

408

Biologicas
423
T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLÓGICAS DE LA
FUNDACIÓN VALENCIANA DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE FILAMENTOS
INTERMEDIOS ASTROGLIALES DURANTE EL DESARROLLO
DEL CEREBRO: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL**



Memoria de Tesis doctoral presentada por:
Lilián Soraya Vallés Marti.
Licenciada en Ciencias Biológicas.

UMI Number: U607681

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607681

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

▷ Biológicas

Nº Registre 9343

DATA 3.X.96

SIGNATURA

423.T.D

Nº LIBRIS: j30646367

30 cms.

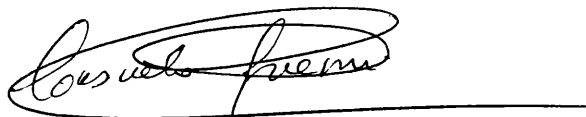
CONSUELO GUERRI SIRERA, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas,

CERTIFICO:

Que la tesis doctoral *Cambios en la expresión de genes de filamentos intermedios astrogliales durante el desarrollo del cerebro: Efecto de la exposición al etanol*, que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a Lilián Soraya Vallés Marti, se ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto de Investigaciones Citológicas de la FIB. Por lo que considero que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en

Valencia, a 20 de mayo de 1996.

A handwritten signature in black ink, reading "Consuelo Guerri Sirera", written over a horizontal line.

Fdo: Consuelo Guerri Sirera.

CANCIÓN ÚLTIMA

*Pintada, no vacía:
pintada está mi casa
del color de las grandes
pasiones y desgracias.*

*Regresará del llanto
a donde fue llevada
con su desierta mesa,
con su ruinosa cama.*

*Florecerán los besos
sobre las almohadas.
y en torno de los cuerpos
elevantá la sábana
su intensa enredadera
nocturna, perfumada.*

*El odio se amortigua
detrás de la ventana.*

Será la garra suave.

Dejadme la esperanza.

Miguel Hernández (1910-1942)

A mi familia.

ÍNDICE

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El alcoholismo crónico y su repercusión social.	3
2. Bioquímica del etanol.	4
2.1. Absorción, difusión, distribución y eliminación del etanol.	5
2.2. Vías enzimáticas del metabolismo del etanol.	6
2.2.1. Alcohol deshidrogenasa (ADH).	7
2.2.2. El sistema microsomal de oxidación del etanol. (MEOS).	10
2.2.3. Catalasa.	11
2.3. Metabolismo del acetaldehído.	11
3. Consumo crónico de etanol y alteraciones metabólicas.	12
3.1. Efecto de excesiva generación hepática de NADH.	13
3.1.1. Hiperlactecemia, acidosis, hiperuricemia, cetonemia y heperlipemia.	14
3.1.2. Aumento de lipogénesis y reducción de oxidación lipídica.	14
3.1.3. Metabolismo afectado de glucosa y proteínas. Hipoglicemia.	14
3.2. MEOS y su interacción con otros componentes.	15
3.2.1. Interacción con fármacos.	15
3.2.2. Activación de Carcinógenos.	15
3.2.3. MEOS y oxígeno.	15
3.3. Alteraciones producidas por el acetaldehído.	16
3.4. Peroxidación lipídica.	16
4. Acción del alcohol en el sistema nervioso central.	17
4.1. Disfunciones neurológicas.	17
4.2. Efecto del alcohol sobre algunos receptores.	18
4.2.1. Alcohol y receptores de glutamato.	18
4.2.2. Alcohol y receptores GABA.	19
4.2.3. Receptores dopaminérgicos.	20
4.3. Alcohol y canales de calcio.	20
4.4. Efecto del alcohol en la transducción de señales.	21
5. Alcohol y gestación.	21
5.1. Síndrome Alcohólico Fetal (SAF).	21
5.2. Frecuencia de aparición.	23
5.3. Factores de riesgo.	24
5.3.1. Concentración de alcohol en sangre.	24
5.3.2. Gestación y vulnerabilidad temporal a la exposición al alcohol.	24
5.3.3. Diferencias genéticas.	25
5.3.4. Alcohol y otras drogas.	25
5.3.5. Deficiencias nutricionales.	26
5.3.6. Fases del alcoholismo materno y su repercusión fetal.	26

5.4. Etiopatología del Síndrome Alcohólico Fetal.	27
5.4.1. Alcohol y acetaldehído.	27
5.4.2. Hipoxia fetal.	28
5.4.3. Radicales libres.	28
5.4.4. Prostaglandinas.	29
5.4.5. Efectos citotóxicos del etanol.	30
5.4.6. Alteraciones físico-químicas de la membrana.	30
5.4.7. Cambios en la metilación del ADN.	30
5.4.8. Posible papel de los retinoides.	31
6. Astrocitos y desarrollo del Sistema Nervioso Central.	32
6.1. Ontogenia de las células astrogliales.	32
6.2. Propiedades, características y funciones de las células astrogliales.	34
6.2.1. Función de guía durante el desarrollo neuronal.	36
6.2.2. La red estructural y la barrera hematoencefálica.	37
6.2.3. Reparación y regeneración del tejido nervioso lesionado.	38
6.2.4. Liberación de factores neurotróficos de células astrogliales.	38
6.2.5. Inmunidad.	39
6.2.6. Intercambio de metabolitos entre neuronas y glía.	39
6.2.7. Receptores de glutamato en neuronas y astrocitos.	40
7. El citoesqueleto.	43
7.1. Microtúbulos.	44
7.2. Microfilamentos.	44
7.3. Filamentos Intermedios (FI)	44
7.4. Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP).	46
7.4.1. Estructura de la GFAP.	46
7.4.2. Organización y dinámica de los filamentos de GFAP.	46
7.4.3. Copolimerización de GFAP con vimentina.	47
7.4.4. Regulación del ensamblaje de la GFAP por fosforilación.	47
7.4.5. El gen de la GFAP.	48
7.4.6. La región que codifica la proteína.	49
7.4.7. Formas alternativas del ARNm de la GFAP.	49
7.4.8. Regulación transcripcional de la GFAP.	49
8. La metilación del ADN.	51
8.1. Metilación o desmetilación y actividad génica.	52
8.2. Metilación, envejecimiento y cáncer.	54
OBJETIVOS	57
1. Estudio durante el desarrollo fetal.	59
2. Estudio durante el periodo postnatal.	59
3. Posibles mecanismos implicados en los cambios en los niveles de ARNm inducidos por la exposición prenatal al alcohol.	60

4. Estudios sobre la metilación del gen de la GFAP.	60
5. Liberación del factor de crecimiento nervioso (NGF) por los astrocitos.	60
6. Evolución de ciertos receptores de glutamato durante el desarrollo del hipocampo.	61
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. <u>Material.</u>	65
1.1. Material biológico.	65
1.1.1. Animales de experimentación.	65
1.1.2. Cepas de microorganismos.	65
1.1.3. Cultivos celulares.	65
1.1.4. Plásmidos.	65
1.2. Alimentación de los animales.	66
1.3. Enzimas.	67
1.4. Medios de cultivo.	68
1.5. Productos y reactivos químicos.	68
1.6. Películas.	68
1.7. Aparatos.	68
1.7.1. Aparatos ópticos.	69
1.7.2. Aparatos de electroforesis y de transferencia.	69
1.7.3. Aparatos para medición de radiactividad.	69
1.7.4. Centrifugas.	69
1.7.5. Estufas e incubadores.	69
1.7.6. Balanzas.	70
1.7.7. Homogeneizadores.	70
1.7.8. Microscopios.	70
1.7.9. Otros.	70
2. <u>Métodos.</u>	71
2.1. Manipulación de los animales.	71
2.1.1. Procedimiento de alcoholización. Controles isocalóricos "Pair-fed".	71
2.1.2. Exposición prenatal al alcohol.	71
2.1.3. Exposición postnatal al alcohol.	72
2.2. Aislamiento y cultivos celulares.	72
2.2.1. Aislamiento y cultivo de astrocitos.	72
2.2.2. Aislamiento y cultivo de glía radial.	74
2.3. Obtención de ácidos nucleicos y proteínas.	75
2.3.1. Extracción de ADN de células y tejidos.	75
2.3.2. Extracción de ARN de tejido.	75
2.3.3. Extracción de ARN de células en cultivo primario.	76
2.3.4. Preparación de las muestras para su separación en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE).	76

2.3.5. Preparación de membranas de hipocampo de cerebro de rata.	77
2.3.6. Obtención de núcleos de células en cultivo primario.	77
2.4. Obtención de insertos genómicos a partir de plásmidos recombinantes.	78
2.4.1. Transformación de células bacterianas.	78
2.4.2. Identificación de recombinantes.	78
2.4.3. Extracción de ADN plasmídico.	79
2.4.3.1. Amplificación bacteriana.	79
2.4.3.2. Lisis celular y purificación plasmídica.	79
2.4.4. Digestión de los plásmidos.	80
2.4.5. Electroforesis preparativa en gel de agarosa.	80
2.4.6. Extracción de ADN de geles de agarosa.	80
2.5. Técnicas de electroforesis.	80
2.5.1. Electroforesis en geles de agarosa.	80
2.5.2. Geles de SDS/PAGE.	81
2.6. Análisis de ADN.	82
2.6.1. Digestión, electroforesis y transferencia del ADN a soporte sólido.	82
2.6.2. Hibridación de sondas marcadas al ADN transferido a soporte sólido.	83
2.6.3. Dot blot y Slot blot de ADN en membranas de nitrocelulosa.	83
2.7. Análisis de ARN.	83
2.7.1. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.	83
2.7.2. Transferencia a soporte sólido.	84
2.7.3. Hibridación.	84
2.7.4. Tratamiento de los cultivos de astrocitos con α -amanitina.	84
2.7.5. Ensayos de Run-off.	84
2.8. Preparación de sondas marcadas radiactivamente.	85
2.8.1. Marcaje de sondas por cebadores aleatorios "Random primers".	85
2.8.2. Marcaje por desplazamiento de la mella "Nick translation".	85
2.9. Análisis de proteína.	86
2.9.1. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.	86
2.9.2. Inmunodetección.	86
2.9.3. Inmunofluorescencia.	87
2.9.4. Medida del factor de crecimiento nervioso (NGF).	87
2.9.5. Ensayos para la inmunodetección del NGF.	87
2.9.6. Ensayos de unión e internalización de NGF.	88
2.9.7. Ensayos de unión a MK-801.	89
2.9.8. Hidrólisis de PIP ₂ en fragmentos de hipocampo.	89
2.10. Análisis estadístico.	90
RESULTADOS	91
1. Modelos experimentales.	93
1.1. Animales de experimentación usados.	93

1.2. Cultivos primarios de células astrogliales.	94
2. Patrón de expresión de proteínas astrogliales del citoesqueleto durante el desarrollo embriofetal. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	95
2.1. Niveles de GFAP, vimentina y Rat-401 en cerebro durante el desarrollo fetal. Efecto del alcohol.	95
2.2. Análisis de la expresión de las proteínas GFAP y vimentina durante el desarrollo fetal.	97
3. Efecto del etanol sobre la glía radial en cultivo primario.	100
3.1. Caracterización del cultivo primario de glía radial.	100
3.2. Patrón en los niveles de las proteínas GFAP y vimentina en cultivo primario de glía radial. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	103
3.3. Niveles del ARNm de la GFAP y vimentina en glía radial. Efecto del alcohol.	105
4. Cambios en la expresión de la GFAP y vimentina durante el desarrollo postnatal.	107
4.1. Patrón de evolución de la GFAP y vimentina durante el desarrollo postnatal. Efecto de la exposición al alcohol.	108
4.2. Expresión de la GFAP y de vimentina durante el desarrollo postnatal. Efecto del alcohol.	108
5. Expresión de la GFAP y vimentina durante la proliferación y diferenciación de astrocitos en cultivo primario. Efecto de la exposición prenatal al alcohol.	111
5.1. Efecto del etanol en los niveles de la GFAP y vimentina en astrocitos en cultivo primario.	111
5.2. Efecto de la exposición al alcohol en la expresión de la GFAP y vimentina durante el desarrollo de astrocitos en cultivo primario.	113
6. Mecanismos que pueden participar en la disminución en la expresión de GFAP producida por la exposición prenatal al etanol.	116
6.1. Efecto del etanol sobre el nivel de transcripción en núcleos aislados de astrocitos.	116
6.2. Análisis de la estabilidad de los transcritos de ARNm de la GFAP y vimentina.	117
7. Cambios en el patrón de metilación del gen de la GFAP durante el desarrollo de cerebro. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	119
8. Liberación del factor de crecimiento nervioso por los astrocitos y caracterización de su receptor. Efecto de la exposición prenatal al alcohol.	124
8.1. Liberación de NGF durante la proliferación y diferenciación de astrocitos en cultivo primario. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	124
8.2. Unión [¹²⁵ I] NGF a astrocitos.	127
8.3. Internalización de NGF.	128
8.4. Estudios de inmunodetección del receptor del NGF (NGFR).	129
9. Efecto de la exposición al alcohol sobre los receptores de glutamato durante el desarrollo de cerebro.	130
9.1. Patrón ontogénico de los receptores NMDA durante el desarrollo del hipocampo. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	131
9.2. Evolución en los niveles de los receptores metabotrópicos de glutamato asociados a la activación de la fosfolipasa C. Efecto de la exposición prenatal al etanol.	133
DISCUSIÓN	135
1. Patrón de desarrollo de la expresión de la GFAP y vimentina durante el desarrollo del cerebro y en	137

cultivo primario de glía radial y astrocitos.	137
2. Efecto de la exposición prenatal al etanol sobre la expresión de proteínas de filamentos intermedios astrogliales durante el desarrollo del cerebro.	141
3. Posibles mecanismos implicados en la disminución de la expresión del gen de la GFAP tras la exposición al etanol.	144
3.1. Efecto del etanol sobre la transcripción de los genes de la GFAP y vimentina.	144
3.2. Efecto de la exposición al alcohol sobre la degradación del ARNm	148
3.3. Cambios en la metilación del ADN de la GFAP.	150
4. Alteración producida por la exposición prenatal al alcohol en el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor en células astrogliales.	153
5. Cambios ocasionados por la exposición prenatal al alcohol en los receptores de glutamato durante el desarrollo del hipocampo de rata.	158
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	169
AGRADECIMIENTOS	205

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Vías metabólicas de oxidación del etanol.	7
Fig. 2. Las isoenzimas de la ADH humana.	9
Fig. 3. Mecanismo enzimático del sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS).	10
Fig. 4. Alteraciones metabólicas producidas tras un consumo crónico de alcohol.	13
Fig. 5. Efectos del alcohol sobre el producto de la gestación en relación con el consumo de alcohol materno.	23
Fig. 6. Esquema en el que se representa el origen de las células gliales y neuronales durante el desarrollo de la corteza cerebral.	33
Fig. 7. Intercambio GABA-glutamato entre neurona-astrocito.	40
Fig. 8. Esquema de los receptores de glutamato en astrocitos.	43
Fig. 9. Esquema de las estructuras de las proteínas de filamentos intermedios.	45
Fig. 10. Esquema de la organización, dinámica y regulación del ensamblaje de la GFAP.	48
Fig. 11. Cambio genético que permite a una célula precursora dar origen a dos células hijas, una igual a ella y otra con un patrón distinto de actividad génica.	53
Fig. 12. Diferentes papeles para la metilación del ADN en la Carcinogénesis.	55
Fig. 13. Plásmido pUC8/9.	66
Fig. 14. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias (GFAP y vimentina) obtenidas durante el desarrollo fetal de cerebro en animales control y expuestos prenatalmente al etanol.	96
Fig. 15. Análisis densitométrico obtenido de las inmunotransferencias utilizando un anticuerpo anti-Rat-401 durante el desarrollo fetal de cerebro en animales control y expuestos al etanol.	98
Fig. 16. Análisis densitométrico (<i>Northern blot</i>) de los niveles de ARNm de la GFAP (A) y de la vimentina (B) en ratas control y prenatalmente expuestas al etanol durante el desarrollo fetal del cerebro.	99
Fig. 17. Fotografías en las que se muestran las características de las inmonofluorescencias de la glía radial en cultivo primario de células control y PEA.	101
Fig. 18. Células de glía radial en cultivo primario incubadas con anti-MAP-2 para cuantificar la contaminación neuronal. Microscopía confocal.	102
Fig. 19. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias demostrando los niveles de GFAP (A) y vimentina (B) de células de glía radial control y PEA a diferentes días de cultivo.	104
Fig. 20. Análisis densitométrico de los niveles ARNm de la GFAP (A) y vimentina (B) de células de glía radial control y PEA a diferentes días de cultivo.	106
Fig. 21. Efecto de la exposición prenatal y postnatal al etanol en el peso del cerebro.	107
Fig. 22. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias de la GFAP (A) y de la vimentina (B) durante el desarrollo fetal y postnatal de cerebro de ratas control y PEA.	109
Fig. 23. Análisis densitométrico (<i>Northern blot</i>) de la expresión de GFAP (A) y vimentina (B) durante el desarrollo de cerebro (fetal y postnatal) de ratas control y prenatalmente expuestas al etanol.	110
Fig. 24. Células de astrocitos en cultivo primario.	112

Fig. 25. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias de GFAP y vimentina de astrocitos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol a diferentes días de cultivo.	114
Fig. 26. Análisis densitométrico del ARNm (<i>Northern blot</i>) de la GFAP (A) y vimentina (B) de astrocitos en cultivo primario control y PEA a diferentes días de cultivo.	115
Fig. 27. Análisis del nivel de transcripción de la GFAP y vimentina de astrocitos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol.	117
Fig. 28. Análisis densitométrico del ARNm de la GFAP y vimentina de astrocitos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol tras incubación con α -amanitina.	118
Fig. 29. Posiciones de metilación de la HhaI y MspI/HpaII y lugares de reconocimiento en la secuencia flanqueante 5', el primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP de rata.	119
Fig. 30. Secuencia de nucleótidos de la región flanqueante 5' del primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP de rata.	121
Fig. 31. Autorradiografías representativas (<i>Southern blot</i>) tras digestión del ADN de distintos tejidos con los enzimas de restricción Msp I, Hpa II y Hha I.	123
Fig. 32. Liberación de NGF de astrocitos control y PEA a 6 días de cultivo tras 24 y 40 h de incubación.	125
Fig. 33. Liberación de NGF de astrocitos control y PEA a 6 y 13 días de cultivo.	126
Fig. 34. Análisis <i>Scatchard</i> de la unión específica de [125 I]NGF a astrocitos en cultivo primario control y PEA.	127
Fig. 35. Efecto de la exposición prenatal al etanol en las cinéticas de internalización de [125 I]NGF.	128
Fig. 36. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias del NGFR a diferentes días de cultivo de células de astrocitos control y PEA.	129
Fig. 37. Perfil en el desarrollo postnatal de la unión de 3 H-MK-801 a membranas de hipocampo de ratas control y expuestas prenatalmente al etanol.	131
Fig. 38. Análisis <i>Scatchard</i> de la especificidad de unión de 3 H-MK-801 a membranas de hipocampo.	132
Fig. 39. Efecto de la exposición al etanol en la estimulación por tACPD de la hidrólisis de fosfolípidos durante el desarrollo postnatal.	133
Fig. 40. Elementos reguladores de los genes GFAP y vimentina.	145
Fig. 41. Vías de degradación de ARNm en eucariotas.	149
Fig. 42. Posiciones de metilación de la HhaI y MspI/HpaII y lugares de reconocimiento en la secuencia flanqueante 5', el primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP.	152
Fig. 43. Los receptores de NGF (p75 y TrkA).	156
Fig. 44. Dos diferentes mecanismos que pueden actuar en las interacciones entre p75 y TrkA.	157
Fig. 45. Complejo canal/receptor NMDA.	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros cinéticos de las diferentes formas de la ADH I	9
Tabla II. Enfermedades neurológicas asociadas al alcoholismo crónico.	17
Tabla III. Características principales del síndrome alcohólico fetal.	22
Tabla IV. Anomalías asociadas al Síndrome Alcohólico Fetal.	22
Tabla V. Receptores de glutamato metabotrópicos.	41
Tabla VI. Composición de las dietas (g/l).	67
Tabla VII. Medio de astrocitos.	73
Tabla VIII. Medio de glía radial.	74
Tabla IX. Gel de resolución.	81
Tabla X. Gel de concentración.	82
Tabla XI. Tampones de Run-off.	85
Tabla XII. Niveles de NGF en la célula y en el medio de astrocitos control y PEA, después de 6 días de cultivo.	126
Tabla XIII. Constantes de disociación de unión de [¹²⁵ I]NGF a receptores.	128
Tabla XIV. Parámetros cinéticos obtenidos de la unión de ³ H-MK-801 a membranas de hipocampo de cerebro de rata a diferentes días postnatales. Efecto de la exposición al etanol.	132

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CsCl	Cloruro de cesio.
CYC	Ciclofilina.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato.
D.S.	Desviación Estandar.
D.O	Densidad óptica.
EA	Embriofetopatía alcohólica.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ETOH	Etanol
GFAF	Proteína ácida fibrilar de la glía.
HEPES	Ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico.
Kb	Kilopares de bases.
kDa	Kilodaltons.
lac Y11	Lactosa.
LAT	Por litro de medio LBT, 20 g de agar Difco.
LB	Medio de cultivo (10 g deBacto triptona, 5 g de Extracto de levadura Bacto, 10 g de NaCl y agua hasta 1 l).
LBT	Por litro de medio LB, 20 ml de Timina 2g/l.
leu 6	Leucina.
MCS	Lugar de clonación múltiple.
MEMI	Medio mínimo esencial.
Min	Minutos.
MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico.
Mr	Masa molecular relativa.
MSH	2-Mercaptoetanol.
SNBST	Medio para glicerizados (NaCl, 5g; Nutrient broth, 40g; timina (sol. 2g/l) 40 ml y agua hasta 1l.).
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino.
PEA	Prenatalmente expuesto al alcohol.

PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SAF	Síndrome alcohólico fetal.
SBF	Suero bovino fetal.
SDS	Dodecil Sulfato Sódico.
SNC	Sistema nervioso central.
<u>sup E44</u>	Gen: Supresor de mutaciones ocre (UAG).
TBS	Tampón Tris salino.
TE	Tampón Tris-HCl 10 mM y 1 mM EDTA, pH 8.0.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
<u>thi 1</u>	Tiamina 1.
<u>thr 1</u>	Treonina 1.
<u>ton A21</u>	T-uno (Sensibilidad al fago T1).
Tris-HCl	Trizma-base tamponado con ácido clorhídrico al pH indicado.
VIM	Vimentina.
W/V	Peso/volumen.

INTRODUCCIÓN



1.- EL ALCOHOLISMO CRÓNICO Y SU REPERCUSIÓN SOCIAL.

En los últimos años ha habido en España un aumento importante en el número de individuos alcohólicos o con problemas importantes con el alcohol. Los bebedores con adicción muy grave alcanzan, en el caso de los varones, el 6.8% de la población general española. A estos datos se le suma un 9.7% más correspondiente a hombres con problemas con el alcohol, según el cuestionario CAGE (14).

La ingesta crónica de alcohol provoca graves cambios en el hepatocito. La reactividad del alcohol o de sus metabolitos, en especial el acetaldehído provoca importantes cambios en la comunicación inter e intracelular (221,151,152). Estas y otras alteraciones en la bioquímica celular llevan a numerosas enfermedades, tales como la hepatomegalia (221,427), lesiones y úlceras de la mucosa estomacal, que además impiden la adecuada absorción de los alimentos y provocan estados de malnutrición (289), alteraciones hematológicas y anemia (350), graves miopatías y trastornos cardiovasculares (221,89,320,130), enfermedades respiratorias (103), anormalidades del sistema inmune (97), enfermedades cerebrales que se asemejan a las de tipo degenerativo, que son observadas en la vejez (238), tales como una menor actividad eléctrica cerebral (65), lesiones específicas y pérdida neuronal (124), o bien accidentes vasculares de tipo isquémico (12).

Además, no sólo tienen lugar cambios estructurales; el alcoholismo crónico también produce deterioro de las funciones cognitivas superiores, incluso en ausencia detectable de daño físico. Se han observado déficits en capacidades de abstracción, perceptivo-espaciales y de resolución de problemas, que por otro lado han sido relacionados con la atrofia cortical presentada por estos pacientes (316). Junto con toda esta sintomatología física, frecuentemente aparecen graves alteraciones de la afectividad, que pueden llevar incluso al suicidio (81).

Por otra parte, la incidencia de alcoholismo femenino ha aumentado en los últimos años. Esto ha hecho que varíe el cociente varón /hembra alcohólico, siendo ya en algunos países igual a la unidad (7). El consumo de alcohol en el hombre constituye un grave problema social, pero aún lo es más por parte de la mujer, y especialmente durante el embarazo.

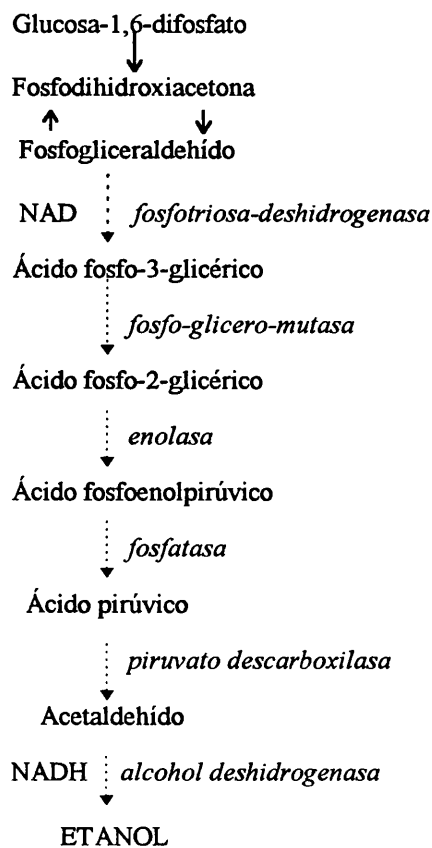
El porcentaje de mujeres que consumen alcohol durante el embarazo oscila entre el 2 y el 26% dependiendo de la muestra de población estudiada y correspondiendo los porcentajes más elevados a las clases sociales más bajas, lo que se demuestra en estudios sociológicos y epidemiológicos.

En España cerca de 800.000 mujeres consumen crónicamente alcohol, de las cuales 500.000 se encuentran en edad fértil (17). Las escasas posibilidades de recuperación de las lesiones físicas y/o psíquicas que la exposición intrauterina al alcohol produce en la descendencia, nos lleva a confirmar que el alcohol es un grave problema de salud pública. Las tres causas más importantes de retraso mental actualmente son, el Síndrome de Down,

los defectos de cierre del tubo neural y el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) (6). De estos tres el último es el único evitable.

2.- BIOQUÍMICA DEL ETANOL.

El alcohol es un compuesto orgánico formado por átomos de carbono e hidrógeno (hidrocarburo), que presenta la particularidad de poseer un hidrógeno reemplazado por un grupo (OH). En el caso concreto de que el alcohol posea dos átomos de carbono (C₂H₅OH), se le denomina etanol o alcohol etílico. Este último es un líquido incoloro y volátil de olor agradable que hierve a 78.3°C y solidifica a -117.3°C. El etanol puede sintetizarse endógenamente, incluso por fermentación bacteriana en el intestino (196). Es el resultado de la fermentación de glúcidos.



La formación de alcohol se observó por primera vez en células bajo condiciones anaeróbicas por *Lechartier* y *Bellamy* (206), pero el primero en asociar este fenómeno con la fermentación fue *Pasteur* (306). Los experimentos mencionados demostraron que al menos todos los tejidos de las plantas superiores son capaces de llevar a cabo la

fermentación alcohólica en condiciones de anaerobiosis, una reacción que puede ser representada esquemáticamente por la siguiente ecuación de *Gay-Lussac*:



En toda fermentación, la formación de alcohol supone producción de pequeñas cantidades de acetaldehído. Esta sustancia es, más concretamente, un producto intermedio de la fermentación alcohólica.

De acuerdo con el esquema de *Embden y Meyerhof*, la fermentación alcohólica se produce a través de cuatro fases esenciales: 1) Formación de triosas de glucosa; 2) deshidrogenación de triosas en ácido pirúvico; 3) Descarboxilación de ácido pirúvico en acetaldehído; y 4) Reducción del acetaldehído a etanol.

2.1.- Absorción, difusión, distribución y eliminación de etanol.

La molécula de alcohol es muy pequeña, liposoluble y polar. Por esta razón es miscible en agua, también relativamente soluble en lípidos y por lo tanto atraviesa fácilmente las membranas biológicas. Como demostraron *Berggren y Goldberg* en 1940 (27) la entrada de alcohol en el organismo, independientemente de su administración, es un proceso de difusión simple, pasiva. La vascularización y el flujo sanguíneo son de importancia decisiva para la velocidad de entrada del alcohol.

La ruta usual de entrada de alcohol es por vía gastrointestinal, principalmente por el intestino delgado (duodeno y yeyuno) y también a través del estómago y del intestino grueso (solo un 20%) (190,133,220). Para experimentación, el alcohol es a menudo inyectado intravenosamente o intraperitonealmente e incluso subcutáneamente.

La absorción comienza inmediatamente después de la ingesta y dura mientras haya diferente concentración entre el tracto gastrointestinal y la sangre de la red de los capilares. La velocidad de absorción depende de varios factores, como cantidad de alcohol ingerida, alimentos consumidos durante la ingesta, estado de motilidad y vascularización del tubo digestivo (52).

La distribución del etanol se lleva a cabo en todo el organismo, acumulándose principalmente en tejidos con mayor contenido de agua y/o con mayor flujo sanguíneo.

Las concentraciones de alcohol en cerebro son similares a las sanguíneas, debido a que este tóxico atraviesa la barrera hematoencefálica libremente (134). La distribución del etanol, demostrada en algunos trabajos, indica que existen en el cerebro niveles más elevados de alcohol en la corteza cerebral, en diversos núcleos y en el ventrículo lateral.

Como norma general, cuanto más rápida sea la absorción del etanol, más graves serán sus consecuencias. Durante el embarazo se produce una ralentización tanto en el vaciado gástrico como en la motilidad intestinal, por lo que los niveles de alcohol en sangre son más bajos, pero se mantienen durante más tiempo. La exposición al alcohol de los fetos varía según el periodo. Durante el primer periodo de la gestación la concentración de agua fetal



es elevada y por lo tanto el feto está expuesto a concentraciones elevadas de alcohol (134). En etapas posteriores, la concentración de alcohol en el líquido amniótico, condón umbilical y sangre fetal es la misma que en la sangre materna, debido también a que la placenta es fácilmente atravesada por el alcohol (7,134).

El etanol se elimina del organismo mediante la metabolización por diferentes sistemas enzimáticos. Un 2-10% es eliminado directamente en el aire espirado por los pulmones, orina y sudor. Un 80-90% se metaboliza en el hígado y finalmente es eliminado como dióxido de carbono y agua.

La velocidad de eliminación del alcohol en neonatos humanos es aproximadamente el 50% de la velocidad de eliminación en el adulto (166). La eliminación del alcohol por parte del feto tiene lugar principalmente por difusión pasiva a través de la placenta y depende de la velocidad de eliminación de la madre (93).

2.2.- Vías enzimáticas del metabolismo del etanol.

El etanol es predominantemente metabolizado en el hígado como ya lo demostrara *Lundsgaard* en 1938 (245), aunque el etanol también se metaboliza en otros órganos extrahepáticos. Concretamente de un 2% a un 10% del etanol ingerido es directamente excretado mediante el proceso de espiración realizado por los pulmones, la orina y el sudor; de un 5% a un 20% es eliminado por el riñón y una pequeña tasa de metabolismo de etanol por gramo de tejido muscular se puede añadir como parte importante de la metabolización extrahepática. La contribución de este metabolismo extrahepático se ha estimado en unos 0.4 mmols de etanol/min (218). Además, una parte significativa del alcohol que se ingiere, no solo es absorbido por el estómago, sino que también es metabolizado por este órgano (53).

Sin embargo, el hígado es el órgano con mayor capacidad metabólica, en el caso del etanol, siendo ésta de un 80-90% del alcohol ingerido. Se ha calculado que la capacidad hepática es de 100 mg/kg/h en el hombre y 300 mg/kg/h en la rata. En el proceso metabólico completo se llega hasta la producción de CO₂ y agua, distinguiéndose tres etapas:

- 1.- Oxidación de etanol a acetaldehído.
- 2.- Conversión de acetaldehído a acetato.
- 3.- Metabolización de acetato a CO₂ y agua.

La oxidación de etanol a acetaldehído puede ser catalizada por al menos tres diferentes sistemas enzimáticos, localizados en distintos compartimentos subcelulares (Fig. 1). En el citosol se localiza la vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH) (18); en el retículo endoplasmático, el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) (actualmente CYP2E1) (224) y en los peroxisomas, el sistema catalasa (332). Siendo el sistema ADH el que mayoritariamente metaboliza el etanol.

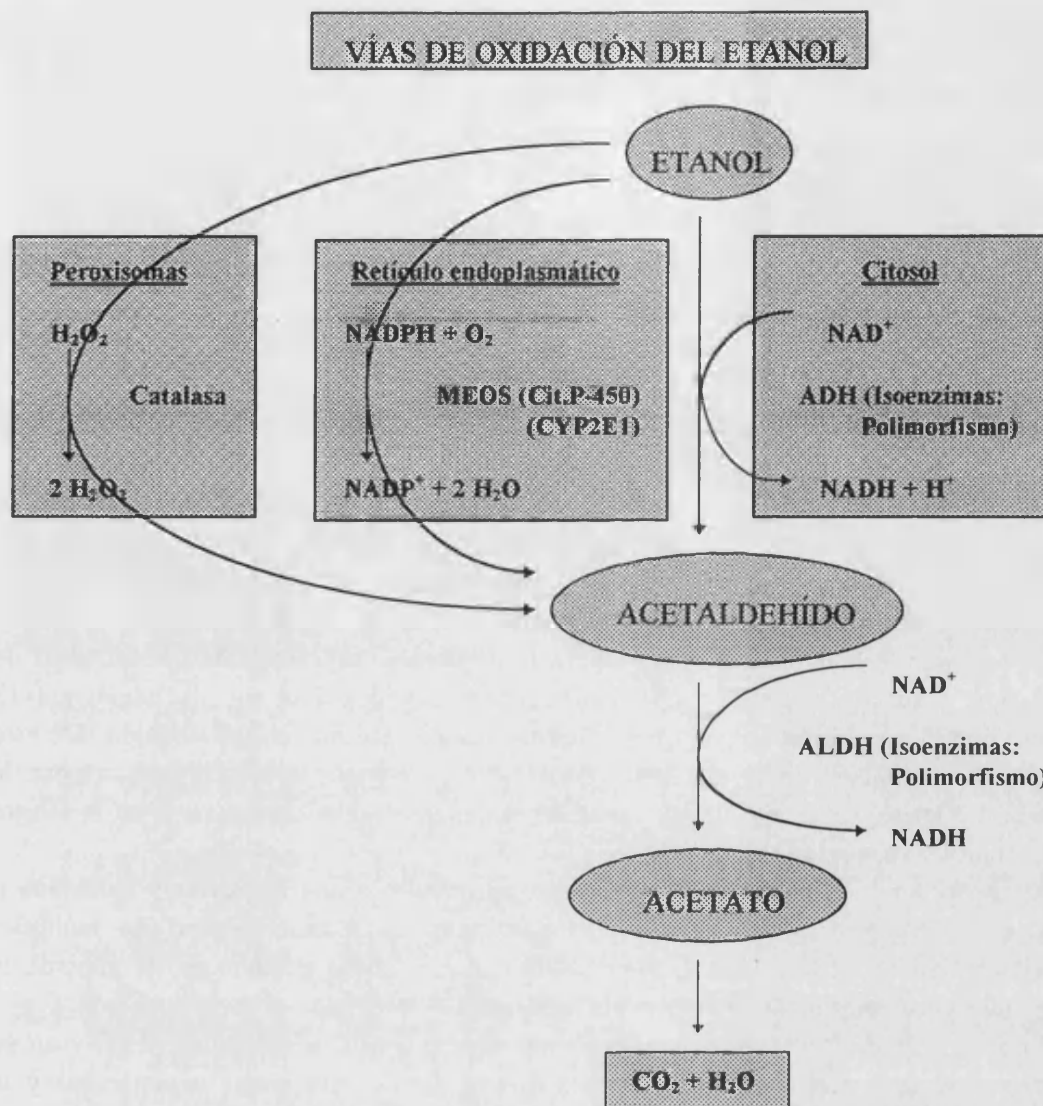
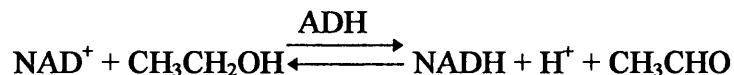


Fig. 1. Vías metabólicas de oxidación del etanol.

2.2.1- Alcohol deshidrogenasa (ADH).

Este enzima es el más importante en la catálisis oxidativa del etanol a acetaldehído. El enzima requiere del cofactor NAD^+ , que se reduce a NADH , para realizar la oxidación del etanol.

La reacción de equilibrio que cataliza la ADH es la siguiente:



La constante de equilibrio fue medida bajo una variedad de condiciones. A 20°C y fuerza iónica 0.1 su valor es 8×10^{-12} .

$$\frac{[\text{NADH}] [\text{H}^+] [\text{CH}_3\text{CHO}]}{[\text{NAD}^+] [\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}]} = 8 \times 10^{-12}$$

El equilibrio es así muy desfavorable para la oxidación del alcohol, siendo el cambio de energía libre, a pH 7.4, de + 4.9 kcal/mol. Si las concentraciones de NAD y NADH son iguales, parece claro que en el rango de pH fisiológico las concentraciones de etanol serán de alrededor de cinco mil veces más altas que la concentración de acetaldehído.

El segundo hecho de importancia para la oxidación del etanol es que el paso de acetaldehído a acetato, es un proceso con una energía libre fuertemente negativa (-13 kcal/mol) que es catalizado por enzimas con una alta afinidad por el acetaldehído. De esta manera la concentración de acetaldehído se mantiene a muy bajo nivel. De esta manera, la oxidación del etanol tiene lugar a las concentraciones que suelen encontrarse en la sangre (1.5 mg etanol/l. sangre) (211).

La ADH también puede metabolizar otros alcoholes a sus respectivos aldehídos o cetonas (417,35), participando de la misma manera en el metabolismo de múltiples sustancias producidas fisiológicamente por el organismo, como pueden ser: el glicerol, el retinol, algunos ésteres alcohólicos y cierta hormonas.

La molécula de ADH es un dímero compuesto por dos subunidades (201) y en su estructura contiene cuatro átomos de zinc, esenciales para mantener la actividad y la integridad de la enzima. El pH óptimo de la enzima es de 10; el valor de K_m para el etanol es de 2 mM y para el NAD^+ es de 27 μM (236).

En los humanos la ADH existe como una familia de isoenzimas que son codificadas por al menos seis genes y se encuentran heterogéneamente repartidas en los diferentes tejidos del organismo. En el hígado se encuentran la mayoría de las formas isoenzimáticas descritas hasta el momento, excepto una que se ha encontrado en el estómago (380). Las diferentes isoenzimas difieren en sus valores de K_m para el etanol, en su movilidad electroforética, en su inhibición por 4-metilpirazol y en su estructura primaria (381,305,42).

Desde los primeros descubrimientos de la ADH hasta el presente se han encontrado al menos seis *loci* que codifican cuatro clases de ADH: ADH I, ADH II, ADH III, ADH IV. La distinción entre las clases se hace en función de sus propiedades cinéticas, electroforéticas y de distribución tisular (Fig. 2).

La clase I (ADH I), es una clase polimórfica que presenta tres *loci* que originan las subunidades α , β_1 , β_2 , todas ellas catódicas y difieren principalmente en sus propiedades

cinéticas, así como en su patrón de expresión a lo largo de la ontogenia. Esta enzima se encuentra principalmente localizada en el hígado y se piensa que es el principal responsable del metabolismo del etanol. La clase γ interviene en el metabolismo de la testosterona.

A lo largo de la ontogenia se originan las diferentes formas isoenzimáticas de la ADH (clase I). La primera en aparecer, durante el desarrollo fetal, es la forma α ; al acabar este desarrollo fetal aparece la forma β y por último, cuando ya han transcurrido varios meses de vida extrauterina, comienza a expresarse la forma γ (Tabla I).

Tabla I. Parámetros cinéticos de las diferentes formas de la ADH I

Isoenzima	$\alpha\alpha$	$\beta_1\beta_1$	$\beta_2\beta_2$	$\beta_3\beta_3$	$\gamma_1\gamma_1$	$\gamma_2\gamma_2$
Km Etanol (mM)	4.2	0.049	0.94	38	1	0.49
Km NAD (μ M)	13	7.4	180	710	7.9	8.7
Ki NAD (μ M)	-	90	340	2300	-	-
V max	0.6	0.23	10	7.9	2.2	0.87
pH óptimo	10.5	8.5	7	10.5	10.5	-

La ADH clase II no es muy eficaz metabolizando el etanol ya que posee una Km de 33 mM. Está formada por la isoenzima π , que en humanos aparece en el hígado.

La ADH clase III está formada por un solo tipo de subunidad χ ; no es saturable por el etanol; se encuentra en todos los tejidos de todos los organismos donde se ha estudiado y además, hasta el momento, es la ADH más conservada.

La ADH clase IV está formada por un solo alotipo σ con una Km para el etanol de 41 mM. Esta enzima se ha encontrado en la piel, estómago y córnea (Fig.2).

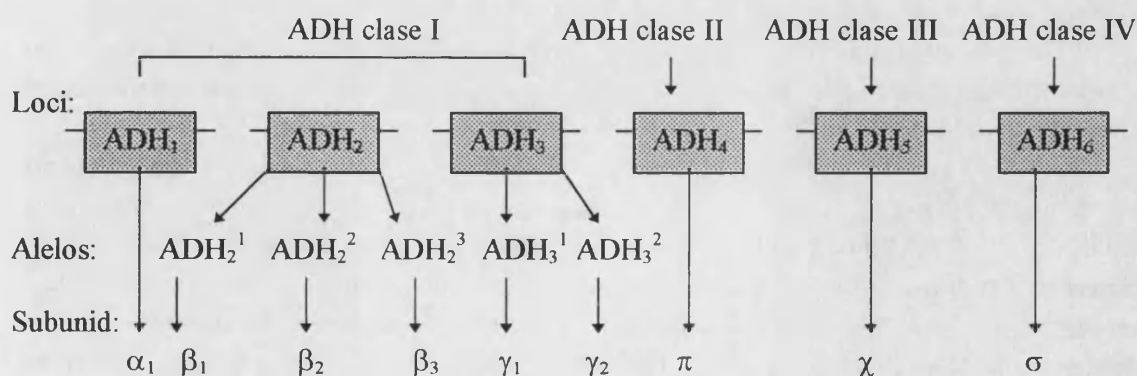


Fig. 2. Las isoenzimas de la ADH humana.

2.2.2.- El sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS).

El sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) fue descrito por primera vez en 1968 por *Lieber y DeCarli* (225) y forma parte del sistema enzimático P-450. Este enzima se halla localizado en el retículo endoplasmático liso y se induce tras el consumo crónico de alcohol. Requiere la presencia de oxígeno molecular y como molécula donante de electrones el NADPH (Fig. 3).

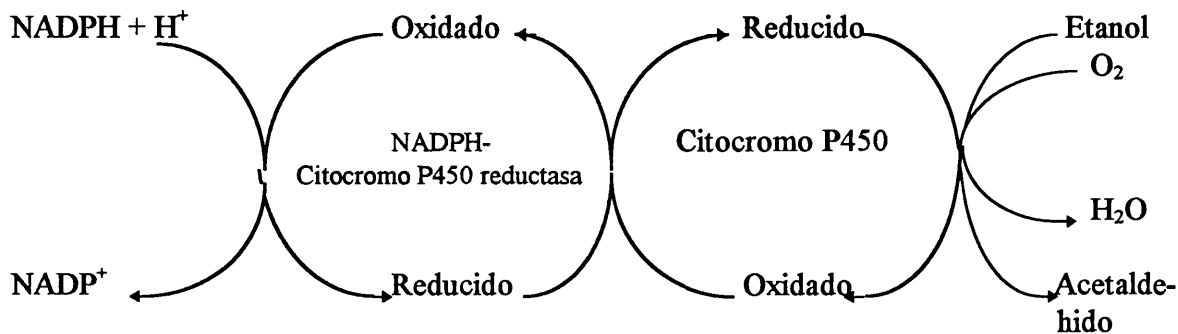


Fig. 3. Mecanismo enzimático del sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS).

El sistema MEOS *in vitro* requiere NADPH-citocromo P-450 reductasa, citocromo P-450 y el fosfolípido lecitina (302). En contraste con la ADH que requiere NAD⁺, esta enzima requiere NADPH y oxígeno.

La Km del sistema MEOS para el etanol es relativamente alta (7-10 mM). Por lo tanto, la contribución del MEOS al metabolismo del etanol es relativamente baja (10-20%) y solo en circunstancias en que las concentraciones de etanol sean elevadas o tras su consumo crónico, puede jugar un papel importante (349).

El consumo crónico de alcohol, se ha demostrado que causa una proliferación del retículo endoplasmático liso, un aumento de la actividad del MEOS y un incremento en el metabolismo del etanol (177).

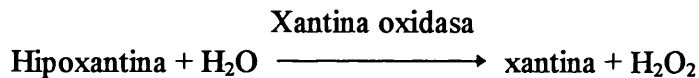
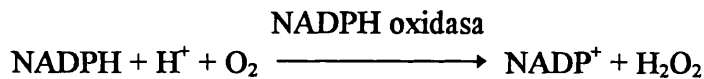
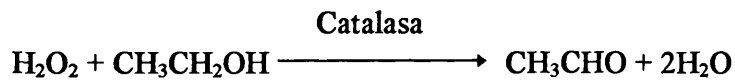
El MEOS pertenece al sistema Citocromo P-450. Este último sistema es un complejo multienzimático que codifica, al menos, 12 familias de genes y 22 subfamilias; está localizado en el retículo endoplasmático liso y participa en el metabolismo de multitud de compuestos endógenos (esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, neurotransmisores, etc.) y exógenos (etanol, solventes, tolueno, fenoles, etc.). Cada isoforma de citocromo P-450 tiene una regulación determinada y una especificidad de sustrato, aunque diferentes isoformas pueden actuar sobre un mismo sustrato.

Durante los últimos años se ha demostrado que la inducción del MEOS que se produce tras el consumo prolongado de alcohol (tolerancia metabólica) es debida a la inducción de una única isoforma del Cit-P450, denominada CYP2E1 (170). Esta forma isoenzimática es muy eficiente y potente para producir radicales libres e iniciar la

lipoperoxidación. Estudios recientes indican que el CYP2E1 genera especies reactivas del oxígeno capaces de iniciar la peroxidación lipídica en membranas microsomales, por lo tanto, la inducción de este enzima puede causar estrés oxidativo (10,100).

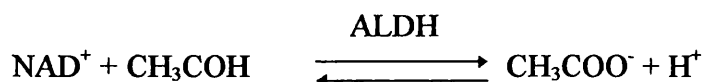
2.2.3.- Catalasa.

El posible papel de la catalasa en el metabolismo del etanol fue sugerido por *Keilin* y *Hartree* en 1936 (189). Se localiza en los peroxisomas y tiene una Km para el etanol de 0.6 mM. La contribución al metabolismo del etanol es de 2-5% del total en condiciones normales. La limitación de este enzima para metabolizar el etanol radica en la poca disponibilidad de H₂O₂ en condiciones fisiológicas. En la actualidad, el papel que pueda ejercer la catalasa en el metabolismo del etanol se encuentra cuestionado.



2.3.- Metabolismo del acetaldehído.

Durante la alcoholemia el nivel de acetaldehído en sangre es extremadamente bajo (alrededor de 5×10^{-6} M). El metabolismo del acetaldehído es muy rápido, pasando a acetato a medida que se produce; por esta razón, se mantienen las concentraciones en sangre tan bajas. Se metaboliza mediante la enzima aldehído deshidrogenasa que se encuentra localizada en diferentes fracciones subcelulares. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



El equilibrio de la reacción está muy desplazado hacia la formación de acetato. La afinidad de la enzima por el acetaldehído es muy elevada.

Además de su posible papel en el metabolismo del etanol, la enzima interviene en el metabolismo de la fructosa en el hígado oxidando gliceraldehído a ácido glicérico.

La ALDH posee grupos tioles en su centro activo y puede ser inhibida por el hidrato de cloral, cianamida y disulfirán. El disulfirán se suministra a pacientes alcohólicos, consiguiéndose una terapia de aversión al alcohol. Este compuesto se une a grupos -SH de la enzima induciéndose una pérdida de la actividad del orden de un 85-90% y ocasionando niveles altos de acetaldehído en sangre (218).

Este enzima posee cuatro formas isoenzimáticas codificadas por diferentes *loci* genéticos, que difieren por su movilidad electroforética, propiedades cinéticas y distribución subcelular (citosol, mitocondria o microsoma). En el hígado humano se han caracterizado cuatro formas isoenzimáticas (9) con diferentes K_m para el acetaldehído. Algunos autores han detectado cinco isoenzimas en el hígado (338).

En condiciones fisiológicas parece que solo la isoforma mitocondrial de la ALDH puede ser importante en la oxidación del acetaldehído, debido a su baja K_m y al hecho de que la concentración hepática de acetaldehído es del orden de micromolar (218).

La isoforma mitocondrial presenta variaciones individuales y raciales con diferentes K_m para el acetaldehído y con las consiguientes variaciones en el metabolismo de éste. Un ejemplo lo constituye la población oriental, en la que un 50% posee una mutación en la ALDH mitocondrial, que la convierte en una enzima casi inactiva. En estos individuos, cuando consumen alcohol, se acumula acetaldehído en sangre (34 μM frente a 2 μM en individuos normales) produciéndoles una intolerancia al alcohol similar a la que ocurre tras la administración de disulfirán (123,275).

3.- CONSUMO CRÓNICO DE ETANOL Y ALTERACIONES METABÓLICAS.

El alcohol causa malnutrición primaria debido principalmente a la pobre ingesta de elementos esenciales y a las calorías vacías del etanol (1 gr. = 7.1 kcal.); y malnutrición secundaria debido principalmente a una mala absorción intestinal y daño en las células del intestino. La hepatotoxicidad resulta de las alteraciones metabólicas asociadas con la oxidación del etanol por medio de alcohol deshidrogenasa hepática y de los cambios redox producidos por los NADH generados, afectando al metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas y purinas.

El etanol es oxidado también en los microsomas hepáticos por el sistema citocromo P-450. La inducción de este sistema contribuye a la tolerancia metabólica y a un incremento de la vulnerabilidad a la toxicidad de solventes industriales, anestésicos, analgésicos, carcinogénicos químicos y retinoides. Finalmente, el incremento en acetaldehído, que se produce como consecuencia del metabolismo del etanol, da lugar a *aductos* proteicos,

inactivación enzimática, depleción de glutatión, toxicidad mediada por radicales libres, peroxidación lipídica e incremento de la síntesis de colágeno (Fig. 4).

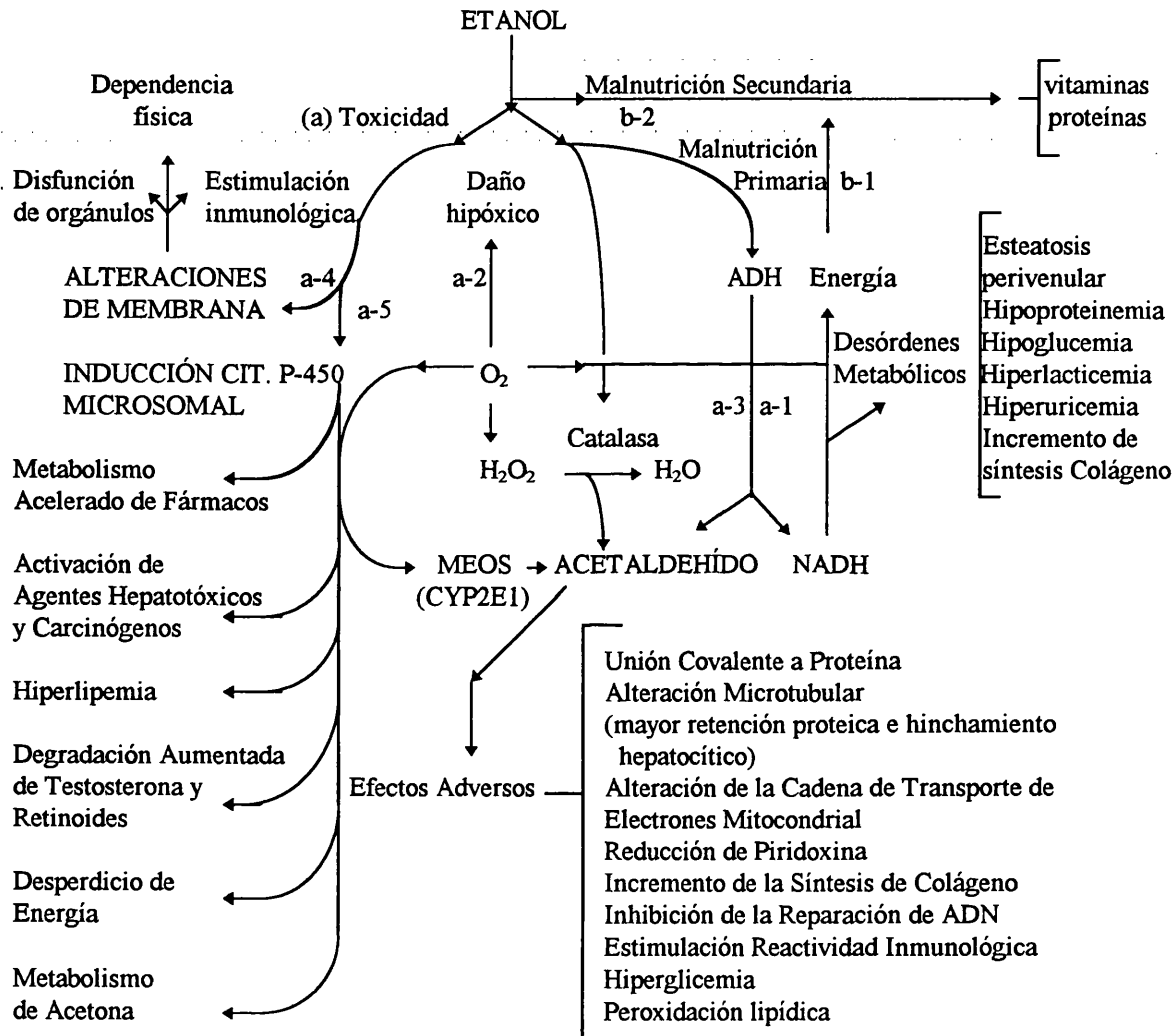


Fig. 4. Alteraciones metabólicas producidas tras un consumo crónico de alcohol. La malnutrición primaria (b-1) o secundaria (b-2) se ha diferenciado de la toxicidad directa (a). Cambios redox (a-1), hipoxia (a-2), acetaldehído (a-3), alteraciones directas en membrana (a-4), efectos secundarios de inducción microsomal (a-5).

3.1.- Efecto de excesiva generación hepática de NADH.

Como ya se ha comentado, la ADH (Clase I) es la principal enzima que metaboliza el etanol en el hígado, dando lugar a acetaldehído, con transferencia de hidrógeno desde el

etanol al cofactor NAD, que es convertido a su forma reducida NADH (Fig. 4). El acetaldehído producido, a su vez, pierde hidrógeno y se convierte en acetato. La oxidación del etanol genera un exceso neto de equivalentes reducidos (NADH). El gran aumento de éstos interfiere en la habilidad de la célula para mantener la homeostasis redox, induciendo alteraciones metabólicas (Fig. 4).

3.1.1.- Hiperlactemia, acidosis, hiperuricemia, cetonemia e hiperlipemia.

El aumento de la relación NADH-NAD produce un incremento de la relación lactato-piruvato dando como resultado hiperlactemia, ya que decrece la utilización y aumenta la producción de lactato por el hígado. La hiperlactemia contribuye a la acidosis y también reduce la capacidad del riñón para excretar ácido úrico, conduciendo a una hiperuricemia secundaria (231). El alcohol induce cetosis (207) y aumenta la descomposición de las purinas (106). Otra posible consecuencia del aumento de degradación de las purinas es la producción incrementada de especies oxigénicas activadas por la xantina oxidasa (187).

3.1.2.- Aumento de lipogénesis y reducción de oxidación lipídica.

El aumento de NADH también aumenta la concentración de α -glicerolfosfato y NADPH. Este aumento favorece la acumulación de triglicéridos hepáticos. Además, el exceso de NADH puede producir síntesis de ácidos grasos. La actividad del ciclo del ácido cítrico se reduce, particularmente porque disminuye la actividad de las reacciones que necesitan como cofactor al NAD. La mitocondria usa los equivalentes de hidrógeno originados del etanol y no los derivados de la oxidación de ácidos grasos que normalmente son la principal fuente de energía del hígado.

La disminución en la oxidación de ácidos grasos da lugar a la acumulación en el hígado de grasas de la dieta (232). Además de los cambios funcionales, que son consecuencia directa del metabolismo del etanol, el abuso crónico de etanol produce cambios más persistentes en la mitocondria (175,347). Así, el abuso de alcohol produce esteatosis hepática (229).

3.1.3.- Metabolismo afectado de glucosa y proteínas. Hipoglicemia.

La inhibición de la síntesis de proteínas se ha observado después de la adición de etanol a diversas preparaciones *in vitro* (347). La intoxicación aguda de alcohol causa hipoglicemia que es debida, en parte, a un bloqueo en la gluconeogénesis, consecuencia del incremento de la relación NADH-NAD. El incremento de NADH produce, además, alteraciones en el metabolismo de esteroides, favoreciendo la reducción de los mismos (223).

3.2.- MEOS y su interacción con otros componentes.

El sistema citocromo P-450, en el que se incluye el MEOS (CYP2E1), además de participar en la oxidación del etanol, participa en la oxidación de una gran variedad de sustancias, dando lugar a la interferencia del etanol con diferentes fármacos y sustancias.

3.2.1- Interacción con fármacos.

El etanol y algunos fármacos interaccionan a nivel de su metabolismo común en el sistema citocromo P-450. La intoxicación aguda de alcohol interfiere con el metabolismo de tranquilizantes y barbitúricos, incrementando sus niveles en plasma a niveles tóxicos. La inducción del MEOS tras el consumo de etanol se refleja en un incremento de la capacidad de la célula para metabolizar determinados compuestos, como tranquilizantes, anticoagulantes, aditivos, etc. (186).

3.2.2.- Activación de Carcinógenos.

Determinadas sustancias precarcinogénicas son transformadas en el sistema microsomal citocromo P-450 en sustancias carcinogénicas. En individuos alcohólicos se ha demostrado que se produce una activación rápida de estas sustancias precarcinogénicas y existe una asociación entre alcohol e incremento de cáncer en el tracto respiratorio y alimentario (230).

Los alcohólicos también son grandes fumadores, por lo que se establece un efecto sinérgico entre el alcohol y la nicotina, dando lugar a la aparición de cánceres de boca, esófago y laringe (230).

3.2.3.- MEOS y oxígeno.

En la oxidación del etanol a nivel microsomal, el MEOS requiere oxígeno como sustrato. Se ha propuesto que la inducción de este sistema incrementaría el consumo de oxígeno. Las oxidaciones catalizadas por él originan energía que se convierte en calor sin conservación de energía química. Si el calor producido es excesivo, dará lugar a una pérdida de energía, que aumentará conforme mayor sea la actividad del MEOS (228).

También se ha demostrado que una isoforma del citocromo P-450 (isoforma CYP2E1) que se induce tras el consumo de alcohol, produce radicales libres incrementados en la zona centrolobulillar del acino hepático (51).

3.3.- Alteraciones producidas por el acetaldehído.

El acetaldehído es el primer producto de la oxidación del etanol y tras un consumo prolongado de alcohol se encuentra incrementado. Este compuesto es muy reactivo y altamente tóxico, provocando muchas de las alteraciones encontradas en pacientes alcohólicos.

El acetaldehído forma uniones covalentes con proteínas del hígado (25). Se une covalentemente a proteínas hepáticas, hemoglobina y albúmina del suero. El acetaldehído también altera los microtúbulos del hepatocito, mediante su unión a los grupos sulfidrilo y lisina de la tubulina, alterando la polimerización de los microtúbulos. Una de las funciones claves de los microtúbulos es intervenir en el transporte intracelular de proteínas y su secreción. El consumo de alcohol puede producir daño en la secreción de proteínas del hígado, con una retención de las mismas en este órgano (412). Por otra parte, la unión covalente de acetaldehído con las proteínas puede inhibir la actividad de determinadas enzimas que poseen lisina en su centro activo (256).

Una segunda posibilidad que explicaría el daño producido por los complejos proteína-acetaldehído implicaría toda una serie de procesos inmunológicos. Así, el organismo podría reconocer estos complejos como neoantígenos, desencadenándose respuestas inmunológicas dañinas. Se han detectado en alcohólicos anticuerpos contra los complejos del acetaldehído, del tipo de inmunoglobulina A, que reconocen específicamente un complejo citosólico hepático de 200 kD. Estudios recientes parecen demostrar que los anticuerpos detectados reconocerían residuos N-etil-lisina en los complejos proteína-acetaldehído (412).

3.4.- Peroxidación lipídica.

El acetaldehído, mediante un efecto directo o indirecto (al disminuir los niveles de GSH) produce un incremento en la peroxidación de los lípidos. La unión de acetaldehído con cisteína y/o glutatión puede contribuir a una disminución de glutatión en el hígado (136,416).

El glutatión tiene importantes funciones, como son:

- 1.- Reacciona con los peróxidos tóxicos protegiendo las membranas y otras estructuras celulares.
- 2.- Es necesario para la síntesis proteica.
- 3.- Protege muchas enzimas que contienen grupos SH en su centro activo.
- 4.- Interviene en varias funciones de membrana. Transporte de azúcares, funciones mitocondriales, liberación de neurotransmisores, etc.

Así, la disminución de glutatión podría producir cambios en la membrana de diferentes orgánulos, determinando alteraciones de permeabilidad y de funcionamiento (177,254).

La peroxidación lipídica hepática está significativamente incrementada en ratas crónicas que reciben una dieta pobre de vitamina E (188), ya que se reduce el contenido de α -tocoferol (el mayor antioxidante en la membrana) hepático por conversión de éste a α -tocoferilquinona (209).

4.- ACCIÓN DEL ALCOHOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

4.1.- Disfunciones neurológicas.

Tras el consumo prolongado de alcohol, pueden aparecer diferentes enfermedades neurológicas asociadas bien con alteraciones del estado nutricional o bien causadas por la intervención más directamente de la toxicidad del etanol a nivel celular. En el primer caso, están causadas indirectamente por la carencia de factores vitamínicos (vitaminas B₁, B₆, B₁₂, etc.) (Tabla II).

Tabla II . Enfermedades neurológicas asociadas al alcoholismo crónico.

CON ALTERACIONES DEL ESTADO NUTRICIONAL	CON PATOGENIA MIXTA
Enfermedad de Korsakoff.	Esclerosis Laminar de Morel.
Enfermedad de Wernicke.	Demencia Alcohólica.
Neuropatía Periférica (Polineuritis etílica).	Atrofia Cerebelosa.
Neuropatía Óptica.	Miopatía Alcohólica.
Encefalopatía Pseudopelagrosa.	Mielinólisis Central Pontina.
Encefalopatía Portocava.	Atrofia Óptica.
	Enfermedad de Marchiafava-Bignami.

Extraído de *Escourolle* (1973) (104).

El consumo de alcohol puede inducir trastornos, como fallos de memoria, atrofia cerebral, cambios electrofisiológicos, pérdida de receptores para benzodiazepinas, alteraciones en la mielina, etc, que también son manifestaciones que se observan en el envejecimiento. Por todo ello, el alcohol puede producir un envejecimiento prematuro del cerebro (116).

El envejecimiento cerebral está asociado a un aumento de formación de radicales libres (146,92). Debido a que el etanol puede causar un envejecimiento prematuro del

cerebro, el mecanismo molecular que podría estar implicado en el caso del alcoholismo crónico sería el mismo que el del envejecimiento celular. Esta hipótesis ha sido demostrada en nuestro laboratorio (279).

4.2.- Efecto del alcohol sobre algunos receptores.

4.2.1.- Alcohol y receptores de glutamato.

El glutamato es el mayor neurotransmisor presente en el sistema nervioso central de los mamíferos. Se sabe que se une, al menos, con cuatro subtipos de receptores divididos en dos grupos: Receptores ionotrópicos, que incluyen los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), Kainato (KA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido propiónico isoxazólico (AMPA) y los receptores metabotrópicos, como el quisqualato (QA), que pueden ir asociados a la hidrólisis de fosfolípidos o a la activación o inhibición de la adenilato ciclasa (155).

Estudios recientes han demostrado que el alcohol inhibe la función de algunos de estos subtipos de receptores de glutamato. Por ejemplo, *Lovinger et al.* (241) demostraron que el alcohol inhibe la corriente iónica inducida por el receptor NMDA en neuronas de hipocampo. Sin embargo, el consumo crónico de alcohol da lugar a un incremento en el número de receptores de NMDA, posiblemente como una adaptación para compensar el efecto inhibitorio del alcohol (174). Este receptor NMDA lleva asociado un canal de calcio (19) y se cree que podría estar implicado en la memoria a largo plazo.

Se ha demostrado que la intoxicación aguda de alcohol inhibe el incremento de la concentración de calcio intracelular, estimulada por NMDA, en las células neuronales. *Hoffman et al.* (160) publicaron que el alcohol disminuye la entrada de calcio, estimulada por el NMDA, en cultivos primarios de células neuronales de cerebelo. Igualmente *Dildy y Leslie* (88) demostraron que el alcohol inhibe el influjo de calcio, estimulado por NMDA, en cultivos celulares de neuronas de neonatos de rata. Además, el alcohol inhibe la acumulación de GMPc (guanidin monofosfato cíclico) estimulado por el NMDA (160) y el incremento, inducido por el kainato, de calcio intracelular en cultivos de neuronas de cerebelo (161).

En relación a la exposición crónica al alcohol, *Iorio et al.* (173,174,384) vió que preexponiendo cultivos primarios de neuronas de cerebelo al alcohol, se producía un gran incremento en la entrada de calcio estimulada por el NMDA y un incremento en la actividad funcional de los receptores NMDA. Sus resultados concordaban con la hipótesis de que la exposición crónica al alcohol, produce una regulación aumentada de la función del receptor NMDA. Además, el aumento del número de receptores NMDA, se ha interpretado como una respuesta adaptativa a largo plazo de las neuronas, ya que la intoxicación por alcohol inhibe la función del receptor NMDA.

Estudios sobre comportamiento sugieren que la activación del receptor NMDA podría estar implicada en las convulsiones que se producen en el síndrome de abstinencia, puesto que cuando se administra a animales experimentales un antagonista (MK-801), se mejora el cuadro convulsivo en estos animales (129,283). Estos resultados sugieren la participación de los receptores NMDA en el síndrome de abstinencia.

4.2.2.- Alcohol y receptores GABA.

El ácido gamma-aminobutírico es el mayor neurotransmisor inhibitorio del cerebro de los mamíferos. El GABA produce su efecto a través de dos clases de receptores: GABA_A y GABA_B. Se ha demostrado que la interacción del GABA con el complejo GABA/benzodiazepinas (GABA_A) induce a un aumento en la conductancia de dicho complejo para iones Cl⁻ y una hiperpolarización de la membrana sináptica (171). Mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, se ha conseguido caracterizar múltiples subunidades del receptor GABA_A con gran homología entre sí (seis alfa, tres beta, dos gamma, una delta, etc.) que, *in vivo*, se asociarían en diversas combinaciones formando subtipos diferentes.

