula en la diana principal.

Parson y col. (1995a) observaron una pérdida de axones mielinizados en el nervio óptico de jóvenes ratones adultos, resultado de una exposición embrionaria al alcohol. En 1989, Prada y col. hipotetizaron que la célula de Müller desarrollaba las vainas de mielina para envolver los axones del nervio óptico. Diez años después, Prada y col. (1999), con la aplicación de MOSP justificaban su hipótesis. Todos estos daños mencionados anteriormente pueden ser un efecto secundario del alcohol, al actuar en primer lugar, como una pérdida de expresión de mielina en las células de Müller. Al perder estas células la capacidad de mielina, como se observa por su inhibición de inmunorreactividad para MOSP, los axones de las ganglionares no son mielinizados y degeneran, quedando destruida la célula. Otra hipótesis puede ser que al quedar las células gliales dañadas, pierdan su propiedad de guiar a los

axones a sus células diana en la vía del tectum óptico. Como consecuencia los axones de las células ganglionares degeneran, quedando éstas destruidas.

La glutamina sintetasa es un enzima que metaboliza el glutamato a glutamina; también actúa como regulador de los neurotransmisores glutamato y γ -aminobutírico (GABA). Otra de las funciones de la GS es actuar como detoxificador en el SNC, al eliminar el exceso de amonio manteniéndolo a niveles bajos de concentración (Cooper y col., 1983; Hertz y Schousboe, 1980). El glutamato, en exceso, destruye a las dendritas y a los cuerpos celulares, dejando los axones que degeneran después, causando muerte celular (Frandsen y Schousboe, 1990). En la retina, la GS se expresa exclusivamente en las células de Müller (Linser y Moscona, 1983). La disminución en la expresión de inmunorreactividad para GS en embriones tratados con alcohol podría dar otra explicación a los daños morfológicos observados en las retinas de dichos embriones.

Goldstein y Chin (1981) concluyen que los efectos del etanol sobre la membrana son, en realidad, sus acciones primarias y que cambios en la función neural representados por el metabolismo y liberación de neurotransmisores son consecuencias secundarias del etanol. Así la disminución en la expresión de inmunorreactividad para MOSP y para glutamina sintetasa sería un efecto secundario del daño ocasionado por el alcohol.

En el tratamiento con alcohol + escualeno existe una recuperación con respecto al tratamiento con alcohol, que en E7 no es muy llamativa pero ya en E11 es más patente. Estos resultados son consecuentes con los obtenidos en bioquímica en los que podíamos observar que los embriones A+E mostraban un patrón similar a los embriones tratados con alcohol (en el estudio de lípidos totales y principales clases de fosfolípidos) quizás debido a que el escualeno sea algo más lento de absorber, digerir o de ser metabolizado por el embrión o que su acción sea más tardía. De nuevo en E11 los resultados bioquímicos se pueden extrapolar a los resultados morfológicos y en ambos podemos apreciar una gran recuperación en los embriones tratados con escualeno.

No conocemos el mecanismo de actuación del escualeno. Quizás en su papel como antioxidante evite la peroxidación lipídica que provoca el alcohol (que ha sido estudiada por diversos autores, como Bautista y Spitzer, 1992 y Rashba-Step y col., 1993).

Dado que el aceite de oliva es consumido diariamente por muchos humanos, el escualeno, derivado de esta dieta, podría, posiblemente proporcionar una protección contra el daño (tanto a nivel bioquímico como morfológico) provocado por el alcohol.

7.- CONCLUSIONES

1. A nivel de lípidos totales, el tratamiento con alcohol causa un marcado incremento del colesterol libre así como una disminución drástica del colesterol esterificado en la retina a lo largo del desarrollo. El escualeno reduce los cambios efectuados por el alcohol, haciendo que éstos no sean tan acusados.

2. El escualeno amortigua el aumento que se produce en la proporción molar colesterol/fosfolípidos en embriones tratados con alcohol, manteniendo la fluidez de la membrana.

3. La proporción de fosfolípidos mayoritarios de las membranas, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, disminuyen en embriones tratados con alcohol; mientras que la fosfatidilserina, la esfingomielina y el fosfatidilinositol aumentan.

4. Al no introducir dosis acumulativas de alcohol, la alteración en la composición lipídica de la retina es superada a lo largo del desarrollo, de manera que las retinas de embriones tratados con alcohol se regeneran a partir del 18º día de incubación (E18). En embriones tratados con alcohol + escualeno, la regeneración es mucho más rápida, siendo los resultados similares a los embriones control en estadios más tempranos.

5. Aunque en E7 se producen variaciones en el contenido de algunos ácidos grasos de embriones tratados con alcohol respecto a embriones control y embriones tratados con alcohol + escualeno, en el resto de los estadios, el

contenido de la mayoría de los ácidos grasos fue similar en los tres grupos de trabajo, de manera que, con carácter general, la composición de ácidos grasos en la retina no fue afectada ni por el alcohol, ni al aplicarle conjuntamente alcohol + escualeno.

6. El alcohol retrasa el desarrollo de la retina con: aumento de espacios intercelulares y en el número de picnosis; retraso en la migración celular; y pérdida de verticalidad celular como consecuencia de la pérdida de la forma celular. El tratamiento con alcohol + escualeno contrarresta estos efectos producidos por el alcohol.

7. El escualeno contrarresta los efectos degenerativos no uniformes producidos por el alcohol en la retina del embrión de pollo, especialmente en su porción más interna.

8. El escualeno recupera los niveles de expresión de MOSP y GS, que quedan inhibidos en el tratamiento con alcohol, permitiendo que la célula de Müller mantenga su funcionalidad.

9. El escualeno protege de las alteraciones morfológicas en la estructura de la retina, ocasionadas por el alcohol, comenzando esta recuperación en el estadio E7 y siendo más pronunciada en el estadio E11.

10. Como conclusión global y final podemos señalar que el escualeno proporciona una protección contra el daño (comprobado tanto a nivel bioquímico como morfológico) provocado por el alcohol en la retina del embrión de pollo a lo largo de su desarrollo.

