

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



Departamento de Ciencias Morfológicas

TESIS DOCTORAL

ACCION DEL ETANOL SOBRE LA ONTOGENESIS

OCULAR

Jesús M^o. Martín Molina

Granada, 1995



UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
MORFOLOGICAS
18071 - GRANADA

Teléf. (958) 24 35 35
FAX: (958) 24 35 35

LUIS MEGIAS MEGIAS, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Granada

INFORMA:

Que la presente Tesis Doctoral "Acción del etanol sobre la ontogénesis ocular", que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía Don Jesús Martín Molina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Granada, considerando que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente informe en Granada a 6 de Julio de 1995.



Dr.: Luis Megías Megías

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en la Sección de Ultraestructura del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Granada durante los años 1991 a 1995, siendo subvencionada por el proyecto de investigación PM 91/0111: "Acción de la exposición al etanol sobre el desarrollo embrionario del pollo. Mecanismos de neurotoxicidad", de la DGICYT.

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas:

Al Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Granada, por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Megias, por su impagable labor rectora del trabajo de investigación objeto de esta tesis doctoral.

Al Dr. J. Arcadio Roda, director del grupo de Investigación de Neuroteratología Experimental y de la Sección de Ultraestructura, por su ayuda y consejo permanente.

A Doña Concepción Hernández y al Dr. David Porcel, de los Servicios Técnicos de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Granada, por la inestimable colaboración prestada durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Al Dr. José Robles, profesor de Oftalmología de la Universidad de Granada, por la ayuda y consejos prestados.

A la Dra. Francisca Molina, por su efectiva colaboración, siempre atenta a nuestros requerimientos.

A mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Hospital Torrecárdenas de Almería, por las facilidades dadas para el desempeño de las labores investigadoras en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

A mi mujer, por su apoyo y comprensión, así como por el tiempo robado durante los años en que se realizó el trabajo.

A mi familia, sin cuya ayuda me habría sido muy difícil desarrollar mi labor como doctorando.

Y, de modo muy especial, a todo aquel que se sienta injustamente ausente en estos agradecimientos.

A mis abuelos

A mis padres

A mi mujer y a mi hija

I.- INTRODUCCION

I. 1.- El alcohol etílico y el alcoholismo. Introducción histórica	1
I. 2.- El consumo de alcohol en España	6
I. 3.- Metabolismo del etanol	11
I. 3. 1.- Absorción del etanol	11
I. 3. 2.- Sistemas de oxidación	12
I. 3. 3.- Alteraciones metabólicas asociadas a la oxidación del etanol	13
I. 4.- Efectos del etanol sobre las membranas celulares	15
I. 5.- Alteraciones orgánicas relacionadas con la ingesta de etanol	15
I. 5. 1.- Efectos del etanol sobre el Sistema Nervioso	17
I. 6.- El etanol como teratógeno o embriotóxico	18
I. 6. 1.- El Síndrome Alcohólico Fetal o Embriofetopatía alcohólica	19
I. 6. 1. 1.- Concepto y características clínicas	21
I. 6. 1. 2.- Incidencia	22
I. 6. 1. 3.- Síndrome Alcohólico Fetal y Sistema Nervioso Central	23
I. 6. 1. 4.- Oftalmología y Síndrome Alcohólico Fetal	23
I. 7.- Objetivos de la investigación	28

II.- MATERIAL Y METODOS

II. 1.- Material biológico	29
II. 1. 1.- Modelo experimental	29
II. 1. 2.- Características diferenciales del ojo de las Aves	32
II. 1. 3.- Grupos de estudio y tratamiento	33
II. 1. 4.- Determinación de etanol	33
II. 1. 5.- Medida del desarrollo ontogénico	34
II. 2.- Preparación de las muestras	35
II. 3.- Tratamiento de los datos	36

III.- RESULTADOS

III. 1.- Concentración de etanol en los embriones	37
III. 2.- Efectos sobre el desarrollo ontogénico temprano	38
III. 3.- Efectos sobre el desarrollo ontogénico ocular	59
III. 3. 1.- Estudio del retraso en el desarrollo ocular	59
III. 3. 2.- Estudio del retraso en el crecimiento del globo ocular	61
III. 3. 3.- Análisis estructural	62
III. 3. 3. 1.- La retina	62
III. 3. 3. 2.- El cristalino	89
III. 3. 3. 3.- La córnea	111

IV.- DISCUSION

IV. 1.- El etanol en el embrión	118
IV. 2.- Acción embrio- y neurotóxica	119
IV. 3.- Acción tóxica sobre el ojo en formación	122

V.- CONCLUSIONES	138
-------------------------	------------

VI.- BIBLIOGRAFIA	140
--------------------------	------------

I.- Introducción

I. 1.- El alcohol etílico y el alcoholismo. Introducción histórica

La palabra alcohol viene del árabe **ألكحول** (al-kuhl, el colirio), y etimológicamente significa lo bueno, la esencia de una cosa.

De forma genérica utilizamos el nombre de alcohol como sinónimo de etanol, a pesar de que existen otros numerosos productos químicos que son también alcoholes. El etanol, o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), es el denominador común y el principal componente de todas las bebidas alcohólicas, y su principal sustancia psicoactiva. Se trata de una sustancia líquida a temperatura ambiente, muy volátil y fuertemente hidrófila y lipófoba, que una vez ingerida se distribuye rápidamente por todos los compartimientos líquidos del cuerpo, estando ausente en los componentes grasos del mismo (Caballero, J.M., 1967). Hay tres clases fundamentales de bebidas alcohólicas, las fermentadas, las destiladas y las artificiales, que contienen diferentes porcentajes de etanol: la cerveza (3-10)%, el vino (8-23)%, los vermouths y aperitivos (14-24)%, bebidas destiladas y aguardientes (40-70)%, y los licores (25-50)%.