El etanol parece interactuar con un subtipo de GABA_A, que posee de modo específico la subunidad α -6 y que solamente se expresa en las células neuronales del cerebelo (244). Este receptor podría estar implicado en los efectos agudos producidos por el etanol a nivel cerebelar, ya que la administración de un agonista benzodiazepinas, previene las alteraciones motoras producidas por el etanol (399). Estos datos parecen indicar que el etanol podría interactuar a nivel de este receptor en la intoxicación aguda.

Otros estudios recientes han demostrado que el etanol podría interactuar, igualmente, con la isoforma γ 2L del receptor GABA_A. Se han encontrado dos isoformas de la subunidad γ 2 del receptor GABA_A que difieren entre sí por la presencia (isoforma larga, γ 2L) o ausencia (isoforma corta, γ S) de una inserción de 8 aminoácidos. Estos 8 aminoácidos parecen ser una secuencia consenso de fosforilación por la proteína quinasa C (428). Estudios en oocitos de *Xenopus* demuestran que la modulación por el etanol requiere, de modo específico, la presencia de la isoforma larga, pero no de la corta y que el mecanismo podría ser a través de fosforilación-desfosforilación de dicha isoforma (418).

El consumo crónico de alcohol parece disminuir la actividad GABAérgica. De hecho, existen datos que indican que la expresión de las subunidades α -1 y α -2 del receptor GABA_A disminuye tras un consumo crónico (50). Sin embargo, la expresión de la subunidad α -6 aumenta (284).

En resumen, durante la intoxicación aguda, el alcohol actuaría aumentando la acción inhibitoria del GABA_A y durante el consumo crónico se producirían cambios compensatorios, disminuyendo la funcionalidad de éstos y la actividad GABAérgica, aumentando el estado de hiperexcitación a nivel del SNC. Esta conclusión la apoyan estudios en los que se demuestra que cuando se administran sustancias que incrementan la

transmisión GABAérgica, se manifiestan significativamente los signos característicos de la privación (240).

4.2.3.- Receptores dopaminérgicos.

Las propiedades de refuerzo del alcohol parecen estar asociadas con el sistema dopaminérgico, como en otras sustancias adictivas. Hay evidencias que indican que el alcohol estimula las proyecciones de los sistemas mesolímbico y nigroestriado para mediar la respuesta de refuerzo del etanol (433,435). Se ha sugerido que el alcohol, al menos en dosis bajas, aumenta la síntesis, metabolismo y liberación de dopamina (433,435), mientras que en la privación alcohólica parecen disminuir las actividades dopaminérgicas (346). Además, la serotonina, que también parece estar implicada en la regulación del consumo de alcohol, estimula la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (234). De hecho, en ratas con alta preferencia al alcohol, los receptores de dopamina y serotonina localizados en diferentes zonas del cerebro, presentan alteraciones con respecto a aquellos animales que poseen aversión al alcohol (258).

4.3.- Alcohol y canales de calcio.

El calcio tiene una enorme importancia a nivel celular, ya que numerosas funciones celulares se encuentran reguladas por este ion, incluyendo secreción de neurotransmisores, activación de diferentes enzimas intracelulares, etc. El calcio puede entrar en la célula a través de canales dependientes de voltaje, de los que se han descrito, al menos, tres tipos (299).

Concentraciones de alcohol superiores a 25 mM inhiben la entrada de calcio a través de estos canales en sinaptosomas aislados (210). Sin embargo, se ha demostrado que el consumo crónico de alcohol aumenta la densidad (de 30 a 50%) de los lugares de unión de la dihidropiridina, asociada a los canales tipo L (91). En concordancia con estos resultados, la administración de antagonistas de los canales de calcio tipo L, junto con dosis repetidas de etanol, previene el desarrollo de la tolerancia y las acciones anestésicas del alcohol (91). Otros autores han demostrado que estos antagonistas de la entrada de calcio, previenen las convulsiones en el síndrome de abstinencia (239). En base a estos datos, se ha postulado que los canales de calcio podrían estar implicados, en parte, en el mecanismo de adicción al alcohol.

En resumen y unificando las tres últimas hipótesis descritas, se podría postular que la adicción al alcohol se produciría como consecuencia de un incremento de los receptores NMDA, que junto con una disminución de la actividad GABAérgica, daría lugar a un aumento en la excitabilidad neuronal característica del síndrome de abstinencia y por tanto de la dependencia al alcohol (354). Otra hipótesis alternativa que se ha sugerido, es que la activación en los receptores NMDA, junto con un aumento en los canales de calcio,

incrementaría el calcio intracelular. Este aumento de calcio podría activar las quinasas dependientes de calcio y fosforilar la subunidad 2L del GABA_A, alterando la función de este receptor (240).

4.4.- Efecto del alcohol en la transducción de señales.

Los efectos del alcohol en la transducción de señales han sido considerados muy recientemente. *Gordon et al.* (127), usando células de neuroblastoma y glioma, han demostrado que la exposición aguda al alcohol incrementa los niveles del receptor de adenosina estimulado por AMPc. La exposición crónica al alcohol produce el efecto opuesto, con adaptación de las células al alcohol por reducción de la actividad del receptor de adenosina estimulado por la adenilato ciclasa. Otros autores han demostrado que el alcohol altera los niveles de la proteína G que regulan la actividad adenilato ciclasa (324) incrementando la fosforilación de la proteína kinasa C (PKC). Esta última participa en el crecimiento neuronal inducido por NGF (345).

5.- ALCOHOL Y GESTACIÓN.

5.1.- Síndrome Alcohólico Fetal (SAF).

Desde principios de siglo se conoce que el alcohol afecta al desarrollo del feto (391). Sin embargo, hasta hace 20 años no se ha prestado atención al efecto teratógeno del alcohol.

Investigadores clínicos en Francia publicaron un artículo en el que se sugería que la exposición prenatal al alcohol podía dañar el desarrollo fetal (208). Años más tarde, *Jones* y sus colaboradores (180,181) recalcaron la relación entre el abuso de alcohol materno y los defectos en los recién nacidos y describieron el término síndrome alcohólico fetal (SAF) para definir a un conjunto de características presentes en niños nacidos de madres alcohólicas. Estas características incluyen: deficiencias en el crecimiento pre y postnatal, alteraciones cráneo-faciales características (microcefalia, fisuras palpebrales cortas, filtrum poco desarrollado, malformación del área maxilar) y una gradación variable de disfunciones en el sistema nervioso central (anomalías neurológicas, retraso en el desarrollo y/o déficits intelectuales). Todas estas alteraciones, así como la frecuencia de aparición de las mismas, se muestran en las Tablas III y IV. Como resultado de la identificación de SAF, se han publicado numerosos artículos estudiando los efectos teratógenicos del alcohol.

Tabla III: Características principales del síndrome alcohólico fetal.

CARACTERÍSTICA	MANIFESTACIÓN
<i>Alteraciones del SNC</i>	
Intelectuales	Retraso mental moderado (Media 60)*
Neurológicas	Microcefalia*, Hipotonía**
De Comportamiento	Irritabilidad*, Dificultad de aprendizaje*, Escasa coordinación**
<i>Déficits del crecimiento</i>	Defectos en el desarrollo*
<i>Anomalías faciales</i>	
Ojos	Blefarofimosis*, Epicantus*, Ptosis p.**
Nariz	Puente nasal ancho*
Mandíbula	Hipoplasia**
Orejas	Rotación**, Anomalías de la implantación**
Boca	Labio superior delgado*, Paladar hendido**
*Más del 80% de los pacientes	
***Entre el 50 y el 80% de los pacientes.	

Extraído de *Clarren y Smith* (60).

Tabla IV: Anomalías asociadas al Síndrome Alcohólico Fetal.

CARACTERÍSTICA	MANIFESTACIÓN	
	FRECUENTES*	OCASIONALES**
Ojos	Ptosis, Estrabismo, Pliegues epicánticos	Miopía, Microftalmia, Blefarofimosis
Boca	Pliegues palatinos laterales prominentes	Labio leporino, Paladar hendido, Dientes hipoplásicos con esmalte defectuoso
Cardíaca	Soplos, especialmente en la 1ª infancia	Defecto del septo ventricular, Anomalías en los grandes vasos, Tetralogía de Fallot
Génito-urinaria	Hipoplasia labial en niñas	Hipospadias, Hidronefrosis, Riñones poco rotados
Cutánea	Hemangiomas	Hirsutismo en la infancia
Esquelética	Pliegues palmares aberrantes, Torax excavado	Limitación en los movimientos articulares, Hipoplasia ungueal, Polidactilia, Xifoides bífidos, Escoliosis
Muscular		Hernia diafragmática umbilical o inginal, Diástasis de los rectos
*Entre el 25-50% de los pacientes		
**Menos del 25% de los pacientes		

Extraído de *Clarret y cols.* (61)

5.2.- Frecuencia de aparición.

El Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) aparece entre el 30% y el 45% de los hijos de madres alcohólicas crónicas. Actualmente no se sabe el límite máximo de consumo de alcohol por la madre que permite definir la existencia de daño fetal, ni un límite mínimo que excluya la posibilidad de afectación fetal.

La gravedad de los efectos en la descendencia es gradual y se encuentra directamente relacionada con el incremento en el consumo materno de alcohol, siendo el efecto más grave la muerte fetal, especialmente en los primeros períodos de gestación. Después de la muerte perinatal, el efecto más grave causado por el alcohol en la descendencia es el SAF. (Fig.5) (180,181).

La estimación de la frecuencia de niños nacidos con SAF está en el rango entre 0.33-2/1000 nacidos vivos (8). Sin embargo, la frecuencia de niños nacidos con algunos defectos relacionados con el alcohol (ARBDS) es mucho mayor. Por lo tanto, este síndrome es la principal causa conocida de retraso mental en el mundo occidental, incluso aventaja en frecuencia al Síndrome de Down y a los defectos en el cierre del tubo neural, cuyas frecuencias son de 1.25/1000 y 1/1000 respectivamente (8). Teniendo en cuenta que es la única claramente evitable, se deberían realizar campañas de prevención para evitar este problema.

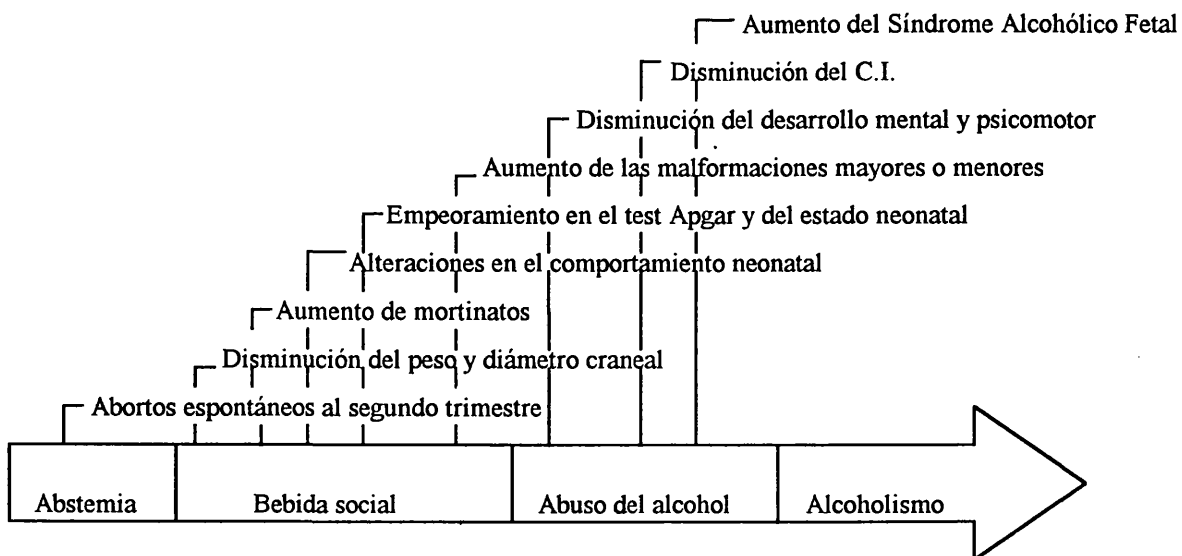


Fig. 5. Efectos del alcohol sobre el producto de la gestación en relación con el consumo de alcohol materno.

5.3.- Factores de riesgo.

En la madre gestante, es importante identificar algunos factores que producen una exacerbación de los efectos causados en el feto por el consumo de alcohol materno. Es conocido el hecho de que tomando las mismas cantidades de alcohol durante la gestación, algunas madres dan a luz bebés sin anomalías severas, mientras otras tienen niños con SAF. Esto sugiere la existencia de factores de riesgo que pueden influir en el grado de daño producido por la exposición fetal al etanol.

5.3.1.- Concentración de alcohol en sangre.

La concentración de alcohol en sangre materna, es un factor clave en la inducción de daño cerebral durante el desarrollo fetal (312). No se conoce la cantidad de alcohol mínima que puede producir el SAF, ni tampoco la dosis límite para evitar la teratogenicidad. Pero, por otra parte, el riesgo de aparición de niños con SAF es de un 50% en el caso de madres que han consumido dosis mayores de 100 gr. de etanol/día durante la gestación; a dosis menores de 10 gr. de etanol/día, los riesgos son mínimos, o en todo caso no relacionables con la acción del tóxico (83). La correlación existente entre el daño producido por el alcohol y la concentración de alcohol en sangre, ha sido demostrada tanto en las alteraciones estructurales (39), como en el deterioro funcional (125). Una cantidad mínima de alcohol consumida durante un periodo crítico de desarrollo, puede producir efectos a largo plazo. La importancia de los niveles de alcohol en sangre y el efecto umbral está directamente relacionada con el genotipo y el metabolismo de alcohol materno.

5.3.2.- Gestación y vulnerabilidad temporal a la exposición al alcohol.

El tiempo de exposición al alcohol es otro factor de riesgo clave que puede influir en el tipo o extensión del daño. El periodo más sensible para la mayoría de los teratógenos corresponde a la organogénesis (que usualmente ocurre durante el primer trimestre). Estudios en animales han mostrado que la exposición al alcohol durante el periodo equivalente al primer trimestre de gestación en humanos, puede producir morfología facial similar a la asociada con FAS (398), mientras que la exposición durante el equivalente al segundo trimestre en humanos, puede causar alteraciones neuronales (268). Por otro lado, la exposición al alcohol durante el tercer trimestre produce alteración de los circuitos neuronales, gliosis e incluso, disminución en la neurogénesis (422,119,126). Por lo tanto, parece claro que la afectación producida por el alcohol durante el desarrollo, abarca un periodo mucho más extenso que la causada por otros teratógenos, como lo confirman diversos estudios neuroanatómicos en el que el tercer trimestre se presenta como un periodo de vulnerabilidad especial para el cerebro, en respuesta al daño causado por el alcohol (250).

Todos estos datos, muestran que el efecto teratogénico del alcohol se extiende más allá del primer trimestre de desarrollo, a diferencia a lo que ocurre con otros teratógenos.

5.3.3.- Diferencias genéticas.

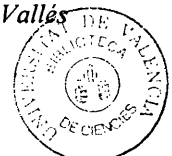
Existen evidencias claras, tanto en humanos (71) como en animales (73), de que ciertos factores genéticos juegan un papel importante en el daño fetal causado por el alcohol. Así existen ciertos factores genéticos o interindividuales que incrementan la susceptibilidad al daño causado por el alcohol, ya sea bien a través de factores maternos o bien a través del genotipo fetal (4). Algunas mujeres metabolizan el alcohol y/o su metabolito el acetaldehído más rápidamente que otras. La modificación en los niveles de alcohol y/o acetaldehído puede explicar ciertas diferencias interindividuales.

5.3.4.- Alcohol y otras drogas.

Además del alcohol, el uso de otras drogas, por parte de la madre alcohólica, puede agravar los defectos teratogénicos del alcohol. La cafeína, el consumo de cocaína o de marihuana (u otras drogas de diseño) e incluso el tabaco (tal vez la nicotina), pueden potencialmente influir en el desarrollo fetal produciendo retraso en el crecimiento, aumento de abortos espontáneos y mortalidad perinatal, alteraciones de comportamiento y aparición de malformaciones (117).

Tabaco: El consumo de tabaco es una causa importante de retraso en el crecimiento intrauterino. Los efectos del tabaco y del alcohol se pueden potenciar induciendo a un mayor retraso en el crecimiento fetal. El mecanismo, o los mecanismos, del efecto del tabaco todavía no son bien conocidos, pero se la ha relacionado no solo con el retraso del crecimiento (219), sino también con una gran variedad de anomalías en la placenta que afectan al feto (262). El común denominador parece ser un efecto isquémico de la nicotina en el flujo de sangre a través de la placenta. Otros estudios apuntan hacia un efecto directo de la nicotina en el transporte de nutrientes a través de la placenta o a la acumulación de monóxido de carbono (348).

Cafeína: No existen evidencias claras en humanos, de que la cafeína sea un teratógeno *per se*. Sin embargo, estudios experimentales en combinación con etanol, parecen reducir la supervivencia fetal y el tamaño de las crías supervivientes. Esta potenciación de los efectos de la cafeína en los roedores, no está relacionada con el daño causado por el etanol en el transporte de aminoácidos a través de la placenta, y de hecho, puede demostrarse una disminución de la proliferación celular en cultivos de hígado fetal de rata (153).



Otras drogas: Poco o nada se conoce sobre el efecto de otras drogas en el desarrollo fetal. Solo han sido publicados algunos datos sobre el efecto de la cocaína y la marihuana en el feto humano (441). En estos estudios se demuestra que estas drogas disminuyen el tamaño fetal. La cocaína atraviesa rápidamente la placenta, aparentemente debido a su alta solubilidad lipídica; además, la combinación del alcohol con la cocaína produce cocaetileno (382) que ha sido implicado en la producción de la toxicidad (149). Pero los posibles efectos de la cocaína en el flujo sanguíneo a través de la placenta, se desconocen.

5.3.5.- Deficiencias nutricionales.

Deficiencias nutricionales y minerales que acompañan comúnmente al consumo crónico del alcohol, pueden producir malnutrición fetal, potenciando los efectos del etanol. La malnutrición per se produce una disminución del crecimiento fetal, característica de niños con SAF; teniendo en cuenta que algunos nutrientes claves (aminoácidos, glucosa, ácido fólico, tiamina, vitamina B₆ y zinc) son esenciales para el crecimiento de los tejidos y el desarrollo del feto, una adecuada nutrición suplementaria de la madre es necesaria para el desarrollo fetal (113).

En algunos estudios, se ha proporcionado un suplemento proteico a la madre gestante y se ha conseguido con ello disminuir los efectos adversos del alcohol, pero en otros no se ha conseguido (367).

Otro factor importante en la patogénesis del FAS es el desarrollo de disfunciones placentarias. El consumo agudo y especialmente el consumo crónico de alcohol decremента el transporte de diversos aminoácidos a través de la placenta en roedores. Resultados similares se han obtenido con placentas de monos con un consumo crónico de alcohol (112). Por otro lado, la exposición aguda al alcohol, a concentraciones como las encontradas en humanos, no tiene efectos significativos en el transporte de aminoácidos y glucosa a través de la placenta (368).

Así, la malnutrición fetal debe potenciar los efectos del etanol, pero no parece ser el primer responsable de las anormalidades en el desarrollo inducidas por el alcohol. De hecho, el alcohol tiene un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de embriones de pollo (311) y embriones de rata en cultivo (318); dos sistemas en que los factores nutricionales y placentarios no juegan ningún papel en el desarrollo de las anormalidades producidas por el alcohol.

5.3.6.- Fases del alcoholismo materno y su repercusión fetal.

Además de los factores de riesgo anteriormente descritos, parece que otros factores pueden influir en los efectos del alcohol. De hecho, determinados estudios sugieren que el abuso de alcohol por parte del padre debe también afectar al desarrollo fetal (5). Por otro lado, la edad, el número de hijos, el estado de salud materno, etc., también deben ser

considerados al hablar de factores de riesgo. Según *Majewski*, los niños con SAF pueden clasificarse en tres grupos de severidad según las alteraciones del SNC. Además, este autor ha intentado relacionar los tres grados de afectación con la variabilidad materna debida al tiempo de consumo de alcohol, cantidad de alcohol ingerido durante la gestación, edad de la madre, etc.(248).

Existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de una correlación directa entre la gravedad de las manifestaciones de los niños con SAF y la fase del alcoholismo materno (6,329).

Experimentos realizados en nuestro laboratorio confirman la importancia de este factor de riesgo. La frecuencia de aparición de malformaciones en las crías de ratas alcohólicas hembras, de un año de consumo de alcohol y con mayor daño hepático, fue más alta que en las hembras con marcada menor afectación y menor tiempo de exposición al tóxico (359).

5.4.- Etiopatología del Síndrome Alcohólico Fetal.

A la luz de los numerosos estudios clínicos y experimentales, parece claro que no existe un único mecanismo patogénico para explicar el SAF. Por esta razón se han postulado una serie de mecanismos para intentar explicar las diferentes alteraciones que se producen en el SAF. Entre estos mecanismos cabe destacar:

5.4.1.- Alcohol y acetaldehído.

Hasta ahora todavía no se ha establecido si el daño fetal ocurrido en el SAF es por acción del alcohol *per se* o de su metabolito primario, el acetaldehído.

Diversas observaciones han demostrado que el etanol es un tóxico para el feto. En primer lugar, es conocida la difusión rápida del etanol a través de todos los tejidos. En segundo lugar, los niveles de alcohol en el feto son iguales e incluso superiores a los maternos (134). Además, ni la placenta ni el hígado fetal pueden metabolizarlo al no poseer maquinaria enzimática necesaria, por lo que se almacena en el líquido amniótico (355). Se ha comprobado que el etanol no se puede metabolizar a acetaldehído debido a la inmadurez del sistema alcohol deshidrogenasa (ADH) (356). Por otra parte, el tert-butanol que no se metaboliza causa efectos teratogénicos en animales experimentales (128). Estos resultados muestran que el alcohol es fetotóxico en estudios experimentales.

Por otra parte se sabe que el acetaldehído es mucho más tóxico que el etanol y que atraviesa la barrera placentaria ejerciendo sus efectos directamente sobre el feto (134,184). Este metabolito es citotóxico (93), mutagénico (300) y produce letalidad, retraso en el crecimiento y malformaciones (93). Además, parece que en el periodo de lactancia, tanto el alcohol como el acetaldehído pasan a la leche pudiendo ser tóxicos para los neonatos (356). Sin embargo, existen discrepancias respecto al papel del acetaldehído, ya que otros autores

(36) no han confirmado que el acetaldehído sea tóxico para el feto. Además, en estudios con embriones de rata en cultivo (56,318) también se han observado resultados contradictorios. Por tanto, se podría concluir que aunque el acetaldehído parece contribuir a la teratogenicidad del etanol, no es el agente causal.

5.4.2.- Hipoxia fetal.

Una hipótesis que se postuló hace unos años para explicar las alteraciones que se observan en el SAF es que estas son debidas a una restricción del flujo sanguíneo que llega a la placenta induciendo una hipoxia fetal con el consiguiente daño a nivel del SNC. De hecho, se conoce que una falta en el aporte de oxígeno al feto puede producir retraso en el crecimiento y alteraciones en la morfogénesis fetal (49). Se ha demostrado experimentalmente que la administración de 2-4 gr. de etanol por kilo de peso a animales experimentales da lugar a una disminución de la presión sanguínea, frecuencia cardíaca, acidosis y alteraciones en el flujo sanguíneo placentario, sin ocasionar graves alteraciones en la madre (13,179,437).

En estudios sobre daño neuronal causado por hipoxia en el cerebro en desarrollo, se ha encontrado una dramática disminución de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo y de las células de Purkinje en el cerebelo (20,39,313). Se ha propuesto que la hipoxia inducida por el etanol puede conducir a una excesiva liberación de ciertos neurotransmisores excitadores, tales como el glutamato, induciendo neurotoxicidad (264).

Sin embargo, esta hipótesis no está totalmente esclarecida ya que no se han observado alteraciones en el flujo sanguíneo en mujeres embarazadas tras el consumo de alcohol (367).

5.4.3.- Radicales libres.

El oxígeno es una molécula que inicialmente contiene un par de electrones desapareados, localizados en diferente orbital y que al oxidarse por captación de un electrón, forma una especie oxigenada activada o anión superóxido (O_2^-). Este último posee uno o más electrones desapareados por lo que es muy inestable y confiere a la molécula gran capacidad reactiva. El O_2^- , bien espontáneamente o bien por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), sufre una dismutación dando lugar al agua oxigenada (H_2O_2). Esta última, por rotura del enlace O-O, se transforma fácilmente en especies altamente oxidantes, como el radical hidroxilo ($OH\cdot$).

El O_2^- se ha demostrado que es mutagénico y tóxico para muchos organismos (83). Puede producir daño celular directamente o por interacción con peróxidos de hidrógeno, generando radicales hidroxilo. Para minimizar el efecto citotóxico en el organismo del O_2^- existen mecanismos básicos de protección. La reducción tetravalente de O_2 a agua y el uso por parte del organismo de la SOD, un enzima que cataliza la conversión de O_2^- en H_2O y O_2 , deben proteger los tejidos de los efectos deletéreos del O_2^- .

Un exceso de radicales libres conduce al estrés oxidativo, el cual puede estar implicado como mecanismo de ciertos estados patológicos como envejecimiento, cáncer, arteriosclerosis, etc. Dicho estrés tiene lugar cuando la producción de especies reactivas es mayor que la eliminación que puedan realizar los sistemas de defensa del organismo. Estos sistemas de defensa se encuentran muy interrelacionados entre sí, siendo los más importantes entre los sistemas enzimáticos: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el glutatión peroxidasa dependiente de selenio y otras glutatión peroxidases. Y entre los no enzimáticos: el glutatión, la vitamina E y la vitamina C.

Estudios de los últimos años indican que el estrés oxidativo puede ser una de las causas de la patología hepática y cerebral que se observa tras el consumo crónico de alcohol (10,11,100,278,296).

Estudios recientes indican además, que un aumento de radicales libres podría participar en la patogenia del SAF. De hecho, *Davis* y sus colaboradores (85), usando cultivos celulares de cresta neural, demuestran que el etanol disminuye significativamente la viabilidad celular y simultáneamente produce un aumento de radicales libres. Estos mismos autores demuestran que la adición de enzimas antioxidantes en el medio de cultivo, como la SOD, revierten los efectos causados por el etanol en el cultivo celular. Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la exposición prenatal al alcohol causa un incremento en los niveles de lipoperóxidos y especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) en cerebros de fetos de 21 días. Estos mismos animales procedentes de madres alcohólicas presentan disminuciones significativas en los niveles de glutatión cerebral. Además, la administración de vitamina E a la madre alcohólica gestante previene la disminución de peso corporal y cerebral que se observa en sus descendientes (139). Estos resultados sugieren que los radicales libres y el estrés oxidativo inducido por el alcohol, podría participar en algunas alteraciones que se observan tras la exposición prenatal al alcohol.

5.4.4.- Prostaglandinas.

Las prostaglandinas son miembros de una familia de ácidos grasos formados por cadenas de 20 carbonos derivadas del metabolismo del ácido araquidónico. A este grupo pertenecen los eicosanoides, el tromboxano y la prostaciclina. Estos compuestos se encuentran en casi todos los tejidos y fluidos corporales interviniendo en un gran número de actividades biológicas (277). De particular importancia es que estos prostanoides están implicados en todos los estadios de la gestación, desde la implantación hasta el parto, así como el normal crecimiento y desarrollo fetal. Además, las prostaglandinas parecen regular la liberación de ciertos neurotransmisores y la diferenciación celular en el sistema nervioso central (430).

Se ha sugerido que el alcohol podría alterar el metabolismo de las postraglandinas y que los cambios en los niveles de éstas podrían explicar algunas de las alteraciones que se observan en SAF (328). Esta hipótesis se basa principalmente en el hecho de que algunos inhibidores de la liberación de las postraglandinas, tales como la aspirina y la indometacina,

reducen los efectos tóxicos inducidos por el etanol y atenúan el retraso en el crecimiento de animales experimentales expuestos al alcohol (367). Además, ciertos datos en humanos sugieren que la exposición al alcohol incrementa la liberación de prostanoideos fetal (434).

Sin embargo, esta hipótesis necesita estudios que demuestren los posibles beneficios de inhibidores de prostaglandinas en la prevención de los efectos embriotóxicos del alcohol.

5.4.5.- Efectos citotóxicos del etanol.

Debido al hecho de que el etanol puede interferir en diferentes etapas de la proliferación y diferenciación celular, se ha postulado la hipótesis de que el alcohol actuaría de forma directa en la célula inhibiendo la síntesis proteica y de ADN (141). Esta hipótesis podría explicar la disminución del peso corporal y la microcefalia que se observa tanto en niños como en animales experimentales expuestos prenatalmente al alcohol. Además la inhibición de la síntesis de ADN se ha correlacionado con una acumulación de células en las fases G₀/G₁, impidiendo la normal evolución de las células a la fase de síntesis S (141).

El etanol produce inhibición de la síntesis proteica tanto a nivel celular como en tejidos (335,141). Induciendo, probablemente también, disminución en el contenido celular de ARN y ARNm (140).

5.4.6.- Alteraciones físico-químicas de la membrana.

El nivel óptimo de fluidez de membrana es muy importante para mantener las funciones biológicas normales en la célula, tales como crecimiento, transporte a través de membrana, actividad enzimática, etc. Durante el desarrollo, los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la bicapa lipídica deben alterar la conformación de las proteínas de membrana, la interacción proteína-lípido, la adhesión celular (actividad de la N-CAM), la migración y el reconocimiento (121). Se ha postulado que los efectos inducidos por el alcohol en la fluidez de membrana podría ser uno de los mecanismos implicados en las alteraciones que se observan en el SNC tras la exposición prenatal al alcohol (132,367).

Las posibles consecuencias que puede originar un aumento de fluidez de la membrana inducida por el alcohol es la alteración en la función de algunos receptores de membrana, tales como NMDA o GABA, en los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, etc. Un aumento en las concentraciones de calcio intracelular puede inducir muerte neuronal.

5.4.7.- Cambios en la metilación del ADN.

La metilación del ADN parece ser uno de los mecanismos que regulan la actividad y función génica (331) (ver apartado 8). En muchos eucariotas superiores, el ADN se encuentra modificado debido a la metilación del residuo de citosina en la posición 5' que lo

se convierte en 5-metilcitosina. La hipótesis general es que dicha conversión puede impedir la unión de determinadas proteínas, tales como represores o activadores, al ADN. El posible cambio producido en la unión de ADN-proteína puede ocasionar alteraciones de la expresión génica (163). Se ha demostrado que el ADN de los embriones está altamente metilado (379), y que durante los estados de diferenciación en el desarrollo, los genes que codifican proteínas específicas de tejido son demetilados produciéndose una expresión de estas proteínas en el tejido correspondiente. Por tanto, existe un diferente patrón de metilación que es específico para cada tejido.

Se ha postulado que el alcohol podría alterar la metilación del ADN conduciendo a una alteración en la expresión de ciertos genes que podrían explicar ciertas alteraciones que se observan en el síndrome alcohólico fetal. Esta hipótesis está basada en el hecho de que la administración aguda de alcohol a ratas gestantes disminuye la actividad del enzima ADN metilasa (120). Estos autores demuestran que la disminución de la actividad enzimática está causada por el acetaldehído, producto de oxidación del etanol. De conformidad con estos datos Garro y sus colaboradores postulan que una posible hipometilación del ADN alteraría la expresión génica y podría ser uno de los mecanismos responsables de algunas anomalías observadas en el SAF.

Esta hipótesis, aunque atractiva e interesante, no aporta ninguna evidencia experimental de que el alcohol produzca alteraciones en la metilación de genes o de determinados genes y éste va a ser un objetivo de la presente tesis.

5.4.8.- Posible papel de los retinoides.

En los últimos años se ha demostrado que los genes que regulan el ácido retinoico tienen un papel fundamental durante la morfogénesis del sistema nervioso central así como de otros órganos. De hecho, trabajos recientes indican que estos genes están en una zona en donde se encuentran también otros genes que codifican a las hormonas tiroideas así como otras hormonas. Igualmente se ha demostrado que actúan como factores de transcripción sugiriéndose que es una de las primeras señales en la diferenciación de los tejidos durante la embriogénesis (261).

Se sabe que el etanol puede ser un inhibidor competitivo en la oxidación del retinol catalizado por la alcohol deshidrogenasa (Clase I) humana (415). *Duester* ha postulado (95) que una reducción en la síntesis de ácido retinoico en el feto -debido a la inhibición causada por el etanol en la oxidación del retinol- puede conducir a algunas de las malformaciones en el desarrollo del sistema nervioso central observadas en el FAS (95,131).

La vía de biosíntesis del ácido retinoico pasa por la conversión de retinol (vitamina A) en el metabolito primario retinal por la acción de la retinol deshidrogenasa, que es idéntica a la alcohol deshidrogenasa Clase I. El retinal es posterior e irreversiblemente oxidado a ácido retinoico por la aldehído deshidrogenasa. Se ha demostrado que la enzima alcohol deshidrogenasa presenta un mayor grado de afinidad por el alcohol que por el retinol. Durante la intoxicación alcohólica, la mayoría de la alcohol deshidrogenasa está

metabolizando al etanol y por tanto la oxidación del retinol no se puede realizar, lo que conlleva una reducción del ácido retinoico. Por tanto, una carencia en el ácido retinoico podría alterar la expresión de ciertos genes y podría ser el factor clave responsable de las morfogénesis alteradas observadas en FAS.

Esta hipótesis, aunque nueva e interesante, sin embargo, se sabe que en el embrión, además de la ADH, existen otros sistemas enzimáticos que metabolizan el retinol a ácido retinoico y, por tanto, se necesitan más pruebas experimentales que demuestren que el alcohol altera los niveles de ácido retinoico durante el periodo embriofetal. Al mismo tiempo, otro inconveniente que se le ha encontrado es que la carencia de ácido retinoico no produce exactamente las mismas alteraciones morfofaciales que se observan en el síndrome alcohólico fetal.

6.- ASTROCITOS Y DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

6.1.- Ontogenia de las células astrogliales.

Tanto las neuronas como las células gliales en el cerebro de los mamíferos derivan del neuroepitelio del tubo neural primitivo. Como se muestra en la Fig. 6, los procesos de gliogénesis corticales proceden de derivados celulares de la cresta neural. Conceptualmente, durante el desarrollo embrionario aparecen 4 grupos principales de células progenitoras (*stem cell*): 1) células progenitoras multipotenciales, 2) células progenitoras bipotenciales, 3) células progenitoras gliales y 4) células progenitoras neuronales.

En experimentos realizados con células embrionarias de cerebro de rata (13.5-14.5 días de edad fetal) mediante expansión clonal, se han observado tres poblaciones diferentes de células progenitoras (407): 1) una célula progenitora que dará lugar a una amplia población de células que finalmente se diferenciarán en células gliales y neuronales, así como a una población de células mitóticas de morfología similar a la célula progenitora que se partió; 2) una célula progenitora que finalmente dará lugar a la diferenciación de células gliales y neuronales; y 3) una célula progenitora que dará lugar a un único fenotipo glial o neuronal (55).

Las células progenitoras multipotenciales están presentes solamente durante la embriogénesis, y se consideran como una población finita celular que deja (de todas maneras se mantiene una población de células progenitoras multipotenciales) la función de auto-renovación para formar 2 células precursoras bipotenciales.

Las células progenitoras bipotenciales son, en principio, similares funcionalmente a las células precursoras multipotenciales y pueden generar células gliales y neuronales diferenciadas y, sin embargo, se diferencian en que las células progenitoras bipotenciales tienen una limitada capacidad proliferativa. Estas células expresan una nueva clase de proteína de filamentos intermedios (clase VI) denominada nestina. Esta última proteína se

reconoce antigénicamente como Rat-401. Se ha demostrado que las células progenitoras bipotenciales expresan, además de la nestina, la vimentina, detectada también en células neuroepiteliales indiferenciadas, en neuronas y en glia radial durante el estado temprano de su diferenciación. También expresan el gangliósido G_{D3} y una serie de gangliósidos que reconocen al anticuerpo monoclonal A2B5.

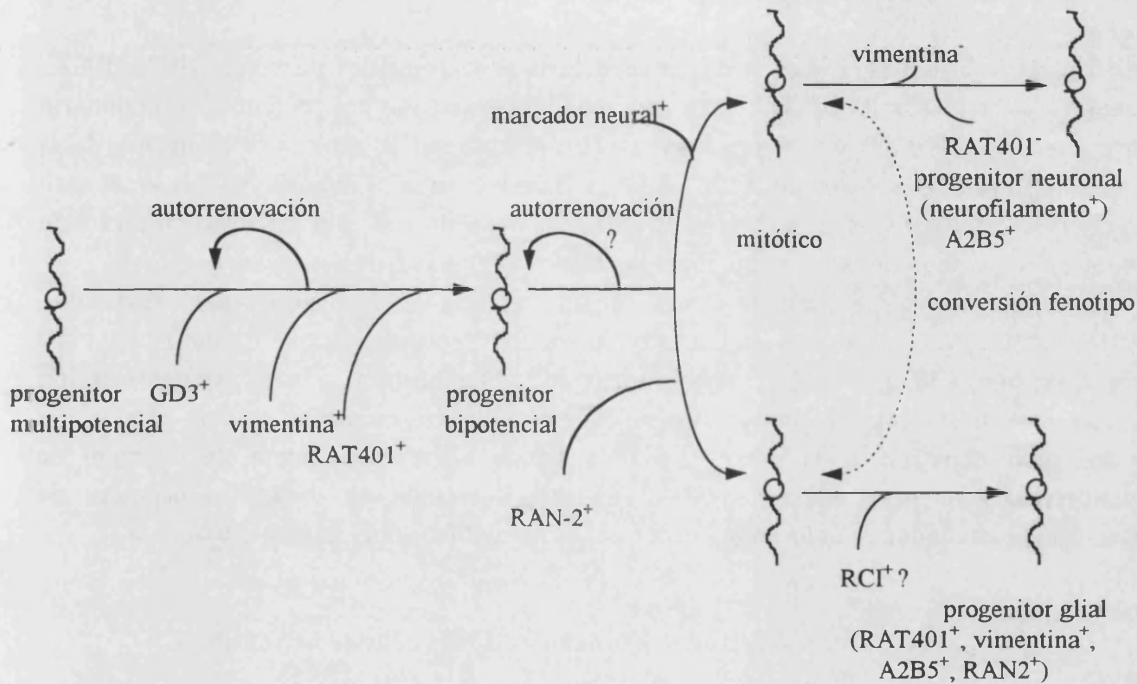


Fig. 6. Esquema en el que se representa el origen de las células gliales y neuronales durante el desarrollo de la corteza cerebral. En este esquema también se representa la adquisición (+) o pérdida (-) de los componentes antigénicos en la maduración de los diferentes tipos celulares. Tomado de *Cameron y Rakic* (55).

La formación de una célula glial o neuronal pasa por una población de células bipotenciales y posteriormente por unas células progenitoras exclusivas para neuronas y otras para células gliales (Fig. 6). La adquisición del antígeno Ran-2, específico de las células gliales que se expresan aproximadamente al día 11 en el desarrollo del embrión, proporciona una indicación de que existe una segregación de las poblaciones celulares gliales y neuronales. Los antígenos vimentina y Rat-401 parecen expresarse en la célula progenitora restringida al linaje glial. Además, los antígenos A2B5 y G_{D3} se expresan también en estas células progenitoras gliales. Por otra parte, durante la mitosis de las células progenitoras que darán lugar a las neuronas, existe un momento en que éstas dejan de

expresar los antígenos G_{D3}, vimentina y Rat-401 y empieza a expresar proteínas específicas de neuronas, tales como las proteínas de neurofilamentos y las isoformas de la clase III de la B-tubulina.

La célula bipotencial va a dar lugar a la glía radial. Las células gliales radiales se caracterizan por poseer una forma alargada que durante el desarrollo cortical cerebral se expanden radialmente a la corteza cerebral. Estas células juegan un papel importante en la organización de la disposición espacial de las diferentes capas de la corteza cerebral y cerebelar.

En ratas, el fenotipo antigénico de las células gliales radiales primarias (RC1⁺, RC2⁺, vimentina⁺, Rat-401⁺ y Ran-2⁺) se sustituye durante el desarrollo por un fenotipo secundario con expresión de GFAP y vimentina. Hasta el momento no se sabe si la expresión de la vimentina precede a la expresión de la GFAP en las células gliales radiales, ya que en el caso de primates la GFAP sí se expresa por estas células progenitoras. Sin embargo en rata y en pollo solo se ha detectado la vimentina en las células gliales radiales, pero no la GFAP.

Las células gliales radiales van desapareciendo a lo largo del desarrollo, transformándose en astrocitos fibrilares y astrocitos protoplásmicos. Estudios *in vitro* realizados por *Culican* y su colaboradores (68) demuestran que la transformación morfológica de las células gliales radiales ocurre concomitantemente con la adquisición gradual de inmunoreactividad de la GFAP y con una correspondiente disminución de inmunoreactividad para RC1. La GFAP ha sido detectada en todas las especies de vertebrados estudiadas, siendo un marcador definitivo del fenotipo celular astrocítico.

6.2.- Propiedades, características y funciones de las células astrogiales.

Las células gliales de mayor tamaño son los astrocitos. Estos se pueden dividir en astrocitos fibroso, que se encuentran en la materia blanca, y astrocitos protoplásmicos, localizados en la materia gris. Los astrocitos, como su nombre indica poseen forma estrellada y presentan prolongaciones membranosas, largas y estrechas, y dilataciones que se aprecian en sus extremidades, los pies terminales (*end feet*), que rodean la superficie de los capilares sanguíneos, dejando pequeños huecos para la difusión de sustancias desde los endotelios capilares hasta los espacios extracelulares del cerebro. Estos pies terminales característicos de los astrocitos, se encuentran relacionados también con las membranas neuronales y con las membranas piales que cubren la superficie cerebral externa (45).

Los astrocitos protoplásmicos presentan un tamaño entre un rango de 10 a 40 μm y poseen un citoplasma más claro que el de los astrocitos fibrosos. En su pericarion se encuentran filamentos de 90 Å y microtúbulos de 240 Å, gránulos de glucógeno, lisosomas y cuerpos semejantes a los de lipofucsina, cisternas aisladas de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi pequeño y mitocondrias alargadas y pequeñas que aparecen en los procesos celulares muy a menudo. Su núcleo es oval y su nucleocromatina homogénea. A diferencia de los astrocitos fibrosos, no contienen abundantes estructuras filamentosas y sus prolongaciones tienden a ser laminares o membranosas.

Los astrocitos fibrosos, se sitúan normalmente entre los haces de axones mielinizados y contienen abundantes estructuras filamentosas, gliofilamentos agrupados en haces delgados cuyo componente proteico más importante, es la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP).

Las células astrogiales juegan un importante papel funcional tanto en el desarrollo cerebral como en el cerebro adulto.

En el sistema nervioso adulto, las neuronas y los astrocitos presentan relaciones morfológicas íntimas. Los astrocitos constituyen aproximadamente el 50% del número total de células del cerebro (315). Investigaciones recientes han demostrado que la astroglia constituye una familia de células que puede ser definida por características morfológicas, inmunológicas o farmacológicas, y estas células son responsables de la homeostasis de iones (especialmente K^+) y aminoácidos [glutamato (Glu)² y ácido γ -aminobutírico (GABA)] (157,421) en el medio extracelular. Además, la astroglia posee mecanismos complicados para la regulación del volumen celular, especialmente en comparación con los mecanismos que poseen las células oligodendrogiales y neuronales (192). Las propiedades de los astrocitos en lo referente a transporte a través de la membrana, pueden jugar un papel importante en el control de la composición de los fluidos extracelulares en el sistema nervioso central (SNC). Como el espacio extracelular en el cerebro es relativamente pequeño (aproximadamente 10% del volumen total cerebral) (197), ligeros cambios en el volumen celular astrogial podrían ejercer un efecto importante en la composición del espacio extracelular en lo concerniente a iones, aminoácidos, neurotransmisores, factores tróficos y factores neuroactivos (165,191,247).

Existen pruebas de que la estimulación de muchos receptores gliales activa sistemas de segundos mensajeros (AMP cíclico, GMP cíclico, trifosfato de inositol, diacilglicerol, etc.) (191). Por otra parte, muchos neurotransmisores, en los astrocitos, causan cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} . Multitud de estudios han demostrado que las células gliales expresan adrenoceptores, tanto de α - como de β -subtipo y que también poseen receptores para histamina. Se han observado receptores de dopamina en los astrocitos del estriado. La existencia de receptores de 5-hidroxitriptamina₂ (5HT₂) ha sido demostrada en diferentes regiones cerebrales (145) y seguramente el receptor de 5HT_{1A} también existe en estas células. Se han obtenido evidencias de que los astrocitos poseen receptores acetilcolina muscarínicos, P₂-purinérgicos y receptores de adenosina A₁ y A₂. El GABA, que es uno de los mayores neurotransmisores inhibitorios en el SNC de los mamíferos, ejerce su acción sobre dos tipos de receptores: GABA_A y GABA_B. Se ha demostrado que ambos tipos de receptores producen trasiego de Ca^{2+} en astrocitos tipo 1 (294). Incluso se han identificado receptores para aminoácidos excitadores en los astrocitos. Muchos receptores de péptidos se han encontrado en células astrogiales: receptores para el péptido intestinal vasoactivo (PIV), angiotensina II, endotelinas ET1 y ET3, arginina-vasopresina (AVP), péptido natriurético atrial (PNA), bradikina, substancia P, somatostatina, y receptores para secretina (191). Se ha demostrado la presencia de receptores de opiáceos δ y κ en astrocitos (102), aunque la presencia de receptores de opiáceos μ no ha podido ser demostrada. La demostración de receptores ligados a la neurotransmisión y canales iónicos

sensibles al voltaje en astrocitos tiene un gran interés para comprender cómo responde la glía a la actividad neuronal.

La idea de que las neuronas mandan mensajes a la astrogliá sugiere que la glia también manda mensajes a las neuronas (y a otras glías). De hecho, las células astrogliales pueden sintetizar y liberar sustancias neuroactivas y factores tróficos. Es interesante el hecho de que parecen existir localizaciones específicas de sustancias neuroactivas en subpoblaciones de los astrocitos. Así, las encefalinas son producidas en la astrogliá del cerebelo, corteza cerebral, estriado e hipotálamo y son liberadas desde estas células por estimulación de β -receptores, mientras que la somatostatina es producida en la astrogliá cerebelar pero no en astrocitos de corteza cerebral o estriado. Las células gliales también sintetizan y secretan un gran número de factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), insulina y factores de crecimiento parecidos a la insulina I y II (252). Muchos datos sobre las propiedades de los astrocitos tienen su origen en estudios que usan diferentes sistemas de cultivo y solamente se han realizado unas pocas investigaciones en células astrogliales in vivo (111,386,411) debido, sobre todo, a las dificultades para la identificación de las células astrogliales en el cerebro vivo. De hecho, el desarrollo de las condiciones de cultivo durante las últimas dos décadas, ha sido el prerrequisito para el conocimiento que actualmente poseemos de la bioquímica y la farmacología de las células astrogliales.

6.2.1.- Función de guía durante el desarrollo neuronal.

La glía participa de forma importante tanto en el desarrollo del SNC como en la regeneración nerviosa (148). Así, las células gliales radiales guían a través de sus largas fibras la migración de las neuronas hasta sus lugares definitivos. Posteriormente, la glía radial ofrece una dirección para el crecimiento axonal. En definitiva, las células astrogliales tejen una red estructural, que permite la migración de las neuronas desde sus puntos de origen en el sistema nervioso en desarrollo, hasta sus destinos finales en el cerebro maduro.

Jerry Silver (377), ha demostrado, en el cerebro de ratón, que un *cabestrillo* de astrocitos dirige el crecimiento de los axones de una parte del cerebro a la otra, formando el cuerpo caloso, que es el principal tracto de fibras nerviosas que conecta los dos hemisferios cerebrales. En los animales que carecen del cabestrillo glial, el cuerpo caloso no se forma. Pero, si implantamos una pieza de material filtrante de plástico con astrocitos en crecimiento, los axones volverán a desarrollarse (377).

Existe una serie de moléculas que intervienen en la interacción neurona-glía y todo un sistema de adhesión que contribuye a la migración neuronal realizada por la glía. *Hatten* y colaboradores (99) han identificado una proteína neuronal, la astrotactina, que juega un papel crítico en la migración neuronal. Evidencias de ensayos in vitro indican que la astrotactina interviene en la unión de la membranas neuronales a las células gliales, en el establecimiento de los contactos neurona-glía, en la organización del posicionamiento neuronal realizado por los procesos gliales y en la migración de las neuronas a lo largo de

los procesos gliales *in vitro*. Además, las moléculas de adhesión celular neural N-CAM y L1 se expresan en los axones y en las fibras paralelas. La expresión de astrotactina se restringe a los cuerpos celulares y a los procesos que conducen la migración neuronal. Esto sugiere que las moléculas de adhesión celular neural y las caderinas intervienen en el crecimiento de conos de locomoción. La migración neuronal se realiza por la astrotactina.

Estudios *in vitro* sobre el crecimiento axonal a lo largo de los substratos gliales sugieren que existen dos sistemas generales de adhesión neural, las moléculas de adhesión celular neural de la superfamilia IgG y las caderinas. Los astrocitos expresan tanto N-CAM como las caderinas. Por medio de una unión entre N-CAM o caderinas neuronales y N-CAM o caderinas astrogiales se podría explicar el crecimiento de las neuritas (409).

6.2.2.- La red estructural y la barrera hematoencefálica.

Las células neurogliales y, en particular, los astrocitos, adquieren una disposición espacial de forma que impiden el flujo al azar de los impulsos nerviosos. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran organizados en modelos discernibles, siendo estos modelos variables pero provocando que los procesos de los astrocitos separen o aislen las superficies receptoras de las neuronas de las influencias aferentes no específicas.

Una función más de los astrocitos es la de inducir la formación de la barrera hematoencefálica. En la mayor parte del organismo, las células endoteliales que revisten las paredes de los vasos capilares están trabadas de una manera laxa, permitiendo así que las sustancias hidrosolubles más pequeñas que se encuentran disueltas en la sangre, difundan hacia los tejidos. No ocurre eso en el cerebro, cuyas células endoteliales capilares se hallan tan estrechamente unidas que resultan virtualmente impermeables a las sustancias hidrosolubles. La barrera, creada de esa manera, es fundamental para mantener en el cerebro un medio químicamente constante, pero supone también un obstáculo para la terapia de las enfermedades cerebrales (178).

En el sistema nervioso tiene lugar un intercambio de materiales entre la neurona y su microambiente. Pero, a fin de conseguir una actividad eléctrica continua y bien coordinada a través de las redes neurales, debe producirse una rápida eliminación de su ambiente inmediato de muchas sustancias que, de otra forma, influirían en la actividad neuronal. En los vertebrados, las células gliales suponen un filtro denso y un sistema de absorción, que rodea casi totalmente (90%) a todos los capilares sanguíneos. Los capilares cerebrales están rodeados, casi en su integridad, por los *pies terminales* de las fibras astrocíticas, que dibujan un patrón en sierra que cubre la superficie externa de los vasos. Los astrocitos presentan un papel importante, induciendo a las células endoteliales de los capilares cerebrales, a formar las uniones estrechas (*tight junctions*) y a sintetizar las enzimas características de la barrera hematoencefálica. Las sustancias que entran en el cerebro son sometidas a una selección primaria por parte del recubrimiento endotelial de los capilares sanguíneos y posteriormente a otra selección realizada por el sistema de filtro glial. Solamente los compuestos que sobreviven a esta ruta larga y estrecha, debido a su elevada concentración o a la ausencia de

sistemas de captación selectiva, llegarán a las neuronas. De esta forma, las células gliales actúan como filtro, determinando mediante absorción selectiva, la composición del espacio extracelular neuronal.

6.2.3.- Reparación y regeneración del tejido nervioso lesionado.

Las células neurogliales, y en especial los astrocitos en el estado adulto, conservan la capacidad de dividirse y multiplicarse. En lesiones cerebrales se produce la denominada gliosis reactiva, en la que se da un aumento del tamaño y del número de astrocitos. Los astrocitos reactivos tienen más procesos y más filamentos gliales que los ordinarios y desarrollan mayor actividad metabólica. Fruto frecuente de esa reacción es la formación de una cicatriz de glía constituida por tales astrocitos reactivos; los astrocitos reactivos desempeñan un papel restaurador; cuando se produce una lesión en la corteza cerebral tiene lugar, en primer lugar, una proliferación astrocitaria formando un núcleo en el centro de la misma, encerrando el área dañada y aislándola de las leptomeninges. La inflamación subsiguiente produce una activación de la microglía, convirtiéndose en fagocítica.

Los astrocitos pueden liberar varios factores de crecimiento neuronales. Algunos, como el factor de crecimiento nervioso, podrían estimular la neurona entera, desarrollándose incluso el axón. Por otra parte, la laminina, la fibronectina y otros constituyentes de la matriz extracelular pueden promover y acelerar específicamente el crecimiento de los procesos neuronales (193).

6.2.4.- Liberación de factores neurotróficos de células astrogliales.

Las células neuronales reciben distintos tipos de soportes neurotróficos durante su desarrollo y su vida. Muchos de los factores neurotróficos no son solo capaces de producir supervivencia neuronal, sino que también inducen a diferenciación neuronal. De esta manera, algunos cambios en la función de los factores neurotróficos pueden tener influencias significativas en el cerebro en desarrollo. Entre estos factores neurotróficos, el factor de crecimiento nervioso (NGF) ha sido el mejor caracterizado y se ha establecido su papel fisiológico en la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las neuronas colinérgicas cerebrales y, quizá, de otras neuronas del sistema nervioso central.

Las fuentes del NGF en el SNC son las neuronas y las células astrogliales. Se ha demostrado que los astrocitos sintetizan y segregan NGF y que expresan ARNm de NGF, lo que sugiere una síntesis de NGF en el SNC por parte de la glía. Durante periodos de rápida proliferación glial, por ejemplo en la etapa prenatal y primeros estadios postnatales, las células gliales pueden segregar grandes cantidades de NGF, mientras que en el cerebro maduro la síntesis de NGF se ve disminuida a niveles bajos. En el cerebro adulto, el NGF puede expresarse a altos niveles por astrocitos reactivos, presentes tras una injuria cerebral.

La presencia de factores de crecimiento moduladores, que determinan la respuesta glial a la injuria cerebral, puede ser crítica para la supervivencia neuronal. La intervención de estos factores de crecimiento en el momento adecuado en los procesos de regeneración neuronal, puede facilitar el crecimiento de las células gliales e iniciar la secreción de factores neurotróficos específicos a partir de las células gliales activadas. Uno de estos factores moduladores es la interleukina-1, un factor derivado de macrófagos y microglía, que incrementa el contenido de ARNm de NGF en células no neuronales de nervio ciático de rata. Se ha demostrado que la interleukina-1 aumenta la secreción del NGF en cultivos primarios de astrocitos de cerebro y cerebelo (58).

El factor de maduración glial (GMF) estimula la proliferación y diferenciación de los astrocitos en cultivo. Este factor de crecimiento se comporta como un mitógeno o como un factor de maduración, dependiendo del medio ambiente celular. Así, es capaz de activar o suprimir la proliferación celular.

Los factores de crecimiento *insulin-like* (IGF) I y II son péptidos estructuralmente similares a la proinsulina. Ambos y sus receptores se encuentran en el SNC de los mamíferos, tanto en fetos como en adultos. El gen que codifica IGF I se expresa en astrocitos cultivados, indicando que es producido por estas células. La adición de IGF I a astrocitos cultivados estimula su proliferación (235).

6.2.5.- Inmunidad.

Los astrocitos intervienen en las reacciones de inmunidad en el cerebro. La combinación de un antígeno, una proteína extraña y ciertas moléculas endógenas estimulan a otras células, por lo general a los linfocitos T, que reaccionan y destruyen el cuerpo invasor. Parte del repertorio genético de la célula, el llamado Complejo Mayor de Histocompatibilidad, determina las moléculas endógenas que se presentan con el antígeno.

Las moléculas de dicho complejo se presentan en dos formas, la clase I y la clase II. Se ha demostrado que ambos tipos se encuentran en los astrocitos, dotándoles de las funciones que se asignan a las células presentadoras de antígenos (193).

6.2.6.- Intercambio de metabolitos entre neuronas y glía.

A los astrocitos se les reconoce un papel decisivo en el metabolismo del glutamato y del ácido gamma-aminobutírico (GABA), importantes neurotransmisores de tipo excitador e inhibitor, respectivamente. Para que la red neuronal funcione debidamente hay que eliminar esos transmisores, una vez se hayan vertido al espacio sináptico. La enzima glutamina sintetasa parece tener una localización predominantemente glial, lo que significa que la glutamina se sintetiza en la glía. La enzima glutaminasa se encuentra principalmente en las neuronas. Por lo tanto, es muy probable que exista un ciclo de movimiento de glutamato entre las neuronas y la glía. Los astrocitos captan GABA y glutamato y los

transforman en glutamina. Una vez sintetizada, la glutamina llega a las neuronas, donde se convierte en el precursor principal del GABA y del glutamato. Estas reacciones consumen amoníaco (NH_4^+) y, por lo tanto, sirven para mantener los niveles bajos de esa sustancia tóxica en el tejido cerebral (Fig. 7) (178).

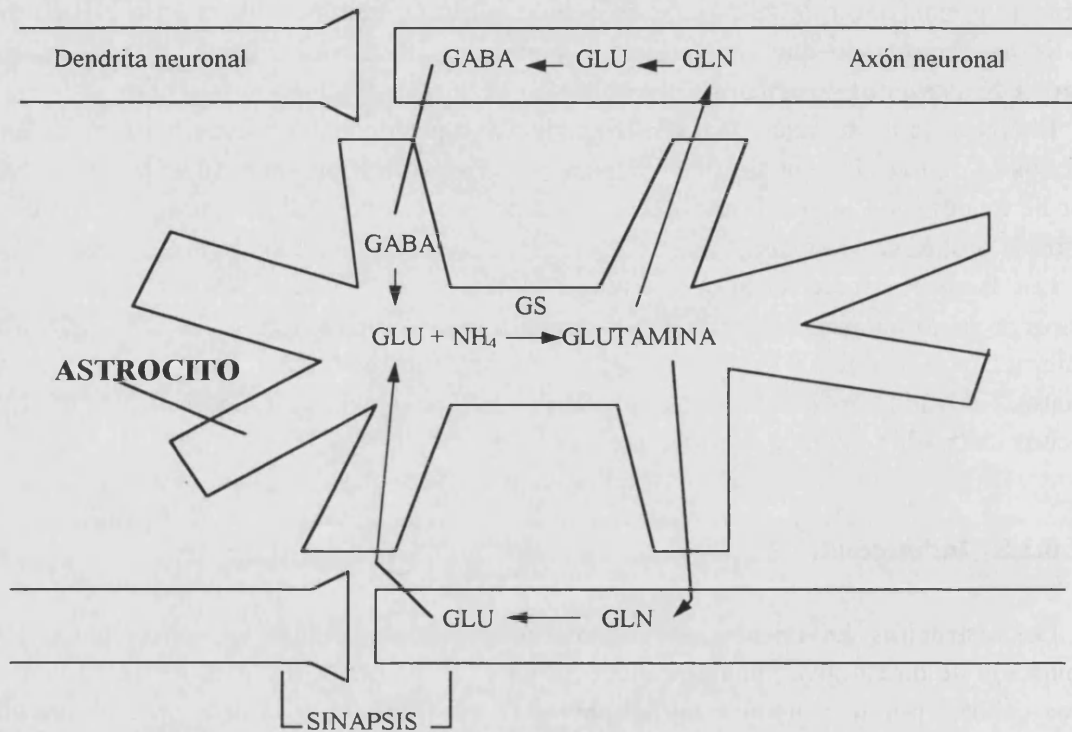


Fig. 7. Intercambio GABA-glutamato entre neurona-astrocito.

6.2.7.- Receptores de glutamato en neuronas y astrocitos.

El glutamato es el aminoácido transmisor excitador más extensamente distribuido de la corteza cerebral. Los receptores de glutamato se encuentran en el hipocampo, la corteza frontal y las regiones asociadas con las funciones sensoriales.

Los receptores de glutamato pueden ser catalogados dentro de dos distintos grupos denominados receptores ionotrópicos (iGluR) y receptores metabotrópicos (mGluR) (276). Parece que los receptores ionotrópicos abren canales iónicos y se les ha dado el nombre del agonista por el que son selectivamente activados: α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-ácido propionico (AMPA), Kainato, y N-metil-D-aspartato (NMDA). Han sido caracterizados también antagonistas selectivos. Los receptores AMPA y Kainato son estimulados por el glutamato y causan despolarización de los astrocitos mediante la apertura

de canales de membrana permeables a iones Na^+ y K^+ , exhibiendo diferente permeabilidad para el Ca^{2+} . El influjo de Ca^{2+} inducido por el kainato parece estar influido por receptores-canal de kainato y no por la activación de canales sensibles al voltaje. Estudios de cortes de cerebro y cultivos primarios de neuronas y glía sugieren que éstas células comparten los mismos tipos de iGluRs (406).

Los mGluRs son diferentes funcional y farmacológicamente de los iGluRs. Los mGluR están acoplados a proteínas G y provocan una variedad de funciones mediante transducción de señales intracelulares (tabla V). Uno de los agonistas de mGluR, el ácido trans-1-amino ciclopentano-1,3-dicarboxílico (1S,3R-ACPD), modifica el metabolismo del fosfato de inositol y la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (269). Sin embargo, estudios recientes sugieren que muchas respuestas fisiológicas a ACPD están influenciadas por otros subtipos de mGluR que son distintos farmacológicamente de los que hidrolizan IP. Experimentos de clonaje revelan que al menos existen siete subtipos: mGluR1-mGluR7 (2,270,290,303,314,362,378,403).

Tabla V: Receptores de glutamato metabotrópicos^a.

	Receptores	Referencias
Ionotrópicos	NMDA	
	AMPA	406
	Kainato	
Metabotrópicos	mGluR1 α	↑ IP ↑ cAMP ↑ AA 403, 314
	mGluR1 β	↑ IP
	mGluR1c	↑ IP
	mGluR2	↓ cAMP 403
	mGluR3	↓ cAMP 403
	mGluR4a	↓ cAMP 403
	mGluR4b	↓ cAMP 378
	mGluR5a	↑ IP 2
	mGluR5b	↑ IP 270
	mGluR6	↓ cAMP 290
mGluR7	↓ cAMP 303, 362	

^aMetabolismo del fosfato de inositol (IP); ácido araquidónico (AA).

El mGluR1 está principalmente acoplado a una señal de transducción de hidrólisis de fosfato de inositol y Ca^{2+} (314,403), mientras que mGluR2-4 y mGluR6 están unidos a otras cascadas de señales (290,378,403). mGluR4a es potencialmente activado por el ácido L-1-amino-4-fosfonobutanoico (L-AP4), lo cual sugiere que el receptor mGluR4a es un posible candidato para L-AP4 (378). mGluR5a,b ha sido recientemente clonado y está acoplado a

la estimulación de la transducción de señales de hidrólisis de PI/Ca²⁺ pero es diferente de mGluR1 (2,270). La estimulación del receptor mGluR7 conduce a una inhibición de la formación de AMP cíclico (303,362).

Se ha demostrado que la estimulación de los mGluRs produce señalización a largo plazo en el sincitio astrogliial (64). Los segundos mensajeros generados dentro de una célula (IP₃ o Ca²⁺) pueden ejercer influencias sobre las células vecinas o bien entrar en ellas a través de uniones de fisura intercelulares (*gap junctions*) permeables a segundos mensajeros. La señalización intercelular de Ca²⁺ ocurre a través de las uniones de fisura y puede proporcionar medios para la regulación coordinada de la función celular, incluyendo crecimiento celular y diferenciación. A través de estudios en cultivos se vio que este proceso era bastante lento. Así, se ha estimado que la acumulación de Ca²⁺ intercelular se produce a una velocidad de 15 μm/s (64). Esta tasa de propagación es extremadamente pequeña comparada con la transmisión sináptica y los potenciales de acción. Este modo de señalización no puede ser relevante para las rápidas acciones fisiológicas, sino que más bien podría representar un sistema extraneuronal para el procesamiento de la información (383) afectando, por ejemplo, a estados de excitabilidad o suplemento de energía en varias regiones cerebrales. De hecho, los segundos mensajeros generados por activación de receptores metabotrópicos deben estar implicados en vías glucogenolíticas (Fig. 8).

El incremento mediado por el glutamato del Ca²⁺ interno parece activar la fosfolipasa A₂ neuronal, produciendo liberación de ácido araquidónico. Esto es de considerable interés, ya que se ha demostrado que el ácido araquidónico regula un número de conductancias iónicas, bien directamente o después de metabolizarse a uno o más eucosanoides (199,389).

Actualmente existen evidencias de que el ácido araquidónico interviene en el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP) (212). El mantenimiento de LTP parece implicar cambios en ambos lugares de la sinapsis, mientras que la inducción de LTP parece implicar eventos postsinápticos tales como activación del receptor NMDA y entrada de Ca²⁺ en las neuronas.

En el terminal presináptico se produce aumento en la liberación de Glu, provocando un incremento en la sensibilidad del receptor de Glu de los terminales postsinápticos. El ácido araquidónico producido en la glía y liberado por estimulación de Glu puede conducir a incrementar la concentración de Glu en el espacio sináptico por inhibición de la captación de Glu glial y, por lo tanto, la astrogliá podría formar parte de la regulación de la inducción de LTP y especialmente de su mantenimiento. Se sabe que el ácido araquidónico se acumula en el cerebro en condiciones patológicas, tales como en la isquemia. (376). La alta sensibilidad de los sistemas de transporte de Glu para el ácido araquidónico está relacionada con la inhibición de la captación, siendo un mecanismo modulador relevante en la sinapsis de Glu. Una reducción de la captación de Glu por las terminales presinápticas podría desembocar en un incremento de la disponibilidad del transmisor para activar receptores postsinápticos.

Es probable que el ácido araquidónico afecte a la captación de Glu, tanto la realizada por los astrocitos como por las neuronas perisinápticas, conduciendo a una acumulación de glutamato en el espacio extracelular.

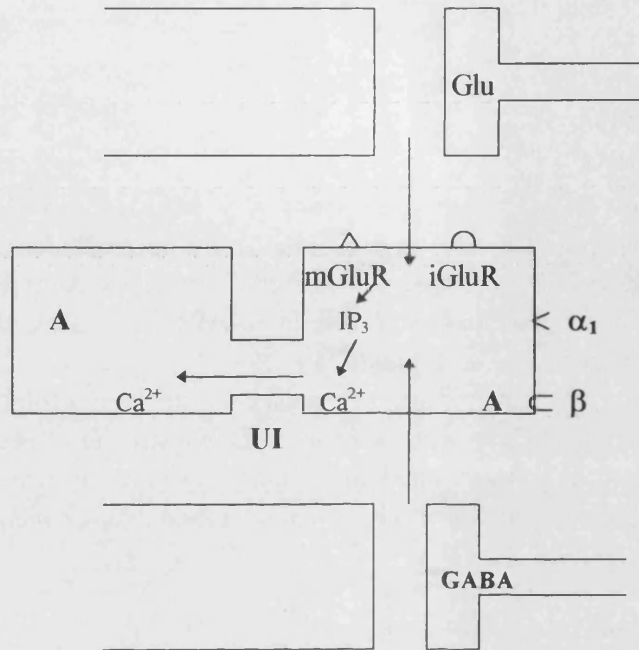


Fig. 8. (A) Esquema de los receptores de glutamato en astrocitos. (UI) Uniones intercelulares. Procesos astrocíticos extendidos hacia las sinapsis glutamatérgica y GABAérgica. Los astrocitos poseen receptores de membrana para receptores de Glu ionotrópico (α_1 , β) y metabotrópicos (iGluR, mGluR). Los transportadores de captación de Glu y GABA gliales se muestran con flechas dentro de A. La estimulación del receptor α_1 incrementa la captación de Glu glial; la estimulación del receptor β disminuye la captación de Glu glial. Se indica un receptor metabotrópico de Glu que induce el inositol fosfato (IP_3) y señalización mediada por Ca^{2+} dentro del astrocito. La estimulación de los receptores por Glu regula el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana celular astroglial al interior de la célula.

