

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLOGICAS
DE LA CAJA DE AHORROS DE VALENCIA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL SINDROME ALCOHOLICO
FETAL: ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DE HEPA-
TOCITOS, Y DE ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

Lda. en Medicina

MARIA SANCHO-TELLO VALLS

Valencia, Septiembre de 1988

UMI Number: U602919

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 U602919

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

TITULO DE LA TESIS:

Estudio experimental del Síndrome Alcohólico Fetal: alteraciones en el desarrollo de hepatocitos, y de astrocitos en cultivo primario.

AUTOR: MARIA SANCHO-TELLO VALLS

DIRECTOR: Dra. CONSUELO GUERRI SIRERA y Dr. JAIME RENAU PIQUERAS

TRIBUNAL: Prof. Dr. D. JOSE VIÑA RIBES

Prof. Dr. D. MANUEL BENITO DE LAS HERAS

Prof. Dr. D. M^a JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER

Prof. Dr. D. JOSE CABO SOLER

Prof. Dr. D. FEDERICO PALLARDO CALATAYUD

FECHA DE LA LECTURA: 25 Noviembre 1988

CALIFICACION OBTENIDA: Apto "Cum Laude"



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLOGICAS
DE LA CAJA DE AHORROS DE VALENCIA**

SANTIAGO GRISOLÍA, DIRECTOR

Amadeo de Saboya, 4 - Tel.-(98) *369 85 00

46010 VALENCIA (España)

**CONSUELO GUERRI SIRERA, Doctora en Ciencias
Biológicas y Adjunto de Investigación del
Instituto de Investigaciones Citológicas, y**

**JAIME RENU PIQUERAS, Doctor en Ciencias
Biológicas y Adjunto de Investigación del
Instituto de Investigaciones Citológicas.**

CERTIFICAMOS: Que la presente Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL SINDROME ALCOHOLICO FETAL: ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DE HEPATOCITOS, Y DE ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO", que presenta la Lda. en Medicina María Sancho-Tello Valls, ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Citológicas bajo nuestra dirección, presentándose a su defensa con nuestra aprobación.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 12 de Septiembre de 1988.

Dra. C. Guerri Sirera

Dr. J. Renau Piqueras

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Instituto de Investigaciones Citológicas de la Caja de Ahorros de Valencia, por la concesión de una beca que me ha permitido la realización del presente trabajo.

A la Dra. CONSUELO GUERRI SIRERA por haber aceptado la dirección de esta tesis, así como por su constante estímulo y consejo durante la larga duración de este trabajo.

Al Dr. JAIME RENAU PIQUERAS por haber aceptado la co-dirección de esta tesis y por su inestimable colaboración y ayuda.

Al Dr. SANTIAGO GRISOLIA, Director de este Instituto, por acoger la realización del presente trabajo, así como por haber sabido crear un gran ambiente científico en este centro.

Al Dr. ENRIQUE ALBORCH por haber aceptado la ponencia de esta tesis, al igual que por sus valiosos comentarios críticos.

A mis compañeras de laboratorio MARISA MARCH, AMPARO MARQUES y la Dra. ROSA SANCHIS por la amistad y colaboración que siempre he recibido de ellas durante la realización del presente trabajo. A CARMEN NAVARRO por la confección del material gráfico. Al Dr. J.E. O'CONNOR por el análisis con el citofluorímetro de flujo.

A todas las personas del Instituto, especialmente a las de los departamentos de Bioquímica y de Cultivo de Tejidos, por el apoyo y la ayuda que siempre he recibido.

A mis padres

INDICE

	pag
INTRODUCCION	1
1. Consumo de alcohol en España	2
2. Relación entre el consumo materno de alcohol durante la gestación y la gravedad de los efectos sobre su descendencia	3
3. Síndrome alcohólico fetal	5
3.1. Características principales	5
3.2. Frecuencia de aparición	8
3.3. Factores de riesgo	8
3.3.1. Dosis de alcohol	8
3.3.2. Períodos críticos de exposición	9
3.3.3. Susceptibilidad genética	9
3.3.4. Nutrición	10
3.3.5. Consumo de otras drogas	10
3.3.6. Estadio de la enfermedad alcohólica materna	11
3.3.7. Factores socioeconómicos	11
4. Metabolismo del etanol. Agente causal del S.A.F.: ¿alcohol o acetaldehído?	12
4.1. Metabolismo del etanol	12
4.1.1. Sistemas enzimáticos de oxidación del etanol	12
4.1.1.1. Alcohol deshidrogenasa (ADH)	12
4.1.1.2. Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS)	13
4.1.1.3. Sistema catalasa	13
4.1.2. Oxidación del acetaldehído	14
4.2. Alteraciones debidas al consumo crónico de alcohol	15

	pag
4.3. Agente etiológico del S.A.F.: ¿alcohol o acetaldehído?	16
5. Alteraciones hepáticas debidas a la exposición prenatal al alcohol	17
6. Alteraciones en el sistema nervioso central debidas a la exposición prenatal al alcohol	18
7. Modelos experimentales utilizados	21
7.1. Modelo animal	21
7.2. Modelo de cultivo primario de células nerviosas	22
8. Objetivos de la investigación	26
MATERIALES Y METODOS	28
1. Materiales	29
1.1. Animales	29
1.2. Dietas utilizadas	29
1.3. Aparatos	31
1.4. Reactivos y productos	33
2. Métodos	34
2.1. Manipulación de los animales	34
2.1.1. Procedimiento de alcoholización me- diante dieta líquida. Utilización de controles isocalóricos "pair fed"	34
2.1.2. Exposición prenatal al alcohol	35
2.1.3. Exposición postnatal al alcohol	35
2.2. Aislamiento y cultivos celulares	36
2.2.1. Aislamiento de hepatocitos	36
2.2.2. Aislamiento y cultivo de astrocitos	36
2.3. Estudio de los hepatocitos	39
2.3.1. Síntesis de proteínas	39

	pag
2.3.2. Síntesis de glicoproteínas	40
2.3.3. Separación de subpoblaciones hepatocitarias por gradiente de densidad	41
2.3.4. Método utilizado para análisis ultraestructurales	44
2.3.4.1. Preparación de las muestras	44
2.3.4.2. Técnica de citoquímica	44
2.3.4.3. Técnica de autorradiografía	45
2.3.4.4. Estudio de las micrografías	46
2.3.4.5. Estudio de autorradiogramas	47
2.4. Estudio de los cultivos de astrocitos	47
2.4.1. Pureza de los cultivos	47
2.4.2. Síntesis de proteínas	48
2.4.3. Síntesis de ADN y ARN	48
2.4.4. Procesamiento de las células para estudios bioquímicos	49
2.5. Determinaciones enzimáticas	49
2.6. Otras determinaciones	54
RESULTADOS	57
1. Estudio de los hepatocitos	58
1.1. Aislamiento de hepatocitos de ratas fetales y neonatales: consideraciones metodológicas	58
1.2. Síntesis de proteínas en hepatocitos	59
1.2.1. Incorporación y liberación de ³ H-leucina	59
1.2.2. Métodos autorradiográficos	61
1.3. Síntesis de glicoproteínas	65
1.4. Estudio de las subpoblaciones de hepatocitos de ratas neonatales	70

	pag
1.4.1. Proceso de separación	70
1.4.2. Viabilidad y recuperación de las subpoblaciones de hepatocitos	76
1.4.3. Citofluorimetría de flujo	78
1.4.4. Actividades enzimáticas en las subpoblaciones de hepatocitos	78
1.4.5. Estudio ultraestructural	82
1.4.5.1. Resultados cualitativos	82
1.4.5.2. Resultados cuantitativos	84
2. Estudio de los astrocitos en cultivo primario	95
2.1. Consideraciones metodológicas	95
2.2. Características morfológicas	96
2.3. Crecimiento del cultivo	98
2.4. Síntesis de proteínas, ARN y ADN	103
2.5. Actividades enzimáticas en los astrocitos	109
2.5.1. Enzimas marcadoras	110
2.5.2. Enzimas ligadas a membranas	116
2.5.3. Alcohol deshidrogenasa	120
DISCUSION	121
1. Estudio de los hepatocitos	122
1.1. Aislamiento de hepatocitos	122
1.2. Síntesis y glicosilación de proteínas	123
1.3. Subpoblaciones de hepatocitos	128
1.4. Subpoblaciones hepatocitarias obtenidas de ratas expuestas al alcohol	131
2. Estudio de los cultivos primarios de astrocitos	135
2.1. Características del cultivo	136

	pag
2.2. Efecto del alcohol	138
2.3. Astrocitos prenatalmente expuestos al alcohol	140
2.4. Repercusión sobre el síndrome alcohólico fetal	141
CONCLUSIONES	144
BIBLIOGRAFIA	149



ABREVIATURAS (sólo se incluyen las poco usuales)

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALAT	Alanina aminotransferasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
BSA	Seroalbúmina bovina
FAE	Fetal alcohol effects
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GERL	Golgi-Retículo endoplásmico-Lisosomas
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEM	Minimum essential medium
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Piruvato Kinasa
PP	Periportal
PV	Perivenoso
REI	Retículo endoplásmico liso
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SAF	Síndrome alcohólico fetal
SBF	Suero bovino fetal
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Acido tricloroacético
UDP	Uridin difosfato

INTRODUCCION

1. CONSUMO DE ALCOHOL EN ESPAÑA.

El consumo de bebidas alcohólicas se conoce desde hace milenios, cuando el hombre, además de cultivar frutos y granos, aprendió a fermentar sus jugos. Desde entonces el consumo de alcohol ha estado íntimamente unido a diversos aspectos mágicos, sagrados y sociales en las diferentes culturas que han poblado los cinco continentes.

Hoy en día se sigue consumiendo bebidas alcohólicas en todo el mundo. En nuestra sociedad es la toxicomanía más frecuente, constituyendo uno de los más graves problemas de salud pública. Para hacernos una idea de la magnitud del problema basta recordar que actualmente en España el 70% de la población consume bebidas alcohólicas, de los que más del 11% son bebedores de cantidades altas o excesivas (>75 cc de alcohol puro/día), lo que supone unos 4 millones de personas [103]. Esta cifra se incrementa constantemente debido principalmente al aumento del número de mujeres que se incorporan a los hábitos de bebida y de jóvenes, que empiezan a consumir bebidas alcohólicas a una edad cada vez más temprana. Estos porcentajes son similares a los publicados en la mayoría de países de Europa y Norteamérica.

La cantidad de alcohol que consume la población española también aumenta año tras año. Así, mientras en la pasada década se bebía una media de 14,5 litros de etanol absoluto por habitante y año, las últimas estadísticas dan unos datos de 19,2 litros, lo que coloca a España en la tercera posición de países consumidores de alcohol [103].

El consumo de etanol produce lesiones en casi todos los sistemas del organismo, favoreciendo la aparición de alteraciones clínicas tan diversas como cardiomiopatía, gastritis, pancreatitis, cirrosis hepática, alteraciones sanguíneas y metabólicas, neuropatías, demencia, etc. Además es causa directa de numerosos accidentes, tanto laborales como extralaborales, lo que en conjunto lleva a que la tercera causa más frecuente de muerte en España sea debida al consumo de alcohol [66].

Si dicho consumo por el hombre constituye un grave problema social, aún lo constituye más por parte de la mujer, ya que últimamente se ha descrito la aparición de graves alteraciones en niños cuyas madres habían consumido alcohol durante la gestación. En España se calcula que hay unas 800.000 mujeres que consumen crónicamente alcohol, de las que 500.000 se encuentran en edad fértil [14], lo que puede constituir un grave problema de salud pública, dada la trascendencia social de esta afectación

y la escasa posibilidad de recuperación de estos niños.

2. RELACION ENTRE EL CONSUMO MATERNO DE ALCOHOL DURANTE LA GESTACION Y LA GRAVEDAD DE LOS EFECTOS SOBRE SU DESCENDENCIA.

Desde hace mucho tiempo se sospechaba que el alcohol consumido durante la gestación tenía consecuencias graves en la descendencia; según el Antiguo Testamento, un ángel anunció a la madre de Sansón "Concebirás y darás a luz un hijo; desde ahora guárdate de beber vino o licor" (Jueces, 13:3-4).

En los últimos 300 años se han hecho muchas observaciones y trabajos que igualmente apoyan la creencia que el alcoholismo materno durante el embarazo podía producir daño en la descendencia, como son los informes presentados por el Colegio de Médicos al Parlamento Británico en 1726 durante la "epidemia de ginebra" [272] y por un comité a la Casa de los Comunes en 1834 [106], o como los trabajos publicados en Inglaterra [64,247] y Francia [120] hace casi 100 años.

Más recientemente se han publicado trabajos [124, 211] que describen una serie de anomalías comunes aparecidas en hijos de madres alcohólicas; pero no fué hasta 1973 cuando Jones y Smith [106,107] caracterizaron este patrón de alteraciones, denominando a esta nueva entidad clínica "Síndrome Alcohólico Fetal", o también denominada "Embriofetopatía Alcohólica" [146].

Hoy se sabe que la exposición prenatal al alcohol puede dar lugar a una amplia gama de efectos adversos. En la figura 1 (tomada de [245]) se presentan los resultados de unos estudios estadísticos en los que se ha tratado de relacionar pautas y dosis de consumo de alcohol por la madre, con los efectos sobre la descendencia. Como puede observarse en dicha figura, la gravedad de los efectos es gradual y está directamente relacionada con el consumo materno de alcohol, observándose las alteraciones más marcadas en hijos de mujeres alcohólicas crónicas o que han consumido elevadas cantidades de alcohol durante la gestación. El efecto más grave, además de la muerte perinatal, es la aparición del Síndrome Alcohólico Fetal (S.A.F).

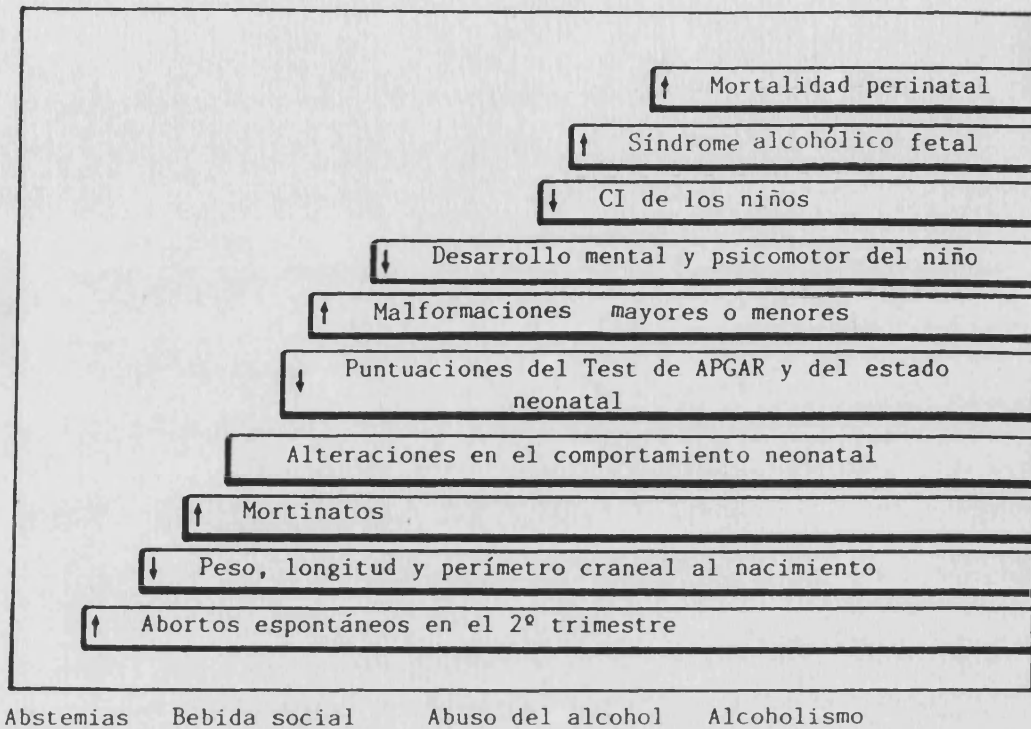


Figura 1. Espectro de los efectos del alcohol sobre el feto en relación con el consumo de alcohol materno (tomado de [245]).

3. SINDROME ALCOHOLICO FETAL.

3.1. CARACTERISTICAS PRINCIPALES.

Este síndrome engloba una serie de alteraciones en diversas partes del organismo, que se pueden clasificar en 4 grupos principales:

- a) Disfunción del sistema nervioso central.
- b) Deficiencia en el crecimiento.
- c) Cuadro característico de alteraciones faciales.
- d) Malformaciones mayores y menores en distintos órganos, que se asocian en mayor o menor grado a las anteriores.

Todas estas alteraciones que pueden presentar los niños con S.A.F., así como su frecuencia de aparición, se muestran en las Tablas 1 y 2 (tomadas de [37]).

No siempre aparece el cuadro típico completo de S.A.F., sino que frecuentemente se observan formas incompletas o parciales, que se denominan F.A.E. ("Fetal Alcohol Effects"), es decir, efectos del alcohol sobre el feto.

TABLA 1. Características principales del síndrome alcohólico fetal.

<u>Característica</u>	<u>Manifestación</u>
Disfunción del sistema nervioso central:	
Intelectual	Retraso mental leve a moderado (*)
Neurológico	Microcefalia (*) Escasa coordinación; hipotonía (+)
Comportamiento	Irritabilidad en la infancia (*) Hiperactividad en la niñez (+)
Deficiencia en el crecimiento:	
Prenatal	<2 D.S. de longitud y peso (*)
Postnatal	<2 D.S. de longitud y peso (*) Tejido adiposo desproporcionalmente disminuido (+)
Características faciales:	
Ojos	Fisuras palpebrales pequeñas (*)
Nariz	Corta; antevertida (+) Philtrum hipoplásico (*)
Maxilar	Hipoplásico (+)
Boca	Bermellón labial superior delgado (*) Retrognatia en la infancia (*) Micrognatia o prognatia relativa en adolescentes (+)

Aparece en >80% (*) y en el 50-80% (+) de los pacientes.

TABLA 2. Características asociadas al síndrome alcohólico fetal.

<u>Area</u>	<u>Frecuente</u> (*)	<u>Ocasional</u> (+)
Ojos	Ptosis; estrabismo; pliegues epicánticos	Miopía; microftalmía clínica; blefarofimosis
Orejas	Rotación posterior	Pabellones auriculares poco desarrollados
Boca	Pliegues palatinos laterales prominentes	Labio leporino, paladar hendido; dientes hipoplásicos con esmalte defectuoso
Cardíaca	Murmillos, especialmente en la primera infancia, en general por defecto del septo atrial	Defecto del septo ventricular; anomalías en los grandes vasos; tetralogía de Fallot
Genito- urinaria	Hipoplasia labial en niñas	Hipospadias; riñones poco rotados; hidronefrosis
Cutánea	Hemangiomas	Hirsutismo en la infancia
Esquelética	Pliegues palmares aberrantes; pectus excavatum	Movimientos articulares limitados, principalmente en dedos y codos; hipoplasia ungueal, especialmente del 5º dedo; polidactilia; sínó- stosis radio-cubital; pectus cari- natum; xifoides bífida; síndrome de Klippel-Feil; escoliosis
Muscular		Hernia diafragmática, umbilical o inguinal; diástasis de los rectos

Aparece en el 25-50% (*) y en <25% (+) de los pacientes.

3.2. FRECUENCIA DE APARICION.

La frecuencia del S.A.F. depende de muchos factores, entre los que cabe destacar: el reconocimiento de este nuevo síndrome por los clínicos, la realización de historias clínicas detalladas de las madres (especialmente en lo que respecta al consumo de alcohol), así como diferencias en el consumo de bebidas alcohólicas en cada país, y dentro de éstos, variación según las regiones, razas, etc.

Todos estos factores hacen que la frecuencia del S.A.F. varíe enormemente de unas estadísticas a otras, siendo los valores más altos de 1/100 recién nacidos vivos [1] y los más bajos de 1/2.500 [237]. Aunque en España no existe ningún estudio epidemiológico completo, se han dado cifras de 1/500 recién nacidos vivos [33].

Recientemente se ha realizado un estudio en el que se recoge la mayoría de las estadísticas publicadas. En él se estima que la incidencia media del S.A.F. en países occidentales es de 1,9/1.000 nacimientos [9], llegándose a la conclusión de que este síndrome es la principal causa conocida de retraso mental en el mundo occidental, aventajando incluso a las que eran consideradas más frecuentes, como son el síndrome de Down y los defectos de cierre del tubo neural, cuyas frecuencias son de 1,25 y 1/1.000, respectivamente [8].

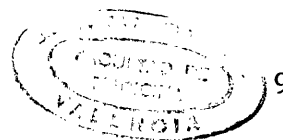
3.3. FACTORES DE RIESGO.

En base a los numerosos trabajos aparecidos en los últimos años, actualmente es un hecho establecido que el alcohol es un teratógeno y que su consumo durante el embarazo es el responsable del desarrollo del S.A.F. y F.A.E.

Sin embargo, al igual que otros teratógenos, el etanol no ejerce un efecto uniforme y constante en los descendientes de mujeres que han consumido alcohol durante la gestación. Esto se debe a que existen una serie de factores que predisponen o favorecen la aparición de las distintas alteraciones y en diferentes grados de intensidad. Los principales factores, considerados de alto riesgo, se enumeran a continuación.

3.3.1. DOSIS DE ALCOHOL.

En base a los estudios realizados, parece ser que la dosis de alcohol es uno de los factores de más alto riesgo. Aunque no ha sido fijada la cantidad mínima diaria de



etanol que produce efectos adversos en la descendencia, sí se puede hablar de una relación dosis-efecto, como puede observarse en el siguiente esquema (tomado de [93]), en el que se expresa el riesgo de aparición de E.F.A./S.A.F. según el consumo de etanol absoluto (en g/día):

g/día:	0	24	48	70	95	118
riesgo:	bajo	10%	20%	30-50%	75%	

A dosis bajas de etanol (<20 g/día) no se encuentran efectos o, en general, son muy ligeros [43,91,251], mientras que dosis altas (>50 g/día) ya se considera un riesgo importante, con aparición de numerosas afecciones [37,43,121,251].

3.3.2. PERIODOS CRITICOS DE EXPOSICION.

Uno de los períodos más vulnerables a la acción teratogénica del alcohol parece ser el primer trimestre de embarazo, en particular entre las semanas 4ª y 10ª, que corresponde al período de embriogénesis [55,217]. Durante este período el alcohol, como otros teratógenos, puede actuar produciendo graves malformaciones funcionales o morfológicas en todos los sistemas del organismo, que pueden dar lugar a abortos espontáneos.

Sin embargo, para el sistema nervioso central se pueden distinguir tres períodos críticos [47,217]. En humanos, el primer período, en el que se forma el tubo neural, coincide con el citado anteriormente (embriogénesis). En el segundo se produce la diferenciación y migración celular, y se corresponde con el 2º trimestre del embarazo. En el último período crítico se produce un crecimiento muy rápido del cerebro ("brain growth spurt") con gran desarrollo de células gliales, mielinización y conexiones neurales, comenzando a mitad del 2º trimestre y concluyendo al final del 2º año de vida.

3.3.3. SUSCEPTIBILIDAD GENETICA.

Existen diferencias individuales y raciales en la velocidad de eliminación del etanol y sus metabolitos, de manera que cuanto mayor sea la capacidad materna de eliminarlos, menor será el tiempo de exposición fetal y por tanto menor riesgo de aparición de malformaciones. Esta variación en la velocidad de eliminación depende fundamentalmente de los niveles de las enzimas que metabolizan

el etanol, así como de las características de éstas que posea cada individuo, como se verá más adelante (apartado 4.1.).

Además de la susceptibilidad genética materna hay que considerar la fetal [245], ya que varios estudios han comprobado que gemelos tanto univitelinos como bivitelinos pueden presentar diferente afectación tras la exposición prenatal al alcohol [34,35,58,227].

3.3.4. NUTRICION.

El alcohol provoca una malnutrición primaria ya que, aunque su completa oxidación genera 7,1 cal/g [273], éstas son "calorías vacías" puesto que carece de minerales, proteínas y vitaminas. También provoca malnutrición secundaria por interferencia con los procesos de absorción, metabolización y eliminación de otros nutrientes [99,160].

Sin embargo, la desnutrición "per se", ni siquiera en las condiciones de severa inanición [235], da lugar a la aparición de las malformaciones que aparecen en el S.A.F. Por otra parte, se ha visto que el alcohol produce tanto una alteración en el transporte de nutrientes a través de la barrera placentaria [62,236], como una inhibición directa sobre el crecimiento embrionario "in vitro" [32].

Por todo ello se puede concluir que la malnutrición materna (tanto primaria como secundaria), es un factor de riesgo que puede potenciar el efecto del etanol sobre el retraso en el crecimiento de los tejidos fetales [5,62].

3.3.5. CONSUMO DE OTRAS DROGAS.

El abuso en el consumo de tabaco, café y otras drogas (heroína, metadona, LSD, dolantina, barbitúricos, etc.), frecuentemente va unido a la ingesta de alcohol. Su uso durante el embarazo se ha asociado con efectos adversos en la descendencia, tales como retraso de crecimiento, aumento de abortos espontáneos y de la mortalidad perinatal, alteraciones en el comportamiento y aparición de algunas malformaciones [20,25,63].

Sin embargo, el patrón de malformaciones es diferente al que aparece en los niños con S.A.F., por lo que se ha sugerido que la asociación de estas drogas con el alcohol, potenciaría la acción teratogénica de éste [149,237].

3.3.6. ESTADIO DE LA ENFERMEDAD ALCOHOLICA MATERNA.

La enfermedad alcohólica materna no se había considerado como factor de riesgo hasta hace 4 ó 5 años; sin embargo, actualmente se piensa que puede ser otro de los factores de más alto riesgo, incluso mayor que la dosis de alcohol ingerida, para la aparición del S.A.F. [146]. De hecho, aunque se ha observado que la incidencia de niños con S.A.F. es mayor en hijos de madres alcohólicas crónicas (25/1.000 nacimientos) que en la población general [237], actualmente hay evidencias que apoyan la existencia de una correlación directa entre la gravedad de las manifestaciones en los niños con S.A.F. y la fase del alcoholismo materno [146,231].

Por otra parte, algunos autores han observado que cuando una mujer alcohólica crónica se abstiene de beber alcohol durante la gestación, tiene un hijo que, aunque no presenta síntomas del S.A.F., puede tener una disminución de peso al nacer [121,140,247], por lo que debe haber algún cambio fisiológico en los grandes consumidores de alcohol que no revierte inmediatamente tras la suspensión de la ingesta alcohólica [245].

Por tanto, parece ser que la gravedad de la enfermedad alcohólica materna influye tanto sobre la frecuencia de aparición del cuadro completo del S.A.F. como en la gravedad de las manifestaciones [146].

3.3.7. FACTORES SOCIOECONOMICOS.

Aunque se han encontrado niños con S.A.F. en todas las clases sociales, algunos autores han asociado una mayor frecuencia entre las clases sociales más bajas, con algún factor de riesgo asociado al estado socioeconómico [45,244]. Esto se debe a que este factor engloba a otros muchos como son la raza, edad, número de hijos, recursos económicos, cuidado obstétrico, etc., así como la nutrición, consumo de otros tóxicos o salud materna ya mencionados, los cuales se asocian con mayor frecuencia en las clases sociales más bajas, potenciando en mayor o menor grado la acción teratogénica del etanol [4,5].

4. METABOLISMO DEL ETANOL. AGENTE CAUSAL DEL S.A.F.: ¿ALCOHOL O ACETALDEHIDO?.

4.1. METABOLISMO DEL ETANOL.

El etanol se absorbe por difusión a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, alcanzando los niveles máximos en sangre entre los 20 y 120 min [266] con unos valores de 20-30 mM tras una ingesta moderada de alcohol, y a más de 60 mM tras grandes dosis [92]. Una vez absorbido, se distribuye por todos los tejidos, proporcionalmente a su contenido en agua [53].

El estudio del metabolismo del alcohol es de gran importancia puesto que la duración y extensión de sus efectos tóxicos van a depender de su metabolismo. En condiciones normales se metaboliza a una velocidad de 2,6-3,2 mmoles/Kg/h, siendo el hígado el principal órgano responsable de ello (2 mmoles/min). Otros órganos participan en menor medida a su metabolización, y el 10-15% de lo absorbido es eliminado sin ser metabolizado por la respiración, sudor y orina [127].

En el hígado, el etanol es oxidado a acetaldehído y éste a acetato; parte del acetato se metaboliza en el propio hígado dando CO₂ y agua, o es convertido en otros metabolitos intermediarios como cuerpos cetónicos o ácidos grasos; el resto del acetato se vierte al torrente sanguíneo y se transforma igualmente en CO₂ y agua en otros tejidos. En condiciones normales, tras la ingesta de alcohol se elevan los niveles sanguíneos de acetaldehído a ≈2 μM [182] y de acetato a ≈2 mM [248].

4.1.1. SISTEMAS ENZIMATICOS DE OXIDACION DEL ETANOL.

Los sistemas enzimáticos capaces de oxidar etanol a acetaldehído son tres:

4.1.1.1. ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH).

La ADH es una enzima citosólica que, aunque no tiene gran especificidad de sustrato, oxida la mayor parte de etanol, en individuos no alcohólicos y cuando la concentración no excede de 20 mM [15]. Cataliza la siguiente reacción:

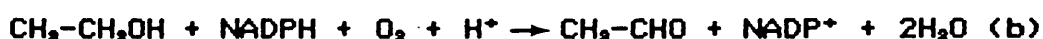


Esta enzima es una proteína de peso molecular de 80 KD, constituida por dos cadenas polipeptídicas iguales o ligeramente diferentes, que poseen 2 átomos de zinc cada una [180]. Su pH óptimo de actuación es de 10, teniendo una K_m para el etanol de 2 mM y de 27 μ M para el NAD [137]. Es específicamente inhibida por el pirazol y sus análogos, y utiliza como cofactor el NAD(H) preferentemente al NADP(H).

Ciertas variaciones genéticas, en determinados individuos y grupos raciales, determinan la presencia de isoenzimas que tienen unas propiedades diferentes a la ADH "típica", como la afinidad para los sustratos, pH óptimo de actuación, etc., lo que da lugar a grandes diferencias en el metabolismo del etanol en estos individuos [29, 267].

4.1.1.2. SISTEMA MICROSOMAL DE OXIDACION DEL ETANOL (MEOS).

Este sistema se encuentra en el retículo endoplásmico liso y cataliza la siguiente reacción [128,131]:



Además del etanol, este sistema es capaz de metabolizar otras drogas así como otros alcoholes. Presenta una K_m de 10 mM para el etanol y de 8 μ M para el O_2 . Su pH óptimo de actuación es de 7,4, utiliza NADPH como cofactor y no es inhibido por el pirazol [131].

Cuando la concentración de etanol es baja, el MEOS contribuye muy poco a su oxidación, pero al ir aumentando dicha concentración la reoxidación del NADH es un factor limitante para la acción de la ADH [266], por lo que el etanol alcanza unos niveles a los que este sistema de alta K_m es operativo, participando en esas condiciones en un porcentaje muy elevado ($\approx 40\%$) a la oxidación del etanol [131,250].

4.1.1.3. SISTEMA CATALASA.

El tercer sistema capaz de catalizar la oxidación de etanol a acetaldehído es el catalasa-peroxidativo [112]. Este sistema, que está localizado en peroxisomas, en presencia de un donante de hidrógenos como el etanol, cataliza la siguiente reacción:



Aunque su K_m para el etanol es bajo (0,6 mM), su función está limitada a la reducida producción de H_2O_2 [30]; además, no todo el H_2O_2 formado se utiliza para la oxidación de etanol. Por tanto, la contribución de este sistema al metabolismo del etanol representa sólo un 2-5% en condiciones normales [131], pudiendo aumentar cuando la producción de H_2O_2 (por la NADPH oxidasa) está aumentada, como ocurre al aumentar la concentración de etanol y en alcohólicos crónicos [254].

4.1.2. OXIDACION DEL ACETALDEHIDO.

Después de que el alcohol es oxidado a acetaldehído, éste es oxidado a acetato por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), mediante la siguiente reacción irreversible:



Esta enzima, que actúa con gran variedad de sustratos, se encuentra en muchos tejidos, pero es en el hígado, como ocurría con la ADH, donde es predominante [127], siendo responsable de la metabolización de $\approx 95\%$ del acetaldehído producido.

El hígado humano posee dos enzimas ALDH principales [73]: una localizada en el citosol, con un peso molecular de 245 KD, y una K_m de 100 μM para el acetaldehído y de 8 μM para el NAD; la otra enzima se encuentra en las mitocondrias, tiene un peso molecular de 225 KD, y una K_m para el acetaldehído de 2 μM y de 70 μM para el NAD.

Durante la oxidación del etanol, la concentración hepática de acetaldehído es del orden micromolar, por lo que sólo la ALDH de baja K_m (la mitocondrial) parece desempeñar un papel importante en la oxidación del acetaldehído "in vivo" [127].

La ALDH es una proteína que posee grupos tioles en su centro activo, siendo inhibida por el hidrato de cloral, cianamida y disulfirán. Este último se utiliza en pacientes alcohólicos como "terapia de aversión", ya que se une a grupos -SH de la enzima, provocando una pérdida de su actividad en $\approx 85-90\%$ [127].

Esta enzima también presenta diferencias individuales y raciales, lo que da lugar a variaciones en la meta-

bolización del acetaldehído. Por ejemplo, se ha encontrado que $\approx 50\%$ de la población oriental posee una mutación en la ALDH de baja K_m que la hace prácticamente inactiva; en consecuencia, en dichos individuos se acumulará el acetaldehído en sangre tras el consumo de etanol (34 μM frente a 2 μM de sujetos normales), lo que provoca una intolerancia al alcohol [67,161].

4.2. ALTERACIONES DEBIDAS AL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL.

El consumo crónico de alcohol da lugar a cambios adaptativos en el organismo, con la finalidad de mantener una situación lo más próxima posible a la normalidad en presencia del alcohol. Estos cambios conllevan a la tolerancia y dependencia al etanol, que se atribuyen a:

- cambios adaptativos del sistema nervioso central, por los que estos sujetos son capaces de ingerir dosis elevadas de etanol sin experimentar síntomas tóxicos (tolerancia celular), pero que a la vez necesitan de ciertos niveles de etanol para su normal funcionamiento (dependencia física) [80];
- adaptación metabólica que les permite metabolizar más rápidamente el etanol (tolerancia metabólica) [139].

La tolerancia metabólica da lugar a que el hígado metabolice el alcohol más rápidamente (hasta 8,6 mmoles/Kg/h) [269], por lo que los alcohólicos crónicos presentan unos niveles en sangre más elevados de los metabolitos procedentes del alcohol, es decir, de acetaldehído [139] y de acetato [117]. La tolerancia metabólica parece ser debida principalmente a una inducción del sistema microsomal MEOS (b) observada tras ingestas crónicas de alcohol [131], produciéndose paralelamente una proliferación del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos [101].

Otro efecto íntimamente unido al anterior es el aumento del consumo metabólico de oxígeno, debido al incremento de la actividad del MEOS; las oxidaciones por él catalizadas producen energía que se convierte en calor sin conservación de energía química. Si este calor excede las necesidades térmicas fisiológicas, dará lugar a una pérdida de energía, que aumentará más cuanto mayor sea la actividad del MEOS [134].

Muchos de los efectos patógenos del etanol se deben a las alteraciones metabólicas producidas por la continua actuación de las enzimas ADH y ALDH: la excesiva producción de NADH con la subsiguiente depleción de NAD^+ . Al alterarse el cociente NADH/NAD^+ varía el estado redox

celular, produciéndose un desplazamiento en el equilibrio de muchas reacciones metabólicas que requieren NADH (ver revisiones [129,130]).

Por último, hay que considerar la toxicidad propia del acetaldehído, que es un compuesto muy reactivo, capaz de producir efectos tóxicos por sí mismo. Este metabolito es capaz de unirse a grupos amino y sulfidrilos, tanto de la hemoglobina [240] como de ciertas enzimas produciendo una inactivación de éstas [155]. Al mismo tiempo y por el mismo mecanismo, disminuye los niveles de glutatión [78,263] y altera ciertos orgánulos celulares, incluidas las mitocondrias, que son las responsables de su metabolismo [101,153,154]. Todos los efectos tóxicos del acetaldehído estarán exacerbados en los alcohólicos crónicos ya que, como se ha dicho anteriormente, tienen niveles muy elevados de dicho metabolito.

4.3. AGENTE ETIOLOGICO DEL S.A.F.: ¿ALCOHOL O ACETALDEHIDO?.

El etanol se difunde rápidamente a todos los tejidos y compartimentos del organismo, incluyendo feto, placenta y líquido amniótico. Los niveles de alcohol en el feto son iguales o incluso superiores a los maternos [7,92,169], ya que ni el hígado fetal ni la placenta poseen prácticamente actividad de las enzimas capaces de metabolizar el etanol [181,234], actuando el líquido amniótico como reservorio.

La mayoría de los estudios realizados sobre el S.A.F. implican al etanol como el factor etiológico principal. Sin embargo, el acetaldehído también podría estar implicado. De hecho se sabe que el acetaldehído es mucho más tóxico que el etanol, siendo a concentraciones bajas citotóxico, mutagénico y teratogénico [172,261,262]. Además se ha podido demostrar que el acetaldehído también es capaz de atravesar la barrera placentaria [31,83,219], pudiendo por tanto ejercer efectos tóxicos directamente sobre el feto en crecimiento. Por otra parte, la administración de acetaldehído a animales gestantes produce unos efectos fetales similares a los producidos por el alcohol [175].

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos llegar a la conclusión de que, aunque el etanol pueda ser el principal agente responsable de la aparición del S.A.F., el acetaldehído debe ser considerado como factor de riesgo importante en los efectos fetotóxicos de este síndrome. Además, como se ha reiterado, el riesgo será mayor en determinadas situaciones, tales como alcoholismo crónico o en personas que tienen alguna alteración o mutación en

las enzimas que metabolizan el alcohol, en las que los niveles de acetaldehído se encuentran muy elevados.

5. ALTERACIONES HEPATICAS DEBIDAS A LA EXPOSICION PRENATAL AL ALCOHOL.

El hígado es uno de los órganos más afectados por el consumo crónico de alcohol, produciéndose en él graves alteraciones fisiológicas, bioquímicas y ultraestructurales (ver revisiones [129,130,174]). Sin embargo, no hay muchos trabajos que hayan estudiado los posibles daños hepáticos producidos por la exposición prenatal al alcohol. El hígado fetal difiere del adulto en muchos aspectos tales como el estado de diferenciación, capacidad metabólica, utilización y aporte de sustancias, respuesta a drogas, etc.; debido a estas diferencias cabe suponer que el alcohol no produzca exactamente los mismos efectos en el hígado en desarrollo que en el adulto.

Se han descrito pocos casos de niños con S.A.F. que hayan presentado alteraciones fisiológicas o histopatológicas hepáticas de importancia [50,89,122,162,168]. Aunque la patogenia de dichas alteraciones no se conoce exactamente, se ha sugerido que al menos algunas de ellas, como los depósitos grasos y la fibrosis, sí podrían producirse por un mecanismo similar al de la enfermedad hepática alcohólica del adulto.

Igualmente son escasos los trabajos realizados en animales experimentales para estudiar el efecto del etanol sobre el hígado en desarrollo. Entre estos estudios cabe destacar los de Rawat [197], que encontró en los hígados fetales y neonatales de rata prenatalmente expuestos al alcohol una inhibición de la síntesis proteica, así como una disminución en el contenido de ARN y de proteína ribosomal, y una alteración de la relación ADN/ARN. Estudios posteriores del mismo laboratorio encontraron alteraciones en la biosíntesis de lípidos [199] y en el metabolismo de drogas en el hígado [194]. Otros estudios encontraron también alteraciones en el metabolismo hepático de lípidos [145,214].

Análisis ultraestructurales de hígados de ratones y mini-cerdos expuestos prenatalmente al alcohol permitieron observar necrosis celular, infiltración grasa y alteraciones en las mitocondrias, retículo endoplásmico liso y gránulos de glucógeno de los hepatocitos [11,207-209].

En nuestro laboratorio también hemos encontrado que los hígados de ratas descendientes de madres alcohólicas presentaban, junto a un menor peso hepático [82,225],

unos cambios cualitativos y cuantitativos en mitocondrias, aparato de Golgi y distribución de glucógeno, encontrándose residuos en forma de mielina en el citoplasma [201]. También se encontraron alteraciones en diferentes parámetros estereológicos (volumen absoluto, densidad de superficie, número de orgánulos y densidad numérica) de varios orgánulos hepatocitarios como mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico liso, etc. [201], así como una disminución en la actividad de varias fosfatasas marcadoras de orgánulos celulares [202]. Hay que destacar que, entre todos los orgánulos hepatocitarios estudiados, el que presentaba las alteraciones más llamativas fué el aparato de Golgi, en el que se encontró tanto una desorganización del mismo, como una disminución de la actividad de varias enzimas marcadoras de las zonas "cis" y "trans" [203]. Esta última alteración podría explicar una modificación en una de las funciones más importantes de este orgánulo, como es la glicosilación de proteínas de secreción.

Por otra parte se sabe que el hígado no es homogéneo, sino que presenta una heterogeneidad ultraestructural, bioquímica y funcional a lo largo del acino [87], el cual Rappaport [195] dividió en tres regiones funcionales: zona 1, centrilobulillar o periportal, zona 2 o intermedia, y zona 3 o perivenosa.

Diversos estudios histopatológicos han encontrado que el consumo crónico de alcohol no afectaba a todos los hepatocitos por igual, sino que las lesiones se inician en la zona perivenosa y se van extendiendo a las contiguas [102,166,184].

Hay que destacar sin embargo que, si son pocos los trabajos en los que separan los hepatocitos de las diferentes zonas del acino hepático en animales que consumían crónicamente alcohol [259,260], son nulos los referentes a dicha separación en animales en desarrollo, controles o expuestos al alcohol. La separación de las distintas subpoblaciones de hepatocitos podría ayudar a la mejor comprensión y caracterización bioquímica y morfológica de las lesiones iniciales que pueda producir el alcohol en las diferentes zonas del acino hepático.

6. ALTERACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEBIDAS A LA EXPOSICION PRENATAL AL ETANOL.

Una de las afecciones más importantes y frecuentes que aparecen tras la exposición prenatal al alcohol, son las alteraciones que se producen a nivel del sistema nervioso central (S.N.C.), que dan lugar a disfunciones tan-

to intelectuales como neurológicas, incluso en ausencia de otras manifestaciones de S.A.F.

Muchos de estos niños presentan al nacer signos de privación alcohólica semejantes a los del "delirium tremens" del adulto, incluyendo hiperactividad, exudación, contracciones, etc. [3]. Durante las primeras semanas o meses de vida los niños con S.A.F. son irritables, temblorosos, con pobre reflejo de succión, aparentemente hipersensibles al sonido, con dificultades en la alimentación y con frecuentes ataques [92,244]. Durante la infancia muestran ligeras alteraciones en la función cerebral e hipotonía, siendo niños hiperactivos, distraídos, atrevidos, impulsivos, con retraso en el desarrollo motor (tanto en los movimientos finos como en los gruesos), y en más del 85% de los casos con un retraso mental superior a 2 D.S. por debajo de la media [37], lo que constituye uno de los problemas más graves asociados al consumo materno de alcohol durante la gestación.

Aunque la patogenia de estas alteraciones se desconoce, estudios neuropatológicos de cerebros de niños con S.A.F. [36,105,176,280] han demostrado la existencia de fallos o interrupciones en las migraciones neuronales y gliales, displasias cerebelares y grupos de células heterotópicas, especialmente en la corteza cerebral. Igualmente se han encontrado microcefalia, anencefalia [37, 39], hidrocefalia si las malformaciones interfieren con la dinámica del fluido cerebroespinal, y defectos de cierre del tubo neural, tales como mielomeningocele [69].

Hay que destacar que el grado de afección intelectual parece correlacionarse con la gravedad de las malformaciones y con el déficit en el crecimiento [242]. Igualmente es importante destacar que, aunque muchos niños prenatalmente expuestos a bajos niveles de etanol que no presentan ni las malformaciones ni el retraso en el crecimiento típicos del S.A.F., sí pueden presentar alteraciones psicológicas y de comportamiento, como son problemas de aprendizaje y atención, déficit de lenguaje y habla, problemas escolares, etc. [243].

Para dilucidar la patogenia de estas alteraciones se han realizado gran cantidad de estudios en animales experimentales, tratando de reproducir tanto las disfunciones neurológicas como las alteraciones en la morfología del S.N.C., que aparecen en niños prenatalmente expuestos al alcohol.

En estos animales se ha encontrado muchas anomalías en el comportamiento, similares a las descritas en niños con S.A.F., como por ejemplo: hiperactividad [6], alteraciones en los reflejos [38,206], en el desarrollo motor

[170] y en la conducta [125,268], y deficiencias en el aprendizaje [150,205].

En estudios morfológicos de los cerebros de dichos animales se han observado alteraciones similares a las descritas en niños con S.A.F., como menor desarrollo de cerebro y cerebelo [116,167,179], y gran cantidad de alteraciones morfológicas en diversas partes del S.N.C., las cuales, en algunos casos, dependen del período en el que el animal ha sido expuesto al alcohol. Entre éstos citaremos: anomalías en la migración celular [158,159], pérdida de células [178] y disminución de su número [19] y tamaño [239]; alteraciones en las células piramidales del hipocampo [275], en el desarrollo sináptico de las células del cerebelo [265], en las dendritas [204,241], así como modificaciones en la mielinización [204], y defectos en el tubo neural [72].

En nuestro laboratorio hemos encontrado que las ratas expuestas prenatalmente al etanol mostraban algunas alteraciones en el cerebro tales como menor desarrollo de dicho órgano [77,82,224], disminución del contenido de ADN y de proteínas [224], así como de la actividad de varias enzimas ligadas a membranas sinápticas de las células neurales, medido tanto en homogenado de cerebro entero [77,79,82,222] como en neuronas y astrocitos aislados de dichos cerebros [81]. Estas últimas alteraciones podrían ser indicativas de un menor desarrollo de las prolongaciones celulares y de sus conexiones, que son fundamentales para la función del sistema nervioso. También se han encontrado alteraciones hormonales que pueden ser la expresión de una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario [57,77,186]. Además, hay que destacar que tanto la disminución del peso cerebral como las de las actividades de las enzimas ligadas a las membranas, se mantuvieron en el animal adulto, lo que parece demostrar que son alteraciones irreversibles.

Sin embargo hay que tener en cuenta que estas alteraciones se encontraron en estudios realizados "in vivo", y por tanto es difícil separar: a) las lesiones que produce el alcohol directamente de las que puede ocasionar indirectamente a través de alteraciones hormonales, nutritivas, etc.; y b) el efecto del etanol sobre diferentes tipos de células nerviosas (por ejemplo, neuronas y células gliales). Por tanto, para conocer el efecto directo del etanol sobre el crecimiento y desarrollo de diferentes tipos de células neurales por separado, sería conveniente realizar estudios paralelos a nivel celular, investigando el grado de afectación de cada uno de ellos.

7. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS.

7.1. MODELO ANIMAL.

Desde que se describió el S.A.F., numerosos investigadores han tratado de reproducir este síndrome en animales experimentales, para tratar de conocer los mecanismos implicados en el efecto teratogénico del alcohol.

Los estudios con animales experimentales tienen la ventaja, entre otras, de poder controlar muchos de los factores de riesgo que predisponen a la aparición del S.A.F., que son difícilmente desligables en humanos de los efectos tóxicos directos del etanol, tales como: salud materna, uso de otras drogas, situaciones de stress, edad, número de hijos, etc., permitiendo que sólo el etanol actúe como teratógeno. A la vez, se puede controlar la malnutrición primaria producida por la restricción de comida que suele acompañar a la ingesta de alcohol; esto se consigue introduciendo un grupo de control nutricional, el cual recibe diariamente las mismas calorías totales que ingiere el grupo de animales tratados con alcohol, sustituyendo las calorías que proporciona el alcohol por carbohidratos. A este grupo de animales se le denomina normalmente "pair fed" o de alimentación paralela. Para estudiar un posible factor de restricción de comida y bebida del grupo "pair fed", muchos investigadores introducen un tercer grupo de animales, a los que se les administra comida y bebida "ad libitum". De esta forma se pueden separar las alteraciones producidas por el alcohol "per se" de las debidas a la restricción de alimentos nutritivos.

Aunque las primeras experiencias en animales se realizaron en embriones de pollo, los animales con desarrollo intrauterino son los modelos más apropiados para reproducir los efectos tóxicos que el etanol produce en el feto humano. Los primates serían los animales ideales de elección, por su proximidad en la escala zoológica al hombre, pero no son muy utilizados debido a su elevado coste y lentitud de trabajo. Los roedores (rata y ratón) son los elegidos con mayor frecuencia, pues debido a su corto período de gestación (21-22 días) y al elevado número de crías por camada (10-12 crías), pueden obtenerse resultados en períodos de tiempo corto. Además, por su tamaño pequeño permite un manejo fácil y no se requiere animalarios demasiado sofisticados ni costosos.

Una de las mayores dificultades que surgen al trabajar con animales es su aversión por el etanol. Por esta razón se ha ideado diferentes rutas y formas de administración de esta droga, como son intubación, inclusión en

el agua de bebida o en dieta líquida, inyecciones intraperitoneales, subcutáneas o intravenosas, inhalación de vapores, etc. Las ventajas e inconvenientes de cada método han sido ampliamente debatidas [2,218].

Otra variable a tener en cuenta es el tiempo de exposición del animal al etanol. A veces se administra durante uno o varios días, dentro de un determinado período crítico, o a lo largo de un período de tiempo equivalente al 1º, 2º o 3º trimestre de embarazo humano; también es frecuente que la exposición comprenda toda la fase gestacional e incluso la lactancia, pudiendo o no haber administrado etanol anteriormente a la preñez, durante un período de tiempo más o menos largo.

Nosotros hemos utilizado ratas descendientes de hembras alcohólicas, cuyo período de exposición al alcohol ha sido toda la gestación y lactancia, suministrado a los animales mediante dietas líquidas. Una de las características de este modelo es que las madres son "alcohólicas" ya antes de la gestación, presentando tolerancia y dependencia [76,80,148,226], lo que se acerca más a los humanos, ya que los casos de niños con S.A.F. completo sólo se han descrito en hijos de mujeres alcohólicas crónicas [39]. Por otro lado, el consumo de alcohol durante la gestación y lactancia ha dado lugar a la reproducción, en las crías de estos animales, de una serie de alteraciones similares a las aparecidas en niños con S.A.F., como alteraciones en el crecimiento [77,82,218,224,225], hormonales [56,57,77,82,185,186] y otras [221,222], además de las alteraciones en los hígados y cerebros mencionadas anteriormente.

7.2. MODELO DE CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS NERVIOSAS.

Durante los últimos 25 años, los estudios "in vitro" sobre células en cultivo se han convertido en un complemento necesario de los trabajos realizados "in vivo" en animales, especialmente en estudios relativos a citotoxicidad, por las ventajas que ofrecen:

- Posibilidad de aislar y mantener en cultivo un solo tipo celular, lo que permite comparar la sensibilidad y respuesta de células de origen y naturaleza diferentes a un agente tóxico.
- El aislamiento de células a partir de un organismo permite controlar el entorno, eliminando factores endocrinos, inmunitarios y nerviosos que podrían dificultar el estudio de la acción específica del agente tóxico.

- El agente tóxico está en contacto directo con las células cultivadas, tanto si éstas crecen en monocapa como si lo hacen en suspensión.
- La homogeneidad de la suspensión celular, a partir de la cual son repartidas en cápsulas de cultivo, permite un estudio comparativo del efecto de una sustancia a diferentes concentraciones, tiempo de exposición, variaciones en el medio, etc.