8.- BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J.D. (1996) *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona

ALVAREZ, E., RUIZ-GUTIERREZ, V., SANTA MARIA, C. y MACHADO, A. (1993) Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mec. Ageing Dev.*, 71: 1-2

ANDERSON, R.E., BENOLKEN, R.M., DUDLEY, P.A., LANDIS, D.J. y WHEELER, T.G. (1974) Polyunsaturated fatty acids of photoreceptor membranes. *Exp. Eye Res.*, 18: 205-213

ANDERSON, R.E., MAUDE, M.B. y ZIMMERMAN, W. (1975) Lipids of ocular tissues. X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retina. *Vision Res.*, 15: 1087-1090

ANDERSON, G.J., CONNOR, W.E., CORLISS, J.D. y LIN, D.S. (1989) Rapid modulation of the n-3 docosahexaenoic acid level in the brain and retina of the newly hatched chick. *J. Lipid Res.*, 30: 433-441

ARMENGOL, J.A., PRADA, F. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1979) Vesículas cubiertas (coated vesicles) en la retina del embrión de pollo: un primer estadio sinaptogénico?. *Morf. Norm. Patol. A*, 3: 707-711

ARMENGOL, J.A. (1983) Histogénesis de los fotorreceptores de los vertebrados. *Tesis Doctoral*. Fac. Medicina. Sevilla

ASHWELL, K.W.S. y ZHANG, L.L. (1994) Optic nerve hypoplasia in an acute exposure model of the Fetal Alcohol Syndrome. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16(2):161-167

AVELDAÑO, M.I. y SPRECHER, H. (1983) Synthesis of hidroxy fatty acids from 4,7,10,13,16,19-[1-¹⁴C] docosahexaenoic acid by human platelet. *J. Biol. Chem.*, 258: 9339-9343

AVELDAÑO, M.I. (1988) Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes. *Biochemistry*, 27 (4): 1229-1239

BABUCHIN, A. (1863) Beiträge zur entusickelungsgeschichte des anges, besonders der retina. *Würzb. Naturw. Z.*, 4: 71-90

BARNES, D.E. y WALKER, D.W. (1981) Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Dev. Brain Res.*, 1: 333-340

BASTIAANSE, E.M., HOLD, K.M., VAN DER LAARSE, A. (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc. Res.*, 33(2): 272-283

BAUTISTA, A.P. y SPITZER, J.J. (1992) Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by "in situ" perfused rat liver. *Hepatology*, 15: 892-898

BAZAN, N.G., BIRKLE, D.L. y REDDY, T.S. (1984) Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) is metabolized to lipoxygenase reaction products in the retina. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 125: 741-747

BECKER, R. (1989) Preparation, composition and nutritional implications of amaranth seed oil. *Cereal Foods World*, 34: 950-953

BELL, M.V. y TOCHER, D.R. (1989) Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Occurrence of high levels of di-(n-3) polyunsaturated fatty acid species. *Biochem. J.*, 264 (3): 909-915

BELL, M.V. y DICK, J.R. (1991) Molecular species composition of the mayor diacylglycerophospholipids from muscle, liver, retina and brain of cod (*Gadus morhua*). *Lipids*, 26(8): 565-573

BERRAQUERO, R. (1983) Bases embriológicas del síndrome alcohólico fetal. *Tesis Doctoral*. Fac. Medicina. Sevilla

BERRY, M.S. y PENTREATH, V.W. (1980) The neurophysiology of alcohol. M. Sandler (ed). *Psychopharmacology of alcohol*. Raven Press, New York: 43-72

BIRCH, E.E., GARFIELD, S., HOFFMAN, D.R., UAUY, R. y BIRCH, D.G. (2000) A randomized controlled trial of early dietary supply of long chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev. Med. Child Neurol.*, 42(3): 174-181

BOESZE-BATTAGLIA, K., HENNESSEY, T. y ALBERT, A.D. (1989) Cholesterol heterogeneity in bovine rod outer segment disk membranes. *J. Biol. Chem.*, 264 (14): 8151-8155

BORDONI, A., COCCHI, M., LODI, R., TURCHETTO, E. y RUGGERI, F. (1986) Metabolism and distribution of linoleic and α -linolenic acid derivatives in chick embryo development. *Prog. Lipid Res.*, 25: 407-411

BOURRE, J.M., PASCAL, G., DURAND, G., MASSON, M., DUMONT, O. y PICIOTTI, M. (1984) Alternations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J. Neurochem.*, 43: 342-348

BOURRE, J.M., FRANCOIS, M., YOUYOU, A., DUMONT, O., PICIOTTI, M., PASCAL, G. y DURAND, G. (1989) The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.*, 119 (12): 1880-1892

BOX, G., HUNTER, W. y HUNTER, A. (1978) *Statistics for experiments*. Ed. Wiley Interscience, New York: 263-265

BRECKENRIDGE, W.C., GOMBOS, G. y MORGAN, I.G. (1972) The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 266: 695-707

BRODIE, C. y VERNADAKIS, A. (1990) Critical periods to ethanol exposure during early neuroembryogenesis in the chick embryo: cholinergic neurons. *Dev. Brain Res.*, 56: 223-228

BROEKHUYSE, R.M. (1968) Phospholipid in tissues of the eye. I. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (2): 307-315

CARRASCO, M.P., SANCHEZ-AMATE, M.C., SEGOVIA, S.L. y MARCO, C. (1996) Studies on phospholipid biosynthesis in hepatocytes from alcoholic rats by using radiolabeled exogenous precursors. *Lipids*, 31(4): 393-397

CASTRO, J., MAQUEDANO, A. y GUZMAN, M. (1987) Short and long term effects of ethanol on glycerolipid synthesis from palmitate in fasted rat hepatocytes. *Int. J. Biochem.*, 7: 595-599

COHEN, L.A., THOMPSON, D.G., MAUERA, Y., CHOI, K., BLANK, M.E. y ROSE, D.P. (1986) Dietary fat and mammary cancer. I. Promotional effects of fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77: 33-42

CONNOR, W.E., NEURINGER, M. y LIN, D.S. (1990) Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.*, 31: 237-247

COOPER, A.J.L., VERGARA, F., y DUFFY, T.E. (1983) Cerebral glutamine synthetase. *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System*. L. Hertz, E., Kvamme, E.G., McGeer and A. Schousboe, eds. Alan R. Liss, New York: 77-93

COOPER, R.A. (1978) Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J. Supramol. Struct.*, 8(4): 413-430

COREY, E.J., NIWA, H., FALCK, J.R., MIOSKOWSKI, C., ARAI, Y. y MARFAT, A. (1980) Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 6: 19-25

COULOMBRE, A.J. (1955) Correlations of structural and biochemical changes in the developing retinal of the chick. *Am. J. Anat.*, 96: 153-189

CUNNINGHAM, C.C. FILUS, S., BOTTENUS, R.E. y SPACH, P.I. (1982) Effect of ethanol consumption on the phospholipid composition of rat liver microsomes and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 712: 225-233

CUNNINGHAM, C.C. y SPACH, P.I. (1987) The effect of chronic ethanol consumption on the lipids in liver mitochondria. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 492: 181-192

CHAN, T., BOWELL, R., O'KEEFE, M. y LANIGAN, B. (1991) Ocular manifestations in fetal alcohol syndrome. *Br. J. Ophthalmol.*, 75: 524-526

CHEN, H., WIEGAND, R.D., KOUTZ, C.A. y ANDERSON, R.E. (1992a) Docosahexaenoic acid increase in frog retinal pigment epithelium following rod photoreceptor shedding. *Exp. Eye Res.*, 55: 93-100