7.- EL CITOESQUELETO.

El tejido conectivo extracelular que da estructura a otros tejidos, no está presente en el sistema nervioso. El SNC, aunque está revestido de tejido conectivo, no presenta matriz extracelular. La arquitectura del sistema nervioso está basada en esqueletos fibrosos intracelulares que dan resistencia mecánica a las prolongaciones celulares de neuronas y glía. El citoesqueleto es la red filamentosa de estructura proteica, que surca la matriz citoplásmica de las células eucariotas. Esta compleja red está formada por las proteínas de los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. La complejidad y variedad de funciones que posee el sistema nervioso puede deberse a su importante arquitectura. Las

neuronas y las células gliales extienden sus procesos a largas distancias, con el fin de realizar contactos específicos con otras células (204).

7.1.- Microtúbulos.

Los microtúbulos son estructuras muy abundantes en neuronas y glía. Están formados por dos cadenas polipeptídicas, de una masa molar de aproximadamente 50 kDa, que forman las dos subunidades α y β que constituyen la tubulina. Además de tubulina, los microtúbulos poseen otras proteínas asociadas, las MAPs y una serie de polipéptidos de menor masa que se denominan en su conjunto tau (255).

Los microtúbulos participan en la determinación de la morfología celular, dando estabilidad mecánica. También intervienen en la mitosis, puesto que se encuentran formando parte del huso mitótico. Intervienen en algunos tipos de secreción, procesos de motilidad celular y en procesos de transporte intracelular, como el flujo axoplásmico (21).

7.2.- Microfilamentos.

Los microfilamentos formados por actina, de 6-8 nm de diámetro, son elementos del citoesqueleto presentes en células neuroepiteliales, gliales y neuronas. Determinan, junto con otros elementos del citoesqueleto, la forma y el movimiento celular.

Los filamentos de actina están dispuestos en forma de haces, por medio de proteínas que forman puentes entre ellos. Estos filamentos pueden contactar con la membrana plasmática en puntos determinados, donde se encuentran anclados por al menos cuatro proteínas de unión a proteínas transmembrana (28).

7.3.- Filamentos Intermedios (FI).

Los filamentos intermedios han sido reconocidos como una superfamilia de fibras 10 nm ubicuas en los eucariotas multicelulares. Su nombre viene de su tamaño intermedio entre filamentos de actina (6 nm) y microtúbulos (23 nm). En contraste con la actina y la tubulina, que se encuentran altamente conservadas evolutivamente, solo presentan un 20% de secuencia idéntica.

Inicialmente, los polipéptidos que ensamblan los FI se agruparon en cinco categorías: queratinas, desmina, vimentina, proteínas de neurofilamento (FN) y proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (205).

Actualmente, las proteínas de los FI se agrupan en relación a la homología entre sus dominios α -helicoidal.

Tipo I y Tipo II: las queratinas, con dos distintos ARN mensajeros y genes. Son los responsables de la formación de los filamentos intermedios de las células epiteliales.

Tipo III: Vimentina, desmina, GFAP, y periferina.

Tipo IV: Neurofilamentos. En el tejido nervioso.

Tipo V: Láminas. En el núcleo celular.

Tipo VI: Nestina. En las células embrionarias neuronales de la cresta neural.

Los filamentos intermedios están formados por tres regiones distintas: una región-cabeza amino-terminal, una región central y una región-cola carboxi-terminal (Fig. 9). Las regiones centrales están altamente conservadas dentro de las proteínas de FI, mientras que el tamaño y las secuencias de aminoácidos de las regiones de la cabeza y la cola varían.

El dominio central está subdividido en segmentos α -helicoidales, que poseen una estructura en héptada de la forma (a-b-c-d-e-f-g)_n, en la que más del 75% de los residuos a y d son apolares, mientras que las posiciones b, c, e, f y g son frecuentemente residuos polares o cargados.

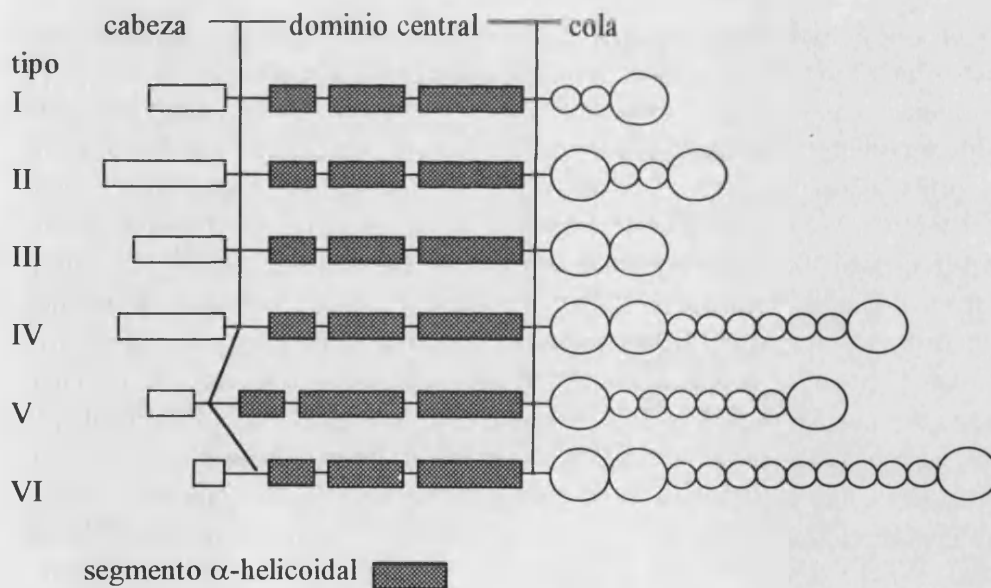


Fig. 9. Esquema de las estructuras de las proteínas de filamentos intermedios. La figura muestra las diferencias entre cabeza, dominio central y cola de los diferentes tipos.

7.4.- Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP).

7.4.1.- Estructura de la GFAP.

La proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) es una proteína de los filamentos intermedios que se expresa específicamente en la astrogía (205). La GFAP, junto con la vimentina y la desmina, está clasificada como un tipo III de proteína de FI. Posee unos 50 kDa y está compuesta de regiones distintas, como en los otros casos de FI. La fosforilación y desfosforilación de residuos de aminoácidos específicos en la región de la cabeza están implicadas en la regulación del ensamblaje de esta proteína. La región del dominio central está compuesta de 345 residuos de aminoácidos, conteniendo repeticiones en tándem de siete secuencias de aminoácidos llamadas repeticiones de héptada. Esta región es esencial para el empaquetamiento. La región de la cola es de alrededor de 50 residuos de aminoácidos, tiene una estructura globular y podría estar envuelta en las interacciones entre FI de otras proteínas.

7.4.2.- Organización y dinámica de los filamentos de GFAP.

Bajo condiciones fisiológicas la mayoría de las proteínas de GFAP se unen para formar filamentos de 10 nm *in vitro*. Para su organización, los filamentos de GFAP de 10 nm siguen los siguientes pasos (Fig. 2): Primero, dos moléculas de GFAP se agrupan para formar una estructura dímera espiral enrollada con α -hélices en paralelo; luego, dos dímeros forman un protofilamento paralelo compuesto así por un tetrámero. Este acoplamiento antiparalelo del tetrámero caracteriza la estructura no polar de la GFAP. Finalmente, los protofilamentos se ensamblan para constituir estructuras filamentosas de 10 nm (390). Estudios de reconstitución *in vitro* revelan que el ensamblaje y la morfología de filamentos de GFAP están afectados por varios factores físicos, tales como la concentración de GFAP, el pH, los cationes bivalentes, los aminoácidos, la fuerza iónica y la temperatura. El rango de pH adecuado para una formación *in vitro* de filamentos de 10 nm es de alrededor de pH 7. A pH menor, las moléculas de GFAP forman filamentos en forma de cinta, de más de 10 nm. Los cationes bivalentes tales como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} aceleran el ensamblaje de la GFAP. Sin embargo, a concentraciones altas, éstos inducen la formación de filamentos de GFAP en cinta (289).

Aunque muchas proteínas de FIs están en estado polimerizado con pocos tetrámeros libres, estudios recientes, usando subunidades marcadas fluorescentemente o biotiniladas de FIs, revelan que las moléculas de FIs, incluyendo la GFAP, cambian dinámicamente entre estado ensamblado y estado desensamblado. La GFAP tiene un residuo de cisteína único, que puede ser estequiométricamente marcado y es posible monitorizar el grado de ensamblaje en tiempo real. Así, las moléculas de GFAP presentan cambios dinámicos entre las dos fases (Fig. 10).

7.4.3.- Copolimerización de GFAP con vimentina.

Además de la GFAP, la astrogliá también expresa vimentina. Ésta es otro tipo de proteína de FI (115). Un contenido alto de vimentina se observa en astrocitos inmaduros (396), astrocitos reactivos (54), glía radial (340) y diversas líneas celulares gliales. Diferentes estudios revelan que la vimentina y la GFAP coexisten en los mismos filamentos y pueden formar copolímeros (1).

7.4.4.- Regulación del ensamblaje de la GFAP por fosforilación.

Es importante mantener intacta la estructura de los filamentos intermedios en las células, incluso después de la reorganización dinámica durante la mitosis, la diferenciación, locomoción y en los procesos patológicos. Se ha visto que la fosforilación y desfosforilación de las regiones de la cabeza de los FI tienen un papel crítico para el mantenimiento y reconstrucción de los FIs. Cuando los residuos de aminoácidos de la cabeza son fosforilados, los filamentos de la GFAP se desensamblan en una forma soluble (Fig. 10) (168,169). La región de la cabeza de la GFAP se encuentra positivamente cargada debido a la presencia de gran cantidad de residuos de arginina. Esta carga positiva puede ser importante para el ensamblaje de la proteína. Cuando la región de la cabeza es eliminada de la GFAP por digestión, las moléculas de GFAP no pueden ensamblarse bajo condiciones de pH neutro. Además, la pérdida de los residuos de arginina conduce al desensamblaje de los filamentos de GFAP. Así, el mecanismo de regulación del ensamblaje de la GFAP puede estar relacionado con la regulación de la carga eléctrica en el dominio de la cabeza por fosforilación.

En la GFAP, cuatro serinas (Ser-8, Ser-13, Ser-17 y Ser-34) y una treonina (Thr-7) son fosforiladas por diferentes proteína Quinasas: proteína quinasa dependiente de AMP-cíclico (Quinasa A), quinasa II dependiente de Ca^{2+} calmodulina (CaM quinasa II) y quinasa C. La quinasa A fosforila los residuos Thr-7, Ser-8, Ser-13 y Ser-34 de la región de la cabeza. La CaM quinasa II fosforila Ser-13, Ser-17, Ser-34 y Ser-389. La astrogliá expresa receptores para varios neurotransmisores, y la quinasa A, la quinasa C y la CaM quinasa II están localizadas al final de las vías de transducción de señales. Por lo tanto, esas quinasas podrían desempeñar un importante papel en la modulación de la estructura de la GFAP en la astrogliá en respuesta a neurotransmisores. La elevación de las concentraciones de AMP cíclico en cultivo de astrocitos produce cambios morfológicos marcados, acompañados de una reconstrucción de las redes de los filamentos de GFAP (169).

La GFAP fosforilada puede, potencialmente, ser desfosforilada y reincorporada dentro de las redes de FI. La microinyección de GFAP fosforilada dentro de células con redes de vimentina, revela que puede desfosforilarse rápidamente e incorporarse dentro de los filamentos de vimentina. Esas observaciones implican que el ensamblaje y desensamblaje de la GFAP está también regulado por la desfosforilación con fosfatasas (Fig. 10).

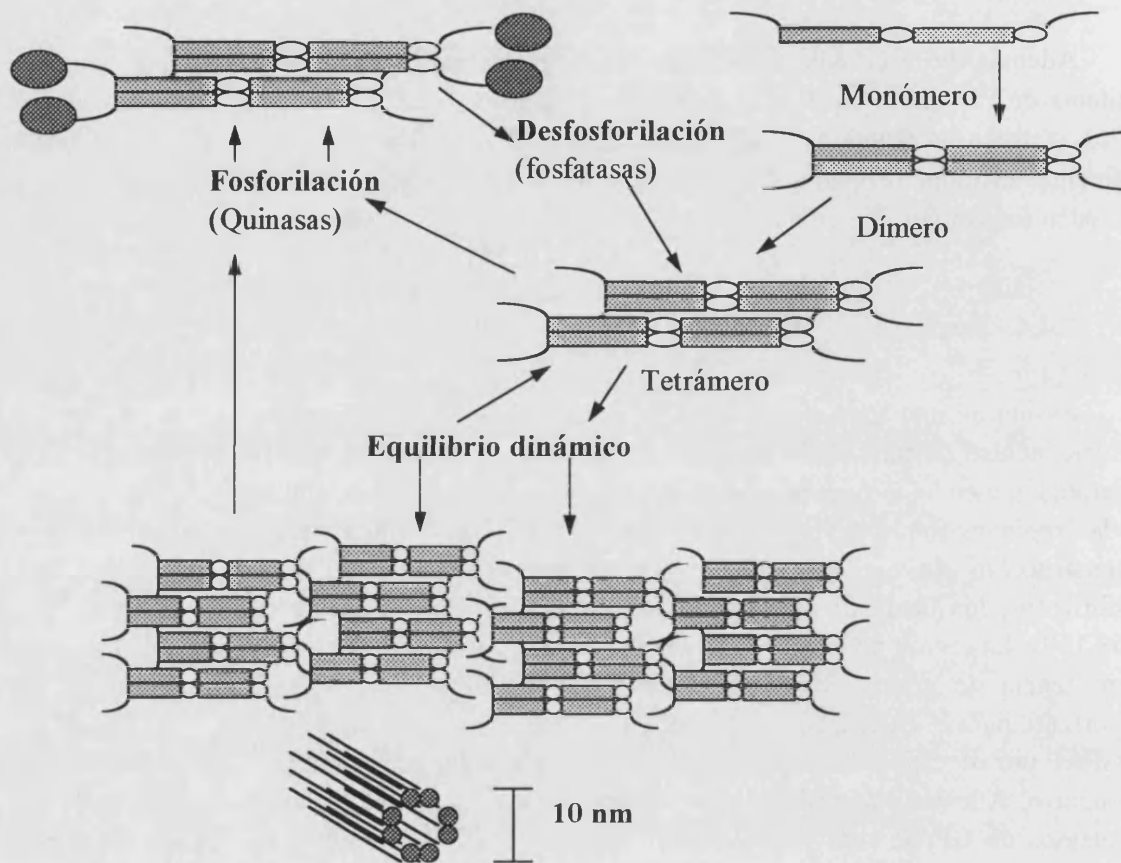


Fig. 10. Esquema de la organización, dinámica y regulación del ensamblaje de la GFAP.

7.4.5.- El gen de la GFAP.

Los estudios moleculares del gen de la GFAP comenzaron en 1984, cuando fue aislado el primer clon de GFAP por el laboratorio de *Nicholas Cowan* (215). Este grupo obtuvo un clon ADNc completo de la GFAP de ratón. Los clones genómicos enteros para el ratón y el humano se han secuenciado y muestran estructuras muy similares. Los intrones interrumpen la secuencia genómica en posiciones idénticas en ambos genes y son de similar tamaño, aunque difieren considerablemente en la secuencia.

Todas las evidencias indican que el gen de la GFAP está presente en una única copia, tanto en el genoma de ratón como en el humano. El gen humano está localizado en el cromosoma 17 y el de ratón en el cromosoma 11. Un gran número de genes asociados con desórdenes neurológicos están localizados en la misma región que el gen de la GFAP, tanto en humanos como en el ratón.

La secuencia entera del gen de la GFAP tiene un total de 9.8 kb. y contiene nueve exones separados por intrones en la posición 139,159,191,245,287,361,376 y 404. El tamaño de los intrones oscila entre 0.2 y 2.5 kb y todas las uniones intrón-exón poseen los dinucleótidos señal de empalme consenso GT y AG.

7.4.6.- La región que codifica la proteína.

El lugar de inicio para la transcripción de los ARNm ha sido determinado en ratón, rata y humano. El ADN genómico del ratón contiene una secuencia AATAAA en una posición y en un contexto análogo al de rata, humano y al ADNc aislado por *Lewis et al.* (215). También tienen su 3' final justo corriente arriba de ese lugar. El punto de inicio de la traducción de la GFAP ha sido asignado a un codón AUG metionina localizado justo unos 15 nucleótidos (nt) antes del 5' final de los ARNm de ratón, rata y humano. Cada uno de esos puntos poseen todos los criterios para ser *inicio de la traducción*; así el cebador AUG en el ARNm contiene un iniciador fuerte, y en su cabeza hay una pauta abierta de lectura que produce una proteína del tamaño y estructura esperado para la GFAP (23).

7.4.7.- Formas alternativas del ARNm de la GFAP.

Recientemente se han descrito formas alternativas para el ARNm de la GFAP tanto en el SNC como en otros tejidos. El primero fue encontrado en las células de Schwann y se le denominó ARNm GFAP- β , mientras a la forma estándar se le llamó forma ARNm GFAP- α . Esta nueva forma se inicia unos 170 nt antes del ARNm GFAP- α . La regulación transcripcional de las formas GFAP- α y GFAP- β podrían ser diferentes ya que el inicio de su transcripción se realiza en distintos lugares en el ADN.

El ARNm GFAP- β , además de expresarse en el sistema nervioso periférico (SNP), también se expresa en el SNC, donde constituye el 5% del total ARNm.

Otra forma alternativa del ARNm de la GFAP es la forma ARNm GFAP- γ , que ha sido encontrada en el SNC y en otros sistemas. Este tiene un tamaño de unos 2.4 kb, que corresponde a unos 300 pb menos que la forma α . Todos los resultados sugieren que la forma γ es idéntica a la forma α , excepto que el primer exón ha sido reemplazado por 126 nt en la posición 3' terminal del intrón 1 (46).

7.4.8.- Regulación transcripcional de la GFAP.

Las células de los organismos superiores reaccionan de forma diversa según los estímulos que reciben. Unos estímulos vienen de fuera de la célula y otros proceden del interior de la misma. En el primer caso hablamos de estímulos externos o ambientales, de los que son ejemplos las hormonas y factores de crecimiento. En el segundo caso nos

hallamos ante estímulos internos, que instan, entre otros, a procesos de desarrollo y diferenciación celular.

La adaptación de la célula ante la nueva situación implica la modulación, esto es, la activación de los genes relacionados con la respuesta desencadenada. Esta regulación diferencial de genes en respuesta a los estímulos se produce, en la mayoría de los casos, a través del control de la transcripción. La transcripción es el proceso en virtud del cual la información contenida en la estructura del ADN se transmite hacia productos de ARN.

Dentro de cada molécula de ADN existe un punto donde se inicia la transcripción; se realiza ésta mediante la activación de la enzima ARN polimerasa II (ARN pol II). Para que un gen se active, se necesita la interacción entre factores de transcripción y secuencias reguladoras de ADN. (Los factores de transcripción son proteínas nucleares.) Las secuencias reguladoras se sitúan delante mismo del sitio de iniciación de la transcripción, en el segmento promotor. Aunque no siempre se localizan en las proximidades del sitio de iniciación: las llamadas secuencias multiplicadoras o amplificadoras quedan a gran distancia.

Cada gen tiene una combinación particular de elementos de respuesta positivos y negativos, que hacen que su expresión esté controlada de una forma muy compleja. La transcripción de la mayoría de los genes requiere la presencia de un conjunto de proteínas necesarias para dirigir la ARN pol II hacia el sitio de iniciación correcto. Estas proteínas son factores de transcripción auxiliares que se asocian y se disocian en el momento de iniciación, formando el complejo transcripcional. La eficacia relativa de formación de este complejo y su estabilidad depende de la presencia o ausencia de una secuencia de nucleótidos formados por TATA (normalmente) y que reciben el nombre de caja TATA. El principal componente del complejo transcripcional es el factor de transcripción TFIID que se une a la caja TATA. En el promotor de la GFAP, la secuencia TATA (CATAAAA) está localizada unos 29 pares de bases (pb.) del inicio del ARN y es requerida para la activación de la transcripción. Estudios de *footprinting* indican que se requiere la región promotora situada después del lugar de inicio del ARN para una unión estable del factor de transcripción TFIID a la caja TATA. La señal de poliadenilación AATAAA se encuentra aproximadamente 1.4 kb corriente abajo del codón de terminación TGA. Así, la región 3' no traducida del ARNm de la GFAP es comparativamente más larga que la porción que codifica el ARNm (aproximadamente 1.2 kb), que está formado por unos 200 nucleótidos (23,46).

La región promotora del gen de la GFAP contiene estructuras típicas de un gran número de genes eucarióticos. Mientras la secuencia TATA está ausente, la secuencia ATA se encuentra 35 pares de bases corriente arriba del lugar de inicio de la transcripción y la secuencia consenso CAAT está localizada 85 pares de bases 5' al lugar de inicio.

Un hecho particular importante en la secuencia del gen de la GFAP es el gran número de elementos repetidos que aparecen en los intrones. Cada uno de esos elementos consta, bien enteramente o en parte, de fragmentos repetidos de di- o trinucleótidos.

Los distintos factores de transcripción que regulan la expresión de la GFAP todavía no se conocen y queda mucho camino por recorrer.

Desde hace unos años se tienen evidencias claras de la participación del lugar AP-1, que está perfectamente conservado en los genes de rata, ratón y humano. La secuencia AP-1 se descubrió originalmente como el lugar de unión para la Proteína-1 activadora, un heterodímero formado por los factores de transcripción de los proto-oncogén c-jun y c-fos. Estos factores se incluyen como las primeras proteínas inducidas por muchos estímulos e intervienen en algunos de los cambios de la regulación génica inducida por hormonas, factores de crecimiento, y antígenos. La naturaleza esencial de este lugar para la transcripción de la GFAP se ha demostrado usando mutaciones puntuales en esta zona (46).

8.- La metilación del ADN.

El descubrimiento de que la 5-metilcitosina podía afectar seriamente la interacción entre proteínas y ADN, junto con el hecho conocido de que la 5-metilcitosina constituye un componente común en el ADN de los vertebrados, plantas y muchos otros organismos superiores, sugirió que la presencia de 5-metilcitosina podría condicionar la actividad génica de los eucariotas y, así, participar quizá como una señal que facilitase la activación o la inhibición de los genes.

En los mamíferos, el 90% de las 5-metilcitosinas se encuentran en la forma CG y en un 50-70% están metilados, dependiendo de la especie y el tejido considerado (331).

Las 5-metilcitosinas se localizan más frecuentemente en secuencias altamente repetitivas que en secuencias medias o únicas (331). Además, la extensión y el patrón de la metilación en el genoma de vertebrados es específico de especie y de tejido (59), hereditario y reversible.

Las C se modifican después de la replicación del ADN mediante metilasas que transfieren un grupo CH_3 desde la S-Adenosil-Metionina hasta el carbono 5 del anillo pirimidínico.

La enzima metilasa de mantenimiento actúa solo en los fragmentos de ADN hemimetilados, entendiéndose por tales aquéllos en que una sola de las dos cadenas tiene metilado el doblete de citosina-guanina. Al duplicarse el ADN completamente metilado, se originará ADN hemimetilado, de cuya metilación inmediata se ocupa la enzima metilasa de mantenimiento. Por el contrario, la descendencia del ADN sin metilar permanecerá así, ya que la metilasa de mantenimiento no podrá actuar sobre él. En consecuencia, se conservará una señal de metilación previa durante la división celular. Ocurrirá lo mismo con el ADN no metilado y no habrá regiones permanentemente hemimetiladas. Con estas reglas se recompondrá en las células hijas el patrón de metilación o no metilación del ADN de una célula parental.

Otra enzima, la metilasa *de novo*, actúa sobre sitios no metilados. Existen evidencias de la actuación de este tipo de metilasas, sobre todo en el desarrollo embrionario temprano (163).

La metilación de las C puede afectar a la conformación del ADN y a su topología. Es una cuestión interesante y significativa estudiar si la metilación del ADN en sitios altamente

específicos afecta a las funciones biológicas esenciales directamente o bien por cambios estructurales que se producen por la metilación. El ADN puede adoptar muchas conformaciones diferentes dependiendo de las condiciones, por ejemplo las familias de hélices A, B y Z. En condiciones de alta concentración salina, las regiones del ADN que alternan bases púricas y pirimidínicas adoptan una conformación levógira, denominada ADN Z. La forma metilada de dúplex que alternan C y G origina formas Z del ADN a una concentración salina mucho más baja, que se aproxima a las condiciones fisiológicas.

La existencia de proteínas que se unen específicamente al ADN en su forma Z sugiere que el mantenimiento de esta conformación puede ser importante intracelularmente y por eso se puede inferir un posible mecanismo de acción de la metilación del ADN.

8.1.- Metilación o desmetilación y actividad génica.

El mantenimiento de los patrones de metilación del ADN a través de muchas generaciones de células no explica la manera en que los genes pueden activarse y desactivarse durante el desarrollo; es decir, no explica cómo se cambia el patrón de uniones a proteínas para que ciertas células adquieran una especialización mayor que sus progenitoras (59,163).

Solo una minoría de los dobletes de citosina-guanina del ADN están implicados en los mecanismos de cambios de actividad génica; el ADN contiene demasiados dobletes metilados como para que todos cumplan una misión reguladora. Los dobletes importantes en dichos procesos se alojan en secuencias de bases más largas, reconocibles por proteínas reguladoras específicas para determinados genes; por sí solos, los dobletes ubicuos no confieren esa especificidad.

Los cambios de actividad génica se producen cuando una enzima distinta de la metilasa de mantenimiento reconoce una secuencia específica de bases en una de las cadenas de ADN de un cromosoma y coloca un grupo metilo en un doblete de citosina-guanina de esa secuencia. Esta acción obliga a la enzima metilasa de mantenimiento a metilar inmediatamente la cadena complementaria. De esta forma, las futuras generaciones del mismo cromosoma estarán metiladas en el mismo sitio, a pesar de que los grupos metilo no estén unidos al gen en un principio.

En otros casos, una enzima específica de secuencia puede eliminar un grupo metilo de un sitio concreto, antes de que acontezca la división celular. En ausencia de la señal de metilación, la enzima metilasa de mantenimiento no metilará el sitio opuesto en la cadena complementaria recién sintetizada, y el gen originalmente metilado dejará entonces de estarlo. Un caso distinto es el de una proteína específica de secuencia que bloquea la metilación de mantenimiento, uniéndose al punto del segmento de ADN recién replicado donde debe normalmente colocar un grupo metilo (la metilasa de mantenimiento). En estas últimas condiciones, cuando se replique el ADN hemimetilado, la cadena que carezca de grupo metilo originará otra cadena sin metilar, quedando así eliminada la señal de metilación del cromosoma afectado.

Este mecanismo singular de cambio puede muy bien estar implicado en la segregación de actividades génicas: proceso mediante el cual una célula se divide y origina una célula hija igual a ella y otra que va a seguir cierta ruta de diferenciación (Fig. 11). La segregación se puede producir en células progenitoras (*stem cells*) de organismos en fase de desarrollo y adultos, por ejemplo las células de la médula ósea que producen diversos tipos de glóbulos rojos y leucocitos. Estos fenómenos de segregación ocurren también en etapas bastante tempranas del desarrollo. Esos cambios de actividad génica podrán asimismo obedecer a cambios de metilación, aunque no necesariamente se seguirán los mismos mecanismos que operan en la células madre.

Aunque se ha hablado de los mecanismos de cambio y herencia como si estuviesen únicamente controlados por factores internos de las células individuales, se sabe que hay agrupaciones celulares de un embrión que sufren cambios coordinados en respuesta a señales extracelulares (inductores y morfógenos) emitidas por otras células. Las señales son recibidas en la membrana celular y transmitidas al núcleo, dando lugar a la transcripción de genes específicos. La metilación podría participar en este proceso. Así, la señal recibida en la membrana celular puede alterar el estado de metilación de las secuencias reguladoras de genes particulares en un grupo de células diana. Una vez realizado el cambio de metilación, será heredado por las siguientes generaciones celulares.

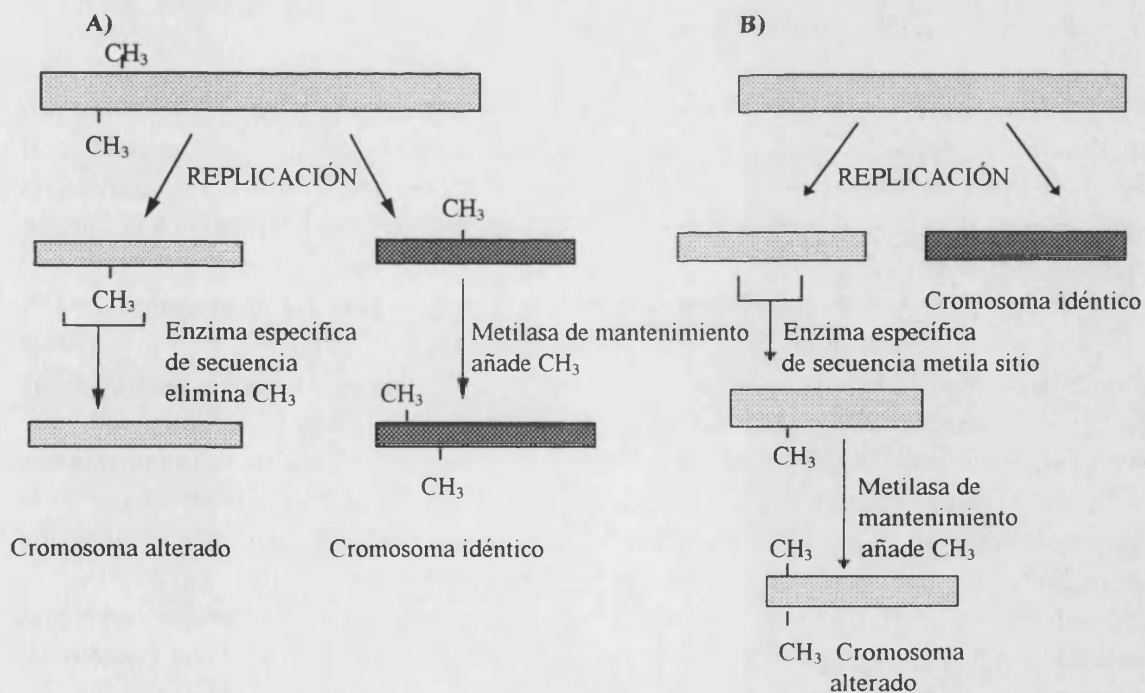


Fig. 11. Cambio genético que permite a una célula precursora dar origen a dos células hijas, una igual a ella y otra con un patrón distinto de actividad génica. El cambio puede realizarse de varias maneras. Por ejemplo, una enzima puede eliminar un grupo metilo de una secuencia específica de bases de un gen recién replicado; esto determinará que el gen se herede en su forma no metilada (A). También, la unión

específica de una proteína puede impedir la metilación de la nueva cadena (no se muestra). Asimismo, una enzima específica puede añadir un grupo metilo a un gen sin metilar (B), que ahora se heredará de esta forma.

En muchos estudios se ha correlacionado la activación génica con la ausencia de metilación del ADN en sitios específicos, normalmente en la región reguladora del gen o en su vecindad. Resulta sorprendente que dicha correlación no constituya un efecto débil o relativo, sino una asociación del tipo todo o nada. La presencia de los grupos metilo no parece estar asociada con una disminución en la expresión génica, sino, casi siempre, con la total inactivación. Al contrario, las alteraciones en la secuencia de bases de las regiones promotoras, donde se inicia la transcripción, poseen, con frecuencia, un efecto modulador; dando a entender de nuevo que la señal de metilación es el regulador más específico de la función génica (Fig. 11).

La desmetilación parece darse fuera de los periodos de replicación de ADN, lo que indica de manera tajante que el proceso no es un mero subproducto de la replicación, sino que está controlado por proteínas que solo funcionan en tipos celulares específicos. La presencia de dicho proceso activo, específico de tejido, sugiere que la desmetilación no es una reacción casual, sino que encierra un propósito definido: la activación génica selectiva.

8.2.- Metilación, envejecimiento y cáncer.

Si el carácter heredable de los patrones de metilación importa para el funcionamiento a largo plazo de los tejidos, la pérdida gradual de grupos metilo puede contribuir al envejecimiento. Se ha postulado que la pérdida de metilación podría provocar un estado de activación no deseable en genes silenciados y, por consiguiente, una alteración en la función celular y la muerte de las células.

Actualmente hay un considerable interés en el papel que juega la metilación del ADN (5-metilcitosina) tanto en el desarrollo normal como en la carcinogénesis. En procesos tumorales se han observado cambios importantes en la metilación de ciertos genes, lo que ha llevado a postular diferentes hipótesis. *Goodman* y sus colaboradores han postulado que la hipometilación del ADN facilita la expresión de genes aberrantes en la tumorigénesis (66); otros autores indican que una hipermetilación del ADN conduce a la alteración en la génesis de tumores, que implica inactivación de genes supresores de tumores y señalización de regiones cromosómicas para la delección (156) (Fig. 12).

Por otra parte también se ha postulado que la hipermetilación de regiones específicas del ADN también podría participar en la transformación de células normales en cancerosas. Algunos investigadores han demostrado que hay asociaciones entre regiones cromosómicas hipermetiladas y áreas que contienen genes supresores de tumores. De esta forma, regiones hipermetiladas podrían inhibir la transcripción de ciertos genes supresores de tumores, favoreciendo la aparición de ciertos tipos de cáncer.

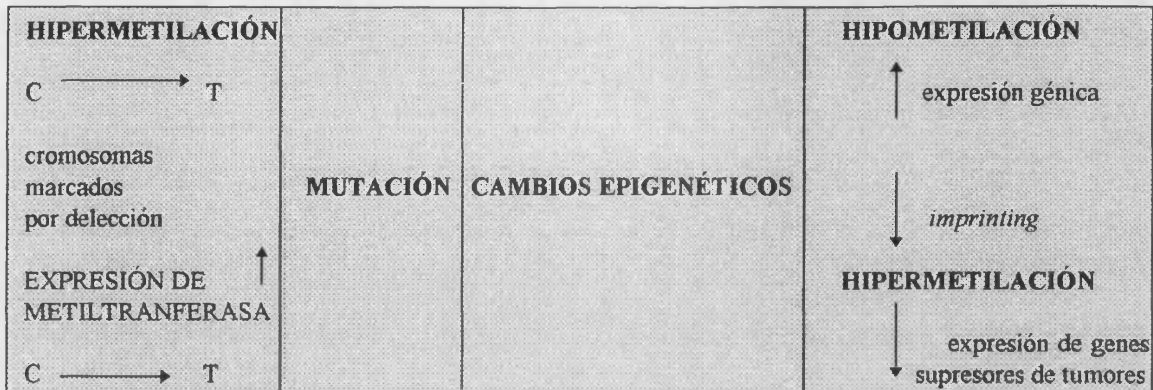


Fig. 12. Diferentes papeles para la metilación del ADN en la Carcinogénesis.

La 5-metilcitosina posee una gran facilidad de mutar a C vía deaminación y esta última a T. Así, en presencia de bajos niveles de S-adenosil metionina, la ADN metiltransferasa es capaz de catalizar la deaminación de C a U, dando lugar a la transición de C a T.

Por otra parte, aunque no se ha demostrado la implicación directa de los cambios de metilación del ADN en la carcinogénesis, hay, sin embargo, pruebas indirectas. Así, la azacitidina es un carcinógeno muy vigoroso que produce un abanico mayor de tumores en animales experimentales que otros carcinógenos conocidos. Ahora bien, la azacitidina no suele producir mutaciones genéticas. Y dado que el compuesto químico afecta a la metilación del ADN, parece razonable sospechar que las alteraciones registradas en los patrones de metilación por azacitidina contribuyen al desarrollo del cáncer.

Todos estos mecanismos que implican la metilación del ADN manifiestan que este proceso es importante tanto en el desarrollo como en ciertos procesos patológicos como es el cáncer.

OBJETIVOS

La exposición prenatal al alcohol altera el desarrollo del cerebro dando lugar, en humanos, a graves alteraciones en el comportamiento y retraso mental en mayor o menor grado. Se ha sugerido que estas disfunciones podrían deberse, a alteraciones en los patrones de migración de las neuronas corticales, lo que da lugar a la aparición de neuronas ectópicas. Sin embargo, trabajos de nuestro laboratorio indican que, el etanol es especialmente tóxico para las células astrogiales, produciendo alteraciones en la proliferación y diferenciación de estas células, tanto *in vivo* como en cultivo primario. En base a estos resultados y puesto que el desarrollo y la migración neuronal están modulados por factores astrocitarios, nuestro grupo ha postulado que los efectos teratogénicos del etanol sobre el sistema nervioso central podrían ser debidos a una acción primaria de este tóxico sobre la astrogliogénesis.

Para profundizar en los mecanismos moleculares y celulares de la vulnerabilidad específica de los astrocitos al alcohol durante su desarrollo, el objetivo principal del presente proyecto ha sido estudiar el efecto de este tóxico sobre la células precursoras de astrocitos (glía radial), analizando la expresión de ciertos genes específicos de células astrogiales (GFAP y vimentina) e investigando el mecanismo molecular por el cual el etanol podría actuar modificando la expresión de dichos genes.

En concreto, los objetivos que se han analizado son los siguientes:

1.- Estudio durante el desarrollo fetal.

a) Analizar el patrón de expresión de dos proteínas de filamentos intermedios de células astrogiales, GFAP y vimentina, durante el desarrollo fetal de cerebro, periodo en el cual tiene lugar la diferenciación de la glía radial, tanto en cerebros de ratas control como en expuestas prenatalmente al alcohol (PEA).

b) Aislar e investigar, en cultivos primarios de glía radial, la expresión de las proteínas GFAP y vimentina durante el desarrollo del cultivo, tanto en células procedentes de fetos de 13 días control como PEA.

c) Caracterizar las posibles alteraciones morfológicas que en los cultivos de glía radial pueda ocasionar la exposición prenatal al etanol en ausencia de alcohol en el medio de cultivo.

2.- Estudio durante el periodo postnatal.

a) Estudiar el patrón de expresión de las proteínas GFAP y vimentina, durante el periodo postnatal o fase de astrogliogénesis.

b) Analizar los cambios en la expresión de la proteínas anteriormente descritas, en astrocitos en cultivo primario procedentes de cerebros de fetos de 21 control y PEA. Las células PEA se cultivarán en ausencia de etanol en el medio de cultivo.

3.- Posibles mecanismos implicados en los cambios en los niveles de ARNm inducidos por la exposición prenatal al alcohol.

a) Alteraciones en el nivel de transcripción de estas proteínas en núcleos aislados de astrocitos en cultivo primario control y PEA.

b) Modificaciones en la estabilidad de sus ARNm en astrocitos en cultivo primario tanto control como PEA.

4.- Estudios sobre la metilación del gen de la GFAP.

a) Determinar si existe una correlación entre cambios en la metilación y expresión del gen de la GFAP durante el desarrollo de cerebro.

b) Analizar si la exposición al alcohol provoca cambios en el estado de metilación del gen de la GFAP, conduciendo a cambios en el nivel de expresión de este gen.

5.- Liberación del factor de crecimiento nervioso (NGF) por los astrocitos.

Durante los últimos años se ha demostrado que las células astrogliales desempeñan un papel crítico durante el desarrollo de cerebro, secretando un gran número de factores neurotróficos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de las neuronas recién formadas. Entre estos, merece destacar el factor de crecimiento nervioso (NGF). Por lo tanto uno de nuestros objetivos ha sido:

a) Analizar la liberación del NGF durante la fase de proliferación y diferenciación de astrocitos en cultivo primario.

b) Caracterizar su receptor mediante la unión del ^{125}I -NGF a astrocitos, además del posible efecto de la exposición prenatal al etanol sobre estos parámetros.

6.- Evolución de ciertos receptores de glutamato durante el desarrollo del hipocampo.

Durante el desarrollo del SNC, el glutamato y sus receptores juegan un papel importante en el establecimiento de la arquitectura y conexiones sinápticas. Por lo tanto cambios en las funciones normales de estos receptores durante la ontogenia podrían explicar algunas de las disfunciones de comportamiento que se observan tras la exposición prenatal al alcohol.

Hemos investigado el efecto de la exposición al alcohol sobre los receptores de glutamato durante el desarrollo del hipocampo del cerebro, tanto control como PEA, en los receptores.

a) N-metil-D-aspartato (NMDA).

b) Los receptores metabotrópicos asociados a la activación de la fosfolipasa C.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL.

1.1.- Material biológico.

1.1.1.- Animales de experimentación.

En todos los experimentos se utilizaron ratas de la raza Wistar obtenidas de Interfauna (Barcelona). Se usaron los siguientes grupos de animales:

a) Adultos:

- Ratas hembra utilizadas para experimentación y también para cruce (en este caso vírgenes).
- Ratas macho solo utilizadas para cruce.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones constantes de humedad (60%) y temperatura (23°C). Los animales se sometieron a un régimen luz/oscuridad de 12 h.

b) Crías:

- Ratas durante diferentes estadios del desarrollo postnatal.
- Fetos en diferentes estadios del desarrollo embrionario.

1.1.2.- Cepas de microorganismos.

E. coli k12: thr1 leu 6 thi1 lac Y1 ton A21 sup E44. (22).

1.1.3.- Cultivos celulares.

Todos los cultivos que se usaron fueron cultivos primarios obtenidos tanto de ratas control como de ratas expuestas prenatalmente al etanol.

- a) Cultivos de astrocitos.
- b) Cultivos de glía radial.

1.1.4.- Plásmidos.

Los plásmidos utilizados contenían el gen de las proteínas siguientes: La proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), la vimentina y la ciclofilina. El plásmido que contenía el gen

de la GFAP fue del tipo pUC9. Éste confiere resistencia a la ampicilina y posee un lugar de clonación múltiple (MCS) dentro del gen β -galactosidasa con nueve lugares únicos para clonación. La orientación de la región MCS en el plásmido pUC9 es análoga a la misma región en el fago M13 (Fig. 13).

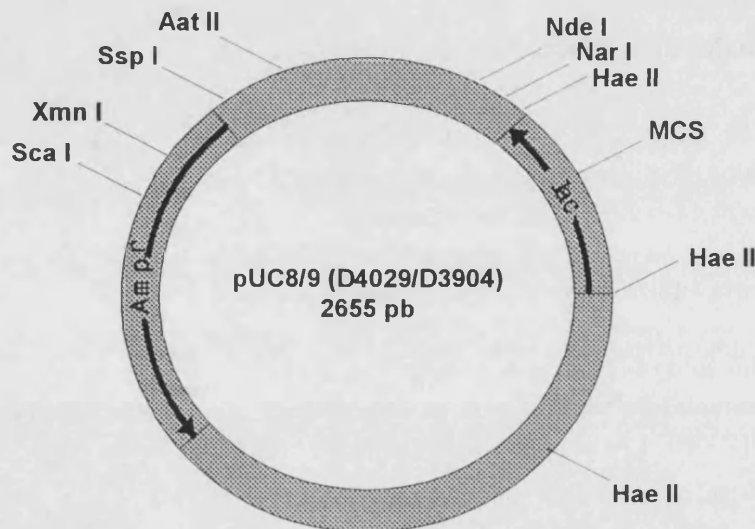


Fig. 13. Plásmido pUC8/9.

1.2.- Alimentación de los animales.

Los animales se dividieron en tres grupos, según el tipo de alimentación que recibieron. Se establecieron tres grupos de alimentación: a) animales alimentados con dieta líquida que contenía alcohol (5% peso/volumen), b) animales paralelamente alimentados con dieta líquida control y c) animales control alimentados con dieta sólida y agua *ad libitum*. Para la alcoholización de las ratas se utilizó la dieta líquida formulada por *Lieber y DeCarli* (226,227). Esta dieta contiene el 36% de las calorías totales en forma de alcohol y el 18%, 21% y 25% de las calorías totales en forma de proteína, grasa e hidratos de carbono, respectivamente (Tabla VI). En los animales control isocalóricos, la dieta fue la misma, pero las calorías del etanol se reemplazaron por dextrina-maltosa.

Las dietas líquidas, tanto control como alcohol, se preparaban cada 2-3 días para evitar el posible deterioro de las mismas y se guardaban en cámaras frigoríficas a 4°C. Diariamente se administraba el alimento (por la tarde) a los animales y el etanol se añadía a la dieta momentos antes de ser administrada. La alimentación de los animales se realizaba a través de bebederos de vidrio graduados para poder determinar la cantidad de dieta/día ingerida por cada animal. A las dos dietas se les añadía unas pocas gotas de sacarina (110 mg/l) para mejorar el sabor.

Tabla VI. Composición de las dietas (g/l). A: Dieta en alcoholización y gestación. B: Dieta en lactancia.

DIETA	A	A	B	B
	CONTROL	ETANOL	CONTROL	ETANOL
Proteína (Caseína)(1)	41.4	41.4	57.6	57.6
L-Cisteína	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-Metionina	0.3	0.3	0.3	0.3
Grasa	23.2	23.2	18.3	18.3
Carbohidrato	151.7	62.1	150.0	60.4
Mezcla de vitamin.(2)	4	4	4	4
Mezcla de Sales (3)	10	10	10	10
Carragenato sódico	2	2	2	2
Cloruro de zinc	0.01	0.01	0.01	0.01
Etanol	0	50	0	50
Contribución energética	%	%	%	%
Proteína	18	18	25	25
Grasa	21	21	16	16
Carbohidrato	61	25	59	23
Etanol	0	36	0	36

(1) Se utilizó leche en polvo de la casa Central Lechera Asturiana (semidesnatada) cuya composición es: 15% de materia grasa, 45% de lactosa y 30% de proteínas.

(2) La mezcla de vitaminas se obtuvo de la casa I.C.N. Nutritional Biochemical. La composición en mg/kg es: 4.5 de concentrado de vitamina A (200.000 U/g), 0.25 de concentrado de vitamina D (400.000 U/g), 5.0 de α -tocoferol, 45.0 de ácido ascórbico, 5.0 de inositol, 75.0 de clorhidrato de colina, 2.25 de menadiona, 5.0 de ácido p-aminobenzóico, 4.5 de niacina, 1.0 de riboflavina, 1.0 de piridoxina-ClH, 3.0 de pantotenato cálcico, 0.09 de ácido fólico, 0.02 de biotina y 0.135 de vitamina B₁₂.

(3) La mezcla de sales fue obtenida de la casa I.C.N. (Nutritional Biochemical). La composición en % es: 29.974 de carbonato cálcico, 32.22 de fosfato bipotásico, 7.49 de fosfato monocálcico, 10.19 de sulfato magnésico, 16.76 de cloruro sódico, 2.74 de citrato férrico, 0.079 de yoduro potásico, 0.49 de sulfato de manganeso, 0.029 de sulfato de cobre y 0.024 de cloruro de zinc.

1.3.- Enzimas.

Las enzimas de restricción de ácidos nucleicos utilizadas en este trabajo fueron adquiridas fundamentalmente a Boehringer-Mannheim, Sigma, New England Biolabs y Promega Biotech. Las digestiones se realizaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por las casas suministradoras y según los protocolos detallados por Sambrook *et al* (353).

1.4.- Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados pueden clasificarse en dos apartados:

a) Medios para células procariotas: LB, LAT y 5NBST preparados según *Sambrook et al* (353) y esterilizados en autoclave.

A los medios se les añadía Ampicilina, consiguiéndose una concentración final de 20 o 40 $\mu\text{g/ml}$, según los casos.

b) Medios para células eucariotas:

1.- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco), para neuronas y astrocitos.

2.- Medio mínimo esencial Eagle (MEM) con glucosa, L-glutamina y HEPES incorporado (Gibco), para glía radial.

1.5.- Productos y reactivos químicos.

Los productos y reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron suministrados principalmente por: Sigma Chemical Co., Merck Darmstadt, Bio-Rad, Pharmacia, Boehringer-Mannheim, Gibco, Nunc, Flow-Laboratories, Panlab, I.C.N. Nutritional Biochemical y Abelló Oxígeno-Linde S.A. Particularmente, los productos radiactivos fueron suministrados por Amersham International (Reino Unido).

1.6.- Películas.

Los geles de agarosa o poliacrilamida se fotografiaron con una cámara Polaroid MP4. K1B. Se utilizaron películas Polaroid 665/positivo-negativo.

Las películas autorradiográficas utilizadas fueron de Amersham (Hyper film-MP) y de Kodak tipo X-Omat AR.

1.7.- Aparatos.

Los aparatos utilizados para la realización de esta tesis fueron los siguientes:

1.7.1.- Aparatos ópticos.

- Espectrofotómetros:

- 1.- Pye Unicam Sp-500 para ultravioleta, visible o infrarrojo próximo.
- 2.- Espectrofotómetro Zeiss PM6.
- 3.- Lector de microplacas Labsystems Multiskan.

- Transiluminador Appligene TFX-35M.
- UV Stratalinker. 1800. Stratagene.

1.7.2.- Aparatos de electroforesis y de transferencia.

- Fuentes de alimentación LKB, ISCO.
- Fuente de electroforesis de alto voltaje. ISCO. Modelo 453.
- Secador de geles Ephortec.
- Aparatos para minigeles, de la casa Bio-Rad. Mini-Protean II Cell 10/0,75.
- Cubetas de electroforesis para geles de agarosa. Modelo B1. Easy-Cast.
- Aparato para transferencia en semi-seco Milliblot™ de la casa Millipore.

1.7.3.- Aparatos para medición de radiactividad.

- Contador para radiación y ANSR. Laboratorios Abbott.
- Contador de centelleo líquido LKB 1211-Rackbeta.
- Contador de centelleo líquido LKB 1219-Rackbeta.
- Contador Geiger Ludlum. Modelo 3.

1.7.4.- Centrífugas.

- Ultracentrífugas Beckman modelos L5-65, L8-M y XL-80.
- Centrífuga Sorvall RC-5B, provista de los rotores GSA y SS-34.
- Centrífuga Jouan CR 4 11.
- Microcentrífugas Eppendorf 5412, 5414 y 5415.

1.7.5.- Estufas e incubadores.

- Estufa de cultivo. REVCO.
- Incubador Memmert. B 50.
- Estufa Heraeus. KB680.
- Estufa Memmert. Tv 27 U.

1.7.6.- Balanzas.

- Mettler H54 AR, sensibilidad 0.01 mg.
- Mettler PR 700, sensibilidad 0.01 g.
- Mettler PE 2000.

1.7.7.- Homogeneizadores.

- Potter-Elvehjem con émbolo de teflón.
- Ultra-Turrax tipo 18/10.
- Ultra-Turrax tipo OMNI 1000.

1.7.8.- Microscopios.

- Carl Zeiss M.P.M. II con condensador para contraste de fases.
- Zeiss de fluorescencia con dispositivo Epi iluminación.
- Confocal ACAS 570 (Meridian Instruments Okemos, MI.).

1.7.9.- Otros.

- Bomba de aceite. Modelo E2M2. EDWARDS.
- Microondas Moulinex. FM430.
- Máquina de hielo. Scotsman. AF-30.
- Agitadores magnéticos: Corning Stirrer PC-353. P-Selecta Agilux.
- Baños termostatzados con y sin agitación.
- Campana de flujo laminar. Tipo HD-12.
- Ordenador Compaq 386 y 486.
- Impresora Hewlett packard laserjet 4L y Deskjet 520.
- Pipetas eppendorf, Gibco y Amersham.
- pHmetro Standart PH M 62.
- Congeladores: de -20°C y -70°C.
- Densitómetro Shimadan dual-wavelength flying-spot scanner cs-9000
- Densitómetro láser 2202 Ultrosan de LKB-Pharmacia.
- Autoclaves.

2.- MÉTODOS.

2.1.- Manipulación de los animales.

2.1.1.- Procedimiento de alcoholización. Controles isocalóricos "Pair-fed".

Uno de los métodos más completos y eficaces para la alcoholización de animales experimentales es la utilización de dietas líquidas (226,227). Con este procedimiento se consigue eliminar la desnutrición que normalmente acompaña al consumo de alcohol, incorporando el etanol a la mezcla líquida de proteínas, vitaminas, minerales, etc. Además, este procedimiento permite conseguir niveles constantes de alcohol en sangre, similares a los presentes en humanos.

La administración del etanol a los animales se realizó de forma gradual mediante una fase de adaptación, evitándose de esta manera la aversión espontánea de los animales al alcohol. La fase de adaptación (7-8 días) consta de tres periodos:

- 1.- Dieta con concentración alcohólica del 3% (peso/volumen), durante los primeros 3 ó 4 días.
- 2.- Dieta con concentración alcohólica del 4% (p/v), durante los 3 ó 4 días siguientes.
- 3.- Dieta con concentración alcohólica del 5% (p/v), mantenida durante el resto del tratamiento. (Tabla VI).

Las ratas, en general, se mantuvieron durante 6 ó 7 semanas con la dieta alcohólica; transcurrido ese tiempo, los animales eran tolerantes y dependientes al etanol, presentando síntomas de abstinencia si se les retiraba dicha dieta (5,6,7,8).

La utilización de este tipo de dietas permite usar controles isocalóricos en los que el alcohol es sustituido por carbohidratos; con ello se consigue una alimentación paralela y también administrar la misma cantidad de comida/Kg peso/día que ingiere el grupo alcohólico. Los animales alimentados con este tipo de dieta líquida también fueron sometidos a un periodo de adaptación para acostumbrarlos al sabor de la dieta y al nuevo sistema de alimentación.

2.1.2.- Exposición prenatal al alcohol.

Transcurridas 4 ó 5 semanas de tratamiento, alcohol o control, las ratas hembras en proestro o estro inicial eran colocadas en cajas con machos durante toda la noche (periodo de actividad de la rata). A la mañana siguiente se les practicaba lavado vaginal para determinar la presencia o ausencia de espermatozoides. La aparición de éstos definía ese día

como el día 0 de gestación. Las ratas preñadas eran dispuestas en cajas individuales y alimentadas con su correspondiente dieta. El periodo de gestación de las ratas era de aproximadamente 21 días.

La cantidad de dieta líquida consumida fue de ± 75 ml/día, consiguiéndose niveles de alcohol en sangre de ± 20 mM (356) similares a los niveles encontrados en mujeres alcohólicas embarazadas (144). Por otra parte, se ha demostrado que estos niveles son los adecuados para el estudio de la toxicidad del alcohol en modelos de animales (3,38,395).

En las experiencias en las que se usaban fetos de 12,15,17,19 y 21 días, las ratas gestantes (controles y alcohol) fueron sacrificadas mediante guillotina y tras abrir la cavidad abdominal, los fetos se extraían y se diseccionaba el cerebro. Este órgano se utilizó en fresco o en algunas ocasiones se congeló en N₂ líquido hasta su procesamiento.

2.1.3.- Exposición postnatal al alcohol.

Para los estudios de exposición postnatal al alcohol, las ratas gestantes eran vigiladas en los días 21 a 23 de gestación para poder determinar el día de nacimiento de las crías (día 0 de lactancia o día 0 postnatal).

El número de crías por camada se mantuvo constante, 8-10, sacrificándose el resto al nacer. Las crías fueron mantenidas con sus madres en cajas individuales. La dieta de las madres varió debido a la necesidad de un aporte proteico mayor en el periodo de lactancia (Dieta B, Tabla VI). En este periodo las madres consumieron unos 120 ml/día de dieta, consiguiéndose un nivel de alcohol de 30 mM en las mismas y de alrededor de 0.25 mM en las crías (358).

Las crías fueron sacrificadas en los días 4,7,14,21 y 28 postnatal, elegidas por ser las más adecuadas para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central.

2.2.- Aislamiento y cultivos celulares.

2.2.1.- Aislamiento y cultivo de astrocitos.

Para el cultivo de astrocitos se utilizaron ratas gestantes de 21 días (tanto ratas control como alcohol). La rata era sacrificada por decapitación y los fetos eran extraídos de la cavidad abdominal previamente abierta por cesárea. Para el cultivo se utilizaban todos los cerebros de la camada, los cuales se separaban en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Tras diseccionar los hemisferios cerebrales y eliminar las meninges, se depositaban en un tubo con medio de cultivo (Eagle modificado de Dulbecco: DMEM) y se disgregaban por aspiración con pipeta de 10 ml. La suspensión celular se agitaba en un vórtex durante un minuto para eliminar las neuronas. La mezcla disgregada se pasaba por una malla Nitex con poros de 90 μ m de tamaño para eliminar capilares sanguíneos y otros

restos celulares. El filtrado se mezclaba en una botella con medio completo (15 ml/cerebro) que contenía DMEM, 20% de suero bovino fetal (SBF) (inactivado durante 30 min a 60°C), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomina), 1% de fungizona y 1 mM de HEPES, para mantener el pH adecuado (Tabla VII).

La suspensión celular se sembraba en placas de cultivo de diferentes diámetros según las necesidades (Nunc, Denmark), con capacidad para 2,5 ó 10 ml/placa.

Las placas se incubaron en una estufa de CO₂/O₂ (5% /95%) a 37°C. El medio de cultivo era cambiado cada 3 ó 4 días a concentraciones diferentes según el período de cultivo (Tabla VII).

El crecimiento de las células se determinaba rutinariamente con un contador Coulter. La viabilidad celular se determinó con el test de exclusión de azul tripán. Una solución comercial conteniendo un 0.5% (p/v) de azul tripán en 0.85% (p/v) de NaCl (Flow-Laboratories) se mezclaba en proporción 1:1 con la suspensión celular a determinar. Después de 5 min se determinaba el porcentaje de células vivas. Se medía el número de células vivas por ml en un hemocitómetro.

El crecimiento de los cultivos se controlaba tanto bioquímica como morfológicamente (mediante inmunofluorescencia) manteniéndose las células normalmente hasta 28-30 días. Para los diferentes experimentos se utilizaron placas a diferentes días de cultivo: 4,7,14,21 y 28.

Para la realización de los cultivos se siguió la técnica descrita por los autores *Booher y Sensenbrenner* (40), con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio *Renau-Piqueras et al* (337).

Tabla VII. Medio de astrocitos. (1L).

	1ª Semana	2ª, 3ª y 4ª
SBF (ml)	200 (20%)	100 (10%)
D-glucosa (g)	4.42	0
Bicarbonato sódico (g)	3.7	3.7
Fungizona (g)	0.01	0.01
Penicilina (U)	1000	1000
Estreptomina (g)	0.001	0.001
HEPES	(1%)	(1%)
DMEM (g)	10	10

El pH del medio se ajustó a 6.9 y posteriormente se filtró a través de Millipore de 0.2 µm. Los antibióticos, fungizona, HEPES y SBF se añadieron en el momento de usar el medio de cultivo

2.2.2.- Aislamiento y cultivo de glía radial.

Los cultivos de glía radial se realizaron siguiendo la técnica descrita por *Culican et al.* (68) a partir de fetos de 13 días de gestación. A la madre gestante se la decapitaba y los fetos eran extraídos del útero materno. En condiciones estériles y gracias a lupas de aumento, se procedía a la extracción de los cerebros, separación de cortezas cerebrales y a su disgregación mecánica mediante una pipeta de 10 ml en medio MEM (medio mínimo esencial Eagle. Sigma) según tabla VIII.

La mezcla se pasaba a través de una malla Nitex con poros de 90 μm para eliminar capilares sanguíneos y otros restos de cerebro. De la suspensión celular se tomaba una alícuota y, tras mezclarse con azul tripán, se procedía al recuento del número de células vivas. La suspensión celular se sembraba a una concentración de 200-300 células/ mm^2 en placas recubiertas con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El medio en el que estaban resuspendidas las células se componía de: MEM con glucosa, L-glutamina y HEPES, 10% de suero de caballo (previamente inactivado), 1% de fungizona y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) (Tabla VIII). Las células se sembraban en placas de 2,5 ó 10 ml (Nunc), según las necesidades del experimento, manteniéndose en estufa húmeda a 37°C y CO_2/O_2 (5%/95%). Al segundo día de cultivo, se procedía a la aplicación de un choque frío para eliminar la presencia de neuronas en el cultivo. Para ello, el medio se eliminaba y se aplicaba medio frío (4°C) durante 3 segundos, eliminándolo rápidamente y sustituyéndolo por medio completo atemperado a 37°C. A las placas se les cambiaba el medio cada 3 ó 4 días.

El crecimiento celular se determinaba rutinariamente con un contador Coulter. La viabilidad celular se determinó con el test de exclusión de azul tripán. El número de células viables por ml se determinaba con un hemocitómetro. A diferentes periodos de cultivo se recogían placas para su estudio bioquímico y morfológico (Contraste de fases e inmunofluorescencia). Los cultivos se mantenían hasta 28-30 días.

Tabla VIII. Medio de glía radial. (1L).

	1ª Semana	2ª, 3ª y 4ª Semana
Suero de caballo (ml)	100 (10%)	100 (10%)
Bicarbonato sódico (g)	0.85	0.85
Fungizona (g)	0.01	0.01
Penicilina (U)	1000	1000
Estreptomicina (g)	0.001	0.001
Medio mínimo esen. (g)	14.98	14.98

El pH del medio se ajustó a 6.9 filtrándose posteriormente con filtros Millipore de 0.2 μm . Los antibióticos, fungizona y suero de caballo se añadieron en el momento de utilizar el medio. El medio mínimo esencial (MEM) contenía también glucosa, L-glutamina y HEPES.

2.3.- Obtención de ácidos nucleicos y proteínas.

2.3.1.- Extracción de ADN de células y tejidos.

Para la obtención de ADN, el tejido se congelaba en nitrógeno líquido y se machacaba en un mortero hasta dejarlo convertido en polvo. Se añadían 10 volúmenes de tampón de extracción (10 mM Tris-HCl con pH 8, 0.1 M EDTA al mismo pH, 20 µg/ml de ARNasa pancreática y 0.5 % de SDS) y se dejaba 1 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo se añadía proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se incubaba 3 h a 50°C, agitando periódicamente. La solución se pasaba a tubos de polipropileno y se le añadía igual volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 0.1 M. Se centrifugaba a $5.000 \times g$ durante 15 min. La fase acuosa se recuperaba y se le añadía $\frac{1}{2}$ volumen de fenol y $\frac{1}{2}$ de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugaba a $5.000 \times g$, 5 min, recuperándose la fase acuosa. A ésta se le añadía igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol.

Tras centrifugar, la fase acuosa se precipitaba con 2 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato sódico (3 M y pH 5.2). Con una varilla de vidrio en forma de gancho se pescaba el ADN y se colocaba en un tubo eppendorf. El resto se centrifugaba y el precipitado se lavaba con etanol 70%. El ADN se resuspendía en TE y se medía la concentración ($1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$).

2.3.2.- Extracción de ARN de tejido.

La obtención de ARN a partir de tejido se realizaba utilizando el procedimiento del tiocianato de guanidinio (413), seguido por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) (122).

El tiocianato de guanidinio se utilizaba para romper las células. El homogeneizado resultante se depositaba sobre un colchón de una solución densa de CsCl (5.7 M). El ARN, en el CsCl, es más denso ($> 1.8 \text{ g/ml}$) que otros componentes celulares (ADN y proteínas) y, tras la centrifugación, el ARN forma un precipitado en el fondo del tubo mientras que el ADN y las proteínas flotan en el sobrenadante de la solución. Por lo tanto, este procedimiento es idóneo para obtener fracciones de ARN con poca contaminación de ADN o proteínas.

El procedimiento que se utilizaba era el siguiente: al tejido congelado o fresco se le añadían 5 volúmenes de tampón de homogeneización (4.0 M tiocianato de guanidinio, 0.1 M Tris-HCl con pH 7.5 y 1% β -mercaptoetanol), se homogeneizaba y se le añadía lauril sarcosinato sódico (0.5% de concentración final), ya que el SDS es insoluble en soluciones salinas concentradas. La mezcla se centrifugaba a $5.000 \times g$, 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se depositaba con una jeringa hipodérmica en un colchón de 5.7 M de



CsCl y 0.01 M de EDTA y en un tubo de polialómero, centrifugándose a 20°C en un rotor SW28 a 23.500 r.p.m. y durante 26 h.

Después de centrifugar, el precipitado o fracción que contenía el ARN se lavaba con 70% de etanol, dejándolo secar a temperatura ambiente. El precipitado se disolvía en 1 ml de TE (pH7.6) / 0.1 % SDS y se añadían 0.1 volúmenes de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol frío. Se dejaba 30 min a -70°C y se centrifugaba a 12.000 × g, 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminaba y el precipitado se lavaba con 70% de etanol. El precipitado, ya seco, se resuspendía en agua.

La concentración y pureza de la muestra se determinó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica a 260 nm y 280 nm respectivamente ($1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$). La ausencia de degradación del ARN aislado se comprobó mediante minigeles de agarosa.

2.3.3.- Extracción de ARN de células en cultivo primario.

Esta extracción se realizaba siguiendo el método de *Chomyszski y Sachi* (78).

Las placas se lavaban con PBS y se les añadía solución de tiocianato de guanidinio (4.0 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato sódico con pH 7, 0.5 % de lauril sarcosinato sódico y 0.1 M de β -mercaptoetanol). Se homogeneizaban bien y se les añadía secuencialmente los siguientes productos: 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico con pH 5.2, 0.5 volúmenes de fenol saturado con Tris.Cl y 0.1 volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1).

La mezcla se dejaba 5 min en hielo y posteriormente se centrifugaba a 5.000 × g, 20 min y a 4°C. El sobrenadante se recogía y se le añadía 1 volumen de isopropanol, dejándolo 1 h a -20°C para permitir que el ARN de la muestra precipitara. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaba a 10.000 × g, 20 min y el precipitado se mezclaba con 0.3 ml de solución de tiocianato de guanidinio. Se transfería a tubos eppendorf y se le añadía igual volumen de isopropanol, dejándolo 1 h a -20°C. Se centrifugaba a 4°C durante 10 min en centrífuga de mesa eppendorf y el precipitado se lavaba con 70 % de etanol. Después de secar el precipitado, éste se disolvía en agua.

La concentración de ARN se medía en espectofotómetro ($1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$). La ausencia de degradación se comprobó mediante minigeles.

2.3.4.- Preparación de las muestras para su separación en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE).

Los cerebros procedentes de ratas controles o alcohólicas se homegeneizaban en 4 volúmenes (p/v) de 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 que contenía 2% SDS, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, en un homogeneizador Potter Envelheimer a 4°C. Una alícuota del homogeneizado resultante (0.125 ml) se hervía en 1 ml de tampón de muestra para electroforesis durante 5

min (0.125 M Tris-HCl pH, 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 5% MSH Y 0.025% azul de bromofenol).

Cuando se analizaban células en cultivo, la monocapa se lavaba 2 veces con PBS y después se disolvía directamente en: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 5% MSH y 0.025% azul de bromofenol. Se hervía 5 min a 100°C.

Las muestras se analizaban rápidamente para evitar posibles proteolisis o bien se congelaban a -70°C hasta su utilización. La concentración de proteína se determinaba por los métodos de Bio-Rad y de *Lowry et al.* (242), usando BSA como estándar.

2.3.5.- Preparación de membranas de hipocampo de cerebro de rata.

La membranas se prepararon siguiendo el procedimiento de *Schafer et al.* (366).