El consumo de bebidas alcohólicas ha sido una constante a lo largo de la historia de la humanidad (Bravo, F. y Bravo, J.M., 1993). Hay evidencias de que el hombre de Cro-Magnon, originario del Próximo Oriente, que vivió en Europa en el Paleolítico Superior, y más tarde en el norte de Africa, conocía que los jugos de las frutas azucaradas, expuestos al aire durante algún tiempo, se convertían en una bebida con propiedades especiales. Es muy probable que las sociedades primitivas

consumiesen alcohol en celebraciones con raíces de carácter ritual, místico o religioso, "...para luchar contra el miedo y la angustia que le producía su precaria situación en el seno de una naturaleza desconocida y peligrosa..." (Horton, D., 1943,1950), o bien "... como instrumento para incrementar la potencialidad individual y el desarrollo de lazos interpersonales..." (Perrin, P., 1960; Jellinek, E.M., 1965).

El consumo de cerveza se popularizó antes que el del vino, pues la fabricación de cerveza ha estado ligada al cultivo de los cereales de los que se obtiene por fermentación. Así se sabe que el hombre ya fabricaba cerveza en el Neolítico. De la fermentación de granos y harinas se obtenía una bebida de bajo contenido en alcohol, espesa y de no muy buen sabor, que había de ser decantada antes de beberse. En las civilizaciones de Mesopotamia y Anatolia (4.000 años a.C.), casi la mitad de la producción cerealística se dedicaba a la fabricación de la cerveza (*Sirkaru*). Se cree que en China ya se consumía.

La primera industria cervecera se instaló en el Egipto faraónico, en Peluso (hoy Port Said), hacia el año 2.500 a.C., el dios Osiris era el patrón de los cerveceros. La cerveza egipcia (*Zythum*) hubo de ser una bebida tan popular que, además de proporcionar una importante fuente de ingresos para el imperio (Engs, R.C., 1979), fue necesario regular su consumo en el considerado como primer código legislativo de la humanidad, el Código de Hammurabi (o Hammu-Rapi, sexto rey de la 1ª dinastía de Babilonia, 1793-1750 a.C.).

En el Imperio Inca la cerveza se bebía en servicios religiosos de obligado cumplimiento (culto al dios del maíz), que ordenaban embriagarse en lugar y fechas determinados, castigándose con pena de muerte a los individuos que contravenían sacrílegamente este mandato.

En el Imperio Romano el vino era una bebida que, durante mucho tiempo, sólo podían permitirse los patricios, mientras el pueblo, ya sea por su escasez o porque era muy caro, consumía cerveza. Los galos, germanos, bretones e iberos consideraban que el vino ablandaba la mente y el carácter de los luchadores, por lo que bebían cerveza, que era considerada como una poción mágica, que dotaba de fuerza y valor a los guerreros.

El consumo de cerveza se reintroduce en España cuando viene el emperador

Carlos I. La corte flamenca que le acompaña incluye cerveceros, siendo Enrique Vander Duysen el encargado de fabricar en nuestro país las primeras cervezas para el monarca, extendiéndose su consumo entre nobles y cortesanos. El pueblo, sin embargo, no la consume al considerarla como una bebida extranjera. Es de destacar que uno de los médicos imperiales, el flamenco Andries Van Wesel (Vesalio, 1515-1564), ya observó la alta incidencia de cirrosis hepáticas entre los individuos que consumían grandes cantidades de alcohol.

Hasta finales del siglo XIX y principios del XX no se populariza de nuevo su consumo en nuestro país, y es en el último tercio de nuestro siglo cuando se generaliza. En la actualidad ha aumentado su consumo de tal modo que, en unidades de volumen, se consume más que el vino.

El origen del vino no está bien aclarado. Como ya hemos expuesto con anterioridad, durante muchos milenios, las comunidades primitivas, atribuyeron a la intervención sobrenatural la conversión en vino de determinados jugos azucarados de frutas. Por lo tanto, no parece extraño que su ingesta estuviese ligada a ritos de carácter místico-religioso.

Se cree que durante el primer milenio a.C. los fenicios introdujeron el cultivo de la vid y del olivo en el oriente mediterráneo, y que desde allí llegó a la Península Ibérica. Su descubrimiento parece remontarse a las primeras civilizaciones del Próximo Oriente. Se atribuye a Jam-Sheed (Jefferis, J., 1994), fundador de Persépolis (siglo VI a.C.), el descubrimiento del vino, conocido en Persia como "el veneno delicioso". Según parece el primer vino que alcanzó cierta popularidad se obtenía por fermentación de dátiles, y el escritor y filósofo griego, discípulo de Sócrates, Jenofonte (Xenophón, c. 430 a.C) lo describió, tras su viaje a Persia, como "una bebida agradable que provoca dolor de cabeza". En las antiguas culturas orientales se extendió ampliamente el consumo de vinos obtenidos por la fermentación del arroz.

Conocemos también que los griegos practicaban la vinicultura como arte. El discípulo de Aristóteles, Teofrasto de Ereso (372-286 a.C.), escribe los primeros ensayos sobre la citada materia. En el Antiguo Testamento de la Biblia, se cita el vino más de 500 veces, en relación con su producción y consumo.

El cultivo de la vid, propio de toda la cuenca mediterránea, y que junto con el

olivo y el trigo constituían una característica triada, fue extendido a todo el Imperio Romano, hasta tal punto que su producción hubo de ser regulada. El emperador Dominiano (81-96 d.C.) ordenó arrancar la mitad de las vides para proteger la producción de cereales y evitar el hambre. La Bética, sin embargo, logró resistir las citadas medidas tendientes a limitar la expansión de la vid, al amparo de los permisos especiales otorgados por Probo (s. III) a Hispania y Galia.