CHEN, H. y ANDERSON, R.E. (1992b) Lipids of frog retinal pigment epithelium: comparison with rod outer segments, retina, plasma and red blood cells. *Curr. Eye Res.*, 11(8): 793-800

CHEN, L.H., HU, N. y HUANG, T.L. (1992) Effects of acute alcohol intoxication on liver antioxidant defense systems in rats. *Biochem. Arch.*, 8: 95-100

CHIN, J.H. y GOLDSTEIN, D.B. (1977) Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol. *Science*, 196: 684-685

CHIN, J.H., PARSON, L.M. y GOLDSTEIN, D.B. (1978) Increased cholesterol content of erythrocyte and brain membranes in ethanol-tolerant mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 513: 358-363

CHIN, J.H. y GOLDSTEIN, D.B. (1984) Cholesterol blocks the disordering effects of ethanol on membranes. *Lipids*, 19: 929-935

CHINTHALAPALLY, V.R., NEWMARK, H.L. y REDDY, B.S. (1998) Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 19 (2): 287-290

CHMIELEWSKI, C.E., QUESADA, A., PRADA, F., RAMIREZ, F., ARGÜELLES, F., AGUILAR, J.M. y GRACIA, A. (1996) Estudio experimental sobre los efectos del consumo de alcohol durante el desarrollo embrionario. *Anales Españoles de Pediatría*, Supl. 85

CHMIELEWSKI, C.E., HERNANDEZ, L.M., QUESADA, A., POZAS, J.A., PICABEA, L. y PRADA, F.A. (1997) Effects of ethanol on the inner layers of chick retina during development. *Alcohol*, 14(3): 1-5

DAVIES, K.L. y SMITH, D.E. (1981) A Golgi study of mouse hippocampal CA I pyramidal neurons following perinatal ethanol exposure. *Neurosci. Lett.*, 26: 49-54

DE KRUYFF, B., VAN DIFCK, P.W.H., GOLDBACH, R.W., DEMEL, R.A. y VAN DEENEN, L.L.M. (1973) Influenced of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane bound enzyme in *Acholeplasma laidlawii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 330: 269-282

DELTON-VANDENBROUCKE, I., GRAMMAS, P. y ANDERSON, R.E. (1997) Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells. *J. Lipid Res.*, 38: 147-159

DERACHE, P., MITJAVILA, S., SOULA, G. y DERACHE, R. (1980) Radicaux libres, lipoperoxidation et toxicite. *Ann. Nutr. Alimn.*, 34: 599-624.

DOGIEL, A. (1888) Ueber das verhalten der nervösen elementen in der retina der ganoiden reptilian. *Vogel und Sängetiere. Anat. Anz.*, 3: 133-143

DORADO, M.E. (1986) Análisis de la migración y diferenciación de las células del asta anterior de la médula espinal en el embrión de pollo. *Tesis doctoral*. Facultad de Medicina. Sevilla

DORMAN, R.V., DREYFUS, H., FREYSZ, L. y HORROCKS, L.A. (1977) Ether lipid content of phosphoglycerides from the retina and brain of chicken and calf. *Biochim. Biophys. Acta*, 486: 55-59

DREYFUS, H., URBAN, P.F. EDEL-HARTH, S. y MANDEL, P. (1975) Developmental patterns of gangliosides and of phospholipids in chick retina and brain. *J. Neurochem.*, 25: 245-250

DRUSE, M.J. y HOFTEIG, J.H. (1977) The effect of chronic maternal alcohol consumption on the development of central nervous system myelin subfractions in rat offspring. *Drug Alcohol Depend.*, 2: 421-429

DRUSE, M.J. (1986) Effects of perinatal alcohol exposure on neurotransmitters, membranes and proteins. In: Westt, J.R. (ed) *Alcohol and brain development*. New York: Oxford University Press: 343-367

EDEL-HARTH, S., DREYFUS, H., BOSCH, P., REBEL, G., URBAN, P.F. y MANDEL, P. (1973) Gangliosides of whole retina and rod outer segments. *FEBS Lett.*, 35 (2): 284-288

EWING, J.A. y ROUSE, B. (1976) Alcohol as an euphoriant drug: researching for a neurochemical basis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 273: 159-166

FARKAS, K., RATCHFORD, I.A.J., NOBLE, R.C. y SPEAKE, B.K. (1996) Changes in the size and docosahexaenoic acid content of adipocytes during chick embryo development. *Lipids*, 31 (3): 313-321

FIELD, F.J., BOYDSTUN, J.S. y LABRECQUE, J.R. (1985) Effect of chronic ethanol ingestion on hepatic and intestinal acyl coenzyme a:cholesterol acyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in the rat. *Hepatology*, 5(1): 133-138

FLIESLER, S.J. y SCHROEPFER, G.J.Jr. (1982) Sterol composition of bovine retinal rod outer segment membranes and whole retinas. *Biochim. Biophys. Acta*, 711: 138-148

FLIESLER, S.J. y ANDERSON, R.E. (1983a) Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.*, 22: 79-131

FLIESLER, S.J. y SCHROEPFER, G.J.Jr. (1983b) Metabolism of mevalonic acid in cell-free homogenates of bovine retinas; formation of novel isoprenoid acids. *J. Biol. Chem.*, 258 (24): 15062-15070

FLIESLER, S.J. y SCHROEPFER, G.J.Jr. (1986) In vitro metabolism of mevalonic acid in the bovine retina. *J. Neurochem.*, 46: 448-460

FLIESLER, S.J., FLORMAN, R., RAPP, L.M., PITTLER, S.J. y KELLER, R.K. (1993) In vivo biosynthesis of cholesterol in the rat retina. *FEBS Lett.*, 335 (2): 234-238

FLIESLER, S.J., BOESZE-BATTAGLIA, K., PAW, Z., KELLER, R.K. y ALBERT, A.D. (1997) Squalene is localized to the plasma membrane in bovine retinal rod outer segments. *Exp. Eye Res.*, 64 (2): 279-282

FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509

FOSTER, D.A. (1993) Intracellular signalling mediated by protein tyrosine kinase: net-working through phospholipid metabolism. *Cell. Signal*, 5: 389-399

FRANSEN, A. y SCHOUSBOE, A. (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *In. J. Dev. Neurosci.*, 8: 209-216

FUJITA, S. (1963) The matrix cell and mitogenesis in the developing central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 120: 37-42

FUJITA, S. y HORII, H. (1963) Analysis of mitogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch. Histol. Japan*, 23: 359-366

FUJITA, S. (1964) Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 122: 311-328

FUJITA, H. y FUJITA, S. (1964) Electron microscopic studies on the differentiation of the ependymal cells and the glioblast in the spinal cord of domestic fowl. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 64: 262-272