Los hipocampos se diseccionaban de cerebros de ratas postnatales. Éstos se homogeneizaban en 0.32 M sucrosa (15 ml/g) en un homogeneizador Potter-Elvehjem a 4°C. La mezcla se centrifugaba a 2.000 × g durante 10 min y el sobrenadante se centrifugaba nuevamente a 21.000 × g, 20 min. El precipitado se resuspendía en agua (7.5 ml/g), se centrifugaba a 9.000 × g durante 10 min y el sobrenadante resultante se centrifugaba otra vez a 48.000 × g durante 20 min. El precipitado resultante se resuspendía en 50 mM Tris-citrato, pH 7.1 (2 ml/g) y se incubaba durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugaba nuevamente a 48.000 × g durante 20 min. Finalmente el precipitado se resuspendía en tampón Tris-citrato. La concentración proteica se determinaba por el método de *Lowry et al.* (242).

2.3.6.- Obtención de núcleos de células en cultivo primario.

Para la obtención de núcleos de astrocitos se siguió el procedimiento usado por *Current Protocols in Molecular Biology* (69). Para ello, las placas de astrocitos en cultivo se lavaban por dos veces con PBS y con un rubber policeman se recolectaban las células en un tubo de 15 ml de centrifuga. Después de centrifugar 5 min a 500 × g en frío, las células se resuspendían en 4 ml de tampón sucrosa I (0.32 M sucrosa, 3 mM CaCl₂, 2 mM acetato magnésico, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT y 0.5% (v/v) Nonidet P-40). Las células se homogeneizaban con un homogeneizador Dounce con solo 5 a 10 golpes de homogeneización para evitar la rotura de los núcleos. Una pequeña alícuota se examinaba en un microscopio mediante contraste de fases para comprobar que la totalidad de las células estaban rotas y que los núcleos estaban íntegros. Posteriormente se añadía 4 ml de tampón sucrosa II (2 mM sucrosa, 5 mM acetato magnésico, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 1 mM DTT) y se agitaba hasta obtener una mezcla homogénea.

En un tubo de polialómero se introducían 4.4 ml de tampón sucrosa II para conseguir un colchón de sucrosa. Encima se disponían los 8 ml de la mezcla de núcleos y se

centrifugaba a $30.000 \times g$ durante 45 min, a 4 °C. El precipitado de núcleos se resuspendía en 220 μ l de tampón 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40% (v/v) glicerol, 5 mM $MgCl_2$ y 0.1 mM EDTA y se congelaba en nitrógeno líquido. Unos $3-5 \times 10^7$ núcleos eran resuspendidos cada vez. Los núcleos se guardaban en congelador a -70°C hasta su utilización. En cada ensayo se usaban 210 μ l de mezcla de núcleos.

2.4.- Obtención de insertos genómicos a partir de plásmidos recombinantes.

2.4.1.- Transformación de células bacterianas.

Las bacterias se transformaron según una variación del protocolo de *Cohen et al.* (62).

Para ello se realizaba un cultivo de la cepa huésped *E. coli* K12, dejándola crecer durante toda la noche a 37°C en medio LB. Al día siguiente se inoculaban 0.2 ml de la cepa en 9 ml de LB y se dejaba en tubos de burbujeo a 37°C hasta obtener una $D.O_{550} = 0.6$.

Se sacaba de la incubación y se dejaba enfriar a 4°C durante 20 min. Posteriormente, el cultivo se centrifugaba a 6.000 r.p.m. durante 15 min. Al precipitado se le añadían 8 ml de $CaCl_2$ 0.1 M y se dejaba en frío durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugaba a 6.000 r.p.m. durante 15 min. Al precipitado se le añadía 1 ml de $CaCl_2$ 0.1 M y se dejaba en frío durante 1 h. En estas condiciones, las células eran competentes para ser transformadas y podían guardarse en alícuotas a -70°C.

En un tubo de plástico se añadían secuencialmente 100 μ l de Tris-HCl 0.1 M pH 7.2, 100 μ l de la cepa competente y 10 μ l del plásmido con el que se pretendía transformar la bacteria. Se dejaba en frío durante 15 min y posteriormente se introducía en un baño a 42°C durante 5 min. El choque térmico permitía el paso del plásmido al interior de la célula.

Se añadían 0.8 ml de LB y se dejaba crecer 1 h y 30 min a 37°C en un baño con agitación.

Las células transformadas se seleccionaban extendiendo un volumen adecuado (100-200 μ l) en placas Petri con medio selectivo (LAT/Ampicilina 20 μ g/ml) y se incubaba a 37°C durante toda la noche. Se efectuaron los correspondientes controles, con plásmido intacto y digerido, con la enzima de restricción específica.

2.4.2.- Identificación de recombinantes.

Para determinar las colonias bacterianas que poseían los plásmidos recombinantes se realizaba una minipreparación mediante modificación del método de la lisis alcalina de *Birnboim y Doly* (34) y *Ish-Horowicz y Burke* (176).

Las colonias crecieron en 5 ml de medio LB/Ampicilina durante toda la noche. Tras centrifugar 1.5 ml del cultivo durante 5 min a $11.000 \times g$, el precipitado celular se

resuspendía en 100 µl de una solución previamente atemperada que contenía: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y se mantenía 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se añadían 200 µl de solución de NaOH 2 N/SDS 1%, se mezclaba y se dejaba en hielo durante 5 min.

A esta mezcla se le añadían 150 µl de una solución de acetato potásico 3 M pH 4.8/ácido acético 5 M y se mantenía en hielo 5 min más. Finalmente, la mezcla se centrifugaba a 15.000 × g durante 5 min, a 4°C y el sobrenadante se extraía con fenol/cloroformo (1:1) y la fase acuosa se precipitaba con etanol. El precipitado se redisolvió en TE pH 8.0.

La presencia del inserto se determinaba tras digestión con las enzimas de restricción específicas, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

2.4.3.- Extracción de ADN plasmídico.

Para obtención de ADN plasmídico se utilizaba el kit de columnas de Quiagen (Izasa).

2.4.3.1.- Amplificación bacteriana.

Para obtener ADN plasmídico a gran escala se inocularon 5 ml de LB/ampicilina con una única colonia de *E. coli* K 12 conteniendo plásmido con inserto. Se incubaba a 37°C durante aproximadamente 6 h. Transcurrido ese tiempo se inoculaban 100 ml de LB/ampicilina y se dejaba crecer durante toda la noche a 37°C hasta la saturación del cultivo.

2.4.3.2.- Lisis celular y purificación plasmídica.

El cultivo de células se centrifugaba a 4°C a 6.000 r.p.m. en una centrífuga Sorvall durante 15 min. El precipitado se resuspendía con 4 ml de tampón P1 (100 µg/ml Rnase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8.0) y se añadían 4 ml de tampón P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezclaba bien y se incubaba a temperatura ambiente alrededor de 5 min. Después se añadían 4 ml de tampón P3 (3 M Kac, pH5.5) y se incubaba en hielo durante 15 min. Se centrifugaba a 15.000 r.p.m. durante 30 min, a 4°C. El sobrenadante se recogía y se depositaba en una columna de Quiagen (previamente la columna había sido equilibrada). La columna se lavaba dos veces con un tampón especial (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0 y 15% etanol) y se eluía el ADN con 5 ml del tampón de elución (1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 y 15% etanol). El ADN se precipitaba con 0.7 volúmenes de alcohol isopropílico y se centrifugaba a 15.000 × g, a 4°C durante unos 30 min. El precipitado se lavaba con etanol 70% y después de dejarlo secar se resuspendía en un adecuado volumen de tampón TE. Se calculaba su concentración en el espectrofotómetro mediante el cálculo

de la relación de DO_{260}/DO_{280} (un cociente superior a 1.8 era lo deseable). Para comprobar la pureza de la muestra, se resolvía en geles de agarosa.

2.4.4.- Digestión de los plásmidos.

Las digestiones de los plásmidos recombinantes se realizaron con los enzimas de restricción adecuados. Para ello, los plásmidos eran sometidos a digestiones dobles con los dos enzimas necesarios para la obtención del inserto y se les mantenía a 37°C el tiempo necesario, que dependía del enzima utilizado. Posteriormente, se precipitaba el ADN con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se guardaba en frío 1 h a -20°C y se recuperaba por centrifugación a $15.000 \times g$ durante 15 min, a 4°C. El precipitado se lavaba con etanol 70%, se secaba y se redisolvió en el tampón adecuado.

2.4.5.- Electroforesis preparativa en gel de agarosa.

Para la obtención de fragmentos de ADN de geles de agarosa, el ADN se resolvía en geles preparativos de agarosa al 1% en tampón TAE, consiguiéndose, a esa concentración, separar los fragmentos de interés. El gel se teñía con bromuro de etidio para poder localizar el inserto, se cortaba la banda correspondiente a éste y se procedía a la extracción del ADN.

2.4.6.- Extracción de ADN de geles de agarosa.

Para la extracción de ADN de geles de agarosa se utilizó el kit Qiaquick, de la marca Qiagen. Para ello, el fragmento de interés se separaba del gel de agarosa y se introducía en un tubo eppendorf. Se añadían 3 volúmenes de tampón QX1 (tampón de solubilización) para un volumen de gel. Se incubaba a 50°C, 10 min. Se pasaba la solución por una columna de Qiaquick, se centrifugaba, se lavaba la columna y se eluía el ADN añadiendo 50 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8.5.

2.5.- Técnicas de electroforesis.

2.5.1- Electroforesis en geles de agarosa.

La separación electroforética de fragmentos de restricción de ADN genómico en geles de agarosa se realizó usando concentraciones variables de la misma, 0.8%-1%, en tampón TBE (x 0.5). El tampón utilizado para la electroforesis fue también TBE (x 0.5).

La tinción del ADN se realizaba sumergiendo el gel, después de la electroforesis, en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante un tiempo de 10 min o bien se añadía el bromuro de etidio a la cubeta antes de realizar la electroforesis, consiguiéndose la tinción a la vez que se resolvían las muestras. El ADN se visualizaba mediante luz ultravioleta, utilizando un transiluminador.

Para la separación electroforética del ARN se utilizaban geles desnaturalizantes de agarosa al 1.0% con formaldehído 2.2 M (2). El tampón de electroforesis contenía MOPS 20 mM pH 7.0, acetato sódico 8 mM y EDTA 1.0 mM.

2.5.2.- Geles de SDS/PAGE.

El método utilizado fue el seguido por *Laemmli* (200). Los geles poseían un espesor de 0.75 mm, con un tamaño de las placas de 8.5 × 6 cm (Minigeles). El gel concentrador contenía acrilamida al 4.5% en tampón Tris-HCl 125 mM pH 6.8 y SDS 0.1%. El gel de resolución presentaba concentraciones de acrilamida variables, según la proteína a estudiar, entre el 7 y el 15% en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8.8 y SDS 0.1%. El tampón utilizado en la electroforesis era Tris-HCl 50 mM pH 8.3, glicina 384 mM y SDS 0.1% (Tabla IX y X).

Las muestras se desnaturalizaban por ebullición durante 5 min antes de su resolución en el gel. Realizada la electroforesis, las proteínas se fijaban en una solución que contenía: 10% ácido tricloroacético (TCA), 10% ácido acético glacial y 30% metanol, tras lo cual los geles se teñían con azul Coomassie K-250 al 0.1% que contenía metanol 30% y ácido acético 10%. Para eliminar el exceso de teñidor, los geles se sumergieron en solución desteñidora (25% metanol y 8% ácido acético).

Tabla IX. Gel de resolución.

Nº de geles.	1			2			4		
	6%	7.5%	10%	6%	7.5%	10%	6%	7.5%	10%
H ₂ O.	3.30	3.04	2.64	6.60	6.08	5.28	13.2	12.17	10.56
Acrilamida/Bis-acril.	0.99	1.25	1.65	1.98	2.50	3.30	3.96	5.00	6.60
Tris-HCl 3M, pH 8.8	0.625	0.625	0.625	1.25	1.25	1.25	2.50	2.50	2.50
SDS 10%	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
Persulfato amónico.	0.03	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.12	0.12	0.12
TEMED.	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl	7 µl	7 µl	7 µl	14 µl	14 µl	14 µl

Antes de añadir el persulfato amónico al 10% y el TEMED, se degasó la mezcla durante 15 min. Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0.8%. Todas las cantidades están expresadas en ml, excepto el TEMED.

Tabla X. Gel de concentración.

Nº de gel.	1	2	4
Concentración.	4.5%	4.5%	4.5%
H ₂ O.	1.76	3.52	7.05
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.375	0.750	1.50
SDS 10%	0.3125	0.625	1.25
Persulfato amónico.	0.0225	0.045	0.09
TEMED.	3.5 µl	7 µl	14 µl

Antes de añadir el persulfato amónico al 10% y el TEMED, la mezcla se degaseó durante 15 min. Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0.8%. Todas las cantidades están expresadas en ml, excepto el TEMED.

2.6.- Análisis de ADN.

El análisis de ADN genómico se realizó por el método *Southern* (387). Con esta técnica se consigue la localización de secuencias específicas en el ADN.

2.6.1.- Digestión, electroforesis y transferencia del ADN a soporte sólido.

Se tomaba 50 µg de ADN de alto peso molecular aislado de hígado o cerebro de rata y se digería con *Msp I*, *Hpa I* y *Hha I* (Boehringer Mannheim, Sigma, 3 U/µg ADN) durante 12 h a 37°C. Los fragmentos resultantes se resolvían mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Una vez hecha la electroforesis, el gel se introducía en una solución de HCl 0.25 M durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se desnaturalizaba con una solución de 1.5 M NaCl/NaOH 0.5 M durante 15 min, a temperatura ambiente (dos veces). Transcurridos los 15 min, el ADN se neutralizó con 1M pH 8.0 Tris-HCl/NaCl 1.5 M durante 15 min, equilibrándose después en tampón de transferencia SSC × 20 durante 30 min.

El gel tratado se transfería por capilaridad a un filtro de nylon durante toda la noche en tampón SSC × 10. Al día siguiente, el filtro se lavaba con SSC × 2 y el ADN se fijaba en el filtro por medio de *stratalinker*. Los geles ya transferidos se teñían con bromuro de etidio para comprobar la efectividad de la transferencia.

2.6.2.- Hibridación de sondas marcadas al ADN transferido a soporte sólido.

Los filtros se introducían en bolsas de plástico especiales resistentes a altas temperaturas y se prehibridaba a 65°C durante 5 min en una solución que contenía: 1 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄, pH 7.2 y 7% SDS. A continuación se cambiaba la solución de prehibridar y se añadía la sonda de cADN, cuya concentración en la solución era de 10⁶ cpm/ml (actividad específica de la sonda 10⁸ cpm/μg sonda), previamente marcada con ³²P por la técnica de *random primer* y desnaturalizada.

La hibridación se realizaba durante toda la noche y en un baño a 65°C. Al día siguiente las membranas se lavaban 2 veces en una solución de lavado 1 (1 mM EDTA, 40 mM Na₂HPO₄, pH 7.2 y 5% SDS) durante 30-60 min a 65°C. Posteriormente, las membranas se lavaban dos veces más en la solución de lavado 2 (1 mM EDTA, 40 mM Na₂HPO₄ y 1% SDS) durante 30-60 min, a la misma temperatura de 65°C.

Finalmente, el filtro se exponía a una película autorradiográfica durante un tiempo que variaba entre 4 y 15 días, dependiendo de la marca obtenida.

2.6.3.- Dot-blot y Slot-blot de ADN en membranas de nitrocelulosa.

Los plásmidos de cADN se linearizaron e inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa para posterior hibridación en el ensayo de transcripción nuclear (Run-off).

Para desnaturalizar el ADN se añadía 1 M NaOH y se llevaba a ebullición durante 7 min. Para neutralizar la muestra se añadía 6 × SSC y se incubaba en hielo. Se utilizaba un aparato para Slot-Blot o Dot-Blot, según el experimento. A una membrana de nitrocelulosa se añadían 2.5-5 μg de ADN por ranura y después se aplicaba el vacío. El ADN se fijaba a la membrana mediante *stratalinker* y se guardaba en un desecador de vacío hasta su uso.

2.7.- Análisis de ARN.

Para cuantificar los niveles de ARNm se utilizó el procedimiento de *Northern blot*. Este método permite la determinación del tamaño y abundancia del ARN a estudiar.

2.7.1.- Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.

Se desnaturalizaban diferentes concentraciones de ARN total aislado de cerebro de rata o de cultivo primario (apartado 2.3.2 y 2.3.3) por calentamiento a 65°C durante 15 min, en una solución que contenía formaldehído 2.2 M y formamida al 50% en tampón (MOPS 20 mM pH 7, acetato sódico 8 mM y EDTA 1.0 mM) y los diferentes ARNs se separaban mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con formaldehído 2.2 M (353). El tampón de electroforesis era similar al utilizado en la desnaturalización del ARN.

2.7.2.- Transferencia a soporte sólido.

Después de la electroforesis, el gel se lavaba con agua tratada con DEPC durante 5 min y se equilibraba unos 45 min con SSC \times 10. El ARN se transfería a una membrana de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) por capilaridad en tampón SSC \times 10. Tras 20 h de transferencia el filtro se lavaba con SSC \times 2 y se secaba en *stratalinker*. Para comprobar la transferencia, una pequeña porción de la membrana que contenía muestra se teñía con azul de metileno.

2.7.3.- Hibridación.

Las membranas de nylon que contenían los ARN se trataban igual que las de ADN (apartado 2.6.2). Se añadía la misma cantidad de sonda y los tiempos de incubación fueron similares.

Una vez se eliminaban las uniones inespecíficas del filtro, se dispuso frente a una película autorradiográfica en cassette con pantalla amplificadora, protegido de la luz y se guardó a -70°C durante un tiempo variable (4-10 días) según la potencia de la señal obtenida.

2.7.4.- Tratamiento de los cultivos de astrocitos con α -amanitina.

Cultivos de astrocitos control y PEA de 14 días de cultivo se trataban con 10 μM de α -amanitina, inhibidor de la ARN polimerasa II. A las 3,6,9 y 15 h tras la incorporación de α -amanitina, se extraía el ARN por el procedimiento de *Chomyszski y Sachi* (78) y se analizaba por el método *Northern* para determinar el tamaño y la abundancia del ARN en estudio.

2.7.5.- Ensayos de Run-off.

A 200 μl de núcleos procedentes de aproximadamente $4-5 \times 10^7$ de células, extraídos como se indica en el apartado 2.6.3, se les añadía 200 μl de 2 \times tampón de reacción con nucleótidos y 10 μl de 10 mCi/ml de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP. La mezcla se incubaba durante 30 min a 30°C . Transcurrido ese tiempo se procedía a la separación de ARN de los otros componentes nucleares (ADN, proteínas) mediante el procedimiento de tiocianato de guanidinio y posterior centrifugación en solución de cloruro de cesio.

El ARN obtenido y marcado con ^{32}p , se disolvía en solución TES y se mezclaba en solución TES/NaCl. Las membranas de nitrocelulosa con ADN inmovilizado se introducían en bolsas de hibridación y se les añadía la mezcla que contenía ^{32}p -ARN. Se dejaba hibridando durante 36 h a 65°C . Tras la hibridación, las membranas se lavaban en 2 \times SSC

durante 1 h a 65°C, repitiendo el lavado varias veces. Finalmente, la membrana se exponía a una película autorradiográfica.

Tabla XI. Tampones de Run-off.

2 × tampón de reacción	2 × tampón de reacción con nucleótidos
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	1 ml 2 × tampón de reacción
5 mM MgCl ₂	10 µl 100 mM ATP
0.3 M KCl	10 µl 100 mM CTP
	10 µl 100 mM GTP
	5 µl 1 M DTT

2.8.- Preparación de sondas marcadas radiactivamente.

Para el marcaje se usaron dos técnicas utilizadas según fuera el tamaño del ADN a marcar.

2.8.1.- Marcaje de sondas por cebadores aleatorios *Random primers*.

Esta técnica fue desarrollada por *Feinberg and Vogelstein* (108,109). Se usaban unos 200 ng mínimo de ADN. En un tubo eppendorf se mezclaba el ADN con 75 ng de mezcla de hexanucleótidos × 10 y agua. Se calentaba a 100°C durante 4 min y después de enfriar se añadía a la mezcla 1 µl de 20 mM ditioneitol, 1 µl de una solución de dGTP, dCTP y dTTP (cada uno a una concentración de 5mM), 1 µl de tampón RP × 10 (900 mM HEPES y 100 mM MgCl₂), 3 µl de [α -³²P] dATP (actividad específica > 3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl) y 1 µl (5 unidades) de la enzima Klenow (fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*).

Se dejaba unas 3 h a temperatura ambiente como mínimo y posteriormente se paraba la reacción, añadiendo 12 µl de un tampón que contenía: 50 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0 y 0.5% de SDS. Antes de su uso, se desnaturizaba la sonda mediante ebullición durante 5 min.

2.8.2.- Marcaje por desplazamiento de la mella *Nick translation*.

Algunas sondas se marcaban mediante la técnica de desplazamiento de la mella (*nick translation*) (341).

En un tubo eppendorf de 0.5 ml de tamaño se añadían 0.5 µg de ADN, 1 µl de tampón nick-translation × 3 y 0.5 ng de ADNasa I. Se dejaba a temperatura ambiente durante 30 min y después se añadía 1 µl de tampón nick-translation × 10 (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M MgSO₄, 1 mM ditioneitol y 500 µg/ml de BSA), 1 µl de una mezcla de nucleótidos a 5 mM de concentración cada uno (dCTP, dGTP, dTTP), 10 µl de [α -³²P] dATP (10 µCi/µl) y 1 µl de la enzima ADN polimerasa I. Se dejaba a 16°C durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, la reacción se paraba mediante la adición de 25 µl del mismo tampón de parada que se utiliza para *random primers*.

2.9.- Análisis de proteína.

Se utilizó el método Western siguiendo el procedimiento de *Twobin et al.* (410).

2.9.1.- Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

Se usaron geles en gradiente utilizando cubeta mini Protean II (Bio-Rad). La metodología para la realización de los geles fue la misma que la indicada en el apartado 2.5.2, pero en este caso, finalizada la electroforesis, los geles se transferían a papel de nitrocelulosa. Para la transferencia se utilizaba un aparato de Millipore con placas de grafito. En el ánodo se colocaban dos papeles de filtro Whatman 3MM humedecidos con tampón 1 (Tris-HCl 0.3 M pH 10.4 y metanol 20%). A continuación, un papel más impregnado en tampón 2 (Tris-HCl 25 mM pH 10.4 y metanol 20%). Encima se colocaba la membrana de nitrocelulosa y sobre ella el gel, cubriéndose todo con cuatro papeles de filtro mojados en un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM pH 10.4, ácido ϵ -amino-n-caproico 40 mM y metanol 20%. La placa de grafito correspondiente al cátodo se dispuso encima. La transferencia se realizó a 1.2 mA/cm² de gel durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, los geles se tiñeron con azul Coomassie para comprobar la eficacia de la transferencia.

2.9.2.- Inmunodetección.

Las membranas se equilibraban 10 min con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.5 M NaCl) y posteriormente se bloqueaban los sitios inespecíficos con gelatina al 3% en TBS durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se incubaban con los anticuerpos diluidos en TBS al 1%, durante un tiempo variable (2-12 h). Posteriormente, las membranas se lavaban con agua, dos veces con TBS 10 min. Los papeles de nitrocelulosa se incubaban con un anti-IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina y diluido 1:1000 durante 1h. Después de la incubación se lavaban con agua y TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.05% de Tween-20) durante 10 min. En algunos experimentos en vez de gelatina fue utilizada

leche al 5% para el bloqueo. En este caso, los lavados se realizaban con TBS y 0.01% Tween 20, los anticuerpos se diluían en 0.2% de leche, 0.01% Tween 20 y 1% de BSA para el primer anticuerpo y TBS, 0.01% de Tween 20 y 0.1% de leche para el segundo anticuerpo o anti IgG.

La solución de desarrollo de color contenía tampón AP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂). Para cada 5 ml de tampón AP, se añadían 16.5 µl de NBT (Nitroazul de tetrazolio 50 mg/ml en 70% de dimetil-formamida) y 33 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol acético 50 mg/ml en dimetil-formamida).

2.9.3.- Inmunofluorescencia.

Para la realización de inmunofluorescencias se siguió el método desarrollado por *Cardoso et al.* (57) y *Saez et al.* (351). Para estos experimentos se utilizaron cubres de cristal (15 mm.) en el que las células se sembraban. Los citoesqueletos de los astrocitos se incubaban simultáneamente con anticuerpos anti-GFAP (dilución 1:10) y anti-vimentina (1:10). La incubación se realizaba durante 60 min a 37°C.

Después de lavar varias veces con tampón BSA-TBS, las células se incubaban durante 90 min a 37°C con PBS que contenía IgG anti-ratón-TRITC (isotiocianato de tetra-metil-rodamina, Boehringer Chemical Co, Germany), e IgG anti-conejo-FITC (isotiocianato de fluoresceína, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), para vimentina y GFAP, respectivamente; e IgG anti-ratón-FITC (Boehringer Chemical Co., Germany), e IgG anti-conejo-TRITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Todas las diluciones eran 1:10.

Los astrocitos eran examinados con un microscopio de fluorescencia Zeiss con iluminador vertical para la luz incidente (Ex 450-490/FT 510/LP 520 para FITC y Ex 510-560/FT 580/LP 590 para TRITC).

2.9.4.- Medida del factor de crecimiento nervioso (NGF).

Para medir la liberación de NGF en astrocitos control y PEA el procedimiento utilizado fue el de *Carman-Krzan et al.* (58). Las células se lavaban 2 veces con DMEM y el medio de cultivo se reemplazaba con 1 ml de medio de cultivo fresco que contenía 1 mg/ml de BSA. Después de 24 ó 40 h de incubación, el medio de cultivo se recogía y se congelaba inmediatamente. Para la determinación del NGF, se utilizaba el procedimiento de inmunodetección descrito en el apartado siguiente.

2.9.5.- Ensayos para la inmunodetección del NGF.

Se siguió el procedimiento de *Carman-Krzan et al.* (58), basado en el de *Korsching and Thoenen* (195).

Las células crecidas en 5 placas de 35 mm se resuspendían en 1 ml de PBS/1% BSA y se utilizaba una pequeña muestra para la determinación proteica por el método de *Lowry et al.* (242). Tras una centrifugación a $15.000 \times g$ durante dos min, las células se sonicaban en 0.25 ml de tampón de extracción [50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 200 mM NaCl, 1% Triton X-100, 4 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 0.5 mM PMSF, 2 mM EDTA, 0.1 mM cloruro de benzeno y 0.05% NaN_3]. El extracto celular se centrifugaba a $15.000 \times g$, durante 15 min y el precipitado se usaba para la determinación de NGF y de proteína.

Se incubaban Placas de Elisa durante 2 h a 37°C con 0.15 ml de una solución que contenía: 50 mM de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 9.6, NaN_3 0.1% (w/v) y la solución de anti-NGF (clon 27/21) (0.7 $\mu\text{g/ml}$). Transcurrido ese tiempo, se lavaban 3 veces con tampón de lavado 1 [50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl, 0.1% (w/v) Triton X-100 y 0.05% (w/v) de NaN_3 , con un pH 7.0]. Se eliminaba la solución de lavado y se añadía 0.1 ml de extracto celular o de medio de cultivo o de solución estándar y se incubaba durante toda la noche a 4°C . A la mañana siguiente, las placas se lavaban, al menos 3 veces, con solución de lavado 1. Se añadía 0.1 ml de solución-anti- β -NGF conjugado con β -galactosidasa que contenía 1% de BSA (1:10) y se incubaba 4 h a 37°C . Se quitaba la solución de las placas por succión y se lavaban 3 veces con tampón de lavado 1. Seguidamente se añadían 0.2 ml de solución de substrato [40 mg de clorofenol red- β -D-galacto piranósido en 20 ml de tampón substrato: 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, NaN_3 0.1% (w/v), albúmina 1% (w/v) y 2 mM MgCl_2 pH 7.0 y se incubaba a 37°C hasta que el desarrollo de color era suficiente. La intensidad del color se medía en un lector de microplacas a una longitud de onda de 574 nm.

Se utilizaron estándar de NGF (10-300 pg/ml) para generar una curva estándar. El límite de detección del ensayo fue de 5 pg/ml.

2.9.6.- Ensayos de unión e internalización de NGF.

Los ensayos de unión se determinaron de acuerdo con los protocolos de *Kahle and Hertel* (182).

Estos ensayos se realizaban en un tampón que contenía: PBS, 1.2 mM MgSO_4 , 0.1% BSA y 0.1% glucosa a un volumen final de 120 μl . Para los experimentos de saturación se utilizaba una suspensión de 10^6 células/ml y se incubaba 1 h a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de [^{125}I]NGF (2000 Ci/mmol, Amersham) y con actividad específica constante de 200 Ci/mmol. Las uniones no específicas se determinaban en ensayos paralelos que contenían 0.5 μM de NGF no marcado. Los ligandos libres y unidos se separaban mediante el ensayo de centrifugación descrito por *Vale and Shooter* (414) y *Kahle and Herlet* (182).

Para determinar la internalización de NGF, 3×10^6 células/ml, se preincubaban con 1 nM de [^{125}I]NGF (200 Ci/mmol) durante unos 90 min y a 37°C . A diferentes intervalos de tiempo, las células se separaban mediante centrifugación. El precipitado celular se resuspendía en un volumen igual de ácido acético 0.2 M y NaCl 0.5 M (pH 3.5). En condiciones ácidas se disociaba la unión de ^{125}I -NGF a las membranas dejándolas durante 5

min, a 0°C. Las uniones no específicas se determinaban en incubaciones en paralelo en presencia de 0.5 µM de NGF no marcado. La radiactividad asociada a los precipitados celulares nos da la unión total unida (en ausencia de un exceso de NGF no marcado). La cantidad internalizada es la que nos da tras el lavado con ácido y la no específica son las muestras que están en presencia de un exceso de NGF no marcado. La radiactividad se midió en un contador para medición γ . Los parámetros de unión fueron estimados a partir de curvas de saturación usando el programa EBDA/LIGAND.

2.9.7.- Ensayos de unión a MK-801.

Los ensayos de unión se realizaron en tubos de polipropileno y con un volumen final de 1 ml que contenía: 150-200 µg de proteína (procedente de membranas de hipocampo), 25 mM Tris-citrato, pH 7.1, 100 µM glutamato, 100 µM glicina y 1 µM ^3H -MK-801 (30 Ci/mmol, New England Nuclear, Dupont Billerica, MA). Para la realización de curvas de saturación de unión de ligando se usaban diferentes concentraciones de ^3H -MK-801 (10-300 nM). Las uniones no específicas se determinaban en presencia de 1 mM (+)-MK-801.

Muestras dobles se incubaban a 37°C durante 20 min. Los ensayos se paraban mediante rápida centrifugación a 10.000 \times g durante 30 min. Los precipitados se lavaban 3 veces con 1 ml de 50 mM tampón Tris-citrato y la radiactividad unida se contaba usando un contador LKB-Rackbeta 1219.

Los parámetros de unión (K_d y B_{max}) se estimaron a partir de las curvas de saturación usando el programa EBDA/LIGAND. Los valores se presentan como la media \pm S.E.M.

2.9.8.- Hidrólisis de PIP₂ en fragmentos de hipocampo.

La hidrólisis de PIP₂ (fosfatidilinositol trifosfato) se medía en cortes de tejido hipocampo de rata, siguiendo el procedimiento descrito por *Fisher et al.* (114). Los cortes de hipocampo se lavaban 3 veces en tampón A (142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 3.6 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM D-Glucosa y 30 mM HEPES, pH 7.4). Aproximadamente 50 µl de cortes de tejido (aproximadamente 0.75-1 mg de proteína) se incubaban en tampón A durante 90 min y a 37°C, conteniendo 3 µCi de mio-(2- ^3H)inositol (16.5 Ci/mmol), 10 mM LiCl y 100 µM tACPD (trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato) en un volumen final de 0.5 ml. La cantidad de PIP₂ basal, se determinaba mediante incubación de las muestras paralelamente en ausencia de tACPD. La reacción se paraba añadiendo 1.5 ml de cloroformo-metanol (1:2). Después se sonicaba la muestra y 50 µl se guardaban para la determinación de proteína. El contenido de ^3H -Ins-1-P (fosfatos de inositol marcados) se determinó siguiendo el método de *Berridge et al.* (29).

2.10.- Análisis estadístico.

Los resultados reflejados en este trabajo, son la media \pm DS. (desviación estándar). Los datos se analizaron usando análisis ANOVA de dos vías (two-way ANOVA). Cuando se utilizaron curvas de saturación y representaciones de Scatchard, los parámetros de unión se estimaron mediante el programa EBDA/LIGAND.

RESULTADOS

1.- MODELOS EXPERIMENTALES.

1.1.- Animales de experimentación usados.

Desde que Jones y colaboradores (181) describieron e identificaron el síndrome alcohólico fetal (SAF), se han publicado numerosos artículos para dilucidar los efectos teratogénicos del alcohol. Con el fin de conocer los mecanismos implicados en este síndrome, diversos investigadores han tratado de reproducirlo en animales de experimentación.

En los estudios con animales experimentales se persigue controlar la multitud de factores de riesgo que predisponen a la aparición del SAF. Estos factores de riesgo influirán en el grado de daño producido por la exposición fetal al etanol y, en el caso de humanos, los efectos directos del etanol difícilmente se pueden separar de dichos factores de riesgo: factores nutricionales, consumo de otras drogas, edad, número de hijos, factores sociológicos, etc.

Uno de los factores de riesgo más importantes es el de las deficiencias nutricionales y minerales que suelen acompañar al consumo de alcohol y que pueden producir un enmascaramiento en los efectos causados directamente por el etanol. Los estudios con animales experimentales permiten controlar tanto la malnutrición primaria asociada a la ingesta de alcohol como otros factores de riesgo anteriormente descritos.

Para evitar la aversión al alcohol que presentan los animales de experimentación, se han utilizado diferentes vías y formas de administración, entre las que se incluyen: la intubación; introducción del alcohol en el agua de bebida o en dietas líquidas; inyección intraperitoneal, subcutánea o intravenosa; inhalación de vapores, etc. (3).

En estudios con animales en los que se utilizan dietas líquidas, la nutrición se controla mediante la incorporación de un grupo de control nutricional que recibe diariamente las mismas calorías totales que las que ingiere el grupo de animales tratados con alcohol, pero en el que se sustituyen las calorías que proporciona el alcohol por carbohidratos. A este grupo control se le administra una cantidad de dieta líquida igual a la que consume el grupo alcohólico y por eso se le denomina grupo *pair-fed*. Muchos investigadores utilizan un tercer grupo de animales para controlar un posible factor de restricción en la comida y en la bebida que podría presentarse en el grupo *pair-fed*. A este tercer grupo se le suministra comida y bebida *ad libitum*. De esta manera, pueden controlarse y separarse las alteraciones producidas por el etanol y las debidas a la restricción alimentaria que se presentan en humanos.

De todas las especies de animales experimentales, los primates, los más próximos al hombre en la escala zoológica, serían los más adecuados para el estudio de los efectos teratogénicos causados por el etanol en el feto. Sin embargo, estos animales suelen ser descartados por su elevado coste, largo periodo de gestación y bajo número de crías. Por esta razón gran parte de los estudios se han realizado en roedores (ratas y ratones). Estos

animales tienen las ventajas de su bajo coste, el corto periodo de gestación (21-22 días), del elevado número de crías por camada (10-14 crías) y de su fácil manipulación.

Según los diferentes autores, el tiempo de exposición al etanol varía: algunos días durante un determinado periodo de desarrollo; durante toda la fase gestacional; durante gestación y lactancia e incluso administrando etanol anteriormente a la gestación un tiempo más o menos extenso.

En nuestro laboratorio hemos utilizado ratas descendientes de hembras alcohólicas que presentaban tolerancia y dependencia al alcohol antes de la gestación. Esto nos ha permitido reproducir gran parte de los efectos que se observan en niños con SAF, ya que el síndrome completo solo se ha descrito en hijos de mujeres alcohólicas crónicas. El alcohol era introducido por medio de dieta líquida y las hembras se mantenían con esta dieta durante toda la gestación y la lactancia (para el desarrollo postnatal) (133,137,251). Mediante este modelo hemos observado que los descendientes de madres alcohólicas poseen malformaciones fetales, mortinatos, alteraciones en el crecimiento (358,359), hormonales (355,356), etc.

1.2.- Cultivos primarios de células astrogliales.

Los estudios con células en cultivo *in vitro* permiten completar los realizados *in vivo*, sobre todo en estudios de citotoxicidad, ya que se obtienen una serie de ventajas, como son:

- Poder mantener y aislar un solo tipo celular para estudiar la acción del agente tóxico sobre los diferentes tipos celulares aislados. También se pueden realizar estudios con dos tipos celulares para observar las diferentes interrelaciones que se establecen entre ambos.

- La separación de las células del organismo permite controlar diferentes factores del entorno que influirían en las células en caso de encontrarse dentro del organismo, como son factores endocrinos, nutritivos, etc.

- Posibilidad de que el agente tóxico se encuentre en contacto directo con las células sin ninguna barrera que lo impida.

- Las células son repartidas en placas de cultivo a partir de un homogeneizado celular, lo que permite estudios comparativos del efecto del tóxico a diferentes concentraciones (dosis-respuesta), tiempo de exposición, variaciones del medio, etc.

- Además, la evaluación *in vitro* permite observar la célula viva directamente con todas las ventajas que ello conlleva.

Los cultivos celulares obtenidos de tejidos u órganos procedentes de organismos vivos y que no han sido subcultivados se denominan cultivos primarios y tienen la ventaja de presentar un patrón de desarrollo *in vitro* comparable al de las células *in vivo* (246). Respecto a la ventaja de los cultivos primarios de células neurales, durante los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de la estructura y función de los diferentes tipos de células nerviosas, debido a la ventaja de poder obtener cultivos primarios

de un único tipo celular de una determinada zona o región del cerebro. Hay que destacar que el sistema nervioso central es complejo por su gran heterogeneidad, tanto a nivel zonal como a nivel celular.

En nuestro caso, los cultivos primarios, tanto de glía radial como de astrocitos, poseen una gran pureza o escasa contaminación de otros tipos de células nerviosas. En ambos tipos de cultivo la posible contaminación se ha examinado mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra proteínas específicas de neuronas, así como la posible contaminación de oligodendrocitos, obteniéndose una pureza del 99% del tipo celular deseado.

2.- PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ASTROGLIALES DEL CITOESQUELETO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIOFETAL. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL.

Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio demuestran que durante el desarrollo del SNC los astrocitos procedentes de madres alcohólicas, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, se encuentran afectados, presentando un menor crecimiento general, menor síntesis de proteínas y ADN, alteraciones en su citoesqueleto con disminución en el contenido y distribución de la GFAP (proteína marcadora de astrocitos), modificaciones en las glicoproteínas de membrana, etc. Todos estos datos demuestran que la exposición al etanol altera el desarrollo de la astrogía, cosa que ocurre principalmente durante el periodo postnatal en la rata. Esto da a entender que el etanol, posiblemente, afecta a las células precursoras de los astrocitos o glía radial. Por tanto, nuestro primer objetivo fue analizar el efecto de la exposición prenatal al etanol sobre el desarrollo de glía radial en cerebros en edad embriofetal.

2.1.- Niveles de GFAP, vimentina y Rat-401 en cerebro durante el desarrollo fetal. Efecto del alcohol.

Para el estudio del desarrollo de la glía durante el periodo fetal se analizaron diferentes proteínas que están presentes en glía radial y se detectaron mediante inmunotransferencia. En concreto, las proteínas que se analizaron fueron:

- a) Rat-401 (marcadora específica de glía radial);
- b) vimentina, que durante esta etapa se encuentra presente tanto en glía radial como en neuronas; y
- c) GFAP que, aunque se expresa durante la etapa postnatal, hemos podido detectarla durante la etapa fetal.

Las diferentes proteínas se estudiaron a los días 15 y 21 fetal, tanto en animales control como en animales prenatalmente expuestos al alcohol. Para la inmunodetección se

utilizó citoesqueleto o fracción insoluble en Tritón X-100 y las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 14).

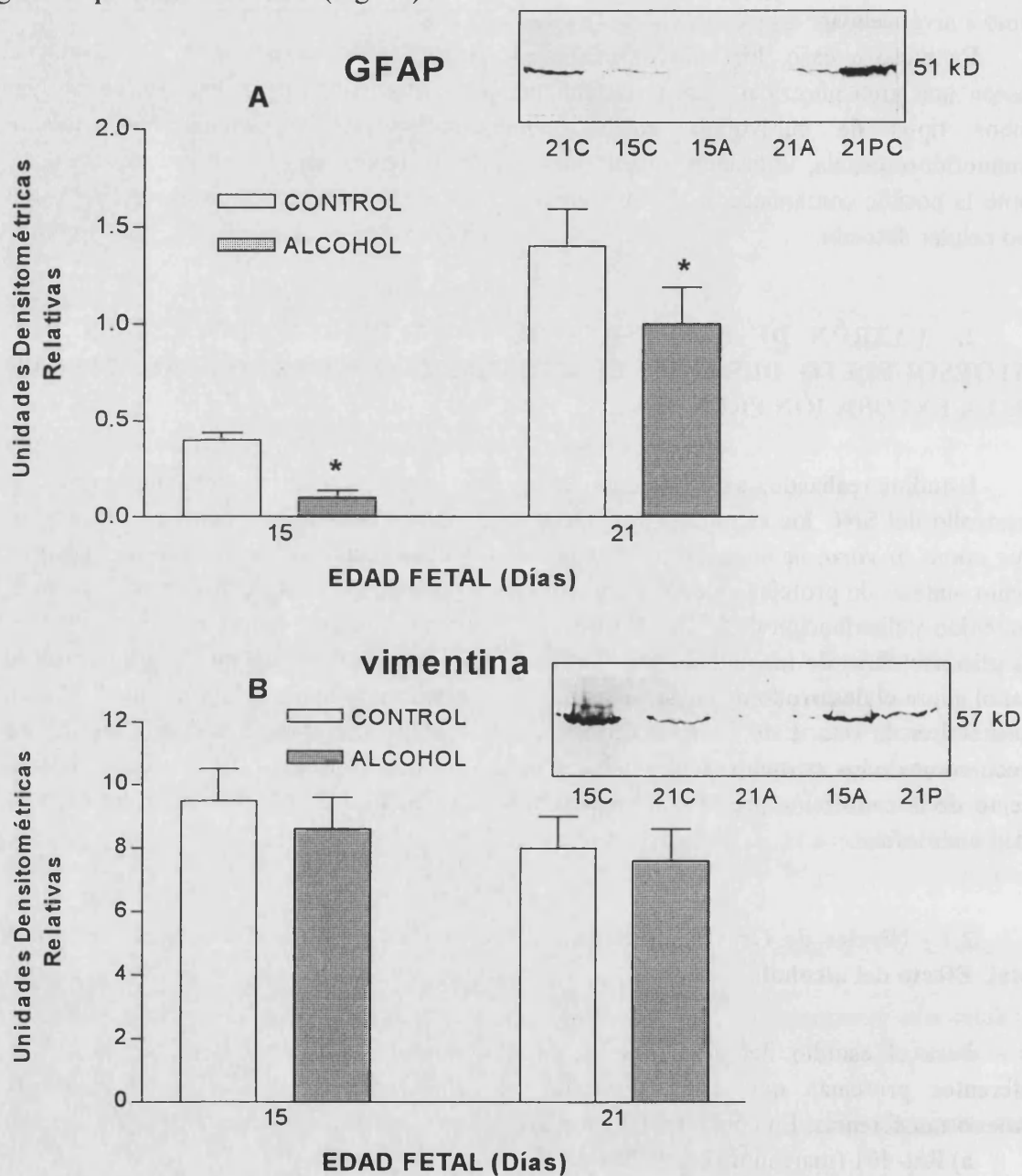


Fig. 14. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias (GFAP y vimentina) obtenidas durante el desarrollo fetal de cerebro en animales control y expuestos prenatalmente al etanol. Cambios en los niveles de la proteína GFAP; concentración de proteína constante (60 μ g/línea) (A). Cambios en los niveles de la proteína vimentina; concentración de proteína constante (15 μ g/línea) (B). Se muestran inmunotransferencias representativas. Cada punto es la media \pm DS. de tres diferentes preparaciones de citoesqueleto. * $P < 0.0169$ vs. control.

Cuando se analizó la proteína GFAP se obtuvo una única banda de 51kD que se detectó en todos los días analizados utilizando un anticuerpo monoclonal. Para poder detectar la presencia de GFAP en el día 15 fetal (15F) y puesto que estudios anteriores no habían podido demostrar la presencia de esta proteína durante el periodo fetal, se utilizó en el gel una alta concentración de proteína (60 µg. por línea). Como se muestra en la figura 14A, a 15 días fetal empieza a apreciarse la GFAP, aumentando sus niveles unas 3 veces a los 21 días (21F) y siendo este valor aproximadamente 12 veces menor que el que se observa en el animal adulto.

La exposición prenatal al alcohol indujo a una disminución significativa en los niveles de GFAP en todos los días analizados. De hecho, en algunos casos no se pudo detectar la GFAP en estos animales. Estos datos parecen sugerir que esta proteína, al igual que ocurre en el periodo postnatal, también resulta afectada durante el desarrollo de la glía radial.

Como ya se indica en la introducción, la GFAP es una proteína específica de cerebro que se expresa en filamentos intermedios de astrocitos, formando copolímeros con otra molécula de GFAP o bien formando heteropolímeros con la vimentina. Por lo tanto, quisimos evaluar el efecto del etanol en los niveles de vimentina durante esta fase fetal.

Como se muestra en la figura 14B, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la vimentina obtuvimos una única banda de aproximadamente 57 kD. Puesto que la vimentina se expresa de forma importante durante la fase embrionaria, para la detección de esta proteína se utilizaron solo 15 µg en todos los días analizados. El patrón de desarrollo de la vimentina fue diferente al de la GFAP, observándose altos niveles a los 15 días fetal y disminuyendo levemente su contenido en el día 21 fetal. La cantidad relativa de esta proteína con respecto a la GFAP fue mucho mayor y además, en el caso de los animales PEA, la vimentina presentó un decremento no significativo con respecto a los valores control (Fig. 14B).

Cuando se determinó la Rat-401 se obtuvo principalmente una banda de aproximadamente 200 kD (Fig. 15). Como se puede observar en la figura 15, los niveles de esta proteína en cerebros de fetos de 15 días fueron elevados, disminuyendo a lo largo del desarrollo fetal. Este patrón de desarrollo es opuesto al que se obtiene con la GFAP. De hecho, estos resultados son coherentes si se piensa que durante la transformación de glía radial a astrocitos, la Rat-401 va disminuyendo a medida que aumenta la GFAP (158).

2.2.- Análisis de la expresión de las proteínas GFAP y vimentina durante el desarrollo fetal.

Para investigar si la disminución de GFAP que observábamos tras la exposición prenatal al etanol era debida a una disminución en sus niveles de ARNm, decidimos analizar el nivel de expresión de la vimentina y GFAP en cerebros de fetos controles y expuestos al etanol. Hay que tener en cuenta que hasta el momento no existía ningún trabajo que hubiese analizado ni la expresión de la vimentina ni la expresión de la GFAP durante la etapa embriofetal en el desarrollo del cerebro.

Los niveles ARNm de la GFAP y de la vimentina se analizaron en cerebros de rata en varias etapas del desarrollo fetal (15,17,19 y 21 días fetal). Se realizaron análisis de ARNm mediante la técnica de *Northern blot*, usando como sondas un ADNc específico de la GFAP y de la vimentina (215).

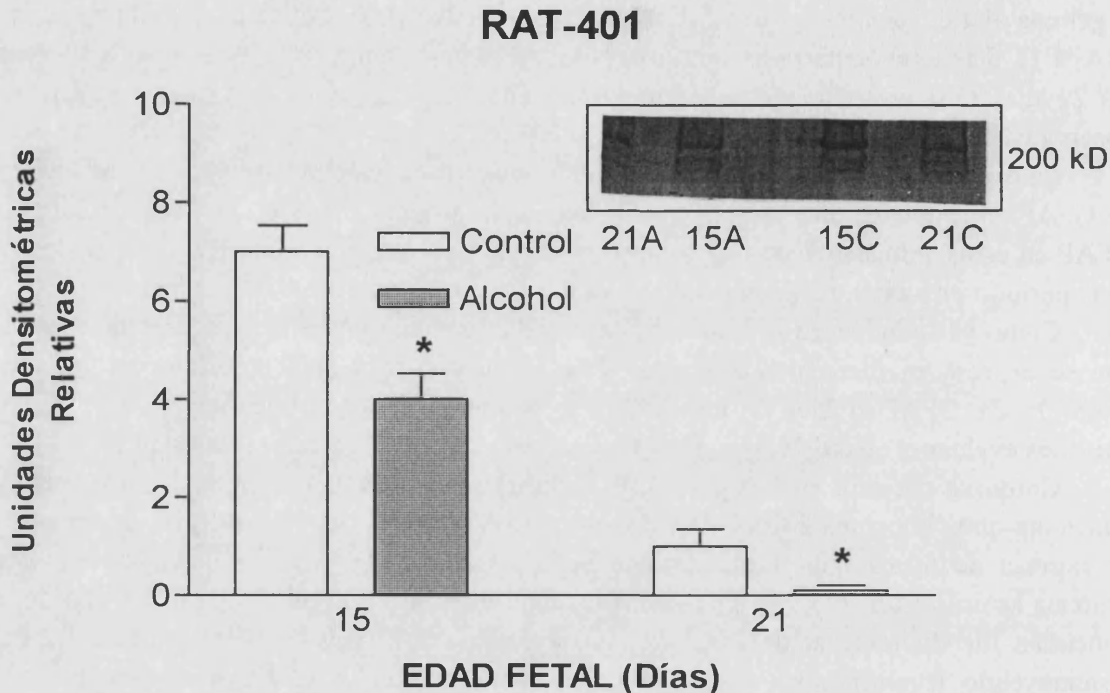


Fig. 15. Análisis densitométrico obtenido de las inmunotransferencias utilizando un anticuerpo anti-Rat-401 durante el desarrollo fetal de cerebro en animales control y expuestos al etanol. * $P < 0.011$ vs. control.

La figura 16A muestra los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo cerebral fetal. Para detectar la expresión de la GFAP se usaron concentraciones altas de ARN total (50 $\mu\text{g}/\text{línea}$) y también se dejaron las autorradiografías expuestas durante un largo periodo de tiempo (10-15 días). Bajo esas condiciones, se detectó una única banda de 2.7 kb. de ARNm de la GFAP a día 15 fetal. El nivel de ARNm se incrementó casi 6 veces desde el día 15 fetal hasta el día 21 fetal. La exposición al alcohol produjo una disminución significativa en los niveles de ARNm de la GFAP en el cerebro fetal, a todos los días analizados (Fig. 16A). Estos resultados son coherentes con la disminución de la cantidad de proteína GFAP que se observa en cerebros expuestos al alcohol y sugieren que este tóxico afecta al desarrollo de la glía radial. Paralelamente, también se examinó el patrón de expresión de la vimentina durante la etapa fetal. Como se observa en la figura 16B, obtuvimos un único transcrito a 2.1 kb. El análisis *Northern* reveló que los niveles de ARNm de la vimentina son muy elevados en el día 15 fetal y luego disminuyen aproximadamente unas 6 veces en el día 21 fetal (Fig. 16B).

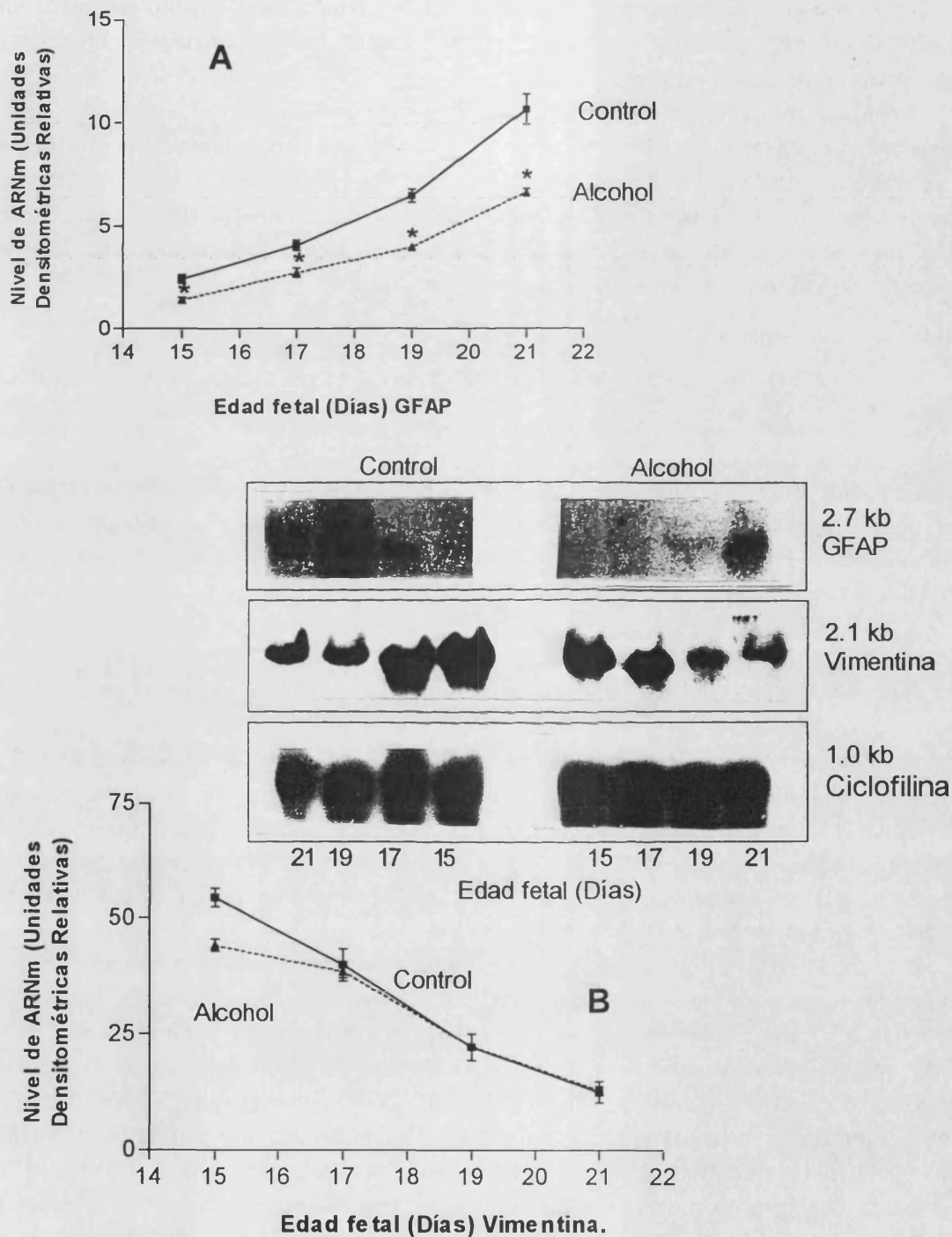


Fig. 16. Análisis densitométrico (Northern blot) de los niveles de ARNm de la GFAP (A) y de la vimentina (B) en ratas control y prenatalmente expuestas al etanol durante el desarrollo fetal del cerebro. ARN constante (A: 50 µg/línea; B: 15 µg/línea). Northern blot representativo. El ARNm de la ciclofilina se presenta como un control de la cantidad y la integridad del ARN. Cada valor representa la media ± DS. de cuatro experimentos diferentes. *P < 0.001 vs. control, por análisis ANOVA de dos vías.

La expresión de la vimentina en cerebros de fetos expuestos al alcohol demostró un patrón de evolución similar al observado en fetos control, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

Como control de la cantidad de ARN a lo largo de todo el desarrollo, se rehibridaron las mismas membranas con ciclofilina. Se ha demostrado que la ciclofilina es una proteína que se expresa a igual nivel a lo largo de todo el desarrollo cerebral, por lo que puede servir como un buen control en este tipo de estudios (201). Como se muestra en la figura 16, se detectó un único transcrito de ARNm a 1 kb. que, además, se expresó a niveles constante a lo largo de todo el desarrollo y de los tratamientos analizados.

3.- EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA GLÍA RADIAL EN CULTIVO PRIMARIO.

Los anteriores resultados nos sugerían que la exposición al alcohol alteraba el desarrollo de la glía radial; por esta razón decidimos poner a punto un procedimiento para aislar solamente glía radial y analizar y comprobar más específicamente los resultados obtenidos *in vivo*.

3.1.- Caracterización del cultivo primario de glía radial.

Los cultivos de glía radial se realizaron según el procedimiento de *Culican et al.* (68), con algunas modificaciones. Puesto que el procedimiento específico ya se ha descrito en material y métodos, solo vamos a describir en este apartado la caracterización de las células mediante estudios de inmunofluorescencia. Una de las ventajas de las células en cultivo primario es que se pueden estudiar los posibles cambios morfológicos que puede producir en ellas la exposición al etanol.

Para caracterizar el cultivo realizamos doble marcado mediante la utilización de dos anticuerpos al mismo tiempo, uno monoclonal y otro policlonal. Los cultivos se analizaron en los días 2,5,7,10,15 y 18. Se utilizaron varios anticuerpos marcadores de glía radial anti-GFAP, anti-vimentina y anticuerpo Rat-401 y dos anticuerpos para detectar la posible contaminación neuronal (neurofilamento 160 y MAP-2). Al comienzo del cultivo -día 2-3- las células presentaron largos procesos delgados y no ramificados que partían del pequeño cuerpo celular. Estas células se marcaron fuertemente con vimentina y Rat-401 (Fig. 17). También se encontraron muchas células formando agrupaciones celulares redondeadas y pequeñas, como describe *Culican et al.* (68). Ocasionalmente, algunas células positivas al Rat-401 mostraron una morfología estrellada, con tres o más procesos cortos que, normalmente, no estaban ramificados.

A los días 5-7 de cultivo empezaron a aparecer células que se marcaban con GFAP junto con células positivas para vimentina y Rat-401. El número de células de morfología estrellada aumentó y el número de células mono o bipolares declinó.

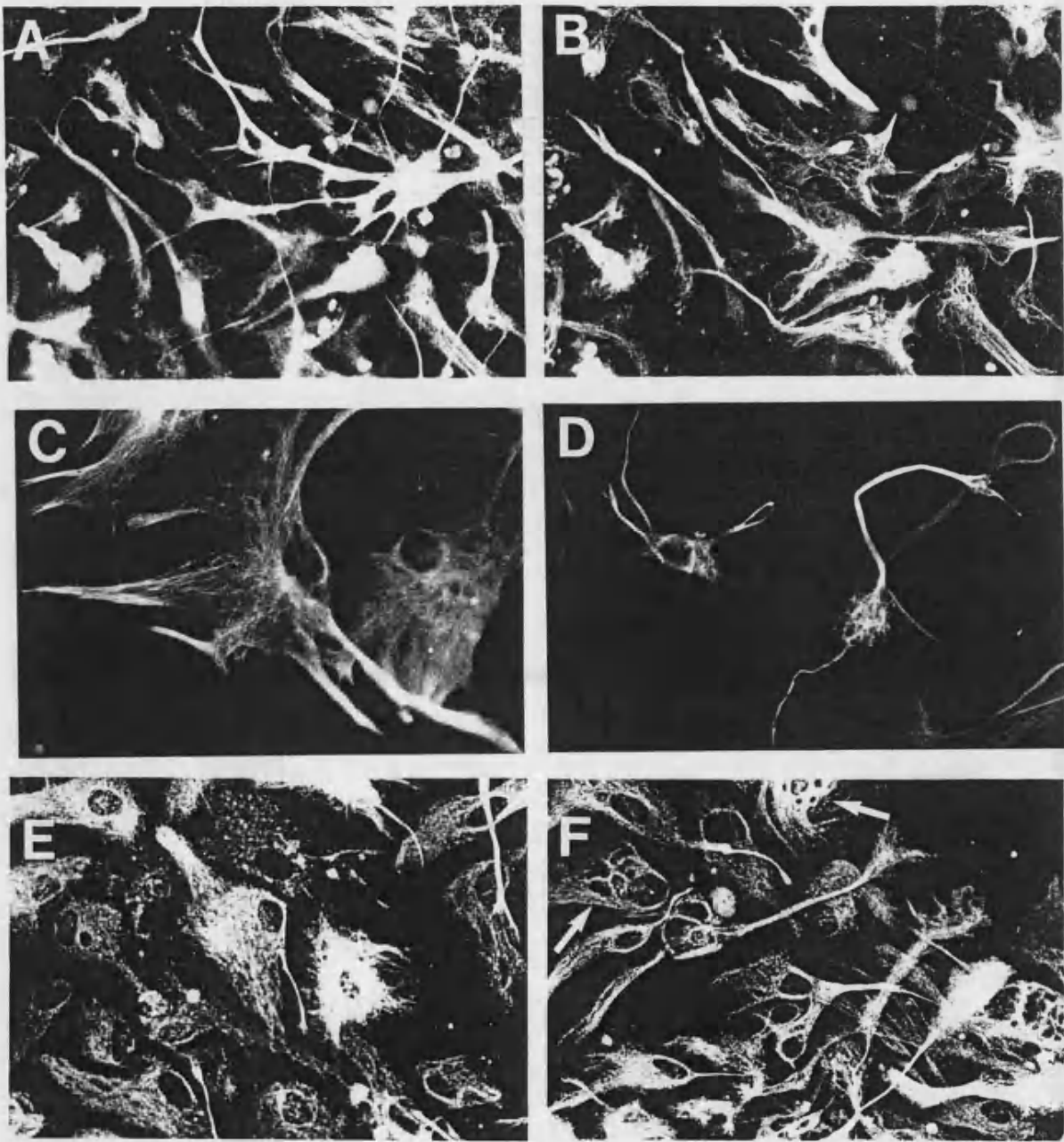


Fig. 17. Fotografías en las que se muestran las características de las inmunofluorescencias de la glía radial en cultivo primario de células control (A,B,C,E) y PEA (D,F). A,B: Células de glía radial control a 10 días de cultivo, doble marcado con Rat-401 (A) y GFAP (B). Inmunofluorescencia con GFAP de células a 15 días (C,D) y 18 días (E,F) de cultivo. Como se indica, el alcohol altera la morfología celular (D) y el patrón del citoesqueleto (F, como indica la flecha). A,B,E,F, $\times 900$; C,D $\times 1200$.

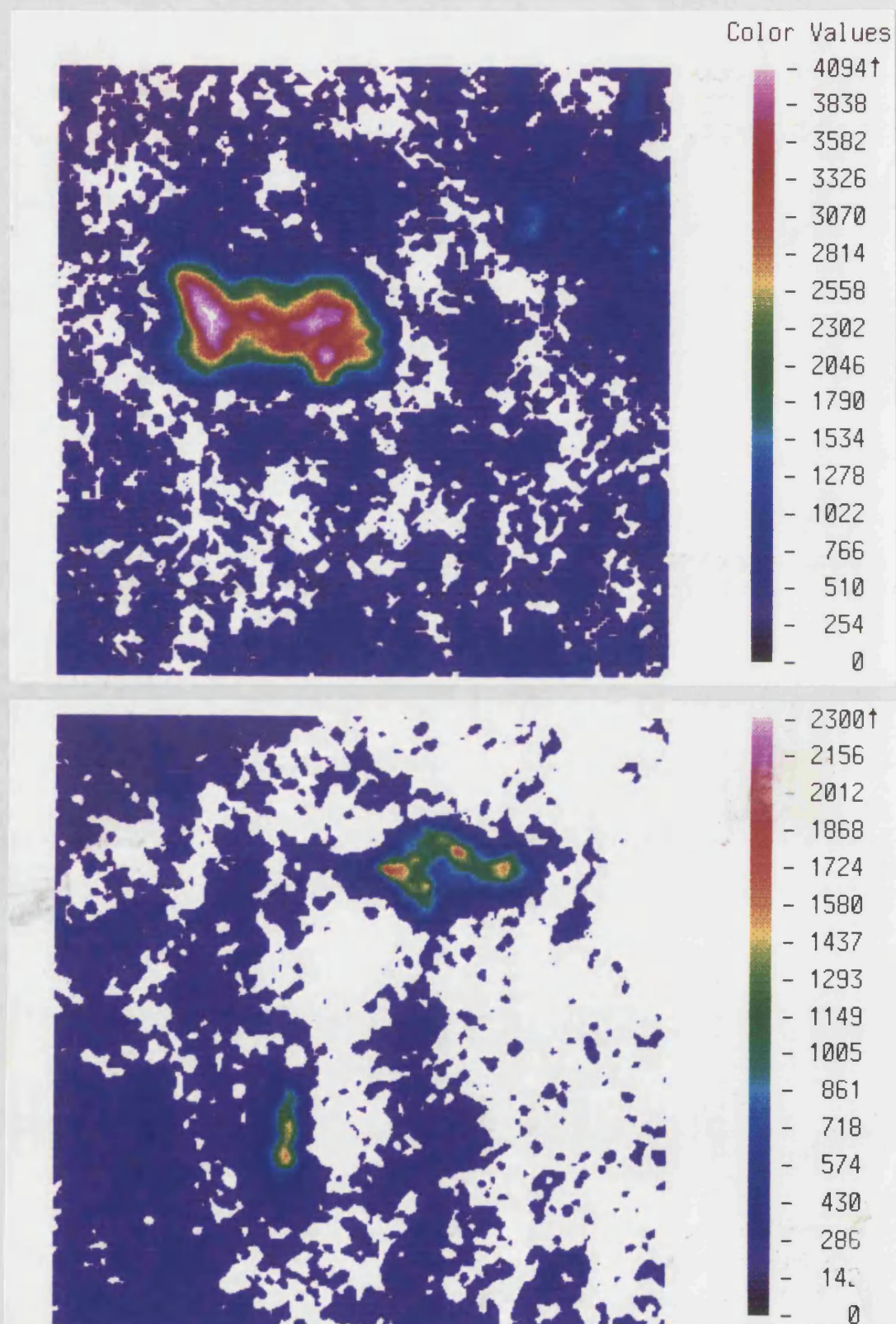


Fig. 18. Células de glía radial en cultivo primario incubadas con anti-MAP-2 para cuantificar la contaminación neuronal. Microscopía confocal.

Al día 10 de cultivo (Fig. 17), las células estrelladas desarrollaron más procesos, apareciendo gran número de ellos ramificados e incrementando aproximadamente tres veces las células que se teñían con GFAP y disminuyendo las células positivas a la Rat-401.

El anticuerpo anti-MAP-2 se utilizó para identificar la posible contaminación por neuronas del cultivo de glía radial. Mediante microscopía confocal se determinó el número de neuronas, siendo éste menor de un 1% (Fig. 18).

Como muestra la figura 17, cuando la glía radial procedía de cerebros de ratas prenatalmente expuestas al alcohol, ésta presentó diversas alteraciones, entre las que cabe destacar:

- a) la longitud de los procesos gliales, característicos de estas células, era más corta que en células control;
- b) a los 15 días de cultivo, el número de células estrelladas era menor en alcohol, apareciendo todavía un gran número de células de morfología similar a la glía radial;
- c) la aparición de la GFAP se retrasó unos 2 días (día 7-8 de cultivo) en las células alcohol;
- d) las células PEA mostraron alteraciones en su citoesqueleto, como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio por Sáez *et al.* (351).

3.2.- Patrón en los niveles de las proteínas GFAP y vimentina en cultivo primario de glía radial. Efecto de la exposición prenatal al etanol.

El análisis del patrón de evolución de la GFAP y vimentina a diferentes días del cultivo de glía radial se realizó mediante inmunotransferencia.

Como muestra la figura 19A, en cultivo control la GFAP empezó a detectarse en el día 5 de cultivo y se incrementó progresivamente, llegando a alcanzar valores 10 veces superiores en el día 14 de cultivo. Respecto a la vimentina, a los dos días de cultivo ya se obtuvo una banda con relativa intensidad y los niveles de esta proteína se incrementaron ligeramente (1.5 veces) en el día 14 de cultivo (Fig. 19B).