Por otra parte, algunos procedimientos son difícilmente aplicables "in vivo", como la observación directa de la célula viva, estudios simultáneos de las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células, etc.

Además de todas estas ventajas, en particular los cultivos primarios, que son los obtenidos directamente de células, tejidos u órganos de organismos vivos, y que no han sido subcultivados, presentan un patrón de desarrollo "in vitro" comparable con el de las células "in vivo" [144]. Los cultivos primarios con mayor éxito son los obtenidos de fetos o de animales recién nacidos, puesto que entonces han cesado los movimientos morfogenéticos y prácticamente ya ha aparecido el número total de células precursoras, las cuales son suficientemente potentes y al mismo tiempo flexibles y maleables para acomodarse en el nuevo entorno y continuar su desarrollo [165]. La validez de este modelo ha sido probada con gran número de estudios [61,96].

Con respecto al sistema nervioso central hay que considerar que, aunque es muy heterogéneo de unas regiones a otras y el desarrollo de cada tipo celular es asincrónico, se puede aplicar un esquema general de crecimiento [44]:

- 1º Organogénesis y multiplicación neuronal.
- 2º Gran crecimiento cerebral, con crecimiento dendrítico y axonal, multiplicación glial, mielinización y crecimiento de tamaño.
- 3º Maduración.

Centrándonos en las células gliales, hay que señalar que los astrocitos tienen una función primordial tanto durante el desarrollo cerebral como en el cerebro adulto (ver por ejemplo [23,177,238]). Sus células precursoras, los astroblastos, empiezan a aparecer en fases muy iniciales del desarrollo embrionario, poco después de la aparición de los primeros precursores neuronales (Fig. 2, tomada de [17]), pero a diferencia de éstos, su prolife-

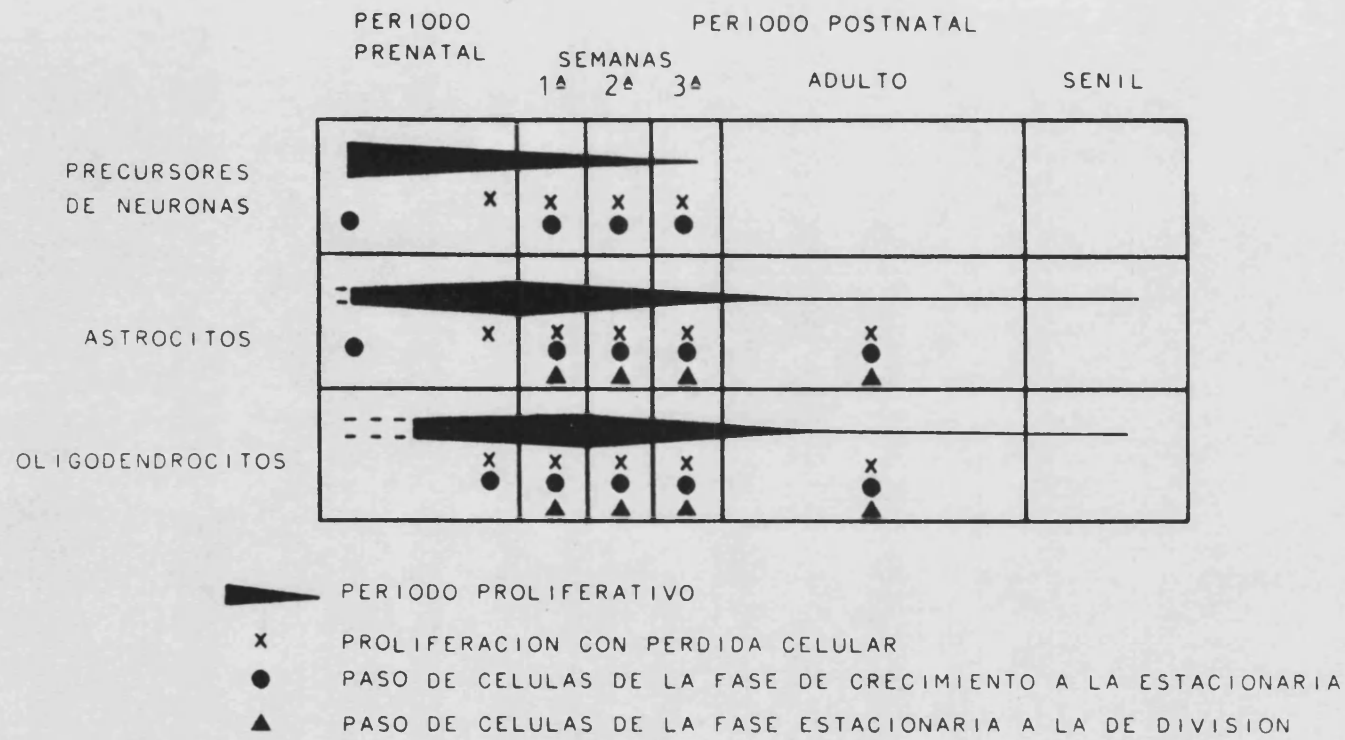
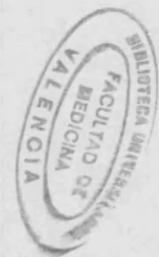


Figura 2. Esquema del período de proliferación de diferentes tipos celulares del cerebro de rata, durante los períodos pre- y postnatales de la ontogénesis (tomado de [17]).



ración continua durante un período de tiempo más largo [17,40], siendo los astrocitos las células encargadas de la reparación y regeneración del tejido nervioso lesionado en el cerebro adulto. Durante el desarrollo cerebral las células radiales gliales, precursoras de astrocitos, forman un enrejado a lo largo del cual se desplazan los neuroblastos en migración [191,192]. Además, los astrocitos regulan la concentración extracelular de Na^+ y K^+ , intervienen en el metabolismo de neurotransmisores y segregan sustancias similares al factor de crecimiento nervioso (NGF ("neural growth factor")) [23]. En el cerebro adulto desempeñan un papel crucial en la regulación de las funciones sinápticas neuronales y del entorno iónico; sus procesos ("pies chupadores") rodean tanto los capilares como las sinapsis, forman las capas subpial y subependimaria, y parece que envuelven toda la superficie neuronal no cubierta por otras neuronas o por membranas de oligodendroglía [113].

Los inconvenientes de cultivar este tipo de células son básicamente técnicos, ya que hay que partir de cerebros de fetos, a los que hay que diseccionar una parte de cerebro (corteza cerebral, hipocampo, etc.); además, hay un riesgo de contaminación por otros tipos de células, tanto nerviosas como conjuntivas, lo que exige una serie de precauciones y el control continuo de los cultivos. Por último, dado que el medio de cultivo es rico en nutrientes, existe un elevado riesgo de contaminación por hongos, agravado porque se mantiene en ambiente cálido y húmedo.

8.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.

Indudablemente el esclarecimiento de los mecanismos implicados a nivel básico en la etiopatogenia del Síndrome Alcohólico Fetal constituye un tema difícil de abordar en humanos. Por esta razón se ha tratado de reproducir dicho síndrome en animales experimentales. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental en la rata en el que se reproducen muchas de las características que se observan en niños afectados con dicho síndrome. Sin embargo, es difícil esclarecer "in vivo" los mecanismos básicos de actuación del alcohol. Por tanto hemos pretendido estudiar en este trabajo el efecto del etanol a nivel de células aisladas de hígado y cerebro de animales en desarrollo, puesto que es en estos órganos donde hemos encontrado las alteraciones más marcadas.

Basándonos en resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio, donde encontramos una disminución de peso hepático así como marcadas alteraciones morfológicas, principalmente a nivel del aparato de Golgi, en hígados de fetos de rata prenatalmente expuestos al alcohol, decidimos abordar los siguientes objetivos:

- 1º Desarrollar un procedimiento para aislar hepatocitos de ratas fetales y neonatales.
- 2º Estudiar la síntesis y glicosilación de proteínas en hepatocitos aislados de fetos controles y expuestos al alcohol mediante métodos bioquímicos y autorradiográficos.

Basados en el hecho de que la hepatotoxicidad del etanol en el adulto se inicia en la zona perivenosa del acino hepático, y para estudiar si esta selectividad ocurría también en hígados en desarrollo expuestos al alcohol, nos planteamos:

- 3º Desarrollar un procedimiento que nos permitiera separar diferentes subpoblaciones hepatocitarias, caracterizando especialmente los de las zonas periportal y perivenosa del acino hepático. El aislamiento de dichas subpoblaciones es un requisito necesario para poder analizar sus características simultáneamente por métodos bioquímicos, citofluorimétricos y ultraestructurales.

- 40 Mediante este procedimiento se ha pretendido investigar si las lesiones observadas en hígado entero, de animales expuestos al alcohol, se localizan preferentemente en una u otra zona.

Por otra parte, uno de los órganos más afectados por la exposición al etanol durante su desarrollo es el sistema nervioso central. Sin embargo es difícil estudiar el efecto directo del alcohol "in vivo", por la complejidad de dicho sistema y por los efectos que se asocian al consumo de alcohol, tales como alteraciones nutritivas, hormonales, etc. Por esta razón hemos recurrido al cultivo primario de células nerviosas, eligiendo los astrocitos ya que no existen estudios sobre el efecto del alcohol sobre estas células, y sin embargo se ha especulado que algunas alteraciones del desarrollo de las neuronas podrían ser consecuencia de anomalías de las células gliales. Por tanto los objetivos de este trabajo han sido:

- 10 Caracterización de estos cultivos mediante la evaluación global de la proliferación y diferenciación de dichas células a lo largo de 28 días de cultivo. Esto se realizó a través de: a) cuantificación del contenido de proteínas y ADN así como de síntesis de dichas macromoléculas y ARN; b) medida de las actividades de enzimas marcadoras de astrocitos y ligadas a membranas plasmáticas; y c) morfología de las células en cultivo.
- 20 Efecto del alcohol "in vitro" sobre el crecimiento y maduración de astrocitos de ratas controles, utilizando dosis comparables a una intoxicación en humanos crónica (25 mM) o aguda (100 mM).
- 30 Características de los astrocitos obtenidos de cerebros de fetos expuestos prenatalmente al alcohol y cultivados en presencia o ausencia de etanol. Este último sistema permitiría analizar si la exposición prenatal al alcohol afecta a las células precursoras de los astrocitos, y lo que ocurriría si éstas siguen expuestas a dicha sustancia durante el desarrollo equivalente al período postnatal "in vivo".

**MATERIALES
Y METODOS**

1. MATERIALES.

1.1. ANIMALES

En todas las experiencias se utilizaron ratas hembras vírgenes de raza Wistar, con un peso inicial de 175-200 g. Los machos utilizados para cruzarlas eran de la misma raza.

Todos los animales se obtuvieron de la casa Alin (Madrid), manteniéndose bajo condiciones constantes de temperatura (23°C), humedad (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12 h). Las ratas no se utilizaron hasta después de una semana de aclimatación a las condiciones del animalario.

1.2. DIETAS UTILIZADAS.

DIETAS LIQUIDAS.

Se utilizó dieta líquida basada en la formulada por Lieber y DeCarli [132,133]. La dieta alcohólica contenía 36% de las calorías totales como etanol, el 18% como proteínas, el 21% como grasas, y el 25% como hidratos de carbono (Dieta I, Tabla 3). En la dieta control, el 36% de las calorías procedentes del etanol se sustituyeron por hidratos de carbono, de manera que constituían el 61% de las calorías totales (Tabla 3). Además, estas dietas estaban suplementadas con zinc.

La dieta que consumían las ratas lactantes fue la misma, pero se aumentó el contenido proteico en forma de caseína (Dieta II, Tabla 3). El aporte calórico de esta dieta alcohólica fue: proteínas el 25%, grasas el 16%, hidratos de carbono el 31% y etanol el 28%. En la dieta control, los hidratos de carbono representaban el 59%.

TABLA 3. Contenido de las dietas (g/l).

	Dieta I		Dieta II	
	Control	Etanol	Control	Etanol
Leche (a)	138	138	89	89
L-Cisteína	0,65	0,65	0,65	0,65
DL-Metionina	0,4	0,4	0,4	0,4
Aceite de maíz	0,54	0,54	2,07	2,07
Aceite de oliva	1,8	1,8	2,16	2,16
Etil linoleato	0,15	0,15	-	-
Dextrina	42,48	-	88,50	30,36
Maltosa	10,62	-	22,00	7,59
Sacarosa	36,52	-	-	-
Mezcla de vitaminas (b)	4	4	4	4
Mezcla de sales (c)	10	10	10	10
Carragenato sódico	2	2	2	2
Cloruro de zinc	0,013	0,013	0,013	0,013
Agar	1,75	2,12	2	2
Caseína	-	-	30,9	30,9
Etanol (96°)	-	50	-	40
Agua hasta 1 litro				

(a) Se utiliza la leche en polvo semidescremada, comercializada por Central Lechera Asturiana. Su composición es la siguiente: 15% materia grasa, 45% lactosa, 30% proteínas.

(b) La mezcla de vitaminas se obtuvo de la casa I.C.N. Nutritional Biochemical. La composición (en mg/Kg) es la siguiente: Concentrado de vitamina A (200.000 U/g), 4,5. Concentrado de vitamina D (400.000 U/g), 0,25. Alfa tocoferol, 5. Acido ascórbico, 45. Inositol, 5. Clorhidrato de colina, 75. Menadiona, 2,25. Acido p-aminobenzoico, 5. Niacina, 4,5. Riboflavina, 1. Piridoxina-ClH, 1. Pantotenato cálcico, 3. Acido fólico, 0,09. Biotina, 0,02. Vitamina B-12, 0,135.

(c) La mezcla de sales o minerales fué la Sal Hegsted, obtenida por I.C.N. Nutritional Biochemical, cuya composición (en %) es la siguiente: Carbonato cálcico, 29,974. Fosfato bipotásico, 32,22. Fosfato monocálcico, 7,49. Sulfato magnésico, 10,19. Cloruro sódico, 16,76. Citrato férrico, 2,74. Yoduro potásico, 0,079. Sulfato de manganeso, 0,49. Sulfato de cobre, 0,029. Cloruro de zinc, 0,024.

DIETA SOLIDA.

Se utilizó pienso compuesto para animales de laboratorio (Panlab A.04, Barcelona) especial para ratas y ratones. Esta dieta contenía un 22% de las calorías totales como proteínas, un 9% como grasas y un 69% como hidratos de carbono. Los animales recibieron comida y agua "ad libitum".

Los machos utilizados para cruzar a las hembras recibieron siempre esta dieta.

GRUPOS DE ANIMALES SEGUN SU ALIMENTACION.

Según la dieta que recibieron, los animales se dividieron en:

- grupo alcohólico: recibieron como alimento la dieta líquida alcohólica;
- grupo control "pair fed" o paralelamente alimentado: recibieron como alimento la dieta líquida control, en una cantidad restringida a la consumida por el grupo de animales alcohólicos.
- grupo control "ad lib": recibieron dieta sólida y agua "ad libitum".

Para evitar el posible deterioro de las dietas líquidas, éstas se almacenaron en cámaras refrigeradas a 4°C y se prepararon en pequeñas cantidades frecuentemente (cada 3 ó 4 días). La comida se administró a los animales en bebederos de vidrio graduados, especiales para dieta líquida, en los que se puede determinar la cantidad ingerida diariamente por cada animal. La dieta se administró a los animales diariamente, evitando así el posible crecimiento de microorganismos, evaporaciones de alcohol u otras alteraciones que pudieran ocurrir. A todas las dietas líquidas se les añadió unas gotas de sacarina (110 mg/l) para mejorar su sabor.

1.3. APARATOS.

ESPECTROFOTOMETROS

- Zeiss PM6, con fuente de hidrógeno y tungsteno, monocromadores de prisma, cambiador automático de cubetas, portacubetas termostatzado mediante el uso de un baño circulante, y registrador gráfico (BBC

- Goerz, Servogor 210).
- Pye Unicam SP-500 para ultravioleta visible e infrarrojos próximo.
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer 512, con doble haz.

CENTRIFUGAS

- Heraus Christ GMBH con rotores para tubos y botellas.
- Microcentrífugas Eppendorf 5412 y 5414, para microtubos cónicos desechables de plástico.
- Jouan CR 4 11 con rotores para tubos y botellas, y con control de temperatura.

MICROSCOPIOS

- Carl Zeiss M.P.M. II, con condensador para contraste de fases.
- Zeiss de fluorescencia con dispositivo Epi iluminación.
- Electrónico Philips modelo ME-300, manejado a 60 KV.

BALANZAS

- Mettler H 54 AR, sensibilidad 0,01 mg.
- Mettler PR 700, sensibilidad 0,01 g.
- Mettler PE 2000.

OTROS

- Citofluorímetro de flujo EPICS V (Coulter Electronics, Inc.), con laser de argón sintonizado a 488 nm y 250 mW.
- Cromatógrafo de gases con doble canal Perkin-Elmer, modelo Sigma 3B, con espacio de cabeza para gases volátiles y toma automática de muestras, modelo HS-6, provisto de un integrador Perkin-Elmer Sigma 15. Se empleó una columna Teknokroma, 15% carbowex 1510, 80/100.
- PHmetro Standard PH M 62.
- Baño con agitación y temperaturas regulables, Grant SS40.
- Congeladores: Super A C-50NR-12; Koxka ANE-85 350.
- Estufas: Memmert Tv27u; Heraeus, estufa de carbónico.
- Homogeneizador: Ultra-turrax tipo TP 18/10.
- Ultrastainer LKB 2168.
- Densi-Flow II C gradient former, Buchle Instruments.
- Ultramicrotomo LKB.
- Contador de centelleo líquido Intertechnique SL-4200.
- Bombas de vacío, secadores de aire, relojes eléctricos, cronómetros y demás material comúnmente usado en un laboratorio de investigación científica.



1.4. REACTIVOS Y PRODUCTOS.

Todos los productos utilizados se obtuvieron de: Boehringer-Mannheim, Sigma Chemical Company, Merck Darmstadt, I.C.N. Nutritional Biochemical, Pharmacia y Abelló Oxígeno-Linde S.A. Los productos radiactivos se obtuvieron de Amersham International (Inglaterra).

2. METODOS

2.1. MANIPULACION DE LOS ANIMALES.

2.1.1. PROCEDIMIENTO DE ALCOHOLIZACION MEDIANTE DIETA LIQUIDA. UTILIZACION DE CONTROLES ISOCALORICOS "PAIR FED".

Aunque existen muchos procedimientos para alcoholizar a los animales, se ha comprobado que uno de los más completos y eficaces es mediante la utilización de dietas líquidas. Este procedimiento consiste en introducir el alcohol en una mezcla de elementos esenciales (proteínas, vitaminas, minerales incluido Zn, etc.) de forma que el animal, al mismo tiempo que ingiere el alcohol, toma los demás nutrientes, eliminando así la desnutrición que normalmente acompaña al consumo de alcohol. Al mismo tiempo, con este procedimiento se puede conseguir niveles constantes de alcohol en sangre, similares a los que se presentan en humanos.

En general, puesto que los animales suelen tener una aversión espontánea al alcohol, éste se introduce en la dieta de forma gradual, durante un período de adaptación de 7-8 días. La pauta seguida durante este período fué la siguiente: los primeros 3 ó 4 días la dieta contenía una concentración de alcohol del 3% (p/v), los 3 ó 4 días siguientes del 4%, y posteriormente ya se incluyó la concentración final deseada del 5% (Dieta I), que se mantuvo durante todo el tratamiento. Este período de adaptación no se tomó en cuenta en ninguno de los experimentos realizados.

En general, las ratas se mantuvieron durante 4 ó 5 semanas con dieta alcohólica, transcurridas las cuales los animales eran tolerantes y dependientes al alcohol, mostrando síntomas de abstinencia si se les retiraba dicha dieta [76,80,148].

Otra de las ventajas de la utilización de la dieta líquida es la posibilidad de realizar controles isocalóricos (las calorías del etanol se sustituyen por carbohidratos) y "pair fed" o paralelamente alimentados (mediante la administración de la misma cantidad de comida/Kg peso/día que ingiere el grupo alcohólico). Los animales alimentados con esta dieta control se mantuvieron durante un período de tiempo similar al del grupo alcohólico, durante el cual se acostumbraron a beber mediante este nuevo sistema así como al nuevo sabor de la dieta.

2.1.2. EXPOSICION PRENATAL AL ALCOHOL.

Después de 4 ó 5 semanas de tratamiento, las hembras alimentadas con dieta líquida (alcohólica y control) así como otras que consumían dieta sólida y agua "ad lib", se cruzaron con los machos. Tras confirmar la gestación, mediante la presencia de espermatozoides en el lavado vaginal (día 0 de gestación), las ratas se mantuvieron con sus correspondientes dietas durante los ≈ 21 días de gestación, en jaulas separadas.

La cantidad de dieta líquida consumida fué de ≈ 75 ml/día, consiguiéndose unos niveles de alcohol en sangre de ≈ 20 mM [218,224], que son similares a los encontrados en mujeres alcohólicas embarazadas [92]. Además, estos niveles son los requeridos en el estudio de la toxicidad del alcohol en modelos animales [2,28,244].

Algunas hembras preñadas de cada uno de los 3 grupos (alcohólico, "pair fed" y control "ad lib") se destinaron a las experiencias realizadas con fetos de 21 días. Ese día se sacrificaron los animales (decapitándolos mediante guillotina), abriéndoles rápidamente la cavidad abdominal y localizando el útero grávido. Inmediatamente se separaron los fetos, de los que se extrajo el cerebro o el hígado, dependiendo del experimento que se iba a realizar. Con el fin de evitar variaciones de la estructura hepatocitaria debidas a los ritmos circadianos [86], las ratas se sacrificaron siempre a las 8:30 horas.

Las restantes hembras preñadas que no se sacrificaron llevaron a término su gestación, siendo estrictamente vigiladas durante los días 21 a 23 para controlar la fecha exacta del nacimiento de las crías (día 0 de lactancia).

2.1.3. EXPOSICION POSTNATAL AL ALCOHOL.

El número de crías por camada se mantuvo constante a 8-10, sacrificándose el resto el día del nacimiento. Las crías se mantuvieron con sus respectivas madres hasta que fueron sacrificadas a los 12 días de lactancia.

Las madres siguieron alimentándose con sus correspondientes dietas (alcohólica, "pair fed" o control "ad lib"), aunque la composición de la dieta líquida varió ligeramente (Dieta II) debido a los mayores requerimientos proteicos durante este período. Igual que ocurrió durante la gestación, el grupo "pair fed" recibió una cantidad de dieta restringida o equivalente a la del grupo alcohólico. Durante la lactancia, las madres consumieron alrededor de 120 ml/día, lo que conseguía que

las madres alcohólicas tuvieran una alcoholemia de ≈ 30 mM, mientras que la de sus crías fue de $\approx 0,25$ mM [225].

A los 12 días de lactancia se decapitaron varias crías de cada camada (a las 8:30 horas) abriéndoles rápidamente la cavidad abdominal para obtener el hígado. Debido al menor peso de los hígados de las ratas tratadas con alcohol [225], se mató mayor número de crías (5-6) que en el caso de los controles (4-5), para obtener un mismo peso final de hígado (3-4 g).

2.2. AISLAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES.

2.2.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

Para el aislamiento de hepatocitos se siguió el procedimiento de Lorenzo y cols. [141] con algunas modificaciones.

Se partió de 3-4 g de hígado que se obtuvieron de 4-6 ratas de 12 días de edad, o de 9-12 fetos de 21 días, cuyas madres eran controles o tratadas con alcohol. Los hígados se lavaron en la solución A (en mM: NaHCO_3 , 23,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2; NaCl , 119,2; KCl , 4,5; KH_2PO_4 , 1,2; EGTA, 0,5), se trocearon y se incubaron en 15 ml de la misma solución durante 30 min con la finalidad de eliminar la sangre. Todos los procesos de incubación se realizaron en un baño de agitación a 37°C , estando las células constantemente oxigenadas con carbógeno (O_2/CO_2 , 95%/5%).

Transcurridos los 30 min, la suspensión celular se centrifugó a $35 \times g$ durante 2 min; el precipitado se resuspendió en 15 ml de solución B (solución salina de Krebs-Henseleit: solución A sin EGTA, con CaCl_2 , 2,5 mM) que contenía 7,5 mg de colagenasa (Boehringer) y se incubó durante 60 min. Pasado este tiempo la suspensión se filtró por una malla Nitex con poros de 500 y 90 μm de tamaño, para eliminar los agregados celulares; se centrifugó a $35 \times g$ durante 2 min y el precipitado se resuspendió en diferentes medios, dependiendo del experimento a realizar. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente.

2.2.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ASTROCITOS.

Los cultivos primarios de astrocitos se realizaron según una técnica basada en la descrita por Hertz y cols. [98] y Sensenbrenner y cols. [232]. Se utilizaron ratas preñadas de 21 días, controles o tratadas con alcohol,

empleándose para cada cultivo todos los cerebros de la camada de una sola rata.

Todo el proceso que se describe a continuación se realizó en condiciones estériles. Luego de decapitar a la rata se sacaron los fetos, los cuales a su vez fueron decapitados para extraer sus hemisferios cerebrales. Se separaron cuidadosamente los bulbos olfatorios, hipocampo, ganglios basales y meninges. Los hemisferios se lavaron en medio de cultivo completo que contenía 20% de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Tabla 4); se disgregaron mediante aspiración, primero con una pipeta de 10 ml y luego con una pipeta Pasteur, y la suspensión resultante se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 1 min para destruir las neuronas presentes. La suspensión celular se filtró a través de una malla Nitex con poros de 80 μ m de tamaño (para eliminar capilares sanguíneos y agregados celulares), resuspendiéndose en el medio completo, en una proporción de 15 ml/cerebro. Se sedimentó en placas de cultivo de 2 cm de diámetro, con una capacidad de 2 ml/placa, lo que equivale a 7,5 placas/cerebro.

A algunas de estas placas se les añadió etanol al medio de cultivo para obtener una concentración final de 25 ó 100 mM; estos niveles son similares a los encontrados en sangre de alcohólicos crónicos, o tras una intoxicación aguda moderada de alcohol, respectivamente, tanto en humanos como en animales experimentales.

Las placas con la suspensión celular se incubaron en una estufa húmeda de CO₂/aire (5%/95%) a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 3 ó 4 días por medio nuevo, el cual contenía una concentración de sustratos variable, según la edad del cultivo (Tabla 4).

El crecimiento de astrocitos se controló tanto bioquímica como morfológicamente, tomando muestras a diferentes días de cultivo, el cual se mantuvo normalmente durante 28 días. Durante este período se analizó tanto el crecimiento como la maduración celular.

TABLA 4. Medio utilizado para el cultivo de astrocitos (para 1 l).

	semanas		
	1ª	2ª	3ªy4ª
SBF inactivado (57° C/30 min) (ml)	200	100	100
D-glucosa (g)	4,42	-	-
Bicarbonato sódico (g)	3,7	3,7	3,7
Fungizona (mg)	10	10	10
Antibióticos:			
penicilina (U)	1000	1000	1000
estreptomina (mg)	1	1	1
Medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco) (g)	10	10	10

El pH del medio se ajustó a 6,9 con HCl, filtrándose luego a través de Millipore 0,2 µm. Los antibióticos y el SBF se añadieron luego de filtrar el medio, en el momento de utilizarlo.

2.3. ESTUDIO DE LOS HEPATOCITOS.

2.3.1. SINTESIS DE PROTEINAS.

Para el estudio de la síntesis de proteínas se utilizó el aminoácido leucina, marcado radiactivamente con tritio. La incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente en las células permite estudiar tanto la cantidad como los lugares de síntesis y vías de migración de las proteínas en el interior de las células. Esto se puede estudiar tanto por métodos bioquímicos como autorradiográficos.

Según el método autorradiográfico, la radiactividad retenida en las células se debe, en un 91-97%, al aminoácido marcado unido a proteínas [49]. El orgánulo que aparece marcado en tiempos cortos de incorporación corresponde con el lugar de la síntesis de las proteínas, y los lugares en los que aparecen durante las subsiguientes desmarcas, representan distintas etapas de la migración de las proteínas ya sintetizadas.

Para estudiar la síntesis de proteínas de los hepatocitos "in vitro", se utilizaron fetos de 21 días de gestación, de madres controles o tratadas con etanol, de los que se obtuvieron 3-4 g de hígado.

Una vez aisladas las células y obtenido el precipitado de hepatocitos, se resuspendieron en 15 ml de MEM, 2mM glutamina, BSA al 1% (pH 7,4 a 37°C), filtrándose la suspensión celular por sucesivas mallas Nitex con poros de 90 y 60 μ m.

Las células se contaron y diluyeron a una concentración de 10^6 células/ml de medio, añadiéndose 1 μ Ci/ml de 3 H-4-5-L-leucina (actividad específica de 52 Ci/mmol) e incubándose durante 5 ó 60 min. La suspensión celular se mantuvo constantemente oxigenada con carbógeno y en un baño de agitación a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación la suspensión de hepatocitos se centrifugó a 45 x g (temperatura ambiente) durante 2 min. El precipitado se resuspendió en MEM que contenía 100 μ g/ml de leucina y BSA al 1%, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar al máximo la 3 H-leucina no incorporada por las células. Por último, el precipitado se resuspendió en el mismo medio.

A los 0, 15, 30, 60 y 90 min de incubación en medio sin isótopo (tiempos de desmarca), se centrifugó una alícuota de 1 ml de la suspensión celular (10^6 células) a

8.000 x g durante 5 min (4°C). El precipitado se lavó dos veces con TCA al 5%, resuspendiéndose el precipitado final en 0,25 ml de KOH 0,2 M, midiéndose por último la concentración de proteínas.

La radiactividad se determinó en el sobrenadante así como en el precipitado final de cada uno de los tiempos de desmarca.

Para el estudio de la síntesis de proteínas mediante autorradiografía, se siguió el método anterior pero incubando la suspensión de hepatocitos con 200 μ Ci/ml con la misma 3 H-leucina durante 5 min. Se hicieron las desmarcas a los 0, 15, 30 y 60 min, centrifugando en las mismas condiciones, y el precipitado final se procesó para su estudio ultraestructural. Se utilizó el precursor a dosis tan altas porque la autorradiografía es mucho menos sensible que el método anterior, pero tiene la ventaja de localizar dentro de la célula las proteínas sintetizadas, a lo largo de todo el proceso.

2.3.2. SINTESIS DE GLICOPROTEINAS.

Las glicoproteínas, que constituyen la inmensa mayoría de las proteínas celulares, son cadenas polipeptídicas a lo largo de las cuales se insertan cadenas de oligosacáridos y en cuya síntesis intervienen varios orgánulos celulares.

Los esqueletos polipeptídicos se sintetizan en los polisomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso (RER). El primer paso de glicosilación se realiza en el interior del RER donde, a todas las cadenas polipeptídicas destinadas al aparato de Golgi, se le añade la misma molécula de oligosacáridos (que contiene 14 moléculas de azúcar, 9 de las cuales son manosa). Después de perder 4 moléculas de azúcar (incluida 1 de manosa) en el mismo RER, son transferidas a la zona "cis" del aparato de Golgi. Una vez allí, cada glicoproteína sufrirá unas transformaciones diferentes, dependiendo de su destino: las destinadas a los lisosomas reciben grupos fosfato sin perder más moléculas de azúcar, mientras que las glicoproteínas destinadas a secreción y las destinadas a la membrana plasmática, pierden la mayoría de sus manosas, a la vez que ganan ácido siálico, galactosa y N-acetilglucosamina, principalmente en la zona "trans" del aparato de Golgi [212].

Para el estudio de la glicosilación de proteínas se utilizaron precursores marcados con tritio, eligiéndose un azúcar que es incorporado en los primeros pasos de la glicosilación, la manosa, y otro que se incorpora al

final del proceso, la galactosa, como se ha comentado anteriormente. Utilizamos hepatocitos aislados de fetos de 21 días, de madres controles o tratadas con alcohol.

La suspensión de hepatocitos aislados (10^6 células/ml) se incubó con 1 μ Ci/ml de 3 H-manosa ó 1,2 μ Ci/ml de 3 H-galactosa (actividad específica de 9,4 y 6,9 Ci/mmol, respectivamente). Después de una incubación de 5 min la suspensión celular se centrifugó a $45 \times g$ a temperatura ambiente durante 2 min; el precipitado se resuspendió en MEM con BSA al 1% que contenía 5 mM de manosa y 10 mM de piruvato sódico, ó 5 mM de galactosa, según se hubiese incorporado 3 H-manosa o 3 H-galactosa, respectivamente. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar al máximo los azúcares radiactivos no incorporados por las células, resuspendiéndose de nuevo en sus respectivos medios.

A los 0, 15, 60 y 180 min de desmarca se tomó 1 ml (10^6 células) de la suspensión celular, centrifugándose a $8.000 \times g$ (4°C) durante 5 min. El precipitado se lavó 2 veces con TCA al 5%, resuspendiéndose el precipitado final en 0,25 ml de KOH 0,2 M, donde se midió la concentración de proteínas.

La radiactividad se determinó en el sobrenadante así como en el precipitado final de cada uno de los tiempos de desmarca.

Para el estudio de la glicosilación de proteínas mediante autorradiografía, se siguió el método anterior pero incubando los hepatocitos durante 5 min con 100 ó 120 μ Ci/ml con las mismas 3 H-manosa o 3 H-galactosa, respectivamente. Se realizaron desmarcas de 0, 15, 60 y 180 min, centrifugando en las mismas condiciones, y procesando el precipitado final de hepatocitos para su estudio ultraestructural. La justificación del uso de dosis tan altas para el estudio de la síntesis de glicoproteínas por medio de autorradiografías, queda reflejada en el apartado 2.3.1.

2.3.3. SEPARACION DE SUBPOBLACIONES HEPATOCITARIAS POR GRADIENTE DE DENSIDAD.

Para el estudio de las subpoblaciones de hepatocitos se utilizaron ratas de 12 días de edad postnatal, ya que los hepatocitos no presentan heterogeneidad metabólica hasta esa edad [109,111].

Una vez aislados los hepatocitos y obtenido el precipitado celular, se resuspendió en la solución C (solución A con BSA al 1%, ver apartado 2.2.1.) y se filtró

por sucesivas mallas Nitex con poros de 90 y 60 μm . Para eliminar las células muertas se añadió 0,15 mg/ml de tripsina y 0,10 mg/ml de DNAasa, agitándose dicha suspensión celular durante 2 min, transcurridos los cuales se añadió 0,3 mg/ml de un inhibidor de la tripsina (tipo I, Sigma) para detener el proceso. Las células se centrifugaron a 35 x g durante 2 min, resuspendiéndose el precipitado celular en 15 ml de solución A y filtrándose por una malla Nitex con poros de 35 μm . Durante todo el proceso se mantuvo la oxigenación con carbógeno.

De la suspensión obtenida se tomaron alícuotas para medir la viabilidad y el número de células, así como diversos parámetros bioquímicos y análisis con el citofluorímetro de flujo. El resto se utilizó para la separación de subpoblaciones hepatocitarias en gradiente de densidad.

Dicho gradiente de densidad se confeccionó diluyendo Percoll (Pharmacia) en agua hasta conseguir diferentes soluciones cuyas densidades, a 22°C, eran: 1,077, 1,086, 1,089, 1,095, 1,101, 1,107, 1,112 y 1,119 g/cm³; todas estas soluciones contenían una concentración final de 0,15 M NaCl y BSA al 1%. Se preparó un gradiente discontinuo depositando sucesivamente 1,5 ml de las soluciones de Percoll, de mayor a menor densidad, en 6 tubos silicónados, usando para ello un formador de gradientes. Sobre éstos se depositaron 2,2 ml de suspensión de hepatocitos (4×10^6 células/ml) y se centrifugó a 600 x g a 12°C durante 20 min (Fig. 3). Transcurrido este tiempo se recolectaron las diferentes bandas celulares mediante aspiración, uniéndose las células de la misma banda de los 6 tubos centrifugados.

Para eliminar el Percoll, cada fracción celular se diluyó en la solución C, centrifugándose a continuación a 425 x g (12°C) durante 15 min. Esta operación se repitió dos veces. En el último precipitado de cada fracción aislada se determinó la viabilidad celular, se realizó un análisis con el citofluorímetro de flujo, y a continuación se dividieron en dos partes cada uno de los precipitados; una parte se utilizó para medir actividades enzimáticas y la otra se fijó con glutaraldehído para los estudios ultraestructurales.

La viabilidad celular se determinó por el test de exclusión de azul tripán. La preservación de los hepatocitos se confirmó tanto por microscopía de contraste de fases como por secciones semifinas (2 μm).

Para realizar los análisis enzimáticos se centrifugaron las distintas fracciones celulares a 425 x g (12°C) durante 15 min. Los precipitados resultantes se resus-

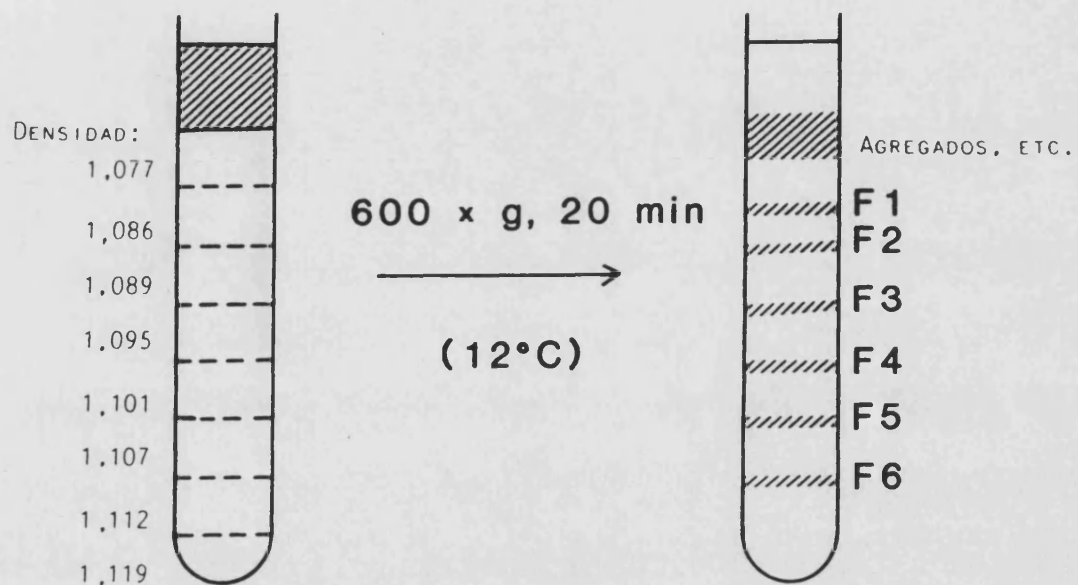


Figura 3. Separación en subpoblaciones de los hepatocitos aislados de ratas de 12 días. Se depositaron 2,2 ml de 4×10^6 células/ml sobre un gradiente discontinuo de soluciones de Percoll, de densidades entre 1,077 y 1,119. Tras centrifugar a $600 \times g$ durante 20 min (a $12^\circ C$) se obtuvieron 6 subpoblaciones celulares que se repitieron en todos los experimentos.

pendieron en tampón 10 mM HEPES que contenía Tritón X-100 al 1%, y se congelaron a -80°C . Al día siguiente se descongelaron y congelaron 3 veces y se homogeneizaron para romper al máximo las células. Los análisis enzimáticos se realizaron tomando alícuotas de estos homogenados.

2.3.4. METODO UTILIZADO PARA ANALISIS ULTRAESTRUCTURALES.

2.3.4.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Todas las muestras que iban a ser objeto de estudio ultraestructural se lavaron 3 veces en tampón BSA al 1%, centrifugándose a $90 \times g$ durante 15 min cada vez. Los precipitados se fijaron a 4°C con glutaraldehído al 1% y formaldehído al 0,7% en tampón cacodilato 0,05 M (pH 7,4 a 4°C , 2 mM CaCl_2 , osmolaridad 300 mOsm).

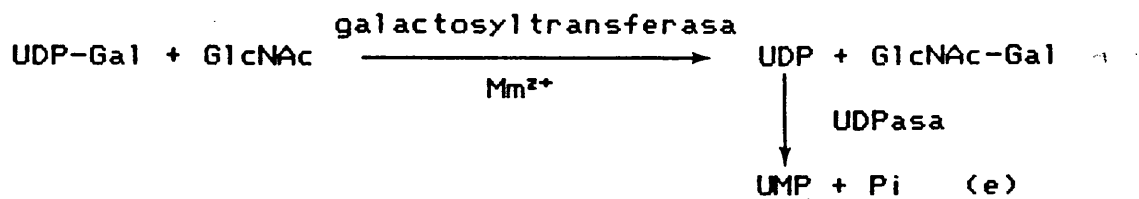
Después de 15 min los sedimentos celulares se despegaron y se fijaron otros 15 min con fijador nuevo. A continuación se cortó cada sedimento en unos 30 bloques pequeños (de $\approx 1 \text{ mm}^3$). De cada grupo de bloques se eligieron 8 al azar, los cuales se fijaron en el mismo fijador a 4°C durante 30 min; a continuación se lavaron con tampón cacodilato a 4°C durante 2 h y posteriormente se fijaron con una solución de OsO_4 al 0,2% y ferrocianuro potásico al 0,8%, manteniéndose en oscuridad y a temperatura ambiente durante 3 h.

Transcurrido este tiempo se lavaron con el tampón cacodilato y se tifieron en bloque con una solución acuosa de acetato de uranilo al 0,5%, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente se deshidrataron por pases sucesivos en acetona de concentración creciente y se incluyeron en resina Vestopal.

Para los estudios estereológicos se siguieron métodos estándar [41,274]. Para ello se eligieron al azar 3 bloques de cada grupo de 8 de cada experimento. De cada bloque se hicieron 4 secciones ultrafinas con el ultramicrotomo (color de interferencia, plata) a intervalos iguales, no inferiores a $200 \mu\text{m}$.

2.3.4.2. TECNICA DE CITOQUIMICA.

Para la demostración citoquímica de la UDPasa, que es un marcador específico de la zona "trans" del aparato de Golgi, se siguió la técnica descrita por Renau-Piqueras y cols. [203]. La UDPasa cataliza la siguiente reacción:



El Pi se detecta con el cloruro de cerio (CeCl₃).

Las muestras se fijaron a 4°C con glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato (pH 7,2), que contenía sacarosa al 5%. Después de 15 min se cortaron en unos 15 bloques pequeños. De cada grupo de bloques se eligieron 6 al azar, los cuales se fijaron con la solución de glutaraldehído durante 45 min; a continuación se lavaron 3 veces en un tampón de reacción apropiado y se introdujeron en el mismo tampón que contenía DMSO al 10%. Después de 60 min, se congelaron con isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se obtuvieron secciones de 20 μm.

Las secciones se preincubaron a 37°C en medio sin sustrato durante 60 min. A continuación se ensayó la actividad enzimática mediante la inmersión de las secciones en la solución adecuada, que contenía iones de cerio como agente de captura. Las muestras se incubaron a 37°C en un baño de agitación durante 90 min (cambiando el medio a los 45 min). La reacción se detuvo lavando las secciones en tampón cacodilato y a continuación se volvió a fijar con glutaraldehído frío. Las muestras se fijaron en OsO₄ al 2% que contenía KFe(CN)₆ al 0,8%, tificando en bloque con acetato de uranilo acuoso al 1%, se deshidrató con acetona, y se incluyeron en Poly-Bed-812.

Finalmente, para el tratamiento de tetróxido de osmio, que se deposita específicamente en la zona "cis" del aparato de Golgi, las muestras de hepatocitos se incubaron en OsO₄ al 2% sin tamponar, a 40°C durante 24 h. A continuación se incubaron nuevamente en OsO₄ fresco al 2%, a 40°C durante otras 24 h, se lavaron en agua, se trataron con acetato de uranilo al 0,5% durante 90 min, se deshidrataron en pases sucesivos de alcohol, y se incluyeron en Poly/Bed-812.

2.3.4.3. TÉCNICA DE AUTORRADIOGRAFÍA.

Las secciones que iban a ser objeto de autorradiografías se procesaron siguiendo técnicas estándar [152].

Estas secciones, de espesor entre 900 y 1.200 Å (color de interferencia, oro) se colocaron sobre portaobjetos de vidrio que habían sido previamente recubiertos

de celoidina, y se contrastaron con solución acuosa de acetato de uranilo al 5% durante 1 h. Todo el proceso que se describe a continuación se realizó en oscuridad. Se introdujeron los portaobjetos con las secciones en emulsión fotográfica durante unos segundos y se dejaron secar. A continuación se almacenaron en cajas con atmósfera seca y al abrigo de la luz, dejando las secciones 4-6 semanas a 4°C.

Transcurrido este tiempo las muestras se revelaron y fijaron según métodos autorradiográficos estándar [152]. Una vez fijadas, se procedió al desprendimiento de la película de celoidina con las secciones, para colocarlas sobre rejillas.

2.3.4.4. ESTUDIO DE LAS MICROGRAFIAS.

Todas las secciones, tanto las que habían sido objeto de autorradiografías como las que no, se montaron sobre rejillas de cobre (malla de 200) cubiertas con carbono, y se tificaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Se hicieron micrografías a dos niveles de ampliación, utilizando el sistema de muestreo de cuadrados alineados. El nivel I ($\times 9.576$) se utilizó para analizar células, citoplasma y núcleo. El nivel II ($\times 20.520$) para el estudio de mitocondrias, lisosomas, glucógeno, retículo endoplásmico rugoso y liso (RER y REL), aparato de Golgi, vacuolas lipídicas y peroxisomas. Tanto el proceso de obtención de las micrografías como su análisis se hizo siguiendo sistemas estandarizados [41,201,274].

El tamaño mínimo de la muestra para cada parámetro se determinó mediante la técnica de las medias progresivas (límite de confianza $\pm 5\%$) [279]. Puesto que no se detectaron diferencias significativas (análisis de la varianza, $p \leq 0,05$) entre las diferentes muestras de cada grupo, los resultados se expresan como la media \pm S.D. por grupo (alcohólico o control).

El estudio estereológico de las muestras que habían sido objeto del estudio citoquímico de la UDPasa y OsO_4 , se realizó según Renau-Piqueras y cols. [203], usando un sistema Leitz ASM para análisis semiautomático de imágenes. La densidad de volumen (Vv) del aparato de Golgi se determinó en los hepatocitos fijados con glutaraldehído-formaldehído y una fijación posterior con osmio reducido; dicho orgánulo se estudió especialmente para analizar su preservación morfológica a lo largo de los tiempos de desmarca.

El estudio de las muestras procesadas para análisis de actividad citoquímica se realizó utilizando una plantilla de doble cuadrícula (relación 1:9) y la fórmula: $V_{vi} = P_i/P_t$. La densidad de volumen de los depósitos sobre el aparato de Golgi así como de aquellos aparatos de Golgi que contenían producto de reacción se estimó superponiendo la plantilla a cada micrografía y contando los puntos sobre los depósitos (P_i) o sobre el aparato de Golgi (P'_i). P_i y P'_i se dividieron entre el total de puntos sobre el citoplasma del hepatocito (P_t). Los resultados se expresaron como la relación entre la V_v de los depósitos y la V_v del aparato de Golgi que contenía dichos depósitos. Se consideraron todos los depósitos, sin tener en consideración su densidad electrónica.

2.3.4.5. ESTUDIO DE AUTORADIOGRAMAS.

Se contó el número de marcas que había sobre citoplasma, membrana plasmática, RER y aparato de Golgi, según los círculos de probabilidad del 95%. El número total de marcas por célula osciló entre 250 y 450.

La distribución de las marcas así obtenidas no da una imagen exacta de la distribución de la radiactividad en estas estructuras celulares, ya que el RER y el aparato de Golgi se encuentran distribuidos al azar por el citoplasma de células secretoras, como hepatocitos, y por tanto pueden contarse falsas marcas que también se distribuyen al azar por toda la célula. Por ello se calculó la "distribución corregida de marcas" o "relación de concentraciones", que consiste en referir el número de marcas sobre cada subestructura, al área relativa que ocupa dicha estructura en el citoplasma [277]. Cuando dicha relación da un valor inferior a la unidad, no se considera significativa.

2.4. ESTUDIO DE LOS CULTIVOS DE ASTROCITOS.

2.4.1. PUREZA DE LOS CULTIVOS.

Para estudiar la pureza de los cultivos se determinó la presencia de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) considerada como marcador específico de astrocitos [27,52].

Se tomaron placas en las que, antes de sembrar las células, se había puesto una laminilla de cristal, para que las células crecieran sobre ella. El cultivo se trató con acetona a -20°C durante 10 min, para permeabilizar y

fijar las células. A continuación las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (1:10, Boehringer) durante 60 min a 37°C; se lavaron con PBS y se incubaron nuevamente durante otra hora a 37°C con anti-IgG de ratón obtenida de cabra (1:100, Sigma), que estaba conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Pasado este tiempo las laminillas se montaron con PBS:glicerol (1:1) y se observaron al microscopio de fluorescencia.

2.4.2. SINTESIS DE PROTEINAS.

La justificación del uso de este método queda expresado en el apartado 2.3.1.

Para estudiar la síntesis de proteínas en astrocitos, se tomaron placas a diferentes días de cultivo. Las células se lavaron durante 10 min con medio Eagle sin leucina, 20 mM HEPES, y a continuación se incubaron durante 60 min con el mismo medio que contenía 5 μ Ci de 3 H-4-5-L-leucina (actividad específica de 63 Ci/mmol). El proceso se detuvo por sucesivos lavados con PBS + 2 mM de leucina (a 4°C), TCA al 10%, y un último lavado con etanol; estos pasos tenían por objeto eliminar el precursor radiactivo no incorporado y precipitar las proteínas celulares TCA-precipitables. La capa celular se disolvió con NaOH 0,4 N, y en la solución resultante se midió radiactividad y concentración de proteínas.

2.4.3. SINTESIS DE ADN Y ARN.

El estudio de la biosíntesis de los ácidos nucleicos se realizó mediante la incorporación de nucleósidos marcados radiactivamente. Se utilizó timidina y uridina marcadas con tritio, para estudiar la síntesis de ADN y ARN, respectivamente.

Cuando se proporciona un nucleósido a la célula, éste se incorpora rápidamente a los ácidos nucleicos si están siendo sintetizados. La síntesis de ADN ocurre únicamente durante una de las fases del ciclo celular, el período S, de manera que el precursor sólo se incorporará a la molécula de ADN cuando las células estén en dicha fase y sean por tanto capaces de dividirse. Sin embargo, la síntesis de ARN se realiza tanto en el período S como en los G₁ y G₂.

El protocolo seguido para el estudio de la síntesis de ácidos nucleicos en los astrocitos fué similar al utilizado para estudiar la síntesis de proteínas. Tras lavarse 2 veces con medio MEM, las células se incubaron

durante 60 min con medio MEM que contenía 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -metil-Timidina o de ^3H -4-5-Uridina (ambas con una actividad específica de 5 Ci/mmol) para estudiar la síntesis de ADN o de ARN, respectivamente.

El proceso se detuvo mediante sucesivos lavados con medio MEM a 4°C (sin los precursores radiactivos), TCA al 10%, y un último lavado con etanol. La capa celular resultante se disolvió con NaOH 0,3 N, deoxicolato sódico al 0,4%, midiéndose la radiactividad así como la concentración de proteínas.

2.4.4. PROCESAMIENTO DE LAS CELULAS PARA ESTUDIOS BIOQUIMICOS.

Para el estudio de diferentes parámetros bioquímicos, se tomaron placas a lo largo de todo el cultivo. La monocapa celular se despegó con una barra de goma (policeman-rubber), y la suspensión resultante se centrifugó a 1.700 x g durante 20 min. El precipitado se lavó 2 veces en tampón tris-ClH 50 mM (pH 7,2), y se congeló a -80°C, manteniéndose toda la noche.