GALLEGO, A. (1978) Mecanismos neuronales de adaptación a nivel de la capa plexiforme externa de la retina. *Fund. Juan March. Serv. Univ.* 52: 1-62

GARCIA-LOMAS, V., QUESADA, A. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1986) Desarrollo de las células horizontales de la retina en el embrión de pollo. *Acta Microscópica*, 9(2): 189-202

GENIS-GALVEZ, J.M. (1970) *Biología del desarrollo*. Ed. Expaxs. Barcelona: 208-210

GENIS-GALVEZ, J.M. (1977) Las células amacrinas de la retina: Un estudio histogenético en el embrión de pollo. *Fund. Juan March. Ser. Univ.*, 25: 55-68

GENIS-GALVEZ, J.M., PUELLES, L., y PRADA, C. (1977) Displaced retinal amacrine cell in the chick retina. *Exp. Neurol.*, 56: 151-157

GENIS-GALVEZ, J.M., PRADA, F.A. y ARMENGOL, J.A. (1978) A possible horizontal amacrine cell system in the retina of the chick embryo. *Third International Con. of Eye Research*. Osaka. Japan.

GENIS-GALVEZ, J.M., PRADA, F.A. y ARMENGOL, J.A. (1979) Evidence of three types of horizontal cells in the chick retina. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 23: 378-387

GERBER, M. (1994) Olive oil and cancer. In: Hill, M.J., Giacosa, A. and Caygill, C.P. (eds). *Epidemiology of Diet and Cancer*, Ch.13. Ellis Horwood. London: 263-275

GLEASON, M.M., MEDOW, M.S. y TULENKO, T.N. (1991) Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ-Res.*, 69(1): 216-227

GOLDIN, R.D., HUNT, N.C., CLARK, J. y WICKRAMASINGHE, S.N. (1993) Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: Reversibility of ethanol-induced changes. *J. Pathol.*, 171: 73-76

GOLDSTEIN, D.B. y CHIN, J.H. (1981) Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed. Proc.*, 40(7): 2073-2076

GOMEZ-TUBIO, A., PITA, M.L., TAVARES, E., MURILLO, M.L., DELGADO, M.J. y CARRERAS, O. (1995) Changes in the fatty acid profile of plasma and adipose tissue in rats after long-term ethanol feeding. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19(3): 747-752

GRÜN, G. (1982) The development of the vertebrate retina: a comparative survey. *Adv. Anat. Embr. Cell. Biol.*, 78: 1-83

GUNSTONE, F.D., HARDWOOD, J.L. y PADLEY, F.B. (1986) *The lipid handbook*. Chapman and Hall Ltd. (eds.) The University Press. Cambridge: 223

GUTIERREZ, S. (1978) En: *Bioestadística*. Ed. Tebar-Flores, Madrid: 263-265

HALSTED, C.H., VILLANUEVA, J., CHANDLER, C.J., STABLER, S.P., ALLEN, R.H., MUSKHELISHVILI, L., JAMES, S.J. y POIRER, L. (1996) Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. *Hepatology*, 23: 497-505

- HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 48-92
- HAMMER, R.P. y SCHEIBEL, A.B. (1981) Morphologic evidence for a delay of neuronal maturation in fetal alcohol exposure. *Exp. Neurol.*, 74: 587-596
- HASSLER, J.A. y MORAN, D.J. (1986) The effects of ethanol on embryonic actin: a possible role in teratogenesis. *Experientia*, 42(5): 575-577
- HEATON, M.B., MITCHELL, J.J. y PAIVA, M. (2000) Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 24(4): 512-518
- HELLSTROM, A. (1999) Optic nerve morphology may reveal adverse events during prenatal and perinatal life-digital image analysis. *Surv. Ophthalmol.*, 44(Suppl.1): S63-S73
- HERNANDEZ, L.M. (1994) Efectos toxicológicos del etanol en la morfohistogénesis de la célula horizontal de la retina del embrión de pollo. Tesis Doctoral. Fac. Medicina. Sevilla.
- HERTZ, L. y SCHOUSBOE, A. (1980) Interactions between neurons and astrocytes in the turnover of GABA and glutamate. *Brain. Res. Bull.*, 5 (Suppl.2): 389-395
- HIDIROGLOU, N y MADERE, R. (1999) Effect of chronic ethanol dosing on hepatic triglyceride and phospholipid profile and fatty acids in guinea pig. *Alcohol*, 19(3): 229-233

HINDS, J.W. y RUFFETT, T.L. (1971) Cell proliferation in the neural tube: An electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 115: 226-264

HINDS, J.W. y HINDS, P.L. (1974) Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev. Biol.*, 37: 381-416

HOLM, M., MANSSON, J.E. VANIER, M.T. y SVENNER-HOLM, L. (1972) Gangliosides of human bovine and rabbit retina. *Biochim. Biophys. Acta*, 280: 356-364

HOLMAN, R.T. (1976) Essential fatty acid deficiency. *Prog Chem. Fats Lipids*, 9: 275-348

HORROCKS, L.A. y YEO, Y.K. (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid. *Pharmacol. Res.*, 40(3): 211-225

HUGHES, W.F. y LAVELLE, A. (1974) On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.*, 279: 179-302

IKIKAWA, T., UMEJI, M., MANABE, T., YANOMA, S., ORINODA, K. y MIZUNUMA, H. (1986) Studies on antitumor activity of squalene and its related compounds. *J. Pharmac. Soc. of Japan*, 106: 578-582

INNIS, S.M., SPRECHER, H., HACHEY, D., EDMOND, J. y ANDERSON, R.E. (1999) Neonatal polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*, 34: 139-149

JELINEK, R. (1959) Proliferace v centrálním nervovém kurecích zárodku. I. Doba travání mitosy v germinální zone míchy od 2 do 3 dne zárodečného vyvoje. *Csk. Morfol.*, 7: 163-173

JENG, I y KLEMM, N (1984) Acyl-CoA cholesterol acyltransferase in cultured glioblastoma cells. *Neurochem. Res.*, 9(9): 1193-1210

JENSEN, M.M., SKARSFELDT, T. y HØY, C.E. (1996) Correlation between level of (n-3) polyunsaturated fatty acids in brain phospholipids and learning ability in rats. A multiple generation study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1300: 203-209

JOHNSON, D.A., LEE, N.M. COOKE, R. y LOH, H.H. (1979) Ethanol-induced fluidization of brain lipids bilayers: Required presence of cholesterol in membrane for the expression of tolerance. *Mol. Pharmacol.*, 15: 739-746

JOHNSTON, D. y HUDSON, R.A. (1974) Phospholipid of the cone-rich chicken retina and its photoreceptor outer segment membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 369: 269-277

JONES, K.L. y SMITH, D.W. (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet.*, 2: 999-1001