Cuando la glía radial se obtuvo de cerebro de 13 días procedente de fetos de madre alcohólica, se observaron dos efectos en la proteína GFAP:

- 1) en muchos cultivos la GFAP no apareció hasta el día 7 de cultivo, retrasándose aproximadamente 2 días con respecto al cultivo control;
- 2) aunque el patrón de evolución no varió con respecto a controles, durante el cultivo existió una disminución significativa en la intensidad de las bandas obtenidas en la inmunotransferencia.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante inmunofluorescencia, en los que se observó un retraso en la aparición de la GFAP y en la transformación de glía radial a astrocitos, así como la aparición de células más pequeñas.

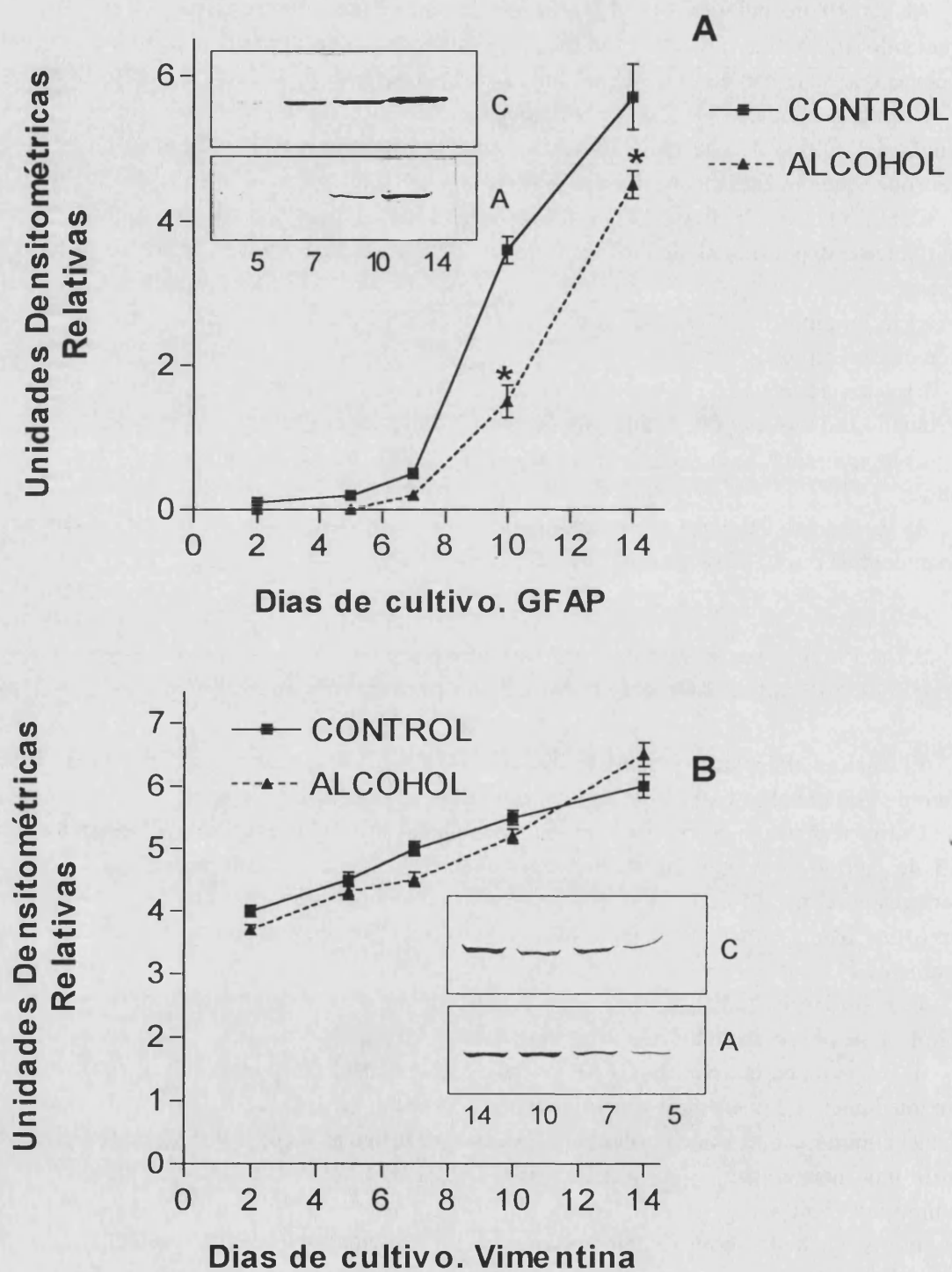


Fig. 19. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias demostrando los niveles de GFAP (A) y vimentina (B) de células de glía radial control y PEA a diferentes días de cultivo. Concentración de proteína constante (10 $\mu\text{g}/\text{línea}$). Se muestran inmunotransferencias representativas. Cada punto representa la media \pm DS. de tres diferentes cultivos. Análisis ANOVA de dos vías * $P < 0.002$ vs. control.

3.3.- Niveles del ARNm de la GFAP y vimentina en glía radial. Efecto del alcohol.

Para analizar los cambios moleculares que pudieran conducir a una disminución en el contenido de GFAP y vimentina, se analizaron sus niveles de ARNm mediante la técnica de *Northern blot* a diferentes días de cultivo (6, 10 y 14).

Como se demuestra en la figura 20A, el primer día que se pudo detectar el ARNm de la GFAP fue el día 6 de cultivo en células control. A medida que las células maduraron y se transformaron en astrocitos, los niveles de ARNm de la GFAP se incrementaron hasta casi 13 veces en el día 14 de cultivo (Fig. 20A).

Cuando se analizaron las células PEA se observó un retraso en la expresión de la GFAP, ya que no fue posible detectar ARNm al día 6 de cultivo como en células control. Por otra parte, los niveles de ARNm también se incrementaron entre los días 10 y 14 (Fig. 20A), pero éstos fueron significativamente más bajos que los niveles control.

La expresión de la vimentina por análisis *Northern* reveló altos niveles de ARNm en el día 6 de cultivo (Fig. 20B). Posteriormente, los niveles se incrementaron aproximadamente dos veces a 14 días de cultivo.

Este patrón de evolución no se correspondió con el que se había obtenido *in vivo*, ya que mientras en el periodo embrionario la expresión de la vimentina disminuía durante la maduración de la glía radial, en células en cultivo los niveles de expresión de esta proteína aumentaron. Esta posible discrepancia aunque se comentará en el apartado de discusión, creemos que es debida a la multitud de especies de tipos celulares que, durante el periodo embrionario expresan inicialmente vimentina y que posteriormente sustituyen la expresión de esta proteína por otras más específicas (ej. neuronas). Sin embargo, en el caso de glía radial la vimentina se encuentra en filamentos intermedios y sigue expresándose en astrocitos ya que copolimeriza con la GFAP.

Respecto a la expresión de esta proteína, en células PEA se observó que también se encontraba afectada por la exposición al alcohol, ya que sus niveles fueron relativamente menores con respecto a los de control, aunque el patrón fue similar en ambos tipos de células.

Como en los apartados anteriores, se utilizó el gen de la ciclofilina como control para determinar que los niveles de ARN usados en ambos tipos de cultivo eran los mismos y, por lo tanto, la afectación de la disminución de expresión de la GFAP y vimentina era un decremento real. Como se muestra en la figura 20, en ambos tipos de cultivo y en los diferentes puntos analizados se obtuvo una expresión constante del gen de la ciclofilina.

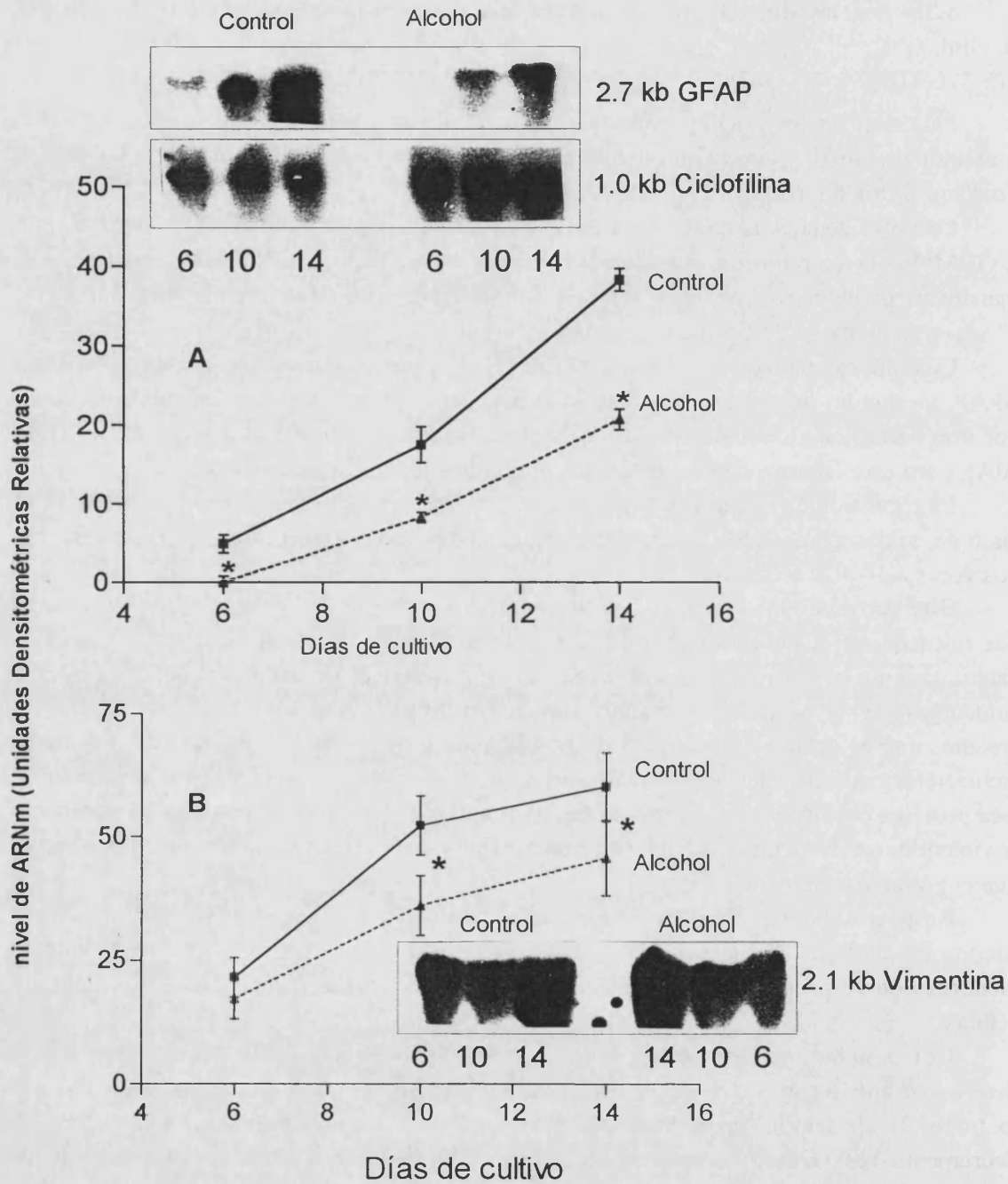


Fig. 20.- Análisis densitométrico de los niveles ARNm de la GFAP (A) y vimentina (B) de células de glía radial control y PEA a diferentes días de cultivo. Concentración de ARN constante (20 μ g/línea). Se muestran autorradiografías representativas de los *Northern blot*. Cada valor es la media \pm DS. de cuatro cultivos diferentes. El ARNm de la ciclofilina se presenta como un control de la cantidad y de la integridad del ARN. *P (GFAP) < 0.001 vs. control. *P (vimentina) < 0.02 vs control. (ANOVA de dos vías).

4.- CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA GFAP Y VIMENTINA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.

Hasta ese momento, habíamos demostrado que la exposición al alcohol alteraba el desarrollo de la glía radial y la expresión de la GFAP durante el periodo fetal o desarrollo de la glía radial; por lo tanto, nuestro próximo objetivo era estudiar si la expresión de esta proteína resultaba también afectada durante el desarrollo postnatal o periodo de rápido crecimiento del cerebro, debido principalmente al desarrollo de la astrogliá y la diferenciación neuronal que se producen.

En la figura 21 se muestra cómo durante los 30 primeros días del periodo postnatal en la rata, el peso del cerebro aumenta aproximadamente 10 veces con respecto al peso que posee el animal a los 21 días de gestación. También se observa cómo disminuye significativamente el desarrollo del cerebro con la exposición al alcohol, sugiriendo una disminución en el desarrollo de la astrogliá.

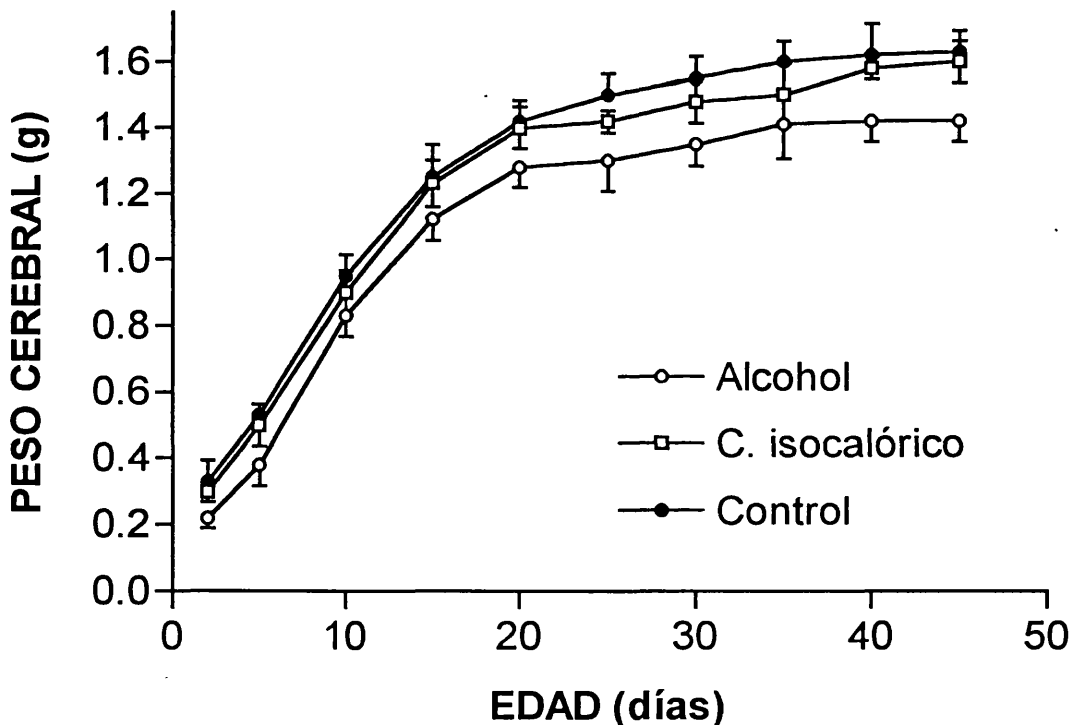


Fig. 21. Efecto de la exposición prenatal y postnatal al etanol en el peso del cerebro. Cada punto representa la media \pm DS. de 8-10 crías procedentes de 3-4 diferentes camadas. * $P < 0.01$ vs. grupo control isocalórico (ANOVA de dos vías).

4.1.- Patrón de evolución de la GFAP y vimentina durante el desarrollo postnatal. Efecto de la exposición al alcohol

Durante el desarrollo postnatal en la rata, se produce el periodo de rápido crecimiento del cerebro, caracterizado, entre otros eventos, por el desarrollo de la astrogliá. Como se muestra en la figura 22A, la GFAP se incrementó aproximadamente 13 veces desde el día 21 fetal hasta el día 21 postnatal. Así, los niveles de GFAP en el día 21 postnatal representaron un 80-90% del valor que se obtiene en el animal adulto, lo que nos demuestra que en este día la astrogliá está casi completamente desarrollada.

Cuando se analizó la vimentina, el patrón de evolución de esta proteína fue completamente opuesto al de GFAP. Así, en la figura 22A se muestra que la banda más intensa obtenida mediante inmunotransferencia apareció en el día 21 fetal, disminuyendo los niveles progresivamente y alcanzando valores aproximadamente 4 veces menores a los 14 días del periodo postnatal. Hay que resaltar que en el caso de esta proteína los valores obtenidos en el animal adulto fueron similares a los que se obtuvieron en el día 21 postnatal.

La exposición prenatal al alcohol produjo, al igual que en el periodo fetal, una disminución significativa en los niveles de GFAP, aunque el patrón de evolución de esta proteína durante el periodo de desarrollo del cerebro fue similar al que se obtuvo con los animales control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se analizaron los niveles de vimentina en cerebros de animales expuestos al alcohol (Fig. 22B). Puesto que la GFAP es una proteína marcadora de astrocitos, estos resultados demuestran que la exposición al alcohol retrasa el desarrollo de la astrogliá y, además, sugieren que existe un efecto específico del etanol sobre la GFAP, ya que no se han observado alteraciones en la vimentina.

Hay que destacar que la evolución de estas proteínas se realizó en la fracción del citoesqueleto o fracción Tritón X-100 soluble y en todos los casos y periodos se utilizó una cantidad constante de proteína (20 µg/línea).

4.2.- Expresión de la GFAP y de vimentina durante el desarrollo postnatal. Efecto del alcohol.

Al igual que en los apartados anteriores, quisimos investigar si había correspondencia entre los cambios en los niveles de la GFAP y los cambios en su ARNm. Para este objetivo se realizaron análisis *Northern* utilizando ADNc específicos para la GFAP y vimentina.

La figura 23A muestra que cuando se usaron niveles constantes de ARN total (15 µg/línea), se detectó una única banda de 2.7 kb. de ARNm y que, además, la expresión de la GFAP se incrementó aproximadamente 2 veces desde el día 4 hasta el día 14 postnatal. Posteriormente se produjo un pequeño decremento en los niveles de ARNm en el día 21 postnatal, permaneciendo constante en este nivel de expresión y siendo éste similar al que se obtiene en el cerebro adulto.

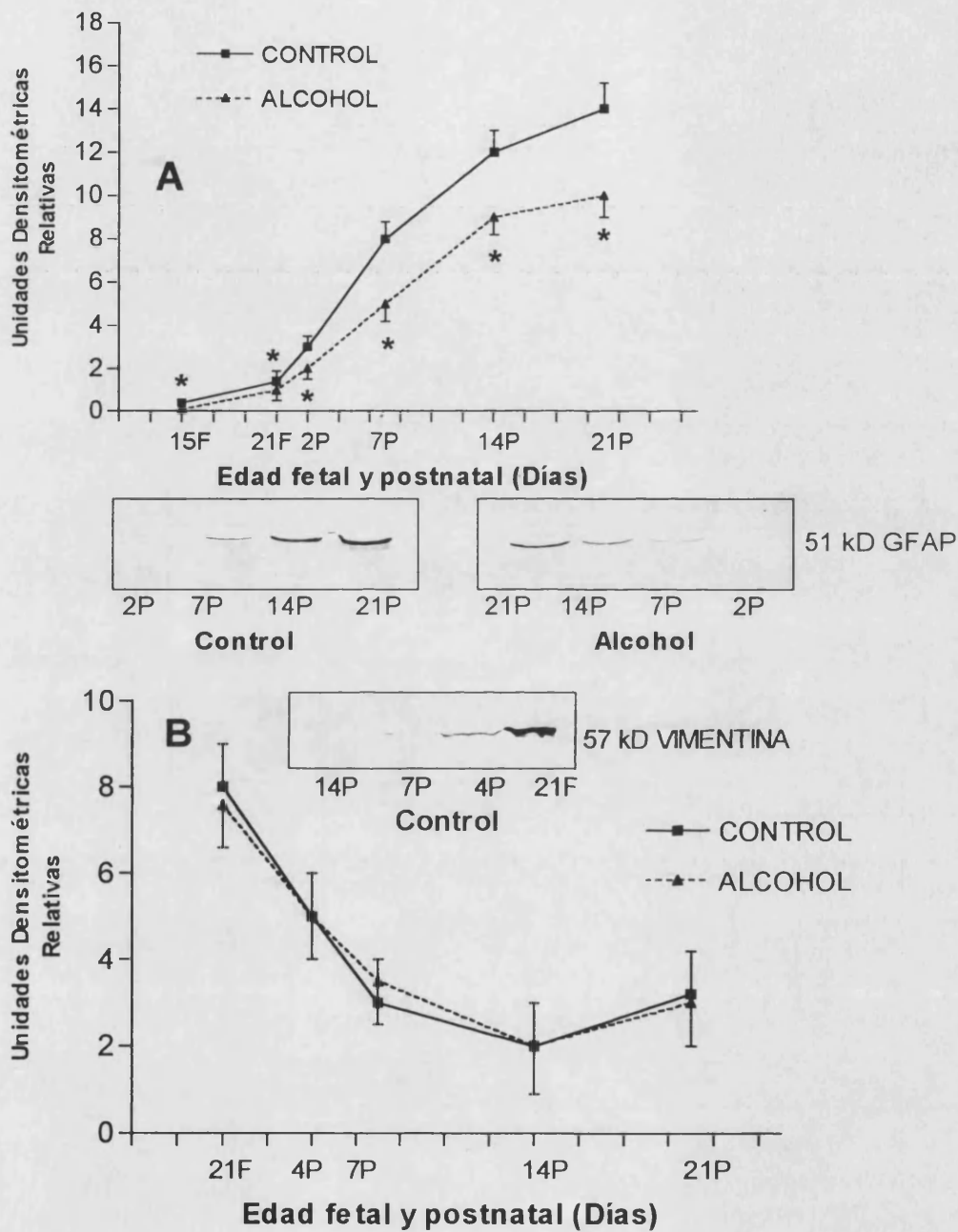


Fig. 22. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias de la GFAP (A) y de la vimentina (B) durante el desarrollo fetal y postnatal de cerebro de ratas control y PEA. Concentración de proteína constante (20 µg/línea). Se muestran inmunotransferencias representativas. Cada punto es la media ± DS. de tres diferentes preparaciones. *P < 0.001 vs. control (ANOVA de dos vías).

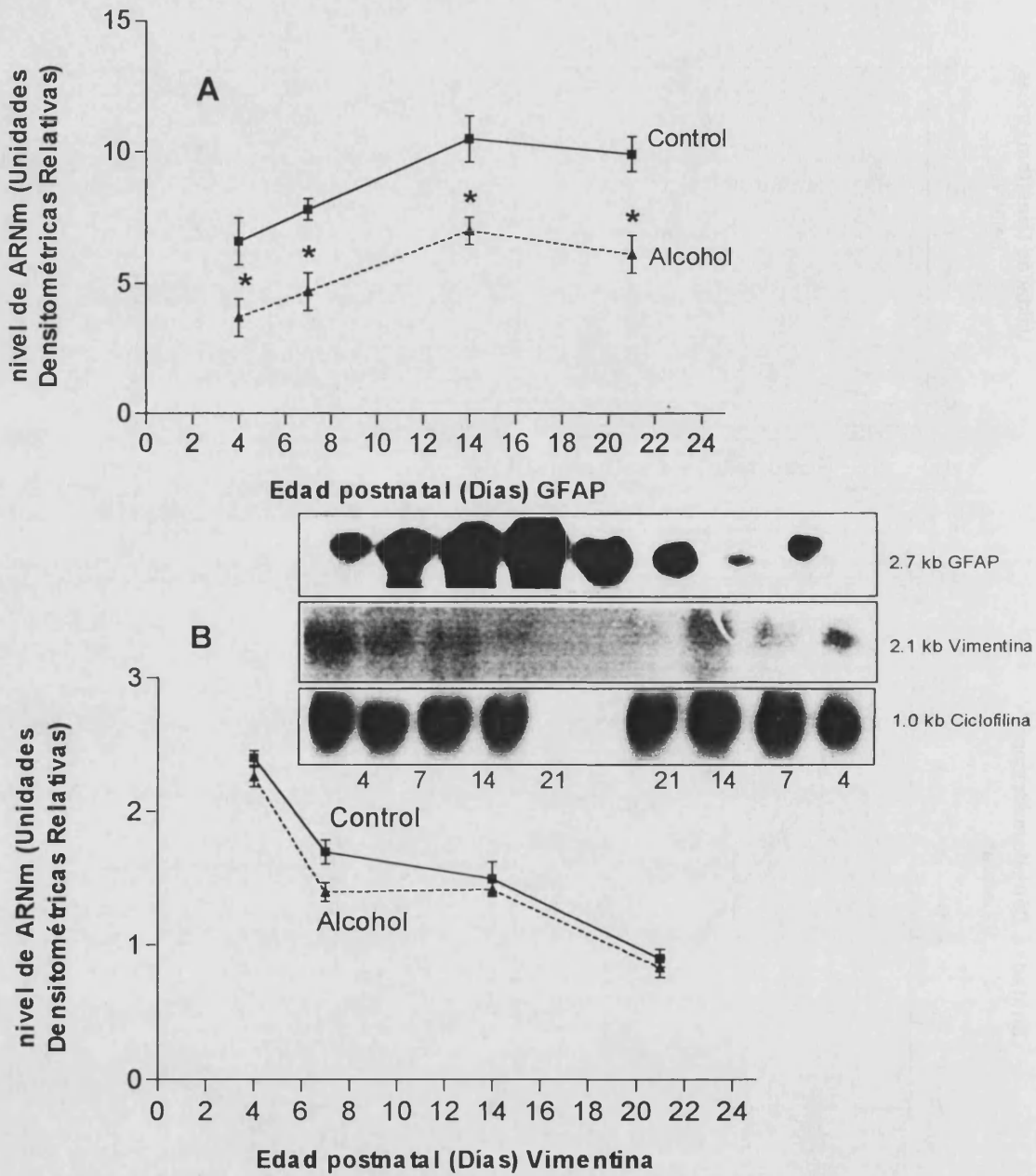


Fig. 23. Análisis densitométrico (Northern blot) de la expresión de GFAP (A) y vimentina (B) durante el desarrollo de cerebro (fetal y postnatal) de ratas control y prenatalmente expuestas al etanol. Concentración de ARN constante (15 µg/línea). Se muestran autorradiografías representativas de los Northern blot. ARNm de la ciclofilina se usa como control de la cantidad e integridad del ARN. Cada valor es la media ± DS. de cuatro diferentes muestras. *P < 0.001 vs. (ANOVA de dos vías).

En los animales prenatalmente expuestos al etanol se observó un descenso en el nivel de expresión de la GFAP en todos los puntos analizados (4,7,14 y 21 postnatal) con respecto a los animales control.

Estos resultados sugieren que el alcohol afecta al desarrollo de los astrocitos en el cerebro de la rata.

Cuando se analizó la vimentina se observó que el patrón de expresión de esta proteína era completamente diferente al desarrollado por la GFAP. El nivel de expresión fue máximo al principio del periodo postnatal, disminuyendo conforme avanzaba el desarrollo del cerebro, con un decrecimiento de aproximadamente de 2.5 veces desde el día 4 al día 21 postnatal (Fig. 23B).

Estos datos coinciden con el patrón que obtuvimos de esta proteína durante el desarrollo postnatal de cerebro.

En el caso de los animales expuestos al alcohol, el decrecimiento observado durante el desarrollo siguió el mismo patrón que el observado en animales control y, además, no se apreciaron diferencias significativas en ninguno de los puntos examinados con respecto a los mismos puntos de desarrollo en los animales control, siendo el valor de (Fig. 23B).

Posteriormente a la exposición autorradiográfica, las membranas se rehibridaron con una sonda para ciclofilina. Con ello se demostró que se había utilizado la misma cantidad de ARN en todos los puntos del desarrollo analizados y en ambos grupos.

5.- EXPRESIÓN DE LA GFAP Y VIMENTINA DURANTE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL.

Estudios anteriores de nuestro laboratorio [Sáez *et al.* (351)], habían demostrado que la exposición prenatal al alcohol alteraba la proliferación y diferenciación de astrocitos además de la distribución y la cantidad de la GFAP (Fig. 24).

Por lo tanto, en el presente estudio nos planteamos analizar si esta disminución de GFAP estaba correlacionada con alteraciones en su ARNm.

5.1.- Efecto del etanol en los niveles de GFAP y vimentina en astrocitos en cultivo primario.

La primera aproximación que realizamos fue comprobar el efecto de la exposición al alcohol sobre los niveles de GFAP y vimentina en astrocitos en cultivo primario. Para esto, los niveles se cuantificaron a 15 y 21 días de cultivo y la detección de esta proteína se realizó mediante inmunotransferencia, usando anticuerpos monoclonales contra la GFAP y la vimentina y se utilizaron en todos los casos 10 µg de proteína obtenida a partir de homogeneizado procedente de células en cultivo, tanto control como PEA.

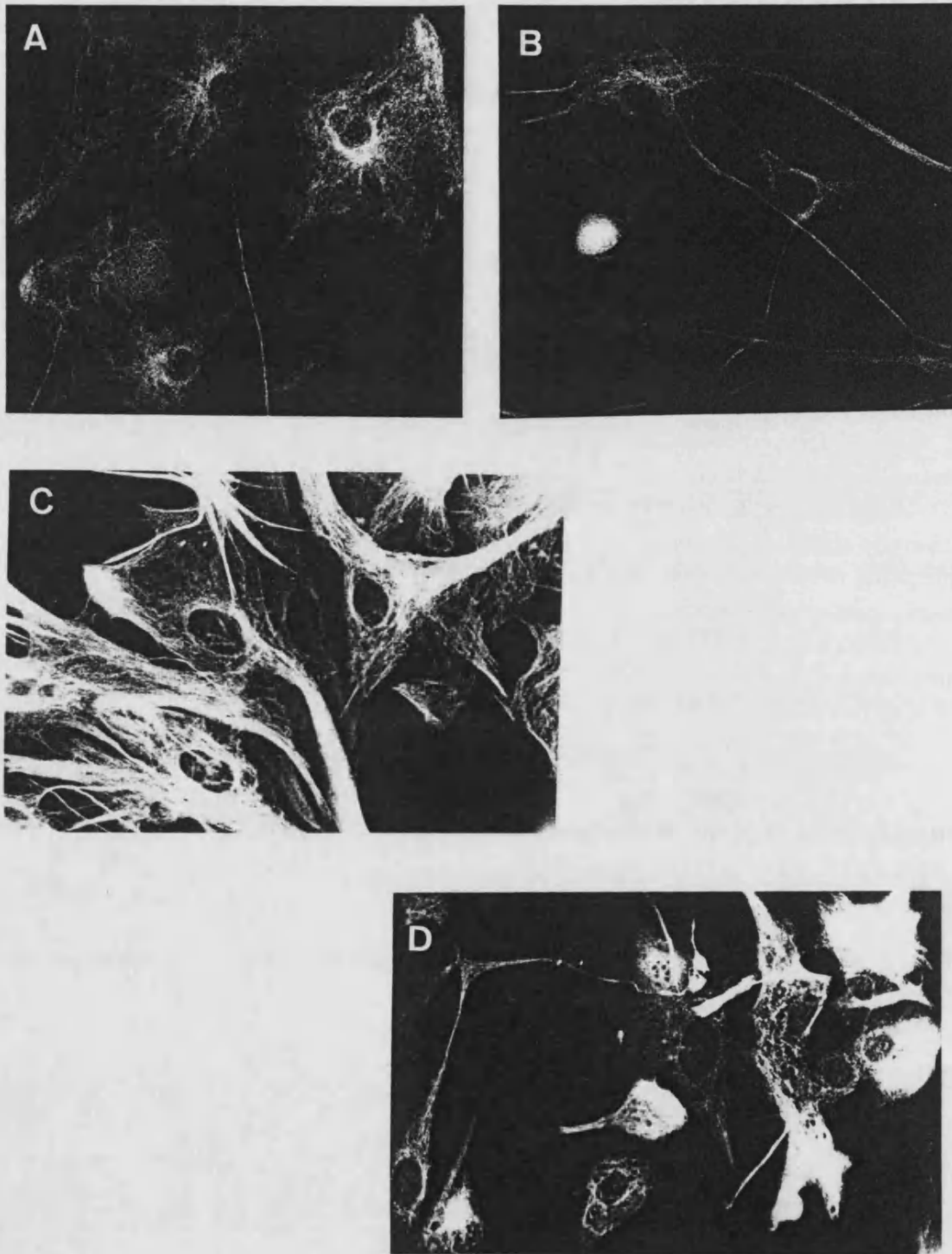


Fig. 24. Astrocitos en cultivo primario. Fotografías en las que se muestran las características de las inmunofluorescencias con GFAP de astrocitos en cultivo primario. A: células control de 4 días. B: células PEA de 4 días. C y D: astrocitos de 14 días control y PEA respectivamente. En las fotografías B y D se aprecia un retraso en el crecimiento y alteraciones en el citoesqueleto de los astrocitos.

A los 15 días de cultivo primario de astrocitos, la GFAP presentó un valor menor que a 21 días y se apreció solo una banda de 51 kD., que corresponde al peso molecular de esta proteína.

En los animales PEA, la proteína GFAP presentó una disminución significativa tanto a 15 como a 21 días (Fig. 25).

La vimentina también experimentó un aumento a los 21 días, lo cual concuerda con los datos publicados por Sáez *et al.* (351). La exposición al alcohol no afectó ni al patrón ni a los niveles de esta proteína en este tipo celular.

5.2.- Efecto de la exposición al alcohol en la expresión de la GFAP y vimentina durante el desarrollo de astrocitos en cultivo primario.

Para analizar la expresión de la GFAP y vimentina se utilizó ARN de células a diferentes días de cultivo: 7, 14 y 21; y se realizaron análisis *Northern*.

El patrón de expresión de la GFAP siguió un incremento significativo a lo largo de todos los puntos, siendo máximo el nivel de expresión al día 21 de cultivo. El incremento observado en el ARNm de la GFAP entre los días 7 y 21 fue de 2.3 veces (Fig. 26A).

La exposición prenatal al alcohol produjo una disminución significativa en los niveles de expresión de la GFAP, siendo esta disminución más notable en el día 21 de cultivo.

En cuanto a la vimentina, el patrón de expresión fue completamente diferente al que se obtuvo con la GFAP. Así, en la figura 26B se observa que los niveles de ARNm de esta proteína son muy elevados en el día 7 de cultivo, incrementándose ligeramente en el día 14 y disminuyendo posteriormente hasta el final del periodo de cultivo analizado (día 21).

Este patrón coincide con la expresión de esta proteína durante el desarrollo postnatal de cerebro, en el que también observamos una disminución progresiva a medida que se avanza en el desarrollo.

Un punto que queremos destacar es que el patrón de expresión de la vimentina es diferente al obtenido con la proteína. Así, mientras los niveles del ARNm disminuyen a medida que maduran los astrocitos, los niveles de la proteína se incrementan ligeramente durante el mismo periodo de cultivo.

En el caso de astrocitos expuestos al alcohol, se obtuvo un patrón diferente de expresión, ya que no se observa el pico a los 14 días y además se obtienen niveles de ARNm significativamente más bajos que en control.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos *in vivo*, ya que en este último caso la exposición al alcohol no produjo disminuciones significativas en la expresión de esta proteína.

Por último, las membranas se rehibridaron con un ADNc específico para la ciclofilina y, como se puede observar en la figura 26, los niveles de ARN total utilizados en los diferentes días de cultivo en ambos grupos (control y alcohol) fueron similares.

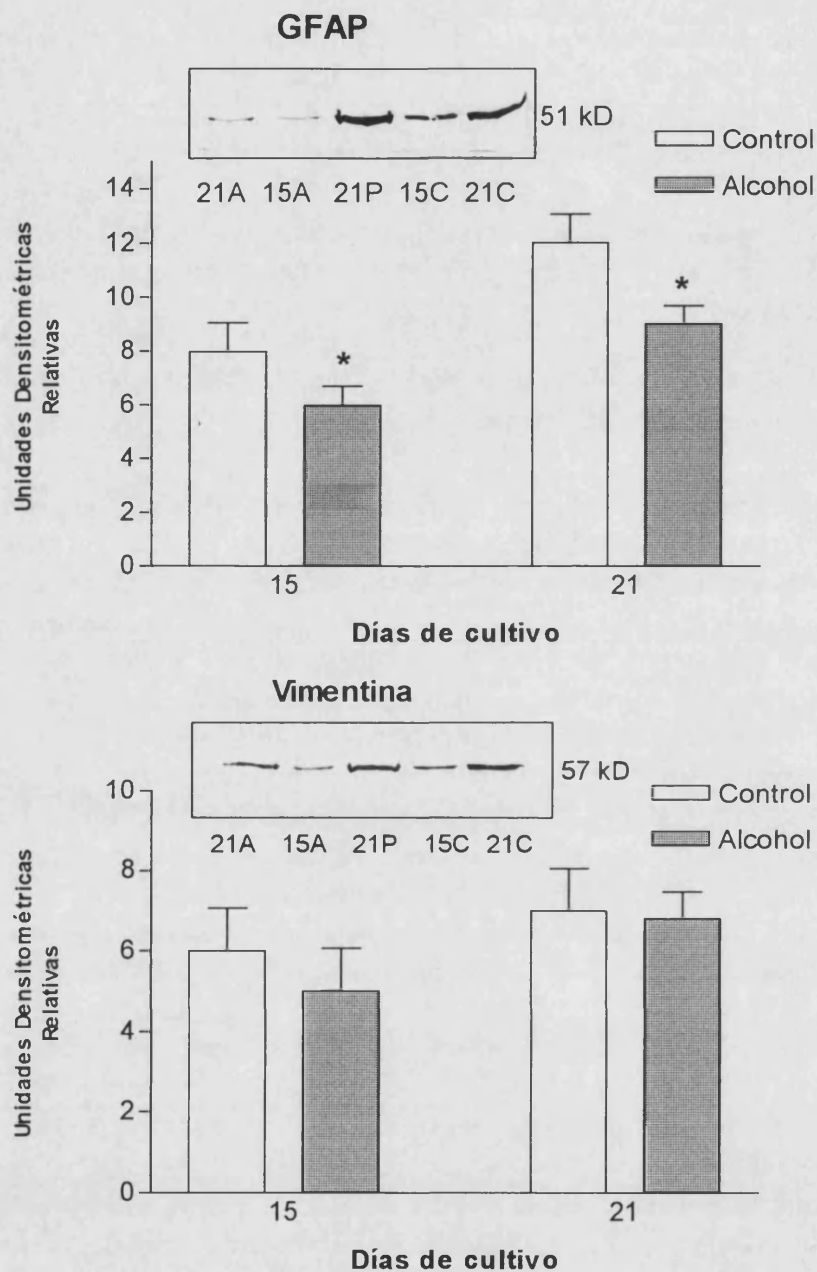


Fig. 25. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias de GFAP y vimentina de astroцитos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol a diferentes días de cultivo. Concentración de proteína constante de 10 $\mu\text{g}/\text{línea}$ para la GFAP y de 15 $\mu\text{g}/\text{línea}$ para la vimentina. Se muestran inmunotransferencias representativas. Cada punto representa la media \pm DS. de tres diferentes cultivos. * $P < 0.01$ vs. control.

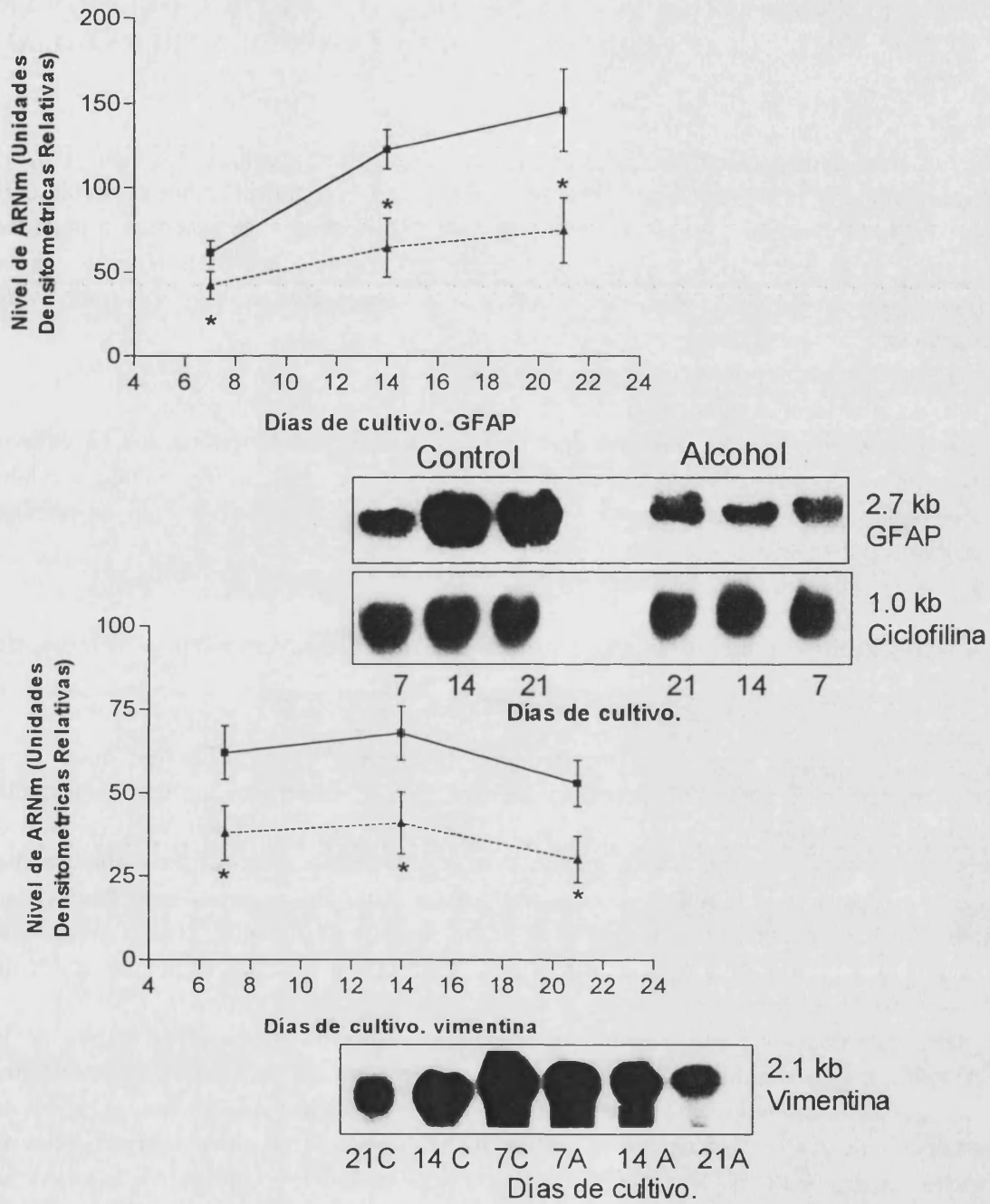


Fig. 26. Análisis densitométrico del ARNm (Northern blot) de la GFAP (A) y vimentina (B) de astrocitos en cultivo primario control y PEA a diferentes días de cultivo. Concentración de ARN constante (10 µg/línea). Se muestran autorradiografías representativas de los Northern blot. Cada valor es la media ± DS. de cuatro diferentes cultivos. ARNm de la ciclofilina como control de la cantidad y la integridad del ARN. *P (GFAP) < 0.001 vs. control. *P (vimentina) < 0.02 vs. control (ANOVA de dos vías).

6.- MECANISMOS QUE PUEDEN PARTICIPAR EN LA DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GFAP PRODUCIDA POR LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL.

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que la exposición prenatal al etanol disminuye la expresión de la proteína GFAP y sugieren que el etanol altera tanto el desarrollo de la glía radial como la astrogliogénesis. Sin embargo, la pregunta a plantear sería; ¿cual es el mecanismo molecular del efecto del etanol sobre la disminución en la expresión de la GFAP?. Para contestar a esta pregunta se han realizado dos aproximaciones:

- 1) analizar el nivel de transcripción de la GFAP;
- 2) determinar si el etanol altera la estabilidad del ARNm para esta proteína.

A fin de llevar a cabo ambas aproximaciones hemos utilizado astrocitos en cultivo primario por dos razones; la primera, el contenido de GFAP en estas células es muy elevado y la segunda, que estos mecanismos son difíciles de estudiar *in vivo* y solo se pueden realizar a nivel de células en cultivo.

6.1.- Efecto del etanol sobre el nivel de transcripción en núcleos aislados de astrocitos.

Para determinar el nivel de transcripción de la GFAP y vimentina se obtuvieron núcleos de astrocitos de 14 días de cultivo control y PEA. Este hecho fue muy importante para obtener un buen nivel de transcripción, por lo que decidimos obtener los núcleos, tras romper las células por separación, mediante un gradiente de sacarosa para eliminar las membranas celulares y obtener núcleos puros e intactos. En nuestros experimentos se usaron 40×10^6 células por ensayo. Otro punto importante fue que, tras el ensayo de transcripción, se obtuvo un ARNm lo más puro posible con mínimas contaminaciones de ARNasas, ADNasas y otras proteínas.

En los ensayos de transcripción se utilizó una cantidad constante de ADNc de la GFAP, vimentina y ciclofilina que, en nuestro caso, fue de 5 μ g. En la figura 27 se muestra un resultado representativo de estos ensayos. En esta figura se aprecia el nivel de transcripción de la GFAP, la vimentina y la ciclofilina como control; obtenidas todas ellas de astrocitos control y PEA. Como se puede observar en la figura, en el caso de la GFAP se obtuvieron diferencias significativas entre el valor de los astrocitos control y PEA cuando las autorradiografías se leyeron mediante densitometría. Sin embargo, el nivel de transcripción de la vimentina, aunque en general se obtuvieron disminuciones en el grupo PEA con respecto al control, no presentó diferencias significativas. Finalmente, el nivel de transcripción de la ciclofilina no fue modificado por el alcohol.

En consecuencia, estos resultados sugieren que el alcohol afectaría principalmente el nivel de transcripción de la GFAP y en menor grado el de la vimentina, pero este tóxico no

afectaría a todas las proteínas, puesto que la ciclofilina no presenta ningún cambio en dicho nivel de transcripción.

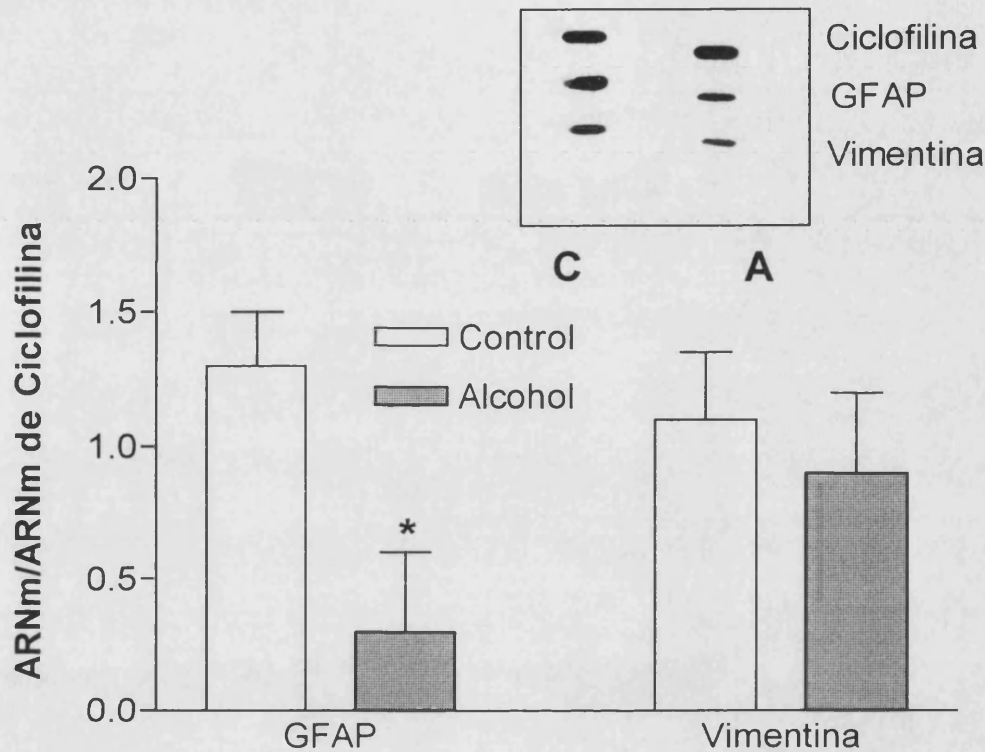


Fig. 27. Análisis del nivel de transcripción de la GFAP y vimentina de astrocitos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol. Concentración de ADNc constante 5 μ g. Los datos representan la media \pm DS. de tres experimentos diferentes; se analizaron por comparación con el ARNm de la ciclofilina que se usa como control.

6.2.- Análisis de la estabilidad de los transcritos de ARNm de la GFAP y vimentina.

Para investigar si la disminución en la expresión de la GFAP en astrocitos PEA era debida a una mayor inestabilidad de su ARNm, la síntesis de ARN fue inhibida tratando los astrocitos, tanto control como PEA, con 10 μ M de α -amanitina, un inhibidor de la ARN polimerasa II. Los niveles de ARNm se midieron a varios periodos de tiempo (a las 3,6,9 y 15 horas de tratamiento) mediante *Northern*. Como muestra la figura 28, en células control se observó una disminución progresiva de los niveles de ARNm de la GFAP, alcanzando a las 15 h niveles muy bajos. Cuando este tratamiento se realizó en astrocitos PEA, se observó un aumento moderado en la degradación en todos los puntos analizados. Así, mientras en las células control la vida media del ARNm de la GFAP fue de 9 h, en células

PEA la vida media se acortó en dos horas, siendo ésta de 7 h, lo cual indica que el alcohol disminuye la estabilidad del ARNm de la GFAP en un 20%.

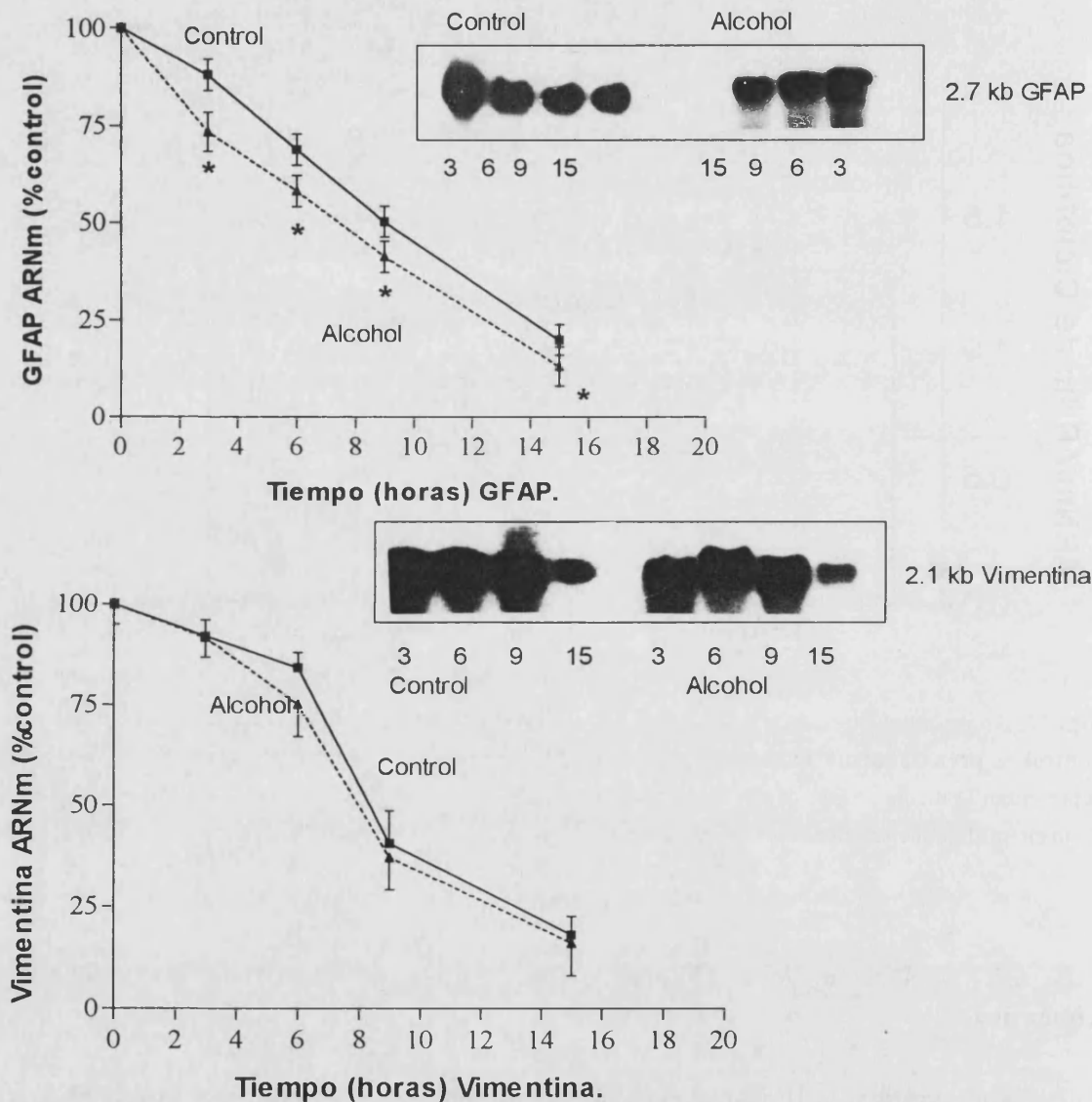


Fig. 28. Análisis densitométrico del ARNm de la GFAP y vimentina de astrocitos en cultivo primario control y prenatalmente expuestos al etanol tras incubación con α -amanitina ($10 \mu\text{M}$). El ARN se extrajo a diferentes tiempos y se utilizó para análisis de *Northern*. Los datos representan la media \pm DS. de seis experimentos diferentes. * $P < 0.03$ vs. control (ANOVA de dos vías).

En el caso del ARNm de la vimentina, la vida media que se obtuvo, tanto en células control como en PEA, fue de 9 h, sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos.

7.- CAMBIOS EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DEL GEN DE LA GFAP DURANTE EL DESARROLLO DE CEREBRO. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL.

Como ya se ha comentado en la introducción, los cambios en la metilación suponen una señal importante para la transcripción de ciertos genes y especialmente los específicos de tejido. Al mismo tiempo, también se conoce que los cambios en la actividad transcripcional de muchos genes se asocian a estados hipometilados del ADN. Por lo tanto, el objetivo de este apartado fue investigar: 1) diferencias en el patrón de metilación entre el hígado (órgano en el que no se expresa la GFAP) y cerebro adulto; 2) estudiar si durante el desarrollo fetal de cerebro, el inicio de la expresión de la GFAP está correlacionado con cambios en la metilación de su ADN.

Para analizar estas aproximaciones utilizamos tres enzimas de restricción: HpaII, MspI y HhaI. Las dos primeras cortan en la secuencia específica CCGG del ADN según el estado de metilación de la citosina interna. Sin embargo, mientras HpaII solo corta si la secuencia se encuentra metilada, MspI corta la secuencia independientemente de si está metilada o no. La enzima de restricción HhaI corta en la secuencia específica GCGC y solo si la secuencia se encuentra metilada.

Los lugares de metilación que reconocen las enzimas HhaI y HpaII en la región flanqueante 5', del primer exón y de parte del primer intrón en el gen de la GFAP, se muestran en la figura 29. En dicha figura se ve que la HhaI reconoce un lugar localizado en la región flanqueante 5' en la posición -1176, un grupo de 5 sitios de corte en el primer exón [114,178,216,218 y 295] y dos lugares localizados en el primer intrón [1057 y 1073]. Los lugares que reconoce la HpaII son: un lugar localizado en la región flanqueante 5' a la posición -764, tres lugares en el primer exón [173,188 y 414] y un sitio único en el primer intrón [853].

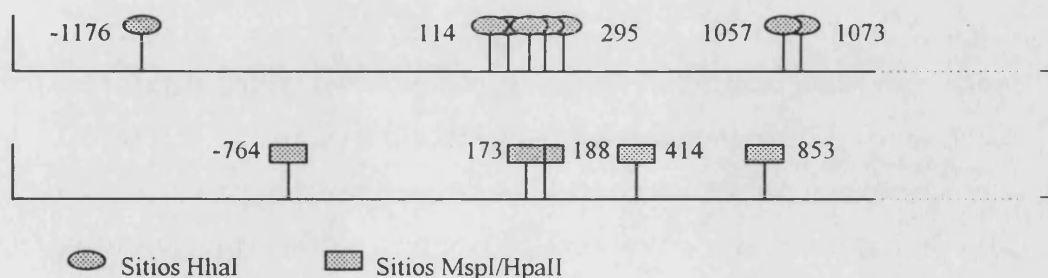


Fig. 29. Posiciones de metilación de la HhaI y MspI/HpaII y lugares de reconocimiento en la secuencia flanqueante 5', el primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP de rata.

-1865 AATTCCAGGG GACACGATGA GGTCCAGTCT AAAGGTCACT GGAACCTCT CTCAAGCTCC

-1805 CCCCCCCCCT ACTGTGCCAC TGTTCCAGGAT TGGGGAAGAT GTGCCTGGAG CCTAAGGGGC

-1745 TCTCCCTGTC CCTATAGTAG GACTCACTAA AGGAACCTCA GCAAAGCAGC CCATTGTAAG

-1685 CTCAATCGAA TACCGTGTCC CTGGTATGGA GTAGAGGATG TGGCTATGAC AGGAACTCAG

-1625 GGGTCTTAAA TGGCTTGAGT GCTGGGAGAG GCAAGCAGCC AGGCCTGGTC TGTAAGCTGG

-1565 AAGTCTGGCA GTGCTGAGCT GGCCAACCCC CTCAGGACCC TCCTCCTTGT GCCCACTGAA
AP-1

-1505 TGACTCACCT TGGCATAGAC ATAATGGTCA GGGGCGGGCA CACAGCCTGA TCCCCGCTGC

-1445 ACTCCAGGCC CCCTTCAATG CTTTCCGAGA AGTCCATTGA GCTGGGAGCT TGTAAGCTGCAC

-1385 CAAGGGCTGA CATCCTGGCA GCCAGGGATG AAAGCAGCCC ATGGGGCTAC CCTTGCCGTA

-1325 TGCCTCACTG GCGGCAGAGA ACAAGGCTCT ATTCAGCAAA TGCCCTGGAG TAGACACCAG

-1265 AAGTCCAAGC ATGGGCAGAG GAAGGCAGGC GTTGGGGGCT GGAGGGGAGC AGAGCTGTCT

-1205 GTTTTCCAGA AGCCCAAGGG TACAGATGGC GCCTGGGGG GAACTGAGTG GAGGGGATAG
HhaI

-1145 ATGGGCCTGA GATCTCAAAC ATCAACAGCC TCCTCCCCAC CAACGATGAA GGTGGAGGTT

-1085 GGTTTCCCAG ACCTACATAT CCCCAGAGA CCTGGTGTAT GAAAATTCAA AGGAGGTAAG

-1025 TCTCCTGAGA GAACGGGGGG CTCACAAATG AAGCCAGCTG TCTTACCCTA TCAGGACCTA

-965 CGTGCATTCC TTCTGTCTCTG CCCCCTAAAC ACACAGCCAG AGGCTCAAAT TGATTCTGGA

-905 GTCACAAAGG GGGCTTGAAA CCCCAGCCCC CCACTCCTGA ACTCCAGGAA TGAGAAGATA

-845 GTATTGGAGG GGTTCAGAGG AGAGGGCTCT GCACATCTGT TGAGAATGGG GGTCCCAGGA

-785 GAGTGTAAAT TAGGCTGATC CCGGAGGAAG GGAATAGGCT CTTCAAGATC CTAGCATCTC
HpaII-MspI

-725 ACAGGCCAC AGAGAAGTTC AGAGTTGGGG CAGCCCTGGC TTACAGGCTC TAAGAACTGG

-665 AGGCAGTTTA CCCAACCCAG CTGTGTGCAT GCTGTCCCTC TCTCTGTCTC TGTCTCTCTC

-605 TCTCTGTCTC TGTCTCTCTG TGTGTGTGTG TGTGTGCTCA CACACGTGTG TGTTTATCAC

-545 ACAAATGTTC ATGTGTGTGT ACATACATGT GTTGGAGCCA GAGGTCAACC TCAGACACTG

-485 TTGACTTGGT TGTCTGAGAT AACATTTCCC CCTGGGACCT GGGATTTGCC AATTAGTGTG

-425 ACCCAGGAAG CCTACTTATT TTCATTCCCTC AGCACTGCAG TTACAAGTAT GCACTGTCAA

-365 ACCAGGCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTCCA AACCAGGCCT TTTGTATTCTG CTCTGTGGCT

-305 AGAACTTGGG TCTCCATGCT TGACAGGCAA GCGATTTATG GACTAAGCTG TTTCCCTCGGC

-245 CCTCTCTTGA CCCATTTACC AGAAATGGGG TTTCCCTTGAT CAATGGTGAA GCCAGGCTGG

-185 TGTTPCCAGG AAACCCTTGA CTCTGGGTAC AGTGACCTTG GTGGGGTGAG AAGAGTTCTC

-125 TCCATATGCG ATCTGGGGCC CAGCTCCACC CCCTCAGGCT ATTCAATGGG GTGCTGCCAG

-65 GAAGTCAGGG GCAGATCCAG TCCAGCCCCT CCCTCAATAA AGGCCCTGAC ATCCCAGGAG

-5 CCAGCAGAAG CAGGGCAAGA TGGAGCGGAG ACGTATCACC TCTGCACGCC GCTCCTATGC
+1 M E R R R I T S A R R S Y A

```

+56   CTCCTCCGAG ACGATGGTCA GGGGCCATGG TCCTACCAGA CACCTGGGTA CCATTCCGCG
      S S E T M V R G H G P T R H L G T I P R
                                     HhaI
+116  CCTCTCCCTG TCTCGAATGA CGCCTCCACT CCCTGCCAGG GTAGACTTCT CCCTGGCCGG
      L S L S R M T P P L P A R V D F S L A G
                                     HpaII-MspI
+176  GCGCTCAAT GCGGCTTCA AAGAGACTCG GGCCAGCGAG CGCGCGGAGA TGATGGAGCT
      A L N A G F K E T R A S E R A E M M E L
      HhaI HpaII-MspI HhaI/HhaI
+236  CAATGACCGC TTTGCTAGCT ACATCGAGAA GGTCCGCTTC CTGGAACAGC AAAACAAGGC
      N D R F A S Y I E K V R F L E Q Q N K A
                                     HhaI
+296  GCTGGCAGCT GAGCTGAACC AGCTTCGAGC CAAGGAGCCC ACCAAACTGG CTGACGTTTA
      L A A E L N Q L R A K E P T K L A D V Y
                                     HpaII-MspI
+356  CCAGGCAGAA CTTCGGGAGC TGGCGCTGCG TCTGGACCAG CTTACTACCA ACAGTGCCCG
      Q A E L R E L R L R L D Q L T T N S A R
+416  GCTGGAGGTG GAGAGGGACA ATCTCACACA GGACCTCGGC ACCCTGAGGC AGAAGTGAGA
      L E V E R D N L T Q D L G T L R Q K
+476  AGGGGAATAG GAAAATGGCT AGTGAGCAGA GAGACTGAAT TGAGAGAGGA GCCTGGAAGA
+536  AGGGTACTGC CTCCCCCTAA GGAGAGCCTC TTAGCTGCTG TGTTTCAAAA GGGAGAGCTG
+596  TCTTTGTTCC CTAATATGAT GCAGAATAGC CAGGAAGAGA CTGAAAACCT CAGGGATCAG
+656  ATTCCCAGAG AGAGCTGAGC ATTCTGGGTA CTTACCACCA AGCTGAGGGA GGACTGTGTG
+716  TGGGTAGCCA GGTACAAGC AGGCAGGTGC TTCAGTCACT GGGCACTATG AATGGCCAGA
+776  GAGGTTTTCG TCCACAAGGA GGGCTCTTGG TCTCTGAAAT ATAAGAAATG CAAGAAAGAG
      HpaII-MspI
+836  CAGGCAGGCC TGGATGCCGG GCCCAGATGG CTGTCTACGA CCTGCTTTTG ACCCTGCTCA
+896  AGTCATTTTG ATTGGTTGTA GCTGTAAAGG AGAGGTCATG ATACAATCTG TCCTAAAAGA
+956  TGGTAACCGA GGTCAAACTC TGGGGCGTGG TGCTTTGCTG GGTGGTGGAT ATTACAGTGT
      HhaI HhaI
+1016 CCCTCTGGTG CAGGAGGGGC ACTGGTGTCA GTGACAGTGG GCGCACGGTG GTGGATCGCG
+1076 CTCTGGGAAC AAGAGCAGGT GGCACCAACC CCGATAAGGC ACCTCAGTAA TGAGTTAAGG
+1136 AGGAAGGCTC TTATCTGTTT ACGCGTCACC AGGCCTCTGT GTAGGAACCT GCCATTGCTT
+1196 ACTCTTCCTG
    
```

Fig. 30. Secuencia de nucleótidos de la región flanqueante 5' del primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP de rata. Se indican el primer ATG, el lugar homólogo a TATA (-29), y el lugar CAAT (-82). Se observan dos lugares adicionales similares a CAAT corriente arriba (upstream) de las posiciones -205 y -436. Los números representan la posición relativa de los nucleótidos del lugar de inicio (+1), indicado mediante una flecha. Se muestra también el lugar de unión AP-1 (TGACTCA) (-1505), así como las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación Hha I y Hpa II.

Para analizar la metilación del gen de la GFAP (Fig. 30) se aisló ADN genómico de los diferentes estadios de desarrollo fetal de cerebro y se incubó con los diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a filtros de nylon. Los fragmentos pertenecientes al gen de la GFAP se visualizaron por hibridación con una sonda ADNc para la GFAP, previamente marcada con ^{32}P por la técnica de *random primer*.

Como se observa en la figura 31A, se realizaron digestiones con MspI y HpaII de ADN obtenido de hígado y cerebro del animal adulto control y cerebro de fetos de 21 control y alcohol. Cuando estos ADNs se digirieron con la enzima de restricción MspI, no se apreciaron diferencias entre los ADNs estudiados ya que, como ya hemos comentado, este enzima corta, esté metilado o no el ADN. Sin embargo, cuando las digestiones se realizaron con la enzima HpaII, se obtuvo un mayor número de bandas en hígado que en cerebro del animal adulto, lo que indicaba que había una mayor metilación en el ADN de hígado, en donde no se expresa la GFAP. Estos datos nos indican que existe una correlación entre cambios en la metilación y expresión del gen de la GFAP específica de tejido.

Cuando se comparó el patrón de metilación obtenido por la digestión con HpaII entre el cerebro adulto y de feto de 21 días control, se observó un patrón de bandas similar. Sin embargo, en esta figura representativa se aprecia, en el cerebro de feto de 21, una banda adicional, lo que indica que el ADN no se encuentra completamente hipometilado. De hecho, nuestros resultados indican que, aunque a 21 días fetal se detecta la expresión de la GFAP, ésta es muy baja.

En la figura 31A también se observa una diferencia clara entre el feto de 21 días control y alcohol, ya que en el feto de 21 días alcohol aparecieron más marcadas algunas bandas que también aparecieron en el hígado metilado, lo cual indica una mayor metilación en el feto alcohol y, por lo tanto, un menor nivel de producción de ARNm y una afectación en la transcripción a este nivel de desarrollo.