Al día siguiente, la suspensión celular se descongeló y congeló 3 veces, y se homogeneizó para liberar al máximo las enzimas ligadas a las membranas celulares. De este homogenado o suspensión de células rotas, se determinó la cantidad de proteínas, y se diluyó hasta obtener una concentración de 1 mg de proteína/ml, cuando fué posible, para determinar las diferentes actividades enzimáticas.

2.5. DETERMINACIONES ENZIMATICAS.

ALANINA AMINOTRANSFERASA

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

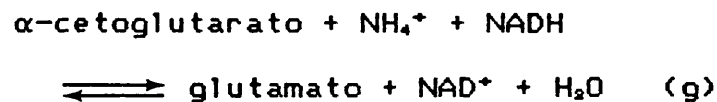


El ensayo utilizado para medir esta enzima se basó en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. En primer lugar, la reacción catalizada por la alanina aminotransferasa, la cual forma piruvato. En segundo lugar, la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) que, como veremos más adelante, utiliza el piruvato formado y da lugar a NAD^+ , midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm, durante un período de tiempo no

superior a 5 min [230]. Un volumen final de 1 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 100 mM fosfato potásico pH 7,3, 4 mM α -cetoglutarato, 0,2 mM NADH, 6 U de LDH y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo L-alanina (17mM) a las cubetas de reacción.

GLUTAMICO DESHIDROGENASA

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



El ensayo utilizado se basó en el registro gráfico de la disminución de absorbancia a 340 nm, debido al continuo consumo de NADH, durante un período de tiempo no superior a 5 min.

Para medir la actividad de esta enzima en hepatocitos, se utilizó el método descrito por Salinas y cols. [216]. Se preincubó un volumen final de 1 ml la mezcla de reacción contenía: 45 mM fosfato potásico pH 7,4, 30 mM α -cetoglutarato pH 6,8, 0,07 mM NADH y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo NH_4Cl (105 mM) a las cubetas de reacción.

Para la medida de la actividad de esta enzima en astrocitos se utilizó el método de Leong y Clark [126] debido a su mayor especificidad para este tipo de muestras. Un volumen final de 1 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 100 mM fosfato potásico-tris pH 7,7, 1 mM EDTA-K^+ , 0,2 mM NADH, 2 mM ADP, 0,1% Tritón X-100, 10 mM α -cetoglutarato pH 7 y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició mediante la adición de acetato amónico (200 mM) a las cubetas de reacción.

LACTATO DESHIDROGENASA

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

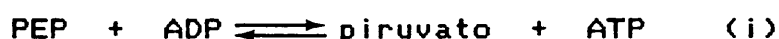


El ensayo utilizado se basó en el registro gráfico de la disminución de absorbancia a 340 nm, debido al

continuo consumo de NADH, durante un período de tiempo no superior a 5 min [24]. Se preincubó un volumen final de 1 ml a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 48 mM fosfato potásico pH 7,5, 0,18 mM NADH y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo piruvato sódico (0,6 mM) a las cubetas de reacción.

PIRUVATO KINASA

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Como vimos en el caso de la alanina aminotransferasa, el ensayo utilizado para medir la actividad de la piruvato kinasa se basó en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas: la catalizada por ésta y la catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) [88]. Se preincubó un volumen final de 1 ml a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía 123 mM tampón trietanolamina pH 7,5, 92,5 mM KCl, 16,25 mM MgSO₄, 1,2 mM EDTA-Na₂, 0,18 mM NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato (PEP), 6,12 U de LDH y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo ADP (3 mM) a las cubetas de reacción.

ALCOHOL DESHIDROGENASA

Esta enzima cataliza la reacción (a). El ensayo utilizado para determinar su actividad se basó en el registro gráfico del incremento de absorbancia a 340 nm, debido a la continua formación de NADH, durante un período de tiempo no superior a 5 min [114].

Se preincubó un volumen final de 1 ml a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 70 mM tampón glicil-glicina pH 9,6, 0,64 mM NAD⁺ y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició al añadir etanol (100 mM), midiéndose el incremento de absorbancia antes y después de la adición de etanol.

ALDEHIDO DESHIDROGENASA

Esta enzima cataliza la reacción (d). El ensayo utilizado para medir la actividad de esta enzima se basó en el registro gráfico del incremento de absorbancia a 340 nm, debido a la continua formación de NADH, durante

un período de tiempo no superior a 5 min [114].

Se preincubó un volumen final de 1 ml a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 70 mM pirofosfato sódico pH 8, 1,3 mM NAD, 3,3 mM pirazol y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo acetaldehído a las cubetas de reacción a una concentración final de 5mM ó 6 μ M, según se fuese a determinar la actividad de ALDH de baja o alta afinidad, respectivamente. El incremento de absorbancia se midió antes y después de la adición de acetaldehído.

GLUTAMINA SINTETASA

La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente:



El ensayo utilizado se basó en la medida del γ -glutamihidroxamato liberado [215]. En un volumen final de 1 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 50 mM imidazol-ClH pH 7,2, 20 mM MgCl₂, 25 mM mercaptoetanol, 50 mM Na-L-glutamina, 100 mM hidroxilamina, y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició mediante la adición de ATP-Na (100 mM).

Tras 1 h de incubación, la reacción se detuvo añadiendo 1,5 ml de cloruro férrico 0,37 M, TCA 0,2 y ClH 0,67 N. La mezcla de reacción se centrifugó a 3.000 x g, determinándose la cantidad de γ -glutamihidroxamato liberado en el sobrenadante. Al unirse este último compuesto con el cloruro férrico da un color marrón característico, cuya intensidad de color se mide a 535 nm.

BUTILCOLINESTERASA

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

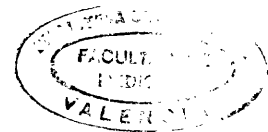
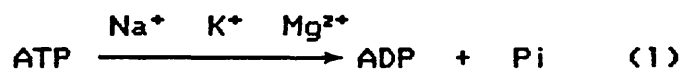


El ensayo utilizado se basó en el registro gráfico del aumento de absorbancia a 412 nm durante un período de tiempo no superior a 5 min [51]. En un volumen final de 1 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 50 mM tampón fosfato potásico pH

7, butiltiocolina 0,75 mM, y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició mediante la adición de 0,5 mM de ácido ditiobisnitrobenzoico (DNTB). Al unirse este último producto, no enzimáticamente, a los grupos tiólicos de la tiocolina producida, da un color amarillo cuya intensidad se mide a 412 nm.

ADENOSIN TRIFOSFATASA (Na⁺,K⁺)

Esta enzima ((Na⁺,K⁺)ATPasa) cataliza la siguiente reacción:



El ensayo utilizado se basó en la medida de la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado [256]. Un volumen final de 1 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 50 mM tampón tris-ClH pH 7,5, 100 mM ClNa, 15 mM ClK, 5 mM ClMg y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo tris-ATP (5 mM). Tras 10 min de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de TCA al 10%.

Los ensayos se realizaron en tubos duplicados, en uno de los cuales (que no contenía ClK ni ClNa) se adicionó 1 mM de ouabaína (inhibidor específico de la (Na⁺,K⁺)ATPasa). La diferencia entre las actividades en ausencia y presencia de ouabaína dió la actividad de la enzima.

Tras detener la reacción se centrifugaron los tubos a 3.000 x g, determinando la cantidad de Pi liberado en el sobrenadante por el procedimiento de Gomori [70].

ADENOSIN TRIFOSFATASA (Ca²⁺)

La reacción catalizada por esta enzima (Ca²⁺ATPasa) es la siguiente:



El ensayo utilizado se basó en la medida de la cantidad de Pi liberado [80]. Un volumen final de 0,5 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 25 mM imidazol-ClH pH 7,1, 100 mM ClK, 3 mM

Cl_2Mg y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo tris-ATP (2 mM). Tras 10 min de incubación se detuvo la reacción añadiendo 0,5 ml de TCA al 10%. El Pi liberado se determinó por el procedimiento de Gomori [70].

Los ensayos se hicieron en tubos duplicados, en uno de los cuales se añadió 0,5 mM EGTA (quelante de los iones Ca^{2+}) y en el otro 2 μM Cl_2Ca (activador de la enzima). Las diferencias entre las actividades con y sin Ca^{2+} dió la actividad de la $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasa}$.

5'RIBONUCLEOTIDO FOSFORILASA

Esta enzima (5'nucleotidasa) cataliza la siguiente reacción:



El ensayo utilizado se basó en la medida de la cantidad de Pi liberado [157]. Un volumen final de 0,5 ml se preincubó, a 37°C durante 5 min, la mezcla de reacción que contenía: 50 mM tris-ClH pH 7,5, 100 mM ClK, 100 mM Cl_2Mg , 10 mM tartrato Na^+K^+ y el homogenado que contenía la enzima. La reacción se inició añadiendo 5 mM AMP. Tras 15 min de incubación se detuvo la reacción añadiendo 0,5 ml de TCA al 10%. La cantidad de Pi liberado se midió en el sobrenadante por el procedimiento de Gomori [70].

Los ensayos se hicieron por duplicado: en uno de los tubos se detuvo la reacción a tiempo cero (blanco) y en el otro a los 15 min. Las diferencias entre las dos medidas dió la actividad de la enzima.

2.6.OTRAS DETERMINACIONES

ALCOHOL Y ACETALDEHIDO

Ambos metabolitos se determinaron mediante cromatografía de gases con "espacio de cabeza" e inyección automática de la muestra, siguiendo el procedimiento de Eriksson y cols. [54] y Sanchis [218]. Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes temperaturas: inyección 170°C, horno (columna) 75°C, detector 140°C y muestra 70°C.

Las muestras (sangre o medio de cultivo) se diluye-

ron en un volumen total de 0,5 ml de H₂O y se introdujeron en viales de vidrio de cierre hermético (especiales para la inyección automática de la muestra). Las áreas obtenidas de los diferentes picos se analizaron automáticamente por un integrador Sigma 15.

Se realizaron curvas estándar de etanol y acetaldehído bajo las mismas condiciones que las muestras. Se realizaron blancos con agua bidestilada al comenzar y finalizar los análisis.

PROTEINA

La concentración de proteínas en las muestras se determinó según el método de Lowry y cols. [143], usando seroalbúmina bovina como estándar.

ADN

El contenido de ADN de las muestras se determinó por el método fluorimétrico de Labarca y Paigen [119]. La muestra se diluyó en tampón 0,05 M NaPO₄, 2 M NaCl pH 7,4, para disociar la cromatina. Al añadirle bisbenzimidazole se produce un aumento de fluorescencia a una excitación de 360 nm y emisión de 460 nm, proporcional al contenido de ADN. Se utilizó ADN de timo bovino como estándar.

RADIOACTIVIDAD

Para determinar la radiactividad en las muestras se tomaron diferentes alícuotas, se neutralizaron y se les añadió líquido de centelleo.

Antes de contar la radiactividad, los viales con las muestras permanecieron 5 ó 6 h en oscuridad y a 4°C, para evitar problemas de fotoluminiscencia y quimioluminiscencia.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (S.D.) o error estándar (S.E.). Para calcular el grado de significación entre los valores obtenidos de los diferentes grupos, los datos se procesaron mediante el test "t" de Student.

En los cultivos de astrocitos, los puntos obtenidos experimentalmente del contenido de ADN y de proteínas se

ajustaron, mediante regresión logarítmica, a una curva de crecimiento logarítmico de ecuación general:

$$y = A + B \log(x)$$

habiéndose descartado previamente la posibilidad de ajuste a otros tipos de curva.

Cuando los valores obtenidos de ratas control "pair fed" y control "ad lib" no mostraron diferencias estadísticamente significativas, se unieron en un solo grupo denominado "control".

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS HEPATOCITOS.

1.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS DE RATAS FETALES Y NEONATALES: CONSIDERACIONES METODOLOGICAS.

El aislamiento de hepatocitos de ratas adultas es un procedimiento rutinario en muchos laboratorios; sin embargo, el aislamiento de estas células a partir de ratas fetales o neonatales es más problemático debido por un lado, al pequeño tamaño de los hígados y por otro, a la gran cantidad de células hematopoyéticas que existen en el hígado a esa edad.

Tanto los hígados fetales como los de ratas neonatales son de difícil perfusión debido a su tamaño, por lo que no pudimos emplear los procedimientos que generalmente se utilizan para aislar hepatocitos de hígado de rata adulta, basados en la perfusión de dicho órgano. Por ello utilizamos otro procedimiento, basado en el descrito por Lorenzo y cols. [141].

El procedimiento alternativo a la perfusión, utilizado en ratas adultas, se basa en una serie de pasos cuya función es:

- 10) Disgregación parcial del tejido mediante troceado mecánico.
- 20) Lavado exhaustivo de los fragmentos para eliminar parcialmente células hematopoyéticas y hematíes maduros.
- 30) Incubación en una solución de colagenasa para la disgregación total de los hepatocitos.
- 40) Eliminación del tejido conjuntivo y agregados celulares por sucesivos pases a través de mallas de tamaño de poro decreciente (500-35 μ m). Debido a que, por una parte los hepatocitos tienden a agregarse rápidamente, y por otra el ADN de las células rotas tiende a formar una especie de entramado capaz de retener células, al final de los filtrados descritos se trató la suspensión celular con tripsina y ADNasa, además de mantener una continua disgregación mecánica.
- 50) Las células hematopoyéticas y los hematíes que pudieran quedar, se eliminaron por aspiración, ya que dichas células sedimentaban, tras centrifugación, en la parte superior del precipitado, y además eran fácilmente identificables por su color rojo.

La recuperación de hepatocitos osciló entre 10 y 14 x 10⁶ células/g de hígado, con una pureza de \approx 98%, tanto para los controles como para los expuestos al alcohol. La viabilidad fué superior al 90%, manteniéndose valores similares hasta el final de los experimentos, gracias a que los hepatocitos se mantuvieron en soluciones que contenían BSA, y estuvieron constantemente gaseados con carbógeno.

1.2. SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS.

La síntesis de proteínas se estudió mediante la incorporación, procesamiento y liberación de ³H-leucina, por métodos bioquímicos y autorradiográficos.

1.2.1. INCORPORACION Y LIBERACION DE ³H-LEUCINA.

La figura 4 muestra la incorporación de ³H-leucina en los hepatocitos así como la liberada al medio de cultivo a diferentes tiempos de desmarca, tras un pulso de 5 min (para estudiar la síntesis de proteínas de síntesis rápida), o de 60 min (para las que se sintetizan más lentamente).

Tras el pulso de 5 min, la radiactividad incorporada en los hepatocitos fué disminuyendo progresiva y linealmente a lo largo del tiempo de desmarca (Fig. 4 A), quedando a los 90 min de dicho período un 75% con respecto a la de 15 min. La radiactividad liberada al medio fué aumentando también progresivamente a lo largo de dicho período (Fig. 4 B), siendo a los 90 min del pulso 1,7 veces superior a la encontrada a los 15 min.

Los hepatocitos de ratas expuestas prenatalmente al alcohol incorporaron, tras un pulso de 5 min, unos niveles de ³H-leucina menores que los controles, aunque la diferencia sólo fué significativa a los 60 min del tiempo de desmarca. La disminución de dichos niveles fué progresiva a lo largo de dicho tiempo. Sin embargo, no fué tan lineal como la de los controles ya que, aunque en los dos casos los valores de dicha disminución fueron similares (\approx 25% con respecto a los de los 15 min de desmarca), en los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol fué más rápida durante la primera hora (donde se redujo el 82% de la disminución total, frente al 67% de los controles), y más lenta durante los últimos 30 min.

La liberación de radiactividad al medio de cultivo por estos hepatocitos también fué aumentando progresivamente a lo largo del tiempo de desmarca, pero fué menor

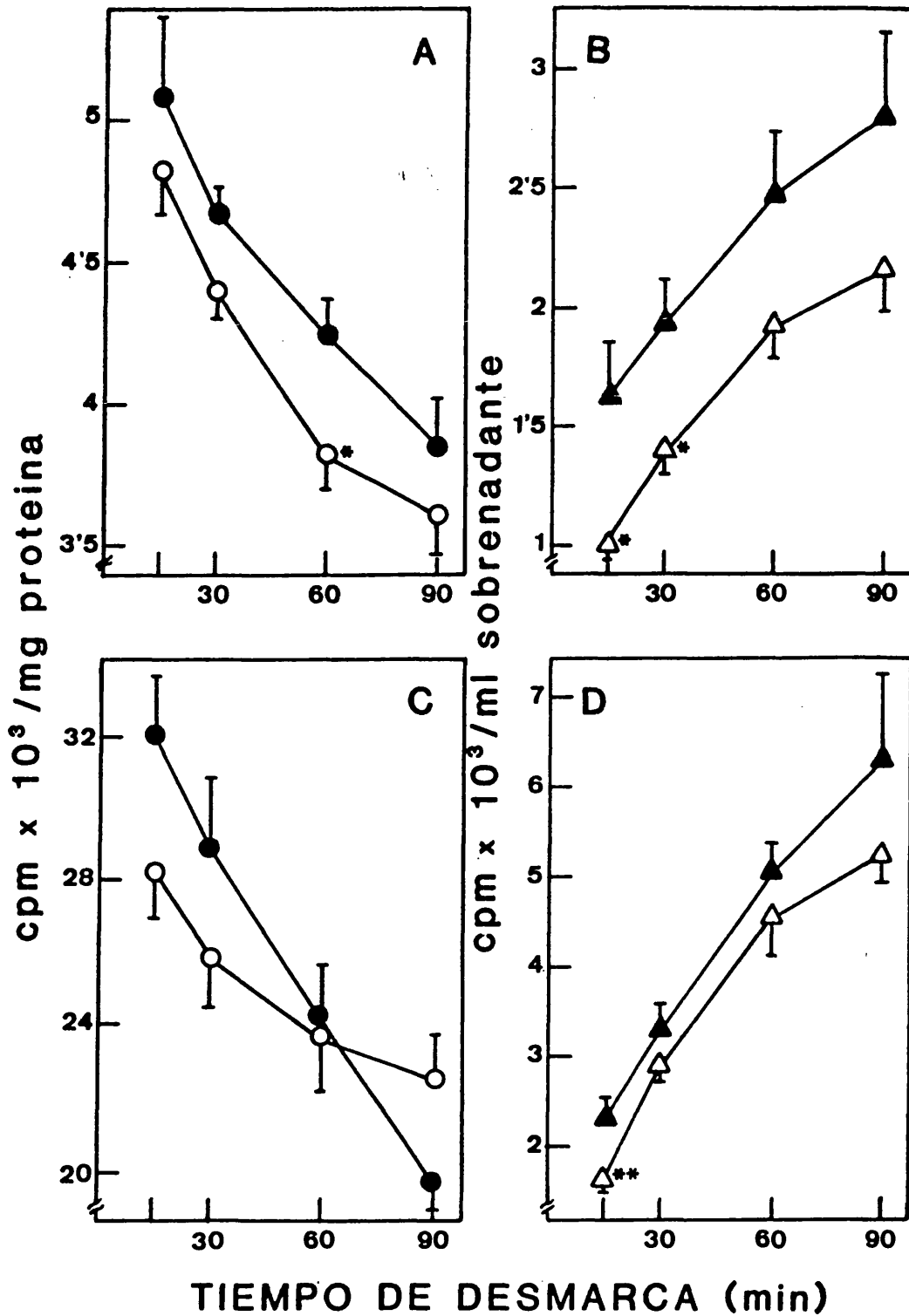


Figura 4. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación y liberación de ³H-leucina en hepatocitos aislados de fetos de ratas controles (radiactividad retenida (●) y liberada al medio (▲)) y expuestos al alcohol (retenida (○) y liberada (△)), tras un pulso de 5 min (A y B) o de 60 min (C y D), y a diferentes tiempos de desmarca. Cada punto representa la media ± S.E. de 7-8 valores. Diferencias significativas con respecto al control (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

que en los controles, encontrándose un valor del 77% con respecto a los controles al final de dicho tiempo. Además, aunque el aumento de radiactividad en el medio fué similar en ambos casos con respecto a los 15 min (≈ 1.160 cpm/ml medio), en los hepatocitos tratados con alcohol la liberación fué más rápida en la primera hora de desmarca (80% del total liberado en el sobrenadante, frente al 72% del control), y más lenta en los últimos 30 min.

Tras el pulso de 60 min se observó el mismo patrón de incorporación y liberación en los hepatocitos controles que el descrito para el pulso de 5 min. Sin embargo dicha incorporación fué, a los 15 min del tiempo de desmarca, 6 veces superior que tras el pulso de 5 min, y fué disminuyendo linealmente a lo largo de dicho tiempo, hasta alcanzar, a los 90 min, unos valores del 61% con respecto a los 15 min (Fig. 4 C). Igualmente, la radiactividad en el medio fué aumentando, siendo al final del experimento 2,7 veces superior que al principio (Fig. 4 D).

Sin embargo, la incorporación y liberación de ^3H -leucina por los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol e incubadas durante 60 min con el precursor, presentó diferencias con respecto a los controles. Por una parte, la disminución de la radiactividad incorporada no fué lineal, sino que disminuyó más rápidamente en la primera hora de desmarca (77% de la disminución total, frente al 63% del control), y más lentamente en los últimos 30 min. Por otra parte, a los 90 min todavía retenían el 79% de las cuentas respecto al valor de los 15 min, lo que supone la mitad de lo disminuido por los controles (61%). En correspondencia con los valores de radiactividad retenidos por los hepatocitos, la liberación al medio fué menor (82% de los controles al final del tiempo de desmarca), siendo el aumento más rápido en la primera hora de desmarca (80% del total liberado, frente al 66% de los controles), y más lento en los últimos 30 min, con un crecimiento final de 3,2 veces con respecto a los 15 min.

En todos los casos, es decir, tanto tras los pulsos de 5 y 60 min, como en los hepatocitos de ratas controles o tratadas con alcohol, la disminución de la radiactividad retenida por las células y el aumento de la liberada al medio a los 90 min, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a los valores de los 15 min.

1.2.2. METODOS AUTORRADIOGRAFICOS.

Por medio de la autorradiografía pudimos analizar la cinética de la ^3H -leucina incorporada en los hepatocitos, estudiando especialmente los orgánulos celulares relacio-

nados con la síntesis y glicosilación de proteínas, como son el retículo endoplásmico rugoso (REr) y el aparato de Golgi, así como el destino de dichas proteínas. Las figuras 5 y 6 muestran el número de marcas en las autorradiografías a microscopía electrónica, correspondientes a la incorporación de ^3H -leucina y las relativas a los distintos tiempos de desmarca, tras un pulso de 5 min.

El número de marcas en el aparato de Golgi, en relación al número total de marcas del citoplasma (Fig. 5), presentó en los hepatocitos controles un valor máximo a los 15 min de desmarca (2,6 veces superior al inicial), disminuyendo posteriormente hasta un valor del 49,5% con respecto al máximo.

En los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol, el porcentaje inicial de marcas sobre el aparato de Golgi fué menor (58%) que en los controles a ese mismo tiempo; posteriormente dicho valor fué aumentando hasta un máximo que se situó a los 30 min del período de desmarca. Este máximo fué 2,2 veces superior al valor inicial, y la mitad del máximo encontrado en los controles. Al final del tiempo de desmarca, los hepatocitos todavía presentaban el 69% del valor máximo (frente al 49,5% de los controles), lo que significa que la velocidad de transporte de estas proteínas marcadas entre el aparato de Golgi y otros compartimentos celulares estaba disminuida.

El incremento de las marcas sobre el aparato de Golgi, entre el valor inicial y el máximo, fué estadísticamente significativo, tanto en los hepatocitos controles ($p \leq 0,01$) como en los tratados con alcohol ($p \leq 0,05$).

Sin embargo hay que señalar que la expresión del nivel de marcas de un orgánulo como el porcentaje de marcas respecto al total del citoplasma, es un procedimiento inexacto cuando se cumplen las condiciones de una distribución de orgánulos al azar y un nivel de proteínas relativamente alto.

Por ello, en nuestro caso, se determinó también la relación de concentraciones expresando los valores citados en relación al área relativa que ocupa el orgánulo en cuestión en el citoplasma. Así observamos que en los hepatocitos controles se produce un gran aumento del número de marcas en el aparato de Golgi (Fig. 6 B). El valor máximo de marcas se alcanzó a los 30 min del período de desmarca, con unos valores 4,8 veces superiores a los iniciales. Estos valores disminuyeron posteriormente hasta alcanzar un 12% del valor máximo al final de dicho período. En los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol, el aumento de marcas en el aparato de Golgi fué mucho menor que en los controles, alcanzándose a los 30

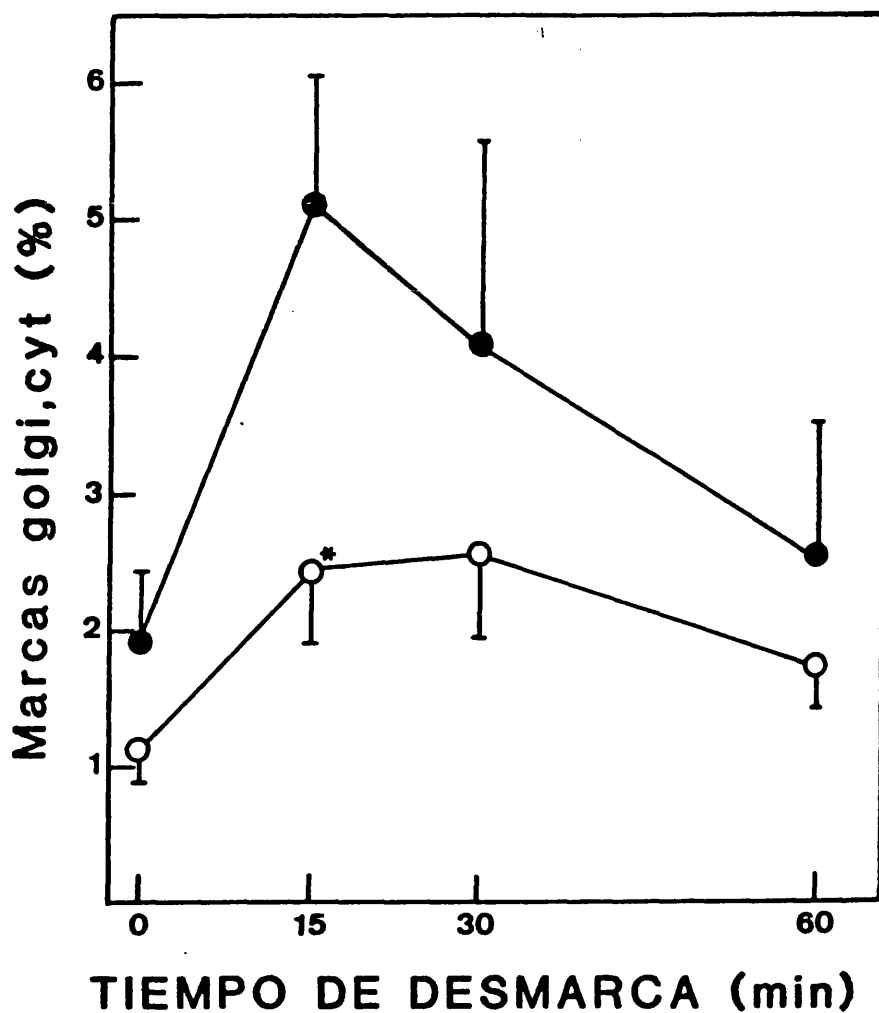


Figura 5. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación de ^3H -leucina en el aparato de Golgi de hepatocitos aislados de fetos de ratas controles (●) y expuestos al alcohol (○), tras un pulso de 5 min y a diferentes tiempos de desmarca. Cada punto representa la media \pm S.E. Para toma de muestras, ver Materiales y Métodos. Diferencia significativa con respecto al control (* $p \leq 0,05$).

RELACION DE CONCENTRACIONES

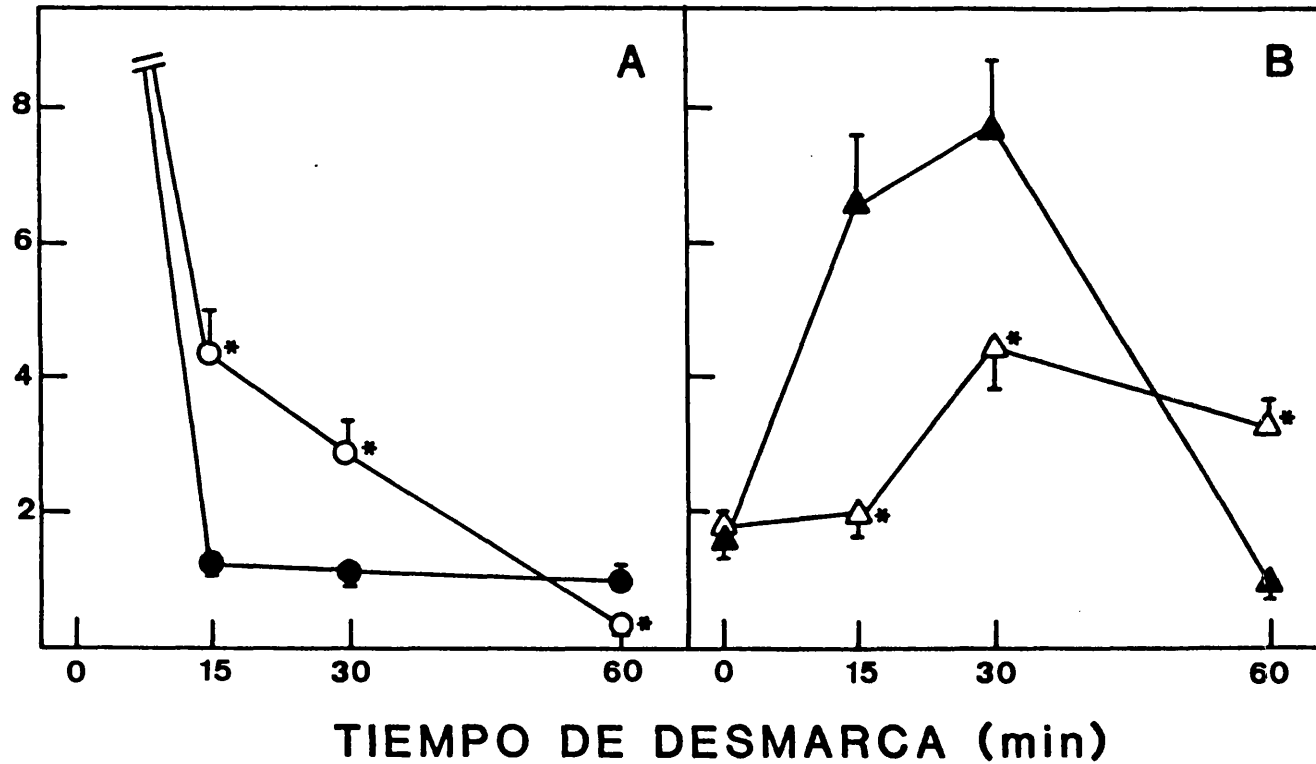


Figura 6. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación de ^3H -leucina en el retículo endoplásmico rugoso (A) y aparato de Golgi (B) de hepatocitos aislados de fetos de ratas controles (●,▲) y expuestos al alcohol (○,△), tras un pulso de 5 min y a diferentes tiempos de desmarca. Cada punto representa la media \pm S.D. Diferencia significativa con respecto al control (* $p \leq 0,01$).

min de desmarca un valor máximo 2,5 veces el inicial, lo que suponía el 58% con respecto al control. El nivel de marcas a los 60 min sólo había disminuído un 28% del valor máximo (frente al 87% de disminución del control).

El incremento de dicha relación entre el tiempo inicial y el punto máximo, así como la disminución entre este último y el valor a los 60 min, tanto en hepatocitos controles como en los tratados con alcohol, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$).

Con respecto al RER, la relación de concentración en los hepatocitos de ratas controles disminuyó rápidamente en los primeros 15 min de desmarca, permaneciendo constante (alrededor de la unidad) durante el resto de dicho tiempo (Fig. 6 A). Sin embargo, la disminución observada en los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol fué más gradual, no llegando al valor 1 hasta los 60 min de desmarca, aunque, como los controles, la disminución fué estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$) con respecto al valor inicial.

1.3. SINTESIS DE GLICOPROTEINAS.

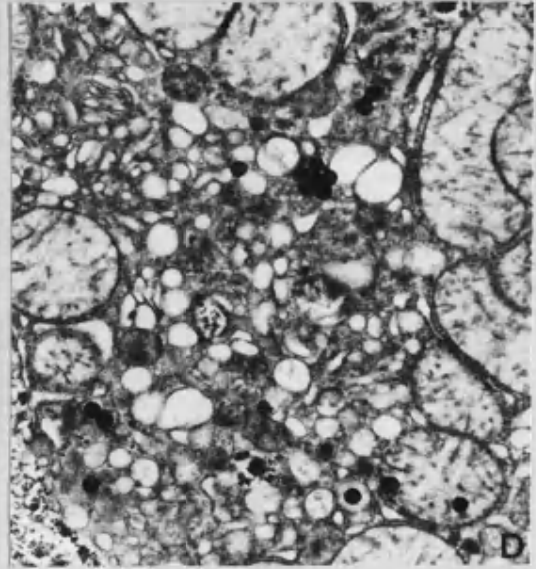
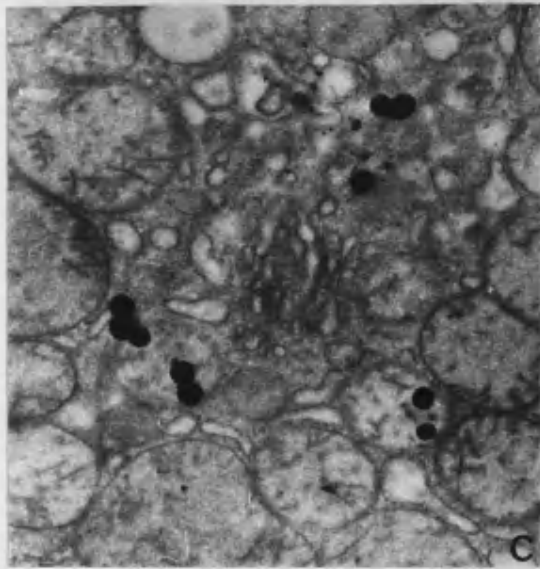
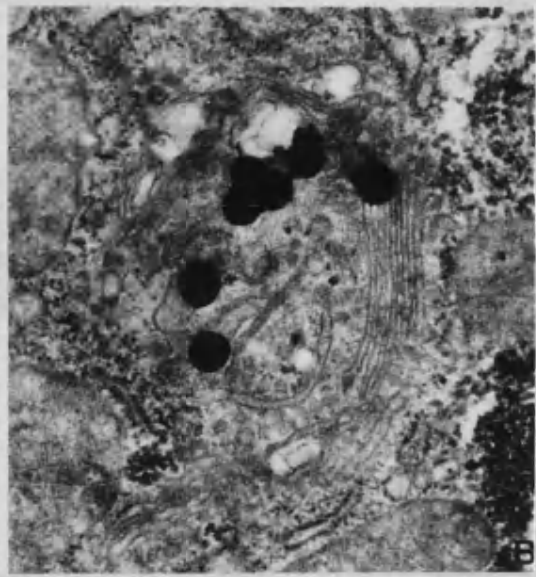
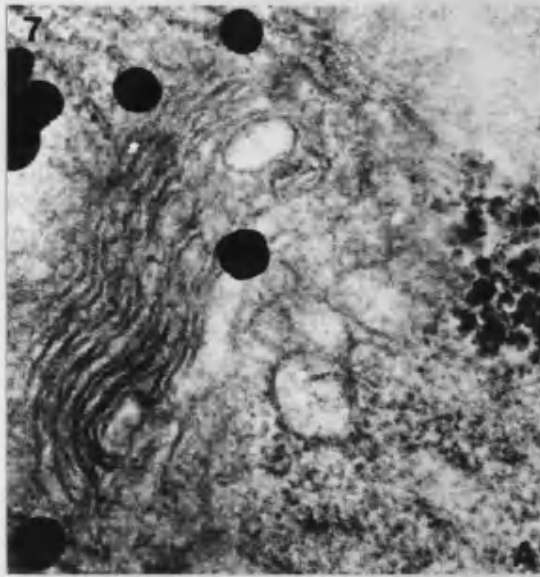
La glicosilación de proteínas se estudió mediante la incorporación, procesamiento y liberación de ^3H -manosa y ^3H -galactosa en los hepatocitos aislados, por procedimientos bioquímicos y autorradiográficos.

Se sabe que es en el RER donde se incorporan inicialmente 14 moléculas de azúcares (9 de las cuales son manosa) a la molécula de proteína, para perder 4 de dichas moléculas (incluída 1 de manosa) antes de ser transferida al aparato de Golgi.

La incorporación de dichos azúcares en los hepatocitos y su liberación al medio se estudió en primer lugar por métodos bioquímicos. Sin embargo, los resultados de estos experimentos nos dieron una gran dispersión de valores que no seguían ningún patrón determinado (probablemente debido al continuo reciclaje de los precursores), por lo que dicho estudio no se tomó en consideración.

Por el contrario, el estudio de las autorradiografías sí que dió una clara visión del proceso de glicosilación en el interior de los hepatocitos (Fig. 7). En las células controles vimos que la relación de concentración de manosa en el RER disminuía bruscamente en la primera media hora de desmarca (el 70% de la disminución total), y con más lentitud en tiempos posteriores, llegando a alcanzar a los 180 min el 52% del valor inicial (Fig. 8

Figura 7. Autorradiografías de hepatocitos de ratas controles (A y B) y prenatalmente expuestas al etanol (C y D) tras un pulso de 5 min con ^3H -manosa (A) o ^3H -galactosa (B, C y D) y desmarcas de 60 min (A y B) y 180 min (C y D). En estas últimas imágenes se ve claramente una retención de marcas en el aparato de Golgi. (A, x 77.628; B, x 55.639; C, x 26.382; D, x 18.500).



UNIVERSITÄT
AD DE
CINA
GIA

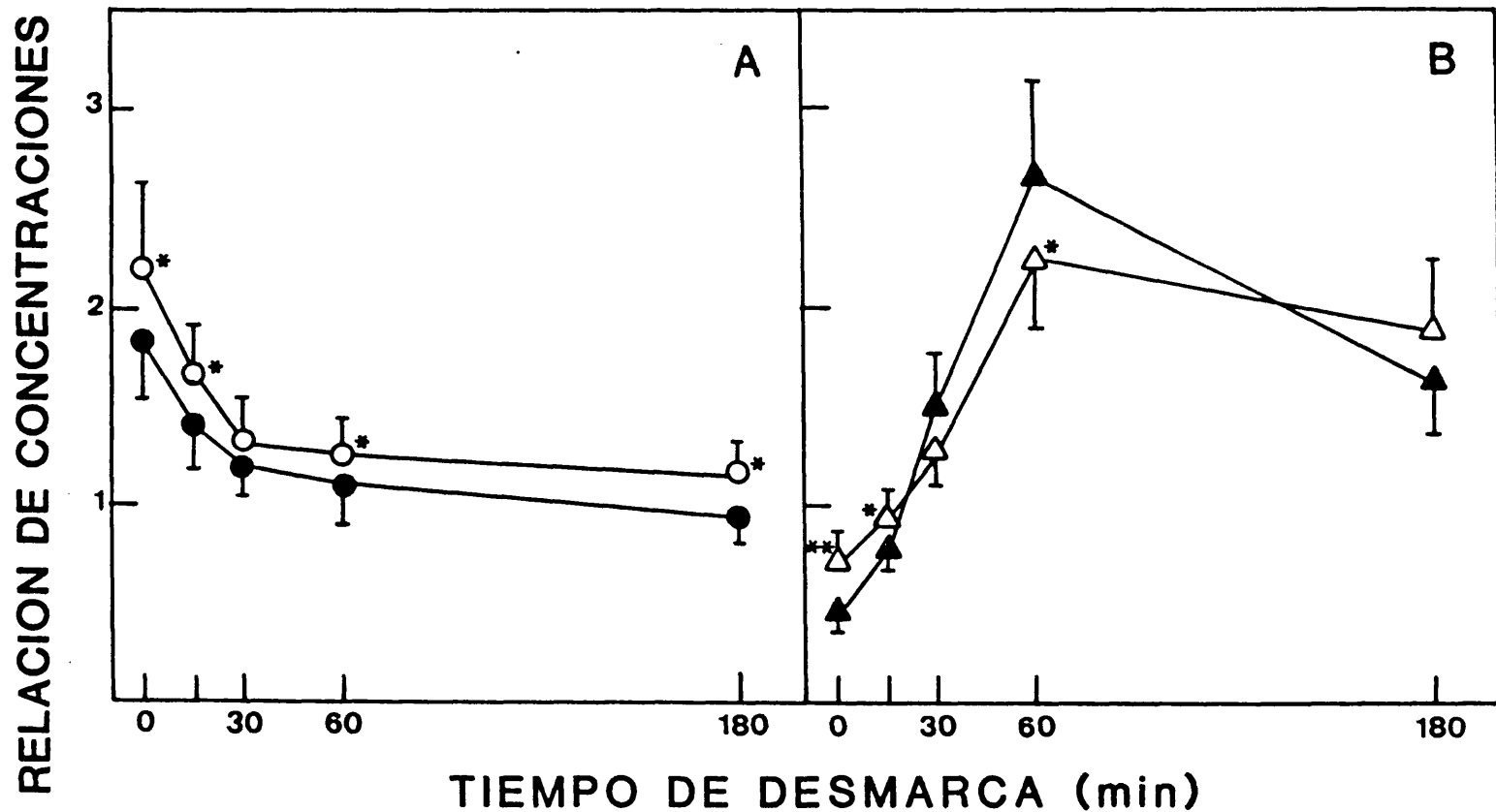


Figura 8. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación de ^3H -manosa en el retículo endoplásmico rugoso (A) y aparato de Golgi (B) de hepatocitos aislados de fetos de ratas controles y expuestos al alcohol, tras un pulso de 5 min y a diferentes tiempos de desmarca. Símbolos como en la Fig. 6. Cada punto representa la media \pm S.D. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

A).

En el aparato de Golgi, donde ya no se pierden más moléculas de manosa, dicha relación de concentración aumentó hasta los 60 min del período de desmarca, con unos valores ≈ 6 veces superiores a los iniciales, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar, a los 180 min, el 61,5% del valor máximo (Fig. 8 B).

En el RER de los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol, se encontró una relación de concentración inicial del azúcar marcado mayor que en los controles, aunque ambos fueron disminuyendo de una manera similar, encontrando al final del tiempo de desmarca un 52% con respecto al inicial. El aparato de Golgi también mostró un patrón de evolución similar al control, si bien a los 60 min sólo había aumentado 3 veces su valor inicial, y a los 180 min todavía presentaba el 84,4% de su valor máximo. Estos datos parecen significar que este proceso es más lento en dichos hepatocitos que en los controles.

Por otra parte, se sabe que la galactosa se incorpora en el aparato de Golgi a las glicoproteínas destinadas a secreción o a la membrana plasmática. Su relación de concentración en el RER no varió a lo largo de todo el tiempo de desmarca, y fué en todo momento inferior a 1 en los hepatocitos de ratas controles (Fig. 9) (hay que recordar que los valores < 1 no son significativos). Estos datos concuerdan con lo anteriormente dicho, ya que el RER no parece jugar ningún papel en el proceso de incorporación de dicho azúcar a la molécula de glicoproteína.

Sin embargo, la relación de concentración en el aparato de Golgi disminuyó bruscamente en los primeros 30 min de desmarca, encontrándose unos valores del 33% de los iniciales, y manteniéndose, luego, prácticamente constante (Fig. 9).

En los hepatocitos de ratas expuestas al etanol no se vió ninguna diferencia con respecto a los controles en los datos referentes al RER. Sin embargo, la relación de concentración inicial en el aparato de Golgi fué mayor que en los controles, y su disminución mucho más lenta, encontrándose a los 30 min de desmarca el 69% del valor inicial, y el 45% a los 180 min. Estos datos apoyan los obtenidos con la manosa, que parecían significar un retraso en el transporte de proteína entre el aparato de Golgi y su destino final, en los hepatocitos de ratas expuestas al alcohol.

Con respecto a la relación de concentración de marcas sobre la membrana plasmática, que es uno de los

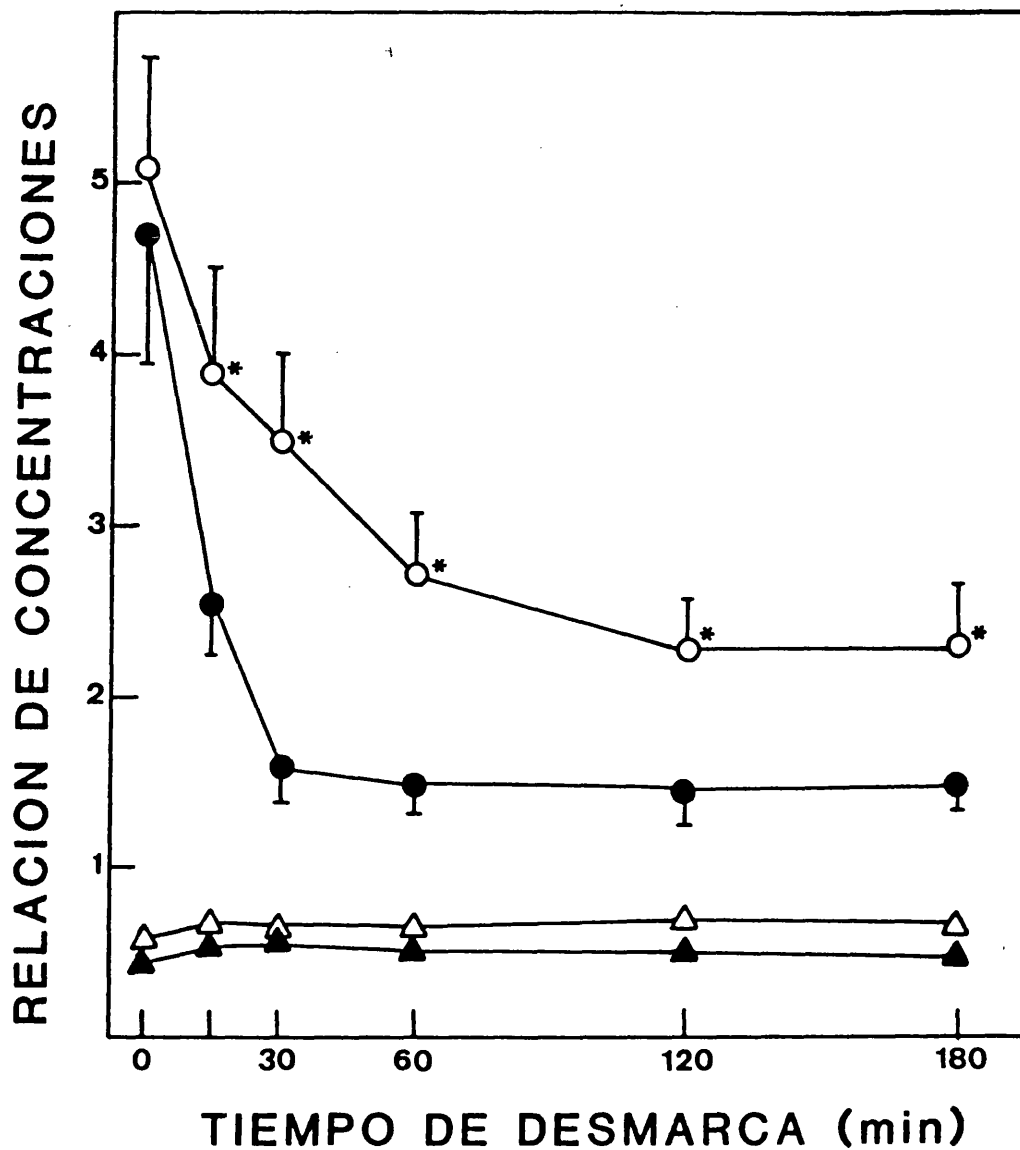


Figura 9. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación de ³H-galactosa en el retículo endoplásmico rugoso (triángulos) y aparato de Golgi (círculos) de hepatocitos aislados de fetos de ratas controles y expuestos al alcohol, tras un pulso de 5 min y a diferentes tiempos de desmarca. Símbolos como en la Fig. 6. Cada punto representa la media \pm S.D. Diferencias significativas con respecto al control (*p \leq 0,01).

componentes celulares donde van destinadas las glicoproteínas sintetizadas, hay que decir que los 2 azúcares estudiados presentaron un comportamiento similar (Fig. 10). En las células controles dicha relación fué aumentando a lo largo del tiempo de desmarca, siendo superior a la unidad, y por tanto significativo, al final del período estudiado (180 min) para ambos precursores. Sin embargo, en los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol dicho aumento fué más lento, no llegándose con ninguno de los 2 azúcares a superar la unidad al final del tiempo de desmarca. Estos datos apoyan los obtenidos anteriormente en los estudios del RER y del aparato de Golgi, que parecen significar que en los hepatocitos alcohólicos existe un retraso en el transporte de las proteínas, de su lugar de síntesis a su destino final.

Hay que destacar que la densidad de volumen del aparato de Golgi fué prácticamente constante a lo largo de todo el tiempo de desmarca, sin mostrar diferencias significativas entre los hepatocitos de ratas controles y tratadas con alcohol (Fig. 11 A). Sin embargo, encontramos que la actividad citoquímica de la uridina difosfatasa, enzima marcadora de la zona "trans" del aparato de Golgi (Fig. 12), así como el depósito de OsO_4 , marcador específico de la zona "cis" (Fig. 13), eran menores en las ratas tratadas que en las controles. Este hecho se constató a lo largo de todo el período de desmarca (Fig. 11 B). Además, cuando se consideraban aisladamente las células controles o las tratadas con alcohol, el valor de estos parámetros no presentó variaciones durante todo el tiempo que duró el experimento, lo que parece indicar que los procesos de aislamiento e incubación no alteran el aparato de Golgi de los hepatocitos.

1.4. ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES DE HEPATOCITOS DE RATAS NEONATALES.