Tenemos constancia de que en España, tras la caída del Imperio Romano, se sigue cultivando la vid. Aunque el profeta Mahoma (siglo VII) prohíbe a los musulmanes el consumo de cualquier bebida alcohólica -lo que hace que durante algunos siglos disminuya su utilización-, en nuestra península hay indicios de que en tiempos de Mohamed I (Mumammad I, emir de Córdoba, 852-866) se autoriza su ingesta a los residentes en zonas fronterizas, en continua lucha con los infieles, pese a la prohibición del Corán (Wernitz, A., 1990). Es más, los famosos médicos hispanos Avicena, Averroes y Maimónides, aconsejaban el empleo moderado del vino como fármaco preventivo y en algunas patologías. Desde el siglo IX se produjo en al-Andalus una nueva expansión vitivinícola. Precisamente al alquimista árabe Yabir o Geber (Abù Mùsà Yabir, c. 800 d.C.) debemos la explicación de algunos de los aspectos teóricos del proceso de destilación. Buscaba la "esencia" o "espíritu" del vino, pues, como hemos dicho con anterioridad, se pensaba que el proceso de fermentación del mosto, y su transformación en vino, se debía al "espíritu" del dios que el vino poseía.

La descripción más antigua de la fabricación de alcohol (*aqua ardens*), a base de vino, la encontramos en el Códice del Maestro de Salerno (siglo XII). Se trata de un poema médico-didáctico que además contiene recomendaciones contra los excesos de la bebida en la mesa. Es por tanto gracias a la Escuela de Salerno (la más antigua escuela del occidente europeo) que el alcohol empezó a conocerse y consumirse en Europa a partir del siglo XIII. Tanto es así que se cuenta que cuando en 1519 Magallanes salió del puerto de Sevilla, al mando de 5 naves, con la intención de dar la vuelta al mundo, invierte más dinero en la compra de vino que en la dotación de armas (Horton, D., 1950). En los ss. XVI-XVII exportamos la viticultura al nuevo continente, llegando a competir su producción con la peninsular, al extremo de que Felipe III, en 1602, prohíbe las nuevas plantaciones de viñas en América.

Hacia finales del siglo XVIII y principios del XIX (con el comienzo de la revolución industrial), cambia la estructura de consumo del vino, accede a su consumo masivo un incipiente proletariado, lo que hace que aumente su producción y se inicie su moderna comercialización, siendo el viñedo, junto con la minería, el sustento básico de la economía española del siglo XIX.

En otro orden de cosas, destacamos los siguientes hechos. En el siglo XVIII el naturalista suizo H.T. Saussure (1767-1845) determina la composición exacta del etanol. El químico y biólogo francés L. Pasteur (1822-1895), tras cuestionar la teoría de la generación espontánea, demuestra, en 1857, que el responsable del proceso de fermentación es un microorganismo. El químico alemán E. Buchner (1860-1917) aísla las diastasas responsables de las fermentaciones, desvelando los mecanismos de la fermentación alcohólica de la glucosa, que empieza a hacerse con extractos de levadura. A partir de entonces distinguimos entre bebidas fermentadas (vino, cerveza, sidra,...) y bebidas destiladas (aguardientes de vino, grano y frutas, ron y licores).

Por otro lado, en 1839 el catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad de Viena, K. Rokitanský (1804-1878) describe, en su manual de Anatomía Patológica, la atrofia amarilla del hígado (conocida todavía como enfermedad de von Rokitanský), como un estado precursor de la cirrosis alcohólica.

En 1849, precisamente cuando su país ocupaba el primer puesto del mundo en el consumo relativo de bebidas alcohólicas, el médico sueco Magnus Huss (1807-1890), introduce el término "alcoholismo" para referirse a una enfermedad (y no únicamente a un vicio o degeneración individual), es decir, a las numerosas alteraciones gastroenterológicas, cardiológicas, neurológicas y psiquiátricas, resultado de la ingestión excesiva de bebidas de alto grado alcohólico (Conde, V. y cols., 1994).

Hoy día, aunque lo seguimos utilizando, resulta ser un término ambiguo. En la Clasificación Internacional de Enfermedades, aprobada por la Asamblea Mundial de la Salud en 1976, se sustituyó por "síndrome de alcoholdependencia". La definición propuesta resulta, cuando menos, demasiado larga: "Un estado, psíquico y habitualmente también físico, resultante de tomar alcohol, caracterizado por una conducta y otras respuestas que siempre incluyen compulsión para tomar alcohol de una manera continua y periódica, con objeto de experimentar efectos psíquicos,

algunas veces para evitar las molestias producidas por su ausencia, pudiendo estar ausente o no la tolerancia" (Alonso-Fernández, F., 1992).

Como ya hemos adelantado con anterioridad, durante bastante tiempo el alcohol se ha empleado a menudo en medicina, ya sea como anestésico o para el tratamiento de la sobreexcitación, como inductor del sueño, como vasodilatador cerebral en la arteriosclerosis, para tonificar el organismo o estimular el apetito, para curar afecciones gripales, reducir la tensión premenstrual y las molestias dismenorreicas, y como antiséptico. Algunos de estos usos se han mantenido hasta nuestros días.

En la actualidad no se mantiene vigente ninguna indicación para el uso médico del alcohol. Hoy está suficientemente constatado que el alcohol etílico no es un alimento, ni una sustancia termogénica, ni un medicamento.