Al analizar el patrón de metilación de los ADNs obtenidos de cerebro de fetos de 15 días control y alcohol (Fig. 31B) y digerirlos con las enzimas MspI y HpaII, comparándolo, además, con los datos obtenidos en la figura 31A, se observaron algunas diferencias en el patrón de bandas mediante la digestión de la enzima HpaII. Así, en esta figura se puede apreciar que, aunque existen las dos bandas principales que se obtenían con esta enzima, la banda intermedia, poco marcada en los cerebros de fetos de 21 días, es en este caso muy intensa, llegándose a unir con la banda inferior. Estos resultados parecían indicar que el ADN se encontraba muy hipermetilado y de hecho, en este estadio del desarrollo, la GFAP comienza a expresarse.

Finalmente, se utilizó la enzima HhaI para comprobar los cambios de metilación obtenidos con la enzima HpaII durante el desarrollo de cerebro. En la figura 31C se observa que utilizando la enzima HhaI aparece a los 15 días una banda que no está presente a 21 días de desarrollo de cerebro, indicando un mayor grado de metilación a 15 días que a 21 y, por lo tanto, menor expresión del gen. En esta figura también se puede apreciar que en cerebros alcohol esta banda es más intensa.

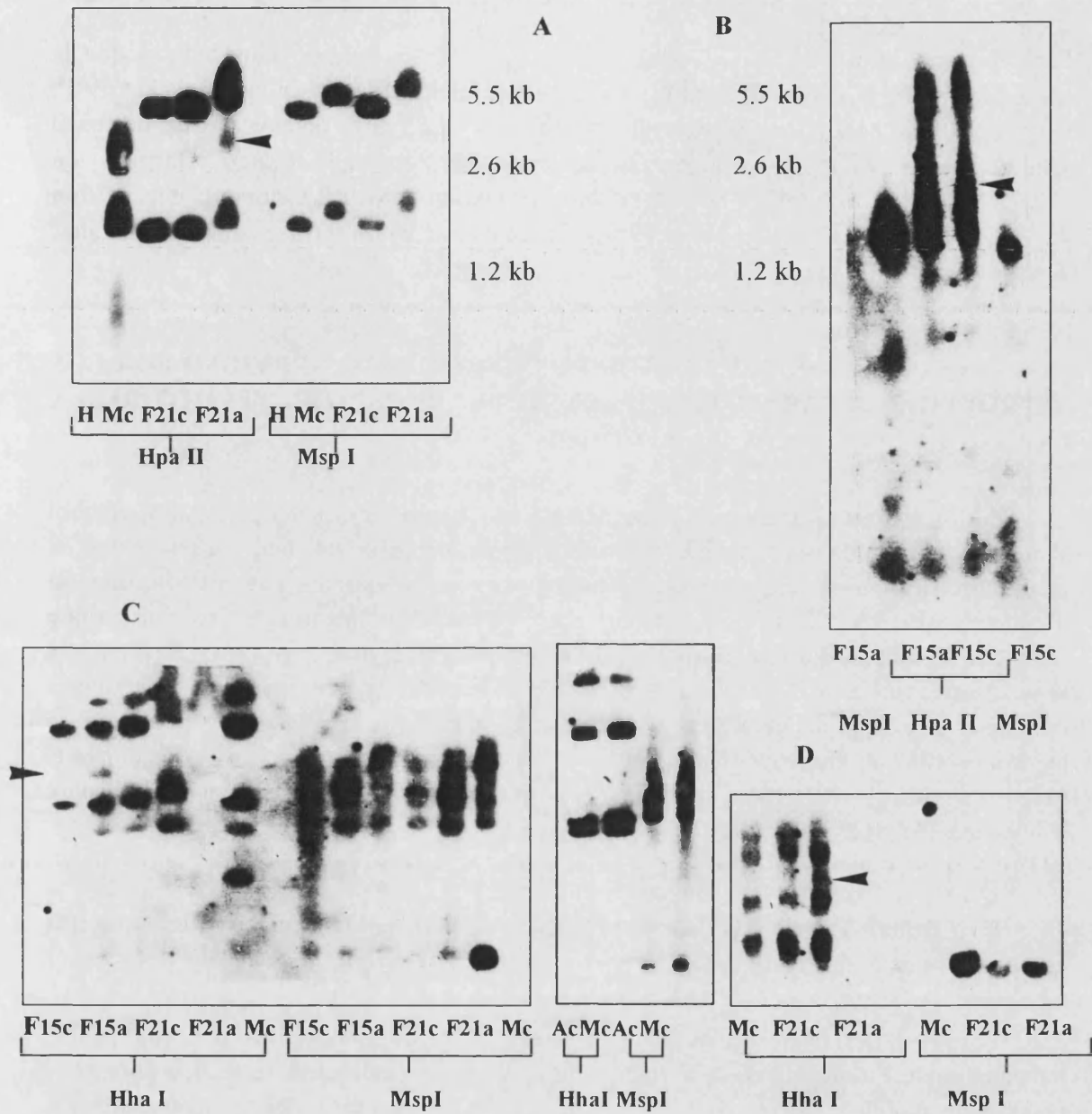


Fig. 31. Autorradiografías representativas (*Southern blot*) tras digestión del ADN de distintos tejidos con los enzimas de restricción Msp I, Hpa II y Hha I y posterior hibridación con GFAPc. H, hígado adulto; Mc, cerebro madre control; Ac, astrocitos control; F21c y F21a, cerebro feto de 21 días control y alcohol; F15c y F15a, cerebro feto de 15 días control y alcohol.

Utilizando esta misma enzima de restricción (HhaI), en la figura 31D se aprecia cómo en cerebros de 21 días expuestos al alcohol se conserva la banda que se observaba a 15 días

fetal, mientras que a 21 días control ésta no aparece. Estos resultados indican que la exposición prenatal al alcohol mantiene un estado de hipermetilación en el gen de la GFAP, lo que conllevaría a una menor expresión de este gen en cerebros de animales expuestos al alcohol. Este efecto puede ser un mecanismo importante para explicar tanto la disminución en los niveles de transcripción que observamos en los astrocitos PEA, como la disminución de la GFAP que se observa en cerebros de animales, tanto fetales como postnatales, expuestos al etanol.

8.- LIBERACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO POR LOS ASTROCITOS Y CARACTERIZACIÓN DE SU RECEPTOR. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL.

En los apartados anteriores se ha demostrado que la exposición prenatal al alcohol altera el desarrollo de la glía radial y la maduración de los astrocitos, tanto *in vivo* como en cultivo primario. Basándonos en estos resultados no es de extrañar que sus funciones se encuentren alteradas; entre ellas cabe destacar determinados factores de crecimiento que estas células liberan durante el desarrollo del sistema nervioso y que son críticos para la supervivencia neuronal, diferenciación y establecimiento de las conexiones definitivas durante el desarrollo del cerebro. Uno de los factores tróficos más caracterizados y que se ha demostrado que liberan los astrocitos, es el factor de crecimiento nervioso. De ahí que el objetivo de este apartado fuera determinar el posible efecto de la exposición al alcohol sobre la liberación de NGF y su receptor.

8.1.- Liberación de NGF durante la proliferación y diferenciación de astrocitos en cultivo primario. Efecto de la exposición prenatal al etanol.

Según se describe en material y métodos, el NGF se cuantificó mediante doble inmunoensayo. La medida de la liberación de NGF por los astrocitos se realizó durante el periodo de proliferación (6 días) y el de diferenciación (13 días). El procedimiento que seguimos fue el de incubar las células durante 24 y 40 h en un medio que contenía MEM y BSA (1 mg prot./ml). Transcurrido este tiempo, el contenido NGF se midió tanto en el medio como en la célula. En la tabla XII se muestra que la liberación de NGF es muy elevada, observándose que a 40 h dicha liberación es el doble que la que se produce a 24 h (Fig. 32). Otro dato significativo es que, del contenido total de NGF, el 99% se libera al medio y solo el 1% es retenido en la célula. La relación entre el NGF extracelular y el intracelular fue similar a la que previamente se ha publicado sobre células astrogiales (58) y es característica de proteínas que se liberan constitutivamente sin un almacenaje previo. La exposición prenatal al etanol incrementó el contenido celular de NGF unas 1.65 veces, pero la liberación de NGF disminuyó unas 1.70 veces después de 24 h de incubación (Tabla XII y Fig.32).

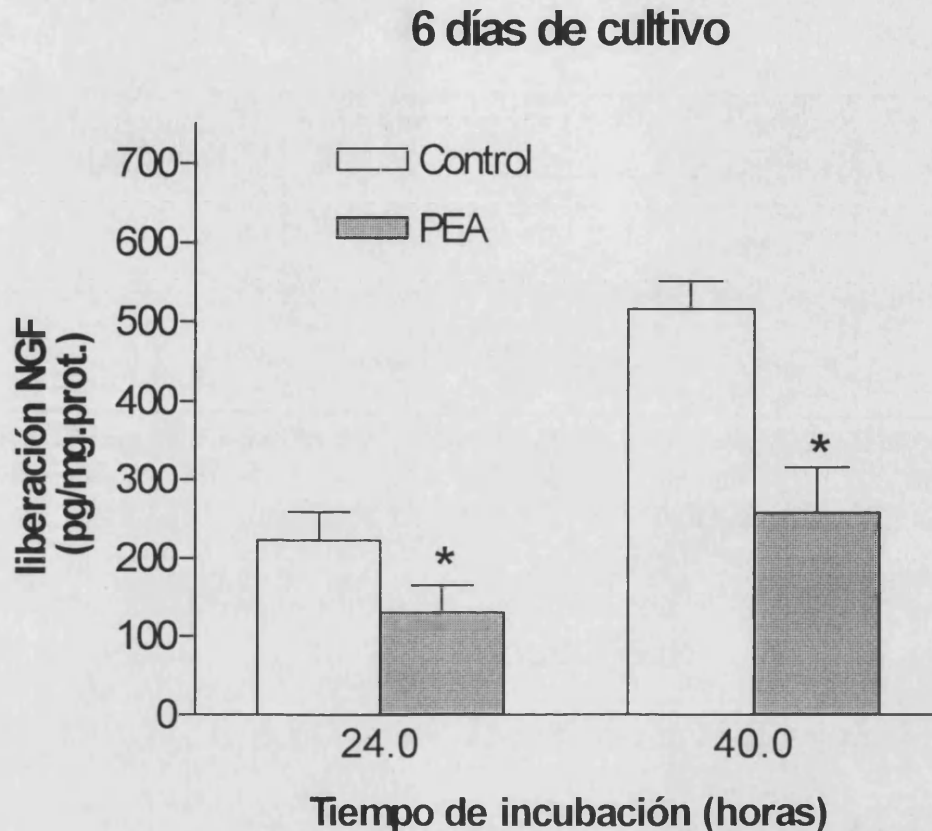


Fig. 32. Liberación de NGF de astrocitos control y PEA a 6 días de cultivo tras 24 y 40 h de incubación. El contenido de NGF en el medio de cultivo fue medido como se describe en material y métodos. Los valores son la media \pm DS. de seis determinaciones independientes. * $P < 0.001$. vs. control.

La relación existente entre NGF liberado al medio y NGF intracelular en los astrocitos PEA era tres veces menor que en los control (Tabla XII).

Estos resultados indican que los astrocitos PEA presentan una liberación significativamente menor de NGF que podría afectar a las neuronas en desarrollo. Al mismo tiempo, los astrocitos PEA presentaron un mayor contenido de NGF intracelular, lo que podría sugerir una alteración en el proceso de secreción de NGF al medio.

Otro de los objetivos, en este apartado, fue investigar si, durante la fase de diferenciación de los astrocitos, la liberación de NGF era la misma que la que habíamos observado durante la fase de proliferación.

En la figura 33 se muestra que a 13 días de cultivo los astrocitos liberan aproximadamente un 40% menos de NGF que a 6 días de cultivo. Otro efecto que se observó es que durante la fase de diferenciación no hubo cambios significativos entre los astrocitos PEA y los controles.

Tabla XII: Niveles de NGF en la célula y en el medio de astrocitos control y PEA, después de 6 días de cultivo.

ASTROCITOS	contenido de NGF (pg/mg de proteína)		
	Medio	Células	NGF medio/células
<i>24 h incubación</i>			
Control	223 ± 36 (14)	1.59 ± 0.22 (5)	140.3
PEA	131 ± 35 (10)*	2.62 ± 0.35 (6)*	50.0
<i>40 h incubación</i>			
Control	515 ± 35 (8)	1.67 ± 0.21 (6)	308.4
PEA	258 ± 57 (9)*	2.60 ± 0.30 (6)*	99.2

El contenido de NGF en el medio y en las células se determinó como se describe en material y métodos. Los valores son la media ± DS. Los números en los paréntesis representan el número de experimentos realizados. * P < 0.001, vs. valores control.

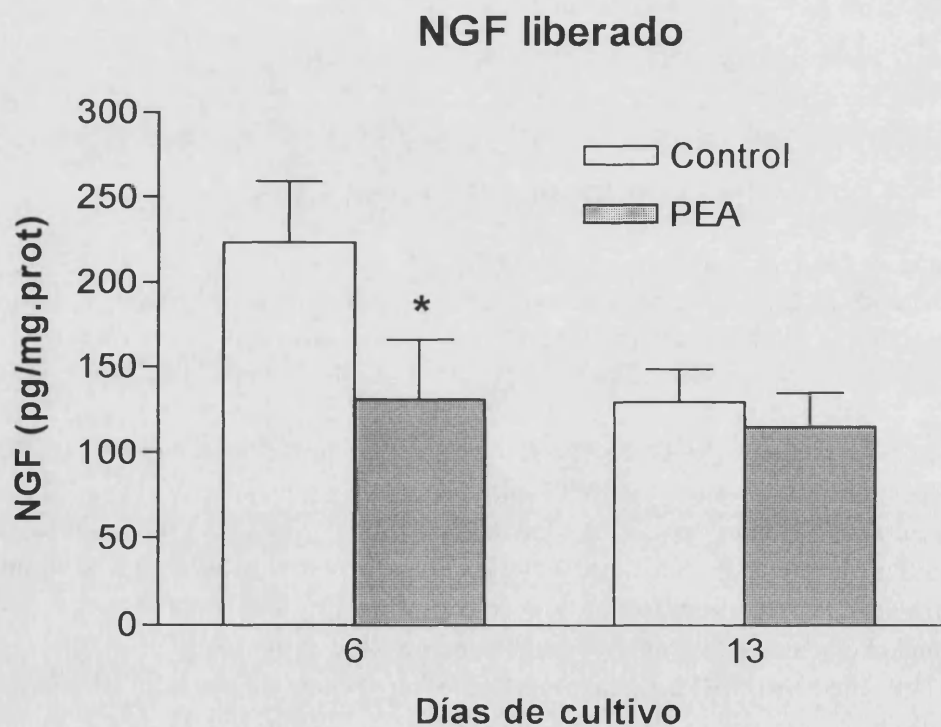


Fig. 33. Liberación de NGF de astrocitos control y PEA a 6 y 13 días de cultivo. El contenido de NGF en el medio de cultivo fue medido como se describe en Material y métodos. Los valores son la media ± DS. de seis determinaciones independientes. * P < 0.001 vs. control.

8.2.- Unión [125 I]NGF a astrocitos.

Para analizar el receptor del NGF en astrocitos se examinó la unión de [125 I]NGF a astrocitos en cultivo primario tras seis días de cultivo. Para este ensayo se utilizaron 1×10^6 y diferentes concentraciones de NGF (entre frío y caliente) (de 0.05 nM a 5 nM), manteniendo una actividad específica de 200 Ci/mmol, según se describe en material y métodos.

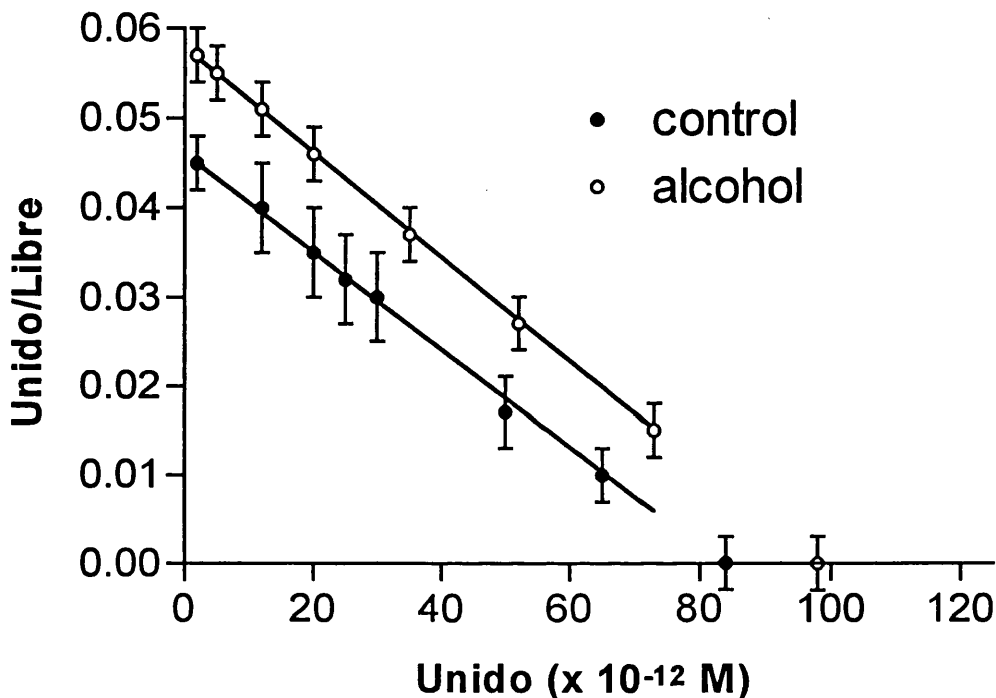


Fig. 34. Análisis *Scatchard* de la unión específica de [125 I]NGF a astrocitos en cultivo primario control y PEA. Una suspensión de 10^6 células/ml se incubó durante 60 min a 37°C con concentraciones variables (10 pM a 10 nM) de [125 I]NGF. Se realizaron tres determinaciones de unión para cada punto.

El ensayo de unión se realizó durante 1 h a 37°C , midiéndose la cantidad de [125 I]NGF unida a las células para las diferentes concentraciones. Para calcular la unión no específica se utilizó como control ensayos paralelos en los que cada tubo contenía $0.5 \mu\text{M}$ de NGF no radiactivo. Los resultados obtenidos se analizaron mediante representación gráfica de *Scatchard*.

Las representaciones de *Scatchard* obtenidas de las curvas de saturación fueron lineales en ambos tipos celulares (Fig. 34). Los datos obtenidos mediante estas representaciones sugieren una única unión, con una constante de afinidad (K_d) en el rango nM. Así, en la tabla 1 se muestra que en células control se obtuvo una K_d de 1.6 ± 0.05 (nM) siendo la B_{max} de 85 ± 2.1 fmol/ 10^6 células. La exposición prenatal al etanol no alteró

la K_d pero incrementó significativamente la capacidad máxima de unión de los receptores para NGF (Tabla XIII).

Tabla XIII: Constantes de disociación de unión de [125 I]NGF a receptores.

Astroцитos	K_d (37°C)(nM)	B_{max} (37°C)(fmol/10 ⁶ cels)
Control	1.60 ± 0.05	85 ± 2.1
PEA	1.75 ± 0.15	98 ± 5.2*

Cada valor representa la media ± DS. de cuatro experimentos diferentes. La saturación de la unión se realizó como se describe en Material y métodos y los datos se obtuvieron de la Fig. 34. * $P < 0.05$ vs. control.

8.3.- Internalización de NGF.

Los procesos de endocitosis mediada por receptor se analizaron utilizando una concentración constante de 1 nM [125 I]NGF y las células se incubaron durante 90 min a 37°C.

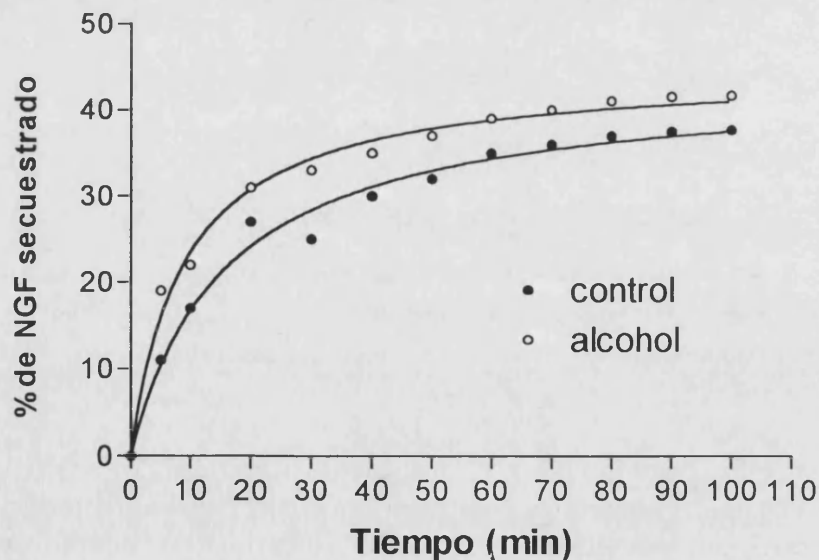


Fig. 35. Efecto de la exposición prenatal al etanol en las cinéticas de internalización de [125 I]NGF. Una suspensión de 3×10^6 células/ml se preincubaron con 1 nM de [125 I]NGF (200 Ci/mmol) durante 90 min a 37°C. La unión no específica se determinó en incubaciones paralelas con 0.5 μ M de NGF no marcado. Los valores son la media de cuatro experimentos independientes. Los datos experimentales se ajustan a una curva de regresión logarítmica.

Tras diferentes intervalos de tiempo, las células se separaron mediante rápida centrifugación y se resuspendieron en un volumen igual de ácido acético. La unión de NGF a membrana se disocia cuando se incubaba las células 5 min en hielo y se puede medir la cantidad de NGF internalizado.

En la figura 35 se muestra que, en astrocitos control, el NGF unido a membrana se internaliza principalmente entre 10 y 20 min, aumentando posteriormente en muy baja proporción (Fig. 35). En la exposición al alcohol, aunque se observó un patrón similar, aumentó el proceso de internalización del NGF.

Todos estos experimentos se realizaron también en astrocitos control y PEA a 6 días de cultivo.

8.4.- Estudios de inmunodetección del receptor del NGF (NGFR).

Nuestros resultados indicaban la presencia en astrocitos de un receptor de baja afinidad para NGF denominado p75 o NGFR.

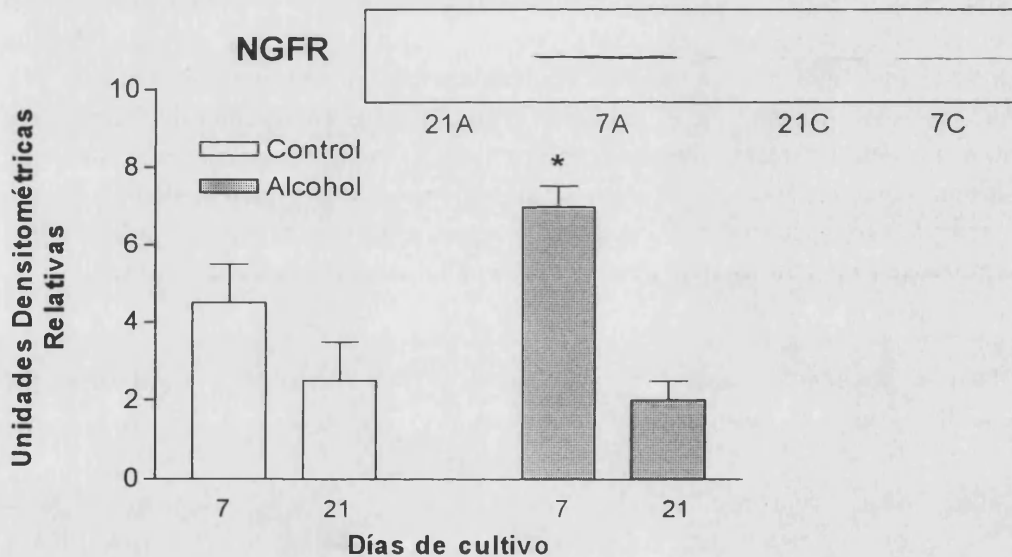


Fig. 36. Análisis densitométrico de las inmunotransferencias del NGFR a diferentes días de cultivo de células de astrocitos control y PEA. Concentración de proteína constante (60 $\mu\text{g}/\text{línea}$). Se muestra inmunoblot representativo. Cada valor es la media \pm DS. de tres diferentes cultivos. * $P < 0.03$ vs. control.

Hay que destacar que el NGF también se puede unir a un receptor con alta afinidad, que en este momento se sabe que es el TrkA; sin embargo, en nuestras condiciones no lo hemos podido detectar.

Puesto que todos los anteriores resultados los habíamos realizado a 6 días de cultivo, mediante técnicas de inmunotransferencia y utilizando un anticuerpo monoclonal que

reconoce al NGFR, tratamos de investigar si el número de receptores en astrocitos era el mismo durante la fase de proliferación (6 días) y la de diferenciación (21 días). En la figura 36 se muestra que, utilizando la misma cantidad de proteína, la cantidad de NGFR fue dos veces superior a 7 días que a 21 días.

En esta figura también se muestra que los astrocitos expuestos al alcohol presentan un aumento de inmunorreactividad del NGFR a 7 días de cultivo con respecto a valores control; sin embargo, no hubo diferencia entre ambos grupos a 21 días de cultivo.

9.- EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL SOBRE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DURANTE EL DESARROLLO DE CEREBRO.

Se sabe que el glutamato participa en una gran variedad de procesos fisiológicos tanto en el cerebro adulto como durante su desarrollo (259). Específicamente, durante el desarrollo del SNC el glutamato y sus receptores participan en la arquitectura y plasticidad neuronal, interviniendo en los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Por tanto, un exceso o defecto de la activación de estos receptores, y particularmente del denominado NMDA (N-metil-D-aspartato), podría explicar algunos de los déficits cognitivos y de comportamiento que se observan tras la exposición prenatal al etanol.

Aunque tanto las neuronas (259) como los astrocitos (143) participan de forma clave en la neurotransmisión glutamatérgica en el cerebro quisimos, como primera aproximación y antes de analizar el efecto del etanol en cultivos, investigar si la exposición al alcohol *in vivo* afectaba al patrón ontogenético de dos tipos de receptores para glutamato: el NMDA y el receptor de glutamato metabotrópico dependiente de la hidrólisis de fosfatidilinositol.

9.1- Patrón ontogenético de los receptores NMDA durante el desarrollo del hipocampo. Efecto de la exposición prenatal al etanol.

Para analizar los receptores NMDA se utilizó un antagonista no competitivo (MK-801). Además, se usaron membranas aisladas de hipocampo de animales control y PEA a diferentes días del periodo postnatal. En la figura 37 se muestra que en animales control alimentados isocalóricamente en el día 2 PN, la unión de ³H-MK-801 a NMDA representa el 60% del valor adulto. Tras este día, la unión se incrementó a 170% en el día PN 14 y disminuyó gradualmente hasta el valor del animal adulto, que se alcanzó en el día PN 35. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron en el grupo control alimentado con dieta sólida y agua *ad lib*. En las ratas expuestas al alcohol se obtuvo un patrón similar, pero se observó una disminución significativa en la unión del MK-801 en todos los días analizados.

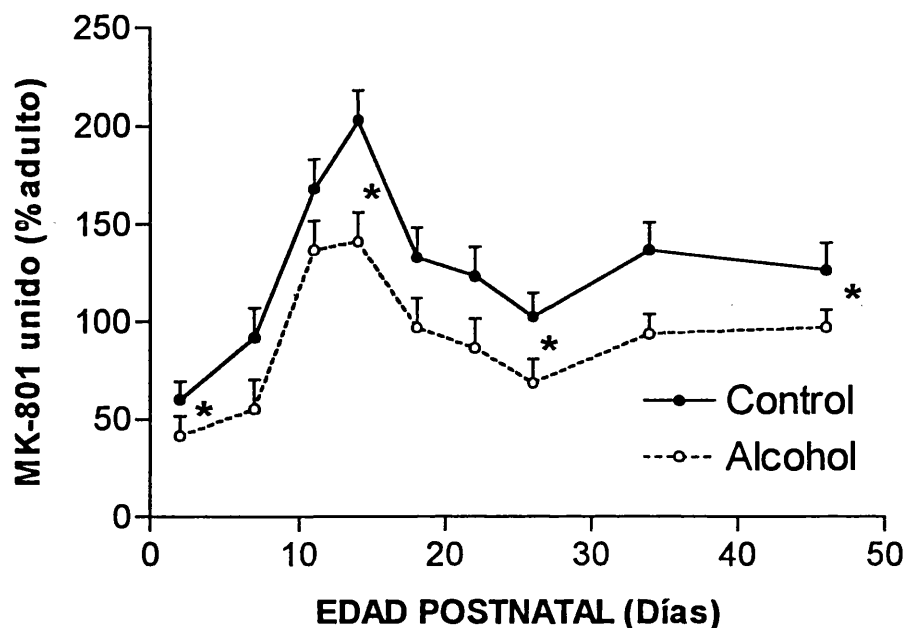


Fig. 37. Perfil en el desarrollo postnatal de la unión de ^3H -MK-801 a membranas de hipocampo de ratas control y expuestas prenatalmente al etanol. Los datos se expresan como porcentaje del valor adulto control (11.7 ± 0.9 pmol/mg prot). Cada valor representa la media de 8-10 crías de 4-5 camadas/grupo. * $P < 0.01$ vs. control isocalórico.

Para determinar si la disminución en la unión de ^3H -MK-801 en el hipocampo de ratas PEA era debida a variaciones en su afinidad por el receptor o bien a un decremento en el número total de receptores NMDA, se realizaron curvas de saturación utilizando diferentes concentraciones (de 10 a 300 nM) de MK-801 en animales control y expuestos al alcohol a los 2, 14 y 26 días del periodo postnatal.

Los resultados se analizaron mediante representaciones de *Scatchard* como muestra la figura 38.

En la figura 38 se observa que en animales control la densidad de los lugares de unión para ^3H -MK-801 se incrementa durante el desarrollo postnatal, mostrando un pico en el día PN 14, donde la B_{max} se incrementa tres veces con respecto a la obtenida en el día PN 2; posteriormente, se produce una disminución en el número de receptores en el día PN 26 (Tabla XIV).

La exposición al alcohol durante el desarrollo de cerebro disminuyó significativamente el número de lugares específicos para el MK-801 (B_{max}) o número de receptores, pero no alteró su constante de afinidad (K_d) (Fig. 38 y tabla XIV) cuando se comparó con los valores control a diferentes días del periodo postnatal.

Tabla XIV. Parámetros cinéticos obtenidos de la unión de ^3H -MK-801 a membranas de hipocampo de cerebro de rata a diferentes días postnatales. Efecto de la exposición el etanol.

DÍAS	CONTROL		ETANOL	
	K_d (nM)	B_{\max} (pmol/mg p)	K_d (nM)	B_{\max} (pmol/mg p)
2	120 ± 23	5.1 ± 0.5	110 ± 22	$2.1 \pm 0.4^*$
14	111 ± 18	15.5 ± 0.8	112 ± 19	$9.2 \pm 0.6^*$
26	118 ± 14	12.8 ± 0.7	102 ± 16	$7.6 \pm 0.7^*$

Los datos se obtuvieron de la Fig. 38 y se estimaron a partir de curvas de saturación utilizando el programa EBDA/LIGAND. Los valores son la media de \pm DS de tres camadas diferentes. * $P \leq 0.01$ vs. valores control.

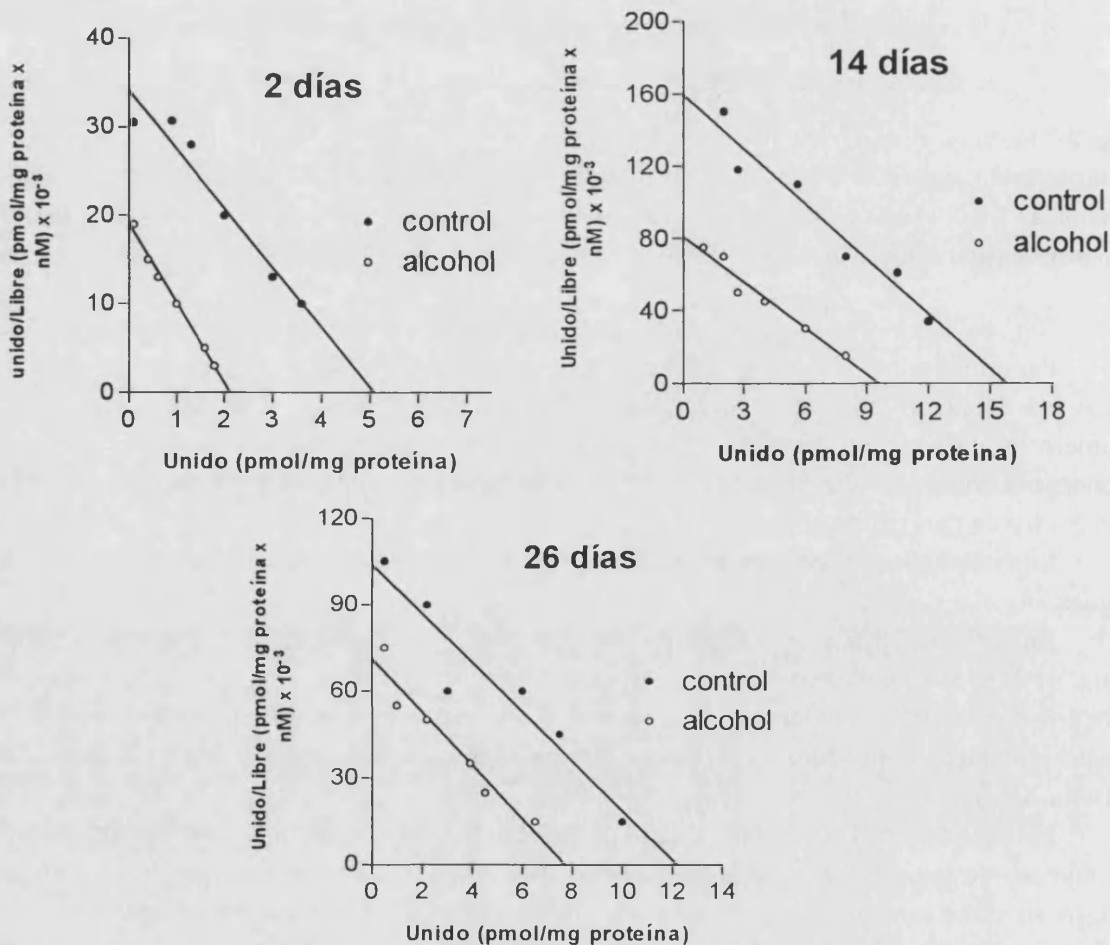


Fig. 38. Análisis Scatchard de la especificidad de unión de ^3H -MK-801 a membranas de hipocampo. Las muestras se prepararon de ratas de 2, 14 y 26 días postnatal control y PEA. Los experimentos se realizaron en presencia de concentraciones variables de ^3H -MK-801 (10-300 nM). Cada punto representa la media de tres diferentes camadas, transformado posteriormente a un punto Scatchard.

9.2.- Evolución en los niveles de los receptores metabotrópico de glutamato asociados a la activación de la fosfolipasa C. Efecto de la exposición prenatal al etanol.

Para investigar el efecto de la exposición al etanol en la actividad de los receptores de glutamato metabotrópicos dependientes de la hidrólisis de fosfolípidos (mGluR), se cuantificó la hidrólisis de PIP₂, mediada por la activación de este receptor con tACPD (trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato). El tACPD es un agonista selectivo del mGluR. En estos experimentos se utilizaron cortes de hipocampo. Paralelamente se midió la hidrólisis de inositol basal en el tejido y no estimulada por el tACPD; los valores basales de esta hidrólisis se muestran en la leyenda de la figura 39.

Como se muestra en la figura 39, la estimulación del PIP₂ por tACPD se incrementó desde el día 2 postnatal al día PN 14, siendo éste el valor máximo obtenido. Posteriormente decreció hasta alcanzar valores del animal adulto a los 35 días postnatal (Fig. 39). La exposición al alcohol produjo un aumento en la hidrólisis del PIP₂, que fue significativa en los días 14, 25 y 35 del periodo postnatal.

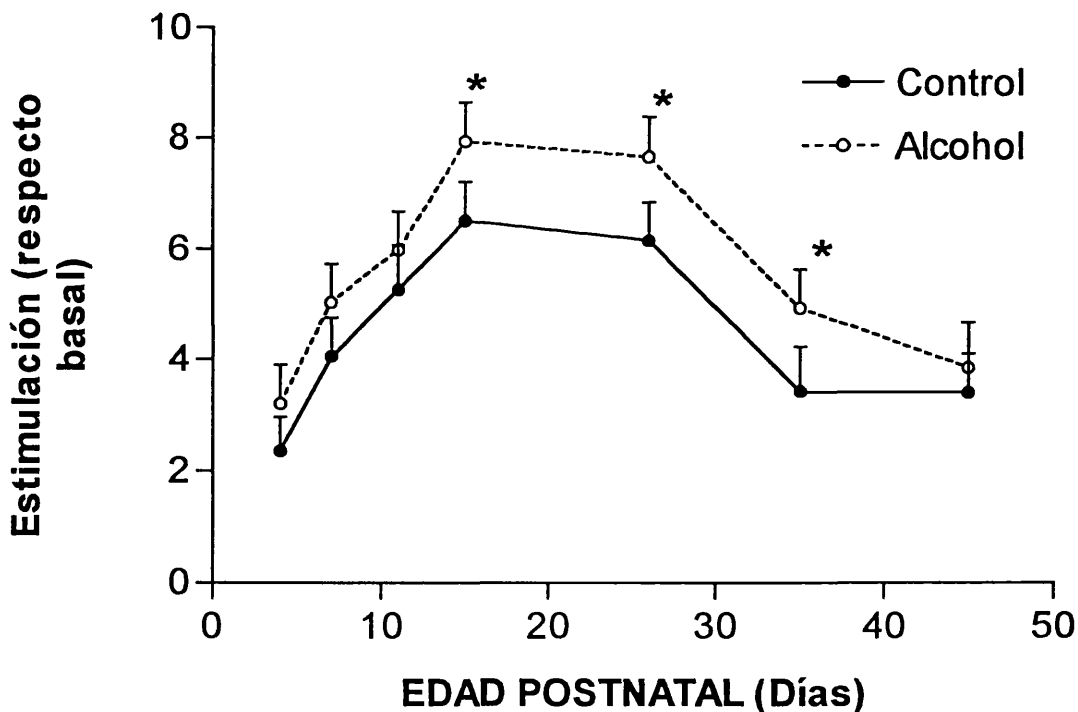


Fig. 39. Efecto de la exposición al etanol en la estimulación por tACPD de la hidrólisis de fosfolípidos durante el desarrollo postnatal. La estimulación se determinó en cortes de hipocampo de ratas control y expuestas prenatalmente al etanol. La hidrólisis basal de los fosfolípidos se determinó en muestras en paralelo incubadas en ausencia de tACPD. Para las ratas control los valores basales fueron 41 ± 11 ; 24 ± 4 ; 22 ± 6 y 16 ± 5 pmol/g de proteína a 4,7,14 y 26 días de edad, respectivamente. Los valores basales PEA no fueron significativamente diferentes a los controles. Los valores son la media \pm DS. de 6-8 crías de 2-3 camadas/grupo. * $P < 0.01$ vs. control isocalórico.

DISCUSIÓN

1.- Patrón de desarrollo de la expresión de la GFAP y vimentina durante el desarrollo de cerebro y en cultivo primario de glía radial y astrocitos.

El desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos es muy amplio y comienza con la formación de la placa neural que, en la rata, tiene lugar en el día 5 de gestación y termina, aproximadamente, en la tercera semana postnatal en roedores (388). Durante este desarrollo tienen lugar, en la mayoría de regiones del sistema nervioso central (ej. corteza cerebral y cerebelar), cuatro fases ontogenéticas importantes (178):

1ª) En esta fase se produce la proliferación o división mitótica de células precursoras en las zonas germinales del tubo neural, que van a dar lugar a células precursoras de neurona o de glía;

2ª) Las células postmitóticas van a migrar desde las zonas germinales a diferentes zonas de la corteza cerebral o cerebelar. Esta migración neuronal va a tener lugar mediante la ayuda de la glía radial que va a guiar a las neuronas a sus lugares de destino. Este proceso se va a desarrollar gracias a los factores de adhesión (ej. moléculas de adhesión celular (N-CAM)) (148) que aporta la glía radial, que también proporciona a las neuronas un entramado para guiarlas desde las zonas germinales a la superficie pial;

3ª) Una vez han llegado a su posición definitiva, las neuronas postmigratorias empiezan a diferenciarse y a adquirir su fenotipo maduro. Durante esta fase se produce un excesivo desarrollo dendrítico y axonal;

4ª) Muchas de las neuronas que se han diferenciado no encuentran su lugar de inervación y mueren. Por lo tanto, durante esta fase se produce la muerte neuronal. Se piensa que algunos de los factores que intervienen en la supervivencia neuronal son los factores tróficos (NGF, neurotrofinas) que les proporcionan las células astrogiales;

Finalmente, las neuronas que han sobrevivido y que han encontrado sus lugares correctos se diferencian formando las conexiones sinápticas definitivas.

El establecimiento de un patrón adecuado que se extiende en el espacio y en el tiempo y la correcta interacción entre células neuronales y gliales va a dar lugar a la formación de una neuromorfogénesis adecuada del sistema nervioso central (326,327).

La glía radial que, como ya hemos descrito, juega un papel muy importante durante la migración neuronal, se caracteriza por poseer una forma alargada que, durante el desarrollo de la corteza cerebral, se extiende radialmente ocupando la pared cerebral desde la zona ventricular hasta la zona apical. Además, estas células intervienen como guía de los axones y conos de crecimiento de las neuronas postmitóticas durante la formación de los circuitos neuronales, garantizando el reordenamiento y la organización espacial de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral y cerebelar (326,327). Estas células en una fase posterior se transforman en astrocitos fibrilares y/o en astrocitos protoplásmicos durante el desarrollo cerebral. En humanos la transformación de glía radial a astrocitos tiene lugar durante el tercer trimestre de gestación; sin embargo en la rata esta transformación ocurre durante el periodo postnatal.

Diversos estudios han demostrado que la glía radial mantiene un fenotipo antigénico característico: (RC1⁺, RC2⁺, vimentina⁺, Rat-401⁺, Ran-2⁺) y que durante su transformación a astrocitos sufre ciertos cambios en su citoesqueleto, apareciendo filamentos intermedios que, además de poseer vimentina, contienen GFAP. Los cambios que ocurren durante esta transformación no están todavía esclarecidos.

De hecho, actualmente se desconoce el origen celular y la diferenciación de las células gliales (55), aunque en una reciente revisión éstos sugieren la posible procedencia de estas células. Sin embargo, lo que sí se conoce es que durante la maduración de las células astrogiales se producen cambios en los componentes del citoesqueleto y modificaciones en la expresión de las proteínas de filamentos intermedios (FI), tales como la GFAP y la vimentina (79).

Diversos estudios han demostrado que, durante el desarrollo cerebral, la glía radial sintetiza vimentina, como primera proteína de los filamentos intermedios (80). Posteriormente, el cambio de vimentina a GFAP se ha descrito que se produce durante la fase de glía radial en humanos y monos (76,213,423) o durante la fase de astrocitos, en el periodo postnatal, en roedores y pollos, (30,370,404,431). Así, estudios inmunohistoquímicos e immunoquímicos han demostrado que en la rata, la GFAP aparece al final del desarrollo fetal o al inicio del periodo postnatal (77,249,351,370,405). Se ha postulado, (79) que la transición de vimentina a GFAP ocurre al comienzo de la mielinización, que en la rata es en el día 12-14 del periodo postnatal. Por lo tanto, hasta el momento no existen evidencias publicadas de que la glía radial en roedores exprese la GFAP, ni tampoco existen evidencias de que el gen que codifica esta proteína se exprese durante la fase fetal en la rata. Éste ha sido uno de los objetivos de este estudio.

Hay que considerar que durante el desarrollo embrionario se genera un gran número de tipos celulares y que éstos se caracterizan por la expresión de determinados genes. Así pues, el análisis de los mecanismos que controlan la transcripción de estos genes con especificidad celular abre el camino hacia la identificación y comprensión de su papel regulador. Los genes que codifican proteínas de FI presentan un modelo atractivo, ya que constituyen una familia multigénica en la que sus miembros se expresan de forma específica en determinados tipos celulares (ej. la GFAP se expresa en astrocitos y los neurofilamentos se expresan en neuronas). Además, los genes de FI presentan homología de secuencia en la región codificante, mientras que las secuencias regulatorias son considerablemente más divergentes.

El tipo III de FI es un grupo de genes que, aunque sus miembros codifican proteínas relativamente grandes, son genes de pequeño tamaño que poseen 9 exones y 8 intrones (307). Este grupo de genes posee una organización muy similar, aunque las secuencias control son muy divergentes. Estas similitudes y diferencias refuerzan el interés del uso de los FI de tipo III como modelo para analizar la regulación génica específica celular. A este grupo pertenecen la GFAP y la vimentina.

La proteína ácida fibrilar de la glía es una proteína de unos 51 kD (430 aminoácidos) de los FI de tipo III y es el componente mayoritario de los FI astrogiales (31,101,214,405).

Aunque la expresión de esta proteína también se ha observado, en una pequeña proporción, en las células epiteliales cerebelares, en las células de la retina y en las células de *Muller*.

En este estudio se ha investigado el comienzo de la expresión del gen de la GFAP tanto durante la fase de glía radial *in vivo* (periodo embrionario) como en cultivo primario de este tipo celular. Al mismo tiempo hemos investigado el patrón de expresión de otra proteína de filamentos intermedios como es la vimentina.

Nuestros resultados demuestran que tanto *in vivo* como en cultivo primario, la glía radial comienza a expresar la GFAP. Así, los resultados *in vivo* muestran que el ARNm de la GFAP se puede ya detectar a los 15 días del periodo embrionario en la rata y en el día 6 de cultivo de glía radial. Nuestros resultados concuerdan con los datos de *Landry et al.* (201) que, usando hibridación *in situ*, demuestran el comienzo de la aparición del ARNm de la GFAP en el día 16 de la fase embrionaria en la rata. Sin embargo, estos autores no logran detectar mediante *Northern* la expresión de esta proteína durante el periodo embrionario de la rata y solo presentan resultados del periodo postnatal. Igualmente, en un trabajo reciente de *Brenner et al.* (47), usando un promotor de la GFAP específico para astrocitos en ratones transgénicos, demuestran que el gen de la GFAP comienza a expresarse el día 12.5 de la fase fetal y que dicha expresión solo se detecta en la glía radial.

Nuestros resultados, así como otros aparecidos recientemente, demuestran que, al igual que en humanos y en primates, la GFAP se expresa en la glía radial del cerebro de rata y que estas células se transforman en astrocitos.

La proliferación y diferenciación de astrocitos ocurre principalmente durante el desarrollo postnatal en la rata (339,405) y se manifiesta por un gran desarrollo de los filamentos intermedios de astrocitos, incrementando significativamente los niveles de la proteína GFAP (249,351). Nuestros resultados concuerdan con estos últimos datos y además demuestran que el nivel de ARNm de la GFAP aumenta significativamente en este periodo tal y como se ha descrito en otros trabajos (201,214,405). Este aumento de ARNm de la GFAP se observa también en células en cultivo primario, tanto de glía radial como de astrocitos; lo que indica que existe un paralelismo entre los estudios *in vivo* e *in vitro*.

Un punto interesante en los niveles de GFAP y su ARNm durante el desarrollo de cerebro, es que mientras la proteína GFAP aumenta progresivamente durante este periodo, el nivel de su ARNm presenta un pico en el día 15 postnatal, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar el nivel del animal adulto. Estos resultados concuerdan con los de *Riol et al.* (343) y aunque no están esclarecidos, estos autores sugieren que durante el desarrollo de cerebro el máximo nivel de transcripción tiene lugar en el día 15 postnatal, manteniéndose constante, o incluso disminuyendo ligeramente, en días posteriores del desarrollo. Respecto al progresivo incremento de la proteína GFAP después del día 15, es interpretado por estos autores como cambios postranscripcionales y/o postraduccionales que puede sufrir esta proteína durante el desarrollo de los gliofilamentos (169). Al mismo tiempo no se descarta un aumento en la degradación del ARNm de la GFAP durante las fases tardías del desarrollo de cerebro. De hecho, los mecanismos que regulan la estabilización de la GFAP, tanto en el cerebro adulto como durante su desarrollo, no se conocen con exactitud, puesto

que la regulación del gen de la GFAP es un proceso complejo con múltiples factores transcripcionales que pueden operar durante el desarrollo (46).

Respecto a la otra proteína estudiada de filamentos intermedios, la vimentina, en este estudio se demuestra que su patrón temporal durante el desarrollo del cerebro es diferente e incluso opuesto al obtenido con la GFAP. En efecto, nuestros resultados demuestran que no existe una transición clara de la expresión de estas dos proteínas, tal y como se había postulado (79), sino que ocurre un solapamiento entre la disminución de vimentina y el inicio de la expresión de la GFAP durante el desarrollo de cerebro de rata.

Existen evidencias inmunocitoquímicas de que la vimentina durante la fase embrionaria, se expresa en las células gliales y en las células de origen mesenquimal y que desaparece a medida que tiene lugar el desarrollo de cerebro (31,80,370). Sin embargo, no existe ninguna evidencia sobre el patrón temporal y espacial de los niveles de ARNm de la vimentina durante el desarrollo del SNC. Los datos del presente trabajo indican que existen altos niveles de vimentina y de su ARNm durante el estadio fetal (día 15 a 21), y que su expresión declina durante el desarrollo postnatal hasta alcanzar a los 21 días niveles similares a los del animal adulto. Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos *in vivo*, en cultivo de glía radial observamos un incremento en la expresión de la vimentina a través de todo el periodo de cultivo. De hecho, también hemos observado altos niveles de vimentina en los cultivos primarios de astrocitos, al igual que otros autores (75,351).

La pregunta que se plantea ante estos resultados, aparentemente contradictorios, es si el aumento de vimentina en el cultivo tiene un significado biológico o representa un estado inmaduro de las células gliales en cultivo. Actualmente se sabe que los FI de las células astrogiales están formados por copolímeros de vimentina-GFAP (322). Además, un estudio reciente utilizando inmunocitoquímica revela que los astrocitos y sus células precursoras presentan filamentos compuestos bien por heteropolímeros de GFAP y vimentina o bien por vimentina solo, y que la relación vimentina-GFAP refleja el grado de diferenciación y el estado funcional de estas células (1). Así, se puede sugerir que durante la diferenciación de la glía radial y su transformación en astrocitos, tanto *in vivo* como en cultivo primario, se incorporan nuevas moléculas de GFAP a los filamentos de vimentina, creándose nuevos heteropolímeros de GFAP-vimentina durante la maduración astrogial. Por lo tanto, durante el desarrollo astrogial, la cantidad de vimentina incrementará paralelamente al desarrollo de los FI o gliofilamentos.

Al mismo tiempo, los elevados niveles de expresión de vimentina que observamos durante el periodo fetal *in vivo*, podrían deberse a la gran proporción de células de origen mesenquimal que expresan vimentina en el periodo fetal. Sin embargo, en estadios más tardíos del desarrollo de cerebro (periodo postnatal), muchas células que expresan vimentina (ej. neuronas) pierden la capacidad para sintetizar la vimentina, mientras que las células astrogiales, como otras células (fibroblastos, etc), todavía expresan vimentina en el cerebro adulto (370). Este razonamiento explicaría la disminución progresiva de la expresión de vimentina durante el desarrollo de cerebro. Por lo tanto, nosotros concluimos que los resultados *in vivo* no se contradicen con el incremento en la expresión de la

vimentina observado en cultivo primario, y que los resultados tienen un significado biológico.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que, durante el desarrollo del cerebro en la rata, la proteína GFAP y su ARNm comienzan a expresarse, aunque a muy bajos niveles, durante la diferenciación de la glía radial en cultivo o *in vivo* durante la fase embrionaria. Estos niveles son máximos durante el desarrollo postnatal del cerebro o en el cultivo de astrocitos. Por el contrario, la vimentina y su ARNm se expresan a elevados niveles durante el desarrollo fetal, disminuyendo durante el desarrollo postnatal. En cambio, en cultivos primarios de glía radial y de astrocitos se observa un incremento en la expresión de la vimentina, que podría tener un significado biológico.

2.- Efecto de la exposición prenatal al etanol sobre la expresión de proteínas de filamentos intermedios astrogliales durante el desarrollo del cerebro.

Como hemos comentado en el apartado anterior, la morfogénesis del sistema nervioso central es muy compleja y es importante la correcta interacción entre diferentes tipos celulares, así como los factores tróficos que intervienen durante las diferentes etapas del desarrollo. De hecho, numerosos estudios indican que los déficits genéticos o factores epigenéticos que producen alteraciones en las células gliales o en las interacciones glía-neurona, durante periodos críticos del desarrollo de cerebro, conducen a anormalidades moleculares, estructurales y funcionales en el cerebro (297).

El etanol es un neurotóxico y su efecto se manifiesta especialmente durante el desarrollo del sistema nervioso central. De hecho, existen pruebas clínicas y experimentales que demuestran claramente que el consumo de alcohol durante la gestación produce una variedad de anormalidades en el patrón de desarrollo cerebral, incluyendo daño en la neurogénesis, muerte celular, migración neural y alteraciones en las proyecciones dendríticas y axonales (61,266). Muchas de estas alteraciones se han observado en niños con síndrome alcohólico fetal, en los que estos déficits se manifiestan por trastornos funcionales cognitivos, retraso mental más o menos severo y alteraciones en el comportamiento (60).

Además de las alteraciones en la neurogénesis, datos de nuestro laboratorio (140) y de otros (82) han demostrado que la exposición prenatal al alcohol también provoca alteraciones en el desarrollo de la astroglia y, de hecho, necropsias obtenidas de niños con SAF demuestran heterotopías neurogliales (60). Hay que considerar que las alteraciones en la astrogliogénesis pueden inducir a modificaciones en las interacciones glía-neurona y podrían contribuir a las anormalidades en el SNC observadas en niños con SAF (140).

Así, mediante la utilización de astrocitos en cultivo primario obtenidos de animales prenatalmente expuestos al alcohol y cultivados en ausencia de este tóxico, nuestro grupo previamente ha demostrado que el etanol reduce la síntesis de ADN y de ARN (141), altera el contenido y la distribución de diversas proteínas de citoesqueleto incluyendo la GFAP (278,337,351) y disminuye las glicoproteínas de la membrana plasmática (331). Las

alteraciones inducidas por el etanol durante el desarrollo de la astrogliá, observadas *in vitro*, también se han observado *in vivo*. De hecho, los cerebros procedentes de animales expuestos al etanol presentan disminuciones significativas en los niveles de dos proteínas marcadoras de astrocitos como son la GFAP y la glutamina sintetasa (140,351). Todos estos resultados parecen indicar que el alcohol altera la astrogliogénesis y sugieren que este tóxico afecta a los precursores de astrocitos, la glía radial, que aparece durante la neuroembriogénesis.

Como anteriormente se ha comentado, la glía radial tiene un papel importante durante la neurogénesis, tanto para la migración neuronal como para la supervivencia de estas células, ya que puede liberar factores tróficos esenciales para el reconocimiento de estas células en sus lugares de invasión y diferenciación neuronal. Por lo tanto, las alteraciones causadas por el etanol sobre la proliferación y diferenciación glial podrían participar en algunas anomalías inducidas por el etanol durante la neurogénesis.

En el presente estudio demostramos que la exposición al etanol durante la embriogénesis induce a una disminución significativa en los niveles de expresión de GFAP tanto *in vivo* como en cultivo primario de glía radial. La disminución en el nivel de expresión de la GFAP durante la fase de diferenciación de la glía radial, observada tanto *in vivo* como *in vitro*, podría explicar la reducción de los niveles de la proteína GFAP que se observa durante la astrogliogénesis (periodo postnatal) en cerebros procedentes de animales expuestos al etanol. De hecho, en el presente trabajo demostramos que la disminución en esta proteína va acompañada de una reducción en los niveles de su ARNm. Esta reducción del ARNm de la GFAP, también se ha observado en astrocitos en cultivo primario procedentes de fetos prenatalmente expuestos al alcohol. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el etanol no actuaría a nivel de traducción, y que dicha afectación se ocasionaría a nivel de transcripción, tal y como demostramos en el presente trabajo. En verdad, en resultados anteriores de nuestro laboratorio, en los que se utilizaba un sistema de traducción *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en el patrón de síntesis de proteínas obtenido de astrocitos control o astrocitos expuestos prenatalmente al alcohol; lo cual sugiere que el etanol podría actuar a nivel de transcripción y no de traducción.

Nuestros resultados también indican que el alcohol no actúa a nivel general sobre todas las proteínas de filamentos intermedios, puesto que los niveles de vimentina y de su ARNm no se ven alterados significativamente durante todo el desarrollo cerebral *in vivo*. Sin embargo, hay que destacar que cuando utilizamos cultivos primarios tanto de glía radial como de astrocitos, en los niveles de ARNm de la vimentina sí que se puede observar una cierta disminución, aunque menor que la de la GFAP. Los diferentes mecanismos por los que el alcohol podría actuar sobre los niveles de transcripción tanto de la GFAP como de la vimentina, se comentan en el apartado 3.1.

En el presente trabajo, mediante la utilización de un cultivo primario de glía radial, mostramos que la exposición al alcohol altera significativamente la morfología de estas células, dando lugar a unos procesos mucho más cortos que los de las células controles, así como a alteraciones del citoesqueleto de estas células. Puesto que a través de estos largos

procesos de la glía radial, las neuronas migran desde las zonas germinales hasta su localización definitiva, es de suponer que una reducción en el tamaño de los procesos gliales conducirá a modificaciones importantes en este estadio de la neurogénesis o migración neuronal.

Todos estos resultados sugieren que la principal diana de la toxicidad del etanol tiene lugar sobre las células germinales y que una alteración en éstas puede desencadenar multitud de alteraciones secundarias, tales como una afectación en la astrogliogénesis y en la neurogénesis (266). De hecho, recientes trabajos en niños prematuros expuestos al alcohol sugieren que las células germinales son particularmente subceptibles a la acción tóxica del etanol (162).

En un reciente trabajo se demuestra que el alcohol afecta principalmente a la proliferación celular y que las células precursoras son las más sensibles a la toxicidad del etanol (265). Nuestros resultados con glía radial apoyan estos datos y sugieren que la exposición al etanol durante el desarrollo embrionario altera la glía radial retrasando su transformación en astrocitos. También han sido descritas por otros autores alteraciones en estas células, tras la exposición al etanol desde el día 7 al 21 de gestación (367). Así, usando inmunohistoquímica, estos autores han encontrado que, aunque los procesos en la glía radial de ratas tratadas con el etanol estaban poco fasciculados y sus procesos eran más cortos, se observaba una aparición precoz de la GFAP. Ello sugiere que el etanol acelera la transformación de la glía radial en astrocitos. Nuestros resultados concuerdan con estos autores en que la glía radial sufre marcadas alteraciones morfológicas; sin embargo, como ya se ha comentado, nuestros resultados sugieren un retraso en la transformación de glía radial en astrocitos. Esta discrepancia puede ser debida a que mientras *Miller y Robertson* (367) usan ratas postnatales expuestas al alcohol durante los días gestacionales 7 a 21, las nuestras se han realizado usando fetos procedentes de ratas tratadas con alcohol antes y durante la gestación. Además, usando este modelo experimental, hemos reproducido en la rata (105,138,334,357) muchas de las alteraciones observadas en los niños con el síndrome alcohólico fetal procedentes de madres alcohólicas (60).

En conclusión, nuestros resultados indican que la exposición al alcohol afectaría mayoritariamente a la células progenitoras, en las que se incluye la glía radial; y que una afectación en la glía radial desencadenaría afectaciones secundarias tales como déficits en el desarrollo de la astrogliá.

Se han demostrado indirectamente en niños con SAF afectaciones en la glía radial. Así, se sabe que durante el desarrollo embrionario, la glía radial sirve de soporte a los axones que unen los dos hemisferios cerebrales y que forman el denominado cuerpo calloso (298). La interrupción de las proyecciones de la glía radial entre los dos hemisferios cerebrales, o la ausencia de esta estructura en ratones mutantes congénitos, impide el crecimiento de axones de una parte a la otra del cerebro y, por lo tanto, no se forma el cuerpo calloso (377). Se han observado agénesis del cuerpo calloso o anomalías en esta estructura en niños con SAF y en niños procedentes de madres alcohólicas (342).

3.- Posibles mecanismos implicados en la disminución de la expresión del gen de la GFAP tras la exposición al etanol.

Cuatro son los posibles mecanismos que, a nuestro parecer, podrían participar en la disminución del ARNm de la GFAP inducida por la exposición prenatal al etanol:

1) El etanol podría inhibir la síntesis de ARN. Efectivamente, estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el alcohol disminuye la incorporación de ³H-Uridina en los astrocitos (336). Sin embargo, éste no es un efecto general, ya que en el presente estudio no se aprecia un cambio significativo en los niveles de ARNm de la vimentina.

2) El alcohol podría interferir en los procesos de transcripción o interaccionar con alguno de los elementos que regulan la transcripción (ej. el lugar AP). En realidad, en el presente trabajo demostramos que la exposición al etanol produce una disminución en el nivel de transcripción de la GFAP;

3) El alcohol podría afectar a la estabilidad del ARNm de la GFAP. En este trabajo nosotros también observamos una alteración causada por el etanol en la estabilidad del ARNm de dicha proteína;

4) El alcohol podría provocar cambios en la metilación del gen de la GFAP, afectando a la transcripción de su ARNm. De hecho, se ha demostrado que la administración aguda de alcohol a ratas preñadas ocasiona una hipometilación del ADN fetal (120), y esto sugiere que este ADN hipometilado puede alterar la expresión de ciertos genes y podría participar en los efectos teratogénicos del alcohol;

3.1.- Efecto del etanol sobre la transcripción de los genes de la GFAP y vimentina .

Los resultados del presente trabajo demuestran que el etanol altera el nivel de transcripción de la GFAP en núcleos aislados de astrocitos y este efecto es específico para este gen ya que ni el nivel de la vimentina, ni el nivel de la ciclofilina se alteran de forma significativa. Los mecanismos moleculares por los que el etanol produce alteraciones en la transcripción de la GFAP pueden ser bastante complejos, ya que en la regulación del gen de la GFAP intervienen numerosos elementos que interaccionan con el ADN y su regulación durante el desarrollo del sistema nervioso todavía se desconoce (46).

El gen de GFAP ha sido aislado y caracterizado en rata, ratón y humano. El gen humano se encuentra localizado en el cromosoma 17, mientras que el gen de ratón está localizado en el cromosoma 11. Las secuencias reguladoras del gen de ratón han sido extensivamente analizadas tanto *in vitro*, en líneas celulares, como *in vivo*, en ratones transgénicos.

En el caso del gen de la GFAP de roedores, se ha determinado la secuencia entera del promotor y los lugares de inicio de la transcripción (273,274). Se sabe que las secuencias

requeridas para la expresión específica de tejido se localizaban dentro de 256 pb antes del punto de inicio de la transcripción. Usando ensayos de impronta con DNasa (*Dnase footprinting*), se han identificado en esta región tres lugares de unión para factores de transcripción designados como GFI (-104 a -82), GFII (-124 a -104) y GFIII (-163 a -140) (Fig. 40).

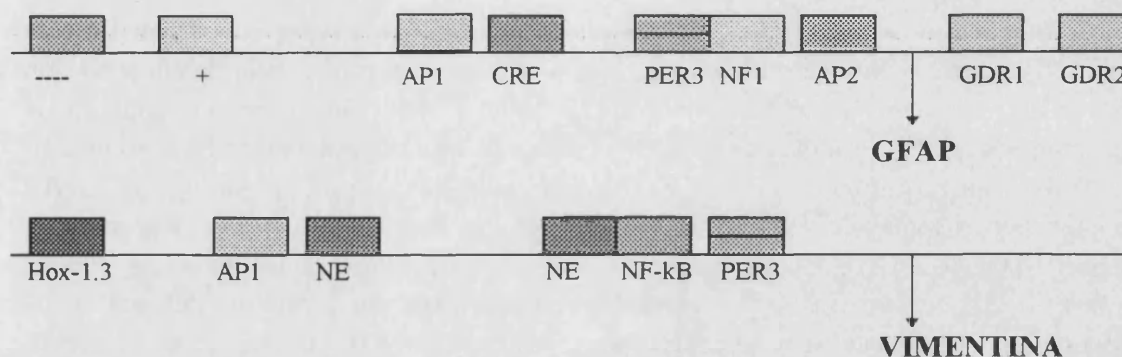


Fig. 40. Elementos reguladores de los genes GFAP y vimentina. Representación esquemática de los elementos reguladores 5' de los genes de FI de la clase III: GFAP y vimentina. Se indican los nombres de las secuencias que corresponden a elementos consenso conocidos: GFI (AP 2), GFII (NF 1), GFIII (CREB) para la GFAP y PER 3, AP1 Y NFKB para vimentina. En este esquema, en la región cadena arriba de la vimentina se observa la presencia de lugares de unión para la familia de homeoproteínas Hox, que deben jugar un papel en el complejo control durante el desarrollo de la expresión de la vimentina.

El lugar de unión GFI es homólogo al lugar de unión para el factor AP2, mientras que los lugares de unión GFII y GFIII corresponden a secuencias consenso de los elementos responsables NFI y AMP-cíclico, respectivamente. Las mutaciones en el lugar de unión GFII disminuyen la actividad del promotor, mientras que una sustitución de una o más bases en el lugar GFI y GFII produce expresión de luciferasa en las líneas celulares negativas para la GFAP, en las que el promotor de tipo salvaje no está activo. Por lo tanto, parece que el promotor proximal de la GFAP está compuesto tanto de elementos positivos (GFII), como de dos elementos negativos específicos de tejido (GFI y GFIII). Por otra parte, estos autores no han encontrado ninguna secuencia correspondiente a los factores de transcripción específicos gliales, indicando este dato que la especificidad celular podría deberse a una combinación de otros factores.

Otros estudios, usando una aproximación similar, describen un lugar AP 1, TGACTCT, localizado inmediatamente cadena arriba del lugar GFIII (360). Se han obtenido evidencias claras de la participación del lugar AP 1, que se conserva dentro de los genes del ratón, de la rata y de los humanos. La secuencia AP 1 se descubrió originariamente como el lugar de unión para la Proteína Activadora-1, un heterodímero de los factores de transcripción proto-oncogénicos c-jun y c-fos (330). Estos factores son las

primeras proteínas que se inducen mediante gran variedad de estímulos e intervienen en algunos de los cambios en la regulación génica inducida por hormonas, factores de crecimiento y antígenos. Finalmente, se sabe que hay miembros adicionales de las familias de las proteínas *jun* y *fos* que se pueden unir al lugar AP 1 en combinaciones diméricas diversas entre ellos o con otros factores de transcripción para producir ya sea activación o inhibición de la transcripción, dependiendo de los miembros de la familia unidos y de que se presenten otros factores (26,271).

Sin embargo, otros estudios indican que el lugar de unión AP 1 es extremadamente débil (288), y por lo tanto su relevancia biológica es dudosa. Por otro lado, la conservación marcada de esta región entre los roedores y el hombre indica un importante papel en la regulación. Esto también lo ha corroborado el hecho de que las mutaciones en la zona -256 pb no producen expresión en ratones transgénicos, mientras que los fragmentos de GFAP que contienen la región, cadena arriba, sí que producen expresión (46). Por otra parte, la secuencia TGGGGTGAGA, que muestra alguna similitud con el lugar de unión para el factor PER 3 que participa en el control de la actividad del promotor del gen de la *periferina*, está localizada entre los nucleótidos -142 y -133 (87), pero no se ha detectado ninguna unión a este lugar.