1.4.1. PROCESO DE SEPARACION.

Los hepatocitos fetales, que están recibiendo un aporte constante de glucosa materna, sólo necesitan desarrollar los sistemas enzimáticos glucolíticos, y no presentan heterogeneidad entre las diferentes zonas del acino. Sin embargo, tras el nacimiento ocurre un cambio brusco de aporte nutritivo al empezar a ingerir leche materna, presentando los primeros días de vida postnatal un metabolismo principalmente gluconeogénico (por el gran contenido en grasa y proteínas de la leche). Gradualmente, durante la segunda semana de vida en la rata, la

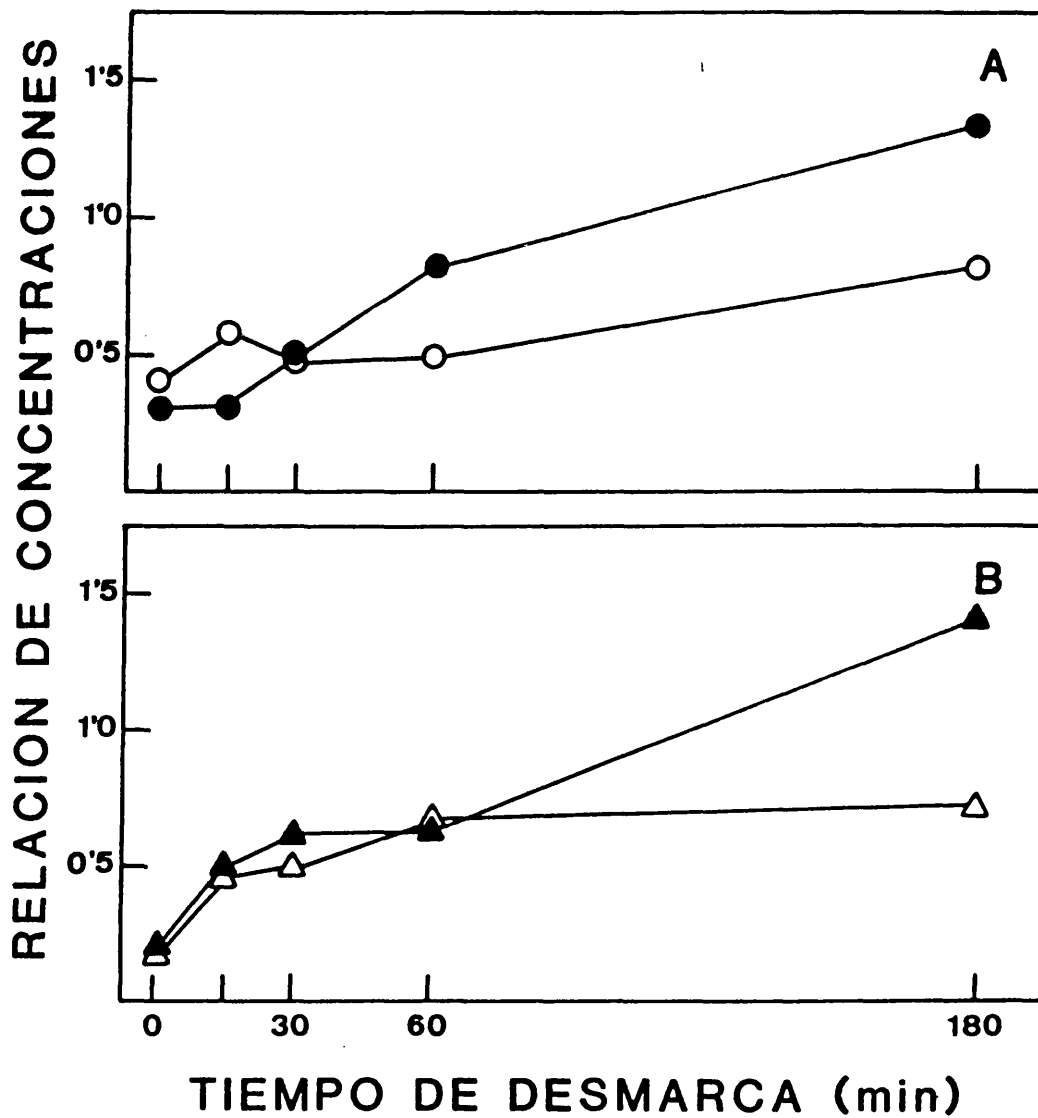


Figura 10. Gráfica en la que se representa la cinética de incorporación de ^3H -manosa (A) y ^3H -galactosa (B) en la membrana plasmática de hepatocitos aislados de fetos de ratas controles (●,▲) y expuestos al alcohol (○,△), tras un pulso de 5 min y a diferentes tiempos de desmarca. Condiciones como en las Figs. 8 y 9.

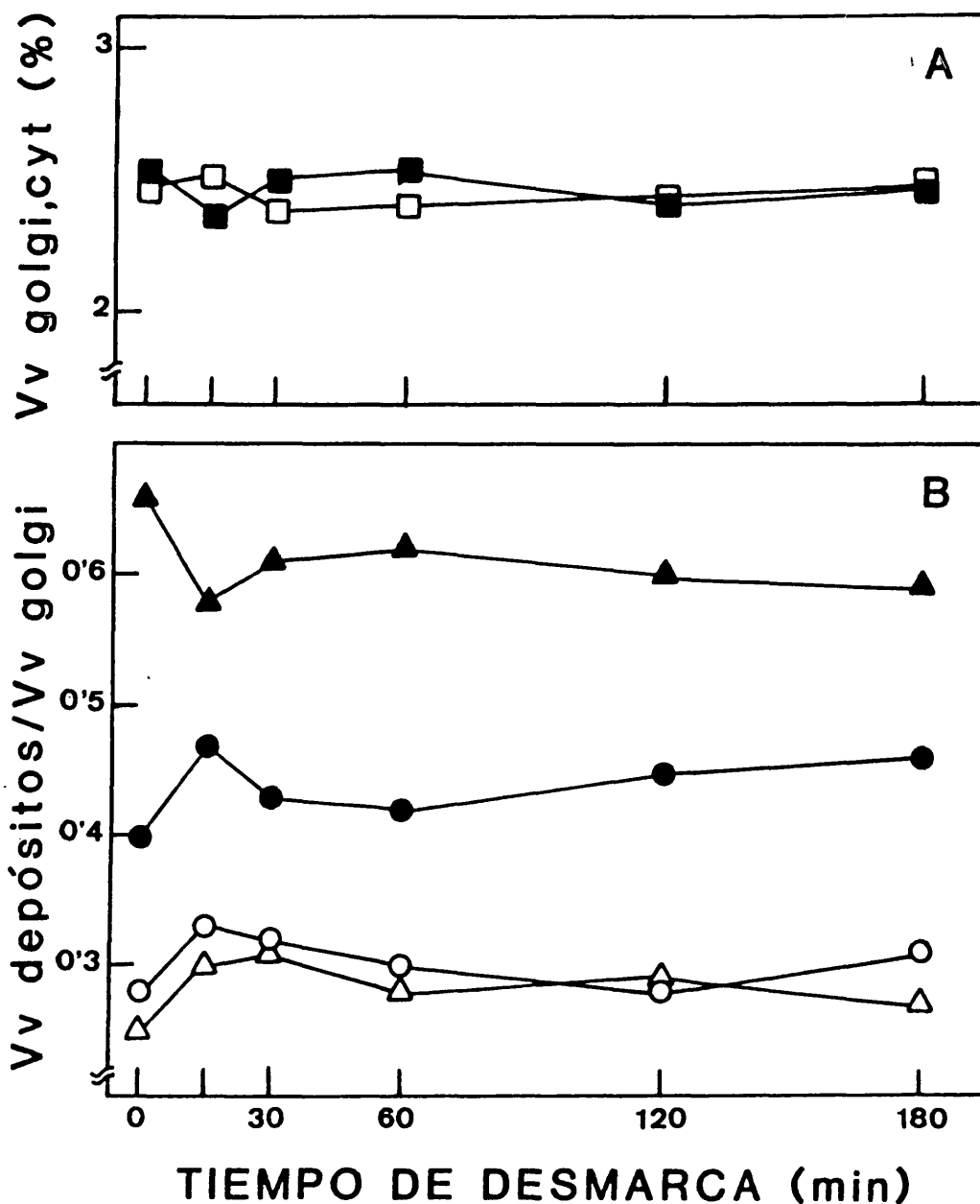
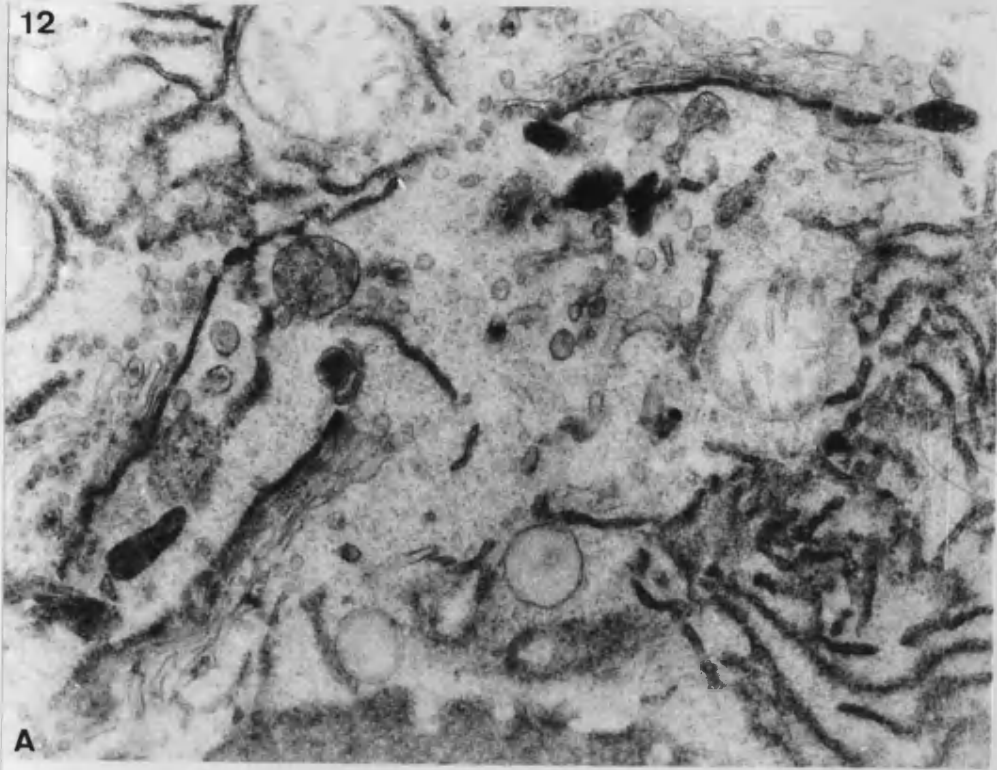


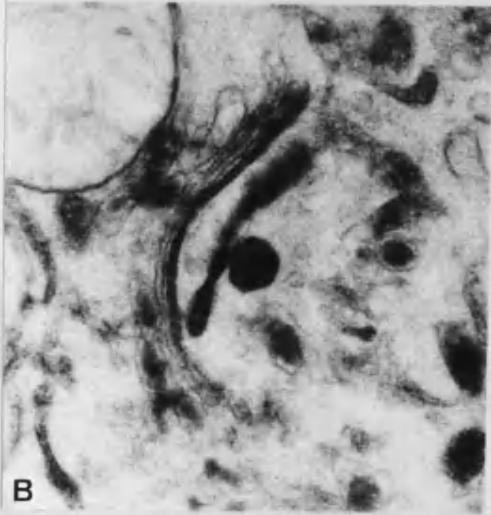
Figura 11. Gráfica en la que se representa la densidad de volumen del aparato de Golgi (A) y la densidad de depósitos (B) de la reacción citotóxica de la UDPasa (círculos) y de OsO_4 (triángulos), en hepatocitos aislados de fetos de ratas controles (■,▲,●) y expuestos al alcohol (□,△,○). Condiciones como en las Figs. 8 y 9.

Figura 12. Micrografías en las que se muestra la actividad citoquímica de la enzima UDPasa. En (A) los precipitados de fosfato de cerio aparecen circunscritos a las porciones "trans" del aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y sistema vacuolar post-Golgi (GERL) de un hepatocito control. En (B) y (C) se compara la actividad UDPasa en el aparato de Golgi de un hepatocito control (B) y otro prenatalmente expuesto al etanol (C). En todos los casos se trata de hepatocitos aislados tal como se describe en el texto. (A, x 62.737; B, x 48.282; C, x 48.330).

12



A



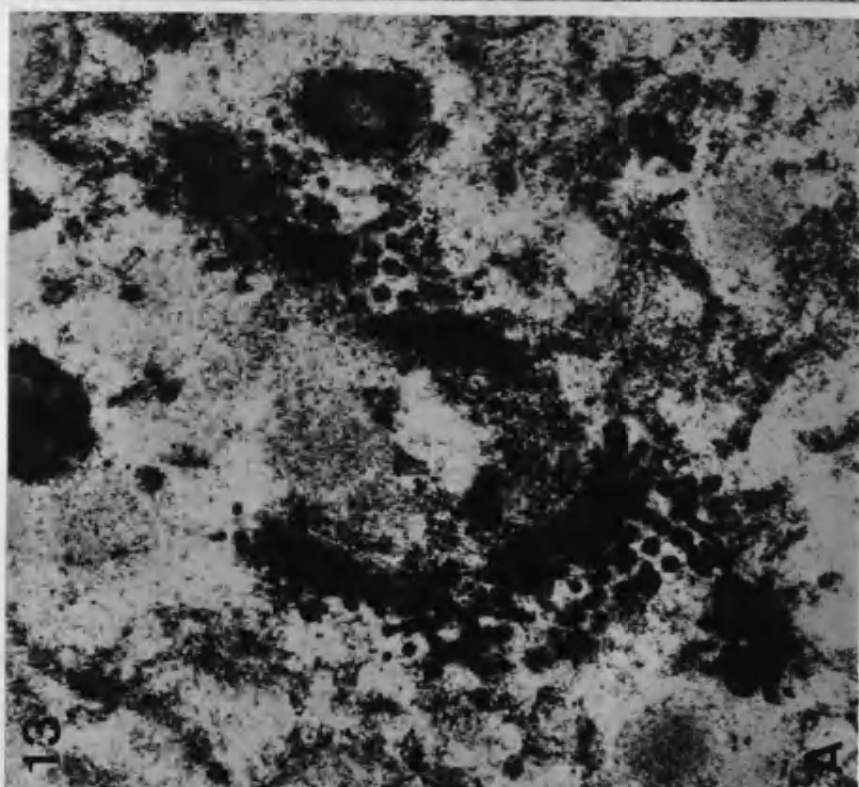
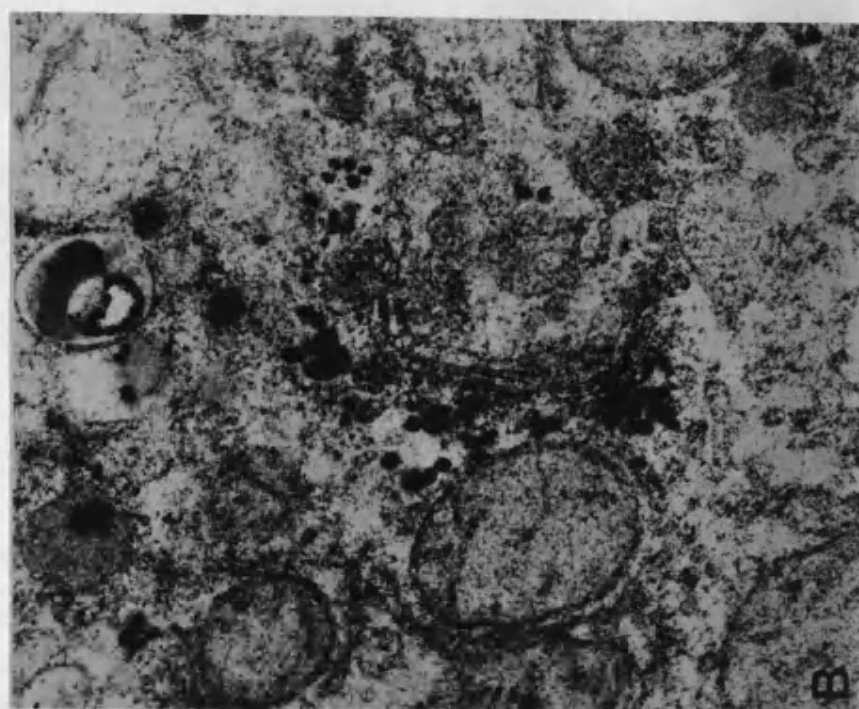
B



C

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA
VALÈNCIA

Figura 13. Hepatocitos aislados y procesados por la técnica de impregnación con OsO_4 para la demostración de las porciones "cis" del aparato de Golgi. Mientras que los hepatocitos controles mostraban varias cisternas y numerosas vesículas conteniendo compuestos de osmio reducido (A), en los hepatocitos de ratas expuestas al etanol dicha actividad aparecía restringida al sistema vesicular. (A, x 47.196; B, x 38.103).



alimentación va siendo más rica en carbohidratos, lo cual coincide con la aparición de la heterogeneidad hepatocitaria en el acino hepático [109,111], que ya es evidente a partir de los 12 días postnatales. Por ello en este estudio se partió de ratas de dicha edad, para separar las diferentes subpoblaciones de hepatocitos, y estudiar la posible afectación selectiva debida a la exposición al alcohol.

Para aislar los hepatocitos en subpoblaciones se vienen utilizando diferentes técnicas [136], basadas en las diferencias de tamaño o de densidad que presentan dichas células. Basándonos en esta última diferencia se procedió a aislar las subpoblaciones de hepatocitos de ratas de 12 días en un gradiente discontinuo de Percoll, procedimiento similar a otros descritos previamente [189,257]. Se utilizó Percoll ya que es una sustancia que no penetra en las células ni parece dañarlas, y con ella se pueden preparar soluciones isoosmóticas de diferente densidad (de 1,0 a 1,3 g/cm³). Las densidades de las soluciones de Percoll utilizadas fueron de 1,077 a 1,119 g/cm³, las cuales se determinaron por distintos procedimientos:

- a) En primer lugar mediante la utilización de "density marker beads" (Pharmacia) que son unas esferas pequeñas de material semejante al Sephadex. Estos marcadores se suministran con colores distintos, cada uno de ellos correspondiente a una densidad de Percoll. El rango de densidades que cubren oscila entre 1,017 y 1,142 g/cm³. En nuestro caso se utilizó una mezcla de perlas de diferentes colores junto con la suspensión de hepatocitos. Tras centrifugar, se determinó la posición de los marcadores de distinto color dentro del gradiente de Percoll y, por tanto, la densidad de cada fracción celular.
- b) Otro procedimiento utilizado para determinar la densidad fué la medida del índice de refracción de las soluciones, mediante un refractómetro.
- c) También se determinó la densidad mediante el cálculo peso/volumen de cada solución.

Por todos los procedimientos se obtuvieron valores muy similares para la densidad de cada una de las soluciones.

Se prepararon 8 soluciones de Percoll de densidad creciente, con el fin de obtener una buena separación de los hepatocitos de las diferentes zonas del acino hepático. Los primeros experimentos se realizaron utilizando 6 soluciones, obteniéndose una resolución insuficiente.

Al añadir 2 soluciones más, de densidad intermedia (1,086 y 1,089 g/cm³), se mejoró considerablemente dicha resolución y por tanto la distancia entre las diferentes bandas.

La centrifugación se realizó a 12°C ya que se ha comprobado que a esta temperatura se reduce considerablemente el riesgo de hipoxia [136].

Tras la centrifugación, los hepatocitos se distribuyeron en todos los experimentos, en un patrón de 7 bandas (Fig. 3). La primera banda, en la parte superior del gradiente, era la que contenía más células, pero estaba constituida principalmente por restos celulares, algunas células muertas y agregados de varios hepatocitos (dobletes y triplete), por lo que esta banda no se consideró en los estudios posteriores. Las siguientes bandas, de la segunda a la séptima, se denominaron F1 a F6.

Cada fracción celular, tanto las obtenidas de ratas controles como de tratadas con alcohol, se analizó mediante:

- 1) Citofluorimetría de flujo, para estudiar el tamaño celular.
- 2) Determinaciones enzimáticas, para conocer la actividad de varias enzimas marcadoras de cada zona del acino hepático, así como de las enzimas que metabolizan el alcohol.
- 3) Procedimientos ultraestructurales, para estudiar la distribución de los orgánulos celulares, tanto cualitativa como cuantitativamente.

1.4.2. VIABILIDAD Y RECUPERACION DE LAS SUBPOBLACIONES DE HEPATOCITOS.

La densidad, viabilidad celular y recuperación de cada una de las fracciones celulares se resume en la Tabla 5. La mayor recuperación se obtuvo en la fracción F1, sin embargo, análisis morfológicos mostraron que esta banda contenía algunas células muertas y agrupaciones de hepatocitos; por tanto esta banda no se tomó en consideración en la mayoría de los análisis realizados. Es importante destacar que la viabilidad fué superior al 90% en todas las fracciones, excepto en las F1.

TABLA 5. Características de las subpoblaciones de hepatocitos.

Fracciones de hepatocitos	Densidad (g/cm ³)	Viabilidad (%)		Recuperación (%)	
		Control	Etanol	Control	Etanol
S0	-	90	90		
F1	1,086	75	75	36,3±2,3	40,5±10
F2	1,086-1,089	≥90	≥90	16,6±2,1	12,5±3,2
F3	1,089-1,095	≥90	≥90	11,6±2,3	9,2±2,3
F4	1,095-1,101	≥90	≥90	17,8±3,0	14,3±4,3
F5	1,101-1,107	≥90	≥90	11,2±3,1	15,3±5,1
F6	1,107-1,112	≥90	≥90	6,4±1,4	7,9±3,1

Media ± S.D. de 5-6 experimentos. S0 = suspensión original de hepatocitos. La recuperación se calculó como porcentaje del número de células en cada fracción, excluyendo la primera banda (células dañadas y agregadas).

1.4.3. CITOFUORIMETRIA DE FLUJO.

El tamaño de los hepatocitos se midió por microscopía electrónica, como se mostrará más adelante, y por citofluorimetría de flujo, como se representa en la figura 14. Como se puede apreciar, las células mayores se van acumulando cada vez en un porcentaje mayor en las fracciones más densas, tanto en las muestras controles como en las tratadas con alcohol, aunque el tamaño de estas últimas parece ser menor que el de las primeras.

1.4.4. ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LAS SUBPOBLACIONES DE HEPATOCITOS.

Aunque todos los hepatocitos tienen la misma dotación enzimática, cada zona del acino hepático del hígado adulto se caracteriza por presentar una mayor actividad de determinadas enzimas, debido a una adaptación metabólica dinámica, es decir, que está condicionada por muchos factores y que se adapta en cada momento a sus necesidades.

En el presente estudio medimos la actividad de 4 enzimas marcadoras de las diferentes zonas del acino hepático, para identificar el origen periportal (PP) o perivenoso (PV) de las fracciones de hepatocitos aislados. Estas son las enzimas más frecuentemente ensayadas para ese fin [22,259].

Todas las fracciones de hepatocitos controles mostraban actividad de alanina aminotransferasa (ALAT), enzima marcadora de la zona PP [164,233]. Sin embargo dicha actividad fué menor en F2, aumentando progresivamente en las siguientes fracciones, siendo la actividad en F6 1,6 veces superior a la de F2 (Fig. 15, Tabla 6). Por el contrario, la actividad de la glutámico deshidrogenasa (GDH), enzima marcadora de la zona PV [164,233] fué mayor en la fracción F2, disminuyendo progresivamente hasta F6, con una actividad 2,3 veces superior en F2 que en F6 (Fig. 15, Tabla 6).

También se midieron las enzimas láctico deshidrogenasa (LDH) y piruvato Kinasa (PK), marcadoras de la zona PP y PV respectivamente [75,164,233]. Aunque encontramos actividad de ambas enzimas en todas las fracciones de hepatocitos, éstas fueron similares en todas ellas, no existiendo diferencias significativas entre las fracciones extremas en ninguna de las 2 actividades enzimáticas (datos no mostrados). Esto probablemente se debe a que a esta edad no existe una clara predominancia de dichas enzimas dentro del acino hepático.

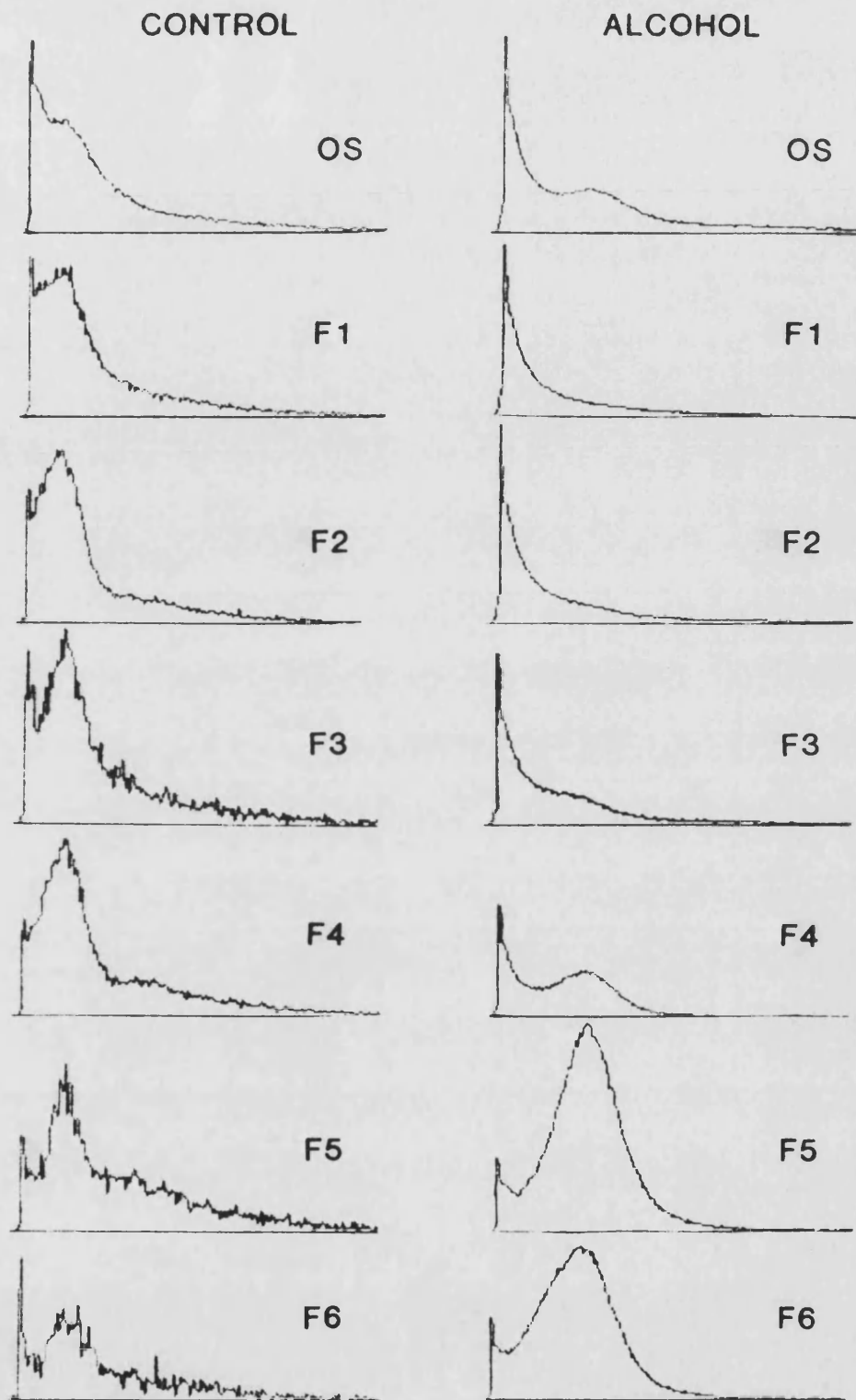


Figura 14. Análisis, mediante citofluorimetría de flujo, de la distribución de tamaños de la suspensión original (OS) y de las subpoblaciones de hepatocitos (F1-F6), aislados de ratas controles y expuestas al alcohol. En ordenadas número de células y en abscisas dispersión frontal de luz (proporcional al tamaño celular). El número de células medidas varió entre $2,5 \times 10^3$ y 1×10^6 .

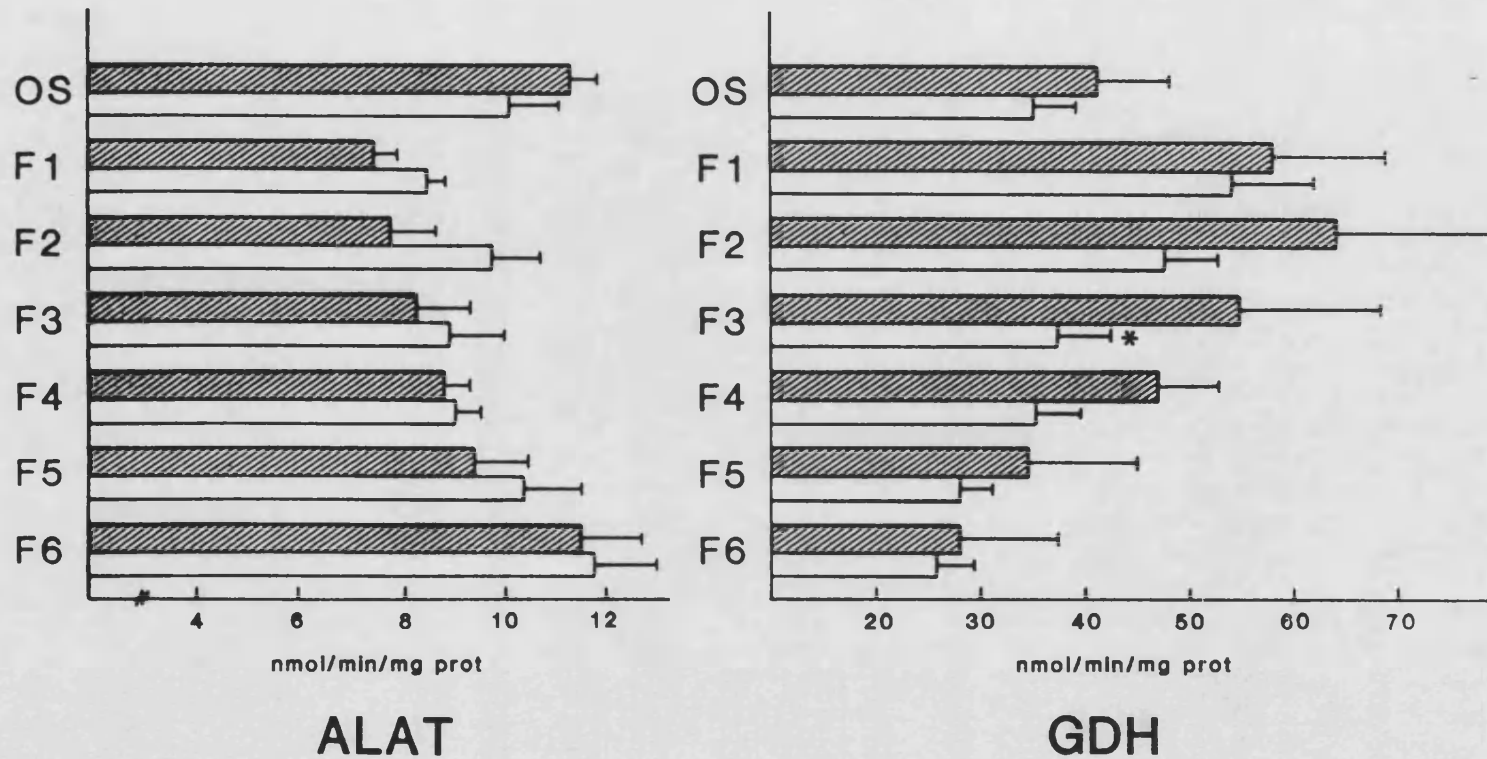


Figura 15. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALAT) y de la glutamato deshidrogenasa (GDH), en la suspensión original de hepatocitos (OS) y en las subpoblaciones de hepatocitos (F1-F6), aislados de hígados de ratas de 12 días controles (▨) y pre + postnatalmente expuestas al alcohol (□). Cada valor representa la media \pm S.E. de 5-6 experimentos diferentes. Diferencias significativas respecto a los controles (* $p \leq 0,05$).

TABLA 6. Relación entre las actividades enzimáticas de los hepatocitos F6 y F2, y entre los de ratas controles y tratadas con etanol.

	F6/F2		Control/Etanol	
	Control	Etanol	F2/F2	F6/F6
Alanina aminotransferasa	1,66*	1,17	0,69	0,98
Glutámico deshidrogenasa	0,44*	0,55**	1,34	1,08
Alcohol deshidrogenasa	0,52**	0,79	1,60**	1,07
Aldehído deshidrogenasa: alta K_m	0,47**	0,59	1,12	0,90
baja K_m	0,49*	0,64	1,14	0,87

Relación obtenida de los datos de las figuras 15 y 16. Diferencias significativas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

La figura 16 muestra la actividad, en las diferentes fracciones de hepatocitos controles, de las enzimas que metabolizan el alcohol: alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) de alta y baja K_m . Su patrón de distribución fué similar al de la GDH, es decir, disminuyendo de F2 a F6. Estas actividades eran 1,8, 2,1 y 2,0 veces mayores en F2 que en F6, respectivamente (Tabla 6).

Las actividades de las enzimas marcadoras de zona, de las fracciones de hepatocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol, presentaron ciertas diferencias con respecto a las controles (Fig. 15, Tabla 6). Por un lado, aunque la actividad de la ALAT fué similar a la de los controles, no presentó el mismo patrón de distribución ya que los valores más bajos aparecieron en las fracciones intermedias, no habiendo diferencias significativas entre F2 y F6. Por otra parte, la GDH mostró el mismo patrón de distribución que en las fracciones controles, es decir, disminuyendo progresivamente de F2 a F6, aunque la actividad fué menor que en los hepatocitos controles.

Al igual que ocurría en las fracciones de hepatocitos controles, encontramos actividad LDH y PK en todas las fracciones procedentes de ratas tratadas con alcohol, pero tampoco existía una clara predominancia de dichas actividades en ninguna de ellas.

Con respecto a las enzimas que metabolizan el etanol en estos hepatocitos hay que destacar que, aunque el patrón de distribución fué similar al de los controles para las tres enzimas (Fig. 16), no encontramos en ningún caso diferencias significativas entre las fracciones extremas. Por otra parte, la actividad de las tres enzimas era menor en la mayoría de las fracciones con respecto a los controles, siendo dicha disminución especialmente marcada en las primeras fracciones y para la ADH.

1.4.5. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.

1.4.5.1. RESULTADOS CUALITATIVOS.

Los hepatocitos de todas las fracciones, tanto los obtenidos de ratas controles como los de tratadas con alcohol, presentaban una preservación ultraestructural buena excepto en la fracción F1, en donde se observaron algunas células muertas y muchos agregados celulares, como se ha mencionado anteriormente.

Los hepatocitos de la fracción F2 se caracterizaban por tener un retículo endoplásmico liso (REI) relativa-

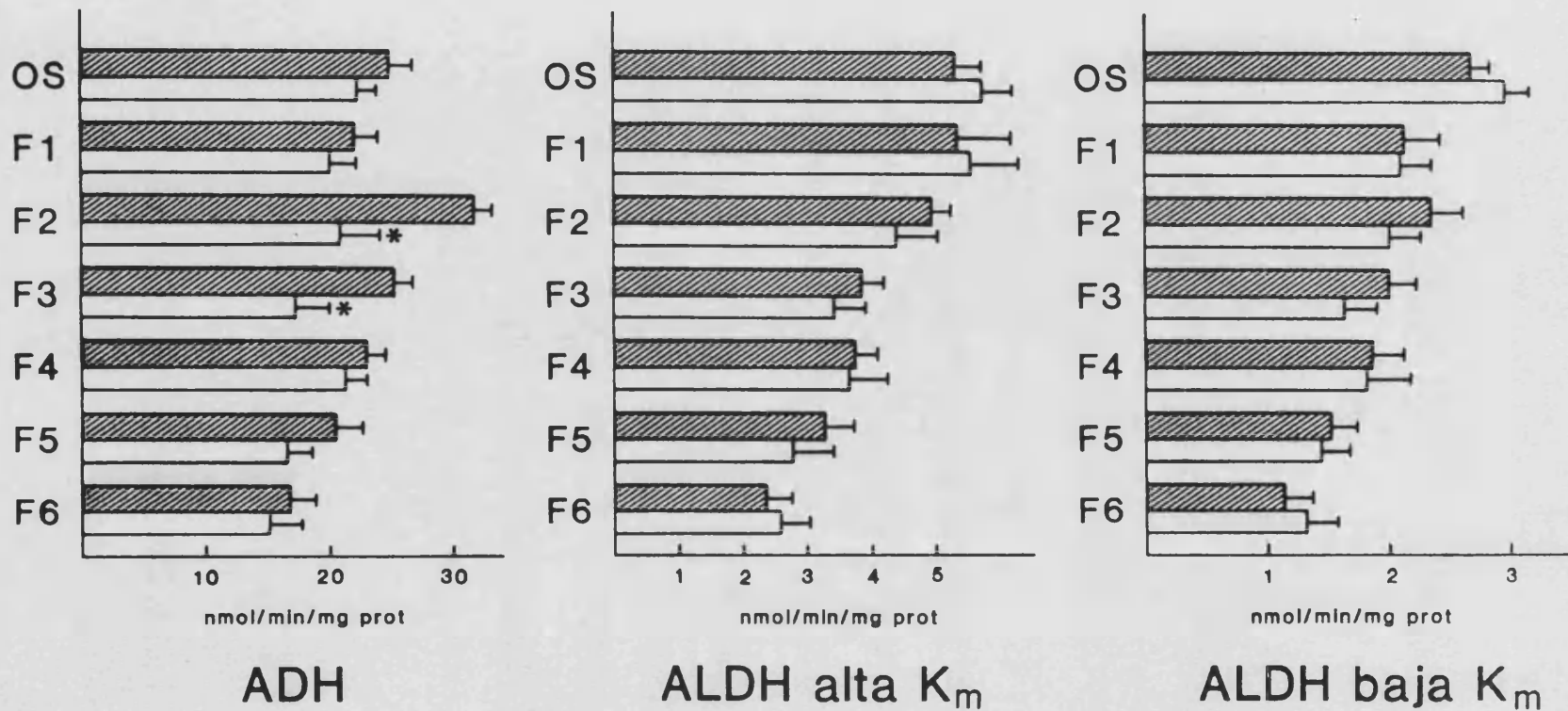


Figura 16. Actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y de las aldehído deshidrogenasas (ALDH) de alta y baja K_m en la suspensión original de hepatocitos (OS) y en las subpoblaciones de hepatocitos (F1-F6), aislados de hígados de ratas de 12 días. Símbolos como en la Fig. 15. Cada valor representa la media \pm S.E. de 5-6 experimentos diferentes. Diferencias significativas respecto a los controles (* $p \leq 0,01$).

mente abundante, mitocondrias pequeñas, escasos ribosomas libres y pocas partículas de glucógeno, las cuales, cuando aparecían, lo hacían en forma de partículas α aisladas. En cambio, en los hepatocitos F6 el glucógeno se presentaba en grandes masas compactas, y tenían un retículo endoplásmico rugoso (REr) prominente, ribosomas libres, un REl poco desarrollado y un aparato de Golgi más prominente que en F2 (Figs. 17 y 18). Las células de las fracciones F3, F4 y F5 presentaban una morfología intermedia entre F2 y F6.

Las características ultraestructurales de los hepatocitos de las ratas tratadas con alcohol eran similares a las de las controles. Sin embargo, $\approx 30\%$ de las células presentaban un aparato de Golgi sin cisternas, compuesto principalmente por vesículas pequeñas, lo que era especialmente marcado en F2.

Hay que destacar que en las fracciones F3, F4, F5 y F6 obtenidas de ratas tratadas con alcohol se encontró un tipo especial de hepatocitos, con una morfología claramente diferente al resto de la población. Estas células, a las que, por su aspecto, llamaremos "células densas", presentaban un citoplasma completamente ocupado por mitocondrias, ribosomas libres y REr (Figs. 19 y 20). Las mitocondrias de estas "células densas" tenían una matriz clara, y eran más grandes que las de las demás células. Su núcleo también estaba alterado, presentando principalmente una mayor proporción de cromatina condensada.

Estos hepatocitos "densos" se encontraron igualmente en secciones ultrafinas de tejido hepático de ratas tratadas con alcohol. La proporción de estas células en las diferentes fracciones era: 0% (F2), 45% (F3), 36% (F4), 28% (F5) y 9% (F6).

En las figuras 17-20 puede observarse algunas características de hepatocitos de diferentes fracciones.

1.4.5.2. RESULTADOS CUANTITATIVOS.

Los resultados cuantitativos referidos al volumen celular medio de los hepatocitos de las diferentes fracciones, mostraron un progresivo aumento de dicho parámetro de F2 a F6, siendo en F6 1,5 veces mayor que en F2 (Fig. 21).

Con respecto a los orgánulos citoplásmicos de los hepatocitos controles, encontramos que la densidad de volumen de mitocondrias, aparato de Golgi, glucógeno y REr era mayor en los hepatocitos F6 que en los F2 (Figs.

Figura 17. Micrografía que muestra la distribución de glucógeno en hepatocitos controles de las subpoblaciones F2 (A) y F6 (B). En las células F2 el glucógeno está disperso en rosetas pequeñas y aisladas, cercanas al retículo endoplásmico liso. En las células F6 el glucógeno aparece en grandes agregados. (A, x 29.151; B, x 23.321).

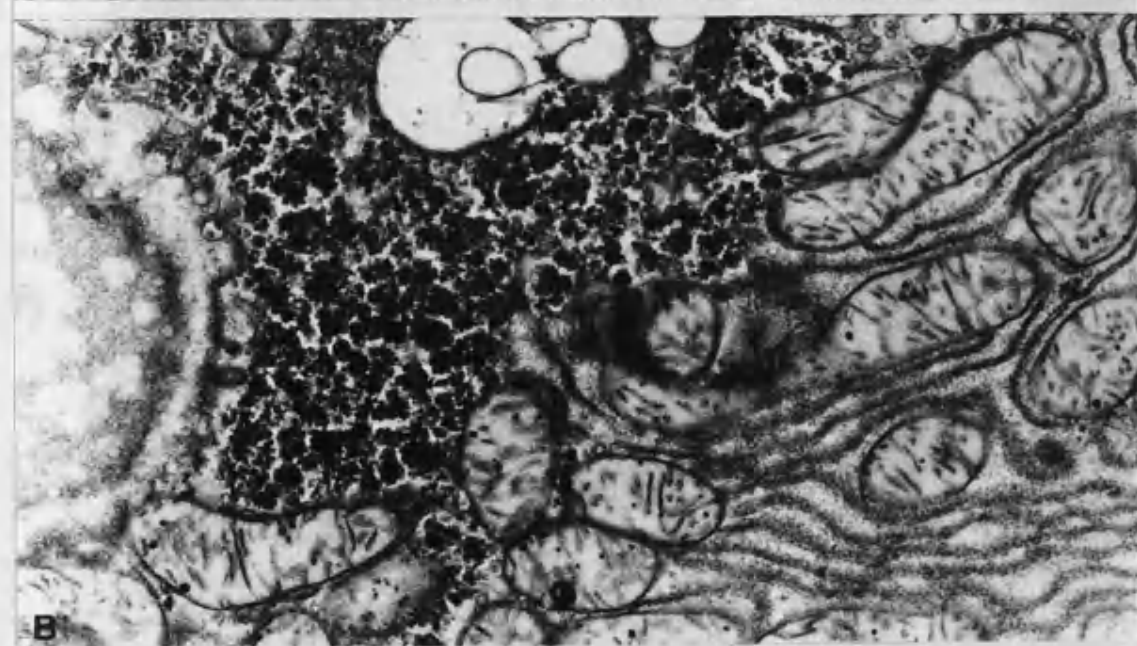
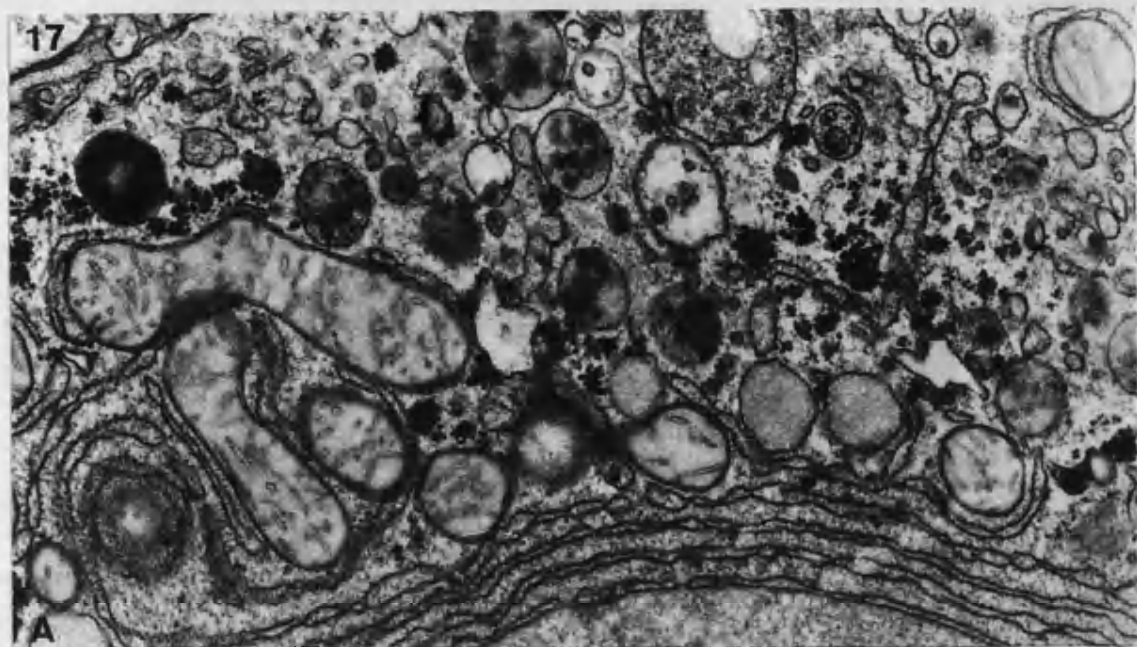
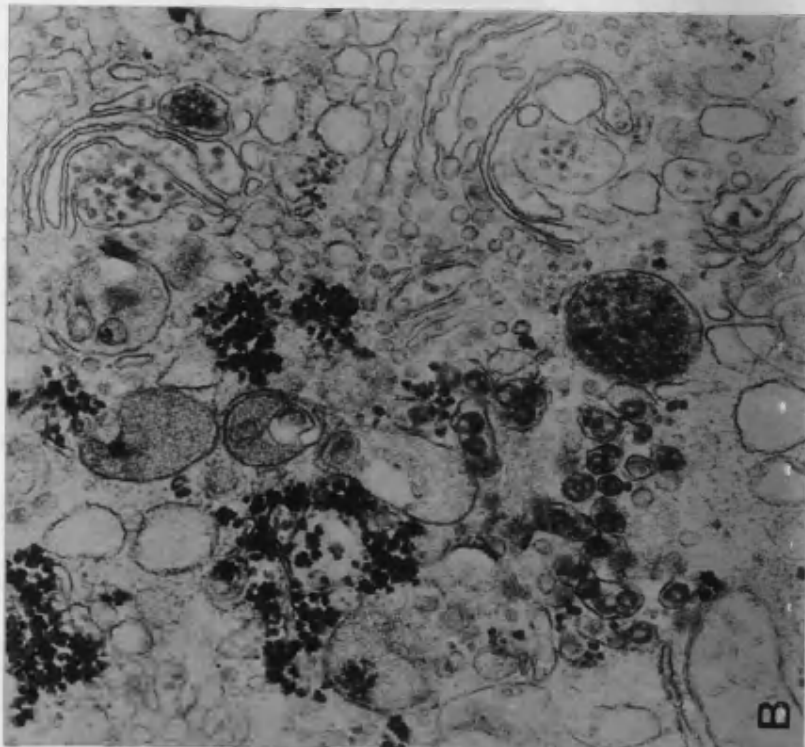


Figura 18. Micrografías que muestran detalles de los hepatocitos controles de las subpoblaciones F2 (A) y F6 (B). En (A) se muestra un área de Golgi, varios perfiles de retículo endoplásmico liso y mitocondrias. En (B) un aparato de Golgi bien desarrollado y muchas vesículas que contienen partículas de lipoproteínas de muy baja densidad. Cabe destacar la buena preservación ultraestructural de los diferentes componentes celulares. (A, x 28.533; B, x 35.917).



UNIVERSIDADE
FACULTAD DE
MEDICINA
LENOIA

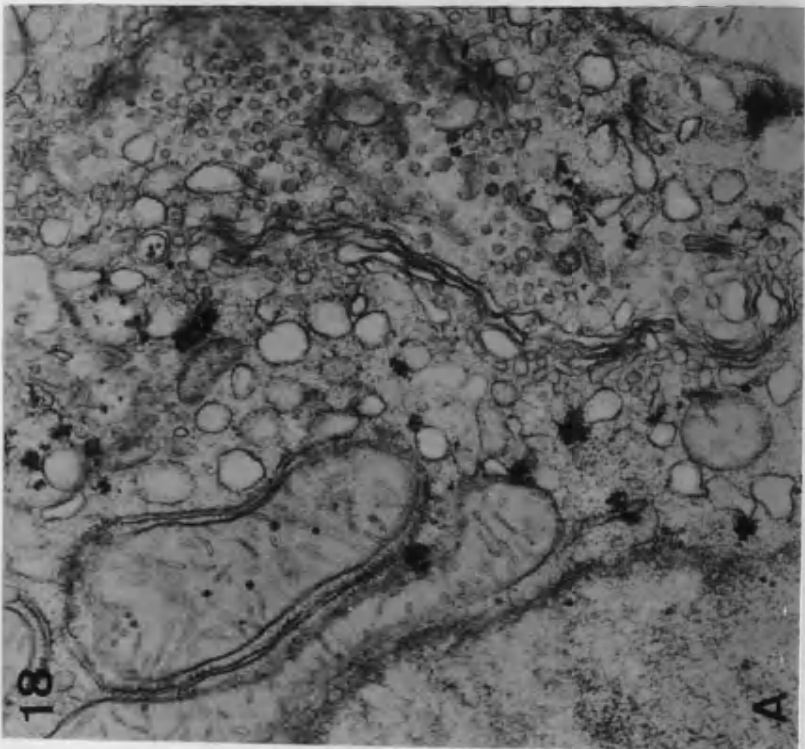


Figura 19. Micrografías que muestran las características ultraestructurales del núcleo de un hepatocito control (A) y un hepatocito "denso" (B). Destaca la diferencia en los patrones de cromatina condensada en los dos tipos celulares. (A, x 15.469; B, x 19.242).