KAHN, A.J. (1974) An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Develop. Biol.*, 38: 30-40

KATDARE, M., SINGHAL, H., NEWMARK, H., OSBORNE, M.P. y TELANG, N.T. (1997) Prevention of mammary preneoplastic transformation by naturally-occurring tumor inhibitors. *Cancer Lett.*, 111: 141-147

KATO, K., COX, A.D., HISAKA, M.M., GRAHAM, S.M., BUSS, J.E. y DER, C.J. (1992) Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 89: 6403-6407

KELLER, R.K., FLIESLER, S.J. y NELLIS, S.W. (1988) Isoprenoid biosynthesis in the retina; quantitation of the sterol and dolichol biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.*, 263 (5): 2250-2254

KELLER, R.K. y FLIESLER, S.J. (1990) Incorporation of squalene into rod outer segments. *J. Biol. Chem.*, 265 (23): 13709-13712

KENNEDY, L.A. y ELLIOTT, M.J. (1986) Ocular changes in the mouse embryo following acute maternal ethanol intoxication. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 4: 311-317

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H. y CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257

KEYS, A., MENOTTI, A., KARVONEN, M.J. ARAAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., DJORDJEVIC, B.S. DONTAS, A.S., FIDANZA, F., KEYS, M.H., KROMHOUT, D., NEDELJKOVIC, S., PUNSAR, S., SECCARECCIA, F. y TOSHIMA, H (1986) The diet and 15-year death rata in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.*, 124: 903-915

KISSIN, B. (1979) Biological investigations in alcohol research. *Quart. J. Studies Alcohol.*, 40: 146-181

KJELLSTRÖM, C. y CONRADI, N.G. (1992) Decrease axonal calibre without axonal loss in optic nerve following chronic alcohol feeding in adult rats: A morphometric study. *Acta Neuropathol.*, 85: 117-121

KOHL, N.E., CONNER, M.W., GIBBS, J.B., GRAHAM, S.L., HARTMAN, G.D. y OLIFF, A. (1995) Development of inhibitors of protein farnesylation as potential chemotherapeutic agents. *J. Cell. Biochem.*, S22: 145-150

KOHNO, Y., EGAWA, Y., ITOH, S., NAGAOKA, S., TAKAHASHI, M. y MUKAI, K (1995) Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1256: 52-56

KRITCHEVKY, D., MOYER, A.W., TESAR, W.C., LOGAN, J.B., BROWN, R.A. y RICHMOND, G. (1954) Squalene feeding in experimental atherosclerosis. *Circ. Res.*, 11: 340-343

KUHNE, W. (1878) *On the Photochemistry of the Retina and on Visual Purple* Foster, M. (ed). MacMillan and Co., London.

LANDS, W.E.M. (1979) The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Annu. Rev. Physiol.*, 41: 633-652

LANZON, A., ALBI, T., CERT, A. y GRACIANI, J. (1994) The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 285-291

LEHNINGER, A.L. (1982) *Bioquímica*. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona

LEINFELDER, P.J. y SALIT, P.W. (1934) The lipids of retina, brain and blood. *Am. J. Ophthalmol.*, 17: 619-624

LIEBER, C.S., ROBINS, S.J. y LEO, M.A. (1994) Hepatic phosphatidylethanolamine methyltransferase activity is decreased by ethanol and increased by phosphatidylcholine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 18: 592-595

LINSER, P. y MOSCONA, A.A. (1983) Hormonal induction of glutamine synthetase in cultures of embryonic retina cells: requirements for neuron-glia contact interactions. *Dev. Biol.*, 96: 529-534

LITTLETON, J.M. y JOHN, G. (1977) Synaptosomal membrane lipids of mice during continuous exposure to ethanol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 29: 579-580

LIU, G.C.K., AHRENS, E.H.Jr., SCHREIBMAN, P.H. y CROUSE, J.R. (1976) Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J. Lipid. Res.*, 17: 38-45

LOWRY, O.H., ROBERTS, N.R. y LEWIS, C. (1956) The quantitative histochemistry of the retina. *J. Biol. Chem.*, 220: 879-892

MANDEL, P., DREYFUS, H., EDEL-HARTH, S., FREYSZ, I. Y URBGAN, P.F. (1977) Lipids of chick retina during ontogenesis. In *Brain: Fetal and Infant*. Berenberg, S.R. (ed) Martinus Nijhof Medical Division. The Hague. The Netherlands: 1-21

MANTLE, D. y PREEDY, V.R. (1999) Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React. Toxicol. Res.*, 18(4): 235-252

MANZI, P., PANFILI, G., ESTI, M. y PIZZOFERRATO, L. (1998) Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 77: 115-120

MARCO, C., CEACERO, F., GONZALEZ-PACANOWSKA, D., GARCIA-PEREGRIN, E. y SEGOVIA, J.L. (1986) Alterations induced by chronic ethanol treatment on lipid composition of microsomes, mitochondria and myelin from neonatal chick liver and brain. *Biochem. Int.*, 12(1): 51-60

MARIANI, A y LEURE DU PREÉ, A. (1977) Horizontal cell of the pigeon retina. *J. Comp. Neurol.*, 175: 13-26

MARTINEZ, M., CONDE, C. y BALLABRIGA, A. (1974) Some chemical aspects of human brain development. II. Phosphoglyceride fatty acids. *Pediat. Res.*, 8: 93-102

MARTINEZ, M., BALLABRIGA, A., GIL-GIBERNAU, J.J. (1988) Lipid of the developing human retina: I. Total fatty acids, plasmalogens and fatty acid composition of ethanolamine and choline phosphoglycerides. *J. Neurosci. Res.*, 20: 484-490

MATHEWS, J. (1992) Sharks still intrigue cancer researchers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 1000-1002

MATSUI, E., OGURA, K. y HANDA, S. (1987) Glycolipid of the bovine pineal organ and retina. *J. Biochem.*, 101: 423-432

McALHANY, R.E.Jr. WEST, J.R. y MIRANDA, R.C. (2000) Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol-induced apoptosis and JUN kinase phosphorylation. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 119(2): 209-216

MEANS, L., BURNETTE, M. y PENNIGTON, S. (1988) The effect of embryonic ethanol exposure on detour learning in the chick. *Alcohol*, 5: 305-308

MELLER, K. (1984) Morphological studies on the development of the retina. *Progr. Eye Res.*, 3: 1-20

MI, L.J., MAK, K.M. y LIEBER, C.S. (2000) Attenuation of alcohol-induced apoptosis of hepatocytes in rat livers by polyenylphosphatidylcholine (PPC). *Alcohol. Clin. Exp.Res.*, 24(2): 207-212

MIETTINEN, T.A. (1984) Regulation of Cholesterol Metabolism. In: Sanghvi, A. (ed) *Proceedings of a NATO Advanced Research Workshop*. Santa Fe, NM: 87-106