Queremos acabar esta pequeña introducción histórica señalando que con ella no se pretende, de ninguna manera, justificar históricamente (aún admitiendo su componente antropológico-cultural) el consumo de alcohol. La toxicomanía alcohólica, además de constituir un gran problema de salud pública en todo el mundo, es una enfermedad muy frecuente, que requiere un diagnóstico y un tratamiento médico.

I. 2.- El consumo de alcohol en España

El consumo de bebidas alcohólicas es, en la actualidad, uno de los principales factores relacionados con el estado de salud de los individuos y las poblaciones. Sin embargo, hace menos de un año (Octubre-Noviembre, 1994) asistimos perplejos en nuestro país a la polémica surgida entre la O.M.S. -que advertía duramente a la población sobre los peligros que conlleva la ingesta de alcohol-, y un pequeño grupo de profesionales de la medicina -que se resistían a desaconsejar su consumo-. Más recientemente (Mayo de éste año), una sentencia judicial, que creemos desafortunada, legalizaba el consumo de alcohol en la vía pública, en unos momentos en que, como expondremos con posterioridad, crece su consumo entre los jóvenes. España es uno de los países donde los problemas relacionados con las bebidas alcohólicas adquieren gran importancia, no sólo por el alto nivel de producción, sino también por la elevada prevalencia de su consumo, su gran arraigo social, y la percepción generalizada de que la ingesta de alcohol forma parte de nuestro patrón alimentario y dietético. No es

casualidad. Nuestra disponibilidad de bebidas alcohólicas es enorme. Somos el noveno productor de cerveza del mundo (27.314.000 HI), el octavo de bebidas destiladas, y el tercero de vino (40.377.00 HI), después de Francia e Italia. Si nos atenemos a su consumo, España ocupa, junto a Hungría, el cuarto puesto en consumo de alcohol absoluto (10,8 litros por persona y año en 1990), tras Francia, Luxemburgo y Alemania (Gutiérrez-Fisac, J.L., 1995).

En torno al alcohol está organizado uno de los primeros y más pujantes sectores económicos del país. Se estima que tenemos unos 260.000 puntos de venta (uno por cada 150 habitantes), y que unas 300.000 familias viven directamente de su producción y comercialización. Miles de millones de pesetas se invierten en su publicidad (4.000 millones sólo en bebidas de más de 20° en 1992), dirigida eminentemente a los jóvenes (Vaquera Orte, J., 1994). El tema es de tal trascendencia, a todos los niveles, que, a finales de 1994, nuestros gobernantes estaban firmemente dispuestos a vetar el ingreso de otros países en la U.E. si no se cambiaba la directiva comunitaria que nos obligaba al arranque progresivo de viñas.

Pero, normalmente, se tiene muy poca conciencia sobre los nefastos efectos de la adicción a la droga "pobre", la más barata. Socialmente no se le da la misma importancia que al resto de las drogas. Es más, como ya hemos señalado, la cultura mediterránea concede una ignorante tolerancia y permisividad al consumo de bebidas alcohólicas. El porcentaje de la población española que consume algún tipo de bebidas alcohólicas con cierta regularidad, ha aumentado desde el 64% de 1980, al 70% del año 1989, en concordancia con la tendencia en la mayoría de los países comunitarios (Walsh, D., 1988, Ministerio de Sanidad y Consumo, 1984, 1989 y 1992). Estos datos se pueden exponer de otra manera más coloquial. Más de la mitad de los españoles considera que bebe "moderadamente". Esta apreciación se traduce en un consumo de hasta 525 gramos de alcohol a la semana, equivalentes, en el peor de los casos, a 39 copitas de brandy, 38 cañas de cerveza y a 5 botellas de vino. Entre éstos se encuentra el terrible 4% de bebedores "altos" o "excesivos", que consumen más de 99 ml de alcohol absoluto al día. Se calcula que un día de fiesta, un domingo, 19.000.000 de españoles beben vino, más de 10.000.000 beben cerveza, 8.000.000 coñac y casi 3.000.000 combinados.

Según una encuesta del Centro de Investigaciones Sociológicas (1989), la razón por la que bebe el 58% de la población es que "acompaña bien a las comidas", aunque el 29% lo hace "por costumbre", el 25% por "el gusto agradable" y el 38% "por alternar con los amigos". Sólo el 12% cree que bebe demasiado, y, menos aún, el 10%, quisiera dejarlo. El 68% de los varones y el 19% de las mujeres se han emborrachado alguna vez, y 317.000 españoles confiesan emborracharse al menos una vez por semana. En cuanto a aprobar o desaprobar el consumo de alcohol, al 42% le parece bien su consumo, frente al 18% que le parece mal.

Al alcohol se atribuyen entre 20.000 y 25.000 muertes anuales en España, es la 4ª causa de mortalidad (Piédrola, G. y Salleras, L., 1988), el 50% de los accidentes de tráfico; el 30% de los accidentes laborales (y el 15% de las defunciones); su consumo está detrás del 50% de los homicidios y suicidios. Un 40% del total de los internamientos psiquiátricos tienen diagnóstico de alcoholismo, entre el 70-80% de las cirrosis hepáticas tienen la misma causa (el número de muertes por cirrosis se ha triplicado desde 1950), el 15% de las depresiones son atribuibles también al alcohol. La mitad de las denuncias de malos tratos tienen que ver con el alcohol. En las urgencias de los hospitales, los alcohólicos representan el 15% de los pacientes y se calcula que unas 25.000 españolas en edad fértil tienen problemas de alcoholismo. Además, como es de suponer, todo ello representa un importante capítulo de gasto del presupuesto sanitario del país. Estimaciones realizadas para España señalan que el coste social del alcoholismo fue de entre 114.248 y 269.444 millones de pesetas en 1988 (Piédrola, G. y Salleras, L., 1988) y, para Cataluña, cifraron el coste del alcoholismo entre 20.000 y 40.000 millones de pesetas del año 1977 (Salleras, L. y Bach, L., 1988).