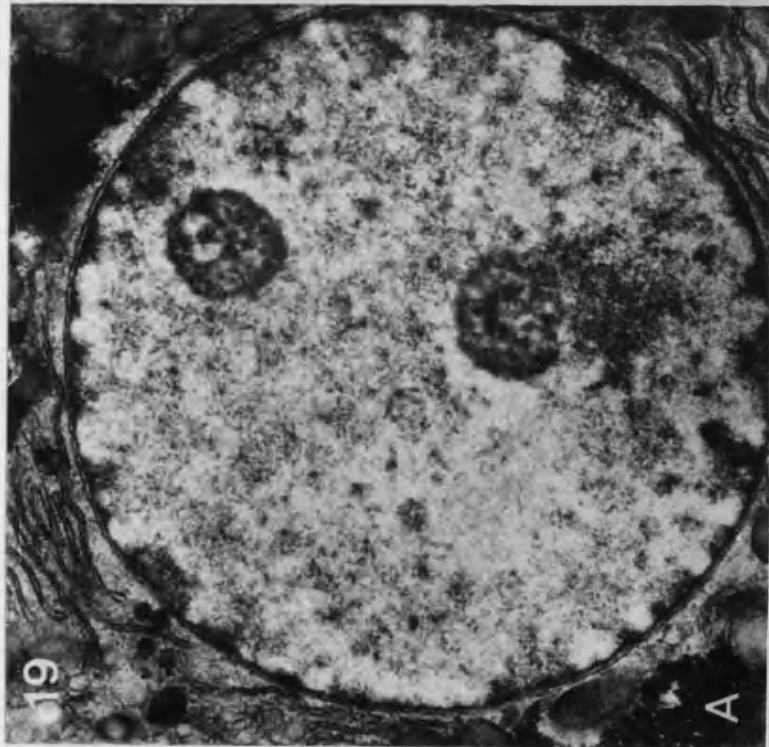
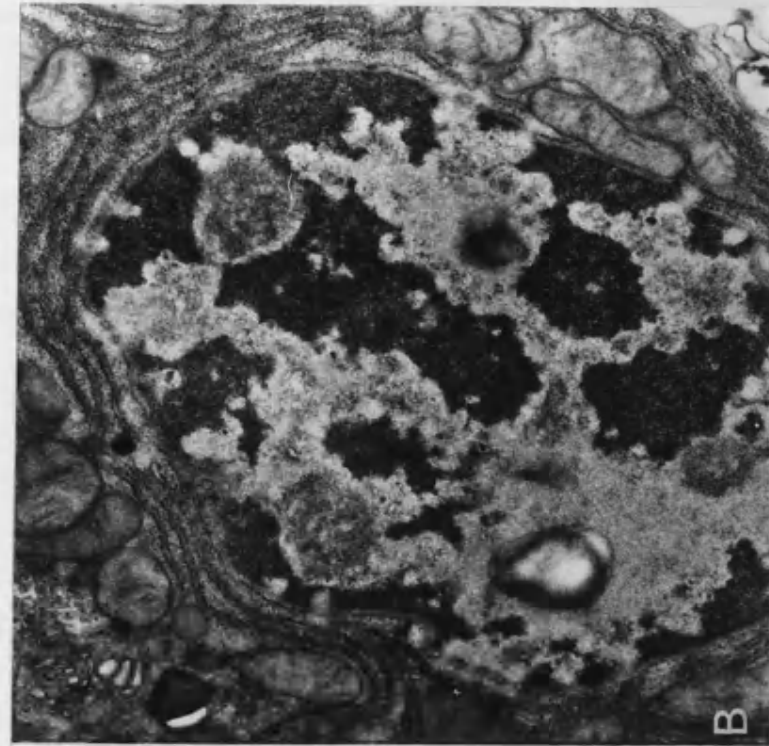
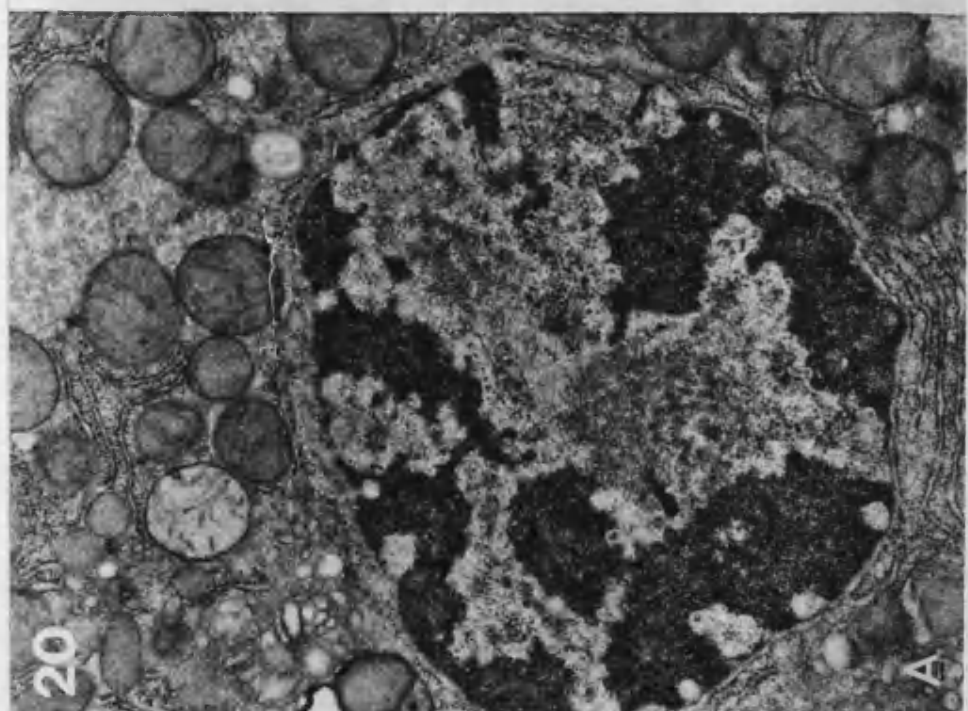
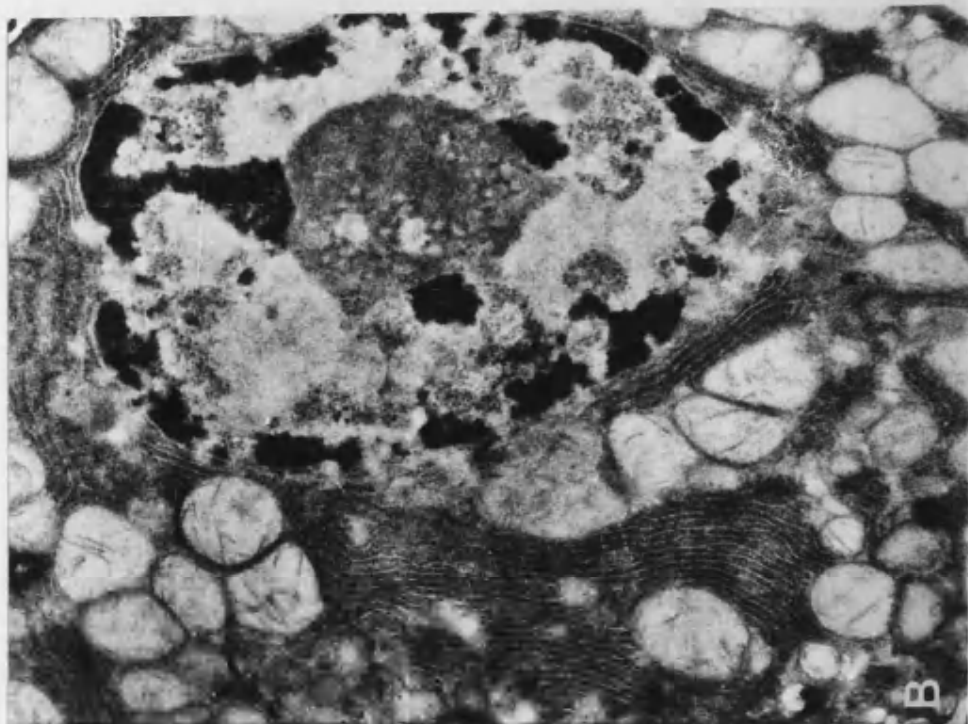


Figura 20. Micrografías que muestran algunas características ultraestructurales de hepatocitos aislados de ratas expuestas al alcohol. (A) Hepatocito con un núcleo de características intermedias entre uno normal y otro "denso". En (B) se muestra un hepatocito "denso" con un citoplasma casi completamente lleno de retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias. El núcleo de esta célula aparece picnótico. (A, x 16.722; B, x 16.722).



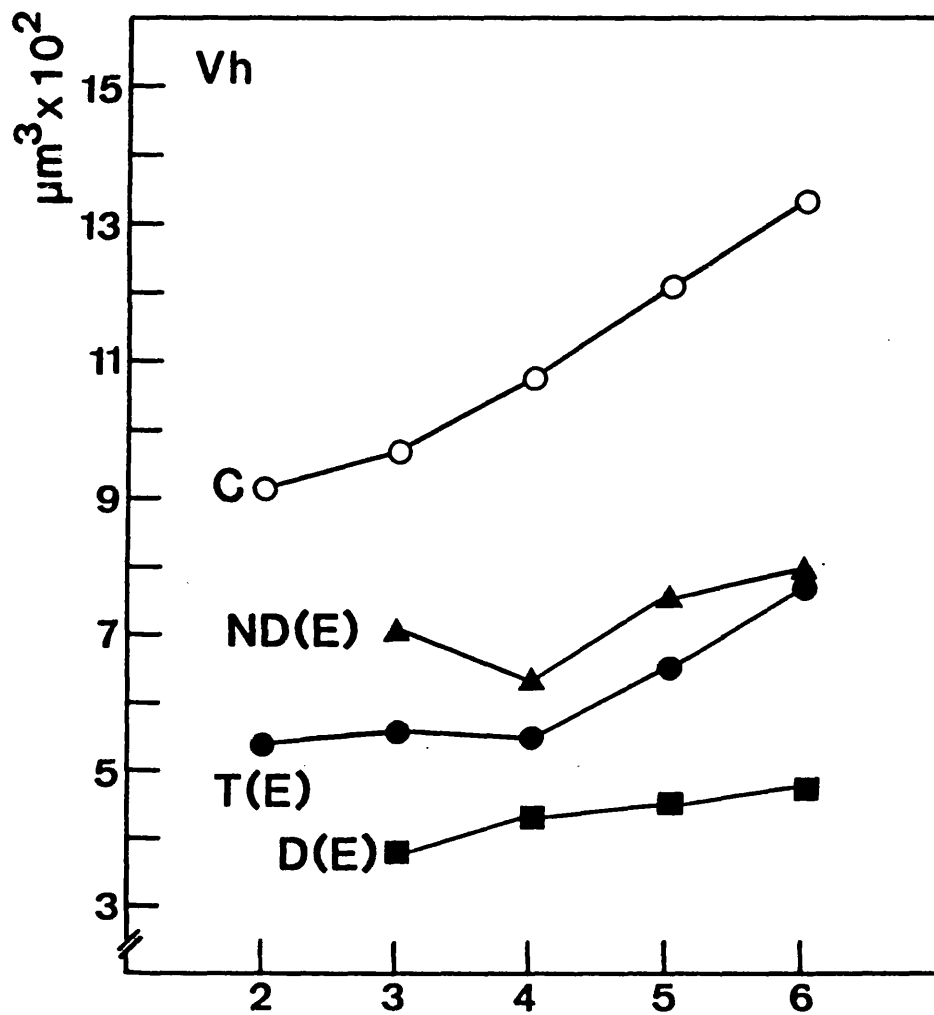


Figura 21. Volumen absoluto de hepatocitos aislados y subfraccionados según su localización en las diferentes fracciones. (O) Hepatocitos controles (C). (●) Hepatocitos tratados con alcohol totales (T(E)). (■) Hepatocitos expuestos al alcohol "densos" (D(E)) y (▲) "no densos" (ND(E)).

22-24). Además, el volumen mitocondrial fué 2,2 veces mayor en los hepatocitos de la fracción F6 que en los de F2, aunque su número total por célula era similar en todas las fracciones. Por el contrario, la densidad numérica mitocondrial y lisosomal, y la densidad de volumen del REI y lisosomas era mayor en las células F2 que en las F6. Los datos estereológicos referentes a los peroxisomas no mostraron diferencias significativas.

Los hepatocitos de ratas expuestas al alcohol mostraron un patrón de distribución del volumen celular y del resto de orgánulos en las diferentes fracciones similar al descrito para las células control. Sin embargo el volumen de las células de todas las fracciones fué menor que sus respectivos controles. Hay que destacar que en los hígados de dichos fetos se encontraron, como se ha dicho, dos tipos distintos de hepatocitos: unos con apariencia normal (similar a la de los controles) y otros que hemos denominado como "células densas". Ambos tipos celulares eran de menor tamaño que sus respectivos controles, especialmente las células densas (Fig. 21).

Los parámetros estereológicos relativos a los diferentes componentes celulares de los hepatocitos de ratas tratadas con alcohol, de las diferentes fracciones, se resumen en las figuras 22-24. De todos ellos cabe destacar que la densidad de volumen de mitocondrias, RER y REI, así como la densidad numérica y el número total de mitocondrias por célula, era mayor que en las controles, en todas las fracciones. Por el contrario el volumen medio mitocondrial y la densidad de volumen del aparato de Golgi y glucógeno, eran menores que en las células controles.

Cuando se compararon los datos estereológicos de las células de las diferentes fracciones procedentes de ratas expuestas al alcohol, en particular la F2 y la F6, con sus respectivos controles, se observó que las mitocondrias y el aparato de Golgi estaban más alterados en la F2, mientras que el glucógeno, RER y REI lo estaban en mayor grado en las células de la fracción F6 (Tabla 7).

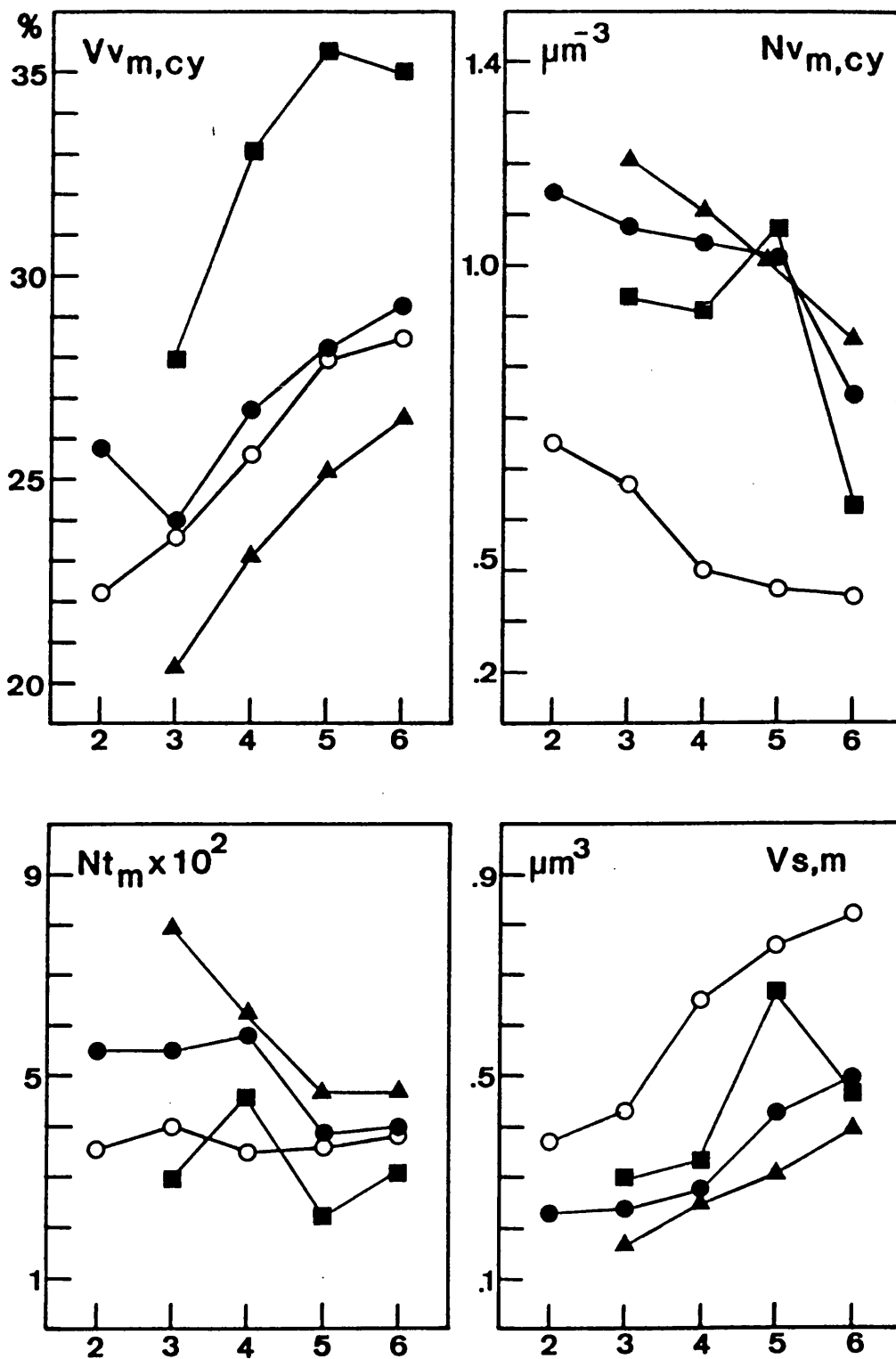


Figura 22. Parámetros estereológicos de las mitocondrias de hepatocitos aislados y subfraccionados, controles y expuestos al alcohol. $Vv_{m,cy}$: densidad de volumen mitocondrial con respecto al citoplasma; $Nv_{m,cy}$: densidad numérica mitocondrial por unidad de volumen de citoplasma; Nt_m : número total de mitocondrias; Vs,m : volumen absoluto medio de una sola mitocondria. Símbolos como en la Fig. 21. Abscisas: número de la fracción.

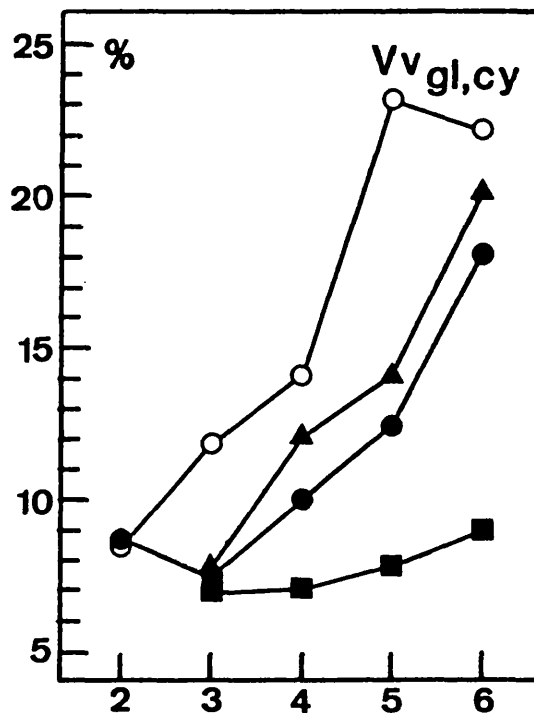
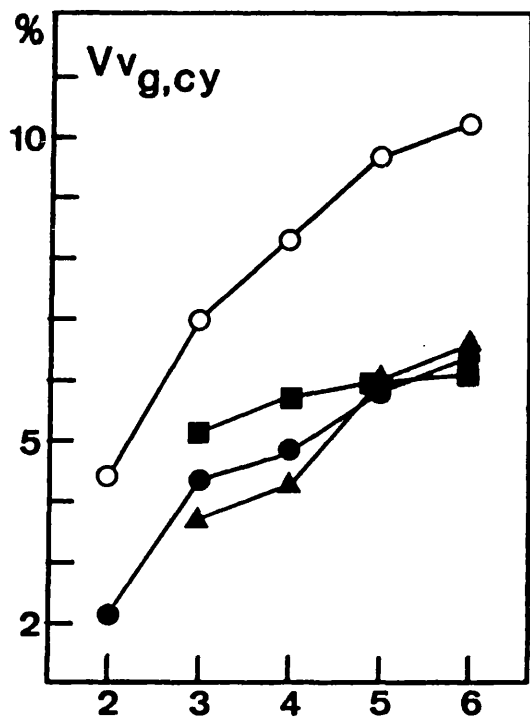


Figura 23. Densidad de volumen del aparato de Golgi (g) y del glucógeno (gl) de hepatocitos aislados y subfraccionados, controles y expuestos al alcohol. Símbolos como en la Fig. 21. Abscisas: número de la fracción.

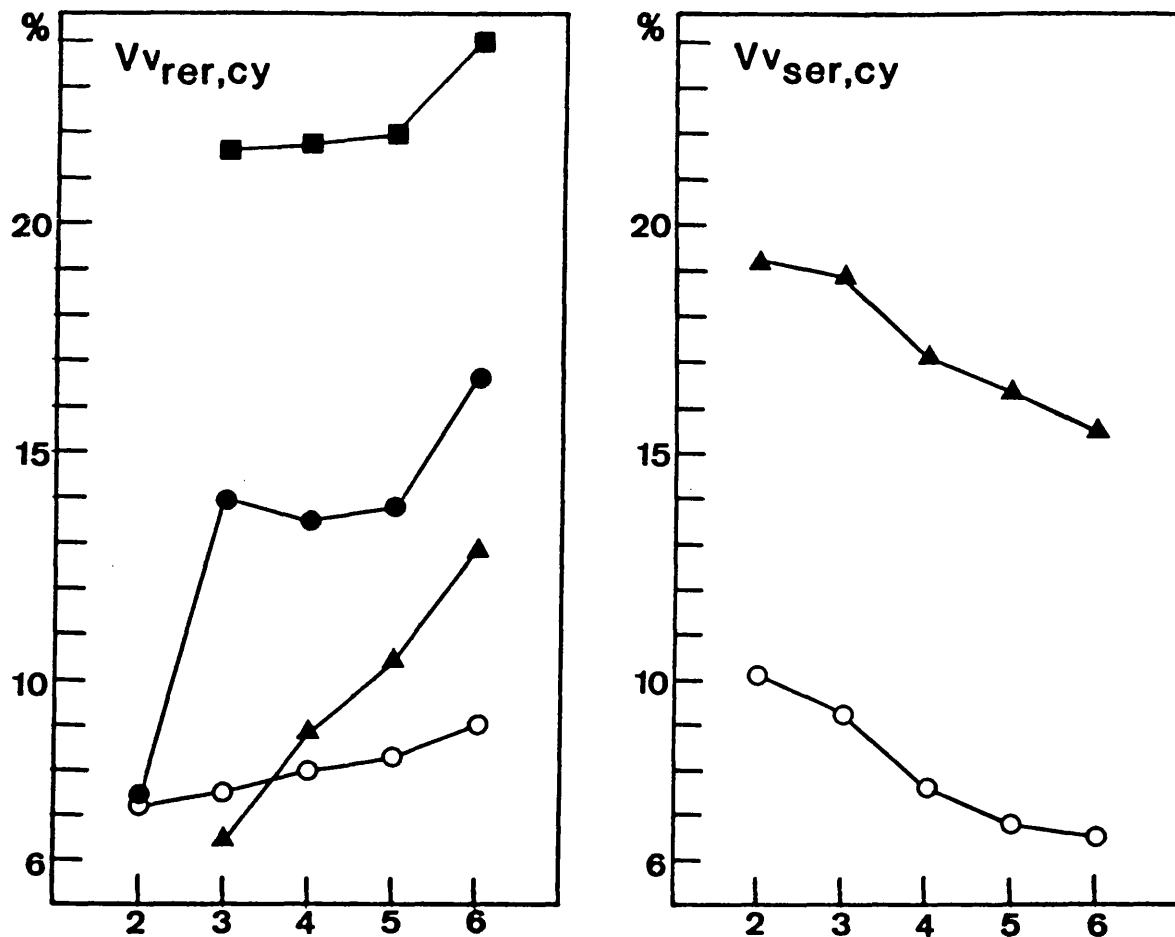


Figura 24. Densidad de volumen del retículo endoplásmico rugoso (rer) y liso (ser) de hepatocitos aislados y subfraccionados, controles y expuestos al alcohol. Símbolos como en la Fig. 21. Abscisas: número de la fracción.

TABLA 7. Relación entre los parámetros estereológicos de los hepatocitos F6 y F2 y entre los de ratas controles (Cont) y tratadas con etanol (Etoh) (población total).

Componente	Parámetro	F6/F2		F2/F2	F6/F6
		Cont	Etoh	Cont/Etoh	Cont/Etoh
Hepatocito	Vh	1,46*	1,44*	1,70*	1,74*
Núcleo	V _{u,n,h}	0,92	0,97	0,89	0,92
	V _n	1,41*	1,31*	2,41*	2,61*
Mitochondria	V _{u,m,cy}	1,28*	1,21*	0,86*	0,97
	S _{u,m,cy}	1,09	1,07	0,93	0,95
	N _{u,m,cy}	0,54*	0,66*	0,57*	0,47*
	N _{t,m}	1,05	0,73	0,66*	0,95
	V _{s,m}	2,21*	2,10*	1,58*	1,66*
Lisosomas	V _{u,l,cy}	0,69*	0,83	0,90	0,75*
	S _{u,l,cy}	0,58*	0,79	0,91	0,65*
	N _{u,l,cy}	0,25*	0,73	0,76*	0,26*
	N _{t,l}	1,05	1,21	0,87*	0,42*
REr	V _{u,rer,cy}	1,25*	2,21*	1,04	0,54*
	S _{u,rer,cy}	1,62*	2,30*	1,10	0,77*
REl	V _{u,rel,cy}	0,64*	0,81	0,53*	0,42*
	S _{u,rel,cy}	0,61*	0,78	0,90	0,71*
Golgi	V _{u,g,cy}	2,08*	3,00*	2,08*	1,44*
Glucógeno	V _{u,g1,cy}	2,65*	2,08*	0,98	1,17
Gotas lipídicas	V _{u,lid,cy}	1,07	1,08	1,35*	1,35*
	S _{u,lid,cy}	1,13	1,08	3,97*	3,05*
	N _{u,lid,cy}	1,13	0,98	1,25*	1,45*
	N _{t,lid,cy}	2,10*	1,53*	1,71*	2,28*
Peroxisomas	V _{u,p,cy}	0,93*	1,29*	0,86*	0,62*
	S _{u,p,cy}	1,14	1,12	0,96	0,98
	N _{u,p,cy}	0,86	1,10	0,94	0,74*
	N _{t,p,cy}	0,77	1,77*	2,54*	1,10

V_u, densidad de volumen; S_u, densidad de superficie; N_u, densidad numérica; cy, citoplasma; h, hepatocito. El primer subíndice corresponde al componente celular y el segundo al volumen de referencia. Diferencias significativas (*p ≤ 0,05).

2. ESTUDIO DE LOS ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.

2.1. CONSIDERACIONES METODOLOGICAS.

Para establecer los cultivos primarios de astrocitos se partió de cerebros de fetos de 21 días de gestación, ya que a esta edad existe una proporción elevada de astroblastos y, por contra, quedan escasos precursores de las neuronas (Fig. 2). Algunos autores establecen dichos cultivos a partir de ratas neonatas, que presentan la ventaja frente al descrito de no requerir el sacrificio de la madre. Sin embargo, la utilización de ratas neonatas era un inconveniente para nuestros propósitos ya que:

- a) Los cultivos que se establecen a partir de estas ratas pueden presentar una elevada contaminación de microglía.
- b) Mientras que el período de gestación en las ratas controles es relativamente constante ($21,5 \pm 0,4$ días), en las ratas alcohólicas puede presentar mayores variaciones ($22,9 \pm 0,6$) [224].

Una vez disecados los hemisferios cerebrales en condiciones estériles, se disgregaron por medios mecánicos y no por medios enzimáticos, como utilizan otros autores. De esta forma se evitan alteraciones en la composición química de la membrana celular, lo cual podría derivar en una distinta adhesión al soporte, y en alteraciones secundarias en algunas enzimas ligadas a la membrana plasmática, en las que estábamos interesados [77,79]. Esta disociación mecánica se acompaña de una agitación con un vórtex a máxima velocidad. Con este paso se destruyeron los precursores neuronales que aún persisten a los 21 días así como gran parte de las neuronas maduras. La no destrucción de estos elementos conllevaría a la obtención, durante los primeros días de cultivo, de cultivos mixtos (neuronas + astrocitos), lo que no era de desear en nuestro caso.

A continuación se realizó un filtrado de la suspensión celular a través de una malla Nitex (90 μ m de poro), que tiene como finalidad eliminar agregados, capilares y, fundamentalmente, porciones de meninges que puede ser fuente de contaminación por elementos celulares no nerviosos.

A lo largo de todo el cultivo se cambió el medio cada 3 ó 4 días, para asegurar que las células tuviesen suficiente aporte de nutrientes para su crecimiento y

desarrollo. El contenido de suero y de glucosa en el medio fué mayor al principio del cultivo, disminuyendo posteriormente ya que durante los primeros días, como se expondrá más adelante, la mayoría de las células se multiplican activamente y requieren un gran aporte energético. Al final del cultivo la división celular es menor (aunque hay un cierto porcentaje de células que sigue dividiéndose), ya que principalmente se produce diferenciación celular con un claro desarrollo de los procesos gliales, lo que requiere un aporte energético menor.

Algunos autores añaden dibutiril-AMP cíclico al medio en la 2ª semana de cultivo, para inducir más rápidamente la diferenciación morfológica y bioquímica de las células. En nuestro caso no ha sido utilizado este procedimiento ya que, aunque se ha descrito una aparente mejoría en dicha diferenciación morfológica y bioquímica, también se ha encontrado la aparición de astrocitos de tipo reactivo característicos de las gliosis [232].

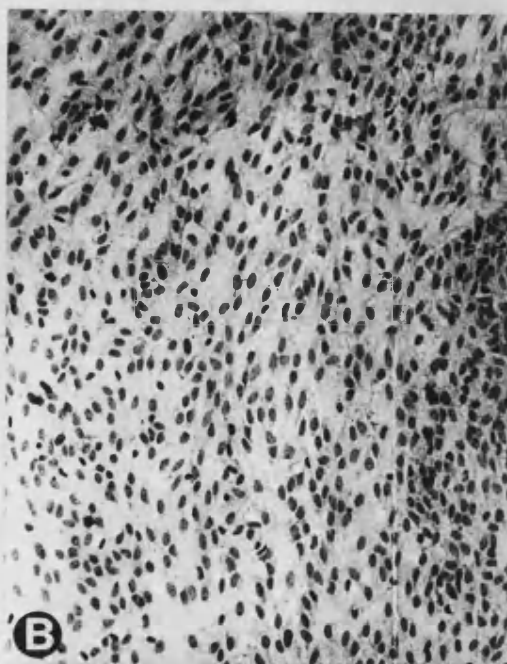
En las primeras series de cultivo obtuvimos una contaminación por hongos elevada, incluso superior al 50% en algunos casos, posiblemente por el entorno ambiental. Para disminuir dicha contaminación se introdujo un fungicida y antibióticos en el medio de cultivo, con lo que se consiguió que dicha contaminación fuese muy escasa, no alterándose ni el crecimiento ni la diferenciación celular en presencia de ambas sustancias.

2.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

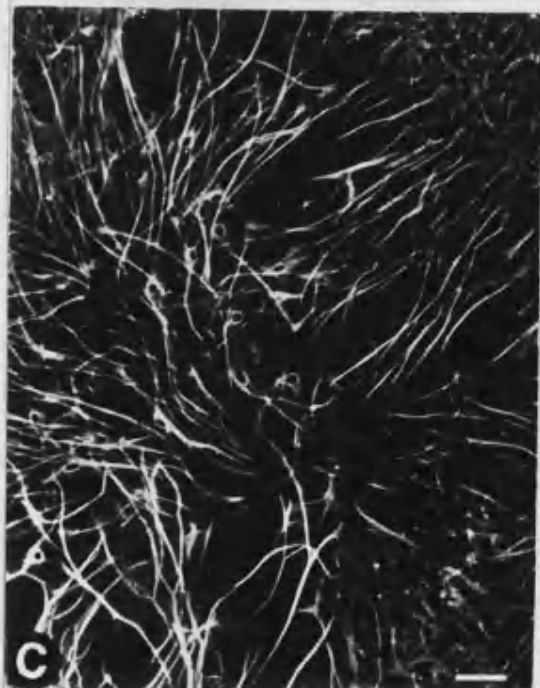
La observación de los cultivos de células controles mediante microscopía de contraste de fases mostró que, tras sedimentar las células, éstas se dividían activamente. Inicialmente (≈ 3 días) los cultivos estaban compuestos principalmente por astroblastos, que presentaban una morfología aplanada y poligonal. En fase posterior (7 días) se vieron muchos astrocitos maduros que mostraban la típica morfología estrellada de estas células. De todas ellas partían 3 ó 4 procesos que formaban un entramado, siendo más evidente este patrón en los cultivos de 15 ó más días (Fig. 25). Estas características de los cultivos controles eran similares a las descritas por otros autores [98,232].

Mediante la tinción de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), marcadora de astrocitos [27,52], se comprobó que los cultivos estaban compuestos en un 80-85% por astrocitos, siendo el resto células conjuntivas y otros tipos celulares, lo que demostraba que la mayor parte de las células eran de naturaleza glial. La cuanti-

Figura 25. En A, C y D se muestra la fluorescencia indirecta de astrocitos controles incubados con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP. La unión de éste se demostró mediante un anticuerpo anti-Ig de ratón obtenido de cabra y conjugado con FITC. (A) Astroblasto poligonal que muestra una distribución reticular de los filamentos intermedios. (C) Micrografía a bajos aumentos de astrocitos de 14 días. En (D) se muestra astrocitos de la misma edad de cultivo que presentan una clara diferenciación de sus procesos. La micrografía mostrada en (B) corresponde a una tinción con Giemsa de un cultivo similar al de (C). (A, x 626, barra = 10 μ m; B, x 96; C, x 96, barra = 50 μ m; D, x 395, barra = 10 μ m).



UNIVERSITARIA
FACULTAD DE
MEDICINA
BIOLOGIA



ficación de la intensidad de la fluorescencia de la GFAP mediante densitometría demostró un incremento de dicha proteína a lo largo del cultivo (resultados no mostrados), que ocurría paralelamente a la diferenciación morfológica de los astrocitos (Figs. 25 y 26).

Basándonos en el estudio del contenido y distribución de GFAP, resultados preliminares y que no se incluyen en este trabajo demuestran que la presencia de alcohol en el cultivo induce 2 efectos:

- a) Una mayor proporción de células inmaduras o poligonales al final del cultivo.
- b) Una disminución en el contenido de la GFAP (Fig. 26).

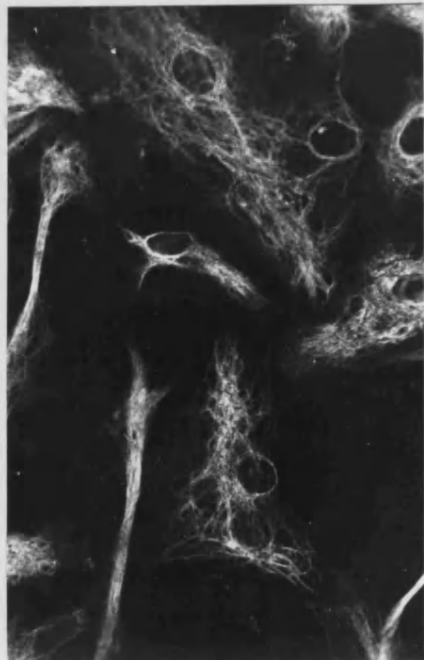
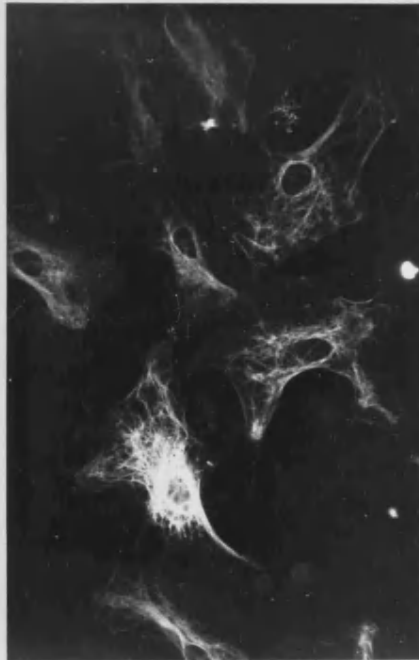
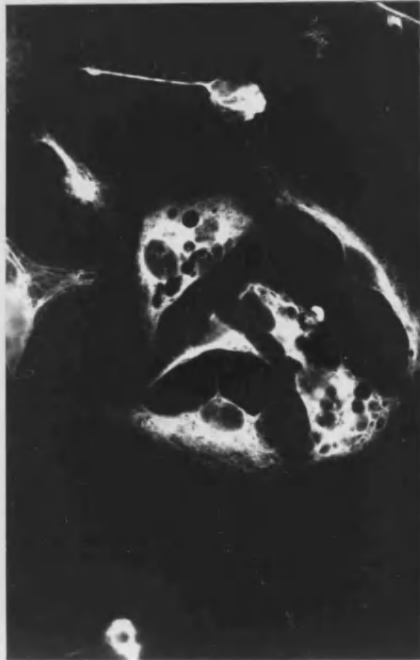
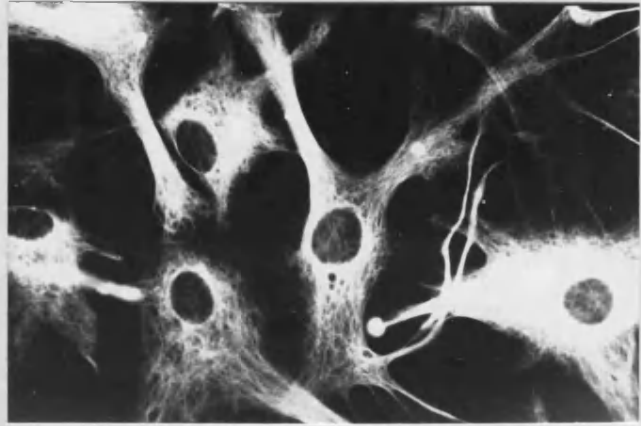
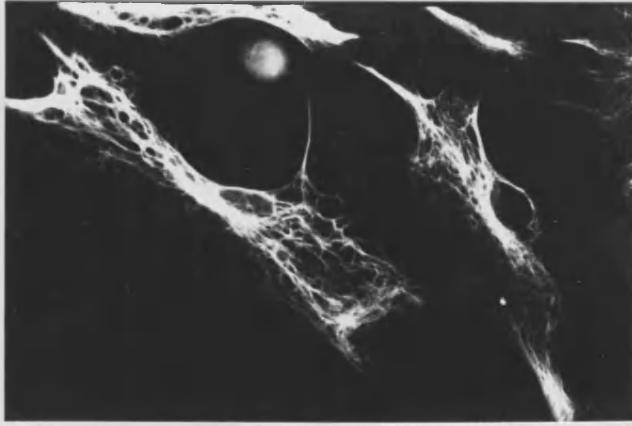
Asímismo, los cultivos procedentes de ratas tratadas con alcohol presentaron tanto un retraso en la maduración de los astrocitos, como un menor contenido de dicha proteína al final del cultivo (Fig. 26); dichos efectos se acentuaban cuando estas células crecieron en presencia de alcohol.

2.3. CRECIMIENTO DEL CULTIVO.

Los cultivos primarios de astrocitos procedentes de ratas controles mostraron un progresivo aumento del contenido de proteínas y de ADN (Figs. 27 A y 28 A), siendo dicho aumento al final del cultivo 2,5 y 6,2 veces superior a los valores iniciales, respectivamente. Puesto que este último parámetro indica el número de células por tratarse de células mononucleadas (diploides), su aumento se puede interpretar como proliferación del número de células. El incremento del contenido de proteínas y de ADN fué muy rápido en la primera semana de cultivo, en la que se produjo el $\approx 60\%$ del incremento total tanto de proteínas como de ADN, y más lento en las 3 semanas siguientes. Puesto que el contenido de ADN siguió incrementando hasta el final del cultivo, esto indicaría que existe un cierto porcentaje de la población de astrocitos que se sigue dividiendo.

La adición de alcohol al medio indujo una disminución, a lo largo de todo el cultivo, tanto del contenido de proteínas como de ADN, que fué más acusado en las células expuestas a concentraciones más altas de etanol. Así, en los astrocitos expuestos a 25 ó 100 mM de etanol se encontró que al final del cultivo dicha disminución era del 25% o del 39% en lo que a contenido de proteínas se refiere, mientras que en el caso del ADN era del 32% ó 40%, respectivamente, con respecto a los controles. Esta

Figura 26. Micrografías que muestran el patrón de distribución de la GFAP, revelado igual que en la Fig. 25. La imagen superior de la izquierda corresponde a un cultivo control de 4 días cuyo citoesqueleto, poco desarrollado, presenta un patrón reticular (x 529). La superior derecha muestra varios astrocitos de 15 días con la morfología y patrón de distribución de la GFAP propios de astrocitos maduros (x 529). La inferior izquierda corresponde a astrocitos de 4 días procedentes de fetos expuestos prenatalmente al alcohol, cultivados en presencia de 25 mM de etanol. Puede verse la diferencia con el correspondiente control en la imagen superior izquierda (x 529). En las imágenes inferiores central y derecha se muestran astrocitos de 20 días cultivados en presencia de 25 mM de etanol. Puede apreciarse el patrón inmaduro de distribución de la GFAP y el menor desarrollo de los procesos (central, x 330; derecha, x 529).



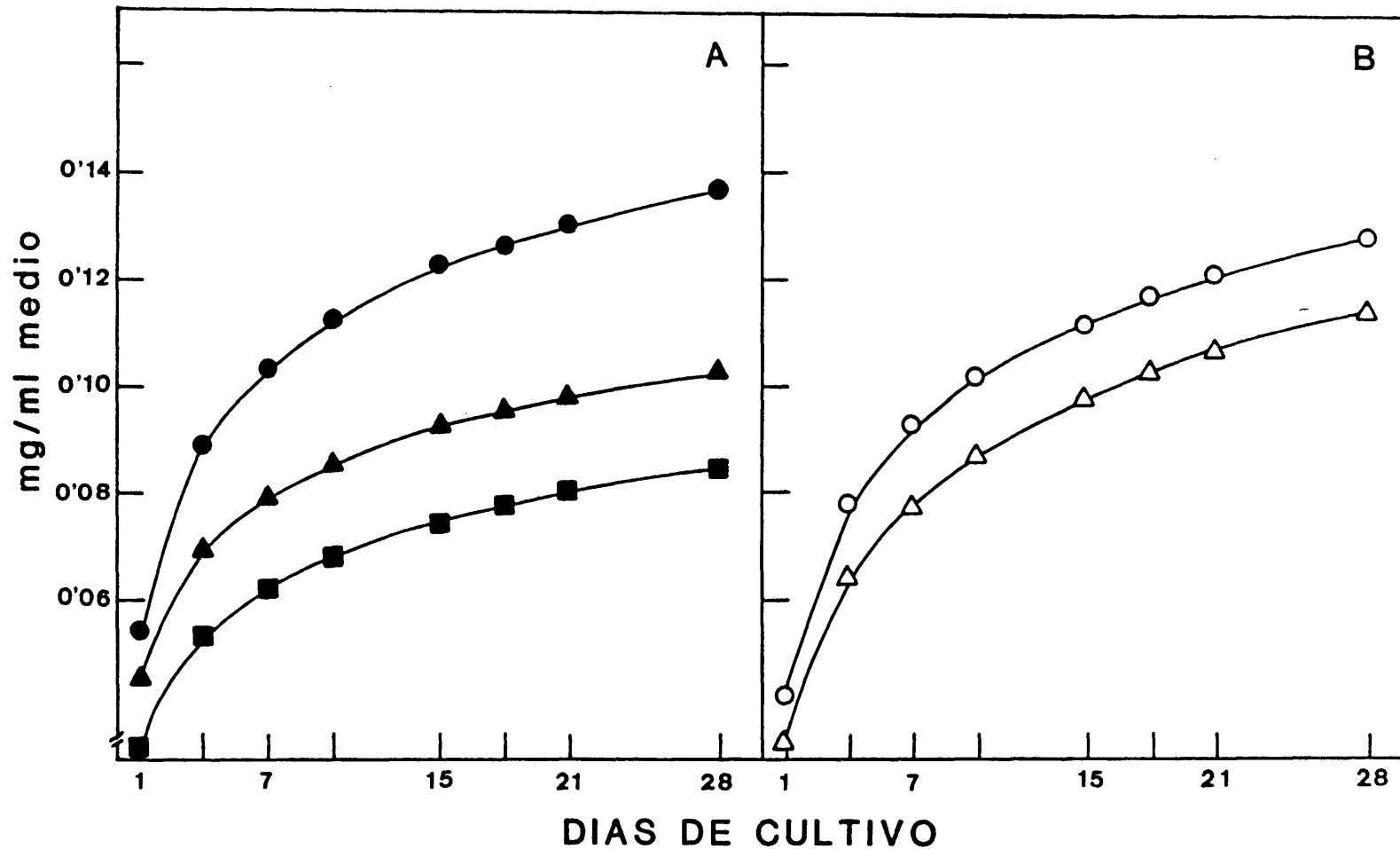


Figura 27. Contenido de proteína en astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo de cultivo. Astrocitos controles (●), expuestos "in vitro" a 25 mM (▲) o 100 mM (■) de etanol. Astrocitos de fetos expuestos al alcohol "in vivo" (○), e "in vitro" (25 mM) (△). Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes.

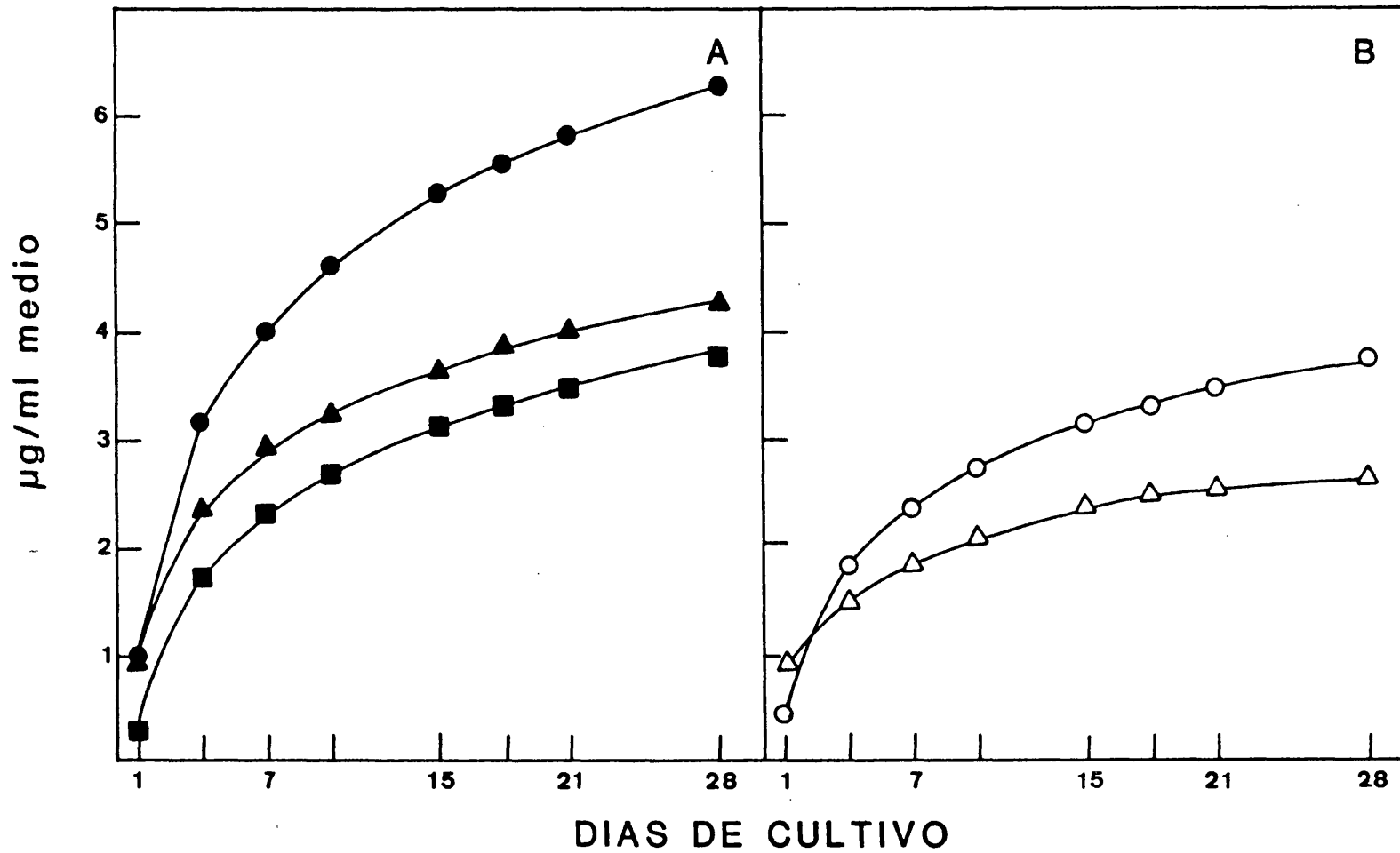


Figura 28. Contenido de ADN en astrocitos obtenidos de fetos control (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo de cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes.

disminución en el contenido de ADN expresa que el número total de células disminuye considerablemente cuando crecen en presencia de alcohol.

Los cultivos procedentes de cerebros de fetos expuestos al alcohol mostraron un patrón de crecimiento similar al control, con un aumento progresivo del contenido de proteínas y de ADN, que fué máximo para los dos parámetros en la primera semana de cultivo ($\approx 60\%$ del incremento total) (Figs. 27 B y 28 B). Sin embargo, durante todo el cultivo se observó una disminución de dichos contenidos, siendo esta disminución a los 28 días de cultivo del 7% y 40% para las proteínas y el ADN, respectivamente, con respecto a los controles. Estos resultados parecían indicar que las células germinales de los astrocitos están ya originalmente dañadas. La adición de alcohol a estos cultivos indujo igualmente un menor crecimiento, observándose una disminución del 17% en el contenido de proteínas y del 59% en el de ADN al final del cultivo, con respecto al control, lo que nuevamente indicaría que el etanol inhibe la proliferación celular.

Estos datos concuerdan con los obtenidos en el departamento de cultivos de tejidos de este Instituto (no mostrados aquí), donde se encontró que el número de células por placa aumentaba progresivamente a lo largo del cultivo. No encontraron diferencias significativas en el número inicial de células, tanto cuando se obtuvieron de cerebros de fetos controles como de expuestos al etanol, sembrándose un número similar de células por placa en todos los cultivos ($\approx 0,8 \times 10^6$). Sin embargo, se observó un menor crecimiento, que parecía ser dosis-dependiente, en las células expuestas al etanol, aunque la viabilidad celular fué superior al 95% en todos los casos.

La relación entre contenido de proteínas y de ADN, que indica el tamaño celular [23], disminuyó la primera semana de cultivo, y más lentamente durante las siguientes. Estos datos concuerdan con las imágenes citológicas (Figs. 25 y 26), en las que se puede observar que en los primeros días de cultivo las células son grandes y poligonales, y a medida que maduran, aunque van desarrollando procesos, el volumen celular total va disminuyendo. En las células expuestas a 100 mM de etanol dicha relación era mayor que en los controles al inicio del cultivo, igualándose a éstos posteriormente.

Los astrocitos procedentes de animales tratados con alcohol, presentaron un aumento de la relación entre el contenido de proteínas y de ADN que no llegó a alcanzar los valores de los controles, especialmente cuando crecían en presencia de etanol. Hay que destacar que dicha

relación expresa el tamaño celular global, pero sin hacer referencia al volumen ocupado por los procesos celulares, lo que sería un indicador morfológico de maduración celular.

2.4. SINTESIS DE PROTEINAS, ARN Y ADN.

Para clarificar los resultados obtenidos anteriormente, se estudió la síntesis de proteínas, ARN y ADN mediante la incorporación de precursores radiactivos (leucina, uridina y timidina, respectivamente).

El análisis de la incorporación de ^3H -leucina en astrocitos procedentes de ratas controles, mostró un aumento progresivo de la captación de dicho precursor, alcanzándose el máximo a los 15 días de cultivo (con un valor 4 veces superior al inicial), y disminuyendo $\approx 35\%$ de dicho valor en días posteriores (Fig. 29 A). Esta es la curva típica que indica un crecimiento exponencial durante los días iniciales de cultivo, al que sigue una fase de escasa división celular que correspondería a la diferenciación celular. La caída de la curva a partir de los 15 días podría indicar cambios en el metabolismo celular. La presencia de alcohol no alteró el patrón de incorporación, aunque disminuyó significativamente a los 8 y 21 días de cultivo en las células expuestas a 100 mM de etanol.

En astrocitos procedentes de fetos expuestos al alcohol, el patrón de incorporación de ^3H -leucina, a diferentes tiempos de cultivo, varió con respecto al de los controles (Fig. 29 B). Así, la incorporación aumentó rápidamente en los primeros días, alcanzando su valor máximo en el octavo día. Sin embargo, dicho valor fue significativamente inferior ($p \leq 0,01$) al obtenido por las células controles a los 15 días (cuando éstas presentaron su valor máximo). En días posteriores la incorporación disminuyó en un 20% con respecto al máximo, obteniendo al final del cultivo unos valores similares a los del control.