MIETTINEN, T.A. (1986) Dietary squalene related to cholesterol and lipoprotein metabolism. *International Congress Series*. N1696. Excerpta Medica, Elsevier Publishers, Amsterdam: 671-674

MICHAELIS, E.K. y MICHAELIS, M. (1986) Molecular events underlying the effects of ethanol on the developing central nervous system. In: West, J.R. (ed) *Alcohol and brain development*. New York: Oxford University Press: 277-301

MILLER, R.R., Jr., SLATHAR, J.R., y LUVISOTTO, M.L. (2000) Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol attenuate ethanol-induced changes in membrane fatty acid composition in embryonic chick brains. *Teratology*, 62(1): 26-35

MILLER, W.M. (1986) Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science*, 233: 1308-1311

MILLER, W.M. y NOWAKOWSKI, R.S. (1991) Effects of exposure to ethanol on the cell cycle kinetics and growth fraction in the proliferative zones of fetal rat cerebral cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15: 229-232

MOREST, D.K. (1970) The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entusicklungsgesh*, 131: 45-67

MORRIS, V.B. (1973) Time differences in the formation of the receptor types in the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.*, 151: 323-330

MÜLLER, H. (1851) Zur histologie der netzhaut. *Z. Wiss. Zool.*, 3: 234-237

MURAKOSHI, M., NISHINO, H., TOKUDA, H., IWASHIMA, A., OKUZUMI, J., KITANO, H. y IWASAKI, R. (1992) Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 52 (6): 950-952

MURIANA, F.J.G., RUIZ-GUTIERREZ, V., BLAYA, J.A. y BOLUFER, J. (1993) Lipid and fatty acid composition of hepatopancreatic brush-border membrane vesicles from the prawn *Penaeus japonicus*. *J. Biochem.*, 113 (5): 625-630

MURIANA, F.J.G., RUIZ-GUTIERREZ, V., BLAYA, J.A. y BOLUFER, J. (1995) Phospholipid fatty acid composition of hepatopancreatic brush-border membrane vesicles from the prawn *Penaeus japonicus*. *Biochimie*, 77: 190-193

NAKAMURA, M.T., TANG, A.B. VILLANUEVA, J., HALSTED, C.H. y PHINNEY, S.D. (1992) Reduced tissue arachidonic acid concentration with chronic ethanol feeding in miniature pigs. *Am. J. Clin. Nutr.*, 56: 467-474

- NANJI, A.A. (1998) Apoptosis and alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.*, 18: 187-190
- NERGIZ, C y ÜNAL, K. (1990) The effect of extraction systems on triterpene alcohols and squalene content of virgin olive oil. *Grasas aceites*, 41: 117-121
- NERVI, A.M., PELUFFO, R.O., BRENNER, R.R. y LEIKIN, A.I. (1980) Effect of ethanol administration on fatty acid desaturation. *Lipids*, 15: 263-268
- NEURINGER, M., CONNOR, W.E., VAN PETTEN, C. y BARSTAD, L. (1984) Dietary n-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkey. *J. Clin. Invest.*, 73: 272-276
- NEURINGER, M., CONNOR, W.E., LIN, D.G., BARSTAD, L. y LUCK, S. (1986) Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4021-4025
- NEURINGER, M., ANDERSON, G.J. y CONNOR, W.E. (1988) The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the brain and retina. *Annu. Rev. Nutr.*, 8: 517-541
- NEWMARK, H.L. (1997) Squalene, olive oil and cancer risk: A review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6 (12): 1101-1103
- NOBLE, R.C. y COCCHI, M. (1990) Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Prog. Lipid Res.*, 29: 107-140

NORDMANN, R., RIBIÈRE, C. y ROUACH, H. (1990) Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcoh. Alcoholism.*, 25: 231-237

OHKIMA, T., OTAGIRI, K., TANAKA, S. y IKEKAWA, T. (1983) Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice. *J. Pharmacol. - Dynam.*, 6: 148-151

PALAY, S.L. y CHAN-PALAY, V. (1974) *Cerebellar cortex: Cytology and organization*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York.

PARSON, S.H., DHILLON, B., FINDLATER, G.S. y KAUFMAN, M.H. (1995a) Optic nerve hypoplasia in the fetal alcohol syndrome: A mouse model. *J. Anat.*, 186: 313-320

PARSON, S.H. y SOJITRA, N.M. (1995b) Loss of myelinated axons is specific to the central nervous system in a mouse model of the fetal alcohol syndrome. *J. Anat.*, 187: 739-748

PAWLOSZY, R.J. y SALEM, N. Jr. (1995) Ethanol exposure causes a decrease in docosahexaenoic acid and an increase in docosapentaenoic acid in feline brains and retinas. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61: 1284-1289

PERRY, T.L. (1982) Cerebral amino acid pools. In: A. Lajtha (ed). *Handbook of Neurochemistry*. New York: Plenum, 1: 151-180

PETTIGREW, A.G. (1986) Prenatal alcohol exposure and development of sensory systems. In: West, J.R. (ed) *Alcohol and brain development*. New York, Oxford University Press: 225-262

PHILLIPS, D.E., KRUEGER, S.K. y RYDQUIST, J.E. (1991) Short and long term effects of combined pre- and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on the development of myelin and axons in rat optic nerve. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 9: 631-647

PRADA, C., PUELLES, L., GENIS-GALVEZ, J.M. y RAMIREZ, G. (1987) Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina. *Anat. Embryol.*, 175: 281-287

PRADA, C., PUGA, J., PEREZ-MENDEZ, L., LOPEZ, R. y RAMIREZ, G. (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.*, 3: 559-569

PRADA, F.A. (1981) La diferenciación glial de la retina del pollo y su papel en el desarrollo de las conexiones nerviosas. *Tesis Doctoral*. Fac. Medicina. Sevilla

PRADA, F.A., ARMENGOL, J.A. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1984) Displaced horizontal cell in the chick retina. *J. Morphol.*, 182: 221-225

PRADA, F.A., MAGALHAES, M.M., COIMBRA, A. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1989a) Morphological differentiation of the Müller cell: Golgi and electron microscopy study in the chick retina. *J. Morphol.*, 201: 11-22

PRADA, F.A., CHMIELEWSKI, C.E., DORADO, M.E., PRADA, C. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1989b) Displaced ganglion cells in the chick retina. *Neurosci. Res.*, 6: 329-339

PRADA, F.A., QUESADA, A., DORADO, M.E., CHMIELEWSKI, C. y PRADA, C. (1998) Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: Relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia*, 22: 221-236

PRADA, F.A., QUESADA, A., AGUILERA, Y., SANTANO, C. y PRADA, C. (1999) Myelin oligodendrocyte specific protein (MOSP) is expressed in developing and adult vertebrate retina. *Congress of the European Developmental Biology*. Oslo. Norway

PSOMIADOU, E. y TSIMIDOU, M. (1999) On the role of squalene in olive oil stability. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 4025-4032

QUESADA, A., PRADA, F.A., ARMENGOL, J.A. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1981) Early morphological differentiation of the bipolar neurons in the chick retina. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol Embryol.*, 10: 328-341

QUESADA, A. (1982) Evolución histogenética de la célula bipolar de la retina. Un estudio en el embrión de pollo. *Tesis Doctoral*. Fac. Medicina. Sevilla

QUESADA, A., PRADA, F.A., ESPINAR, A. y GENIS-GALVEZ, J.M. (1990) Effect of ethanol on morphohistogenesis and differentiation of cerebellar granule cells in the chick embryo. *Alcohol*, 7: 419-428

RAMON Y CAJAL, S. (1893) La rétine des vertébrés. *La Cellule*, 9: 17-257.