Como muestra de la poca atención que recibe en nuestro país el problema del alcoholismo, baste el siguiente detalle. Si a partir de una población de alcohólicos, estimada en 3,5 millones, los expertos calculan que existen 40 por cada heroinómano (la prevalencia del consumo de heroína es del 0,3% de la población), ni la atención social ni los recursos parecen orientados a ello. En España hay 696 centros de carácter sanitario o terapéutico, entre públicos o privados, para el tratamiento de las toxicomanías por opiáceos. Para el tratamiento del alcoholismo hay 382. En ellos han

sido atendidos 59.958 adictos a la heroína y cocaína frente a 24.119 alcohólicos, según detalles de la memoria de 1993 del Plan Nacional sobre Drogas (El País, del 7 Noviembre de 1994).

Los hábitos de consumo han cambiado (Comas, D., 1994). Durante décadas tradicionalmente el consumo de alcohol en España fue diario, casi exclusivo de los hombres, con un gran componente social, muy unido a las comidas y esencialmente de vino. Los jóvenes se inician cada vez con mayor precocidad, sin diferencia de sexos, y beben intermitente y compulsivamente. Centran su ingesta los fines de semana y prefieren los combinados, las bebidas destiladas y la cerveza. El bebedor joven busca la intoxicación rápida, pues la cuestión no es degustar, sino tomar el máximo (litronas), en un tiempo mínimo, para embriagarse y divertirse. ("Jóvenes y alcohol". El País semanal, nº 138, 10 Oct 1993). Los datos de que disponemos en la actualidad indican que en España hay aproximadamente un millón de jóvenes que consumen más de 80 ml de etanol/día, o bien acumulan este consumo semanalmente, especialmente las noches de viernes y sábados (Freixa, F., 1994). Además, como las "copas" en los locales de moda han subido mucho de precio, la alternativa ha sido crear un bar en cada coche, de tal modo que ahora son los maleteros de los coches de la "movida" los que se convierten cada fin de semana en improvisada barra.

Desgraciadamente también debemos considerar que el alcohólico es adicto a, por lo menos, otra sustancia psicoactiva, además del alcohol. En los EE.UU., la droga más frecuente es la marihuana, seguida de la cocaína, los hipnóticos-sedantes, los alucinógenos y las demás. Si se invierte la sustancia psicoactiva de referencia, podemos decir que el 36% de los adictos a la marihuana, el 71% de los adictos a los barbitúricos, el 84% de los adictos a la cocaína y el 67% de los adictos a los opiáceos, son también alcohólicos (Schuckit, M.A. y Haglund, R.M.J., 1982). En España, el policonsumo típico de los jóvenes es el de tabaco y alcohol.

En nuestro país, en 1982, se prohibió la entrada y consumo de alcohol, en locales públicos, a los menores de 16 años. Esta norma se vulnera a diario, y sin aparentes problemas, en toda España, parece ser que ante la imposibilidad de controlar los 133.000 bares y más de 50.000 restaurantes censados. De igual forma, las iniciativas gubernamentales, o municipales, para restringir la venta de alcohol, o

adelantar el cierre de los bares de copas, -los casos de Cáceres, Logroño o Vitoria-, han chocado bruscamente con la oposición de los grupos juveniles, al frente de los cuales se encontraban normalmente los empresarios del sector y, en la mayor parte de las veces, con la aquiescencia de los padres de los consumidores.

En Andalucía las cosas no son muy diferentes según se desprende de un estudio, realizado por el Comisionado para la Droga de la Junta de Andalucía (1993), que refleja las conclusiones de una encuesta realizada en 1991, entre individuos de más de 14 años, cuyos resultados aparecen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1

El consumo de alcohol en Andalucía

<i>Tipología</i>	<i>Consumo (ml)</i>	<i>% pobl. 14 años y más</i>
Abstinentes	0	52,0
Ligeros	1 a 25	20,2
Moderados	26 a 75	17,9
Altos	76 a 100	5,3
Excesivos	101 a 150	2,9
Gran riesgo	más de 150	1,9
TOTAL		100,0
BASE		2.500,0

Tabla 2

Edades de los bebedores altos+excesivos+gran riesgo

<i>Rango de edad (años)</i>	<i>Porcentaje</i>
14-15	3,6
16-20	8,5
21-24	16,7
25-34	15,2
35-44	12,8
+ 44	5,9

Si proyectamos los porcentajes sobre el total de la población andaluza, más de medio millón de personas, de catorce años en adelante, estarían haciendo un consumo abusivo, y potencialmente peligroso del alcohol, y de ellos, casi la mitad, 260.871 (en cifras obviamente aproximadas, por ser el resultado de una extrapolación) se encontrarían en una clara situación de riesgo. Dentro de este grupo de bebedores altos y excesivos, muchos de ellos, o son ya alcohólicos o se encuentran en una situación potencial de serlo. En lo que se refiere al modo de beber, se observa un comportamiento muy diferenciado entre los días laborables y los fines de semanas (viernes a domingo). Del total de personas que, en uno u otro grado, toman alcohol, la media general de consumo diario de lunes a jueves es de 18 ml /día, mientras que de viernes a domingo casi se duplica: 35 ml /día, y esto es aún más extremo en los jóvenes, pues muchos de ellos hacen toda su ingesta de alcohol el fin de semana, mientras que los días laborables prácticamente no beben.