El patrón de incorporación de ^3H -uridina fue similar al de la ^3H -leucina en los cultivos de astrocitos controles, aunque en este caso el incremento a los 15 días fue 20 veces superior al valor inicial, y la disminución al final del cultivo fue de un 30% con respecto al máximo (Fig. 30 A). Sin embargo, la presencia de alcohol en éstos determinó un marcado descenso de dicha incorporación, con respecto a los controles, del 12% y 60% a los 15 días y del 40% y 80% a los 28 días, respectivamente.

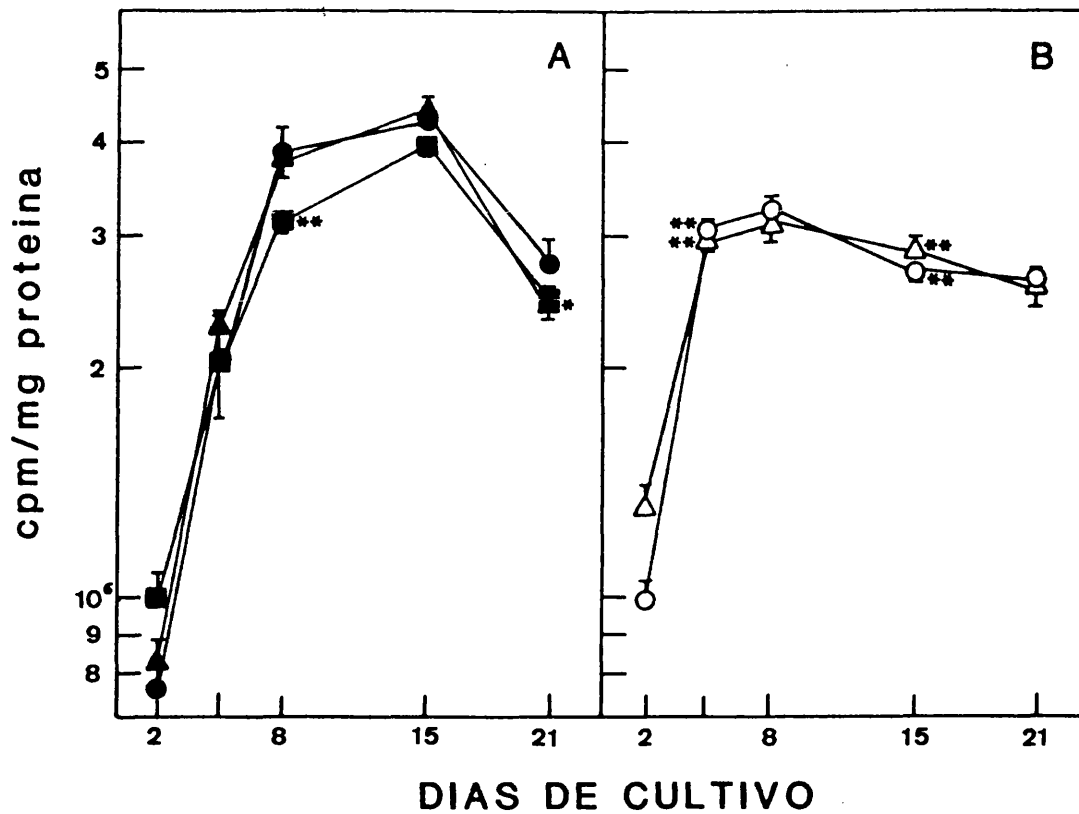


Figura 29. Incorporación de ³H-leucina en los astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media \pm S.D. de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01).

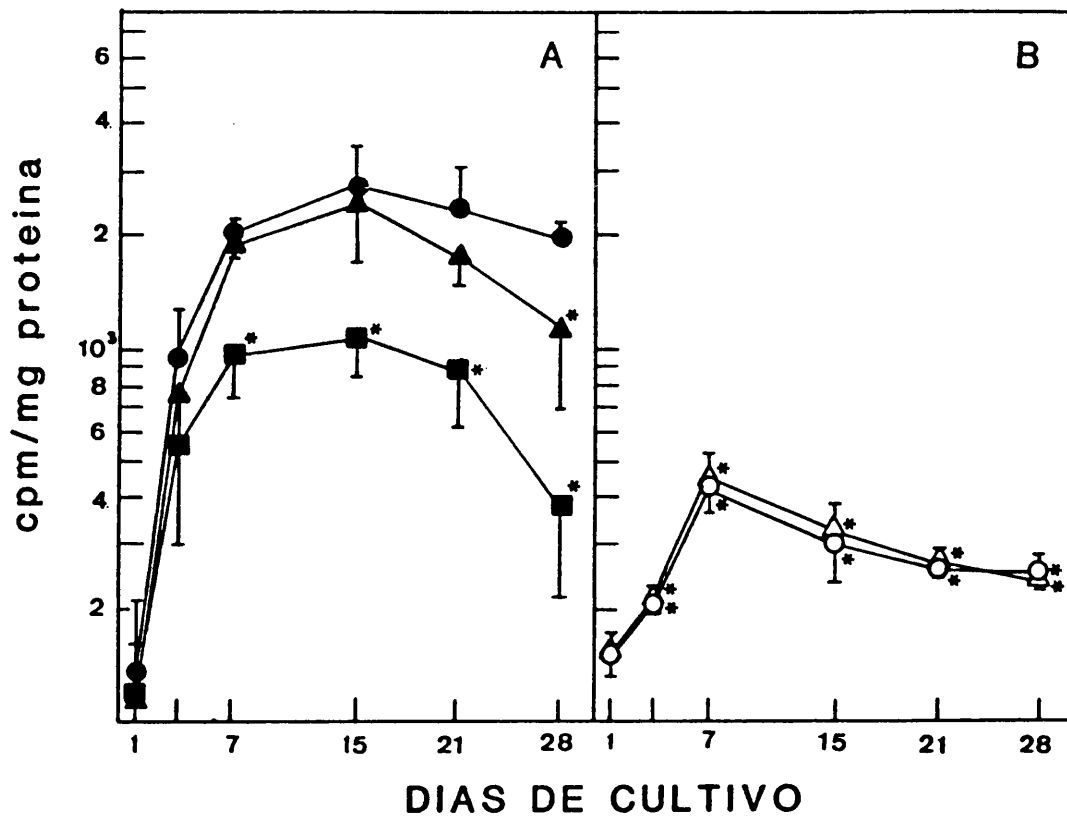


Figura 30. Incorporación de ³H-uridina en los astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media \pm S.D. de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,01$).

La incorporación de dicho precursor en los cultivos procedentes de ratas tratadas con alcohol mostró notables diferencias con respecto a la de los controles (Fig. 30 B). Por una parte, el patrón de incorporación fué diferente ya que se observó un pequeño pico a los 7 días de cultivo, que fué sólo 3,3 veces superior al valor inicial. Por otra parte, los niveles de incorporación a lo largo de todo el cultivo fueron $\approx 75-85\%$ menores que en los cultivos controles.

La incorporación de ^3H -timidina, que expresa la síntesis de ADN, incrementó rápidamente en la primera semana de cultivo (≈ 20 veces superior al valor inicial), disminuyendo un 34% de dicho valor máximo a los 15 días, para mantenerse prácticamente constante hasta el final del cultivo (Fig. 31 A).

Al expresar los valores de incorporación por ml de placa, encontramos una curva diferente, ya que el contenido de ADN iba aumentando a lo largo del cultivo, como se ha visto anteriormente. Así, observamos que la incorporación de ^3H -timidina aumentó durante todo el cultivo, siendo dicho aumento muy rápido en la primera semana del mismo y más moderado posteriormente (Fig. 32 A), encontrando un nivel de incorporación 15 y 23 veces superior al inicial a los 7 días y al final del cultivo, respectivamente. Los valores de incorporación de ^3H -timidina todavía muy altos al final del cultivo parecen indicar que un cierto porcentaje de células mantiene la capacidad de sintetizar ADN, y por tanto de dividirse, a lo largo de todo el tiempo del cultivo, lo que coincide con estudios "in vivo" donde se ha encontrado que la proliferación de astrocitos continua toda la vida, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas.

La presencia de alcohol en el medio de cultivo determinó que, aunque el patrón de incorporación de dicho precursor fué similar al control, se observó un descenso en los niveles de dicha incorporación, que fué más significativo en las células expuestas a mayor concentración de etanol. Concretamente, dicha incorporación, con respecto a los valores controles, disminuyó 17% y 50% a los 7 días, y 37% y 62% a los 28, en los astrocitos expuestos a 25 y 100 mM de etanol, respectivamente (Fig. 31 A), encontrando una disminución semejante cuando se expresó la incorporación por ml de medio de cultivo (Fig. 32 A). Estos datos parecen indicar que aunque hay cierto porcentaje de células que se divide hasta el final del cultivo, éste es menor que en los cultivos que crecen en presencia de alcohol.

Respecto a la síntesis de ADN en los astrocitos procedentes de fetos expuestos al alcohol, al igual que

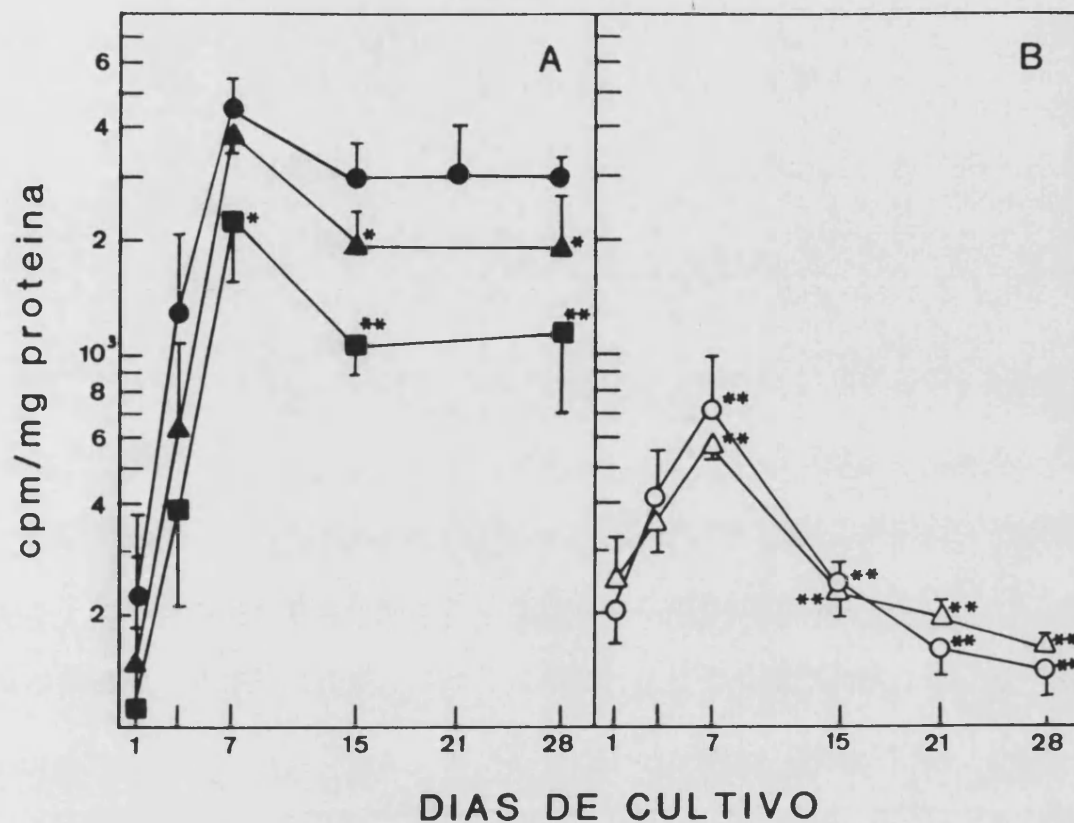


Figura 31. Incorporación de ³H-timidina (en cpm/mg proteína) en los astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media \pm S.D. de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

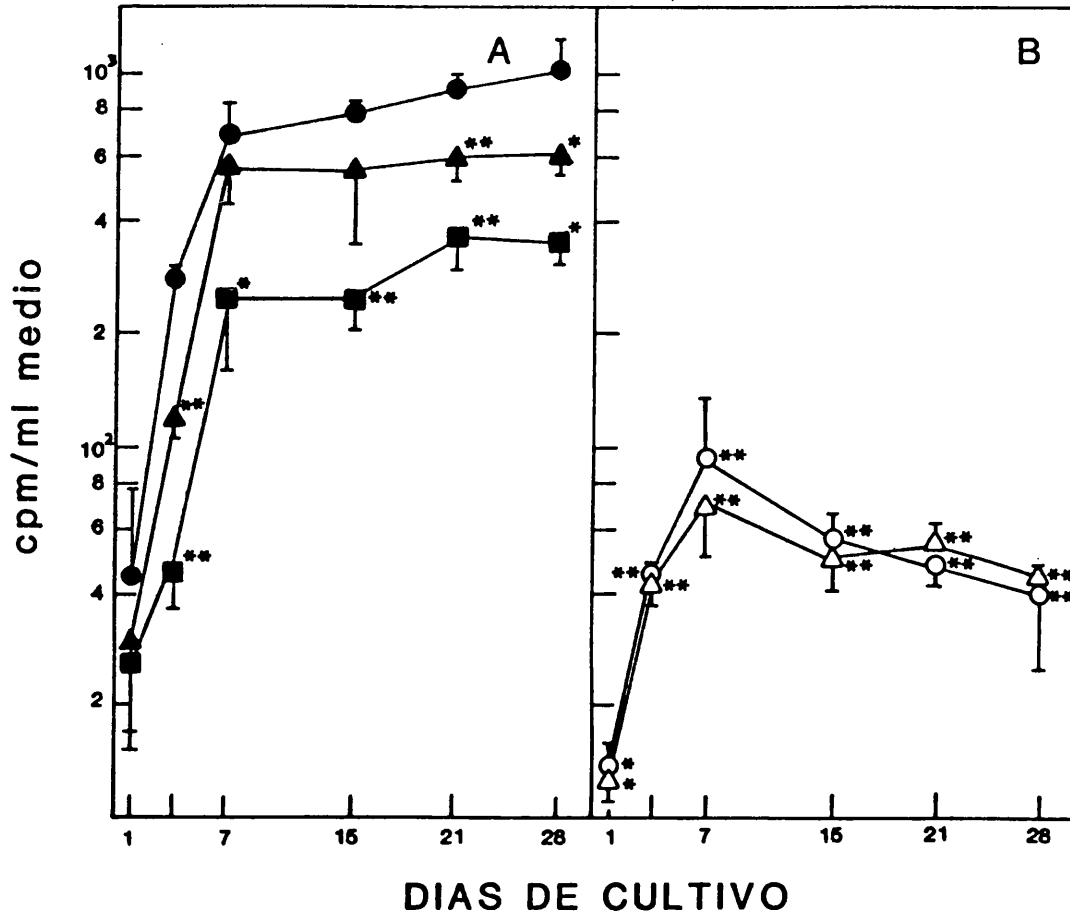


Figura 32. Incorporación de ³H-timidina (en cpm/ml de medio) en los astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media \pm S.D. de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

ocurría con la síntesis de ARN, tanto el patrón como los niveles de incorporación de ^3H -timidina mostraron grandes diferencias con respecto a los controles. Así, aunque los valores máximos de incorporación se observaron a los 7 días (que sólo fueron 3,2 veces superiores a los iniciales), éstos disminuyeron en días posteriores, obteniéndose al final del cultivo unos niveles incluso menores que los iniciales (Fig. 31 B). Por otra parte, durante todo el cultivo dichos niveles fueron significativamente menores ($p \leq 0,01$) que los controles, con una disminución del 70-80%.

Al expresar estos valores como incorporación de ^3H -timidina por ml de medio de cultivo, observamos unas alteraciones similares a las descritas anteriormente, es decir, un incremento máximo a los 7 días (pero que fué muy inferior al control), y una disminución progresiva en los siguientes días de cultivo (Fig. 32 B). Estos datos indican que el porcentaje de células que se divide es mucho menor, y además, al contrario de lo que ocurría en los astrocitos de ratas controles, en los procedentes de ratas tratadas con alcohol va disminuyendo a partir del día 7 de cultivo.

En los cultivos de astrocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol, la presencia de etanol (25 mM) no alteró significativamente el patrón ni los niveles de síntesis en ninguno de los tres precursores estudiados (Figs. 29-32 B).

En resumen, estos datos indican que la presencia de alcohol en los cultivos controles provoca una disminución de la síntesis de ácidos nucleicos (y por tanto de la proliferación del número de células) y en menor medida de la síntesis de proteínas. Estas síntesis están especialmente alteradas en los astrocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol, lo que parece significar que las células precursoras ya están gravemente afectadas.

2.5. ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LOS ASTROCITOS

A diferentes días de cultivo se determinó la actividad de dos tipos principales de enzimas: a) unas consideradas como marcadoras de astrocitos, tales como la glutamina sintetasa y la butilcolinesterasa; y b) otras ligadas a la membrana plasmática, localizándose en los procesos celulares. Igualmente, se midió la actividad de la alcohol deshidrogenasa.

2.5.1. ENZIMAS MARCADORAS.

La enzima glutamina sintetasa está localizada predominantemente en astrocitos, por lo que se ha considerado marcadora de estas células [151]. Su función es catalizar la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio (Fig. 33).

En los astrocitos procedentes de ratas controles la actividad de dicha enzima aumentó rápidamente los primeros días de cultivo, encontrando a los 7 días el doble de actividad que al inicio del mismo; los siguientes días disminuyó ligeramente hasta tener una actividad de un 15% menor que la máxima, al finalizar el cultivo (Fig. 34 A). El patrón de desarrollo de esta enzima es similar al de síntesis de ADN, lo que parece indicar que el aumento inicial de actividad de la glutamina sintetasa (que es una enzima citosólica) es paralelo al del número de células, por lo que aumenta rápidamente en los primeros días de cultivo. En los siguientes días disminuyó ligeramente, probablemente debido a que durante éstos se produce principalmente la diferenciación celular, con crecimiento de los procesos astrocíticos.

La presencia de alcohol en estos cultivos determinó un menor incremento dosis-dependiente de la actividad de esta enzima, tanto en el punto máximo (a los 7 días) como al final del cultivo, con disminuciones del 10% y 23% respecto a los controles a los 7 días, y del 23% y 34% a los 21 días, en los cultivos expuestos a 25 y 100 mM de etanol, respectivamente. Estos datos parecen concordar con la disminución del contenido de ADN en las células expuestas al alcohol.

Los niveles de actividad de glutamina sintetasa en cultivos procedentes de ratas tratadas con alcohol, presentaron a los 7 días un aumento similar al de los controles, aunque al final del cultivo se observó una notable disminución ($\approx 26\%$) de dicha actividad con respecto al del control a los 21 días (Fig. 34 B). La presencia de 25 mM de etanol en estos cultivos determinó una mayor disminución en la actividad de la glutamina sintetasa, que fue especialmente significativa a partir del día 10 de cultivo, encontrando al finalizar el mismo una disminución del 32% con respecto a los controles.

Datos histoquímicos y bioquímicos han demostrado que la enzima acetilcolinesterasa está preferentemente en neuronas, mientras que la butilcolinesterasa se localiza en células gliales, incluyendo astrocitos, por lo que podría considerarse marcadora de estas células [65,96]. De hecho, nosotros medimos la actividad de la acetilcolinesterasa en los cultivos de astrocitos, encontrando

Figura 33. Demostración inmunocitoquímica de la distribución de glutamina sintetasa en astrocitos controles de 4 días (izquierda) y de 10 días (derecha), que se localiza en el citoplasma de las células. Para su demostración se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra dicha enzima (obtenido por la Dra. Amelia Martínez) que fué revelado con la correspondiente anti-Ig conjugada con FITC.

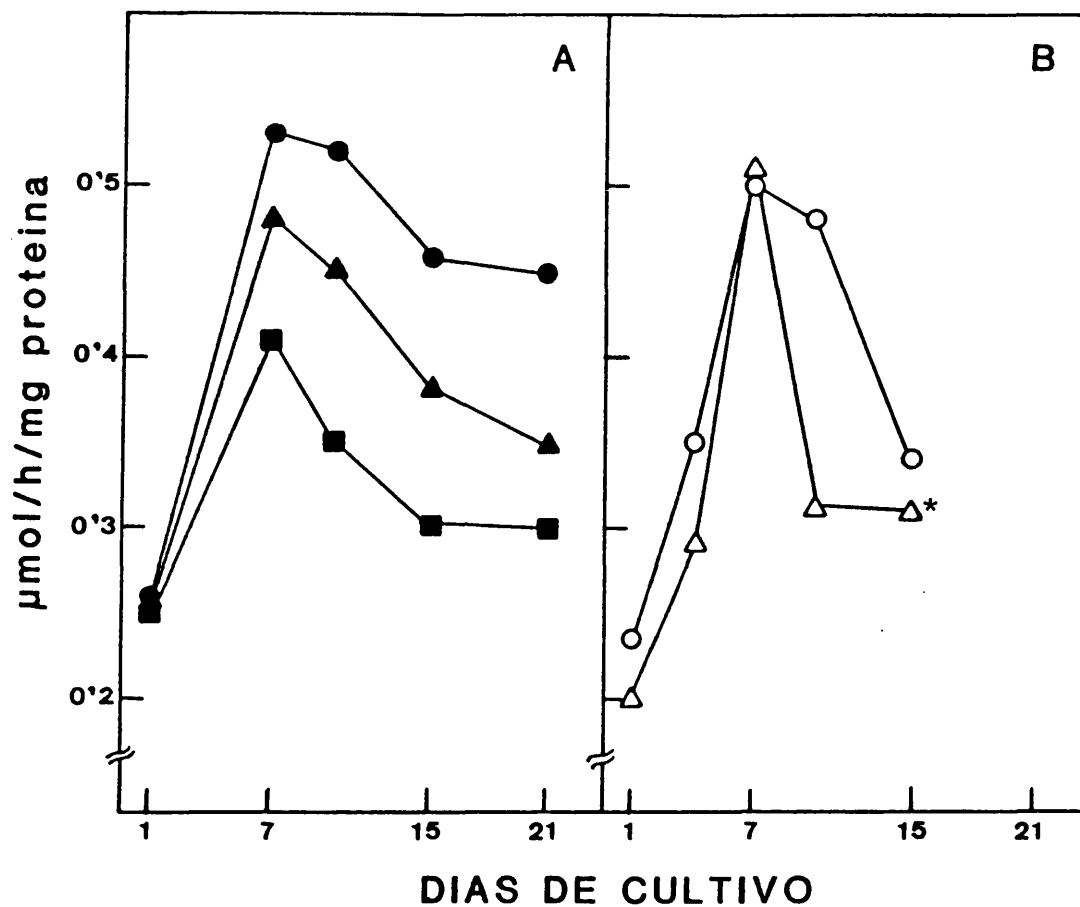


Figura 34. Actividad de la glutamina sintetasa en astrocytos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,05$).

una actividad muy baja y prácticamente constante a lo largo de todo el cultivo (datos no mostrados).

Sin embargo, cuando se midió la actividad de la butilcolinesterasa, se encontró una curva similar a la de la glutamina sintetasa, obteniendo unos niveles de actividad máximos a los 10 días de cultivo, siendo estos valores 2,3 veces superiores a los iniciales, y disminuyendo posteriormente dicha actividad hasta el final del cultivo (Fig. 35 A).

Con la adición de diferentes concentraciones de etanol a las células (25 y 100 mM), al igual que ocurría con la glutamina sintetasa, se observó una disminución en la actividad de la butilcolinesterasa a lo largo de todo el cultivo, que fué más marcada al final del mismo y en los astrocitos expuestos a mayores concentraciones de alcohol.

Los astrocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol presentaron ciertas variaciones con respecto a los controles (Fig. 35 B). Por una parte, la actividad de dicha enzima al inicio del cultivo fué mayor, y por otra parte alcanzaron antes el valor máximo, a los 7 días de cultivo, pero que fué un 20% menor que la actividad máxima encontrada en las células controles. Cuando estas células crecieron en presencia de etanol, la actividad de la butilcolinesterasa aún fué menor, especialmente a los 7 días de cultivo, donde encontramos una disminución del 33% con respecto al valor máximo de los controles.

La enzima glutámico deshidrogenasa, que está localizada en las mitocondrias, cataliza la síntesis de α -cetoglutarato a partir de glutamato, estando así relacionada con la función de la glutamina sintetasa. Aunque esta enzima no es marcadora específica de astrocitos, desempeña un papel muy importante en el metabolismo cerebral ya que los astrocitos captan el glutamato liberado por las neuronas, lo convierten y liberan α -cetoglutarato, manteniendo así un adecuado recambio del glutamato liberado por las neuronas, protegiéndolas del efecto tóxico del glutamato [13].

Los niveles de actividad de esta enzima incrementaron durante los primeros días de cultivo, alcanzando los valores máximos entre los días 7 y 15, manteniéndose prácticamente constantes durante el resto del cultivo (Fig. 36 A). Los astrocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol mostraron una actividad similar a la de los controles a lo largo de todo el cultivo (Fig. 36 B). La presencia de alcohol no afectó significativamente la actividad de esta enzima en los cultivos procedentes de ratas controles, ni en los de tratadas con alcohol.

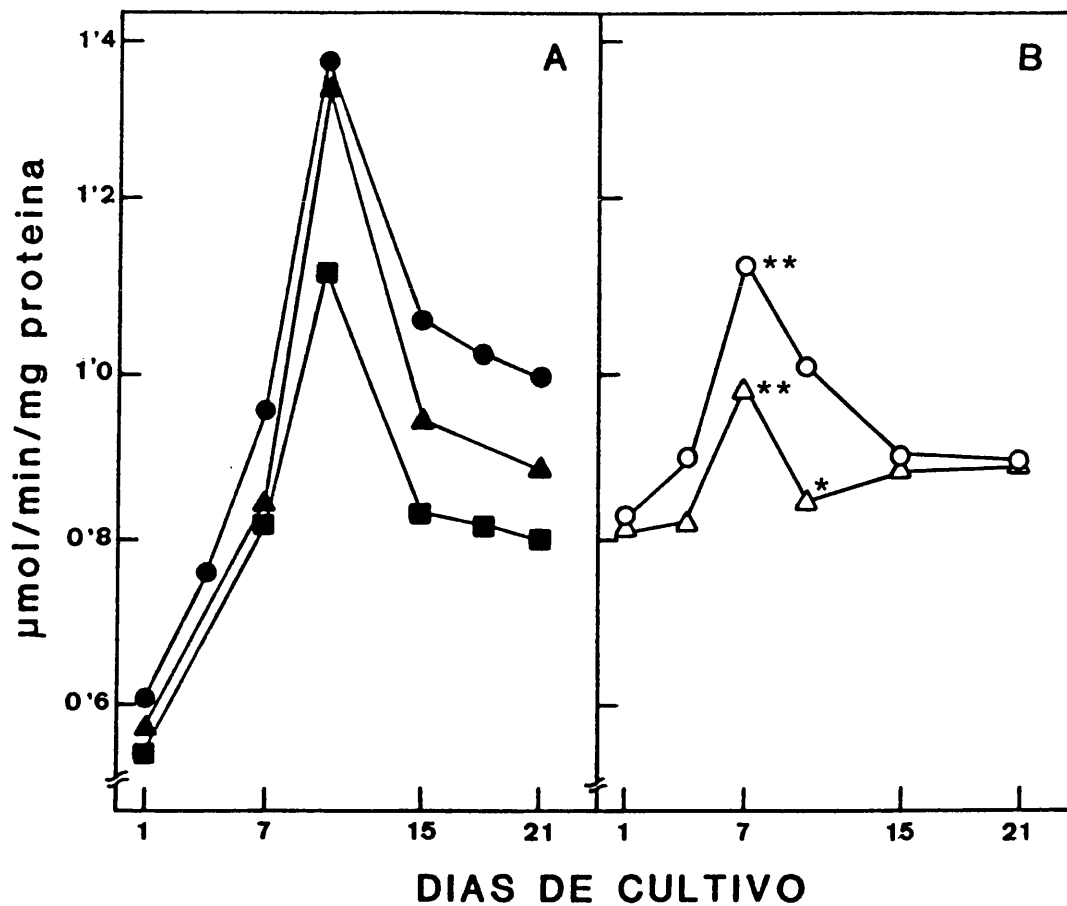


Figura 35. Actividad de la butirilcolinesterasa en astroci-
tos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alco-
hol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como
en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cul-
tivos diferentes. Diferencias significativas con respecto
al control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

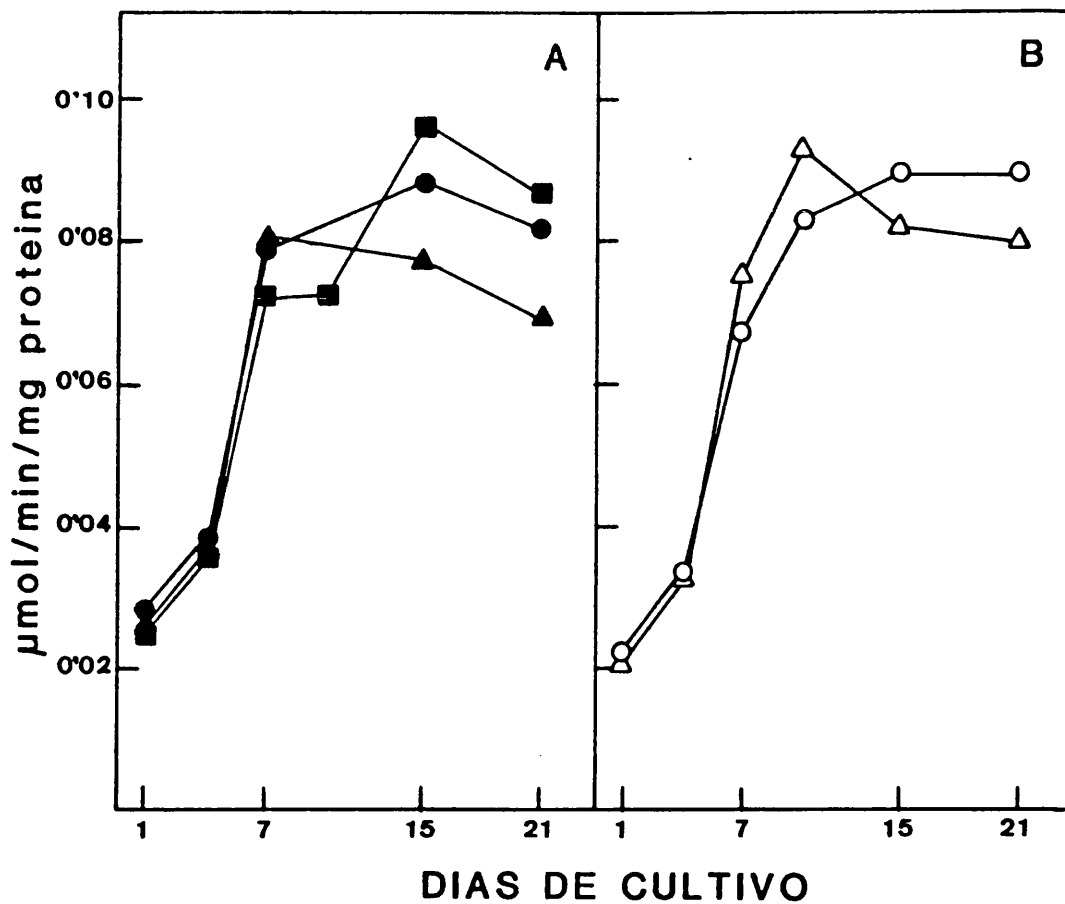


Figura 36. Actividad de la glutamato deshidrogenasa en astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes.

2.5.2. ENZIMAS LIGADAS A MEMBRANAS.

Las figuras 37-39 muestran la actividad a lo largo del cultivo de astrocitos, de tres enzimas ligadas a las membranas plasmáticas: $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasa}$ y 5' nucleotidasa.

La enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ parece desempeñar un papel importante en la glía puesto que, además de regular la concentración de K^+ , está íntimamente ligada al consumo de O_2 en la glía [177,229]. El patrón de actividad de esta enzima en los astrocitos fué diferente al de las enzimas descritas anteriormente, puesto que el mayor desarrollo coincidió con el período de maduración de estas células, que es cuando se desarrollan los procesos. Así, en la figura 37 A se observa que el día 7 de cultivo la actividad sólo fué 1,4 veces superior a los valores iniciales, aumentando los niveles notablemente a partir de ese punto, siendo al final del cultivo 4,4 veces superior a los valores iniciales.

La presencia de alcohol en estos cultivos indujo una disminución de los niveles de dicha actividad a lo largo de todo el cultivo, observando que a los 21 días la disminución era del 24% y 40% con respecto al control, en los astrocitos expuestos a 25 y 100 mM, respectivamente.

La enzima $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasa}$ es otra ATPasa, que está ligada a la parte externa de la membrana celular (por lo que se la denomina "ectoenzima"); es activada por muy bajas concentraciones de Ca^{2+} y requiere el ión Mg^{2+} para su funcionamiento. El patrón de los niveles de actividad fué similar a los de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, observándose un notable incremento desde el día 7 de cultivo hasta el 21, siendo los valores finales 5,4 veces superiores a los iniciales (Fig. 38 A). El desarrollo de esta enzima parece igualmente coincidir con el de los procesos astrocíticos. La presencia de alcohol en estos cultivos controles determinó una disminución de la actividad a lo largo del mismo, que fué un 20% y 40% menor que la de los controles al final del cultivo, en las células expuestas a 25 y 100 mM de etanol, respectivamente.

La 5' nucleotidasa que, al igual que las anteriores enzimas, está ligada a la membrana plasmática, y que facilita la entrada de nucleótidos al citoplasma celular, fué aumentando de una manera similar a las dos enzimas anteriores, hasta alcanzar al final del cultivo control un valor 4,1 veces superior al inicial (Fig. 39 A), ya que también se desarrolla paralelamente a la aparición y formación de procesos celulares. La presencia de 25 y 100 mM de etanol determinó una menor actividad de esta enzima a lo largo del cultivo, siendo al finalizar el mismo un

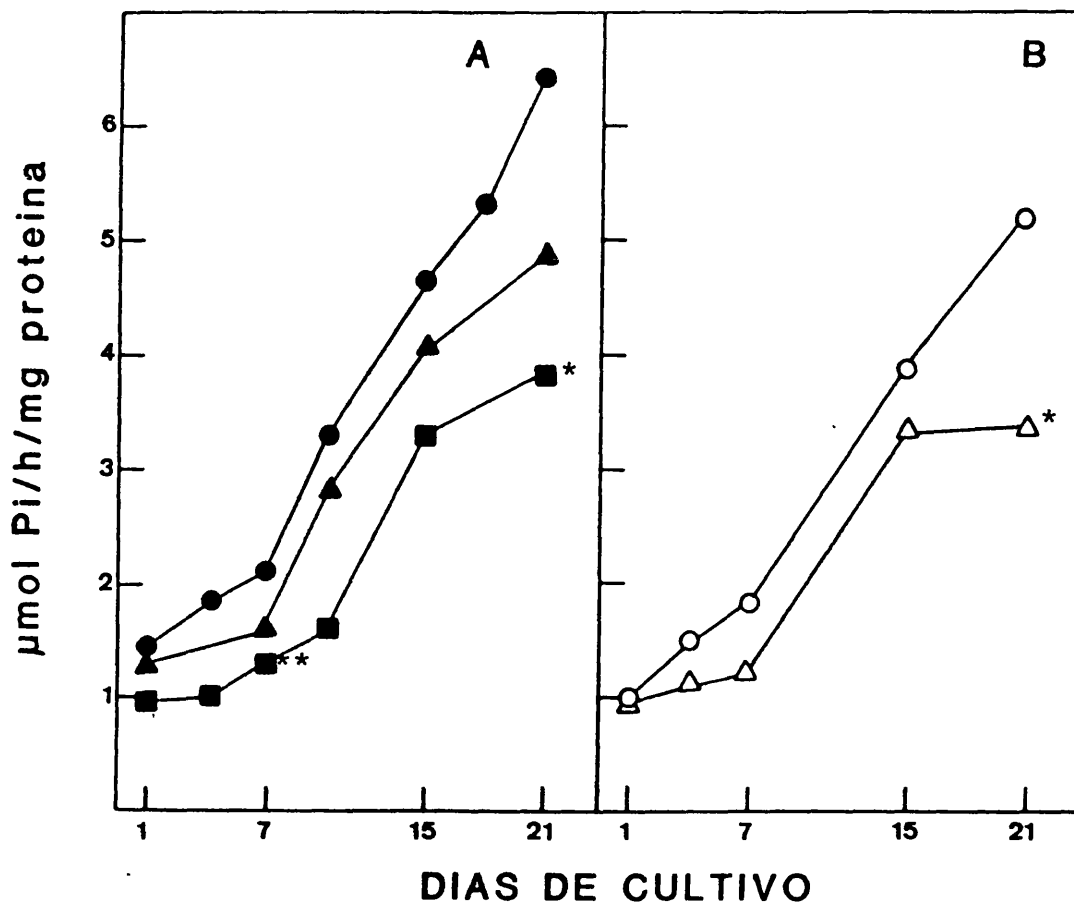


Figura 37. Actividad de la (Na⁺,K⁺)ATPasa en astrocytos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

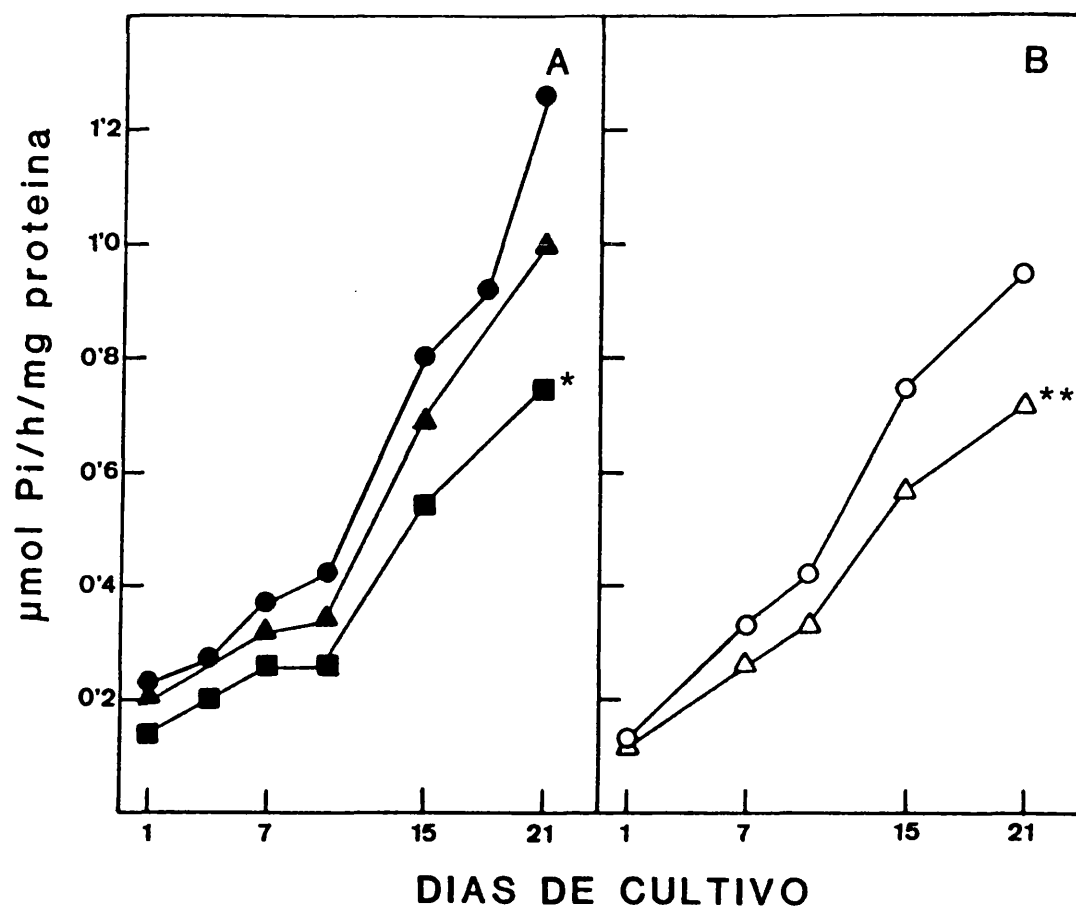


Figura 38. Actividad de la Ca²⁺ATPasa en astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

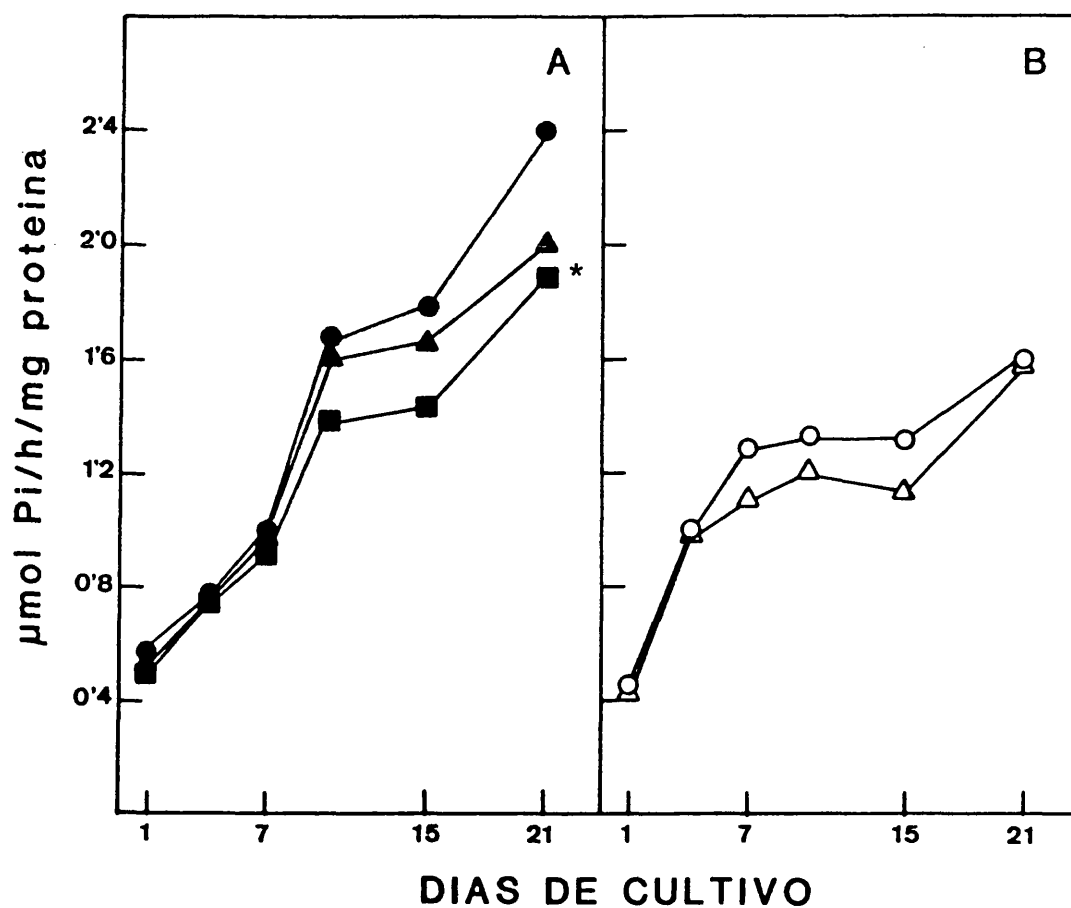


Figura 39. Actividad de la 5'nucleotidasa en astrocitos obtenidos de fetos controles (A) y expuestos al alcohol (B), a lo largo del tiempo del cultivo. Símbolos como en la Fig. 27. Cada punto representa la media de 3-4 cultivos diferentes. Diferencias significativas con respecto al control (* $p \leq 0,05$).

15% y 21% menor que los controles, respectivamente.

En estos cultivos, el aumento de la actividad de estas tres enzimas a los 21 días fué estadísticamente significativo ($p \leq 0,01$) con respecto a los valores iniciales.

En los cultivos de astrocitos procedentes de ratas tratadas con alcohol, el patrón de los niveles de actividad de estas tres enzimas fué similar al de sus correspondientes controles (Figs. 37-39 B). Sin embargo, al final del cultivo dichas actividades fueron menores, encontrando una disminución del 20%, 21% y 34% para la $(Na^+,K^+)ATPasa$, $Ca^{2+}ATPasa$ y 5'nucleotidasa, respectivamente. Cuando estos astrocitos crecieron en presencia de 25 mM de etanol, el valor de dichas actividades fué todavía menor, con unas disminuciones respectivas del 48%, 43% y 35% con respecto a los valores de los controles a los 21 días de cultivo.

En resumen, encontramos que la actividad específica de estas enzimas ligadas a membrana se desarrolla paralelamente a la aparición y formación de procesos astrocíticos, y se afecta tanto por la presencia de etanol en el medio como en aquellos cultivos procedentes de fetos expuestos al alcohol.

2.5.3. ALCOHOL DESHIDROGENASA.

Por último se midió la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH), que es una enzima responsable de catalizar el primer paso del metabolismo del etanol. Sin embargo, no se detectó dicha actividad en ningún cultivo, tanto en los que crecieron en presencia como en ausencia de alcohol.

La importancia de esta enzima estriba en saber si las células que estuvieron expuestas al alcohol en cultivo, lo estuvieron también al acetaldehído resultante de su metabolismo. Puesto que no se encontró actividad ADH, parece indicar que las alteraciones encontradas por la exposición al alcohol "in vitro" se deben a él directamente, y no al acetaldehído.

DISCUSSION

1. ESTUDIO DE LOS HEPATOCITOS.

1.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

El aislamiento de hepatocitos a partir de hígados de rata adulta se ha utilizado ampliamente para estudios sobre regulación de rutas metabólicas de síntesis y catabolismo de diversas sustancias, captación y eliminación de metabolitos, desarrollo de estados patológicos, degradación de sustancias tóxicas exógenas y xenobióticos, etc. [136]. Sin embargo, estos estudios han sido difíciles de abordar en el hígado en desarrollo, ya que los métodos de aislamiento de hepatocitos están basados en la perfusión del hígado, lo que es difícil de realizar en hígados de pequeño tamaño. Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos procedimientos que permiten la separación de hepatocitos de ratas fetales y neonatas [16,46,189].

El estudio de dichos hepatocitos presenta un gran interés ya que las características del hígado no son constantes a lo largo de su desarrollo, puesto que sufre notables cambios fisiológicos y metabólicos hasta que llega al estado adulto. Así, se sabe que en la rata el hígado empieza a aparecer el día 11 de gestación, ocurriendo un rápido crecimiento en 24 h por lo que ya es aparente el día 12. Posteriormente se desarrollan gran número de células hematopoyéticas, que entre el día 15 a 18 de gestación representan el 65% de las células del hígado. El porcentaje de estas células disminuye hasta el 45% el día 21 de gestación [189].

Los cambios fisiológicos y metabólicos que ocurren durante el desarrollo de este órgano se pueden agrupar, a grandes rasgos, en 3 fases [12]:

- a) Fase fetal, donde el hígado es principalmente glucolítico, debido al aporte constante de glucosa a través de la sangre materna.
- b) Fase de lactancia, donde ocurre un cambio de aporte nutritivo, siendo su principal fuente de energía las proteínas y la grasa de la leche materna. Por tanto los hepatocitos desarrollan las vías gluconeogénicas, debido principalmente a importantes cambios hormonales que operan tras el nacimiento, dotando al recién nacido y lactante de la maquinaria enzimática necesaria para proporcionar un aporte constante de glucosa a otros órganos.
- c) Fase de destete (alrededor del día 25 postnatal en la

rata). En esta fase la principal fuente de energía son de nuevo los carbohidratos, por lo que las enzimas gluconeogénicas disminuyen hasta alcanzar los valores normales del adulto.

En este estudio nosotros hemos desarrollado un procedimiento que permite la separación de hepatocitos a partir de hígados de ratas fetales y neonatales, basándonos en el descrito por Lorenzo y cols. [141]. El aislamiento de hepatocitos presenta algunas ventajas, con respecto a otros métodos de estudio del hígado, que en nuestro caso han sido las siguientes:

- Permite realizar estudios bioquímicos, metabólicos y morfológicos simultáneamente de la misma muestra o "pool" de hepatocitos.
- Posibilita la separación de hepatocitos en diferentes subpoblaciones, y por tanto la caracterización diferencial de las células de las distintas zonas del acino hepático.
- Permite estudiar las posibles alteraciones que se puedan producir en hepatocitos de ratas procedentes de madres alcohólicas, aplicando los procedimientos anteriormente descritos.

El procedimiento desarrollado en este estudio tiene un gran potencial de aplicación puesto que se consigue el aislamiento de hepatocitos de fetos y ratas neonatales, con alto grado de pureza y actividad metabólica.

1.2. SINTESIS Y GLICOSILACION DE PROTEINAS.

Por la multitud de trabajos realizados actualmente, está ampliamente aceptado que el etanol interfiere con el metabolismo hepático de proteínas [187,281]. De hecho, se ha comprobado que el consumo crónico de alcohol produce una acumulación de ciertas proteínas, siendo éste uno de los mecanismos implicados en el aumento del volumen de los hepatocitos tras dicho consumo [130]. Esta acumulación hepática de proteínas podría explicarse por tres mecanismos: aumento de la síntesis, disminución de la degradación, y disminución de la secreción [129,187].

Con respecto al efecto del alcohol sobre la síntesis de proteínas, se han obtenido resultados contradictorios [213,281]. Así, mientras que el etanol "in vitro" (en cortes de tejidos, en hepatocitos o ribosomas aislados, etc.) parece inhibir la síntesis de proteínas, sin embargo los resultados obtenidos en estudios "in vivo" son

contradictorios, puesto que se ha encontrado tanto un aumento, una disminución como ninguna variación en dicha síntesis. Estas últimas discrepancias podrían ser debidas a los diferentes modelos y condiciones experimentales utilizados, tales como intoxicación aguda o crónica, dosis de etanol, vías de administración, etc. [187,281].

Igualmente, aunque también existen ciertas discrepancias acerca del efecto del etanol sobre la degradación de proteínas en los estudios realizados "in vivo", trabajos recientes indican que la administración tanto aguda como crónica inhibe la degradación de proteínas por los lisosomas [187]. Estos trabajos sugieren que éste podría ser uno de los mecanismos implicados en la acumulación de proteínas hepáticas.

Por otra parte, se ha postulado que las proteínas acumuladas son principalmente glicoproteínas [258,264] y proteínas de secreción tales como albúmina y transferrina [18,130]. De hecho hay datos experimentales que demuestran que el etanol inhibe el transporte de las glicoproteínas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática y/o la inserción de éstas en dicha membrana [258].

Sin embargo hay que considerar que todas estas evidencias experimentales se han realizado en animales adultos, no existiendo estudios acerca del efecto del alcohol sobre el metabolismo de las proteínas en el hígado en desarrollo. A este respecto sólo encontramos unos trabajos de Rawat [197,200] que observó una inhibición en la síntesis de proteínas en ribosomas aislados de hígados fetales y neonatales de ratas cuyas madres consumían alcohol. Estos resultados coinciden con datos obtenidos en nuestro laboratorio donde encontramos una inhibición del 38% en la síntesis de proteínas, medida mediante la unión de ^{35}S -metionina a proteínas citosólicas en sobrenadante de homogenados de hígados de fetos expuestos al alcohol (resultados no publicados).

Respecto a los resultados que se obtuvieron en hepatocitos aislados de fetos expuestos al alcohol, tras la incorporación de ^3H -leucina se observaron dos efectos: a) una ligera disminución de dicha incorporación; y b) una retención de las proteínas marcadas en los hepatocitos, que fué más evidente al final del tiempo de desmarca y tras el pulso de 60 min que tras el de 5 min.