Otros investigadores, usando el gen de la GFAP entero, encuentran elementos adicionales importantes localizados en las regiones intragénicas. Así, se ha demostrado que una región cadena arriba localizada entre los nucleótidos -1631 y -1479 es un elemento positivo específico glial, mientras que un elemento regulatorio negativo localizado en el primer intrón, impide la transcripción en células no gliales (361). Además, usando métodos de transfección, otros autores han demostrado la presencia de dos elementos regulatorios negativos específicos celulares dentro del gen de la GFAP (183). GDR1, una región de 2.7 kb que se extiende desde el primer intrón al quinto exón, impide la activación de promotor de 10.8 kb en el tejido no neuronal. Un elemento adicional GDR2, localizado en la región 1.7 kb cadena arriba del lugar poliadenilado, impide la expresión en células neuronales. Estos elementos regulatorios negativos funcionan de una manera independiente a la posición, y ambos se necesitan para la expresión propiamente dicha del gen de la GFAP (Fig. 40).

Los estudios con ratones transgénicos con el gen de la GFAP (47,285), dan a entender que el transgén se expresa y que su actividad se limita al SNC y específicamente a los astrocitos.

En lo referente a los posibles factores que regulan la transcripción del gen de la GFAP hay que decir que se tiene un gran desconocimiento de la modulación de este proceso y especialmente en lo que se refiere al desarrollo del SNC (46). Sin embargo, existen evidencias de que las proteínas quinasas A y C podrían controlar este proceso a través de la interacción con los elementos responsables del AMP-cíclico y del lugar AP1 (373). Este podría ser uno de los lugares de interacción del etanol con la transcripción del gen de la GFAP, puesto que el etanol afecta a ambas proteínas quinasas (263,309). De hecho, la exposición prenatal al alcohol induce a una disminución significativa en los niveles de

AMPCíclico de cerebro y afecta a la proteína quinasa A (310). Una disminución en el AMPcíclico podría modular negativamente la transcripción del gen de la GFAP.

Al mismo tiempo, se sabe que la estimulación hormonal, ciertos factores de crecimiento y las citoquinas también pueden modular la expresión de la GFAP (203). El análisis comparativo de las secuencias cadena arriba 5' de los genes de la rata, ratón y humano presenta elementos de respuesta para esta modulación, conservados en las tres especies. La exposición prenatal al etanol afecta de manera muy importante a un gran número de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (105,317,424). Por lo tanto, ésta podría ser otra de las causas por las que el alcohol indirectamente afectaría la transcripción.

Estos resultados indican que el etanol podría interferir en el proceso de transcripción al interactuar de forma indirecta con elementos reguladores de este proceso.

En lo referente a la vimentina, nuestros resultados indican que el etanol no afectaría significativamente a su nivel de transcripción. La pregunta que se plantea es qué diferencias existen entre los genes de la GFAP y la vimentina para explicar la diferentes efectos causados por el etanol.

El gen de la vimentina pertenece a la familia de genes expresados tempranamente en el desarrollo y que se activan rápidamente cuando las células se estimulan (110). En los genes de humano, de hámster y de pollo se han caracterizado los lugares de unión intensificadores y los elementos negativos (Fig. 40) (344,352,364,392). En el control de la expresión del gen de la vimentina intervienen dos intensificadores correspondientes al AP 1/c-jun y a NF-kB, que explicarían uno de los mecanismos moleculares por los que el gen de la vimentina es un gen inducible por mitógenos (Fig. 40) (344,233). Los residuos intensificadores proximales al NF-kB, cadena arriba del promotor, y los elementos silenciadores y desilenciadores cadena arriba, podrían ser importantes en la limitación de la expresión del gen. El elemento intensificador más distal, que consiste en un tándem de lugares de unión de AP 1/Jun (TGAGTCA Y TGAATA), está localizado en una región regulatoria negativa localizada 5' (Fig. 40). Estos dos lugares intervienen en la inducción.

El promotor de la vimentina posee seis motivos ricos en A + T homólogos a los lugares conocidos de unión para las homeoproteínas de la familia Hox, que están localizados entre los nucleótidos -1226 y -1549. Los experimentos de impronta genómica (*footprinting*) han demostrado que las proteínas Hox-A5, que son miembros de la familia Hox de proteínas con homeodominios de control durante el desarrollo, son capaces de unirse específicamente a estos motivos. Además, diversas observaciones indican que las proteínas con homeodominios juegan un papel en la regulación de la expresión durante el desarrollo del gen de la vimentina.

Sin embargo, existe una diferencia entre el lugar AP 1 de la GFAP y el de la vimentina. En el promotor de la GFAP solo existe un elemento AP 1, mientras que en la región regulatoria de la vimentina la secuencia consenso doble AP 1 puede considerarse como dos repeticiones invertidas formando un palíndromo casi perfecto. Por lo tanto, esto podría explicar que la modulación del lugar AP 1 en la GFAP sea diferente a la de la vimentina y que la afectación del alcohol sea diferente.

El hecho de que la vimentina presente una región cadena arriba de lugares de unión para la familia de las homeoproteínas Hox debe jugar un papel importante durante el desarrollo en el control de la expresión de esta proteína, y tal vez el hecho de que el alcohol no afecte significativamente al nivel de transcripción de la vimentina pueda deberse a que estas regiones reguladoras no se encuentran ni en la GFAP ni en otras proteínas de filamentos intermedios de tipo III.

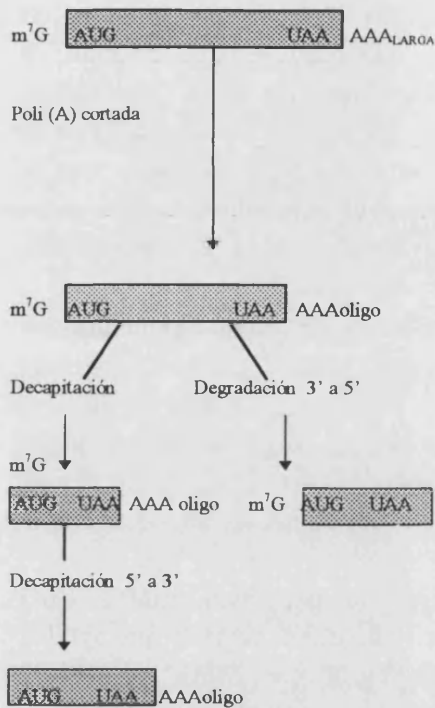
3.2.- Efecto de la exposición al alcohol sobre la degradación de ARNm.

Los factores que regulan la estabilidad de los ARNm en eucariotas no son suficientemente conocidos (308), y los mecanismos específicos que intervienen en la desestabilización inducida por el alcohol del ARNm de la GFAP no se saben con exactitud.

El recambio de ARNm es muy importante para determinar los niveles y la regulación de la expresión génica. Los mecanismos de degradación de los ARNm de eucariotas que actualmente se conocen se exponen resumidos en la figura 41. Una vía de degradación de ARNm se inicia por el corte de la cola poli(A) seguido por la decapitación y degradación exonucleolítica 5' a 3' de los transcritos. Una variación de esta vía degrada los transcritos 3' a 5' después del corte de la cola poli(A). La degradación de ARNm puede también iniciarse sin ser necesario el corte de la cola poli(A); por ejemplo, algunos transcritos específicos pueden ser degradados por una vía independiente de deadenilación, originándose decapitación y posterior degradación 5' a 3'. Además, la degradación de ARNm también puede empezar por un corte endonucleolítico en el cuerpo del transcrito. Basándose en los mecanismos de degradación del ARNm, se ha propuesto un modelo integral de recambio (Fig. 41). En este modelo, todos los ARNms eucariotas poliadenilados se degradarían por una vía dependiente de deadenilación, que puede conducir a decapitación y degradación exonucleolítica 5' a 3' o degradación 3' a 5' mediada por endonucleasas, exonucleasas, o por ambas. Adicionalmente a esta vía, otros ARNms poseerían unos mecanismos de degradación específicos, tales como endonucleasas de corte específicas de secuencia y decapitación independiente de la deadenilación. De esta manera, el nivel de degradación de un transcrito individual será una función de su susceptibilidad a esas vías de recambio.

En este trabajo, para investigar si la disminución en la expresión de la GFAP en astrocitos PEA era debida a una mayor inestabilidad de su ARNm, se inhibió la síntesis de ARN tratando los astrocitos, tanto control como PEA, con 10 μ M de α -amanitina, un inhibidor de la ARN polimerasa II. En el presente trabajo demostramos que el alcohol afecta a la estabilidad de los transcritos del ARNm de la GFAP, no alterando la estabilidad del ARNm de la vimentina. Así, mientras en las células control la vida media del ARNm de la GFAP fue de 9 h, en células PEA la vida media se acortó en dos horas, disminuyendo la estabilidad del ARNm de la GFAP en, aproximadamente, un 20%.

Degradación dependiente de deadenilación



Degradación independiente de deadenilación

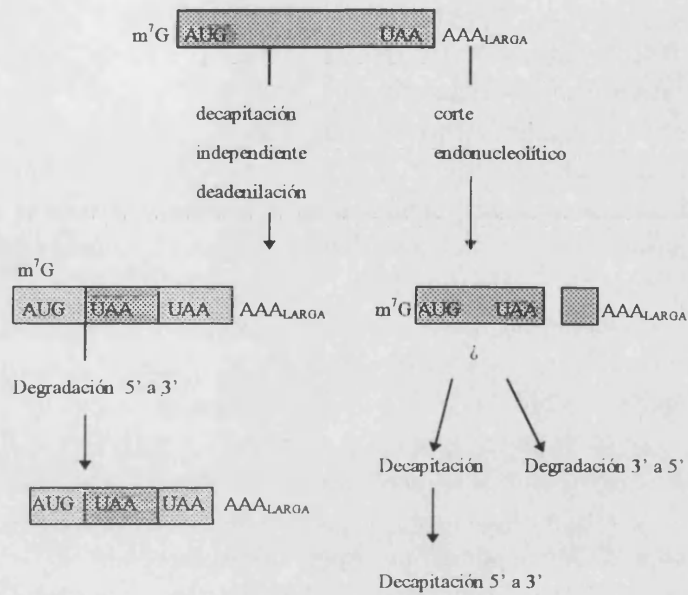


Fig. 41. Vías de degradación de ARNm en eucariotas.

Dos secuencias consenso AUUUA se encuentran en la región 3' no traducida del ARNm de la GFAP de ratón (215). Regiones idénticas ricas AU se localizan en las regiones 3' no traducidas de ARNms con vida media corta, esta secuencia produce inestabilidad cuando se introducen en el 3' final de ARNms estables (374). La desestabilización ocasionada por el alcohol en el ARNm de la GFAP podría ser debida a una afectación sobre las proteínas que interactúan con los elementos ricos AU. Por otra parte, el incremento en el calcio intracelular es uno de los factores que aumentan la vida media de ARNms específicos eucariotas (24,301,439), y es posible que la inestabilidad de la GFAP esté relacionada con la disminución del contenido de calcio en los astrocitos tratados con alcohol (424).

La conclusión del efecto del alcohol sobre una mayor inestabilidad del ARNm de la GFAP obtenida en nuestros resultados, en nuestra opinión, no va a representar un mecanismo importante que actúe en el cerebro, puesto que resultados anteriores de nuestro laboratorio indican que el etanol no altera ni la degradación de proteínas en cerebro entero, ni en astrocitos en cultivo primario. Por lo tanto, creemos que el efecto del etanol sobre la transcripción de la GFAP va a representar un mecanismo más importante que la degradación del etanol sobre el ARNm.

3.3.- Cambios en la metilación del ADN de la GFAP.

Durante el desarrollo embrionario y en momentos críticos del mismo proceso, las células responden a señales intra y/o extracelulares activando o desactivando la transcripción de determinados genes que van a dar lugar a su expresión en un determinado tejido u órgano. El mecanismo o los mecanismos involucrados en este proceso todavía se desconocen con exactitud. Sin embargo, desde hace varios años se sabe que los procesos de metilación/desmetilación del ADN podrían regular la actividad transcripcional de genes durante el desarrollo y establecer la especificidad de tejido (32,59,98,331). Este importante papel de la metilación del ADN lo apoya el hecho de que las mutaciones en el gen de la ADN-metiltransferasa producen una reducción en la metilación del ADN del embrión y causan anomalías en el desarrollo, letalidad en el embrión y alteraciones en la impronta genómica (216,217).

Se ha sugerido que, al menos, existen tres posibles mecanismos que podrían explicar la participación de la metilación del ADN en la actividad génica:

1º) Un mecanismo directo en el que la metilación de citosinas podría interferir con la unión de factores de transcripción específicos (167).

2º) Un mecanismo indirecto donde la metilación de los dinucleótidos CpG representaría una secuencia de reconocimiento para proteínas de unión al ADN que ayudan a la estabilidad de la inactividad transcripcional. Dos de esas proteínas, MeCP1 y MeCP2 pueden unirse a pares de bases CpG metiladas dentro de una secuencia (32).

3º) Un tercer mecanismo sería el que correlaciona la metilación del ADN con la organización de la estructura de la cromatina (372).

El genoma adulto tiene un patrón bimodal de metilación del ADN en el que muchos genes específicos de tejido se modifican. Las modificaciones en la metilación se establecen en el desarrollo temprano del embrión y también ocurre en la regulación de la expresión génica global. Durante la diferenciación, los genes específicos de tejido presentan un programa activo de desmetilación que representa un paso esencial en su activación (98).

La GFAP constituye un buen modelo para estudiar el control de la transcripción en eucariotas, dado que este gen se expresa en un momento determinado durante el desarrollo, solo en sistema nervioso y además es específico de un determinado tipo celular que son los astrocitos.

Además, el estudio de la GFAP presenta otras características interesantes. Siendo un gen que codifica a una proteína bien caracterizada, hasta los últimos años no se ha estudiado su estructura y solo existen dos trabajos, descritos recientemente, que hayan abordado la posible diferencia de los patrones de metilación del ADN de la GFAP entre el cerebro y otros tejidos en los que este gen no se expresa (riñón, hígado) (63,408). Finalmente, no existe ningún estudio que haya abordado las posibles variaciones de los patrones de metilación de este gen durante el desarrollo del cerebro y el inicio de su expresión en este órgano.

Por eso en el presente trabajo hemos estudiado el patrón de metilación de este gen durante el desarrollo del cerebro en la rata. Se ha comparado el patrón de metilación del gen

de la GFAP en el hígado y cerebro de rata usando las endonucleasas de restricción Msp I, Hpa II y Hha I. Las digestiones de ADN genómico con endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, seguido por análisis *Northern*, es un procedimiento común y bien establecido para detectar citosinas metiladas (33). Sin embargo, este procedimiento presenta algunas limitaciones entre las que se incluyen:

1ª) El análisis se restringe solo a dinucleótidos CpG incluidos en una secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción sensibles a la metilación.

2ª) No es posible analizar separadamente dos lugares cuando la distancia entre ellos no permite una buena resolución de los fragmentos en la electroforesis de los geles de agarosa (este hecho es particularmente evidente cuando una agrupación de lugares adyacentes se encuentra en una isla CpG).

3ª) Mediante este procedimiento no es posible realizar cuantificaciones precisas de pequeñas diferencias de metilación.

El análisis de la metilación usando enzimas de restricción presenta, por lo tanto, variabilidad si las digestiones enzimáticas no son completas, o si en las preparaciones de ADN hay presencia de inhibidores de las enzimas de restricción.

Para evitar las limitaciones que presenta este procedimiento, en el presente estudio las transferencias *Southern* (*Southern blots*) se repitieron al menos tres veces con diferentes preparaciones de ADN y las variaciones encontradas en el patrón de bandas, en los diferentes experimentos, fue < 15%. Además, para excluir la presencia de inhibidores en las preparaciones de ADN de hígado que podrían explicar la ausencia de corte, mezclamos ADN de hígado y de astrocitos antes de la digestión. En este experimento no observamos ninguna inhibición de la digestión del ADN astrogial. Cuando utilizamos la enzima Hpa II, la accesibilidad al ADN del enzima de restricción se demuestra también por la digestión completa observada con la insensibilidad a la metilación del isoesquizómero Msp I. En conclusión, este procedimiento nos permite detectar las diferencias en el nivel de metilación, por comparación de los mismos lugares en diferentes poblaciones celulares.

Cuando se compararon los patrones de metilación entre el ADN de hígado y cerebro adulto usando las enzimas Msp I y Hpa II, se obtuvieron los siguientes resultados. En el caso de los experimentos con Msp I, se observaron digestiones completas de ambos ADNs, con patrones similares. Hay que considerar que esta endonucleasa corta, estén o no metilados, los ADNs y por lo tanto se usa como control de la libre accesibilidad del ADN a la acción de la enzima. Los patrones de corte con Msp I, al presentar siempre los mismos fragmentos, nos indican que no existen deleciones, reordenamientos ni amplificaciones del gen de la GFAP. Sin embargo, cuando se utilizó la enzima Hpa II, se observó una diferencia clara entre ambos tejidos. Así, se observó una banda en hígado de aproximadamente 2600 pb que no aparecía en cerebro (Fig 31). Estos resultados parecen sugerir que cuando existen zonas cadena arriba del exón 1 que se encuentran metiladas (ej. hígado), la Hpa II no puede cortar, dando lugar a una banda intermedia entre las bandas de 5500 y 1200 pb.

Al mismo tiempo, cuando se compararon los patrones de metilación obtenidos de ADN de cerebro adulto y de cerebro en desarrollo (15 y 21 días fetal) usando las mismas enzimas de restricción (Hpa II y Msp I), se obtuvo una banda poco marcada en cerebros de

fetos de 21 días y fuertemente marcada a 15 días fetal. Esta banda tenía aproximadamente los mismos pares de bases que la observada en el hígado, de alrededor de 2600 pb (ver Fig. 31 en el apartado de resultados).

Cuando para analizar posibles diferencias entre el ADN de cerebro adulto y fetal (15 y 21 días) se utilizó la enzima Hha I, también se pudo observar una banda adicional que aparecía en el cerebro fetal pero no en el cerebro adulto y se calculó que poseía unos 2.900 pb. Esta banda parecía proceder de lugares metilados cadena arriba del lugar de corte +114 a +295 del exón 1 (63). Estos resultados sugieren que la región -1176 del gen estaba metilada y por lo tanto la enzima no puede cortar en esta zona (Fig. 42).

Según nuestros datos y de acuerdo con los datos de *Condorelli et al.* (63) y *Teter et al.* (408), el estatus de metilación de los lugares CpG dentro del exón 1 no se correlaciona con la expresión específica de tejido de la GFAP, ya que los enzimas de restricción Hha I y Hpa II, en los lugares de corte del exón 1, no muestran diferencias de metilación entre el hígado, cerebro adulto y cerebro fetal. En cambio, el lugar CpG al -1176 (banda de unos 2600 pb en Hpa II o de unos 2900 pb en el caso de Hha I) presenta una hipermetilación en el hígado y cerebro fetal (15 días) y conforme avanzamos en el desarrollo, esta zona se desmetila, hasta llegar al estado más hipometilado encontrado en el cerebro adulto. Esos resultados indican que la desmetilación del lugar -1176 está correlacionado tanto con la expresión específica de tejido (en cerebro y no en otros órganos), como con el desarrollo del sistema nervioso. De hecho, nuestros datos demuestran que la expresión de la GFAP se inicia levemente a 15 días fetal y ésta aumenta según se avanza en el desarrollo del cerebro.

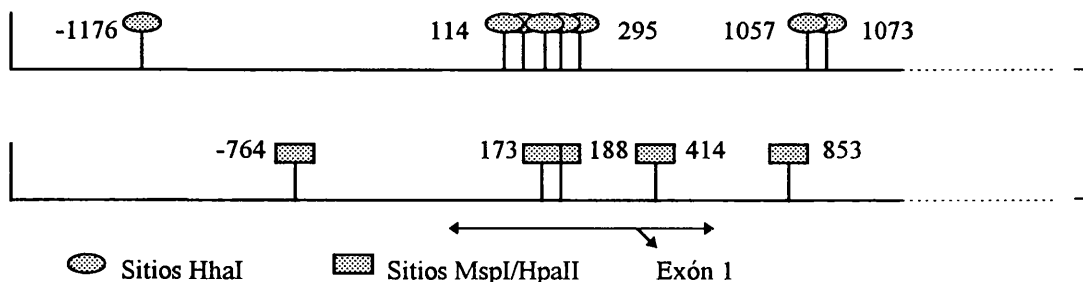


Fig. 42. Posiciones de metilación de la HhaI y MspI/HpaII y lugares de reconocimiento en la secuencia flanqueante 5', el primer exón y parte del primer intrón del gen de la GFAP de rata.

Por otra parte, cuando analizamos el patrón de metilación de los fetos prenatalmente expuestos al etanol de 15 y 21 días, tanto con la enzima Hpa II como con la Hha I, y lo comparamos con el patrón obtenido de fetos control, se observa una mayor metilación en el lugar -1176 del gen de la GFAP en el caso de las ratas expuestas al etanol. Esta hipermetilación se correlacionaría con una menor expresión de este gen en los animales expuestos al etanol y podría participar como mecanismo implicado en la disminución de los

niveles de transcripción que observamos en los astrocitos PEA, así como en la disminución de la expresión de la GFAP observada tanto *in vivo* como *in vitro*.

Según *Condorelli et al.* (63) y *Teter et al.* (408), el lugar -1176 es una región importante ya que pertenece a un grupo de 10 lugares que se encuentran concentrados dentro de un segmento de 0.5 kb en las posiciones del gen -1471 y -965. Esta región resulta interesante por dos razones:

1ª) Sigue a un segmento de 0.4 kb que se ha sugerido que juega un papel importante, como un intensificador distal, en la determinación de los altos niveles de la expresión génica específica de tejido (253,360,361).

2ª) El segmento entre -1600 y -1100, que incluye la región regulatoria distal (253,360,361), está altamente conservado en el gen de rata, ratón y humano (46). Dentro de este segmento, en la posición -1505, en el gen de la rata (inmediatamente corriente arriba del segmento conteniendo la CpG -1176), se encuentra localizada una secuencia consenso AP 1 altamente conservada en el gen de rata, ratón y humano. La importancia de esta secuencia AP 1 radica en que es un elemento crucial en la transcripción de la GFAP en astrocitos y además es un lugar de unión de factores de transcripción tales como Fos y Jun (253).

Finalmente nuestros resultados demuestran tres puntos importantes:

1º) La hipermetilación del lugar -1176 del gen de la GFAP está inversamente correlacionada con la expresión de este gen, tal y como también ha demostrado (63,408).

2º) La desmetilación del lugar -1176 sería la que daría lugar a la expresión de este gen durante el desarrollo del cerebro. Este dato por primera vez lo demostramos en este trabajo.

3º) La exposición prenatal al alcohol provoca una pérdida de la desmetilación y por lo tanto una alteración en la expresión de este gen.

Finalmente, una hipermetilación del ADN inducida por la exposición prenatal al etanol podría explicar el aumento de tumores que se observa en niños procedentes de madres alcohólicas (74). Se ha postulado que las regiones cromosómicas hipermetiladas podrían inhibir la transcripción de ciertos genes supresores de tumores, favoreciendo la aparición de ciertos tipos de cáncer.

4.- Alteración producida por la exposición prenatal al alcohol en el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor en células astrogliales.

Una de las fases que tiene lugar durante la neurogénesis es la muerte neuronal programada, en la que un gran porcentaje de estas células mueren y aproximadamente de un 10 a un 15% (según algunas regiones del cerebro) encuentran sus lugares de inervación y sobreviven. El proceso por el cual estas últimas encuentran su lugar de inervación es complejo, pero uno de los elementos que intervienen es la presencia de ciertos factores tróficos, que ayudan al reconocimiento de los lugares de inervación entre diferentes poblaciones celulares. El factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de los factores tróficos más conocidos y caracterizados aunque su función se limita a poblaciones de

neuronas colinérgicas y del sistema nervioso periférico, si bien recientemente también se ha descrito que puede actuar sobre otros tipos de neuronas del SNC. En los últimos años, se ha demostrado que el NGF pertenece a una familia de proteínas entre las que se encuentran: factor neurotrófico derivado de cerebro o BDNF, neurotrofina-3 o NT-3 y neurotrofina 4/5. Todas estos factores neurotróficos están relacionados estructural y funcionalmente y son conocidos como neurotrofinas (Nts). Las Nts poseen una acción trófica mucho más amplia que el NGF ya que influyen en la supervivencia tanto de células neurales (neuronas y glía) como no neuronales (monocitos, keratinocitos, basófilos, etc).

Todas las neurotrofinas ejercen su acción a través de dos tipos de receptores, uno común para todas ellas, el p75 y los recientemente descritos, producto de oncogenes denominados Trks. El p75 se une con baja afinidad a las neurotrofinas, y desde hace muchos años se sabe que se une al NGF y, de hecho, se le reconoce en muchos trabajos como NGFR (NGFreceptor). Referente a los Trks, en los últimos años se ha demostrado que se unen a las neurotrofinas con alta afinidad y que poseen en su estructura un dominio tirosina quinasa, que facilita la transmisión de señales mediadas por sus propiedades tróficas. Estos últimos receptores se han clasificado como TrkA, TrkB y TrkC, dependiendo de la unión con las diferentes Nts. Así, el NGF interacciona con el TrkA, el BDNF y NT-4 con el TrkB y la NT-3 con el TrkC (43) (Fig. 43).

Mediante la eliminación de genes que codifican a las Nts y a sus receptores en animales experimentales (*knockout mice*) se han podido demostrar las diferentes funciones que poseen estos factores tróficos durante el desarrollo del sistema nervioso central y el periférico, y que en general incluyen morfogénesis, desarrollo, diferenciación y supervivencia neuronal, y plasticidad de diferentes poblaciones del SNC y SNP. Al mismo tiempo, los déficits o variaciones en los niveles de NTs y/o en sus receptores (Trks) durante el desarrollo del SNC, podrían explicar el mecanismo de ciertos tóxicos que producen un aumento de muerte neuronal y dan lugar a graves alteraciones en la plasticidad neuronal.

El papel y la presencia tanto de las diferentes NTs como de los Trks se ha demostrado principalmente en neuronas y todavía no se conoce la participación de estos factores tróficos en astrocitos, así como la posible regulación de estos factores en las interacciones neurona-glía. Sin embargo, sí se conoce desde hace unos años que las células astrogliales expresan y liberan el NGF tanto *in vivo* como en cultivo primario (118,243). Se ha sugerido que durante el crecimiento glial, la glía sintetiza localmente NGF en diferentes áreas del cerebro y que estas acciones locales podrían jugar un papel crítico en la regulación del crecimiento neuronal durante el desarrollo (243) y en el daño cerebral (293). A su vez, en los últimos años se ha demostrado que otras NTs también pueden ser liberadas por este tipo de células (237). Esto último parece indicar que las células astrogliales podrían jugar un papel importante en la liberación y regulación de estos factores neurotróficos; sin embargo no se han realizado estudios sobre la presencia de los receptores de las neurotrofinas en los astrocitos.

Nuestros resultados demuestran que los astrocitos liberan gran parte del NGF que sintetizan ya que aproximadamente el 90% es liberado y solo un 1% es retenido a nivel celular. Al mismo tiempo, nuestros datos también demuestran que la liberación del NGF es

mayor durante la proliferación que durante la diferenciación astrogial, tal y como se ha sugerido en anteriores trabajos (118,243). Existen pruebas que sugieren que el NGF astrogial puede ser crítico durante el desarrollo temprano. Así, durante la ontogenia del SNC, la producción de NGF por los astrocitos que se encuentran en activo crecimiento, podría guiar los axones a sus lugares de inervación definitivos. Al mismo tiempo, se ha demostrado que los astrocitos también pueden liberar NGF en circunstancias de daño neuronal en el sistema nervioso adulto. En estas últimas condiciones se sabe que existe una rápida proliferación astrogial (gliosis reactiva) y posiblemente los astrocitos también liberen este factor neurotrófico junto con otras neurotrofinas para prevenir el daño neuronal que se ocasiona.

En este estudio también se ha tratado de caracterizar el receptor o receptores para NGF mediante la unión de (125 I)NGF a astrocitos. Nuestros estudios cinéticos demuestran que los astrocitos solo unen el NGF con una constante de afinidad baja (10^{-9}) no detectándose, en nuestras condiciones, el receptor de alta afinidad. Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que los astrocitos solo poseen el receptor $p75^{NGFR}$ y no los de alta afinidad $p140$, o Trks.

Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente sobre diversas líneas celulares gliales tumorales, del SNC y SNP, en los que se ha encontrado que las células gliales solo contienen receptores de baja afinidad o $p75$. Hay que destacar que, sin embargo, no se han realizado estudios de expresión de los diferentes Trks en astrocitos en cultivo primario y es uno de los estudios que se está abordando en este momento en nuestro laboratorio. A este respecto hay que destacar que los resultados preliminares indican que el TrkB se expresa en este tipo de células.

En cuanto a los resultados obtenidos tras la exposición prenatal al etanol, los nuestros indican que este tratamiento induce a una disminución significativa del contenido total de NGF en astrocitos. Sin embargo, nuestros resultados indican que lo que se produce en realidad es una disminución significativa de la cantidad de NGF secretado y un aumento en su contenido intracelular. Esto sugiere que el alcohol afecta a los procesos de secreción que, a su vez, pueden ser el resultado de la alteración inducida por el etanol en los elementos constituyentes del citoesqueleto que participan en el tráfico de proteínas intracelulares (185).

De hecho, *Kasaian et al.*(185) demuestra que el tratamiento con colchicina y citocalasina B inhibe el ensamblaje de microtúbulos y microfilamentos, afectando de esta forma a los filamentos intermedios y ocasionando una inhibición en la degradación de NGF. Así también, en el presente trabajo demostramos importantes alteraciones en los filamentos intermedios de astrocitos a nivel de la GFAP.

Existen datos anteriores de nuestro laboratorio que indican que este tratamiento afecta también los niveles de tubulina en estas células (351). A estos datos hay que añadir que la exposición prenatal al alcohol altera de forma importante la estructura y organización de los astrocitos (336,351).

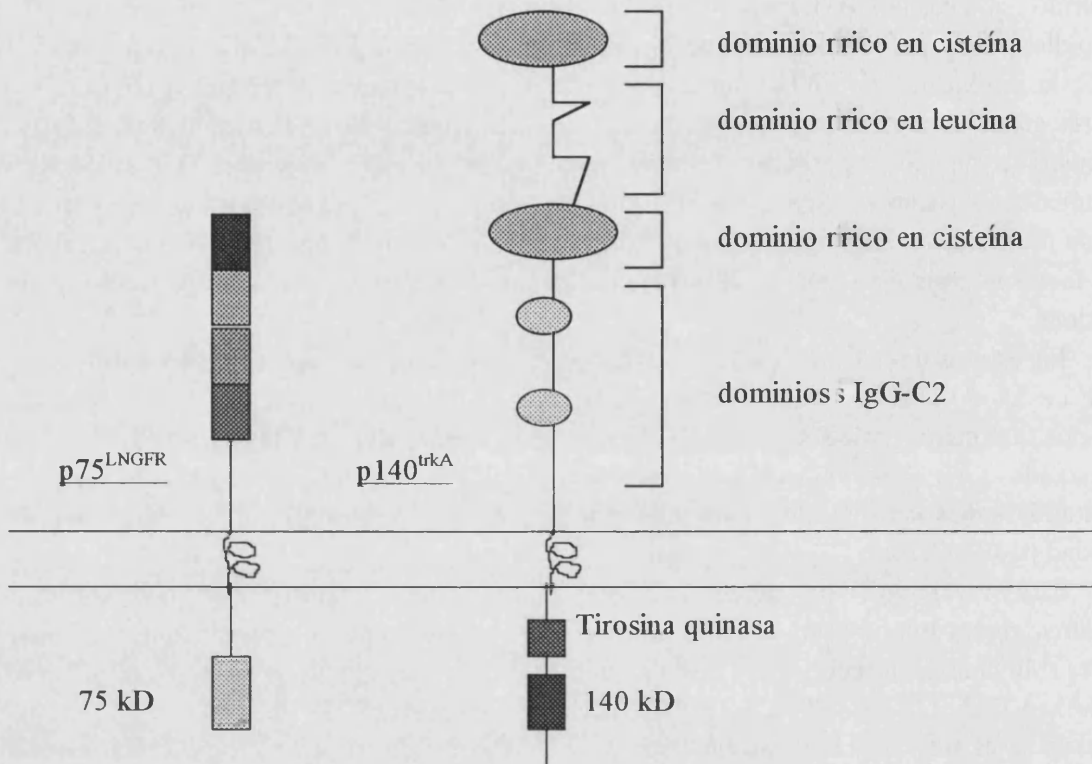


Fig. 43. Los receptores de NGF (p75 y TrkA).

La exposición prenatal al alcohol, además de disminuir el contenido total de NGF en las células astrogliales, produce un aumento de receptores p75. Se sabe que este receptor es una glicoproteína y por lo tanto su glicosilación ocurre en el aparato de Golgi. A este respecto hay resultados de nuestro laboratorio que demuestran que los astrocitos expuestos al etanol presentan importantes alteraciones en el aparato de Golgi, sugiriendo una afectación en el proceso de glicosilación, liberación de glicoproteínas y procesos de reciclaje (257).

Las alteraciones en este orgánulo celular podrían ocasionar modificaciones en las glicoproteínas, que podrían no ser reconocidas por el sistema de señalización, acumulándose en el aparato de Golgi. Este efecto explicaría tanto el aumento de p75 en la membrana como el aumento en el contenido de NGF en astrocitos sometidos prenatalmente al etanol. Existe poca información sobre la síntesis, transporte, localización intracelular y reciclaje del p75^{NGFR} (260,325).

Al mismo tiempo aunque no se conoce con exactitud el papel que pueda desempeñar el p75, los datos obtenidos en los últimos años indican que la presencia de este receptor aumentaría la afinidad del receptor de alta afinidad o TrkA, por ejemplo las células que

expresan el TrkA cuando está presente el p75 aumenta unas 25 veces la velocidad de unión del ligando. Otro ejemplo que lo demuestra son las neuronas del trigémino que, en ausencia del p75, requieren aproximadamente unas cuatro veces más NGF que cuando las células presentan ambos receptores.

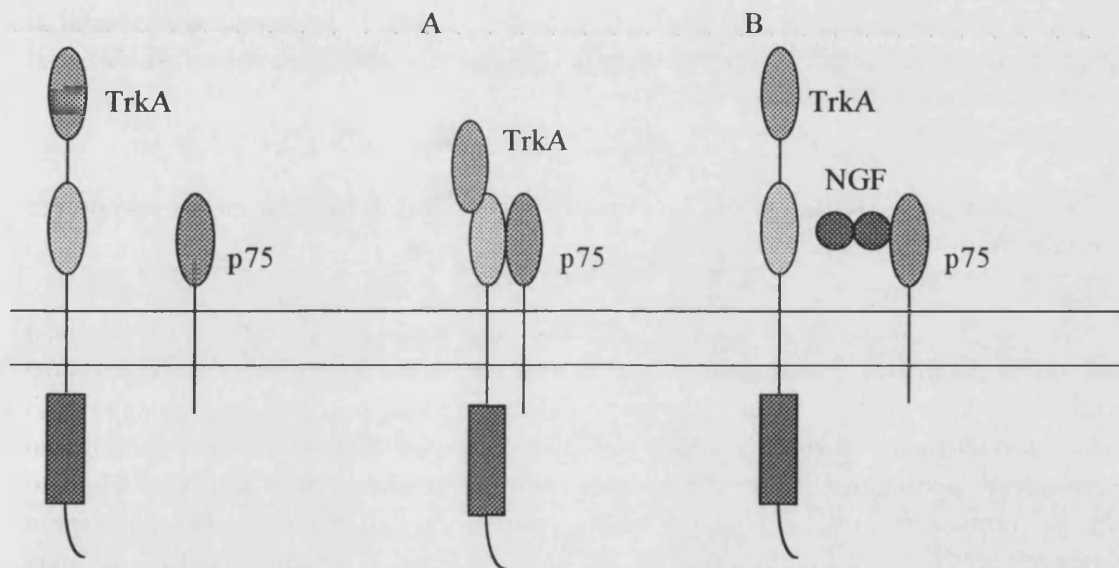


Fig. 44. Dos diferentes mecanismos que pueden actuar en las interacciones entre p75 y TrkA. El p75 cambia la conformación de TrkA y produce un lugar de unión de alta afinidad (A). El p75 se une primero a neurotrofinas y luego aumenta la concentración del ligando o transfiere la neurotrofina al receptor de TrkA directamente.

Otras funciones en las que se ha implicado el p75 son las siguientes: modula la actividad Trk-tirosina quinasa; participa en el transporte retrógrado de las neurotrofinas; se le ha implicado en la apoptosis, la migración neuronal, etc. (70). Trabajos recientes indican que, además, el p75 puede participar en el mecanismo de algunas enfermedades neurodegenerativas. De hecho, en la neuropatía diabética se ha encontrado en las fibras neurodegenerativas un aumento del p75 (365). El mecanismo de este aumento se desconoce, pero en este caso también se observa un déficit en los niveles de NGF. Así pues, es posible que tanto en este caso como en el nuestro (la exposición prenatal al alcohol) el aumento de p75 sea una respuesta adaptativa para compensar la disminución en la secreción de NGF. De hecho, se han observado cambios adaptativos para compensar la neurotoxicidad del etanol en algunos tipos de receptores tras la exposición prenatal al etanol (94).

Finalmente, todos los mecanismos que participan en los cambios inducidos por el alcohol en el NGF y en el NGFR podrían ocasionar la reducción en la liberación de NGF

producida por la exposición prenatal al etanol. Todo ello podría dar como resultado una alteración de la distribución de las neuronas durante el desarrollo, lo que actualmente se ha observado en humanos y en animales prenatalmente expuestos a este tóxico (61,266). Estudios recientes apuntan a que la administración de NGF *in vivo* e *in vitro* puede proporcionar un efecto protector a la toxicidad del etanol sobre el crecimiento de neuritas (150). Además, este tratamiento atenúa los efectos colinotóxicos del etanol durante las primeras etapas de la neuroembriogénesis (48). La principal conclusión que podemos sacar de este trabajo es que los efectos sobre el NGF y el NGFR de la exposición prenatal al alcohol en astrocitos puede contribuir significativamente a las alteraciones asociadas al etanol en el desarrollo del SNC.

5.- Cambios ocasionados por la exposición prenatal al alcohol en los receptores de glutamato durante el desarrollo del hipocampo de rata.

Uno de los neurotransmisores excitadores más importantes del sistema nervioso central es el glutamato. Este aminoácido es el más abundante dentro del sistema nervioso central; sin embargo la mayoría del glutamato del cerebro solo participa en el metabolismo intermediario entre las neuronas y la glía y solo una pequeña fracción del total participa en la señalización neuronal. El glutamato se almacena en vesículas sinápticas y es liberado desde los terminales presinápticos por depolarización de la membrana de una manera dependiente de Ca^{2+} . La concentración de glutamato en el botón sináptico es muy importante para producir la excitación postsináptica y ésta es limitada tanto por las neuronas presinápticas como por sistemas de captación de alta afinidad de la glía.

El glutamato y sus receptores participan en una variedad de procesos fisiológicos, tanto en el desarrollo del SNC como en el maduro (259). La respuesta excitatoria al glutamato está mediada por diversos subtipos de receptores que han sido clasificados en dos categorías principales: receptores ionotrópicos del N-metil-D-aspartato (NMDA), los tipos Kainato y α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propionato (AMPA), y los receptores metabotrópicos (mGluRs) unidos a la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos (PIP_2) o a la activación o inhibición de la adenilato ciclasa (164). Aunque estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro de los mamíferos, presentan una gran densidad en la corteza cerebral y en el hipocampo.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el glutamato y sus receptores juegan un papel crítico en la definición de la arquitectura neuronal y en las conexiones sinápticas que se establecen (259). Por ejemplo, el receptor NMDA se encuentra unido a un canal catiónico permeable a Ca^{2+} y su activación conduce a un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, participando en diversas formas de plasticidad sináptica entre las que se encuentran el aprendizaje y la memoria (259,281,286). Sin embargo, una activación excesiva o anormalmente prolongada de estos receptores puede conducir a una entrada masiva de Ca^{2+} , conduciendo a una cascada de eventos que llevan a la degeneración o muerte neuronal (259). Al mismo tiempo, una disminución en el número de estos receptores

puede ocasionar alteraciones en el desarrollo neuronal, ya que se requiere unos niveles óptimos en la actividad glutamatérgica para el desarrollo normal del cerebro y concretamente del hipocampo. Por lo tanto, los cambios en el número o en la actividad de los receptores de glutamato durante la ontogenia del hipocampo, podrían explicar algunas disfunciones cognitivas y de comportamiento observadas después de la exposición prenatal al etanol (393,394).

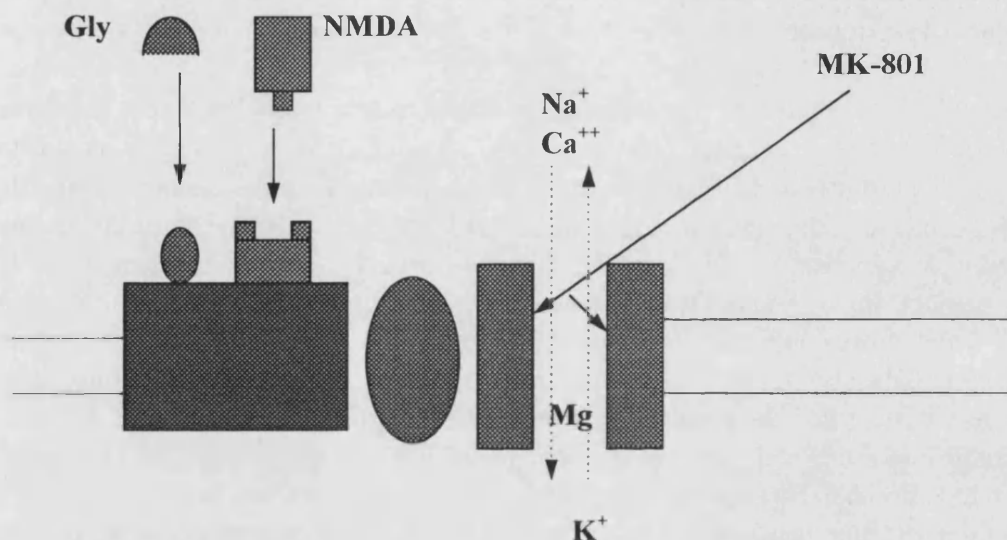


Fig. 45. Complejo canal/receptor NMDA. El lugar de reconocimiento del NMDA está acoplado a un canal catiónico que es permeable tanto a Na^+ como a Ca^{2+} . Existe también un lugar modulador para la glicina que se requiere para la activación del canal y para aumentar la respuesta al NMDA. El Mg^{2+} bloquea el canal dependiendo del voltaje; a potenciales de membrana relativamente negativos el Mg^{2+} bloquea el canal y lo desbloquea si hay depolarización. La respuesta de NMDA puede ser bloqueada farmacológicamente por antagonistas no competitivos del NMDA tales como MK-801.

Usando autorradiografía *in vitro*, ciertos estudios previos han demostrado que se produce un marcado incremento en la expresión de los receptores de glutamato del tipo NMDA durante el desarrollo postnatal en el hipocampo de la rata (172). Nuestros resultados corroboran esos estudios y revelan un máximo transitorio de unión a (^3H)MK-801 a los 14 días de desarrollo postnatal (PN) (170% del valor adulto). Con posterioridad, la unión declina progresivamente durante las dos semanas siguientes, momento en el que alcanza el valor adulto. Además, en el presente estudio demostramos que cambios en el desarrollo reflejan alteraciones en el número de lugares para el receptor NMDA y no en la afinidad para el (^3H)MK-801. Estos datos concuerdan con publicaciones anteriores que indican que la densidad de los receptores NMDA en el cerebro de la rata aumenta durante la primera semana de vida postnatal (172,280). Además, se han publicado estudios sobre los

cambios producidos durante la ontogenia del complejo canal-receptor NMDA en la composición de las subunidades del NMDA (198), en las propiedades del lugar de unión dependiente de un canal iónico de Mg^{++} (44) y en la sensibilidad del receptor a las poliaminas (429). Este patrón de desarrollo del NMDA se ha asociado con cambios en la citoarquitectura, sinaptogénesis, laminación aferente y desarrollo funcional del hipocampo (259).

Al mismo tiempo, durante el desarrollo postnatal en el hipocampo de la rata también se observa un incremento transitorio de la hidrólisis de PIP_2 acoplado al receptor metabotrópico de glutamato. Este perfil que se da durante el desarrollo, concuerda con publicaciones anteriores (291). De hecho, *Nicoletti et al* (291) demostraron que la hidrólisis de PIP_2 estimulada por ibotenateo y quisqualato en el hipocampo y en el estriado, es mayor en el cerebro de ratas neonatales que en el cerebro adulto. Se ha sugerido que este incremento en la hidrólisis de PIP_2 mediada por glutamato podría regular algunas formas de plasticidad durante el desarrollo, a través de la activación de enzimas dependientes de fosfolípidos y de movilización de calcio intracelular (259). De hecho, los receptores de glutamato metabotrópicos están acoplados a proteínas G y estimulan las vías de señalización intracelular dependientes de fosfato de inositol y de calcio (371). Así también, la expresión transitoria de la hidrólisis de PIP_2 estimulada por glutamato en el cerebro inmaduro de la rata coincide con periodos del desarrollo de máxima plasticidad sináptica (291). Además, existen estudios recientes que indican que los receptores de glutamato metabotrópicos podrían producir potenciación a largo plazo (41).

Se ha descrito que tanto en humanos como en animales experimentales la exposición prenatal al etanol produce alteraciones en el comportamiento, asociadas clásicamente a la estructura del hipocampo, en las que se incluyen cambios en el aprendizaje y en procesos de memoria. Estas modificaciones en el comportamiento también se han asociado a la potenciación a largo plazo y, por lo tanto, al resultado de la activación del receptor de glutamato NMDA. A este respecto, nuestros resultados indican que la exposición al alcohol durante la formación del hipocampo reduce significativamente los lugares de unión específicos para MK-801 (B_{max}) y esto se correlaciona con el número de receptores ionóforos NMDA. Sin embargo, no se ha encontrado ningún cambio en la afinidad de los lugares para MK-801, comparando con los valores control, en ninguno de los días postnatales analizados. Mediante autorradiografía se ha demostrado que este tratamiento provoca una reducción en el número de lugares de unión a (3H)glutamato (107) y en la unión a (3H)glutamato sensibles a NMDA en las regiones dendríticas apicales del hipocampo dorsal de ratas de 45 días postnatal, expuestas prenatalmente a bajos niveles de alcohol (363). En un estudio reciente también se demuestra que la sensibilidad del efecto del etanol sobre la actividad sináptica mediada por el receptor NMDA es mayor en el hipocampo de ratas neonatales que en el animal adulto (400). Estos resultados podrían explicar las alteraciones electrofisiológicas y de comportamiento observadas en animales expuestos prenatalmente al alcohol. Por ejemplo, se ha publicado que en ratas PEA existe una capacidad reducida para obtener potenciación a largo plazo en la región del hipocampo CA1 (401) y también una respuesta disminuida de las neuronas piramidales de la región

CA1 del hipocampo (282). Además, estudios morfológicos han demostrado que la exposición al alcohol durante el desarrollo cerebral produce alteraciones severas en la estructura del hipocampo, como disminución en el número y arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA1 y distorsión en el patrón de las proyecciones de las fibras de *mossy* (425,426).

Contrariamente a los resultados obtenidos con el receptor NMDA, la exposición al alcohol durante la maduración del hipocampo aumenta la hidrólisis de fosfolípidos mediada por mGluR, aunque a los 45 días postnatales los niveles de hidrólisis de PIP₂ fueron similares a los obtenidos en animales control. A este respecto, se ha demostrado que las lesiones de la vía glutamatérgica del hipocampo aumentan selectivamente la respuesta de los fosfolípidos estimulada por aminoácidos (292). Así, usando un modelo experimental de daño cerebral inducido por hipoxia-isquemia perinatal, en el que la unión de ³H-glutamato se encontraba reducida en el hipocampo, se ha demostrado que existe un aumento en el reciclamiento de los PIP₂ estimulados por el quisqualato en cortes de hipocampo (72). Estos autores sugieren que esta activación podría contribuir a la patogénesis irreversible del cerebro dañado y/o a mecanismos de recuperación. Por lo tanto, es posible que la estimulación de la hidrólisis de PIP₂ activada por mGluR, observada tras la exposición prenatal al etanol, pueda reflejar una respuesta adaptativa para compensar la disminución en la función de los receptores NMDA. De hecho, estudios recientes indican que la activación de mGluR facilita la generación de la potenciación a largo plazo del receptor NMDA (15).

En contraste con nuestros datos, otros autores han publicado (295,321) que se produce una reducción en la hidrólisis de fosfolípidos estimulada por mGluR en el hipocampo de ratas adultas jóvenes (56,82,110 y 134 días postnatales). Sin embargo, en uno de esos estudios (321) esta reducción no se encontró en ratas de 10-18 días postnatales. Estas discrepancias pueden ser principalmente debidas a diferencias tanto en el tratamiento como en los días de administración alcohólica a la madre gestante. Por ejemplo, en los estudios de *Noble* (295) y de *Queen* (321) el alcohol se le administró a la madre durante parte de la gestación (día 12-20) o durante la gestación completa. En nuestro estudio, las ratas recibieron el alcohol antes y durante la gestación y también en la lactancia.

Otra posible consecuencia que podría producir un aumento de la hidrólisis de fosfolípidos estimulada por mGluR, es las interacciones negativas que existen entre los receptores mGluR y NMDA. Se ha demostrado que la activación del mGluR atenúa la neurotoxicidad mediada por el receptor NMDA en células en cultivo (194); y este efecto parece ser mediado por la activación de la proteína quinasa C (PKC) (67). Al mismo tiempo, existen evidencias que demuestran que el etanol induce inhibición de la función del receptor NMDA (159) y se ha demostrado que este efecto revierte por inhibidores de PKC; lo cual indica que la activación de la PKC es un paso esencial en los efectos de la inhibición inducida por el etanol en el NMDA (385). Por lo tanto, es posible que el aumento en la hidrólisis de fosfolípidos mediada por mGluR en ratas expuestas al alcohol pueda activar la PKC ocasionando la reducción de la función del receptor NMDA en el hipocampo de ratas expuestas al etanol.

Considerando todo lo expuesto, nuestros resultados demuestran que la exposición prenatal y postnatal al etanol reduce significativamente el número de receptores NMDA pero aumenta la hidrólisis de fosfolípidos activada por mGluR, lo que podría reflejar una respuesta adaptativa de la supervivencia neuronal o podría contribuir a la patogénesis del hipocampo y a déficits cognitivos asociados con la exposición prenatal al alcohol.

La pregunta que se plantea ante estos resultados es que participación tiene la astrogliá en la regulación del glutamato y de sus receptores en cerebro. Resultados de los últimos años han demostrado que las células astrogliales no presentan los receptores NMDA pero si contienen receptores ionotrópicos y metabotrópicos (143,406). Así, las células astrogliales se depolarizan por la acción del glutamato (Glu) mediante la intervención de los receptores ionotrópicos que regulan la apertura de canales permeables tanto a Na^+ como a K^+ . En algunos casos, las células astrogliales generan segundos mensajeros (IP_3 o Ca^{2+}), y estos son trasladados a las células vecinas a través de uniones intercelulares (gap junction). El Ca^{2+} intracelular, generado mediante esta última vía, puede proporcionar una regulación coordinada con la neuronas participando en el crecimiento y en la diferenciación celular. Por otra parte, los cambios provocados por el Glu en los niveles de Ca^{2+} intracelular se producen principalmente por la activación de los receptores astrogliales metabotrópicos de Glu (mGluR1 y mGluR5). Estos receptores están acoplados a una proteína G que causa una liberación del Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares, seguido de la formación de inositol trifosfato (IP_3) y unión de este último a su receptor. El incremento en el Ca^{2+} intracelular provocado por el Glu parece activar la fosfolipasa A_2 , que ocasiona la liberación de ácido araquidónico, el cual inhibe la captación de Glu. Existen evidencias de que el ácido araquidónico esta relacionado con el fenómeno de la potenciación a largo plazo (LTP). El mantenimiento de LTP parece participar en los cambios que se producen a ambos lados de la membrana sináptica, sin embargo la inducción de LTP parece ocasiona eventos postsinápticos relacionados con la activación del receptor NMDA y entrada de Ca^{2+} en el interior de las neuronas. El ácido araquidónico producido por la glía y liberado por la estimulación de Glu puede conducir a incrementar la concentración de Glu en el espacio sináptico mediante inhibición de la captación de Glu por la glía y de esta forma, la astrogliá podría formar parte de la regulación de la inducción de LTP y especialmente de su mantenimiento (142,143,406). Por lo tanto, el ácido araquidónico, metabolito que se acumula en condiciones patológica (isquemia), puede afectar tanto a las neuronas como a los astrocitos de la zona perisináptica conduciendo a un déficit en el aclaramiento del glutamato y ocasionando efectos tóxicos.

Finalmente, evidencias de los últimos años parecen indicar que los astrocitos pueden modificar la actividad neural controlando y manteniendo concentraciones de aminoácidos excitadores y evitando una acumulación de estos en el espacio sináptico. Además estas células poseen receptores para adenosina, somatostatina y endotelina que mediante la liberación del ácido araquidónico, pueden controlar las concentraciones externas de glutamato y regular su captación en el cerebro.

CONCLUSIONES

1.- Durante el desarrollo fetal de la rata *in vivo*, la proteína GFAP y su ARNm comienzan a expresarse, a muy bajos niveles, en el día 15 del período fetal, aumentando su expresión conforme se avanza en el desarrollo. Por el contrario, tanto la proteína como el ARNm de la vimentina presenta su máxima expresión a los 15 días del periodo fetal, disminuyendo conforme se avanza en el desarrollo.

La exposición prenatal al etanol produce una disminución significativa tanto en los niveles de la proteína GFAP como en su ARNm, en todos los días analizados. En el caso de la vimentina, no se observan diferencias significativas, ni en la proteína ni en su ARNm, con respecto a los valores control.

2.- En cultivo primario, la glía radial comienza a expresar la proteína GFAP y su ARNm en el día 6 de cultivo, aumentando su expresión a medida que se diferencian y se transforman en astrocitos. Tanto la inmunoreactividad como el ARNm de la vimentina, se pueden detectar en todos los días de cultivo analizados, aunque sus niveles de expresión se incrementan moderadamente a lo largo del cultivo.

En células procedentes de fetos de 13 días expuestos prenatalmente al etanol se observa un retraso en la aparición de la GFAP, así como una disminución significativa en los niveles de expresión de esta proteína y de su ARNm. La vimentina no presenta variaciones significativas ni en la proteína ni en el ARNm con respecto a valores control.

3.- Durante el desarrollo postnatal de la rata se produce el desarrollo de la astroglia, que se manifiesta por un marcado y progresivo aumento de la expresión de la GFAP (proteína y ARNm) y disminución en los niveles de vimentina y su ARNm.

La exposición prenatal al alcohol produce una disminución significativa tanto en los niveles de GFAP como de su ARNm. Sin embargo, la vimentina y su ARNm no presentan diferencias significativas.

4.- Cuando el desarrollo de la astroglia se estudia utilizando cultivo primario de astrocitos se observa, paralelamente a lo que ocurre *in vivo*, un aumento progresivo en la expresión de GFAP (proteína y ARNm). Respecto a la vimentina, se observan pequeños incrementos durante el desarrollo de astrocitos aunque, su ARNm presenta un pico a los 14 días de cultivo.

La exposición prenatal al alcohol ocasiona en astrocitos en cultivo primario una disminución significativa de la GFAP y de su ARNm, así como de los niveles del ARNm de la vimentina.

Durante el desarrollo del cerebro en la rata, la GFAP comienza a expresarse en la fase de glía radial, siendo máxima su expresión durante el desarrollo de la astroglia o periodo postnatal en la rata. Sin embargo, la vimentina presenta una elevada expresión durante la fase de glía radial, disminuyendo progresivamente hasta alcanzar, en el día 21 postnatal, niveles similares a los del animal adulto. Estos resultados demuestran que no existe una transición clara de la expresión de estas dos proteínas, tal y como se había

sugierid; y que lo ocurre es un solapamiento entre la disminución de la vimentina y el inicio de la expresión de la GFAP.

Los patrones de desarrollo de la GFAP y vimentina observados in vivo son similares a los obtenidos en glía radial y astrocitos en cultivo primario, exceptuando los niveles de vimentina en los que se observa un incremento. Sin embargo, sugerimos que esta discrepancia puede tener un significado biológico.

La exposición prenatal al etanol produce una disminución significativa en los niveles de expresión de la GFAP (proteína y ARNm) y sugieren una afectación del etanol bien al nivel transcripcional o en la estabilidad del ARNm.

5.- La exposición prenatal al etanol altera el nivel de transcripción de la GFAP en núcleos aislados de astrocitos y este efecto es específico para este gen, ya que ni la vimentina ni la ciclofilina se alteran de forma significativa.

Estos resultados sugieren que el etanol puede interferir en el proceso de transcripción al interactuar de forma directa o indirecta con elementos reguladores de este proceso.

6.- Nuestros resultados también demuestran que el alcohol puede afectar a la estabilidad del ARNm de la GFAP, aunque este efecto es poco significativo.

7.- Los estudios de metilación indican que existe una correlación entre el estado hipometilado del ADN de la GFAP y la expresión específica de tejido de este gen. En el hígado, donde no se expresa este gen, el ADN se encuentra hipermetilado; por el contrario, la expresión de este gen en el cerebro se correlaciona con un estado de hipometilación.

Durante el desarrollo del cerebro existe una correlación entre el inicio de la expresión del gen de la GFAP (15 días fetal) y las modificaciones en el patrón de metilación.

La exposición prenatal al alcohol mantiene un estado de hipermetilación en el gen de la GFAP, lo que podría conducir a una menor expresión de este gen. Este efecto podría participar en la disminución de los niveles de transcripción de la GFAP observada en astrocitos, así como en la disminución de la expresión de este gen que se observa en los animales expuestos prenatalmente al etanol.

8.- Los astrocitos liberan gran parte del NGF que sintetizan, ya que aproximadamente el 99% es liberado y solo un 1% es retenido a nivel celular. Además, la liberación es mayor durante la proliferación que durante la diferenciación astrogial.

Los astrocitos solo unen el NGF con una constante de afinidad del orden de 10^{-9} que se corresponde con la constante de afinidad publicada para el receptor p75. En nuestras condiciones de experimentación no hemos podido detectar el receptor de alta afinidad p140 o TrkA.

La exposición prenatal al etanol produce una disminución significativa del contenido total de NGF, disminuyendo la cantidad de NGF secretado y aumentando el contenido de

NGF intracelular. Al mismo tiempo, la exposición al alcohol también produce un aumento en el número de receptores p75 sin ocasionar modificaciones en la constante de afinidad.

Estos resultados indican que el alcohol afecta a los procesos de secreción y/o al transporte intracelular de proteínas y sugieren que las alteraciones observadas en el citoesqueleto podrían participar en este efecto. Finalmente una alteración en la secreción de NGF podría explicar las alteraciones en la migración neuronal y la aparición de neuronas ectópicas que se observan tanto en niños como en animales experimentales expuestos prenatalmente al alcohol.

9.- El glutamato y sus receptores juegan un importante papel en la arquitectura y plasticidad neuronal durante el desarrollo del hipocampo y recientemente se han realizado estudios que demuestran la participación de los astrocitos en la regulación del glutamato en el cerebro. Nosotros hemos estudiado, en particular, los niveles de los receptores de glutamato NMDA y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) asociados a la activación de la fosfolipasa C, durante la ontogenia del hipocampo. Los resultados del presente trabajo demuestran que la unión de ³H-MK-801 a NMDA aumenta durante el periodo postnatal en la rata, observándose un pico en el día 14 postnatal y disminuyendo gradualmente hasta el valor adulto. En las ratas expuestas al etanol el patrón es similar, pero se observó una disminución significativa en la unión del MK-801 en todos los días analizados. Además, análisis cinéticos demuestran que el etanol produce una disminución en el número de receptores sin producir cambios en la constante de afinidad.

El patrón de evolución de los receptores mGluR activados por la fosfolipasa C es similar al que se observa con los receptores NMDA; sin embargo, en este caso, la exposición al alcohol produjo un incremento en la activación de este receptor en los días 14, 25 y 35 postnatal, pero no se observaron diferencias significativas en periodos más tardíos del desarrollo del cerebro.

Puesto que el receptor NMDA se ha demostrado que participa de forma importante en la plasticidad sináptica y en los procesos de memoria y aprendizaje; y ya que estos últimos procesos se alteran tras la exposición prenatal al etanol; una disminución en los receptores NMDA causada por la exposición al alcohol podría explicar las alteraciones en la plasticidad sináptica en procesos de aprendizaje y memoria.

10.- Finalmente, nuestros resultados demuestran que la exposición prenatal al etanol produce importantes alteraciones a nivel molecular en la expresión de la GFAP asociada tanto al desarrollo de la glía radial como, posteriormente, a los astrocitos. Esto ocasiona déficits funcionales en estas células, incluyendo la disminución en la liberación de factores tróficos esenciales para el desarrollo neural. Estos resultados podrían explicar las alteraciones en la migración neuronal, la aparición de neuronas ectópicas y la desorganización en la corteza cerebral que se observa tanto en niños como en animales expuestos prenatalmente al etanol. Por lo tanto, sugerimos que la astrogliá puede ser una de las más importantes dianas del efecto ocasionado por el etanol durante el desarrollo del sistema nervioso central.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abd-el-Baset, E.M., Ahmed, I., Kalnins, V.I. y Fedoroff, S. (1992). Immuno-electron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia*. 6: 149-153.
- 2.- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakhishi, S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267: 13361-13368.
- 3.- Abel, E.L. (1980). Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. *Neurobehav. Toxicol.* 2: 167-174.
- 4.- Abel, E.L. (1984). Prenatal effects of alcohol. *Drug Alcohol Depend.* 14: 1-10.
- 5.- Abel, E.L. (1994). Effects of physiosigmine on male offspring sired by alcohol-treated fathers. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 18: 648-652.
- 6.- Abel, E.L. y Dintcheff, B.A. (1986). Effects of prenatal alcohol exposure on behavior of aged rats. *Drug. Alcohol Depend.* 16: 321-330.
- 7.- Abel, E.L. y Greizerstein, H.B. (1980a). Relation of alcohol content in amniotic fluid fetal and maternal blood. *Alcoholism. Clin. Exp. Res.* 4: 209-217.
- 8.- Abel, E.L. y Sokol, R.J. (1987). Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS related anomalies. *Drug Alcohol Depend.* 19: 51-70.
- 9.- Agarwal, D.P. y Goedde, H.W. (1990). Alcohol metabolism, alcohol intolerance and alcoholism. En: *Biochemical Pharmacological Approaches*. Agarwal, D.P. y Goedde, H.W. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1-184.
- 10.- Albano, E., Clot, P., Tabone, M., Arico, S. y Ingelman-Sundberg, M. (1993). Oxidative damage and human alcoholic disease. Experimental and clinical evidence. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. (Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M.U., eds.), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 310-322.
- 11.- Albano, E., Ingelman-Sundberg, M., Tomasi, A. y Poli, C. (1991). Free radical mediated ethanol toxicity: some considerations on the methodological approaches. *Alcoholism: A Molecular Perspective* (Palmer, T.V., ed.), Plenum, New York. 45-46.
- 12.- Altura, B.M., Altura, B.T. y Gebrewold, A. (1983). Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science*. 220: 331-333.

- 13.- Altura, B.M., Altura, B.T., Carella, A., Halevy, S. y Tejani, N. (1983). Alcohol produces spasms of human umbilical blood vessels: Relationship to fetal alcohol syndrome (FAS). *Eur. J. Pharmacol.* **86**: 311-312.
- 14.- Alvarez, F. y del Rio, M.C. (1994). Gender differences in patterns of alcohol consumption in Spain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* **18** (6): 1342-1347.
- 15.- Aniksztejn, L., Bregestovski, P. y Ben-Ari, Y. (1991). Selective activation of quisqualate metabotropic receptor potentiates NMDA but not AMPA responses. *Eur. J. Pharmacol.* **205**: 327-328.
- 16.- Anson, J.F., Laborde, J.B., Pipkin, J.L., Hinson, W.G., Hansen, D.K., Sheehan, D.M. y Young, J.F. (1991). Target tissue specificity of retinoic acid-induced stress proteins and malformations in mice. *Teratology.* **44**: 19-28.
- 17.- Arcas, R., Jimenez, R. y Cruz, M. (1987). Síndrome Alcohólico Fetal. *Arch. Pediat.* **29**: 147-154.
- 18.- Arslanian, M.J., Pascoe, E. y Reinhold, J.G. (1971). Rat liver alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Biochem. J.* **125**: 22-58.
- 19.- Ascher, P. y Nowak, L. (1986). A patch clamp study of excitatory amino acid activated channels. *Adv. Exp. Biol.* **203**: 507-511.
- 20.- Auer, R.N., Jensen, M.L. y Whishaw, I.Q. (1989). Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. *J. Neurosci.* **9**: 1641-1647.
- 21.- Avila, J. (1986). Estructura y función del microtúbulo. En: *Bioquímica y Biología Molecular*. Salvat Ed. Barcelona. 349-355.
- 22.- Bachmann, B.J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* **36**: 525-557.
- 23.- Balcarek, J.M. y Cowan, J. (1985). Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: Implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. *Nucleic Acids Research.* **13**: 5527-5543.
- 24.- Barlett, J.D., Luethy, J.D., Carlson, S.G., Sollott, S.J. y Holbrook, N.J. (1992). Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-related gene, gadd153. Ca^{2+} increases transcriptional activity and mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **267**: 20465-20470.
- 25.- Behrens, U.J., Hoerner, M., Lasker, J.M. y Lieber, C.S. (1988). Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIE1 in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 584-590.

- 26.- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V.J., Tapscott, S.J., Weintraub, H. y Verma, I.M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell*. **68**: 507-519.
- 27.- Berggren, S.M. y Goldberg, L. (1940). The absorption of ethyl alcohol from the gastrointestinal tract as a diffusion process. *Acta Physiol. Scand.* **1**: 246-270.
- 28.- Bernstein, B.W. y Bamburg, J.R. (1989). Cycling of actin assembly in synaptosomes and neurotransmitter release. *Neuron*. **3**:257-265.
- 29.- Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanely, M.R. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* **206**: 587-595.
- 30.- Bignami, A. y Dahl, D. (1977). Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation: An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J. Comp. Neurol.* **153**: 27-38.
- 31.- Bignami, A., Raju, T., y Dahl, D. (1982). Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *Dev. Biol.* **91**: 286-295.
- 32.- Bird, A. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell*. **70**: 5-8.
- 33.- Bird, A.P. y Southern, E.M. (1978). Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus Laevis*. *J. Mol. Biol.* **118**: 27-47.
- 34.- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
- 35.- Blair, A.H. y Vallee, B.L. (1966). Some catalytic properties of human liver-alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*. **5**: 2026-2035.
- 36.- Blakley, P.M. y Scott, W.J., Jr. (1984). Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. I. Teratogenicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**: 355-363.
- 37.- Blatz, A.L. y Magleby, K.L. (1987). Calcium-activated potassium channels. *TINS*. **10**: 463-467.
- 38.- Bogan, W.O. (1982). Animal models of fetal alcohol syndrome. En: *Fetal Alcohol Syndrome*. Vol.III, Animal Studies (Abel, E.L. ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1-13.
- 39.- Bonthius, D.J. y West, J.R. (1990). Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **14**: 107-118.