RAMON Y CAJAL, S. (1933) La rétine des vertébrés. *Trav. Lab. Rech. Biol. Univ. Madrid*, 28: 1-144

RASHBA-STEP, J., TURRO, N.J. y CEDRBAUM, A.I. (1993) Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hidroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300: 401-408

RAWAT, A.K. (1977) Developmental changes in the brain levels of neurotransmitter as influenced by maternal ethanol consumption in the rat. *J. Neurochem.*, 28: 1175-1177

REDDY, B.S. (1986) Diet and colon cancer: evidence from human and animal model studies. In: Reddy, B.S. and Cohen, L.A. (eds). *Diet, Nutrition and Cancer: A Critical Evaluation*. CRC Press, Boca Raton, FL: 47-65

REDDY, B.S. (1992) Dietary fat and colon cancer: Animal model studies. *Lipids*, 27: 807-813

RICHARDSON, K.C., JARETT, L. y FINKE, E.H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35: 313-323

RODIECK, R.W. (1973) *The vertebrate retina. Principles of structure and function*. Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco.

RODRIGUEZ, M.J. (1985) Análisis ultraestructural de los efectos del etanol en la diferenciación de la retina del pollo. *Tesis Doctoral*. Fac. Medicina. Sevilla

RODRIGUEZ DE TURCO, E.B., GORDON, W.C., PEYMAN, G.A. y BAZAN, N.G. (1990) Preferential uptake and metabolism of docosahexaenoic acid in membrane phospholipids from rod and cone photoreceptor cells of human and monkey retinas. *J. Neurosci. Res.*, 27: 522-532

ROTSTEIN, N.P., PENNACCHIOTTI, G.L., SPRECHER, H. y AVELDAÑO, M.I. (1996) Active synthesis of C_{24:5, n-3} fatty acid in retina. *Biochem. J.*, 316: 859-864

RUIZ-GUTIERREZ, V., CERT, A. y RIOS, J.J. (1992) Determination of phospholipid fatty acid and triacylglycerol composition of rat caecal mucosa. *J. Chromatography*, 575: 1-6

RUIZ-GUTIERREZ, V., MURIANA, F.J.G., MAESTRO, R. y GRACIANI, E. (1995) Oleuropein in lipid and fatty acid composition of rat heart. *Nutr. Res.*, 15: 37-51

RUIZ-GUTIERREZ, V., DORADO, M., SANCHEZ, L., BURGOS, A.R. (1996) Ontogenesis of lipid in chick embryo retina. *Curr. Eye Res.*, 15: 1138-1143

SAENZ, M.T., GARCIA, M.D., AHUMADA, M.C. y RUIZ, V. (1998) Cytostatic activity of some compounds from the unsaponifiable fraction obtained from virgin olive oil. *Farmaco.*, 53(6): 448-449

SAMORAJSKI, T., LANCASTER, F. y WIGGINS, R.C. (1986) Fetal ethanol exposure: a morphometric analysis of myelination in the optic nerve. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 4: 369-374

SAMUELSSON, B. (1983) Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 200: 568-575

SANCHEZ-AMATE, M.C., ZURERA, J.M., CARRASCO, M.P., SEGOVIA, J.L. y MARCO, C. (1991) Ethanol and lipid metabolism. Differential effects on liver and brain microsomes. *FEBS Lett.*, 293(1-2): 215-218

SANDERS, E.J., CHEUNG, E. y MAHMUD, E (1987) Ethanol treatment inhibits mesoderm cell spreading in the gastrulating chick embryo. *Teratology*, 36(2): 209-216

SANDOR, S. y AMELS, D. (1971) The influence of ethyl alcohol on the developing chick embryo. *Rev. Roum. Embryol.*, 8: 101-106

SAUER, F.C. (1935) Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.*, 63: 377-405

SAUER, M.E. y WALKER, B.E. (1959) Radiographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101: 557-560

SCOTT, B.L., RACZ, E., LOLLEY, R.N. y BAZAN, N.G. (1988) Developing rod photoreceptor from normal and mutant *rd* mouse retinas: altered fatty acid composition early in development of the mutant. *J. Neurosci. Res.*, 20: 202-211

SCOTT, B.L. y BAZAN, N.G. (1989) Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2903-2907

SCHROEPFER, G.J.Jr. (1981) Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 585-621

SELLNER, P.A. y CLOUGH, J.A. (1992) Fatty acid composition of phospholipids from chick neural retina during development. *Exp. Eye Res.*, 54: 725-730

SHAND, J.H., WEST, D.W., McCARTNEY, R.J., NOBLE, R.C. y SPEAKE, B.K. (1993) The esterification of cholesterol in the yolk sac membrane of the chick embryo. *Lipids*, 28: 621-625

SHAND, J.H., WEST, D.W., NOBLE, R.C. y SPEAKE, B.K. (1994) Esterification of cholesterol in the liver of the chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1213: 224-230

SHEFFIELD, J.B. y FISHMAN, D.A. (1970) Intercellular junctions in the developing neural retina of the chick embryo. *Zeit. Zeil. forsch. Mikrosk. Anat.*, 104: 405-418

SHEN, S.C., GREENFIELD, P. y BOELL, E.J. (1956) Localization of acetylcholinesterase in the chick retina during histogenesis. *J. Comp. Neurol.*, 106: 433-461

SHEPARD, T.H. (1980) *Catalogue of teratogenic agents*. 3rd ed. Maryland: Johns Hopkins University Press

SIDMAN, R.L. (1961) Histogenesis of mouse retina studied with thymidine- H^3 . In: Smelser, G.K. (ed). *Structure of the Eye*. Academic Press. London: 487-506.

SIDMAN, R.L. (1970) Autoradiographic methods and principles for study of the nervous system with thymidine- H^3 . In: Ebbesson, S.O.E. and Nauta, W.J. (eds). *Contemporary Research Techniques of Neuroanatomy*. Springer-Verlag. New York.