La retención de proteínas en los hepatocitos de fetos expuestos al alcohol se corroboró con estudios autorradiográficos, en los que se observó que las proteínas marcadas con ^3H -leucina se acumulaban en el retículo endoplásmico rugoso (REr), retrasándose su procesamiento hacia el aparato de Golgi. Estos datos parecen

indicar que dicha acumulación de proteínas es debida a una alteración en el procesamiento de éstas desde su lugar de síntesis hasta su destino.

De hecho uno de los orgánulos implicados en el procesamiento de proteínas y su glicosilación, es el aparato de Golgi. Estudios morfológicos y citoquímicos en nuestro laboratorio habían demostrado que este orgánulo celular es el más gravemente afectado en hígados de fetos expuestos al alcohol [201-203]. Por esta razón decidimos estudiar el proceso de glicosilación de proteínas con más profundidad, tratando de investigar algunos de los pasos que intervienen en este proceso.

Para ello incubamos los hepatocitos con dos azúcares precursores: la manosa, que se incorpora a la cadena polipeptídica al inicio de dicho proceso, en el RER, y la galactosa que se incorpora posteriormente, en el aparato de Golgi [212]. Los resultados autorradiográficos que se obtuvieron tras la incorporación de manosa en hepatocitos controles mostraron que las marcas se localizaban inicialmente en el RER, disminuyendo progresivamente con el tiempo a la vez que iban aumentando sobre el aparato de Golgi. Posteriormente éstas disminuyeron en dicho orgánulo, apareciendo a las 3 h de desmarca en la membrana plasmática. Sin embargo, tras la incorporación de galactosa, se observó inicialmente una gran abundancia de granos en el aparato de Golgi, disminuyendo éstas con el tiempo y apareciendo a las 3 h, igual que ocurría con la manosa, en la membrana plasmática. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, tras incorporar ambos azúcares en diferentes tipos de células secretoras, como los hepatocitos y las células tiroideas [212,277].

Cuando se realizó la incorporación de dichos azúcares en los hepatocitos de fetos expuestos al alcohol, se observó un retraso en la desaparición de las marcas, tanto sobre el RER como sobre el aparato de Golgi, junto con una menor aparición del número de éstas sobre la membrana plasmática al final del tiempo de desmarca. Dicha acumulación de glicoproteínas marcadas en el aparato de Golgi sugiere que el proceso de glicosilación podría estar alterado durante el paso de éstas a través del aparato de Golgi. Varias posibilidades podrían explicar este efecto:

- a) El etanol puede alterar la actividad de algunas enzimas implicadas en la glicosilación. De hecho hemos podido observar en éste y otros trabajos previos [203] que la exposición prenatal al etanol disminuye la actividad citoquímica de varias enzimas implicadas en este proceso, tal como la UDPasa.

Además, estudios llevados a cabo en animales adultos indican que la intoxicación por etanol es capaz de afectar los primeros pasos de la glicosilación terminal de las glicoproteínas [59,60].

- b) Se ha sugerido que la salida de glicoproteínas desde la zona "trans" del aparato de Golgi hasta su destino final implica el reconocimiento de ciertas señales específicas en estas glicoproteínas, mediante un sistema receptor, y su transporte hasta su destino mediante vesículas post-Golgi [21]. Es posible que el etanol altere bien la estructura de las glicoproteínas o bien su glicosilación y, por tanto, no puedan ser reconocidas por el sistema mencionado.

Estas posibilidades no excluyen que el etanol altere igualmente el flujo de transporte de las vesículas post-Golgi hasta su lugar de destino, p.e. la membrana plasmática. De hecho hemos observado una disminución de las marcas asociadas a la membrana plasmática de hepatocitos tratados con alcohol. En este sentido, Tuma y cols. [258] observaron que la administración de alcohol a animales adultos interfiere con la glicosilación de proteínas, alterando el flujo de las vesículas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática, acumulándose éstas en el citosol de los hepatocitos.

En resumen, nuestros resultados parecen indicar que la exposición prenatal al alcohol inhibe la síntesis hepática de proteínas, alterando el proceso de glicosilación y de transporte de éstas, aunque el contenido total de proteínas en estos hepatocitos parece no alterarse [224].

El mecanismo(s) por el que el alcohol inhibe la síntesis de proteínas en estos hepatocitos se desconoce. Sin embargo, basándose en estudios realizados en animales adultos, se han postulado algunas hipótesis que podrían explicar dicho efecto:

- 10) El etanol altera la síntesis de proteínas mediante un aumento del cociente $NADH/NAD^+$ que se produce como consecuencia de su metabolismo (por las enzimas ADH y ALDH) [129]. Al aumentar dicho cociente se produce una disminución en la relación ATP/ADP [118], dando lugar a una alteración en el equilibrio de nucleótidos y en los procesos de iniciación y elongación de las cadenas polipeptídicas [281], produciendo por tanto una disminución o una inhibición de la síntesis proteica. Sin embargo, es muy poco probable que este mecanismo sea relevante en el feto ya que, aunque está expuesto a las mismas concentraciones de alcohol que la madre [7,77,219], los nive-

les de ADH y ALDH en el hígado fetal son casi indetectables [181,220].

- 29) Otra hipótesis postulada es que el alcohol, a través de modificaciones hormonales, altera indirectamente la síntesis de proteínas en el hígado. Se sabe que dicha síntesis está influida por los niveles de ciertas hormonas tales como glucagón, insulina, hormona del crecimiento, tiroxina, corticoides, etc. [281]. Por tanto, puesto que en animales prenatalmente expuestos al alcohol se han encontrado alteraciones en los niveles de varias hormonas [57,82,185,186,253], es probable que este mecanismo indirecto pueda estar implicado y ser, al menos en parte, responsable de las alteraciones encontradas en el metabolismo proteico de los hepatocitos de estos animales.
- 30) El estado nutritivo del animal, y por tanto las variaciones en los niveles de ciertos metabolitos tales como la glucosa, ciertos aminoácidos o sustancias oxidables, pueden influir sobre la síntesis proteica [173,270]. De hecho se ha descrito que el consumo materno de alcohol altera el transporte placentario de glucosa, aminoácidos, así como de otras sustancias [62,236]; así, aunque la ingesta nutritiva y energética sea igual en la madre alcohólica que en la control "pair fed", no podemos asegurar que el aporte de dichos sustratos sea igual en sus respectivos fetos, y por tanto es posible que la menor disponibilidad de metabolitos sea un factor limitante en la síntesis de proteínas en los fetos.
- 40) Por último se ha postulado que la reducción en la secreción podría ocasionar una inhibición secundaria en la síntesis de proteínas [281]. Este mecanismo también podría estar implicado en nuestro caso ya que observamos una acumulación de proteínas y glicoproteínas en el aparato de Golgi.

Finalmente, aunque no está esclarecido si el etanol actúa directa o indirectamente inhibiendo la síntesis de proteínas en el hígado, sin embargo también se ha encontrado dicha inhibición en otros órganos [196,200], pudiendo ser éste uno de los mecanismos implicados en el retraso del desarrollo que se observa tanto en animales como en niños prenatalmente expuestos al alcohol.

1.3. SUBPOBLACIONES DE HEPATOCITOS.

Aunque existe la creencia de que el tejido hepático es homogéneo, ya en 1954 Rappaport propuso el acino hepático como unidad funcional de dicho parénquima, dividiéndolo en 3 zonas diferentes de acuerdo con la proximidad de los hepatocitos a la vénula porta terminal, y por tanto con el mayor o menor aporte sanguíneo de oxígeno, sustratos y hormonas [195]. La zona 1 ó periportal (PP) corresponde a los hepatocitos que rodean la vénula porta terminal; en esta zona tiene lugar preferentemente el metabolismo energético oxidativo, β -oxidación, catabolismo de aminoácidos, ureagénesis a partir de aminoácidos, gluconeogénesis, etc. La zona 3 ó perivenosa (PV) corresponde a los hepatocitos que están más alejados de la vénula porta y que rodean la vénula hepática; en esta zona tiene lugar con preferencia la glucólisis, liponeogénesis, ureagénesis a partir de amonio, biotransformación de drogas, etc. [108]. La zona 2 ó intermedia corresponde a los hepatocitos localizados entre las zonas 1 y 3.

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar nuevos procedimientos que permitan separar los hepatocitos en diferentes subpoblaciones. Estos procedimientos se basan principalmente en las diferencias de densidad y tamaño que presentan las células de las diferentes zonas del acino hepático. Las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos métodos de separación han sido discutidas en algunas revisiones [136]. Sin embargo hay que destacar que todos estos procedimientos se han realizado en hígado de animales adultos, por lo que no existe en la actualidad un estudio detallado de las características morfológicas y funcionales de las diversas subpoblaciones de hepatocitos durante el desarrollo del hígado.

En este estudio nosotros hemos desarrollado un procedimiento que nos ha permitido separar los hepatocitos de las diferentes zonas del acino hepático de ratas neonatales, y caracterizarlas por métodos bioquímicos, morfológicos y citofluorimétricos simultáneamente.

Utilizamos hígados de ratas de 12 días ya que hasta la 2ª semana de vida postnatal en la rata, los hepatocitos no adquieren una heterogeneidad metabólica [109,111]. Hay que señalar que, puesto que existen pocos datos referentes a las características bioquímicas y ultraestructurales de las diferentes poblaciones de hepatocitos de ratas neonatales, los resultados obtenidos en este estudio se compararán con los de hígados de ratas adultas [108,142,164]. De hecho se ha demostrado que las diferentes características ultraestructurales de las células PV

y PP se mantienen, al menos, durante el primer año de vida en la rata [110,156,228,246].

La separación de las diferentes subpoblaciones de hepatocitos, que se realizó mediante un gradiente discontinuo de densidad, dió lugar a la obtención de 6 fracciones celulares. En todas estas fracciones, los resultados obtenidos por los diferentes métodos utilizados mostraron que las células de las fracciones F2 y F6 realmente constituían diferentes poblaciones de hepatocitos.

Respecto a las actividades enzimáticas ensayadas, hay que señalar que el contenido enzimático de los hepatocitos está distribuido según un gradiente a lo largo del acino hepático, no existiendo una localización exclusiva en una de sus zonas. Así, se ha descrito que la actividad alanina aminotransferasa (ALAT), enzima que interviene en el catabolismo de los aminoácidos, se localiza predominantemente en la zona PP [164,233]; sin embargo, la glutámico deshidrogenasa (GDH), que interviene en la detoxificación de nitrógeno, tiene una actividad máxima en los hepatocitos de la zona PV [164,233]. Nuestros resultados coinciden con estos datos ya que también encontramos un gradiente de actividad enzimática a lo largo de las diferentes fracciones celulares, que varía de unas enzimas a otras, siendo la actividad máxima de la ALAT en las células F6, mientras que la GDH lo fué en F2. Asimismo, la relación de dichas actividades entre los hepatocitos F6 y F2 (Tabla 6) también coincidió con los datos publicados por otros autores en ratas adultas [22,138]. Estos resultados sugieren inicialmente que las fracciones F2 y F6 contienen principalmente hepatocitos de las zonas PV y PP, respectivamente.

Hay que destacar que aunque se ensayó la actividad de otras enzimas, la láctico deshidrogenasa (LDH) y la piruvato kinasa (PK), que igualmente son marcadoras de las zonas PP y PV, respectivamente [75,164,233], no encontramos sin embargo diferencias significativas entre las diferentes fracciones celulares obtenidas. Esta homogeneidad de actividad enzimática probablemente se deba a que, aunque la heterogeneidad de los hepatocitos aparece de una manera progresiva y ya es manifiesta a los 12 días de edad postnatal en la rata, ésta no sea simultánea para todas las enzimas que contienen los hepatocitos [12].

De hecho ambas enzimas sufren notables cambios durante la lactancia [42]. Así, la LDH, que interviene en la gluconeogénesis, aumenta considerablemente durante esta fase, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar los valores del adulto en la fase de destete. Contrariamente ocurre con la PK, enzima glucolítica, cuya actividad es muy elevada en la fase fetal y disminuye progresivamente

en la fase de lactancia (ambas enzimas se midieron en homogenados de hígados en desarrollo; datos no presentados). Estas adaptaciones fisiológicas de las enzimas que intervienen en la gluconeogénesis y glucólisis posiblemente sean la causa de la ausencia de su localización preferente en una zona determinada del acino hepático a los 12 días de edad en la rata.

Con respecto a las enzimas que metabolizan el etanol hay que señalar que los trabajos realizados para determinar su localización en el acino hepático son escasos y a veces contradictorios. Nuestros resultados demuestran que tanto la alcohol deshidrogenasa (ADH) como la aldehído deshidrogenasa (ALDH) de alta y baja K_m presentan una localización similar a la GDH, lo que sugiere que, al menos en ratas neonatas, son enzimas predominantemente perivenosas.

Estos resultados son coherentes con los publicados por otros autores, demostrando que las enzimas que catalizan la biotransformación de drogas se localizan con preferencia en la zona PV [108,271]. Asimismo, coinciden con los estudios realizados por Morrison y Brock [163] en hígados humanos y de rata adultos sobre la localización de la ADH, y por Lindahl y cols. [135] sobre la ALDH. Sin embargo otros autores no han encontrado diferencias significativas en la distribución intraacinar de la ALDH en el animal adulto [22,260].

Por otra parte, resultados ultraestructurales igualmente demuestran que existen diferencias significativas entre los hepatocitos F2 y F6, lo que confirma que existen dos poblaciones diferentes. Así, encontramos que el volumen celular, según los datos tanto estereológicos como citofluorimétricos, mostró un aumento progresivo de la F2 a la F6, siendo la media de estos valores semejante a la publicada para ratas de 12 días [74]. Sin embargo hay que destacar que algunos trabajos realizados en ratas adultas no encontraron diferencias significativas en el tamaño hepatocitario de las diferentes subpoblaciones [87,142].

Los datos estereológicos referentes a los diferentes orgánulos celulares mostraron que los hepatocitos F6 eran más ricos en el retículo endoplásmico rugoso (REr), peroxisomas y glucógeno, el cual se distribuía en grandes agregados; a la vez el aparato de Golgi estaba más desarrollado y tanto la densidad de volumen mitocondrial como su volumen absoluto era mayor que en las células F2. Estos datos coinciden con estudios realizados "in situ", donde se ha encontrado una localización preferente de los componentes celulares mencionados en los hepatocitos periportales [108,110,142,156,228]. El mayor desarrollo

del aparato de Golgi así como del volumen mitocondrial en esta zona se ha asociado a una predominancia de las funciones que realizan, tales como la formación de bilis y el metabolismo energético oxidativo, respectivamente [108].

Por otra parte las células F2 presentaron una mayor densidad de volumen lisosomal, junto con una dispersión del glucógeno (en rosetas aisladas) que estaba frecuentemente asociado con el retículo endoplásmico liso (REI), el cual era más abundante en esta fracción. Estos resultados igualmente coinciden con los publicados en el hígado "in situ" para la zona perivenosa [108,142], asociándose la mayor abundancia de REI en estas células, a la preferente localización que tienen algunas enzimas relacionadas con la biotransformación de xenobióticos, tales como el complejo P-450 [71,108].

En resumen, tanto los resultados bioquímicos como los estereológicos obtenidos de las diferentes subpoblaciones, sugieren que la fracción F2 contiene principalmente hepatocitos de la zona PV, mientras que los de F6 son PP. Las fracciones F3, F4 y F5 corresponden a hepatocitos de la zona intermedia. Además, hay que destacar que los datos obtenidos de la distribución tanto de orgánulos celulares como de las actividades enzimáticas en las diferentes subpoblaciones de hepatocitos, concuerdan con las funciones específicas o predominantes asignadas a las células de las regiones PP y PV [86,109].

1.4. SUBPOBLACIONES HEPATOCITARIAS OBTENIDAS DE RATAS EXPUESTAS AL ALCOHOL.

Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el consumo crónico de alcohol produce alteraciones hepáticas, hay datos que indican que dichas lesiones se inician en los hepatocitos de la zona centrilobulillar o PV [102, 166,184]. Por esta razón nosotros iniciamos el presente trabajo, para estudiar si había una afectación selectiva en los hepatocitos de las diferentes zonas del acino, en hígados de ratas prenatalmente expuestas al alcohol, ya que habíamos observado que en dichas ratas se producían unas alteraciones hepáticas similares a las que aparecen tras el consumo crónico de alcohol [201-203].

Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes del estudio de diferentes subpoblaciones hepatocitarias es que los métodos utilizados para su separación (incluyendo el de centrifugación de células aisladas en un gradiente de densidad, utilizado por nosotros), no garantizan que las células que sedimentan a una determinada densidad,

procedentes de animales expuestos a una droga, se correspondan con las de animales controles [87,136].

De hecho en nuestro caso las "células densas" que aparecieron en hígados de ratas expuestas al alcohol (con una morfología diferente a la del resto de los hepatocitos), no las podemos comparar con los hepatocitos controles que sedimentaron a la misma densidad. Sin embargo estas "células densas" se encuentran en un porcentaje bajo, especialmente en las fracciones F2 y F6, que son las que hemos identificado como PV y PP, respectivamente, en los hepatocitos de ratas controles. Por otra parte, las características generales bioquímicas y estereológicas de las células normales ("no densas") de las ratas expuestas al alcohol, fueron similares a las controles, aunque encontramos ciertas diferencias con respecto a ellas.

Los datos estereológicos mostraron que algunos orgánulos celulares se afectaban más en las células F2 de las ratas expuestas al alcohol, mientras que otros presentaban mayores alteraciones en los hepatocitos F6, comparándolos con los controles. Así, los datos más llamativos fueron los referentes a las mitocondrias y el aparato de Golgi, que estaban más afectados en F2, mientras que los lisosomas, el REI y el RER lo estaban en F6. Estos datos indican que la exposición pre + postnatal al alcohol tiene un efecto selectivo sobre cada componente celular específico, dependiendo de la localización intraacinar de las células.

Por otro lado se observó que en las ratas expuestas al alcohol, las actividades de las enzimas marcadoras, ALAT y GDH, presentaban ciertas variaciones con respecto a las controles, principalmente en los hepatocitos de la fracción F2. Así, mientras la actividad de la ALAT mostró un incremento en dicha fracción, la GDH disminuyó tanto en F2 como en F3.

Algunos autores han sugerido que el etanol produce una hipoxia debido a un aumento en el consumo de oxígeno [104,123,255], que se agravaría en la zona PV ya que la oxigenación es menor en esta zona que en la zona PP [109]. Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis ya que observamos un mayor daño mitocondrial junto con una disminución más marcada de la GDH (enzima mitocondrial) en los hepatocitos de la zona PV. Al mismo tiempo el incremento de ALAT observado, podría reflejar una respuesta adaptativa a la hipoxia que se produce preferentemente en esta zona.

Hay que señalar que las alteraciones mitocondriales que hemos observado en los hepatocitos de la fracción F2

son similares a las descritas en los hígados de fetos expuestos al alcohol [201]. También se había demostrado que el consumo crónico de alcohol en ratas produce una importante reducción de la actividad hepática de GDH [100].

Las relaciones entre las actividades enzimáticas de las poblaciones F6 y F2 de las ratas tratadas con alcohol, mostró variaciones con respecto a las controles (Tabla 6), ya que las diferencias entre dichas actividades en general fueron menos acusadas que en caso de las controles. Este efecto posiblemente sea debido a dos factores:

- a) La pequeña contaminación que existe de "células densas", que son indistinguibles bioquímicamente de las "no densas", podría afectar los niveles de actividad enzimática. Sin embargo debido al bajo porcentaje de éstas en las fracciones F2 y F6, hace que la repercusión de este factor sea despreciable.
- b) Es posible que la maduración de los hepatocitos de las ratas expuestas al alcohol sea más lenta que en las controles, como parece demostrar el retraso general en el crecimiento de estos animales (corporal, hepático, cerebral, etc.) [77,224,225]. Este hecho podría ocasionar un retraso en la aparición de la heterogeneidad entre las diferentes zonas del acino hepático, por lo que en ratas de 12 días de edad encontremos diferencias menos marcadas entre las actividades enzimáticas de las distintas subpoblaciones de hepatocitos.

En las ratas tratadas con alcohol, la actividad de las enzimas que metabolizan el etanol también varió con respecto a las controles. La ADH disminuyó en todas las fracciones, siendo ésta más marcada en F2 y F3. Estos datos coinciden por un lado con trabajos previos de nuestro laboratorio [79], en donde se encontró una disminución en la actividad de dicha enzima en homogenados de hígados de animales pre y postnatalmente expuestos al alcohol. Por otro lado, también parecen coincidir con los resultados de Väänänen y cols. [260] que encontraron una disminución moderada de dicha actividad en hepatocitos de ratas alcohólicas crónicas.

Con respecto a la ALDH de alta y baja K_m , en este trabajo no encontramos diferencias significativas en los niveles de actividad de las diferentes fracciones obtenidas de ratas expuestas al alcohol, con respecto a los controles. Hay que considerar que se han descrito tanto incrementos [85] como disminuciones [115] de dichas actividades enzimáticas, en hígados de animales alcohólicos

crónicos; estas discrepancias posiblemente sean debidas a la mayor o menor integridad mitocondrial que presentan las células hepáticas de dichos animales, que varía según el tiempo de exposición, ya que esta enzima se localiza principalmente en mitocondrias.

Finalmente, sabemos que las ratas expuestas al alcohol durante su crecimiento presentan una disminución de peso tanto corporal como hepático y de otros tejidos, como se ha indicado anteriormente. También se sabe que el etanol interfiere con la lactancia [221], pudiendo causar un déficit nutricional en las crías, a pesar de un estricto control isocalórico de las madres. Sin embargo se ha demostrado que tanto el alcohol como el acetaldehído pasan del torrente circulatorio materno al fetal [7,77, 83,219] y en la lactancia a la leche materna [84], y por tanto ambos metabolitos pueden ejercer un efecto tóxico directo sobre fetos y ratas lactantes, afectando el desarrollo y crecimiento normal del hígado.

En resumen, la exposición al etanol durante el desarrollo y maduración hepática en la rata, tiene un efecto selectivo sobre orgánulos celulares específicos, dependiendo de la localización intracelular de los hepatocitos.

Hay que destacar que las alteraciones morfológicas más marcadas observadas en hígados "in situ" de animales prenatalmente expuestos al alcohol, han sido las mitocondrias y especialmente el aparato de Golgi [201,203], y que estas lesiones se localizan principalmente en la zona perivenosa. Al mismo tiempo, los resultados referentes a las actividades de enzimas marcadoras de zona, también parecen indicar que los hepatocitos de la zona PV son más susceptibles a la acción tóxica del etanol. Todos estos datos coinciden con estudios realizados tanto en humanos [166] como en animales adultos [102,184], donde se ha postulado que la acción hepatotóxica del alcohol se inicia y predomina en la zona perivenosa. Además del alcohol, se ha descrito que otros tóxicos, como el Cl_4C y bromobenceno, también lesionan con preferencia la zona perivenosa. En esos casos se ha sugerido que es debido a que dichos hepatocitos contienen por un lado menos glutatión-peroxidasa y glutatión, y por otro lado a una acumulación de metabolitos electrofílicos que derivan del metabolismo de dichos tóxicos por el citocromo P-450, que es predominante en esta zona [108].

2. ESTUDIO DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS.

Desde el siglo XIX se sabe que en el sistema nervioso existen células diferentes a las neuronas, pero sólo a principios del presente siglo se pudieron diferenciar las células gliales, gracias a las técnicas de tinción de Ramón y Cajal [193,194]. Desde entonces se ha estudiado su morfología y fisiología, y hoy se sabe que desempeñan un papel importante tanto durante el desarrollo cerebral como en el cerebro adulto (ver por ejemplo [22,177, 238]).

Así, como se apuntaba en la Introducción, las células radiales gliales, precursoras de astrocitos [191, 192], actúan de guía de la migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso, formando una especie de enrejado con sus procesos, a lo largo del cual se desplazan las neuronas desde su lugar de origen hasta el sitio que ocuparán definitivamente; además, los astrocitos secretan factores neurotróficos (probablemente NGF ("nerve growth factor")) que regula la diferenciación neuronal [23]. En el cerebro adulto tienen un papel regulador de la nutrición neuronal ya que rodean los endotelios vasculares (formando parte de la barrera hemato-encefálica) y la superficie neuronal, incluidas las sinapsis [113]. Además mantienen el equilibrio del pH en el fluido extracelular así como la homeostasis de iones (como K^+) y de múltiples metabolitos, e intervienen en el metabolismo de neurotransmisores, como el GABA y el glutamato. Finalmente los astrocitos son las células encargadas de la reparación y regeneración del tejido nervioso lesionado ya que, a diferencia de las neuronas, conservan la capacidad de división durante toda la vida [40].

Debido a las importantes funciones que desempeñan los astrocitos, como se ha señalado, y a la gran cantidad de dichas células que presenta el cerebro adulto (10 veces más numerosas que las neuronas, lo que supone \approx un tercio del volumen celular en la corteza cerebral) [183], es razonable esperar que las alteraciones en dichas células se acompañe de disfunciones en el sistema nervioso.

En cuanto al efecto que sobre ellas pueda tener el alcohol, resultados de nuestro laboratorio habían demostrado que ratas expuestas al etanol durante su desarrollo presentaban marcadas alteraciones neuroquímicas a nivel de cerebro entero [77,79], así como en neuronas y astrocitos aislados de animales adultos prenatalmente expuestos al etanol [81]. Sin embargo, es difícil diferenciar "in vivo" entre el efecto directo del alcohol y el que indirectamente puede producir a través de mecanismos tales como alteraciones hormonales, nutritivas, etc. Ade-

más, el cerebro es un órgano complejo y heterogéneo, y es posible que la toxicidad del etanol sea más marcada en unas zonas que en otras, y dentro de éstas también varíe en los diferentes tipos de células que la componen.

Por tanto nos planteamos estudiar el efecto directo del alcohol en un determinado tipo de célula nerviosa en desarrollo, procedente de corteza cerebral. Elegimos los cultivos primarios de astrocitos por varias razones como son:

- a) Por las importantes funciones que desempeñan, como se ha señalado anteriormente.
- b) El crecimiento y diferenciación de los astrocitos en cultivo primario sigue pautas bioquímicas, morfológicas y funcionales similares a las de estas células "in vivo" [97].
- c) Al ser un modelo experimental bien conocido, ha sido utilizado para estudiar el efecto patógeno de otros tóxicos [210].
- d) En estudios "in vivo" se han encontrado alteraciones en la glía de niños y animales expuestos al alcohol durante su desarrollo [36,81].
- e) Hay estudios experimentales en los que se ha encontrado menor desarrollo de las neuronas, postulándose que podría ser debido a una alteración en el desarrollo de la glía [158].
- f) Una de las pocas enfermedades en las que se ha encontrado alteraciones gliales es en el alcoholismo crónico [190].

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO.

En relación a la proliferación y diferenciación de los astrocitos en cultivo primario hay que considerar que éstos pueden presentar ciertas variaciones, dependiendo de las características del medio así como de la cantidad de células sembradas por placa, de su origen, de la edad del tejido del que se aíslan, etc. [68,94].

Con las condiciones utilizadas en este estudio (partiendo de corteza cerebral de fetos de rata a término), obtuvimos unos cultivos primarios de astrocitos con una supervivencia muy alta y que prácticamente no presentaron contaminación de neuronas, fibroblastos, ni de otro tipo de células. Esto se comprobó mediante el marcado de la

proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), específica de los astrocitos [27,52].

Los cultivos procedentes de ratas controles presentaron unas curvas de crecimiento y desarrollo similares a las descritas por otros autores [94,232,276]. Los valores referentes al contenido y síntesis de ADN indican que durante todo el tiempo del cultivo existe división celular, que se mantiene, aunque en menor proporción, hasta el final del mismo; a la vez, los datos acerca del contenido y síntesis de proteínas indican que existe un crecimiento celular que también es menor al final del cultivo.

De hecho se sabe que los astrocitos, cuyos precursores comienzan a aparecer a los 12 días de edad gestacional en la rata, proliferan "in vivo" tanto durante el resto del período prenatal como después del nacimiento, conservando la capacidad de dividirse durante toda la vida, a diferencia de otros tipos de células nerviosas, como las neuronas (Fig. 2). Sin embargo, hay que destacar que la máxima proliferación astrocítica coincide con el final de la gestación y el principio de la vida postnatal.

La morfología de estas células también coincide con la descrita en los estudios mencionados anteriormente, siendo al inicio del cultivo principalmente redondeadas o poligonales, y posteriormente van formando una red, estableciendo conexiones al adquirir la forma estrellada típica con largas prolongaciones. Las primeras células corresponde a los astroblastos, que son las que presentan actividad mitótica, mientras que las segundas son las células diferenciadas o astrocitos fibrosos.

Desde los primeros días de cultivo, las células eran metabólicamente activas en lo que se refiere a enzimas que participan en el metabolismo del glutamato, que es una de las funciones más importantes de los astrocitos. Así, los niveles de las enzimas glutámico deshidrogenasa (GDH) y glutamina sintetasa aumentaron de una manera paralela a la proliferación de células, y disminuyeron ligeramente con la diferenciación morfológica de los astrocitos, lo que coincide con los datos publicados por otros autores [229]. Asimismo pudimos comprobar que eran capaces de captar y liberar neurotransmisores así como de sintetizarlos (resultados no publicados).

La diferenciación y maduración celular se manifestó tanto morfológicamente, mediante la aparición y proliferación de los procesos celulares, con un incremento en GFAP, como bioquímicamente, por el aumento de actividad de enzimas ligadas a las membranas plasmáticas, de manera

similar a lo descrito por otros autores [95]. El desarrollo enzimático fué similar para las tres enzimas de membrana estudiadas, tales como $(Na^+,K^+)ATPasa$, $Ca^{2+}ATPasa$ y 5' nucleotidasa. De éstas, la más ampliamente estudiada ha sido la $(Na^+,K^+)ATPasa$, que desempeña un papel fundamental en la distribución de cationes a través de la membrana plasmática, lo que constituye otra de las funciones más importantes de los astrocitos, necesaria para la actividad eléctrica de las células nerviosas. El desarrollo de la actividad de dichas enzimas de membrana es similar al encontrado en homogenado de cerebros de rata durante la fase postnatal [77,79], lo que probablemente indica que gran parte del notable incremento que sufren dichas actividades "in vivo" se debe al desarrollo de la glía durante dicha fase [95].

2.2. EFECTO DEL ALCOHOL.

La presencia de alcohol en el medio de cultivo de los astrocitos de ratas controles, a unas concentraciones similares a las encontradas en sujetos alcohólicos crónicos (25 mM) o tras una intoxicación aguda moderada (100 mM), indujo una menor proliferación celular y un menor desarrollo de sus procesos, como demuestran las imágenes morfológicas y el menor contenido y síntesis de las macromoléculas estudiadas (proteínas, ARN y ADN). Este efecto fué más marcado en las células expuestas a concentraciones más altas de etanol.

Otros estudios "in vitro" señalan que el efecto del alcohol sobre células en cultivo es muy variable, dependiendo del tipo de células y del tiempo de exposición y concentración de etanol utilizadas. En general, a dosis bajas se había observado que el crecimiento celular así como la captación de precursores y la síntesis de macromoléculas no se afectaba, o incluso se estimulaba ligeramente, mientras que a dosis superiores encontraron una inhibición más o menos marcada [249].

Los mecanismos por los que se producen dichas inhibiciones no se conocen exactamente; sin embargo se ha postulado que el etanol interfiere con los ribosomas induciendo su disgregación, por lo que se produciría una inhibición en la síntesis de proteínas proporcional a la concentración de alcohol [200,213,252]. Con respecto a la inhibición de la síntesis de ADN, se ha postulado que el etanol podría interferir con el ciclo celular de las células cerebrales [10]. De hecho, resultados de nuestro laboratorio demuestran que el alcohol "in vitro" sobre los cultivos de astrocitos produce una acumulación de éstos en la fase G₁ del ciclo celular (datos obtenidos

por citofluorimetría de flujo, no publicados).

En cuanto al efecto del etanol sobre las actividades enzimáticas ensayadas en los astrocitos hay que señalar que encontramos una disminución general en los niveles de dichas enzimas. Aunque los mecanismos por los que el alcohol da lugar a dichas alteraciones tampoco están claros, se han postulado algunas hipótesis basadas en estudios realizados sobre la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ y que podrían explicar dichos efectos en las enzimas ligadas a membrana.

Así, se sabe que el etanol interacciona con los lípidos de las membranas celulares, alterando sus propiedades físico-químicas. Puesto que, en general, las enzimas de membrana dependen de forma importante de los lípidos de su microentorno, una alteración de éstos puede producir una modificación de las proteínas y por tanto una alteración en sus propiedades catalíticas. De hecho, aunque no existen trabajos en los que se haya estudiado el efecto del etanol sobre enzimas ligadas a membrana plasmática de astrocitos, estudios en nuestro laboratorio en membranas sinápticas de animales pre y postnatalmente expuestos al alcohol han demostrado una disminución de los niveles de actividad de enzimas ($(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasa}$ y 5'nucleotidasa) junto con una alteración en las interacciones lípido-proteína [76].

Al mismo tiempo, una segunda posibilidad es que el etanol interaccione directamente con la proteína, induciendo una inactivación de ésta. De hecho se sabe que el etanol "in vitro" inhibe la actividad de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ y que una pequeña parte de dicha inhibición es debida a una interacción directa del alcohol con la proteína [148].

Estos mecanismos podrían estar implicados en la menor actividad específica de las enzimas de membrana estudiadas en las células expuestas al etanol. Además hay que considerar que dichas células mostraron un menor desarrollo de sus procesos, lo que probablemente conllevaría una menor cantidad total de enzimas ligadas a éstos.

Finalmente hay que señalar que, aunque algunos autores han demostrado que células de estirpe glial son capaces de metabolizar el etanol, a través de mecanismos dependientes [147] o independientes de la alcohol deshidrogenasa (ADH) [278], en nuestras condiciones no encontramos actividad ADH, así como tampoco detectamos acetaldehído en los cultivos. Esto parece demostrar que las células no son capaces de metabolizar el alcohol, y por tanto los efectos tóxicos que observamos se deben a la

acción directa del etanol y no a la del acetaldehído, como parece ocurrir en otras circunstancias.

2.3. ASTROCITOS PRENATALMENTE EXPUESTOS AL ALCOHOL.

Los cultivos de astrocitos obtenidos de fetos de rata prenatalmente expuestos al alcohol mostraron un crecimiento y una diferenciación alterados con respecto a las células obtenidas de fetos controles, a pesar de que la supervivencia y la pureza de los cultivos eran similares a las controles. Así, la maduración morfológica de estos astrocitos presentaba un considerable retraso con respecto a los controles, ya que al final del cultivo existía un porcentaje mayor de células inmaduras, de morfología más poligonal y con menor desarrollo de los procesos (datos no presentados). Además, tanto el contenido de proteína y ADN como la síntesis de las macromoléculas estudiadas (proteína, ARN y ADN) era menor en estas células, tanto las que crecieron "in vitro" en ausencia como en presencia (25 mM) de etanol, lo que coincide con otros estudios realizados en diferentes sistemas celulares [48,172,200].

Por otra parte, los niveles de actividad de las enzimas estudiadas, unidas o no a las membranas plasmáticas, en general mostraron disminuciones que fueron más marcadas en las células expuestas al alcohol "in vitro".

Estos resultados parecen indicar que las células obtenidas de cerebros de fetos expuestos al alcohol estarían "dañadas" en su origen por su exposición a este tóxico, puesto que no son capaces de proliferar ni de diferenciarse al ritmo que lo hacen las obtenidas de fetos controles, ni siquiera las que no se les añadió el etanol "in vitro".

La explicación de estos resultados en términos biológicos resulta difícil, pudiéndose postular diversos mecanismos:

- 10) Puesto que tanto el cerebro como los distintos tejidos fetales están expuestos durante su desarrollo prenatal y de una forma constante a niveles de etanol similares a los presentes en la sangre materna [7,77, 83,219], este podría afectar "in vivo" a las células precursoras de los astrocitos, dificultando su posterior crecimiento "in vitro". Esta alteración podría ejercerse en distintos puntos de la célula, siendo un candidato importante, entre otros, el genoma. Aunque el etanol "per se" no parece ser mutagénico, sin embargo el acetaldehído es altamente citotóxico,

mutagénico y teratogénico [172,261,262], induciendo la aparición de cromosomas anormales, roturas del ADN y entrecruzamiento de sus cadenas [172]. De hecho se ha demostrado que el cerebro fetal y por tanto dichas células precursoras estarían expuestas "in vivo" al acetaldehído producido por el metabolismo materno [77,83,219].

- 29) Debido a que el etanol altera el transporte placentario de metabolitos [62,236], aunque la ingesta materna de nutrientes y de calorías de las ratas controles fué la misma que la de las que consumían la dieta alcohólica, no podemos asegurar que los fetos de madres alcohólicas recibían los mismos nutrientes. Por tanto esta posible disminución de factores tróficos también podía afectar la diferenciación de las células precursoras de los astrocitos [90].
- 30) La exposición al alcohol altera los niveles de varias hormonas que desempeñan un papel muy importante en el crecimiento general de los tejidos [57,82,185,186,253], pudiendo por tanto alterarse el desarrollo cerebral. Además, los propios astrocitos liberan un factor similar al de crecimiento nervioso [23] por lo que, al estar su desarrollo disminuido, no estimularía el de otros componentes del sistema nervioso.

2.4. REPERCUSION SOBRE EL SINDROME ALCOHOLICO FETAL.

Hay que considerar que los resultados que se obtienen en estudios "in vitro" no se pueden extrapolar, o hay que hacerlo con cautela, al animal vivo y más aún al ser humano. Sin embargo pensamos que se podrían destacar algunas conclusiones de los resultados obtenidos con los cultivos de astrocitos, por su posible papel en la patogenia de las alteraciones encontradas en el sistema nervioso central (S.N.C.) de los niños con síndrome alcohólico fetal.

Se han propuesto [188,217] una serie de mecanismos que intentan explicar las diferentes afecciones que se encuentran en el S.N.C. de niños expuestos prenatalmente al alcohol, basadas principalmente en el período al que han sido expuestos:

- 10) Durante los primeros días de vida intrauterina el alcohol y el acetaldehído pueden actuar como agentes citotóxicos y mutagénicos, causando la muerte celular directamente, aberraciones cromosómicas letales que producirán la muerte en un espacio de tiempo más o menos largo, o tal vez alteraciones cromosómicas no

letales, que dificultarían la maduración celular. De hecho se ha comprobado que tanto las mujeres [245] como las ratas [223,224] que consumían crónicamente alcohol presentaban un porcentaje de abortos espontáneos tempranos o de reabsorciones, respectivamente, muy superior a la media, aunque hay discrepancias sobre la aparición o no de alteraciones cromosómicas [26,171]. Sin embargo la afectación no letal podría explicar, junto con otros mecanismos, los resultados obtenidos con células procedentes de fetos de madres alcohólicas.

- 29) Durante el 2º trimestre de gestación en humanos, lo que equivale a los días ≈ 11 a 21 en la rata, se puede producir muerte celular y anomalías en la migración de células nerviosas. De hecho se han encontrado agenesias regionales, heterotopias y desorganización de la estructura tisular, microcefalia por pérdida celular, etc. [36,105,176,280]. Puesto que los procesos gliales constituyen la base para la migración de las neuronas, cualquier alteración en la maduración de las células radiales gliales (precursoras de astrocitos [191,192]) conllevaría a una alteración de la migración neuronal. Nuestros resultados morfológicos e inmunocitoquímicos apoyarían este mecanismo ya que hemos observado un importante retraso en la capacidad de maduración de las células prenatalmente expuestas al etanol.
- 30) A partir de la mitad del 2º trimestre de gestación y hasta final del 2º año de vida en humanos, o del día 17-18 de gestación hasta el ≈ 250 día postnatal en ratas, se produciría un retraso en el desarrollo y en la migración celular así como alteración en el establecimiento de conexiones (como glía-neurona, glía-vasos sanguíneos, etc), que darían lugar a disfunciones en el comportamiento y déficits neurológicos. Nuestros resultados parecen coincidir con esta hipótesis ya que los astrocitos expuestos al alcohol "in vitro", obtenidos tanto de cerebros de fetos controles como expuestos al alcohol, presentan un desarrollo general disminuido o retrasado. Además encontramos una disminución tanto en el contenido como en la síntesis de macromoléculas. Está generalmente aceptado que dichos compuestos, como son las proteínas y los ácidos nucleicos, desempeñan un papel importante en las funciones de memoria, aprendizaje, evocación, retención e incluso inteligencia [200]; por tanto es razonable pensar que la disminución observada de dichas macromoléculas en las células expuestas al alcohol (especialmente las expuestas "in vivo") pueden ser en parte responsables de la alteración de dichas funciones cerebrales.

Además de los astrocitos, podrían estar afectadas otros tipos de células nerviosas, como parece indicarlo los estudios sobre biopsias y necropsias [36,176,280]. Nosotros estamos iniciando cultivos primarios de neuronas de rata, y resultados preliminares parecen indicar que también se afecta su crecimiento y diferenciación por la exposición al alcohol, lo que pensamos que puede tener una trascendencia muy significativa en la extrapolación al síndrome alcohólico fetal.

CONCLUSI O N E S

I- EFECTO DE LA EXPOSICION AL ALCOHOL SOBRE LOS HEPATOCITOS DE RATAS FETALES Y NEONATALES

1a- Partiendo de hígados de ratas fetales y neonatales se ha conseguido un buen aislamiento de hepatocitos, con un alto grado de recuperación y viabilidad.

2a- Tras la incorporación de ^3H -leucina en hepatocitos aislados de fetos prenatalmente expuestos al alcohol se observaron dos efectos con respecto a los controles:

a) Una ligera disminución en la incorporación de dicho aminoácido en los hepatocitos, junto con una retención de las proteínas sintetizadas, que es más evidente a largos tiempos de desmarca.

b) Mediante técnicas autorradiográficas se ha demostrado que dicha retención de proteínas tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso así como en el aparato de Golgi, observándose un retraso en su procesamiento hacia sus lugares de destino.

Estos resultados parecen indicar que la exposición al alcohol produce una disminución en la síntesis y procesamiento de las proteínas.

3a- Para estudiar el proceso de glicosilación de proteínas se incorporó ^3H -manosa y ^3H -galactosa en hepatocitos aislados de ratas controles. El estudio autorradiográfico mostró:

a) La ^3H -manosa, que se incorpora en la fase inicial de dicho proceso, dió una acumulación inicial de marcas en el retículo endoplásmico rugoso. Posteriormente estas proteínas marcadas se localizaron en el aparato de Golgi y finalmente en la periferia celular.

b) La ^3H -galactosa, azúcar que se incorpora en las últimas fases del proceso de glicosilación, dió inicialmente una abundancia de proteínas marcadas en el aparato de Golgi que disminuyeron con el tiempo, apareciendo éstas finalmente en la periferia celular.

4a- Durante la incorporación de ^3H -manosa y ^3H -galactosa en hepatocitos aislados de fetos expuestos al alcohol se observó un retraso en la desaparición de marcas, tanto en el retículo endoplásmico rugoso como en el aparato de Golgi, junto con un menor número de éstas en la peri-

feria celular en los últimos tiempos de desmarca. Estos resultados sugieren que la exposición prenatal al alcohol altera la glicosilación y transporte de glicoproteínas, principalmente durante su procesamiento en el aparato de Golgi.

5a- La separación de las diferentes subpoblaciones de hepatocitos de ratas neonatales mediante un gradiente discontinuo de densidad, dio lugar a la obtención de 7 fracciones celulares. De todas estas fracciones, los resultados obtenidos por diferentes procedimientos fueron:

- a) Las fracciones F2 y F6 mostraban características bioquímicas y ultraestructurales de hepatocitos de la zona perivenosa y periportal, respectivamente.
- b) Las células de las fracciones F3 a F5 presentaban características de los hepatocitos de la zona intermedia.
- c) Las enzimas que intervienen en el metabolismo del etanol, tales como alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasas, de alta y baja K_m , se localizan principalmente en la fracción F2 o hepatocitos de la zona perivenosa, lo que coincide con la localización de otras enzimas que catalizan la biotransformación de xenobióticos.

6a- En la separación de hepatocitos de animales expuestos al alcohol se observó:

- a) Al igual que en los controles, las fracciones F2 y F6 obtenidas a partir de dichos hígados mostraban las características generales bioquímicas y morfológicas propias de los hepatocitos perivenosos y periportales, respectivamente.
- b) La aparición de unos hepatocitos de morfología anormal, que hemos denominado "células densas". Estos hepatocitos aparecen principalmente en las fracciones intermedias.
- c) Un efecto selectivo sobre orgánulos celulares dependiendo de la localización intracelular de los hepatocitos.
- d) En la zona perivenosa, los orgánulos celulares más afectados fueron las mitocondrias y el aparato de Golgi, resultados que coinciden con las alteraciones más marcadas que se observan en hígados "in situ" de

animales prenatalmente expuestos al alcohol.

- e) Las actividades de enzimas marcadoras de zona también parecen indicar que los hepatocitos de la zona perivenosa son más susceptibles a la acción tóxica del etanol.

Estos resultados indican que, al igual que en hígado adulto, la toxicidad del alcohol se inicia y predomina en la zona perivenosa del acino hepático.

II- EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.

7a- Partiendo de corteza cerebral de fetos de rata a término, hemos obtenido unos cultivos primarios de astrocitos que presentaron:

- a) Una alta supervivencia y baja contaminación de otros tipos celulares; estos últimos datos se comprobaron mediante el marcado de la proteína fibrilar ácida de la glía, marcadora de astrocitos.
- b) La morfología de estas células al inicio del cultivo era la poligonal característica de astroblastos, adquiriendo posteriormente la forma estrellada propia de astrocitos diferenciados o maduros.

8a- En los cultivos celulares procedentes de ratas controles se observó:

- a) Una curva de crecimiento similar a las descritas "in vivo". Los valores referidos al contenido y síntesis de proteínas, ARN y ADN indican que existe un crecimiento exponencial durante los primeros días de cultivo al que sigue una fase de escasa división celular que correspondería a la diferenciación morfológica.
- b) El patrón de actividad de glutamina sintetasa, butirilcolinesterasa y glutámico deshidrogenasa coincidió con la proliferación celular, aumentando dichos niveles durante la primera semana y disminuyendo o permaneciendo sin variación en fases posteriores del cultivo.
- c) El aumento de los niveles de actividad de las enzimas ligadas a membrana plasmática coincidió con la fase de diferenciación celular, que se manifiesta morfológicamente con la aparición y formación de

procesos y establecimiento de conexiones celulares.

9a- Los cultivos de astrocitos procedentes de cerebros de fetos controles que crecieron "in vitro" en presencia de alcohol a bajas dosis (25 mM), mostraron:

- a) Un menor crecimiento general, tal como se demuestra por los niveles de contenido y de síntesis de las macromoléculas mencionadas anteriormente.
- b) Un retraso en la diferenciación celular, demostrado por una disminución en los niveles de actividad de las enzimas ligadas a membranas plasmáticas. Esto coincide con un menor desarrollo morfológico de sus procesos.

Dichas alteraciones fueron más marcadas cuando la concentración de etanol en el medio fué mayor (100 mM).

10a- Los astrocitos obtenidos de cerebros de fetos expuestos prenatalmente al alcohol y cultivados en ausencia de éste, mostraron marcadas disminuciones tanto en el contenido y síntesis de ADN y proteínas como en los niveles de actividad de las enzimas estudiadas.

Estos resultados indican que tanto el crecimiento como la diferenciación celular están afectados en su origen, es decir que las células precursoras de los astrocitos estarían dañadas por su exposición prenatal al alcohol. Las alteraciones observadas en estos cultivos son más notables si además estas células crecen "in vitro" en presencia de etanol (25 mM).

11a- Finalmente, puesto que los astrocitos desempeñan un papel fundamental en los procesos de migración neuronal, establecimiento de conexiones glía-neurona, regulación del microambiente neuronal, etc., todas las alteraciones inducidas por el etanol sobre estas células, tanto "in vivo" como "in vitro", podrían alterar dichos procesos y constituir uno de los mecanismos implicados en las alteraciones del sistema nervioso central descritas en el síndrome alcohólico fetal.