De los resultados de la encuesta también se desprende que, tanto los bebedores altos como los excesivos-gran riesgo, son principalmente hombres (aunque ya se observa un cierto segmento de mujeres), y de los grupos de edad comprendidos entre los 21 y 44 años (tabla 2), residentes sobre todo en áreas urbanas, de todo tipo de profesiones y estudios.

I. 3.- Metabolismo del etanol

I. 3. 1.- Absorción de etanol

Una vez ingerido el etanol, su absorción se realiza, rápidamente, a lo largo de todo el tracto gastrointestinal por las mucosas bucal, esofágica, gástrica e intestinal. El duodeno y el yeyuno son las secciones del tubo digestivo donde el alcohol se absorbe eminentemente. Este proceso es más rápido a medida que el alcohol llega al intestino en un tiempo más breve y en una concentración más elevada (se absorbe antes un whisky o un martini, que un vino o una cerveza). También puede absorberse por vía pulmonar inhalando sus vapores. Tras pasar al torrente circulatorio, y distribuirse de modo uniforme por todo el cuerpo, entre un 80-90% se metabolizará en el hígado, y aproximadamente un 10% se eliminará a través de la respiración, perspiración y orina. El resto será metabolizado en otros órganos (Lieber, C.S., 1984).

El ritmo de metabolización difiere ampliamente de unos individuos a otros, con una estimación media de 10-15 ml/hora (Valbuena, A., 1993).

I. 3. 2.- Sistemas de oxidación

En el hepatocito el etanol puede seguir tres vías de degradación enzimática capaces de oxidarlo a acetaldehído. Estas vías ocupan compartimientos subcelulares diferentes: en la fracción soluble la Alcohol Deshidrogenasa (ADH), en el retículo endoplásmico el MEOS (*Microsomal Enzym Oxidizing System*), y en los peroxisomas la catalasa.

De estas vías metabólicas, la más importante, *in vivo*, es la que sigue la ADH, que es un enzima citosólica constituida de dos subunidades protéicas de 40.000 dalton, que interviene en la oxidación de varios alcoholes, produciendo sus correspondientes aldehidos o cetonas. Utiliza como coenzima el NAD⁺, al que se une y forma un complejo binario, uniéndose posteriormente al etanol y formando un complejo ternario activo. La etapa limitante en la oxidación del etanol por este mecanismo viene dada por la velocidad de disociación del NADH de la enzima. En el hígado humano hay varias isoenzimas de la ADH.

Existe también una ADH gástrica que es la responsable de que el etanol no entre en la circulación sistémica cuando la ingesta es moderada. Se ha comprobado que la actividad ADH gástrica es menor en las mujeres que en los hombres. Además, las mujeres poseen relativamente menos agua y mayor contenido en grasa que los hombres. Estas dos circunstancias serían las responsables de la mayor susceptibilidad al etanol que presentan las mujeres en comparación con los hombres.

Las otras dos vías de oxidación son secundarias. El MEOS se descubrió al observar que el consumo crónico de etanol inducía la proliferación de retículo endoplásmico en el hepatocito. Los componentes de este sistema son el cit P450, dependiente del sistema de monooxigenasas, y la NADP cit P450 reductasa, enzima anfipática compuesta de una cadena polipeptídica de 70.000-80.000 dalton, asociada con una molécula de FMN y otra de FAD (Sánchez, M.C., 1990). Al tratarse de una vía secundaria funcionará tan solo cuando, a causa de una ingesta masiva, la vía principal se sature y resulte insuficiente, o ante ingestas normales de etanol de individuos

alcohólicos crónicos cuya afectación hepática se traduzca en una insuficiencia metabólica de la primera vía (Lieber, C.S., 1991).

La tercera vía de oxidación del etanol es la vía de la catalasa. En los peroxisomas, el etanol en presencia de H_2O_2 se convierte en acetaldehído y agua, con la mediación de la catalasa. Es una vía metabólica muy minoritaria y cuyo papel en el hombre está todavía por determinar con exactitud. La catalasa es capaz de oxidar etanol *in vitro*, siendo su contribución *in vivo* escasa, ya que depende de la producción de peróxidos de hidrógeno que, en condiciones normales, se encuentra en concentraciones muy bajas en el hepatocito (Lieber, C.S., 1988).

I. 3. 3.- Alteraciones metabólicas asociadas a la oxidación del etanol

Como consecuencia del metabolismo del etanol se acumulan en el hepatocito diversos productos que han de ser eliminados debido a su gran toxicidad.

El primer metabolito que produce la oxidación del etanol es el acetaldehído. Se producen también H^+ que interfieren en el equilibrio redox del citosol hepático. Estos dos hechos pueden causar un conjunto de desórdenes metabólicos y funcionales que inducirán un proceso degenerativo en el hígado y otros órganos.

El acetaldehído está implicado directamente en los procesos patogénicos inducidos por el alcohol. Se considera que está relacionado con las alteraciones hepáticas y cardíacas, en el Síndrome Alcohólico Fetal, así como en las alteraciones del transporte de membrana. Su grupo carbonilo es de naturaleza electrofílica, por lo que es capaz de reaccionar con los grupos nucleofílicos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por otra parte el acetaldehído puede contribuir indirectamente a la patogénesis alcohólica mediante la producción de radicales libres de oxígeno (O_2^{\cdot}), tras la oxidación de éste por la aldehído y la xantina oxidasa. Dichos radicales libres de oxígeno podrían producir peroxidación lipídica.