- 40.- Booher, J. y Sensenbrenner, M. (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology*. 2: 97.
- 41.- Bortolotto, Z.A. y Collingridge, G.L. (1992). Activation of glutamate metabotropic receptors induced long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 214: 297-298.
- 42.- Bosron, W.F. y Li, T.K. (1987). Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme*. 37: 19-28.
- 43.- Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 223-253.
- 44.- Bowe, M.A. y Nadler, J.V. (1990). Developmental increase in the sensitivity to magnesium of NMDA receptors on CA1 hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.* 56: 55-61.
- 45.- Bradford, H.F. (1986). Glial cells: Mechanical and functional supporting cells of the Nervous System. En: *Chemical Neurobiology. An introduction to neurochemistry*. W.H. Freeman and Company. New York. 62-118.
- 46.- Brenner, M. (1994). Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology*. 4: 245-257.
- 47.- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F., y Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.* 14: 1030-1037.
- 48.- Brodie, C., Kentroti, S. y Vernadakis, A. (1991). Growth factors attenuate the cholinotoxic effects of ethanol during early neuroembryogenesis in the chick embryo. *Int. Devl. Neurosci.* 9: 203-213.
- 49.- Bronsky, P.T., Johnston, M.C. y Sulik, K.K. (1986). Morphogenesis of hypoxia-induced cleft lip in CL/Fr mice. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. (Suppl.)*. 2: 113-128.
- 50.- Buck, K.J. y Harris, R.A. (1991). Neuroadaptive responses to chronic ethanol. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 15: 460-470.
- 51.- Bühler, R., Lindros, K.O., Nordling, A., Johansson, I. y Ingelman-Sundberg, M. (1992). Zonation of cytochrome P-450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 204: 407-412.
- 52.- Caballeria, J. (1988). Transtornos de la nutrición en la hepatopatía alcohólica. Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos. Curso actualización en Hepatología para Gastroenterólogos. Madrid. 88-90.
- 53.- Caballeria, J., Baraona, E. y Lieber, C.S. (1987). The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. *Life Sci.* 41(8): 1021-1027

- 54.- Calvo, J.L., Carbonell, A.L. y Boya, J. (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 566: 333-336.
- 55.- Cameron, R.S. y Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and synthesis. *Glia.* 4: 124-137.
- 56.- Campbell, M.A. y Fantel, A.G. (1983). Teratogenicity of acetaldehyde in vitro: Relevance to the fetal alcohol syndrome. *Life Sci.* 32: 2641-2647.
- 57.- Cardoso, M., Heinrich, L. y Nadal-Ginard, Bernardo. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and CdK2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell.* 74: 979-992.
- 58.- Carman-Krzan, M., Vigé, Xavier. y Bradley C. Wise. (1991). Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J. Neurochem.* 56: 636-643.
- 59.- Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell.* 53: 3-4.
- 60.- Clarren, S.K. y Smith, D.W. (1978). The fetal alcohol syndrome. *N. Engl. J. Med.* 298: 1063-1067.
- 61.- Clarren, S.K., Alvor, E.C., Sumi, S.M., Streissguth, A.D. y Smith, D.W. (1978). Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatr.* 92: 64-70.
- 62.- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. y Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110.
- 63.- Condorelli, D.F., Nicoletti, V.G., Barresi, V., Caruso, A., Conticello, S., de Vellis, J. y Giuffrida Stella, A.M. (1994). Tissue-specific DNA methylation patterns of the rat glial fibrillary acidic protein gene. *Journal of Neuroscience Research.* 39: 694-707.
- 64.- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. y Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling. *Science.* 247: 470-474.
- 65.- Corominas Roso, M. (1990). Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- 66.- Counts, J.L. y Goodman, J.I. (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell.* 83: 13-15.
- 67.- Courtney, M.J. y Nicholls, D.G. (1992). Interactions between phospholipase C-coupled and N-methyl-D-aspartate receptor in cultured cerebellar granule cells: protein kinase C mediated inhibition of N-methyl-D-aspartate responses. *J. Neurochem.* 59: 983-992.



- 68.- Culican, S.M., Baumrind, N.L., Yamamoto, M. y Pearlman, A.L. (1990). Cortical radial glia: Identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J. Neuroscience*. 10: 684-692.
- 69.- **Current Protocols in Molecular Biology**. Ausubel, F.M., et al. (ed). John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 70.- Chao, M.V. y Hempstead, B.L. (1995). P75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*. 18: 321-326.
- 71.- Chasnoff, I.J. (1985). Fetal alcohol syndrome in twin pregnancies. *Acta Genet. Med. Gemellol. (Roma)* 34: 229-232.
- 72.- Chen, C.K., Silverstein, F.S., Fisher, S.K., Statman, D. y Johnston, M.V. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury enhances quisqualic acid-stimulated phosphoinositide turnover. (1988). *J. Neurochem*. 51: 353-359.
- 73.- Chernoff, G.F. (1980). The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. *Teratology*. 15: 223-230.
- 74.- Chiappelli, F. y Taylor, A. (1995). The fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects on immune competence. *Alcohol and Alcoholism*. 30: 259-263.
- 75.- Chiu, F.C., Norton, W.T. y Fields, K.L. (1981). The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J. Neurochem*. 37: 147-155.
- 76.- Choi, B.H. (1986). Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: A light and electron microscopic immunoperoxidase study. *J. Neuropathol. Exp. Neuro*. 45: 408-418.
- 77.- Choi, B.H. (1988). Prenatal gliogenesis in the developing cerebrum of the mouse. *Glia*. 1: 308-316.
- 78.- Chomyszski, P. y Sachi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
- 79.- Dahl, D. (1981). The vimentin-GFAP protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J. Neurosci. Res*. 6: 741-748.
- 80.- Dahl, D., Rueger, D.C., Bignami, A., Weber, K. y Osborn, M. (1981). Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell. Biol*. 24: 191-196.

-
- 81.- Dakić-Koretić, D., Alae, M., Solter-Lajko, V., Ilić-Grubisić, M., Kmetić, N. y Zdunić, D. (1994). *Alcoholism*. 30: 1-2.
- 82.- Davies, D.L. y Cox, W.E. (1991). Delayed growth and maturation of astrocytic cultures following exposure to ethanol: electron microscopy observations. *Brain Res.* 547: 53-61.
- 83.- Davis, P.J.M., Partidge, J.W. y Storrs, C.N. (1982). Alcohol consumption in pregnancy. How much is safe?. *Arch. Dis. Child.* 57: 940-943.
- 84.- Davis, V.E. y Walsh, M.J. (1970). Alcohol, amines and alkaloids: a possible basis for alcohol addiction. *Science*. 167: 1005-1008.
- 85.- Davis, W.L., Crawford, I.A., Cooper, O.J., Farmer, G.R., Thomas, D.L. y Freeman, B.L. (1990). Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in vitro. *J. Craniofac. Genet. Biol.* 10: 277.
- 86.- Davison, A.N. y Dobbing, J. (1968). (eds). En: *Applied Neurochemistry*. Davis, Philadelphia.
- 87.- Desmarais, D., Filion, M., Lapointe, L. y Royal, A. (1992). Cell-specific transcription of the peripherin gene in neuronal cell lines involves a cis-acting element surrounding the TATA box. *EMBO J.* 11: 2971-2980.
- 88.- Dildy, J.E. y Leslie, S.W. (1989). Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Res.* 499: 383-387.
- 89.- Docter, F.R., Naitoh, P., James, C. y Smith, M.A. (1966). En: *Psychosomatic Medicine*. 27 (4). 605-615.
- 90.- Dohrman, D.P., Goodlett, C.R., West, J.R. y Pantazis, N.J. (1992). Alcohol reduces nerve growth factor receptor immunoreactivity in neonatal cerebellum. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18: 1600.
- 91.- Dolin, S.J. y Little, H.J. (1989). Are changes in neuronal calcium channels involved in ethanol tolerance?. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 985-991.
- 92.- Dow, K.E. y Riopelle, R.J. (1985). Ethanol neurotoxicity: Effects on neurite formation and neurotrophic factor production *in vitro*. *Science*. 228: 591-593.
- 93.- Dreosti, I.E., Ballard, J., Bellin, G.B., Record, I.R., Manuel, S.J. y Hetzel, B.S. (1981). The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and foetal development in the Rat. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 5: 357-362.

- 94.- **Druse, M.J.** (1992). Effects of in utero ethanol exposure on the development of CNS neurotransmitter systems. En M.W. Miller (Ed.). *Development of the Central Nervous System. Effects of Alcohol and Opiates*. Wiley-Liss. New York. 139-167.
- 95.- **Duester, G.** (1991). A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 15: 568-572.
- 96.- **Dynan, W.S. y Tjian, R.** (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature.* 316: 774-778.
- 97.- **Earnest, D.L., Abril, E.R., Jolley, X.S. y Martinez, J.** (1993). Ethanol and diet-induced alterations in Kuffer cell function. *Alcohol and Alcoholism.* 28 (1): 73-83.
- 98.- **Eden, S. y Cedar H.** (1994). Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Current Opinion en Genetics and Development.* 4: 225-259.
- 99.- **Edmondson, J.C., Liem, R.K.H., Kuster, J.C. y Hatten, M.E.** (1988). Astrotactin: a novel neuronal cell surface antigen that mediates neuron-astroglial interactions in cerebellar microcultures. *J. Cell Biol.* 106: 505-517.
- 100.- **Ekström, G. y Ingelman-Sundberg, M.** (1989). Activity and lipid peroxidation dependent of ethanol-inducible cytochrome P-50 (P-450E1). *Biochem. Pharmacol.* 38: 1313-1319.
- 101.- **Eng, L.F.** (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): The major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8: 203-214.
- 102.- **Ericksson, P.S., Nilsson, M., Wagberg, M., Hansson, E. y Rönnbäck, L.** (1993). Kappa-opioid receptors on astrocytes stimulate L-type Ca^{2+} channels. *Neuroscience.* 54: 401-407.
- 103.- **Erskine, R., Murphy, P. y Langton, J.A.** (1994). The effect of ethyl alcohol on the sensitivity of upper airway reflexes. *Alcohol and Alcoholism.* 29 (4): 425-431.
- 104.- **Escourolle, R.** (1973). Complicaciones nerviosas del alcoholismo. En: Los sistemas nervioso y muscular. *Patología y Médica.* Expaxs. F. Lhermite y H. Mmo. Barcelona. 321-326.
- 105.- **Esquifino, A.I., Sanchís, R. y Guerri, C.** (1986). Effect of prenatal alcohol exposure on sexual maturation of female rat offspring. *Neuroendocrinology.* 44: 483-487.
- 106.- **Faller, J. y Fox, I.H.** (1982). Evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N. Engl. J. Med.* 307: 1598-1602.

- 107.- Farr, K.L., Montano, C.Y., Paxton, L.L. y Savage, D.D. (1988). Prenatal ethanol exposure decreases hippocampal ³H-glutamate binding in 45-day-old rats. *Alcohol*. 5: 125-133.
- 108.- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A technique por radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specidic activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-8.
- 109.- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1984). Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-270.
- 110.- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabreta, B., Derial, J.K., Philiponis, V., Wei, J-F. y Baserga, R. (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3614-3620.
- 111.- Finkbeiner, S.M. (1993). Glial calcium. *GLIA*. 9: 83-104.
- 112.- Fisher, S.E., Atkinson, M., Jacobson, M. et al. (1983). Selective fetal malnutrition: The effect of in vivo ethanol exposure upon in vitro placental uptake of amino acids in the non-human primate. *Pediatr. Res.* 17: 704-707.
- 113.- Fisher, S.E., Atkinson, M.S., Burnap, J.P., Jacobson, S., Sehgal, P.K., Scott, W. y Van Thiel, D.G. (1982). Ethanol-associated selective fetal malnutrition: A contributing factor in the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 6: 197-201.
- 114.- Fisher, S.K., Figueiredo, J.C. y Bartus, R.T. (1984). Differential stimulation of inositol phospholipid turnover in brain by analogs of oxotremorine. *J. Neurochem.* 43: 1171-1179.
- 115.- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. y Weber, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 429-445.
- 116.- Freund, G. (1984). Neurobiological relationships between aging and alcohol abuse. En: *Recent developments in alcoholism*. vol. 2 (Galanter, M., ed.) Plenum Press, New York. 203-221.
- 117.- Fried, P.A. y O'Connell, C.M. (1987). A comparison of the effects of prenatal exposure to tobacco, alcohol, cannabis and cafferine on birth size and subsequent growth. *Neurotoxicol. Teratol.* 9: 79-85.
- 118.- Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E. y Hayashi, K. (1986). Synthesis/secretion of nerve growth factor is associatel with cell growth in cultured mouse astroglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 395-402.
- 119.- Gage, J.C. y Sulik, K.K. (1991). Pathogenesis of ethanol induced hydronephrosis and hydroureter as demonstrated following in vivo exposure of mouse embryos. *Teratology.* 44: 299-312.

- 120.- Garro, A.J., McBeth, D.L., Lima, V. y Lieber, C.S. (1991). Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: Implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 15: 395-398.
- 121.- Gilbert, S.F. (1988). *Developmental Biology*. Sinauer Associates. Sunderland. M.A.
- 122.- Glisin, V., Crkvenjakov, R., y Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*. 13: 2633.
- 123.- Goedde, H.W., Benkmann, H.G. y Kriese, L. (1984). Aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity in four different Chinese populations. *Hum. Hered.* 34: 183-186.
- 124.- Golden, C.J., Graber, B., Blose, I., Berg, R., Coffman, J. y Bloch, S. (1980). Difference in brain densities between chronic alcoholic and normal control patients. *Science*. 211: 508-510.
- 125.- Goodlett, C.R., Kelly, S.J. y West, F.R. (1987). Early postnatal alcohol exposure that produces high blood alcohol levels impairs development of spatial learning. *Psychobiology*. 15: 64-74.
- 126.- Goodlett, C.R., Leo, J.T., O'Callaghan, J.P., Mahoney, J.C. y West, J.R. (1993). Astrogliosis induced by alcohol exposure during the brain growth spurt. *Develop. Brain Res.* 72: 85-97.
- 127.- Gordon, A.S., Collier, K. y Diamond, I. (1986). Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated cAMP levels in a clonal neuronal cell line: An in vitro model of cellular tolerance to ethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 2105-2108.
- 128.- Grant, K.A. y Samson, H.H. (1982). Ethanol and tertiary butanol induced microcephaly in the neonatal rat: comparison of brain growth parameters. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4: 315-321.
- 129.- Grant, K.A., Valverius, P., Hudspeth, M. y Tabakoff, B. (1990). Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 289-296.
- 130.- Greenspon, A.J. y Schaal, S.F. (1983). The "Holiday heart": electrophysiologic studies of alcohol effects in alcoholics. *Annals of Internal Medicine*. 98: 135-139.
- 131.- Grummer, M.A., Langhough, R.E. y Zachman, R.D. (1993). Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 17: 592-597.
- 132.- Guerri, C. (1987). Synaptic membrane alterations in rats exposed to alcohol. *Alcohol Alcoholism*. 1: 467-472.

- 133.- Guerri, C. (1987). Consecuencias del metabolismo del alcohol: Alteraciones en el metabolismo de los fármacos. Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 99-113.
- 134.- Guerri, C. y Sanchís, R. (1985). Acetaldehyde and alcohol levels in pregnant rats and their fetuses. *Alcohol*. 2: 267-270.
- 135.- Guerri, C. y Sanchís, R. (1986). Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following administration. *Life Sci*. 38: 1543-1556.
- 136.- Guerri, C. y Grisolia, S. (1980). Changes in glutathione in acute and chronic alcohol intoxication. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (Suppl. 1): 53-61.
- 137.- Guerri, C. y Grisolia, S. (1983). Chronic ethanol treatment effects synaptosomal membrane-bound enzymes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 45-50.
- 138.- Guerri, C., Esquifino, A., Sanchís, R. y Grisolia, S. (1984). Growth, enzymes and hormonal changes in offspring of alcohol-fed rats. En: Mechanisms of alcohol damage in utero. Ciba Foundation symposium. 105: 85-102. Pitman, London.
- 139.- Guerri, C., Montoliu, C. y Renau-Piqueras, J. (1994). Involvement of free radical mechanism in the toxic effects of alcohol: Implications for fetal alcohol syndrome. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Ed. Plenum Pres. N.Y. 291-305.
- 140.- Guerri, C., Sáez, R., Portoles, M. y Renau-Piqueras, J. (1993). Derangement of astroglionogenesis as a possible mechanism involved in alcohol-induced alterations of central nervous system development. *Alcohol Alcoholism*. 2: 203-208.
- 141.- Guerri, C., Sáez, R., Sancho-Tello, M., Mantin de Aguilera, A. y Renau-Piqueras, J. (1990). Ethanol alters astrocyte development: a study of critical periods using primary cultures. *Neurochem. Res.* 15: 559-565.
- 142.- Hansson, E. (1994). Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. *J. Biol. Chem.* 269: 21955-21961.
- 143.- Hansson, E. y Rönnbäck, L. (1995). Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J.* 9:343-350.
- 144.- Hansson, J.W., Jones, K.L. y Smith, D.W. F.A.S.: (1976). Experience with 41 patients. *J.A.M.A.* 235: 1458-1460.

- 145.- Hansson, W., Simonsson, P. y Alling, C. (1987). 5-Hydroxytryptamine stimulates the formation of inositol phosphate in astrocytes from different regions of the brain. *Neuropharmacology*. 26: 1377-1382.
- 146.- Harman, D. (1993). Free radical theory of aging. En: *Free radicals: From Basic Science to Medicine* (Molecular and Cell Biology Uptades) (Poli, G., Albano, E. y Dianzani, M.U., eds.) Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 124-143.
- 147.- Hassan, H.M. y Fridovich, I. (1980). Superoxide dismutase: Detoxication of a free radical. In Jakoby, W.B. (ed.). *Enzymatic Basis of Detoxication*. 1: 311-332.
- 148.- Hatten, M.E., Fishell, G., Stitt, T.N. y Mason, C.A. (1990). Astroglia as a scaffold for development of the CNS. *The Neurosciences*. 2: 455-465.
- 149.- Hearn, W.L., Rose, S., Wagner, J., Ciarleglio, A. y Mash, D.C. (1991). Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 531-533.
- 150.- Heaton, M.B., Paiva, M., Swanson, D.J. y Walker, D.W. (1993). Modulation of ethanol neurotoxicity by nerve growth factor. *Brain Res.* 620: 78-85.
- 151.- Helander, A. (1993). Aldehyde dehydrogenase in blood: Distribution, characteristics and possible use as marker of alcohol misuse. *Alcohol and Alcoholism*. 28 (2): 135-145.
- 152.- Helander, A., Lowenmo, C. y Johansson, M. (1993). Distribution of acetaldehyde in human blood: Effects of ethanol and treatment with disulfirans. *Alcohol and Alcoholism*. 28 (4): 461-468.
- 153.- Henderson, G.I. y Schenker, S. (1984). Effects of ethanol and or caffeine on fetal development and placental amino acid uptake in rats. *Dev. Pharmacol. Ther.* 7: 117-187.
- 154.- Hendrickx, A.G. y Hummler, H. (1992). Teratogenicity of all-trans retinoic acid during early embryonic development in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Teratology*. 45: 65-74.
- 155.- Henneberry, R.C. (1992). Cloning of the genes for excitatory amino acid receptors. *BioEssays*. 14: 465-471.
- 156.- Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D.S.R., Gnarr, J.R., Linehan, W.M. y Baylin, S.B. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 9700-9704.
- 157.- Hertz, L. (1979). Functional interactions between neurons and astrocytes. 1. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Neurobiol.* 13: 277-323.

- 158.- Hockfield, S. y McKay, R.D.G. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5: 3310-3328.
- 159.- Hoffman, P.L., Rabe, C.S., Grant, K.A., Valverius, P., Hudspith, M. y Tabakoff, B. (1990). Ethanol and the NMDA receptor. *Alcohol.* 7: 229-231.
- 160.- Hoffman, P.L., Rabe, C.S., Moses, F. y Tabakoff, B. (1989). NMDA receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic-GMP production. *J. Neurochem.* 52: 1937-1940.
- 161.- Hoffmann, P.L., Moses, F. y Tabakoff, B. (1989). Selective inhibition by ethanol of glutamate-stimulated cyclic GMP production in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology.* 28: 1239-1243.
- 162.- Holzman, C., Paneth, N., Little, R. y Pinto-Martin, J. (1995). Perinatal brain injury in premature infants born to mothers using alcohol in pregnancy. *Pediatrics.* 95: 66-73.
- 163.- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science.* 238:163-169.
- 164.- Hollmann, M. y Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- 165.- Hösli, E. y Hösli, L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 40: 477-506.
- 166.- Idapaan-Heikkila, J.E., Jouppila, P., Akerblom, J.K. y otros. (1972). Elimination and metabolic effects of ethanol in mother, fetus, and newborn infant. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 112: 387-393.
- 167.- Iguchi-Ariga, S.M. y Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes-Dev.* 3: 612-619.
- 168.- Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S. y Nishi, Y. (1990). Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate on a non-alpha-helical head domain. *J. Biol. Chem.* 265: 4755-4729.
- 169.- Inagaki, M., Nakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T. y Inagaki, N. (1994). Glial fibrillary acidic protein: Dynamic Property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathology.* 4: 239-243.
- 170.- Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Penttila, K.E., Glaumann, H. y Lindros, K.O. (1988). Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 55-60.

- 171.- Inomata, N., Oomura, Y., Akaike, N. y Edwards, C. (1986). The anion selectivity of the gamma-aminobutyric acid controlled chloride channel in the perfused spinal ganglion cell of frog. *Neurosci. Res.* 3: 371-383.
- 172.- Insel, T.R., Miller, L.P. y Gelhard, R.E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience.* 35: 31-43.
- 173.- Iorio, K.R., Reinlib, L., Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (1991). NMDA-induced D[Ca²⁺] enhanced by chronic ethanol treatment in cultured cerebellar granule cells. *Alcoholism: Clin.Exp.Res.* 15: 333.
- 174.- Iorio, K.R., Reinlib, L., Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (1992). Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-Methyl-D-Aspartate receptor function. *Mol. Pharmacol.* 41: 1142-1148.
- 175.- Iseri, O.A., Lieber, C.S. y Gottlieb, L.S. (1966). The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am. F. Pathol.* 48: 535-555.
- 176.- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989.
- 177.- Ishii, R., Joly, J.G. y Lieber, C.S. (1973). Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. *Biochem. Biophys.* 291: 411-420.
- 178.- Jacobson, M. (1991). Neuroglial ontogeny. En: *Developmental Neurobiology.* Plenum Press, New York, Third Edition, 95-139.
- 179.- Jones, D.P. (1981). Hypoxia and drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 30: 1019-1023.
- 180.- Jones, K.L. y Smith, D.W. (1973). Recognition of the FAS in early infancy. *Lancet.* 2: 999-1001.
- 181.- Jones, K.L., Smith, D.W., Ulleland, C.N. y Stressguth, A.P. (1973). Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet.* 2: 1261-1271.
- 182.- Kahle, P. y Hertel, C. (1992). Nerve growth factor (NGF) receptor on rat glial cell lines. *J. Biol. Chem.* 267: 13917-13923.
- 183.- Kaneko, R. y Sueoka, N. (1993). Tissue-specific versus cell type-specific expression of the glial fibrillary acidic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4698-4702.
- 184.- Karl, P.I., Gordon, M.H.J., Lieber, C.S. y Fisher, S.E. (1988). Acetaldehyde production and transfer by the perfused human placental cotyledon. *Science.* 242: 273-275.

- 185.- Kasaian, M.T. y Neet, K.E. (1988). Internalization of Nerve Growth Factor by PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 263: 5083-5090.
- 186.- Kater, R.M.H., Tobon, F. y Iber, F.L. (1969). Increased rate of tolbutamide metabolism in alcoholic patients. *JAMA*. 207: 363-365.
- 187.- Kato, S., Kawase, T., Alderman, J. y Lieber, C.S. (1990). Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*. 98: 203-210.
- 188.- Kawase, T., Kato, S. y Lieber, C.S. (1989). Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology*. 10: 815-821.
- 189.- Keilin, D. y Hartree, E.F. (1936). Coupled oxidation of alcohol. *Proc. Roy. Soc. B*. 119: 141-159.
- 190.- Khanna, J.M. e Israel, Y. (1980). Ethanol Metabolism Liver and Biliary Tract Physiology. *Internat. Rev. Physiol.* 21: 275-315.
- 191.- Kimelberg, H.K. (1988). *Glial Cell Receptors*. Raven, New York.
- 192.- Kimelberg, H.K. (1991). Swelling and volume control in brain astroglial cells. En *Advances in Comparative and Environmental Physiology* (Gilles, R., et al., eds.) 9: 81-117. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- 193.- Kimelberg, H.K. y Norenberg, M.D. (1989). Astrocytes. *Scientific American*. 4: 44-52.
- 194.- Koh, J.Y., Palmer, E. y Cotman, C.W. (1991). Activation of the metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9431-9435.
- 195.- Korsching, S. y Thoenen, H. (1983). Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3513-3516.
- 196.- Krebs, H.A. y Perkins, J.R. (1970). The physiological role of liver alcohol deshydrogenase. *Biochem. J.* 118: 635.
- 197.- Kuffler, S.W., Nicholls, J.G. y Martin, J.L. (1984). *From Neuron to Brain*, Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- 198.- Kuhse, J., Schmieden, V. y Betz, H. (1990). A single amino acid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron*. 5: 867-873.
- 199.- Kurachi, Y., Ito, H., Sugimoto, T., Shimizu, T., Miki, Y. y Ui, M. (1989). Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K⁺ channel. *Nature*. 337: 555-557.

- 200.- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- 201.- Landry, C.F., Ivy, G.O. y Brown, I.R. (1990). Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J. Neurosci. Res.* **25**: 194-203.
- 202.- Lange, L.G., Riordan, J.F. y Vallee, D.L. (1974). Functional Arginyl residues as NADH bindings sites of alcohol dehydrogenases. *Biochemintry*. **13**: 4361-4370.
- 203.- Laping, N.F., Teter, B., Nichols, N.r., Rozovsky, Y. y Finch, C.E. (1994). Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines and growth factors. *Brain Pathol.* **1**: 259-275.
- 204.- Lasek, R.J. (1981). Cytoskeletons and cell motility in eh nervous system. En: *Basic neurochemistry*. (Siegel, G.J., Albers, R.W., Agranoff, B.W. y Katzman, R., eds.) Third Ed, Little, Brown and Company, Boston, pp. 403-412.
- 205.- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. **283**: 249-256.
- 206.- Lechartier, G. y Bellamy, F. (1869). De la fermentation des fruits. *C.R. Acad. Sci.* **69**: 466.
- 207.- Lefevre, A., Adler, H. y Lieber, C.S. (1970). Effect of ethanol on Ketone metabolism. *J. Clin. Invest.* **49**: 1775-1782.
- 208.- Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.P. y Menuet, J.C. (1968). Lés enfants de parents alcooliques. Anomalies observées a propos de 127 cas. *Quest-Medical.* **21**: 476-482.
- 209.- Leo, M.A., Rosman, A. y Lieber, C.S. (1993). Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver diseases. *Hepatology*. **17**: 977-986.
- 210.- Leslie, S.W., Barr, E., Cahndler, L.J. y Farrar, R.P. (1983). Inhibition of fast-and slow-phase depolarization-dependent synaptosomal calcium uptake by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **225**: 571-575.
- 211.- Lester, D. (1962). The concentration of apparent endogenous ethanol. *Quart. J. Stud. Alc.* **23**: 17-25.
- 212.- Lester, D.S. y Bramham, C.R. (1993). Persistent, membrane-associated protein Kinase C: from model membranes to synaptic long-term potentiation. *Cell. Signalling.* **5**: 695-708.
- 213.- Levitt, P. y Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* **193**: 815-840.

- 214.- Lewis, S.A. y Cowan, N.J. (1985). Temporal expression of mouse glial fibrillary acidic protein mRNA studied by a rapid in situ hybridization procedure. *J. Neurochem.* **45**: 913-919.
- 215.- Lewis, S.A., Balcerek, J.M. Krek, V., Shelanski, M. y Cowan, N.J. (1984). Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 2743-2746.
- 216.- Li, E., Bestor, T. y Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* **69**: 915-926.
- 217.- Li, E., Beard, C. y Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature.* **366**: 362-365.
- 218.- Li, T.K. (1977). Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymol.* **45**: 427-483.
- 219.- Lichter J. (1989). Growth of fetuses of rats exposed to ethanol and cigarette smoke during gestation. *Growth. Dev. Aging.* **53**: 129-134.
- 220.- Lieber, C.S. (1983). Alcohol and the liver. En: *The liver Annual.* Arias, I.M. Frenkel, M. y Wilson, J.H.P. eds. Elsevier. Amsterdam. 106-148.
- 221.- Lieber, C.S. (1988). The influence of alcohol on nutritional status. *Nutr.Rev.* **46**: 241-245.
- 222.- Lieber, C.S. (1991). Biochemical mechanisms of alcohol-induced hepatic injury. *Alcohol Alcoholism.* **1**: 283-290.
- 223.- Lieber, C.S. (1992). Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanisms and management. New York: *Plenum Medical Book Company.*
- 224.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1972). The role of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**: 279-287.
- 225.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1968). Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. *Science.* **162**: 917-918.
- 226.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1976). Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed. Proc.* **35**: 1232-1236.
- 227.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1982). The feeding of alcohol in liquid diets: Two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* **6**: 523-531.

- 228.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1970). Hepatic microsomal ethano oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* **245**: 2505-2512.
- 229.- Lieber, C.S. y DeCarli, L.M. (1970). Quantitative relationship between the amount of dietary fat and the severity of the alcoholic fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**: 474-478.
- 230.- Lieber, C.S., Garro, A., Leo, M.A., Mak, K.M. y Worner, T.M. (1986). Alcohol and cancer. *Hepatology.* **6**: 1005-1019.
- 231.- Lieber, C.S., Jones, D.P., Losowsky, M.S. y Davidson, C.S. (1962). Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J. Clin. Invest.* **41**: 1863-1870.
- 232.- Lieber, C.S. y Sprintz, N. (1966). Effects of prolonged ethanol intake in man: role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.* **45**: 1400-1411.
- 233.- Lilienbaum, A. y Paulin, D. (1993). Activation of the human vimentin gene by the human T-cell leukemia virus I tax protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 2180-2188.
- 234.- Liljequist, S. y Karcz-Kubicha, M. (1993). Genetic aspects on the effects of ethanol and central stimulants on locomotor activity and brain dopamine metabolism in mice. *Alcohol and Alcoholism.* **2**: 457-461.
- 235.- Lim, R., Miller, J.F. y Zaheer, A. (1989). Purification and characterization of glia maturation factor-beta: A growth regulator for neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3901-3905.
- 236.- Lindros, K.O., Oshino, N. y Parrilla, R. (1974). Characteristics of ethanol and acetaldehyde oxidation on flavin and pyridinde nucleotide fluorescence changes in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **149**: 7956-7963.
- 237.- Lindsay, R.M.(1993). The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **124**: 103-118.
- 238.- Littleton, J.M. (1991). En: *the molecular pathology of alcoholism*. Departament of Biochemistry. U. of Western Australia. Oxford University Press. 238-253.
- 239.- Littleton, J.M., Brennan, C. y Bouchenafa, O. (1991). The role of calcium flux in the central nervous system actions of ethanol. *Ann. New York Acad. Sci.* **625**: 388-394.
- 240.- Lovinger, D.M. (1993). Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* **17**: 19-27.

- 241.- Lovinger, D.M., White, G. y Weight, F.F. (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*. **243**: 1721-1724.
- 242.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 243.- Lu, B., Yokoyama, M., Reyfus, C.F. y Black, I.B. (1991). NGF gene expression in actively growing brain glia. *J. Neurosci.* **11**: 318-326.
- 244.- Luddens, H., Pritchett, D.B., Kohler, M. y otros. (1990). Cerebellar GABA_A receptor selective for a behavioral alcohol antagonist. *Nature*. **346**: 648-651.
- 245.- Lundsgaard, E. (1938). Alcohol oxidation as a function of the liver. *C.R. Trav. Lab. Carlsbg.* **22**: 333-337.
- 246.- Lyser, K.M. (1977). Differentiation of cells in organ cultures. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff, S. y Hertz, L., eds.) Academic Press. New York. 121-139.
- 247.- Magistretti, P.J., Sorg, O. y Martin, J.L. (1992). Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects. En *Astrocytes: Pharmacology and Function* (Murphy, S., de) pp. 243-265. Academic, New York.
- 248.- Majewski, F. (1985). Sintomatología clínica de la embriopatía alcohólica. Síndrome Alcohólico Fetal. Jornadas Internacionales. Fundación Valgrande, Egraf S.A. Madrid. 13-43.
- 249.- Malloch, G.D.A., Clark, J.B. y Burnet, F.R. (1987). Glial fibrillary acidic protein in the cytoskeletal and soluble protein fractions of the developing rat brain. *J. Neurochem.* **48**: 299-306.
- 250.- Marcussen, B.L., Goodlett, C.R., Mahoney, J.C. y West, J.R. (1994). Alcohol-induced Purkinje cell loss during differentiation but not during neurogenesis. *Alcohol*. **11**: 147-156.
- 251.- Marques, A. y Guerri, C. (1988). Effects of ethanol on rat brain (Na⁺- K⁺) ATPase from native and delipidized synaptic membranes. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 601-606.
- 252.- Martin, D.L. (1992). Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *GLIA*. **5**: 81-94.
- 253.- Masood, K., Besnard, F., Su, Y. Brenner, M. (1993). Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J. Neurochem.* **61**: 160-166.
- 254.- Matsuzaki, S. y Lieber, C.S. (1977). Increases susceptibility of hepatic mitochondria to the toxicity of acetaldehyde after chronic ethanol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 1059-1065.

- 255.- Matus, A. (1988). Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann. Rev. Neurosci.* **11**: 29-44.
- 256.- Mauch, T.J., Donohue, T.M., Zetterman, R.K. y otros. (1986). Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology*. **6**: 263-269.
- 257.- Mayordomo, F., Renau-Piqueras, J., Megias, L., Guerri, C., Iborra, F.J., Azorin, I. y Ledig, M. (1992). Cytochemical and stereological analysis of rat cortical astrocytes during development in primary culture. Effect of prenatal exposure to ethanol. *Int. J. Dev. Biol.* **26**: 311-321.
- 258.- McBride, W.J., Murphy, J.M., Gatto, G.J., Levy, A.D., Yoshimoto, K., Lumeng, L. y Li, T.K. (1993). CNS mechanisms of alcohol self-administration. *Alcohol and Alcoholism* **2**: 463-467.
- 259.- McDonald, J.W. y Johnston, M.V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* **15**: 41-70.
- 260.- Meakin, S.O. y Shooter, E.M. (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* **15**: 323-331.
- 261.- Means, A.L. y Gudas, L.J. (1995). The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 201-233.
- 262.- Meher, M.B. y Tonascia, J.A. (1977). Maternal smoking, pregnancy complications and perinatal mortality. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **128**: 494-502.
- 263.- Messing, R.O., Petersen, P.J. and Henrich, C.J. (1991). Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 23428-23432.
- 264.- Michaelis, E.K. (1990). Fetal alcohol exposure: cellular toxicity and molecular events involved in toxicity. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **14**: 819-826.
- 265.- Miller, M.W. (1996). Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**: 139-144.
- 266.- Miller, M.W. (1992). The effects of prenatal exposure to ethanol on cell proliferation and neuronal migration. En: *Development of the Central Nervous System: Effects of Alcohol and Opiates*. (Miller, M., ed.) Alan R. Liss, New York. 47-69.
- 267.- Miller, M.W. y Robertson, S. (1993). Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J. Comp. Neurol.* **337**: 253-366.

- 268.- Miller, M.W. y Potempa, G. (1990). Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of prenatal exposure to alcohol. *J. Comp. Neurol.* 293: 92-102.
- 269.- Miller, S., Bridges, R.J. y Cotman, C.W. (1993). Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by *trans*-(±)-ACPD is greatly enhanced when astrocytes are cultured in a serum-free defined medium. *Brain Res.* 618: 175-178.
- 270.- Minakami, R., Katsuki, F., y Sugiyama, H. (1993). A variant of metabotropic glutamate receptor subtype 5: an evolutionally conserved insertion with no termination codon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 622-627.
- 271.- Miner, J.N. y Yamamoto, K.R. (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev.* 6:2491-2501.
- 272.- Mitchell, P.J. y Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245: 371-378.
- 273.- Miura, M., Tamura, T. y Mikoshiba, K. (1990). Cell-specific expression of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: identification of the cis- and trans-acting promoter element for astrocyte-specific expression. *J. Neurochem.* 55: 1180-1188.
- 274.- Miura, M., Tamura, T. y Mikoshiba, K. (1991). Involvement of the nuclear factor I motif in the mouse myelin basic protein promoter in cell-specific regulation: comparison with the mouse glial fibrillary acidic protein promoter. *Cell Growth Differ.* 33: 111-116.
- 275.- Mizoi, Y., Ijiri, Y. y Tatsuno, Y. (1979). Relationship between facial flushign and blood acetaldehyde levels after alcohol intake. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 303-311.
- 276.- Monaghan, D.T., Bridges, R.J. y Cotman, C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- 277.- Moncada, S., Flower, R.J. y Vane, J.R. (1985). Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A2 and leukotrienes. *The pharmacological Basis of Therapeutics.* (Gilma, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F., eds.) MacMillan Publishing Co., New York. 660-673.
- 278.- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Vallés, S., Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1995). Ethanol increases CYP2E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J. Neurochem.* 65: 2561-2570.

- 279.- Montoliu, C., Vallés, S., Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1994). Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J. Neurochem.* **63**: 1855-1862.
- 280.- Morin, A.M., Hattori, H., Wasterlain C.G. y Thomson, D. (1989). (³H)MK-801 binding sites in neonate rat brain. *Brain Res.* **487**: 376-379.
- 281.- Morris, S.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S. y Baudry, H. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature.* **319**: 774-776.
- 282.- Morrisett, R.A., Martin, D., Wilson, W.A., Savage, D.D. y Swartzwelder, H.S. (1989). Prenatal exposure to ethanol decreases the sensitivity of the adult rat hippocampus to N-methyl-D-aspartate. *Alcohol.* **6**: 415-420.
- 283.- Morrisett, R.A., Rezvani, A.H., Overstreet, D. y otros. (1990). MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **176**: 103-105.
- 284.- Morrow, A.L., Herbert, S. y Montpied, P. (1991). Chronic ethanol administration increases GABA receptor alpha 6 subunit mRNA levels in the rat cerebellum. *Soc. Neurosci.* **17**: 360-365.
- 285.- Mucke, L., Oldshone, M.B.A., Morris, J.C. y Werenberg, M.I. (1991). Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by local injury. *New Biologist.* **3**: 465-474.
- 286.- Muller, D., Joly, M. y Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science.* **242**: 1694-1697.
- 287.- Murray, M.R. (1977). Introduction. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff, S. y Hertz, L., eds.) Academic Press. New York. 1-8.
- 288.- Nakabeppu, Y., Ryder, K. y Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell.* **55**: 907-915.
- 289.- Nakamura, Y., Takeda, M., Angelides, K.J., Tada, K., Hariguchi, S. y Nishimura, T. (1991). Assembly, disassembly, and subunit exchange of glial fibrillary acidic protein. *Glia.* **4**: 101-110.
- 290.- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* **258**: 597-603.
- 291.- Nicoletti, F., Iadarola, M.J., Wroblewski, J.T. y Costa, E. (1986). Phospholipid metabolism: Developmental changes and interaction with alpha 1-adrenoceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 1931-1935.

- 292.- Nicoletti, F., Wroblewski, J.T., Alho, H., Eva, C., Fadda, E. y Costa, E. (1987). Lesions of putative glutamatergic pathways potentiate the increase of inositol phospholipid hydrolysis elicited by excitatory amino acids. *Brain Research*. 436: 103-112.
- 293.- Nieto-Sampedro, M., Lewis, E.R., Corman, C.W., Manthorpe, M., Skaper, S.J., Barbin, G., Longo, F.M. y Varon, S. (1982). Brain injury causes a time-dependent increase in neurotrophic activity at the lesion site. *Science*. 217: 860-861.
- 294.- Nilson, M., Eriksson, P.S., Rönnbäck, L. y Hansson, E. (1993). GABA induces Ca^{2+} transients in astrocytes. *Neuroscience*. 54: 605-614.
- 295.- Noble, E.P. y Ritchie, T. (1989). Prenatal ethanol exposure reduces the effects of excitatory amino acids in the rat hippocampus. *Life Sci*. 45: 803-810.
- 296.- Nordman, R., Rivière, C. y Rouach, H. (1992). Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radical Biol. Med.* 12: 219-240.
- 297.- Norenberg, M.D., Hertz, L. y Schousboe, A., (eds). (1988). *The Biochemical Pathology of Astrocytes*. Alan R. Liss, New York.
- 298.- Norris, C.R. y Kalil, K. (1991). Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 11: 3481-3492.
- 299.- Nowycky, M.C., Fox, A.C. y Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with differential calcium agonist sensitivity. *Nature*. 316: 440-443.
- 300.- Obe, G. (1981). Acetaldehyde not ethanol is mutagenic. In: *Progress in Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis* Kappas, A. (ed). Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp 19-23.
- 301.- Ohmura, T. y Onoue, K. (1990). Stability of IL-2 mRNA in T lymphocytes is controlled by a protein Kinase C-regulated mechanism. *Int. Immunol.* 2: 1073-1079.
- 302.- Ohnishi, K. y Lieber, C.S. (1977). Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system. *J. Biol. Chem.* 252: 7124-7131.
- 303.- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakanishi, S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269: 1231-1236.
- 304.- Pantazis, N.J., Luo, J. y West, J.R. (1994). Growth factor-mediated neuroprotection against alcohol-induced death of cerebellar granule cells. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 18: 443.

- 305.- Pares, X. y Vallee, B.L. (1981). New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 122-130.
- 306.- Pasteur, L. (1872). Notes sur la production de l'alcool par les fruits. *C.R. Acad. Sci.* 75: 1054.
- 307.- Paulin, D. y Duprey, P. (1995). What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 443-457.
- 308.- Peltz, S.W. y Jacobson, A. (1992). mRNA stability: in trans-it. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4: 979-983.
- 309.- Pennington, S. (1988). Ethanol-induced growth inhibition: The role of cyclic AMP-dependent protein Kinase. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 12: 125-130.
- 310.- Pennington, S.N. (1990). Molecular changes associated with ethanol-induced growth suppression in the chick embryo. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14: 832-837.
- 311.- Pennington, S.N., Boyd, J.W., Kalmus, G.W. y Wilson, R.W. (1983). The molecular mechanism of fetal alcohol syndrome (FAS): 1. Ethanol-induced growth suppression. *Neurobehav Toxicol and Teratol.* 5: 259-262.
- 312.- Pierce, D.R. y West, J.R. (1986). Blood alcohol concentration: a critical factor for producing fetal alcohol effects. *Alcohol.* 3: 269-272.
- 313.- Pierce, D.R., Goodtett, C.R. y West, J.R. (1989). Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology.* 40: 113-126.
- 314.- Pin, J.P., Waeber, C., Prezeau, L. y Heineman, S.F. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10331-10335.
- 315.- Pope, A. (1978). Neuroglia: quantitative aspects. In *Dynamic Properties of Glia Cells.* (Schoffeniels, E., Franck, G., Gertz, L., and Tower, D.B., eds) pp. 13-20, Pergamon, London.
- 316.- Porjesz, B. y Begleiter, H. (1983). En: *The pathogenesis of alcoholism. Biological factors.* Kissin, B. and Begleiter, H. (Eds.). Plenum Press. New York. 415-483.
- 317.- Portolés, M., Sanchis, R. y Guerri, C. (1988). Thyroid hormone levels in rats exposed to alcohol during development. *Horm. Metab. Res.* 20: 267-270.
- 318.- Priscott, P.K. (1982). The effects of ethanol on rat embryos developing in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3641-3643.

- 319.- Priscott, P.K. (1985). Effects of acetaldehyde and 2,3-butanediol on rat embryos developing in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 529-532.
- 320.- Puseler, J.W. (1993). *Alcohol and Alcoholism.* **28** (6): 657-666.
- 321.- Queen, S.A., Sanchez, C.F., Lopez, S.R., Paxton, L.L. y Savage, D.D. (1993). *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **17**: 887-893.
- 322.- Quinlan, R.A. y Franke, W.W. (1983). Molecular interactions in intermediate-size filamentets revealed by chemical cross-linking: Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells. *Eur. J. Biochem.* **132**: 477-484.
- 323.- Rabin, R.A. (1990). Chronic ethanol exposure of PC12 cells alters adenylate cyclase activity and intracellular cyclic AMP content. *J. Pharm. Exp. Ther.* **252**: 1021-1027.
- 324.- Rabin, R.A. (1993). Ethanol-induced desensitization of adinylate cyclase: Role of the adenosine receptor and GTP-binding proteins. *J. Pharm. Exp. Ther.* **264**: 977-983.
- 325.- Raffioni, S. y Bradshaw, R.A. (1993). The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 823-850.
- 326.- Rakic, P. (1981). Neuron-glia interaction during brain development. *Trends Neurosci.* **4**: 184-187.
- 327.- Rakic, P. (1991). Glial cells in development. In vivo and in vitro approaches. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **633**: 96-99.
- 328.- Randall, C.L., Anton, R.F. y Becker, H.C. (1987). Alcohol, pregnancy, and prostaglandin. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **11**: 32-36.
- 329.- Randall, CL., Becker, H.C. y Middaugh, L.D. (1986). Effect of prenatal ethanol exposure on activity and shuttle avoidance behavior in adult Cs7 mice. *Alcohol Drug Res.* **6**: 351-360.
- 330.- Ransone, L.J. y Verma, I.M. (1990). Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**: 539-557.
- 331.- Razin, A. y Shemer, R. (1995). DNA methylation in early development. *Human Molecular Genetics.* **4**: 1751-1755.
- 332.- Redman, C.M., Grag, D.J. y Irucculla, R. (1972). The intracellular pathway of newly formed rat liver catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**: 496-503.

- 333.- Renau-Piqueras, J., Guerri, C., Bungal, M., De Paz, P., Sáez, R. y Mayordomo, F. (1992). Prenatal exposure to ethanol alters plasma membrane glycoproteins of astrocytes during development in primary culture as revealed by concanavalin A binding and 5'-nucleotidase activity. *Glia*. 5: 65-74.
- 334.- Renau-Piqueras, J., Miragall, F., Guerri, C. y Báguena-Cervellera, R. (1987). Prenatal exposure to alcohol alters the Golgi apparatus of newborn rat hepatocytes: A cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 35: 221-228.
- 335.- Renau-Piqueras, J., Sancho-Tello, M., Baguena-Cervellera, R. y Guerri, C. (1989). Prenatal exposure to ethanol alters the synthesis and glycosylation of proteins in fetal hepatocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13: 817-823.
- 336.- Renau-Piqueras, J., Sancho-Tello, M., Zaragoza, R. y Guerri, C. (1988). Effect of ethanol on the development of astrocytes in primary culture. *Adv. Biosci.* 71: 269-273.
- 337.- Renau-Piqueras, J., Zaragoza, R., De Paz, P., Báguena-Cervellera, R., Megias, L. y Guerri, C. (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopy study. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 229-240.
- 338.- Ricciarde, B.R., Saunders, J.B., Willians, R. y Hopkinson, D.A. (1983). Hepatic ADH and ALDH isoenzymes in different racial groups and chronic alcoholism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 61-65.
- 339.- Rickmann, M. y Wolff, J.R. (1985). Prenatal gliogenesis in the neopallium of the rat. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 93: 1-10.
- 340.- Rickmann, M., Amaral, D.G. y Cowan, W.M. (1987). Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 264: 449-479.
- 341.- Rigby, R.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific in vitro by nick translation with DNA polymerasa I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- 342.- Riley, E.P., Mattson, S.N., Sowell, E.R., Jernigan, E.L., Sobel, D.F. y Jones, K.L. (1995). Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 19: 1198-1202.
- 343.- Riol, H., Fages, C. y Tardy, M. (1992). Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 32: 79-85.
- 344.- Rittling, S., Coutinho, L., Amran, T. y Kolbe, M. (1989). AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promoter. *Nucleic Acids Res.* 16: 1619-1633.

- 345.- Roivainen, R., McMahon, T y Messing, R.O. (1993). Protein Kinase C isozymes that mediate enhancement of neurite outgrowth by ethanol and phorbol esters in PC12 cells. *Brain Res.* 624: 85-93.
- 346.- Rossetti, Z.L., Melis, F., Carboni, S, y Gessa, G.L. (1991). Marked decrease of extraneuronal dopamine after alcohol withdrawal in rats: Reversal by MK-801. *Eur.J. Pharmacol.* 200: 371-372.
- 347.- Rothschild, M.A., Oratz, M., Mongelli, J. y Schreiber, S.S. (1971). Alcohol induced depression of albumin synthesis: reversal by tryptophan. *J. Clin. Invest.* 50: 1812-1818.
- 348.- Rowell P.P. (1981). The effect of maternal cigarette smoking on the ability of human placental villi to concentrate alpha-aminoisobutyric acid in vitro. *Res. Commun Subst Abuse.* 2: 253-266.
- 349.- Rubin, E., Gang, H., Misra, P.S. y Lieber, C.S. (1970). Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication. A hepatic microsomal mechanism. *Ann. J. Med.* 49: 801-806.
- 350.- Rubin, R. y Rand, M.L. (1994). Alcohol and platelet function. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 18 (1): 121-131.
- 351.- Sáez, R., Burgal, B., Renau-Piqueras, J., Marqués, A., y Guerri, C. (1991). Evolution of several cytoskeletal proteins of astrocytes in primary culture: Effects of prenatal alcohol exposure. *Neurochem. Res.* 16: 737-747.
- 352.- Salvetti, A., Lilienbaum, A., Li, Z.L., Paulin, D. y Gazzolo, L. (1993). Identification of a negative element in the human vimentin promoter: modulation by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *Mol. Cell. Biol.* 13: 89-97.
- 353.- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 354.- Samson, H.H. y Harris, R.A. (1992). Neurobiology of alcohol abuse. *TIBS.* 131: 206-211.
- 355.- Sanchís, R. y Guerri, C. (1986a). Alcohol-metabolizing enzymes in placenta and fetal liver: effect of chronic ethanol intake. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 10: 39-44.
- 356.- Sanchís, R. y Guerri, C. (1986). Chronic ethanol intake in lactating rats: Milk analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* 85: 107-110.
- 357.- Sanchís, R., Sancho-Tello, M. y Guerri, C. (1986). The effects of chronic alcohol consumption on pregnant rats and their offspring. *Alcohol and Alcoholism.* 21: 295-305.
- 358.- Sanchís, R., Sancho-Tello, M. y Guerri, C. (1989). The role of liquid diet formulation in the postnatal ethanol exposure via rat mother's milk. *Nutr. Pharmacol.Toxicol.* 129: 82-88.

- 359.- Sanchís, R., Sancho-Tello, M., Chirivella, M. y Guerri, C. (1987). The role of maternal alcohol damage on ethanol teratogenicity in the rat. *Teratology*. 36: 199-208.
- 360.- Sarid, J. (1991). Identification of a cis-acting positive regulatory element of the glial fibrillary acidic protein gene. *J. Neurosci. Res.* 28: 217-228.
- 361.- Sarkar, S. y Cowan, N.J. (1991). Intragenic sequences affect the expression of the gene encoding glial fibrillary acidic protein. *J. Neurochem.* 57: 675-684.
- 362.- Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Mulvihill, E.R., Segerson, T.P., and Westbrook, G.L. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 367-372.
- 363.- Savage, D.D., Montano, C.Y., Otero, M.A. y Paxton, L.L. (1991). Prenatal ethanol exposure decreases hippocampal NMDA-sensitive ³H-glutamate binding sites density in 45-day-old-rats. *Alcohol*. 8: 193-201.
- 364.- Sax, C.M., Farrel, F.X. y Zwhner, Z.E. (1989). Down-regulation of vimentin gene expression during myogenesis is controlled by a 5'-flanking sequence. *Gene*. 78: 235-243.
- 365.- Scarpini, E., Conti, Giancarlo., Chianese, L., Baron, P., Pizzul, S., Basellini, A., Livraghi, S. y Scarlato, G. (1995). Induction of p75^{NGFR} in human diabetic neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*. 135: 55-62.
- 366.- Schafer, D.F., Fowler, J.M., Munson, P.J., Thakur, A.K., Waggoner, J.G. y Jones, E.A. (1983). Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in an animal model of fulminant hepatic failure. *J. Lab. Clin. Med.* 102: 870-880.
- 367.- Schenker, S. Becher, H.C., Randall, C.L., Phillips, D.K., Baskin, G.S. y Henderson, G.I. (1990). Fetal Alcohol Syndrome: Current status and pathogenesis. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 14: 635-647.
- 368.- Schenker, S., Dicke, J.M., Fohnson, R.F., Hays, S.E. y Henderson, G.I. (1989). Effect of ethanol on human placental transport of model amino acids and glucose. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 13: 112-119.
- 369.- Schmechel, D.E. y Rakic, P. (1979). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* 156: 115-152.
- 370.- Schnitzer, J., Franke, W.W. y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* 90: 435-447.

- 371.- Schoepp, D.D. (1993). The biochemical pharmacology of metabotropic glutamate receptors. *Biochem. Soc. Transactions*. 21: 97-102.
- 372.- Selker, E.U. (1990). DNA methylation and chromatin structure: A view from below. *Trends Biochem. Sci.* 15: 103-107.
- 373.- Shafit-Zagardo, B., Kume-Iwaki, A. y Goldman, J.E. (1988). Astrocytes regulate GFAP mRNA levels by cyclic AMP- and protein Kinase C-dependent mechanisms. *Glia*. 1: 346-354.
- 374.- Shaw, G. y Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 46: 659-667.
- 375.- Shenker, S., Becker, H.C., Randall, C.L., Philips, D.K., Baskin, G.S. y Henderson, G.I. (1990). Fetal alcohol syndrome: Current status and pathogenesis. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 14: 635-647.
- 376.- Siesjö, B.K., Agardh, C.D., Bengtsson, F. y Smith, M.L. (1989). Arachidonic acid metabolism in seizures. En *Arachidonic Acid Metabolism in the Nervous System*. (Barkai, A.I., and Bazan, N.G., eds). 559: 323-339. New York Academy of Science, New York.
- 377.- Silver, J. y Ogawa, M.Y. (1983). Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice glia-coated cellulose bridges. *Science*. 220: 1067-1069.
- 378.- Simoncini, L., Haldeman, B.A., Yamagiwa, T. y Mulvihill, E. (1993). Functional characterization of metabotropic glutamate subtypes. *Biophys. J.* 64: 1984.
- 379.- Singer, J., Roberts-Ems, J., Luthardt, F.W., y Riggs, A.D. (1979). Methylation of DNA in mouse early embryos, teratocarcinoma cells and adult tissues of mouse and rabbit. *Nucleic Acids Res.* 7: 2369-2385.
- 380.- Smith, M., Hopkinson, D.A. y Harris, H. (1972). Alcohol dehydrogenase isozymes in adult human stomach and liver: evidence for activity of the ADH₃ in liver: evidence for activity of the ADH₃ locus. *Ann. Hum. Genet.* 35: 243-253.
- 381.- Smith, M., Hopkinson, D.A. y Harris, H. (1973). Studies on the subunit structure and molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci, ADH₁, ADH₂, Y ADH₃. *Ann. Hum. Genet.* 36: 401-414.
- 382.- Smith, R.M. (1984). Ethyl esters of arylhydroxy and arylhydroxy-methoxycocaines in the urines of simultaneous cocaine and ethanol users. *J. Anal. Toxicol.* 8: 38-42.

- 383.- Smith, S.J. (1992). Do astrocytes process neural information? En *Progress in Brain Research* (Yu, A.C.H., Hertz, L., Norenberg, M.D., Syková, E., and Waxman, S.G., eds)94: 119-136. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. Netherlands.
- 384.- Snell, L.D., Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (1993). Radioligand binding to the n-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: Alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res.* 602: 91-98.
- 385.- Snell, L.D., Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (1994). Involvement of protein kinase C in ethanol-induced inhibition of NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 18: 81-85.
- 386.- Sontheimer, H. y Waxman, S.G. (1993). Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 70: 1863-1873.
- 387.- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-508.
- 388.- Stanfield, B.B. y Cowan, W.N. (1988). The development of the hippocampal region. En Peters A, Jones E.D. (eds): *Cerebral cortex. 7. Development and maturation of cerebral cortex*. New York. Plenum, pp 107-131.
- 389.- Stella, N., Tencé, M., Glowinski, J. y Prémont, J. (1994). Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J. Neurosci.* 14: 568-575.
- 390.- Stewart, M., Quinlan, R.A. y Moir, R.D. (1989). Molecular interactions in paracrystals of a fragment corresponding to the alpha-helical coiled-coil rod portion of glial fibrillary acidic protein: evidence for antiparallel packing of molecules and polymorphism related to intermediate structure. *J. Cell. Biol.* 109: 225-234.
- 391.- Stockard, C.R. (1910). The influence of alcohol and other anaesthetics on embryonic development. *Am. J. Anat.* 10: 369-392.
- 392.- Stover, D.M. y Zehner, Z.E. (1992). Identification of a cis-acting DNA antisilencer element which modulates vimentin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2230-2240.
- 393.- Streissguth, A.P. y Martin, J.C. (1983). *The Pathogenesis of Alcoholism*. B. Kissin, H. Beigliter (eds). Plenum Press, New York. 539-557.
- 394.- Streissguth, A.P., Barr, H.M. y Sampson, P.D. (1990). Moderate Prenatal alcohol Exposure: Effects on Child IQ and learning problems at age 7 ½ years. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14: 662-669.

- 395.- Streissguth, A.P., Landesman-Dwyer, S., Martin, J.C. y Smith, D.W. (1980). Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science*. 209: 353-361.
- 396.- Suárez, I., Bodega, G., Rubio, M. y Fernández, B. (1992). Sexual dimorphism in the hamster cerebellum demonstrated by glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin immunoreactivity. *Glia*. 5: 10-16.
- 397.- Sulik, K.K., Johnston, M.C. y Webb, M.A.F.A.S. (1981). Embryogenesis in a mouse model. *Science*. 214: 936-938.
- 398.- Sulik, K.K., Johnston, M.C. y Webb, M.A. (1981). Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science*. 214: 936-938.
- 399.- Suzdak, P.D. y Paul, S.M. (1987). Ethanol stimulates GABA receptor-mediated Cl⁻ ion flux in vitro: Possible relationship to the anxiolytic and intoxicating actions of alcohol. *Psychophar. Bull.* 23: 445-451.
- 400.- Swartzwelder, H.S., Wilson, W.A. y Tayyeb, M.I. (1995). Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol. Cli. Exp. Res.* 19: 320-323.
- 401.- Swartzwelder, H.S., Farr, K.L., Wilson, W.A. y Savage, D.D. (1988). Prenatal exposure to ethanol decreases physiological plasticity in the hippocampus of the adult rat. *Alcohol*. 5: 121-124.
- 402.- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., y Nakanishi, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*. 8: 169-179.
- 403.- Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakanishi, S. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13: 1372-1378.
- 404.- Tapscott, S.J., Bennett, G.S., Toyama, Y., Kleimbart, F. y Holtzer, H. (1981). Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. *Dev. Biol.* 86: 40-54.
- 405.- Tardy, M., Fages, C., Riou, H., Le Prince, G., Rataboulet, P., Charriere-Bertrand, C. y Nunez, J. (1989). Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein mRNA in the central nervous system and in cultured astrocyte. *J. Neurochem.* 52: 162-167.
- 406.- Teichberg, B.I. (1991). Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* 5: 3086-3091.
- 407.- Temple, S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*. 340: 471-473.

- 408.- Teter, B., Finch, C.E. y Condorelli, D.F. (1994). DNA methylation in the glial fibrillary acidic protein gene: map of CpG methylation sites and summary of analysis by restriction enzymes and by LMPCR. *Journal of Neuroscience Research*. 39: 708-709.
- 409.- Tomaselli, K. y Reichardt, L.F. (1989). Integrins, cadherins, and cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily neuronal receptors that regulate axon growth and guidance, in *The Assembly of the Nervous System*. (Landmesser LT, ed). 81-109. Alan R. Liss. New York.
- 410.- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
- 411.- Tse, F.W., Fraser, D.D., Duffy, S. y MacVicar, B.A. (1992). Voltage-activated K⁺ currents in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 12: 1781-1788.
- 412.- Tuma, D.J. y Klassen, L.W. (1992). Immune responses to acetaldehyde-protein adducts: role in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 103: 1969-1973.
- 413.- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J. y Goodman, H.M. (1977). Rat insulin genes: Construction of phasmids containing the coding sequences. *Science*. 196: 1313.
- 414.- Vale, R.D. y Shooter, E.M. (1985). Assaying binding of nerve growth factor to cell surface receptors. *Methods Enzymol.* 109: 21-39.
- 415.- Van Thiel, D.H., Gavalier, J. y Leste, R. (1974). Ethanol inhibition of vitamin A metabolism in the testes: Possible mechanism of sterility in alcoholics. *Science*. 186: 941-942.
- 416.- Viña, J., Estrela, J.M., Guerri, C. y Romero, F.J. (1980). Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 188: 549-552.
- 417.- Von warburg, J.P., Bethune, J.L. y Vallee, B.L. (1964). Human liver alcohol dehydrogenase: Kinetic and Physicochemical properties. *Biochemistry*. 3: 1775-1782.
- 418.- Wafford, K.A. y Whiting, P.J. (1992). Ethanol potentiation of GABA_A receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the 12 subunit. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 313: 113-117.
- 419.- Walker, D.W., Heaton, M.B., Smothers, C.T. y Hunter, B.E. (1990). Chronic ethanol ingestion reduces the neurotrophic activity contained in rat hippocampus. *Alcoholism. Clin. Exp. Res.* 14: 350.
- 420.- Walker, D.W., Lee, N., Heaton, M.B., King, M.A. y Hunter, B.E. (1992). Chronic ethanol consumption reduces the neurotrophic activity in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 147: 77-80.

- 421.- Walz, W. (1989). Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.* 33: 309-333.
- 422.- Webster, W.S., Walsh, D.A., Lipson, A.H. y McEwen, S.E. (1980). Teratogenesis after acute alcohol exposure in inbred and outbred mice. *Neurobehav. Toxicol.* 2: 227-234.
- 423.- Weidenheim, K.M., Epshteyn, I., Rashbaum, W.K. y Lyman, W.D. (1994). Patterns of glial development in the human foetal spinal cord during the late first and second trimester. *J. Neurocytol.* 23: 343-353.
- 424.- West, J.R., Cheu, W.J., Pantazis, N.J. (1994). Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab. Brain. Dis.* 9: 291-322.
- 425.- West, J.R. y Pierce, D.R. (1984). The effect of in utero ethanol exposure on hippocampal mossy fibers: an HRP study. *Brain Res.* 317: 275-279.
- 426.- West, J.R., Hodges, C.C. y Black, A.C. (1981). Prenatal exposure to alcohol alters the organization of hippocampal mossy fibers in rats. *Science.* 211: 957-959.
- 427.- West, T.J., Wess, L. y Miller, A. (1994). The in vitro binding of acetaldehyde to collagen studied by neutron diffraction. *Alcohol and Alcoholism.* 29 (4): 403-409.
- 428.- Whiting, P., McKernan, R.M. y Iversen, L.L. (1990). Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA directs expression of two C phosphorylation site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9966-9970.
- 429.- Williams, K., Hanna, J.L. y Molinoff, P.B. (1991). *Mol. Pharmacol.* 40: 774-782.
- 430.- Wolfe, L.S. (1989). Eicosanoids. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Molinoff, P.B. (eds.). *Basic Neurochemistry.* Raven Press. New York. 399-414.
- 431.- Woodhams, P.L., Basco, E., Hajos, F., Csillag, A. y Balazs, R. (1981). Radial glia in the developing mouse cerebral cortex and hippocampus. *Anat. Embryol.* 163: 331-343.
- 432.- Wooten, M.W. y Ewald, S.J. (1991). Alcohols synergize with NGF to induce early differentiation of PC12 cells. *Brain Res.* 550: 333-339.
- 433.- Wozniak, L.M., Pert, A., Mele, A. y Linnoila, M. (1991). Focal application of alcohols elevates extracellular dopamine in rat brain: A microdialysis study. *Brain Res.* 540: 31-40.

- 434.- Ylikorkala, O., Halmemäki, E. y Viinikka, L. (1980). Urinary prostacyclin and thromboxane metabolites in drinking pregnant women and their infants. Relation to fetal alcohol syndrome. *Obstet. Gynecol.* 71: 61-66.
- 435.- Yoshimoto, K., McBride, W.J., Lumeng, L. y Li, T.K. (1992). Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. *Alcohol.* 9: 17-22.
- 436.- Zachman, R.D. y Grummer, M.A. (1992). Letters to the editor. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 16: 141.
- 437.- Zajac, C.S. y Abel, E.L. (1992). Chapter 4: Animal models of prenatal alcohol exposure. *Int. J. Epidemiol. (Suppl. 1)*. 21: S24-S32.
- 438.- Zgombic-Knight, M., Satre, M.A. y Duester, G. (1994). Differential activity of the promoter of the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene ADH3 in neural tube of transgenic mouse embryos. *J. Biol. Chem.* 269: 6790-6795.
- 439.- Ziegler, A., Hagmann, J., Keifer, B. y Nagamine, Y. (1990). Ca²⁺ potentiates cAMP-dependent expression of urokinase-type plasminogen activator gene through a calmodulin- and protein kinase C-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 265: 21197-21201.
- 440.- Zou, J-Y., Rabin, R.A. y Pentney, R.J. (1993). Ethanol enhances neurite outgrowth in primary culture of rat cerebellar macroneurons. *Dev. Brain Res.* 72: 75-84.
- 441.- Zuckerman, B., Frank, D.A., Hingson, R., Amaro, H., Levenson, S.M., Jayne, H., Parker, S., Vinci, R., Aboagye, K., Fried, L.E., Cabral, H., Timperi, R. y Baucher, H. (1989). Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *N. Engl. J. Med.* 320-762.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todo el personal que forma parte del Instituto de Investigaciones Citológicas y, especialmente, a las siguientes personas:

A la Dra. Consuelo Guerri, por la dirección de esta tesis y sobre todo por su afán en enseñar, discutir y contrastar diferentes puntos de vista que hacen amar esta profesión. Por su amistad y cariño sincero.

A Marisa March, por su colaboración constante, sincera amistad y confianza en mí.

A Isabel Roglá, por su desinteresada ayuda y apoyo incondicional a mi persona.

A Rosana Sáez y Carmina Montoliú, por su colaboración y ayuda en la realización de este trabajo.

A María Sancho-Tello, por la caracterización de la glía radial, su ayuda en la realización de las inmunotransferencias de glía radial y por su inestimable apoyo.

A Javier Pitarch, por su asesoramiento informático y su colaboración en esta Tesis.

A Ana Polache y Rafa Martín-Algarra por las charlas científicas y no científicas compartidas.

A María Burgal y Marián Noguera, por la realización de las imágenes computerizadas en seudocolor con microscopía confocal.

A Vicente Felipe y Ruth Wallace, por su ayuda y colaboración en los experimentos relacionados con los receptores de glutamato.

A Rosa Vivó, por los momentos muy agradables que pasamos juntas.

A Rosa Miñana y Eva Climent, por aguantar a una doctoranda en fase de preparación del manuscrito de la Tesis doctoral.

A Eladio Jordá, por soportar lo insoportable y por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

A M^a Luisa Calero y Eusebi Moreno, por sus correcciones lingüísticas y comprensión, animándome a proseguir con ilusión y optimismo.

Y sobre todo, también a mi hijo que tuvo que soportar horas de ordenador, pilas de libros y revistas, largas ausencias y como él mismo dice -no te vayas mamá, por favor-.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D. LILIAN SOAYA VALLES MARTI

la calificación de APROBADO CON LAUDES POR UNANIMIDAD

Valencia, a 5 de JULIO de 1996

El Secretario,

El Presidente

Santiago Jorda

M. Jorda