BIBLIOGRAFIA

1. AASE J.M. FAS in American Indians. A high risk group. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 3:153-156 (1981)
2. ABEL E.L. Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. *Neurobehav. Toxicol.*, 2:167-174 (1980)
3. ABEL E.L. Fetal alcohol syndrome: Behavioral teratology. *Psychol. Bull.*, 87:29-50 (1980)
4. ABEL L.E. Behavioral teratology of alcohol. *Psychol. Bull.*, 90:564-581 (1981)
5. ABEL E.L. Consumption of alcohol during pregnancy: A review of effects on growth and development of offspring. *Hum. Biol.*, 54:421-453 (1982)
6. ABEL E.L. y DINTCHEFF B.A. Effects of prenatal alcohol exposure on behavior of aged rats. *Drug Alcohol Depend.* 16:321-330 (1986)
7. ABEL E.L. y GREIZERSTEIN H.B. Relation of alcohol content in amniotic fluid, fetal and maternal blood. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 4:209 (1980)
8. ABEL E.L. y SOKOL R.J. Fetal alcohol syndrome is now leading cause of mental retardation. *Lancet*, 2:1222 (1986)
9. ABEL E.L. y SOKOL R.J. Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS-related anomalies. *Drug Alcohol Depend.*, 19:51-70 (1987)
10. ALVAREZ M.R. y STONE D.J. Hypoploidy and hyperplasia in the developing brain exposed to alcohol in utero. *Teratology*, 37:233-238 (1988)
11. AMANKWAH K.S., KAUFMANN R.C. y WEBERG A.D. Ultrastructural changes in neonatal liver tissue: Effects of maternal drinking. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 17:213-218 (1984)
12. ANDERSEN B., KIERZ S. y JUNGERMANN K. Perinatal development of the distributions of phosphoenolpyruvate carboxykinase and succinate dehydrogenase in rat liver parenchyma. *Eur. J. Cell Biol.*, 30:126-131 (1983)
13. AOKI C., MILNER T.A., BERGER S.B. y otros. Glial glutamate dehydrogenase: Ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J. Neurosci. Res.*, 18:305-318 (1987)

14. ARCAS R., JIMENEZ R. y CRUZ M. Síndrome alcohólico fetal. *Arch. Pediat.*, 29:147-154 (1987)
15. ARSALANIAN M.J., PASCOE E. y REINHOLD J.G. Rat liver alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Biochem. J.*, 125:22-58 (1971)
16. AW T.K. y JONES D.P. Respiratory characteristics of neonatal rat hepatocytes. *Pediatr. Res.*, 21:492-496 (1987)
17. BARAKAT I. Etude de la prolifération des neuroblastes d'hémisphères cérébraux d'embryons de poulet en culture. Effets stimulateurs d'extraits de cerveau et de facteurs. Tesis Doctoral, Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo (1983)
18. BARADNA E., LEO M.A., BOROWSKY S.A. y LIEBER C.S. Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. *J. Clin. Invest.*, 60:546-554 (1977)
19. BARNES D.E. y WALKER D.W. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Dev. Brain Res.*, 1:333-340 (1981)
20. BARR H.M., STREISSGUTH A.P., MARTIN D.C. y HERMAN C.S. Infant size at months of age: Relationship to maternal use of alcohol, nicotine, and caffeine during pregnancy. *Pediatrics*, 74:336-341 (1984)
21. BARTELS J.R. y HUBBARD A.L. Plasma membrane protein sorting in epithelial cells: Do secretory pathways hold the key?. *TIBS*, 13:181-184 (1988)
22. BENGTSOON B.G., KIESSLING K.H., SMITH-KIELLAND A. y MØRLAND J. Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 118:591-597 (1981)
23. BENJAMINS J.A. y MCKHANN G.M. Development, regeneration and aging of the brain. En: *Basic Neurochemistry* (Siegel G.J., Albers R.W., Agranoff B.W. y Katzman R., eds.) Little, Brown and Company, Boston, pp. 445-469 (1981)
24. BERGMAYER H.U. y BERNT E. Lactate dehydrogenase. UV-assay with pyruvate and NADH. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, Nueva York, pp. 574-579 (1974)

25. BERKOWITZ G.S., HOLFORD T.R. y BERKOWITZ R.L. Effects of cigarette smoking, alcohol, coffee and tea consumption on preterm delivery. *Early Hum. Devel.*, 7:239-250 (1982)
26. BINGOL N., FUCHS M., IOSUB S. y otros. Fetal alcohol syndrome associated with trisomy 21. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 11:42-44 (1987)
27. BOCK E. Immunochemical markers in primary cultures and in cell lines. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S. y Hertz L., eds.) Academic Press, Nueva York, pp.407-422 (1977)
28. BOGGAN W.O. 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 (1982)
29. BOSRON W.F. y LI T.K. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology*, 6:502-510 (1986)
30. BOVERIS A., OSHINO N. y CHANCE B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128:617-619 (1972)
31. BRIEN J.F., LOOMIS C.W., TRANMER J. y McGRATH M. Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 146:181-186 (1983)
32. BROWN N.A., GOULDING E.H. y FABRO S. Ethanol embryotoxicity: direct effects on mammalian embryos in vitro. *Science*, 206:573-575 (1979)
33. CAHUANA A. y GAIRI J. Incidencia de la embriofetopatía alcohólica y relación con el consumo de alcohol por la mujer gestante. En: *Síndrome Alcohólico Fetal, Jornadas Internacionales. Fundación Valgrande, Egraf, S.A., Madrid*, pp.147-160 (1985)
34. CHASNOFF I.J. Fetal alcohol syndrome in twin pregnancy. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 34:229-232 (1985)
35. CHRISTOFFEL K.K. y SALAFSKY I. Fetal alcohol syndrome in dizygotic twins. *J. Pediatr.*, 87:963-967 (1975)
36. CLARREN S.K., ALVORD E.C., SUMI S.M. y otros. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatrics*, 92:64-67 (1978)

37. CLARREN S.K. y SMITH D.W. The fetal alcohol syndrome. *N. Eng. J. Med.*, 298:1063-1067 (1978)
38. COGAN D.C., COHEN L.E. y SPARKMAN G. Effects of gestational alcohol on the development of neonatal reflexes in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5:517-522 (1983)
39. COLANGELO W. y JONES D.G. The fetal alcohol syndrome: A review and assessment of the syndrome and its neurological sequelae. *Progress Neurobiol.*, 19:271-314 (1982)
40. COWAN W.M. Desarrollo del cerebro. *Investigación Ciencia*, 38:72-85 (1979)
41. CRUZ-ORIVE L.M. y WEIBEL E.R. Sampling designs for stereology. *J. Microscopy*, 122:235-257 (1981)
42. CUEZVA J.M. Glucólisis y gluconeogénesis en el feto y neonato. En: *Bioquímica Perinatal*. Fundación Ramón Areces, Sodegraf S.A., Madrid, pp. 153-175 (1986)
43. DAVIS P.J.M., PARTRIDGE J.W. y STORRS C.N. Alcohol consumption in pregnancy. How much is safe?. *Arch. Dis. Child.*, 57:940-943 (1982)
44. DAVISON A.N y DOBBING J. (eds.). En: *Applied Neurochemistry*. Philadelphia: Davis (1968)
45. DEHAENE P., WALBAUN R., TITRAN M. y otros. La descendance des mères alcooliques chroniques, à propos de 16 cas d'alcoolisme foetal. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 72:492-498 (1977)
46. DEVIRGILIIS L.C., DINI L., DIPIERRO A. y otros. An improved nonperfusion method for the isolation and purification of rat foetal and neonatal hepatocytes. *Cell Mol. Biol.*, 27:687-694 (1981)
47. DOBBING J. y SANDS J. Vulnerability of developing brain. *Biol. Neonate*, 19:363-378 (1971)
48. DREOSTI I.E., BALLARD J., BELLIN G.B. y otros. The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and foetal development in the rat. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 5:357-362 (1981)
49. DROZ B. y WARSHAWSKY H. Reliability of the radioautographic technique for the detection of newly synthesized protein. *J. Histochem. Cytochem.*, 11:426-435 (1963)

50. DUNIGAM T.H. y WERLIN S.L. Extrahepatic biliary atresia and renal anomalies in fetal alcohol syndrome. *Am. J. Dis. Child.*, 135:1067-1068 (1981)
51. ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V. y FEATHERSTONE R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95 (1961)
52. ENG L.F., VANDERHAEGHEN J.J., BIGNAMI A. y GERSTL B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 28:351-354 (1971)
53. ERICKSSON C.K. Factors affecting the distribution and measurement of ethanol in the body. En: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol* (Majchrowicz E., ed.) Plenum Press, Nueva York, pp. 9-26 (1979)
54. ERIKSSON C.J.P., SIPPEL H.W. y FORSANDER O.A. The determination of acetaldehyde in biological samples by head space gas chromatography. *Anal. Biochem.*, 80:116-124 (1977)
55. ERNHART C.B., SOKOL R.J., MARTIER S. y otros. Alcohol teratogenicity in the human: A detailed assessment of specificity, critical period, and threshold. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156:33-39 (1987)
56. ESQUIFINO A., SANCHIS R. y GUERRI C. Effect of chronic ethanol intake on the response of plasma prolactin and Luteinizing hormone to estradiol benzoate administration. *IRCS Med. Sci.*, 13:979-980 (1985)
57. ESQUIFINO A., SANCHIS R. y GUERRI C. Effect of prenatal alcohol exposure on sexual maturation of female rat offspring. *Neuroendocrinology*, 44:483-487 (1986)
58. FALCON J., DOMENECH E., BUENO A. y MOYA M. Síndrome alcohólico fetal. Estudio de tres hermanas, dos de ellas gemelas. *Rev. Esp. Pediat.*, 36:35-42 (1980)
59. FARQUHAR M.G. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1:447-488 (1985)
60. FARQUHAR M.G., BERGERON J.J.M. y PALADE G.E. Cytochemistry of Golgi fractions prepared from rat liver. *J. Cell Biol.*, 60:8-25 (1974)
61. FEDOROFF S. y HERTZ L. (eds.). En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology*. Academic Press, Nueva York (1977)

62. FISHER S.E., ATKINSON M., BURNAP J.K. y otros. Ethanol-associated selective fetal malnutrition: A contributing factor in the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 15:197-201 (1982)
63. FRIED P.A. y O'CONNELL C.M. A comparison of the effects of prenatal exposure to tobacco, alcohol, cannabis and caffeine on birth size and subsequent growth. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:79-85 (1987)
64. GALTON F. *Natural Inheritance*. MacMillan, Londres (1889)
65. GIACOBINI E. En: *Morphological and Biochemical Correlates of Neural Activity* (Cohen M.M. y Snider R.S., eds.) Harper and Row, Nueva York, pp. 15-38 (1964)
66. GIMENEZ F. Alcoholismo: El enemigo público número tres. *Antena Dominical* 21:11-13 (1981)
67. GOEDDE H.W., BENKMANN H.G., KRIESE L. y otros. Aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity in four different chinese population. *Hum. Hered.*, 34:183-186 (1984)
68. GOLDMAN J.E. y CHIU F.C. Growth kinetics, cell shape, and the cytoskeleton of primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.*, 42:175-184 (1984)
69. GOLDSTEIN G. y ARULANANTHAM K. Neural tube defect and renal anomalies in a child with fetal alcohol syndrome. *J. Pediatr.*, 93:636-637 (1978)
70. GOMORI G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.*, 27:955-959 (1942)
71. GOODING P.E., CHAYEN J., SAWYER B. y SLATER T.F. Cytochrome P-450 distribution in rat liver and the effect of sodium phenobarbitone administration. *Chem. Biol. Interactions*, 20:299-310 (1978)
72. GRAHAM J.M. y FERM V.H. Heat- and alcohol-induced neural tube defects: interactions with folate in a golden hamster model. *Pediatr. Res.*, 19:247-251 (1985)
73. GREENFIELD N.J. y PIETRUSZKO R. Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isoenzymes. *Biochem. Biophys. Acta*, 483:35-45 (1977)

74. GREENGARD O., FEDERMAN M. y KNOX W.E. Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymatic differentiation. *J. Cell Biol.*, 52:261-272 (1972)
75. GUDER W.G. y SCHMIDT U. Liver cell heterogeneity, the distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the lobule of fed starved rats. *Z. Physiol. Chem.*, 357:1793-1800 (1976)
76. GUERRI C. Synaptic membrane alterations in rats exposed to alcohol. *Alcohol Alcoholism, Suppl.* 1:467-472 (1987)
77. GUERRI C., ESQUIFINO A. SANCHIS R. y GRISOLIA S. Growth, enzymes and hormonal changes in offspring of alcohol-fed rats. En: *Mechanism of Alcohol Damage in Utero. Ciba Foundation Symposium 105, Pitman, Londres*, pp. 85-102 (1984)
78. GUERRI C. y GRISOLIA S. Changes in glutathione in acute and chronic alcohol intoxication. *Pharmac. Biochem. Behav.*, 13, Suppl. 1:53-61 (1980)
79. GUERRI C. y GRISOLIA S. Effects of prenatal and postnatal exposure of rats to alcohol: Changes in (Na^+,K^+) -ATPase. *Pharmac. Biochem. Behav.*, 17:927-932 (1982)
80. GUERRI C. y GRISOLIA S. Chronic ethanol treatment effects synaptosomal membrane-bound enzymes. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, 18:45-50 (1983)
81. GUERRI C., MARQUES A., RENAU-PIQUERAS J. y BAGUENA R. Efecto de la exposición pre y postnatal al alcohol sobre los astrocitos y neuronas de rata. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica, Abstracts 261 (1985)
82. GUERRI C., RENAU-PIQUERAS J., SANCHIS R. y GRISOLIA S. Estudio experimental del Síndrome Alcohólico Fetal. En: *Síndrome Alcohólico Fetal, Jornadas Internacionales. Fundación Valgrande, Egraf, S.A., Madrid*, pp. 196-211 (1985)
83. GUERRI C. y SANCHIS R. Acetaldehyde and alcohol levels in pregnant rats and their fetuses. *Alcohol*, 2:267-270 (1985)
84. GUERRI C. y SANCHIS R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci.*, 38:1543-1556 (1986)

85. GUERRI C., WALLACE R. y GRISOLIA S. The influence of prolonged ethanol intake on the levels and turnover of alcohol and aldehyde dehydrogenases and of brain (Na+K)ATPase of rats. *Eur. J. Biochem.*, 86:581-587 (1978)
86. GUMUCIO J.J. y MILLER D.L. Functional implications of liver cell heterogeneity. *Gastroenterology*, 80:393-403 (1981)
87. GUMUCIO J.J. y MILLER D.L. Liver cell heterogeneity. En: *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias I., Popper H., Schachter S. y Shafritz D.A., eds.) Raven Press, Nueva York, pp. 647-661 (1982)
88. GUTMANN I. y BERNT E. Pyruvate kinase. Assay in serum and erythrocytes. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) Academic Press, Nueva York, pp. 774-778 (1974)
89. HABBICK B.F., CASEY R., ZALESKI W.A. y MURPHY F. Liver abnormalities in three patients with fetal alcohol syndrome. *Lancet* 1:580-581 (1979)
90. HABER B. y PEREZ-POLO R. Glial cells, astrocytes. En: *Encyclopedia of Neuroscience*, Vol. I (Adelman G., ed.) Birkhäuser, Boston, pp. 463-464 (1987)
91. HALMESMÄKI E., RAIVIO K.O. y YLIKORKALA O. Patterns of alcohol consumption during pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 69:594-597 (1987)
92. HANSON J.W., JONES K.L. y SMITH D.W. Fetal alcohol syndrome: experience with 41 patients. *JAMA*, 235:1458-1460 (1976)
93. HANSON J.W., STREISSGUTH A.P. y SMITH D.W. The effect of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. *J. Pediat.*, 92:457-460 (1978)
94. HANSSON E., RÖNNBÄCK L., LOWENTHAL A. y NOPPE M. Primary cultures from defined brain areas; effects of seeding time on cell growth, astroglial content and protein synthesis. *Develop. Brain Res.*, 21:175-185 (1985)
95. HERTZ L. Biochemistry of glial cells. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S. y Hertz L., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 39-71 (1977)
96. HERTZ L. Astrocytes. En: *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 1 (Lajtha A., ed.) Plenum Press, Nueva York, pp. 319-355 (1982)

97. HERTZ L., JUURLINK B.H.J., FOSMARK H. y SCHOUSBOE A. Methodological appendix: astrocytes in primary cultures. En: *Neuroscience Approached through Cell Cultures*, Vol. 1 (Pfeiffer S.E., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 175-186 (1982)
98. HERTZ L., JUURLINK B.H.J., FOSMARK H. y SCHOUSBOE A. Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. En: *A "Cookbook" for Culturing Neural and Glial Cells* (Shahar A., Filogamo A. y Vernadakis A., eds.) Internat. Soc. Dev. Neurosci., Chieti (Italia), p. 81 (1984)
99. HILLMAN R.W. Alcoholism and malnutrition. En: *The Biology of Alcohol: Clinical Pathology* (Hissen H. y Begleiter H., eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 513-581 (1974)
100. IDEO G., DeFRANCIS R., NINNO E.D. y DIOGUARDI N. Decrease of rat liver glutamate dehydrogenase after chronic administration of ethanol. *Enzymology*, 43:245-251 (1972)
101. ISHII R., JOLY J.G. y LIEBER C.S. Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 291:411-420 (1973)
102. JAUHONEN P., BARAONA E., MIYAKAWA H. y LIEBER C.S. Mechanism for selective perivenular hepatotoxicity of ethanol. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 6:350-357 (1982)
103. JAUME J. y SALA L. Epidemiología del alcoholismo en España. Aspectos básicos y clínicos del alcoholismo. *Insalud* nº 1505 (1988)
104. JI S., LEMASTERS J.J., CHRISTENSON V. y THURMAN R.G. Selective increase in pericentral oxygen gradient in perfused rat liver following ethanol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18:439-442 (1983)
105. JONES K.L. Aberrant neuronal migration in the Fetal Alcohol Syndrome. En: *Birth Defects: Original Article Series*, Vol. XI, Number 7. The National Foundation, pp. 131-132 (1975)
106. JONES K.L. y SMITH D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, 2:999-1001 (1973)
107. JONES K.L., SMITH D.W., ULLELAND C.N. y STREISSGUTH A.P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet*, 1:1267-1271 (1973)

108. JUNGERMANN K. Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes. *Enzyme*, 35:161-180 (1986)
109. JUNGERMANN K. y SASSE D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *TIBS*, 3:198-202 (1978)
110. KANAMURA S., KANAI K., OKA M. y otros. Quantitative analysis of development of mitochondrial ultrastructure in differentiating mouse hepatocytes during postnatal period. *J. Ultrastruct. Res.*, 93:195-204 (1985)
111. KATZ N., TEUTSCH H., JUNGERMANN K. y SASSE D. Perinatal development of metabolic zonation of hamster liver parenchyma. *FEBS Lett.*, 69:23-28 (1976)
112. KEILING D. y HARTREE E.F. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem. J.*, 39:293-295 (1945)
113. KIMBELBERG H.K. Primary astrocyte culture. A key to astrocyte function. *Cell Molec. Neurobiol.*, 3:1-16 (1983)
114. KOIVULA T. y KOIVUSALO M. Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, 397:9-23 (1975)
115. KOIVULA T. y LINDROS K.O. Effects of long-term ethanol treatment on aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 24:1936-1942 (1975)
116. KORNGUTH S.E., RUTLEDGE J.J., SUNDERLAND E. y otros. Impeded cerebellar development and reduced serum thyroxine levels associated with fetal alcohol intoxication. *Brain Res.*, 177:347-360 (1979)
117. KORRI U.M., NUUTINEN H. y SALASPURO M. Blood acetate - laboratory marker of alcoholism. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 8:130 (1984)
118. KREBS H.A. Glucogenesis and redox state. En: *Regulation of Gluconeogenesis* (Soling H.D. y Willms B., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 114-116 (1971)
119. LABARCA C. y PAIGEN K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.*, 102:344-352 (1980)
120. LADRAGUE P. *Alcoholisme et enfants. Thèse pour le doctorat en Médecine* (Steinheil G., ed.) París (1901)
121. LARSSON G. Prevention of fetal alcohol effects. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 62:171-178 (1983)

122. LEFKOWITCH J.H., RUSHTON A.R. y FENG-CHEN K.C. Hepatic fibrosis in fetal alcohol syndrome. *Gastroenterology*, 85:951-957 (1983)
123. LEMASTERS J.J., JI S., STEMKOWSKI C.J. y THURMAN R.G. Hypoxic hepatocellular injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18:455-459 (1983)
124. LEMOINE P., HAROUSSEAU H., BORTEYRU J.P. y MENUET J.C. Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées: A propos de 127 cas. *Quest Med.*, 25:476-482 (1968)
125. LEONARD B.E. y DUFFY O. Behavioural consequences of "in utero" exposure to ethanol: A rodent model of the foetal alcohol syndrome?. En: *Functional Teratogenesis* (Fujii T. y Adams P.M., eds.) Teiko University Press, pp. 89-100 (1987)
126. LEONG S.F. y CLARK J.B. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.*, 43: 106-111 (1984)
127. LI T.K. Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymology*, 45:427-483 (1977)
128. LIEBER C.S. Possible role of microsomal changes induced by ethanol intake in the development of tolerance and dependence. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 35:57-75 (1973)
129. LIEBER C.S. Alcohol and the liver. En: *The Liver Annual* (Arias I.M., Frenkel M. y Wilson J.H.P., eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 106-148 (1983)
130. LIEBER C.S. Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med. Scand.*, Suppl. 703:11-55 (1985)
131. LIEBER C.S. y DeCARLI L.M. The role of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 181:279-287 (1972)
132. LIEBER C.S. y DeCARLI L.M. Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed. Proc.*, 35:1232-1236 (1976)
133. LIEBER C.S. y DeCARLI L.M. The feeding of alcohol in liquid diets: Two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 6:523-531 (1982)

134. LIEBER C.S., TESCHKE R., HASUMURA Y. y DeCARLI L.M. Differences in hepatic and metabolic changes after acute and chronic alcohol consumption. *Fed. Proc.*, 34: 2060-2074 (1975)
135. LINDAHL R., CLARK R. y EVCES S. Histochemical localization of aldehyde dehydrogenase during rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 43:5972-5977 (1983)
136. LINDROS K.O., BENGTSSON G., SALASPURO M. y VAAKANEN H. Separation of functional different liver cell types. En: *Regulation of Hepatic Metabolism* (Thurman R.G., Kauffman F.C. y Jungermann K., eds.) Plenum Publishing Corporation, Nueva York, pp. 137-158 (1986)
137. LINDROS K.O., OSHINO N., PARRILLA R. y otros. Characteristics of ethanol and acetaldehyde oxidation on flavin and pyridine nucleotide fluorescence changes in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, 149:7956-7963 (1974)
138. LINDROS K.O. y PENTTILÄ K.E. Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or peri-venous hepatocytes. *Biochem. J.*, 228:757-760 (1985)
139. LINDROS K.O., STOWELL A., PIKKARAINEN P. y SALASPURO M. Elevated blood acetaldehyde in alcoholics with accelerated ethanol elimination. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13:119-124 (1980)
140. LITTLE R.E., STREISSGUTH A.P., BARR H.M. y HERMAN C.S. Decreased birth weight in infants of alcoholic women who abstained during pregnancy. *J. Pediatr.*, 96:974-976 (1980)
141. LORENZO M., RONCERO C. y BENITO M. The role of prolactin and progesterone in the regulation of lipogenesis in maternal and foetal rat liver in vivo in isolated hepatocytes during the last day of gestation. *Biochem. J.*, 239:135-139 (1986)
142. LOUD A.V. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.*, 37:27-46 (1968)
143. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275 (1951)
144. LYSER K.M. Differentiation of cells in organ cultures. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S. y Hertz L., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 121-139 (1977)

145. MAEKUBO H., MATSUSHIMA T., TAMURA Y. y otros. Effects of alcohol diet from the fetal period on lipid metabolism in rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 141:133-142 (1983)
146. MAJEWSKI F. Sintomatología clínica de la embriopatía alcohólica. En: *Síndrome Alcohólico Fetal, Jornadas Internacionales*. Fundación Valgrande, Egraf, S.A., Madrid, pp. 13-43 (1985)
147. MANDEL P., LEDIG M. y M'PARIA J.R. Ethanol and neuronal metabolism. *Pharmac. Biochem. Behav.*, 13, Suppl. 1:175-182 (1980)
148. MARQUES A. y GUERRI C. Effects of ethanol on rat brain (Na+K)ATPase from native and delipidized synaptic membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 37:601-606 (1988)
149. MARTIN J.C., MARTIN D.C., LUND C.A. y STREISSGUTH A.P. Maternal alcohol ingestion and cigarette smoking and their effects on newborn conditioning. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 1:243-247 (1977)
150. MARTIN J.C., MARTIN D.C., SIGMAN G. y RADOW B. Offspring survival, development and operant performance following maternal ethanol consumption. *Dev. Psychobiol.*, 10:435-446 (1976)
151. MARTINEZ-HERNANDEZ A., BELL K.P. y NOREMBERG M.D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195:1356-1358 (1977)
152. MARTINEZ RAMON A., FORTEZA G., HERNANDEZ J. y KNECHT E. En: *Autorradiografía y Ultraestructura Celular*. Semana Gráfica S.A., Valencia (1975)
153. MATSUDA Y., BARAONA E., SALASPURO M. y otros. Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus. Possible role in altered hepatic secretion of plasma proteins. *Lab. Invest.*, 41:455-463 (1979)
154. MATSUZAKI S. y LIEBER C.S. Increases susceptibility of hepatic mitochondria to the toxicity of acetaldehyde after chronic ethanol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75:1059-1065 (1977)
155. MAUCH T.J., DONOHUE T.M., ZETTERMAN R.K. y otros. Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology*, 6:263-269 (1986)
156. MEIHUIZEN S.P. y BLANSJAAR N. Stereological analysis of liver parenchymal cells from young and old rats. *Mech. Ageing Dev.*, 13:111-118 (1980)

157. MICHEL R.H. y HAWTHORNE J.V. The site of oliphospho-
inositiolate synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys.*
Res. Commun., 21:333-338 (1965)
158. MILLER M.W. Effects of alcohol on the generation and
migration of cerebral cortical neurons. *Science*, 233:
1308-1311 (1986)
159. MILLER M.W. Effects of prenatal exposure to alcohol on
the distribution and time of origin of corticospinal
neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 257:372-382
(1987)
160. MITCHELL M.C. y HERLONG H.F. Alcohol and Nutrition.
Ann. Rev. Nutr., 6:457-474 (1986)
161. MIZOI Y., IJIRI I., TATSUNO Y. y otros. Relationship
between facial flushing and blood acetaldehyde levels
after alcohol intake. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 10
:303-311 (1979)
162. MØLLER J., BRANDT N.J. y TYGSTRUP I. Hepatic dysfunc-
tion in patient with fetal alcohol syndrome. *Lancet*, 1:
605-606 (1979)
163. MORRISON G.R. y BROCK F.E. Quantitative measurement of
alcohol dehydrogenase in the lobule of normal livers.
J. Lab Clin. Invest., 70:116-120 (1967)
164. MORRISON G.R., BROCK F.E., KARL I.E. y SHANK R.E. Quan-
titative analysis of regenerating and degenerating
areas within the lobule of the carbon tetrachloride-
injured liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111:448-460
(1965)
165. MURRAY M.R. Introduction. En: *Cell, Tissue, and Organ
Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S. y Hertz L. eds.)
Academic Press, Nueva York, pp. 1-8 (1977)
166. NAKANO M., WORNER T.M. y LIEBER C.S. Perivenular fibro-
sis in alcoholic liver injury: ultrastructure and his-
tologic progression. *Gastroenterology*, 83:777-785
(1982)
167. NATHANIEL E.J., NATHANIEL D.R., MOHAMED S.A. y otros.
Growth patterns of rat body, brain, and cerebellum in
fetal alcohol syndrome. *Exp. Neurol.*, 93:610-620 (1986)
168. NEWMAN S.L., FLANNERY D.B. y CAPLAN D.B. Simultaneous
occurrence of extrahepatic biliary atresia and fetal
alcohol syndrome. *Am. J. Dis. Child*, 133:101 (1979)

169. NICHOUX M. Sur la passage de l'alcool ingeré de la mère an foetus, en particulier chez la femme. Com. Rend. Seance Soc. Biol. Fillial., 51:980-982 (1899)
170. NORTON S., TERRANOVA P., NA J. y SANCHO-TELLO M. Early motor development and cerebral cortical morphology in rats exposed perinatally to alcohol. Alcoholism Clin. Exp. Res., 12:130-136 (1988)
171. OBE G. y MAJEWSKI F. No elevation of exchange type aberrations in lymphocytes of children with alcohol embryopathy. Hum. Genet., 43:31-36 (1978)
172. OBE G. y RISTOW H. Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. Mutation Res., 65:229-259 (1979)
173. ORATZ M., ROTHSCHILD M.A. y SCHREIBER S.S. Alcohol, amino acids, and albumin synthesis: II, alcohol inhibition of albumin synthesis reversed by arginine and spermine. Gastroenterology, 71:123-127 (1976)
174. ORREGO H., BLAKE J.E., MEDLINE A. e ISRAEL Y. Interrelation of the hypermetabolic state, necrosis, anemia and cell enlargement as determinants of severity in alcoholic liver disease. Acta Med. Scand., Suppl. 703: 81-95 (1985)
175. O'SHEA K.S. y KAUFMAN M.H. The teratogenic effect of acetaldehyde: Implications for the study of the fetal alcohol syndrome. J. Anat., 128:65-76 (1979)
176. PEIFFER J., MAJEWSKI F., FISCHBACH H. y otros. Alcohol embryo- and fetopathy: neuropathology of three children and three fetuses. J. Neurol. Sci., 41:125-137 (1979)
177. PFEIFFER S.E., BETSCHART B., COOK J. y otros. Glial cell lines. En: Cell, Tissue and Organ Cultures in Neurobiology (Fedoroff S. y Hertz L., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 287-346 (1977)
178. PHILLIPS S.C. y CRAGG B.G. A change in susceptibility of rat cerebellar Purkinje cells to damage by alcohol during fetal, neonatal and adult life. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 8:441-454 (1982)
179. PIERCE D.R. y WEST J.R. Differential deficits in regional brain growth induced by postnatal alcohol. Neurotoxicol. Teratol., 9:129-141 (1987)

180. PIETRUSKO R., CRAWFORD K. y LESTER D. Comparison of substrate specificity of alcohol dehydrogenase from human liver, horse liver and yeast towards saturated 2-enoic alcohol and aldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159:50-60 (1973)
181. PIKKARAINEN P.H. y RAIHA N.C.R. Development of alcohol dehydrogenase activity in human liver. *Pediat. Res.*, 1: 165-168 (1967)
182. PIKKARAINEN P.H., SALASPURO M.P. y LIEBER C.S. A method for the determination of "free" acetaldehyde in plasma. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 3:259-261 (1979)
183. POPE A. Neuroglia: Quantitative aspects. En: *Dynamic Properties of Glial Cells* (Schoffeniels E., Franck G., Hertz L. y Tower D.B., eds.) Pergamon Press, Oxford, pp. 13-20 (1978)
184. POPPER H. y LIEBER C.S. Histogenesis of alcoholic fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Am. J. Pathol.*, 98: 695-716 (1980)
185. PORTOLES M., SANCHIS R. y GUERRI C. The effect of acute ethanol administration on plasma thyroid hormone levels in rat. *IRCS Med. Sci.*, 13:615-616 (1985)
186. PORTOLES M., SANCHIS R. y GUERRI C. Thyroid hormone levels in rats exposed to alcohol during development. *Horm. Metab. Res.*, 90:267-270 (1988)
187. PÖSSÖ A.R. Ethanol and hepatic protein turnover. *Alcohol Alcoholism, Suppl.* 1:83-90 (1987)
188. PRATT O.E. Introduction: what do we know of the mechanisms of alcohol damage "in utero"? En: *Mechanism of Alcohol Damage in Utero*. Ciba Foundation Symposium 105, Pitman, Londres, pp. 1-7 (1984)
189. RADFORD J. y BHATHAL P.S. Purification of fetal rat hepatocytes. *Cell Biol. Internat. Rep.*, 9:677-688 (1985)
190. RAINE C.S. Neurocellular anatomy. En: *Basic Neurochemistry* (Siegel G.J., Albers R.W., Agranoff B.W. y Katzman R., eds.) Little, Brown and Company, Boston, pp. 21-47 (1981)
191. RAKIC P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.*, 145: 61-84 (1972)

192. RAKIC P. Radial glial cells. En: Encyclopedia of Neuroscience, Vol. II (Adelman G., ed.) Birkhäuser, Boston, pp. 1022-1025 (1987)
193. RAMON Y CAJAL S. Histologie du système nerveux de l'homme et des certébrés. Maloine, Paris (1909)
194. RAMON Y CAJAL S. Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madr., 11:255-315 (1913)
195. RAPPAPORT A.M., BOROWY Z.J., LOUGHEED W.M. y LOTTO W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Anat. Rec., 119:11-34 (1954)
196. RAWAT A.K. Ribosomal protein synthesis in the fetal and neonatal rat brain as influenced by maternal ethanol consumption. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 12: 723-732 (1975)
197. RAWAT A.K. Effect of maternal ethanol consumption on foetal and neonatal rat hepatic protein synthesis. Biochem. J., 160:653-661 (1976)
198. RAWAT A.K. Effects of maternal ethanol consumption on hepatic lipid biosynthesis in foetal and neonatal rats. Biochem. J., 174:213-219 (1978)
199. RAWAT A.K. Ethanol and psychotropic drug interaction during pregnancy and lactation. Biochem. Pharmacol., 30:2457-2460 (1981)
200. RAWAT A.K. Consequences of maternal alcoholism on protein metabolism in the fetus and the newborn. En: Alcohol and Protein Synthesis. Research Monograph No. 10, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, pp. 111-150 (1983)
201. RENAU-PIQUERAS J., GOMEZ-PERRETTA C., GUERRI C. y SANCHIS R. Qualitative and quantitative ultrastructural alterations in hepatocytes of rats prenatally exposed to ethanol with special reference to mitochondria, Golgi apparatus and peroxisomes. Virchows Arch. A, 405: 237-251 (1985)
202. RENAU-PIQUERAS J., GUERRI C., MIRAGALL F. y otros. Alterations in the cytochemical activity of several phosphatases in hepatocytes from rats exposed prenatally to ethanol. Virchows Arch. B, 49:249-259 (1985)

203. RENAU-PIQUERAS J., MIRAGALL F., GUERRI C. y BAGUENA-CERVELLERA R. Prenatal exposure to alcohol alters the Golgi apparatus of newborn rat hepatocytes: A cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, 35:221-228 (1987)
204. REYES E., RIVERA J.M., SALAND L.C. y MURRAY H.M. Effects of maternal administration of alcohol on fetal brain development. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5: 263-267 (1983)
205. RILEY E.P., LOCHRY E.A. y SHAPIRO N.R. Lack of response inhibition in rats exposed to alcohol prenatally. *Psychopharmacology*, 62:47-52 (1979)
206. ROCKWOOD G.A. y RILEY E.P. Suckling deficits in rat pups exposed to alcohol in utero. *Teratology*, 33:145-151 (1986)
207. RØMERT P. y MATTHIESSEN M.E. Ethanol-induced changes of granular endoplasmic reticulum in hepatocytes of mini-pig foetuses. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A*, 91:413-417 (1983)
208. RØMERT P. y MATTHIESSEN M.E. Alcohol-induced injury of mitochondria in hepatocytes of mini-pig fetuses. *Virchows Arch. A*, 399:299-305 (1983)
209. RØMERT P. y MATTHIESSEN M.E. Fine structure of hepatocytes from mini-pig fetuses exposed to alcohol (ethanol) in vivo. *Acta Anat.*, 120:190-195 (1984)
210. RØNNBACK L. y HANSSON E. A model for cellular neurotoxicology. *ATLA*, 14:173-178 (1987)
211. ROQUETTE J. Influence de l'intoxication alcoolique parentele sur le développement physique et psychique des jeunes enfants. Tesis Doctoral, París (1957)
212. ROTHMAN J.E. The compartmental organization of the Golgi apparatus. *Scientific Am.*, 253:84-95 (1985)
213. ROTHSCHILD M.A., ORATZ M. y SCHREIBER S.S. Effects of ethanol on protein synthesis. En: *Alcohol and the Cell* (Rubin E., ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 492, pp. 233-244 (1987)
214. ROVINSKI B., HOSEIN E.A., LEE H. y otros. Hepatotoxicity of maternal ethanol consumption in rat offspring: An assessment with a study of the ontogenic development of ethanol-oxidizing systems. *Alcohol Drug Res.*, 7:195-205 (1987)

215. ROWE W.B., RONZIO R.A., WELLNER V.P. y MEISTER A. Glutamine synthetase (sheep brain). En: *Methods in Enzymology*, Vol. XVII A (Tabor H. y Tabor C.W., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 900-910 (1970)
216. SALINAS M., WALLACE R. y GRISOLIA S. Comparative studies in vivo and in vitro of rat-liver enzymes. *Eur. J. Biochem.*, 44:375-381 (1974)
217. SAMSON H.H. y DIAZ J. Effects of neonatal ethanol exposure on brain development in rodents. En: *Fetal Alcohol Syndrome*, Vol. III, Animal Studies (Abel E.L., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 131-150 (1982)
218. SANCHIS R. Efecto de la exposición pre y postnatal al alcohol sobre el desarrollo de la rata. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia (1985)
219. SANCHIS R. y GUERRI C. Acetaldehyde and alcohol levels in dams and fetuses at different gestation stages. *Alcohol*, 2:267-270 (1985)
220. SANCHIS R. y GUERRI C. Alcohol metabolizing enzymes in placenta and fetal liver. Effect of chronic ethanol intake. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 10:39-45 (1985)
221. SANCHIS R. y GUERRI C. Chronic ethanol intake in lactating rats: milk analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85:107-110 (1986)
222. SANCHIS R., GUERRI C., RENAU-PIQUERAS J. y GRISOLIA S. Effects of prenatal and postnatal alcohol intake on brain development. En: *Developmental Neuroscience: Physiological, Pharmacological and Clinical Aspects* (Caciagly F., Giacobini E. y Paleotti R., eds.) Elsevier Sci. Publs., Amsterdam, pp. 217-223 (1984)
223. SANCHIS R., SANCHO-TELLO M., CHIRIVELLA M. y GUERRI C. The role of maternal alcohol damage on the ethanol teratogenicity in the rat. *Teratology*, 36:199-208 (1987)
224. SANCHIS R., SANCHO-TELLO M. y GUERRI C. The effects of chronic alcohol consumption on pregnant rats and their offspring. *Alcohol Alcoholism*, 21:295-305 (1986)
225. SANCHIS R., SANCHO-TELLO M. y GUERRI C. The role of liquid diet formulations in the postnatal ethanol exposure via rat mothers milk. *J. Nutr.* (en prensa)
226. SANCHO-TELLO M., SANCHIS R. y GUERRI C. Effect of short and long-term ethanol feeding on the extent of metabolic tolerance in female rats. *Alcohol Alcoholism* (en prensa)

227. SANTOLAYA J.M., MARTINEZ G., GOROSTIZA E. y otros. Alcoholismo fetal. *Drogalcohol*, 4:183-192 (1978)
228. SCHMUCKER D.L., MOONEY J.S. y JONES A.L. Age-related changes in the hepatic endoplasmic reticulum: A quantitative analysis. *Science*, 197:1005-1008 (1977)
229. SCHOUSBOE A. Differences between astrocytes in primary cultures and glial cell lines in uptake and metabolism of putative amino acid transmitters. En: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology* (Fedoroff S. y Hertz L., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 441-446 (1977)
230. SEGAL H.L. y MATSUZAWA T. L-Alanine aminotransferase (Rat liver). En: *Methods in Enzymology*, Vol. XVII A (Tabor H. y Tabor C.W., eds.) Academic Press, Nueva York, pp. 153-159 (1970)
231. SEIDENBERG J. y MAJEWSKI F. Zur Haufigkeit der Alkohol-embryopathie in den verschiedenen Phasen der mütterlichen Alkoholkrankheit. *Suchtgefahren*, 24:63-75 (1978)
232. SENSENBRENNER M., DEVILLIERS G., BOCK E. y PORTE A. Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells. Effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments. *Differentiation*, 17:51-61 (1980)
233. SHANK R.E., MORRISON G. CHENG C.H. y otros. Cell heterogeneity within the hepatic lobule (quantitative histochemistry). *J. Histochem. Cytochem.*, 7:237-239 (1959)
234. SJOBLON M., PILSTROM L. y MORLAND J. Activity of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenases in the liver and placenta during the development of the rat. *Enzyme*, 23:108-115 (1978)
235. SMITH C.A. Effects of maternal undernutrition upon the newborn infant in Holland. *J. Pediatr.*, 30:229-243 (1947)
236. SNYDER A.K., SINGH S.P. y PULLEN G.L. Ethanol-induced intrauterine growth retardation: Correlation with placental glucose transfer. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 10:167-170 (1986)
237. SOKOL R.J., MILLER S.I. y REED G. Alcohol abuse during pregnancy: An epidemiological study. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 4:135-145 (1980)

238. SOMJEN G. Glial cells, functions. En: Encyclopedia of Neuroscience, Vol. I (Adelman G., ed.) Birkhäuser, Boston, pp. 465-466 (1987)
239. SPOHR H.L. y STOLTENBURG-DIDINGER G. Morphological aspects of experimental alcohol fetopathy: Purkinje cell development and synaptic maturation in Wistar rats exposed to alcohol pre- and postnatally. En: Alcohol and the Developing Brain (Rydberg U. y otros, eds.) Raven Press, Nueva York, pp. 109-124 (1985)
240. STEVENS U.J., FANTL W.J., NEWMAN C.B. y otros. Acetaldehyde adducts with hemoglobin. J. Clin. Invest., 67: 361-369 (1981)
241. STOLTENBURG-DIDINGER G. y SPOHR H.L. Fetal alcohol syndrome and mental retardation: spine distribution of pyramidal cells in prenatal alcohol-exposed rat cerebral cortex. A Golgi study. Dev. Brain Res., 11:119-123 (1983)
242. STREISSGUTH A.P., HERMAN C.S. y SMITH D.W. Intelligence, behavior and dysmorphogenesis in the fetal alcohol syndrome: A report of 20 patients. J. Pediatrics, 92:363-367 (1978)
243. STREISSGUTH A.P. y LaDUE R.A. Alteraciones psicológicas y del comportamiento en niños expuestos al alcohol antes del nacimiento. En: Síndrome Alcohólico Fetal. Fundación Valgrande, Jornadas Internacionales. Egraf, S.A., Madrid, pp. 109-129 (1985)
244. STREISSGUTH A.P., LANDESMAN-DWYER S., MARTIN J.C. y SMITH D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and animals. Science, 209:353-361 (1980)
245. STREISSGUTH A.P. y MARTIN J.C. Prenatal effects of alcohol abuse in humans and laboratory animals. En: The Pathogenesis of Alcoholism, Vol. 7 (Kissin B. y Begleiter H., eds.) Plenum Publishing Corporation, Nueva York, pp. 539-589 (1983)
246. STURGESS J.M. y de la IGLESIA F.A. Morphometry of the Golgi apparatus in developing liver. J. Cell Biol., 55: 524-530 (1972)
247. SULLIVAN W.C. A note on the influence of maternal inebriety on the offspring. J. Men. Sci., 45:489-503 (1899)
248. SUOKAS A., FORSANDER O. y LINDROS K. Distribution and utilization of alcohol-derived acetate in the rat. J. Stud. Alcohol, 45:381-385 (1984)

249. SYAPIN P.J. y NOBLE E.P. Studies on ethanol's effects on cells in culture. En: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol* (Majchrowicz E. y Noble E.P., eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 521-540 (1979)
250. TAKAGI T., ALDERMAN J. y LIEBER C.S. In vivo roles of alcohol dehydrogenase (ADH), catalase and the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) in deermice. *Alcohol*, 2:9-12 (1985)
251. TENNES K. y BLACKARD C. Maternal alcohol consumption, birth-weight and minor physical anomalies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138:774-780 (1980)
252. TEWARI S. y CRAIN S. Ethanol induced changes on "in vitro" protein synthesis during the development and maturation of brain tissue. En: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems IV. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 132 (Thurman R.G., ed.) Plenum Press, Nueva York, pp. 813-821 (1980)
253. THADANI P.V. y SCHAUBERG S.M. Effects of maternal ethanol ingestion on serum growth hormone in the developing rat. *Neuropharmacology*, 18:821-826 (1979)
254. THURMAN R.G. Induction of hepatic microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent production of hydrogen peroxide by chronic prior treatment with ethanol. *Molec. Pharmacol.*, 9:670-675 (1973)
255. THURMAN R.G., JI S. y LEMASTERS J. Lobular oxygen gradients: Possible role in alcohol-induced hepatotoxicity. En: *Regulation of hepatic metabolism* (Thurman R.G., Kauffman F.C. y Jungermann K., eds.) Plenum Publishing Corporation, Nueva York, p. 293 (1986)
256. TOBIN T., AKERA T. y BRODY T. Gel electrophoretic identity of the (Na⁺+Mg²⁺) and (Na⁺+Ca²⁺) stimulated phosphorylations of rat brain ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 389:117 (1975)
257. TONDA K., HASEGAWA T. y HIRATA M. Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatments on monooxygenase activities and proportions of isolated rat hepatocyte subpopulations. *Mol. Pharmacol.*, 23:235-243 (1983)
258. TUMA D.J., MAILLIARD M.E., CASEY C.A. y otros. Ethanol-induced alterations of plasma membrane assembly in the liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 856:571-577 (1986)

259. VAAKANEN H. y LINDROS K.O. Comparison of ethanol metabolism in isolated periportal or perivenous hepatocytes: Effects of chronic ethanol treatment. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 9:315-321 (1985)
260. VAAKANEN H., SALASPURO M. y LINDROS K. The effect of chronic ethanol ingestion on ethanol metabolizing enzymes in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology*, 4:862-866 (1984)
261. VEGHELYI P.V. y OSZTOVICS M. The alcohol syndrome: The intrarecombigenic effect of acetaldehyde. *Experientia*, 34:195-196 (1976)
262. VEGHELYI P.V., OSZTOVICS M. y SCASZOVSKY E. Maternal alcohol consumption and birth weight. *Br. Med. J.*, 2: 1365-1366 (1978)
263. VIÑA J., ESTRELA J.M., GUERRI C. y ROMERO F.J. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, 188:549-552 (1980)
264. VOLENTINE G.D., TUMA D.J. y SORRELL M.F. Subcellular location of secretory proteins retained in the liver during the ethanol-induced inhibition of hepatic protein secretion in the rat. *Gastroenterology*, 90:158-165 (1986)
265. VOLK B., BERLET H.H. y MALETZ J. The influence of alcohol on cerebellar histo- and synaptogenesis. Light and electron microscopic histochemical and neurochemical investigations of the rat cerebellar cortex. *Drug Alcohol Depend.*, 6:67 (1980)
266. VON WARTBURG J.P. Pharmacokinetics of alcohol in the normal and alcoholic subject. En: *Pharmacological Treatments for Alcoholism* (Edwards G. y Littleton J., eds.) CROOM HELM, Londres, pp.67-86 (1984)
267. VON WARTBURG J.P., PARENBERG J. y AEBI H. An atypical human alcohol dehydrogenase. *Can. J. Biochem.*, 43:889-896 (1965)
268. VORHEED C.V. y FERNANDEZ K. Effects of short-term prenatal alcohol exposure on maze, activity, and olfactory orientation performance in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 8:23-28 (1986)
269. WALLGREN H. y BARRY H. En: *Actions of Alcohol*. Elsevier, Nueva York (1970)

270. WALLIN B. y MØRLAND J. The role of glucose and insulin in the effect of ethanol on protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Alcohol Alcoholism*, 22:219-226 (1987)
271. WANSON J.C., DROCHMANS P., MAY C. y otros. Isolation of centrilobular and perilobular hepatocytes after phenobarbital treatment. *J. Cell Biol.*, 66:23-41 (1974)
272. WARNER R.H. y ROSETT H.L. The effects of drinking on offspring: An historical survey of the American and British literature. *J. Stud. Alcohol*, 36:1395-1420 (1975)
273. WATT B.K. y MERRILL A.L. Data used for calculating energy values of foods or food groups by the Atwater system. En: *Agricultural Handbook no. 8, Composition of Foods*, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., p. 160 (1963)
274. WEIBEL E.R. En: *Stereological Methods, Vol. 1* (Weibel E.R., ed.) Academic Press, Nueva York (1979)
275. WEST J.R. y PIERCE D.R. The effect of in utero ethanol exposure on hippocampal mossy fibers: an HRP study. *Develop. Brain Res.*, 15:275-279 (1984)
276. WHITE F.P. y HERTZ L. Protein synthesis by astrocytes in primary cultures. *Neurochem. Res.*, 6:353-364 (1981)
277. WHUR P., HERSCOVICS A. y LEBLOND C.P. Radioautographic visualization of the incorporation of galactose-³H and mannose-³H by rat thyroids in vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. *J. Cell Biol.*, 43:289-311 (1969)
278. WICKRAMASINGHE S.N. Neuroglial and neuroblastoma cell lines are capable of metabolizing ethanol via an alcohol-dehydrogenase-independent pathway. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 11:234-237 (1987)
279. WILLIAMS M. Stereological techniques. En: *Practical Methods in Electron Microscopy, Vol. 6, part II* (Glauert A.M., ed.) North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, pp. 1-84 (1977)
280. WISNIEWSKI K., DAMBSKA M., SHER J. y QUAZI Q.A. A clinical neuropathological study of the fetal alcohol syndrome. 9th Int. Congr. Neuropathol., Abstracts, p. 78 (1982)

281. ZERN M.A., SHAFRITZ D.A. y SHIELDS D. Hepatic protein synthesis and its regulation. En: *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias I., Popper H., Schachter D. y Shafritz D. A., eds.) Raven Press, Nueva York, pp. 103-121 (1982)

TITULO DE LA TESIS:

Estudio experimental del Síndrome Alcohólico Fetal: alteraciones en desarrollo de hepatocitos, y de astrocitos en cultivo primario.

AUTOR: MARIA SANCHO-TELLO VALLS

DIRECTOR: Dra. CONSUELO GUERRI SIRERA y Dr. JAIME RENU PIQUERAS

TRIBUNAL: Prof. Dr. D. JOSE VIÑA RIBES

Prof. Dr. D. MANUEL BENITO DE LAS HERAS

Prof. Dr. D. M^a JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER

Prof. Dr. D. JOSE CABO SOLER

Prof. Dr. D. FEDERICO PALLARDO CALATAYUD

FECHA DE LA LECTURA: 25 Noviembre 1988

CALIFICACION OBTENIDA: Apto "Cum Laude"



"ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL SINDROME ALCOHOLICO FETAL: ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DE HEPATOCITOS, Y DE ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO".

Tesis Doctoral presentada por MARIA SANCHO-TELLO VALLS.

La exposición prenatal al alcohol causa una serie de alteraciones que constituyen el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF). Debido a la obvia dificultad que representa trabajar en humanos se ha tratado de reproducir dicho síndrome en animales experimentales.

En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo que reproduce, en la rata, gran parte de las alteraciones que se observan en niños con SAF, entre las que destaca un menor crecimiento cerebral con retraso en el desarrollo de las células nerviosas. Además, observamos alteraciones en la estructura y funciones de los hepatocitos, alteraciones hormonales, etc. Basándonos en las alteraciones observadas en dichos animales, y debido a la dificultad de esclarecer "in vivo" los mecanismos básicos de actuación del alcohol, pretendimos estudiar su efecto sobre células aisladas de hígado y cerebro de animales en desarrollo, puesto que es en estos órganos donde encontramos las alteraciones más marcadas.

Los objetivos de este trabajo han sido desarrollar un procedimiento para aislar hepatocitos de ratas fetales y neonatales, estudiando algunas de sus funciones, como la síntesis y glicosilación de proteínas, por métodos bioquímicos y autorradiográficos. Al mismo tiempo, debido a la existencia de una toxicidad selectiva del alcohol en hepatocitos de diferentes zonas del acino hepático, desarrollamos un procedimiento para separar los hepatocitos en subpoblaciones, caracterizando especialmente los de las zonas periportal y perivenosa, por distintos métodos. Este estudio se ha realizado en ratas fetales o neonatales expuestas pre y postnatalmente al alcohol, y en sus respectivos controles.

Se ha obtenido un buen aislamiento celular, con un alto grado de pureza y viabilidad. Los hepatocitos obtenidos de fetos expuestos al alcohol presentaron una disminución de la síntesis de proteínas junto con una alteración en el proceso de glicosilación de éstas. En cuanto a la separación de hepatocitos en subpoblaciones, dos de éstas presentaban características bioquímicas y morfológicas de células periportales y perivenosas. Las subpoblaciones aisladas de ratas ex-

puestas al alcohol mostraron alteraciones más marcadas (tanto bioquímicas como ultraestructurales) en los hepatocitos de la zona perivenosa.

Por otra parte, para estudiar el efecto directo del etanol sobre el desarrollo del sistema nervioso, y debido a la dificultad de estudiar dicho efecto "in vivo", tanto por la complejidad de dicho sistema como por los efectos que se asocian al consumo de alcohol, se ha recurrido al aislamiento y cultivo de un tipo de célula nerviosa, eligiendo los astrocitos por las importantes funciones que desempeñan tanto en el cerebro adulto como durante su desarrollo.

Los objetivos han sido caracterizar estos cultivos mediante la evaluación de la proliferación y diferenciación de dichas células, cuantificando el contenido y síntesis de macromoléculas (ADN, ARN y proteína), actividades de enzimas marcadoras y ligadas a membranas, y morfología de las células en cultivo. Los astrocitos se obtuvieron de fetos de rata expuestos prenatalmente al alcohol, así como de sus correspondientes controles. Además se ha estudiado el efecto del alcohol "in vitro" sobre el crecimiento y maduración de las células de ambas procedencias.

Se ha obtenido unos cultivos de astrocitos con un crecimiento y diferenciación semejantes a los descritos previamente, con un alto grado de viabilidad y pureza (medido mediante la presencia de la proteína fibrilar ácida de la glía, marcadora de astrocitos). La presencia de alcohol "in vitro" determinó una disminución del contenido y síntesis de las macromoléculas estudiadas, a lo largo de todo el tiempo del cultivo (3-4 semanas); también se observó una disminución en la actividad de enzimas marcadoras de astrocitos así como de las ligadas a la membrana plasmática. Las células procedentes de fetos expuestos al alcohol y cultivadas en ausencia de este tóxico, presentaron una disminución del contenido y síntesis de dichas macromoléculas, así como de las actividades enzimáticas estudiadas. Dichas disminuciones fueron más evidentes cuando estos astrocitos crecieron "in vitro" en presencia de alcohol.

Estos resultados pueden esclarecer algunos de los mecanismos básicos implicados tanto en las disfunciones cerebrales como en la toxicidad hepática que se observan en el Síndrome Alcohólico Fetal.