Aproximadamente un 95% del acetaldehído se oxida en el hígado, principal sitio de localización de la Aldehído Deshidrogenasa (ALDH), enzima dependiente de NAD^+ que se encuentra en mitocondrias, retículo endoplásmico y citosol. La metabolización del acetaldehído en el hígado permite que sus niveles en sangre sean mínimos (del orden de μM), a pesar de que las concentraciones de etanol en sangre sean muy

elevadas.

Como resultado de la oxidación del etanol, se produce una acumulación de NADH en el citoplasma hepático, y en consecuencia un aumento en la relación NADH/NAD⁺ que determina el potencial redox celular (E_o). El incremento del E_o hace que todas las reacciones en las que intervienen deshidrogenasas de óxido-reducción se desplacen hacia la formación de metabolitos reducidos, cuya acumulación ocasiona alteraciones en el metabolismo de los azúcares y de los lípidos.

A consecuencia del incremento del E_o , se interfiere el proceso de neoglucogénesis, desplazándose hacia la formación de lactato. El aumento de lactato contribuye al desarrollo de acidosis metabólica (hiperlactacidemia) (Sánchez, M.C., 1990), dándose dos circunstancias: disminuye la excreción urinaria de ácido úrico y se genera una hiperuricemia (con los consiguientes ataques de gota), y por otra parte se promueve la síntesis de colágeno, que tendrá un importante papel en el proceso de fibrogénesis hepática que se desencadena al dañarse este órgano. Además, como la neoglucogénesis está parcialmente implicada en la formación de glucosa en el hígado, se puede generar hipoglucemia.

En el metabolismo de los lípidos confluyen un conjunto de circunstancias que conducen a una acumulación de grasas en el hígado. Con el incremento del E_o se induce un aumento en la síntesis de triglicéridos (en parte debido al incremento en la síntesis de glicerofosfatos), asociado a un defecto en su secreción. Disminuye la β -oxidación de los ácidos grasos, lo que favorece su acumulación. Tiene lugar una utilización de acetil-CoA disponible procedente del metabolismo del etanol, en detrimento del generado en la degradación de los ácidos grasos. Esta acumulación de grasas genera una patología hepática, característica del alcohólico, que comienza con la esteasis hepática o "hígado graso", siguiendo con la hepatitis alcohólica y la cirrosis hepática alcohólica. Por último, la oxidación microsomal del etanol podría interferir con el metabolismo lipídico a través de la generación de radicales de oxígeno (O_2^- y OH^{\cdot}), los cuales podrían aumentar la actividad NADPH oxidasa, creciendo la producción de H_2O_2 y la peroxidación lipídica.

I. 4.- Efectos del etanol sobre las membranas celulares

La acción generalizada del etanol sobre el organismo no se puede entender solamente a través de su oxidación hepática. Se ha considerado que el etanol es capaz de unirse o intercalarse en la membrana plasmática, pudiendo difundir a su través y por lo tanto interaccionar con las membranas de las organelas celulares, con la consiguiente perturbación de sus propiedades físico-químicas y funcionales.

Podemos considerar, por lo tanto, que las membranas biológicas constituyen uno de los principales centros de la acción toxicológica del etanol.

Se han obtenido numerosas pruebas experimentales que han puesto de manifiesto múltiples alteraciones producidas por el etanol sobre los componentes estructurales de las membranas, entre las que, de modo general, cabe destacar su acción fluidificante (aunque no todas las membranas presenten la misma sensibilidad a este efecto), los cambios inducidos sobre las proteínas integrales y las consiguientes alteraciones específicas de las actividades enzimáticas ligadas a membrana (p.e. ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$), o determinados cambios adaptativos a la presencia continuada de etanol ("membranas tolerantes").

Sin embargo, tras muchas investigaciones que tenían como objeto el estudio de la acción molecular del etanol sobre las membranas, aún no se conocen, con exactitud, el modelo de interacción ni los mecanismos bioquímicos implicados en muchos de los procesos de perturbación anteriormente expuestos.

El etanol no tiene, como otros fármacos y drogas, un receptor específico en determinados núcleos o grupos neuronales del Sistema Nervioso Central (SNC), y no se conoce, hasta la actualidad, que tenga algún antagonista específico. La anteriormente expuesta capacidad para alterar las membranas, cuando se aplica a las neuronas, induce una alteración de su fluidez, y por lo tanto de su permeabilidad, que condiciona un proceso de neuroadaptación (Edwards, G.E., 1982), que puede explicar el síndrome de abstinencia menor y mayor (*delirium tremens*), además de la tolerancia, que es responsable de la necesidad de seguir bebiendo.