SLATER TF (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Method Enzymol.*, 105: 283-293.

SLOMIANY, A., PIOTROWSKI, E., GRABSKA, M., PIOTROWSKI, J. y SLOMIANY, B.L. (1999) Chronic ethanol-initiated apoptosis in hepatocytes is induced by changes in membrane biogenesis and intracellular transport. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23: 334-343

SMART, I.H.M. (1970) Changes in location and orientation of mitotic figures in mouse oesophageal epithelium during the development of keratinization. *J. Anat.*, 106(1): 15-21

SMITH, T.J., YANG, G., SERIL, D.N., LIAO, J. y KIM, S. (1998) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 19 (4): 703-706

SPEAKE, B.K., NOBLE, R.C. y McCARTNEY, R.J. (1993) Tissue specific changes in lipid composition and lipoprotein lipase activity during the development of the chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1165: 263-270

SPEAKE, B.K., CEROLINI, S., MALDJIAN, A. y NOBLE, R.C. (1997) The preferential mobilisation of C₂₀ and C₂₂ polyunsaturated fatty acids from the adipose tissue of the chick embryo: potential implications regarding the provision of essential fatty acids for neural development. *Biochim. Biophys. Acta*, 1345: 317-326

SPURR, A.R. (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43

STELLER, H. (1995) Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* (Wash. DC), 267: 1445-1449

STINSON, A.M., WIEGAND, R.D. y ANDERSON, R.E. (1991) Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. *J. Lipid Res.*, 32: 2009-2017

STORM, H.M., OH, S.Y., KIMLER, B.F. y NORTON, S. (1993) Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipids*, 28 (6): 555-559

STRANDBERG, T.E., TILVIS, R.S. y MIETTINEN, T.A. (1989) Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1001: 150-156

STRANDBERG, T.E., TILVIS, R.S. y MIETTINEN, T.A. (1990) Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. *J. Lipid Res.*, 31: 1637-1643

STRÖMLAND, K. (1985) Ocular abnormalities in the fetal alcohol syndrome. *Acta Ophthalmol.*, 63(Suppl.): 171

STRÖMLAND, K. (1987) Ocular involvement in the fetal alcohol syndrome. *Surv. Ophthalmol.*, 31: 277-284

STRÖMLAND, K. y PINAZO-DURAN, M.D. (1994) Optic nerve hypoplasia: Comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology*, 50: 100-111

STUBBS, C.D. y SMITH, A.D. (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 779: 89-137

STUBBS, C.D. y SLATER, S.J. (1999) Ethanol and protein kinase C. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23(9): 1552-1560

THOMPSON, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* (Wash. DC), 267: 1456-1462

TILVIS, R.S. y MIETTINEN, T.A. (1983) Dietary squalene increases tissue sterols and fecal bile acids in the rat. *Lipids*, 18: 32-36

TINOCO, J. (1982) Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog. Lipid Res.*, 21 (1): 1-45

VOGEL, Z. y NIRENBERG, M. (1976) Localization of acetylcholine receptors during synaptogenesis in retina. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 73 (6): 1806-1810

VOLPE, J.J. y HENNESSY, S.W. (1977) Cholesterol biosynthesis and 3-hidroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase in cultured glial and neuronal cells. Regulation by lipoprotein and by certain free sterols. *Biochim. Biophys. Acta*, 486(3): 408-420

VOSS, A., REINHART, M., SANKARAPPA, S. y SPRECHER, H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.*, 256(30): 19995-20000

WANG, N. y ANDERSON, R.E. (1993) Synthesis of docosahexaenoic acid by retina and retinal pigment epithelium. *Biochemistry*, 32: 13703-13709

WIEGAND, R.D., KOUTZ, C.A., STINSON, A.M. y ANDERSON, R.E. (1991) Conservation of docosahexaenoic acid in rod outer segments of rat retina during n-3 and n-6 fatty acid deficiency. *J. Neurochem.*, 57: 1690-1699

YAMAGUCHI, T., NAKAGAWA, M., HIDAKA, K., YOSHIDA, T., SASAKI, T. y AKIYAMA, S. (1985) Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system. *Japan. J. Cancer Res.*, 76: 1021-1026

YEHUDA, S., RABINOVITZ, S., CARASSO, R.L. y MOSTOFSKY, D.I. (1998) Fatty acids and brain peptides. *Peptides*, 19 (2): 407-419

YOUNG, R.W. (1976) Visual cells and the concept of renewal. *Invest. Ophthalmol.*, 15: 700-725

ZAJAC, C.S. y ABEL, E.L. (1992) Animal models of prenatal alcohol exposure. *Int. J. Epidemiol.*, 21(4)(Suppl.1): 24-32

ZEKI, S.M. y DUTTON, G.N. (1990) Optic nerve hypoplasia in children. *Br. J. Ophthalmol.*, 74: 300-304

ZHAO, M., LAISSUE, J.A. y ZIMMERMANN, A. (1997) TUNEL-positive hepatocytes in alcoholic liver disease_A retrospective biopsy study using DNA nick end-labelling. *Virchows Arc. A.*, 431: 337-344

ZIDENBERG-CHERR, S., HALSTED, C.H., OLIN, K.L., REISENAUER, A.M. y KEEN, C.L. (1990) The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defense in the miniature pig. *J. Nutr.*, 120: 213-217

ZIDENBERG-CHERR, S., OLIN, K.L., VILLANUEVA, J., TANG, A., PHINNEY, S.D., HALSTED, C.H. y KEEN, C.L. (1991) Ethanol induced changes in hepatic free radical defense mechanisms and fatty acid composition in the miniature pig. *Hepatology*, 13: 1185-1192

ZLOCH, Z. (1994) Temporal changes of the lipid peroxidation in rats after acute intoxication by ethanol. *Z. Naturforsch.*, 49c: 359-362

ZIDENBERG-CHERR, S., HALSTED, C.H., OLIN, K.L., REISENAUER, A.M. y KEEN, C.L. (1990) The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defense in the miniature pig. *J. Nutr.*, 120: 213-217

ZIDENBERG-CHERR, S., OLIN, K.L., VILLANUEVA, J., TANG, A., PHINNEY, S.D., HALSTED, C.H. y KEEN, C.L. (1991) Ethanol induced changes in hepatic free radical defense mechanisms and fatty acid composition in the miniature pig. *Hepatology*, 13: 1185-1192

ZLOCH, Z. (1994) Temporal changes of the lipid peroxidation in rats after acute intoxication by ethanol. *Z. Naturforsch*, 49c: 359-362

Yolanda Aguilera Garcia
efecto protector del escualeno del aceite de oliva
frente a los efectos teratogénicos producidos por el etanol
en el desarrollo de la retina del embrión de pollo.
Sobresaliente "Apto Cum laude"

por unanimidad

20

DICIEMBRE

2000

Ceo 1264