I. 5.- Alteraciones orgánicas relacionadas con la ingesta de etanol

La ingestión crónica de dosis elevadas de etanol afecta de forma adversa a casi

todos los órganos y sistemas. La acción tóxica del etanol, que puede ser directa o indirecta -a través de sus metabolitos-, está relacionada con las siguientes patologías (Mendelson, J.H. y Mello, N.K., 1985, Ballús, C. y Ortega, L., 1987). En el sistema digestivo: irritación e inflamación de la mucosa gastrointestinal, esofagitis, gastritis, gastritis erosivas, gastritis atróficas, úlceras gástricas, hemorragias gástricas, duodenitis, úlceras duodenales, pancreatitis agudas y crónicas, síndrome de malabsorción, alteraciones hepáticas (Thaler, H., 1980): esteatosis hepática, hepatitis alcohólica, hipertensión portal y varices esofágicas (responsables de peligrosas hemorragias), cirrosis alcohólica (que puede complicarse con ascitis, síndrome hepatorenal, encefalopatía hepática, coma y muerte); en el sistema cardiovascular: hipertensión arterial y taquicardia sostenida, miocardiopatía alcohólica y lesiones cerebrovasculares. En el sistema endocrinológico se pueden afectar todos los niveles: hipotálamo, hipófisis (defectos en la liberación de gonadotropinas e inhibición de la liberación de hormona antidiurética), glándula adrenal, tiroides, gónadas (reducción del nivel plasmático de testosterona, hipogonadismo primario y feminización), y páncreas (provocando diabetes mellitus o hiperglucemia), e influye en el metabolismo periférico de las hormonas (debido al daño hepático: hipertiroidismo hepático y aumentos en los niveles plasmáticos de cortisol), también se pueden encontrar: estimulación de la secreción de catecolaminas, hipoglucemia alcohólica (por inhibición de la neoglucogénesis hepática) y cetosis alcohólica. La acción del etanol sobre el sistema inmunitario induce una disminución de la producción y respuesta de los leucocitos y un deterioro en la producción de anticuerpos, encontrándonos con situaciones de mayor riesgo ante procesos infecciosos. El consumo de alcohol interfiere con la absorción, digestión, metabolismo y utilización de nutrientes, con la consiguiente desnutrición y déficit de ácido fólico (anemia megaloblástica, con trombocitopenia y granulocitopenia), de piridoxina (anemia sideroblástica), de tiamina (síndrome de Wernicke-Korsakoff), de hierro, de zinc (ceguera nocturna de los alcohólicos) y de vitaminas liposolubles A, D y K. Los bebedores crónicos tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de boca, faringe y laringe, esófago, recto y colon, primario de hígado (hepatoma) y neoplasia pancreática (Seitz, H.K. y Simanwski, V.A., 1988, Alonso-Fernández, F., 1992; Miller, N.S. y Gold, M.S., 1993; Valbuena, A.,

1993). Por último, la ingesta crónica de etanol induce numerosas complicaciones neurológicas, a cuyo estudio dedicaremos el siguiente capítulo.

I. 5. 1. Efectos del etanol sobre el Sistema Nervioso

Aunque el alcohol ejerce importantes acciones sobre otros sistemas corporales, el SNC es uno de los territorios orgánicos que más claramente se afecta tras la ingesta crónica de etanol. El tipo y número de complicaciones neurológicas depende de la gravedad del consumo de alcohol, del estado nutricional y de la susceptibilidad individual al alcohol. Atendiendo a Urbano-Márquez, A. y Estruch, R., 1987, las diferentes alteraciones neurológicas relacionadas con la ingestión crónica de etanol se pueden clasificar en cinco grandes grupos:

- 1.- Intoxicación alcohólica aguda:
 - Embriaguez
 - Intoxicación patológica
 - Lagunas o amnesias alcohólicas
- 2.- Síndrome de abstinencia alcohólico:
 - Temblor alcohólico
 - Alucinaciones
 - Convulsiones
 - Delirium tremens
- 3.- Enfermedades nutricionales asociadas al alcoholismo.
 - Síndrome de Wernicke-Korsakoff
 - Neuropatía óptica
 - Degeneración cerebelosa alcohólica
 - Polineuropatía alcohólica
- 4.- Enfermedades de patogenia desconocida posiblemente relacionadas con la acción tóxica del etanol
 - Enfermedad de Marchiafava-Bignami
 - Demencia alcohólica
 - Atrofia cerebral alcohólica
- 5.- Síndrome Alcohólico Fetal (SAF)

I. 6.- El etanol como teratógeno o embriotóxico

La ingestión de estupefacientes por la madre durante el embarazo, tiene efectos adversos sobre la descendencia, lo que puede traducirse en un aumento en la frecuencia de abortos o alteraciones neonatales. Con el aumento de las toxicomanías de todo tipo, que afectan a una población cada vez más joven, y su igualdad en las mujeres, la frecuencia de patologías perinatales es cada vez mayor. Además de una acción directa sobre el feto (los tóxicos atraviesan con facilidad la barrera placentaria), se producen otras complicaciones fetales como desnutrición, hipovitaminosis y diversas alteraciones que se suman a la citada acción directa.

En relación con el etanol, el *Surgeon General* (1981) de los EE.UU., publicó en julio de 1981 una serie de consejos sobre el consumo de alcohol durante el embarazo: "Debe informarse a todas las pacientes sobre el riesgo del consumo de alcohol durante el embarazo, y aconsejarles que no tomen bebidas alcohólicas y que presten atención al contenido de alcohol de las bebidas y de los fármacos"

Sabemos con certeza que el etanol, cuando se ingiere durante el período de gestación, atraviesa libremente la barrera placentaria, llegando con facilidad al feto (Guerri, C. y Sanchis, R., 1985). Está claramente establecido que el etanol es un potente teratógeno, tanto en el hombre como en animales de experimentación (Abel, E.L., 1978, 1982). Como ocurre con cualquier teratógeno, los efectos del alcohol sobre el desarrollo y crecimiento fetal dependen principalmente de dos factores: dosis de alcohol administrada y momento de exposición a la droga en el embarazo. Aunque conocemos que la ingesta abusiva de etanol por parte de la madre afecta negativamente al feto, no conocemos con exactitud las dosis moderadas, o mínimas, de etanol que pueden conducir a consecuencias embriotóxicas (Streissguth, A.P. y cols., 1980). El modelo dosis-respuesta para la teratogenicidad del etanol aún no ha sido determinado. En la actualidad se ha determinado que el alcohol, como teratógeno, es responsable de: a) el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF), cuando los efectos deletéreos son pronunciados, y b) los Efectos Fetales del Alcohol (EFA), cuando los efectos no son tan claramente distinguibles (Hoyseth, K.S. y Jones, J.H., 1989).

I. 6. 1.- El Síndrome Alcohólico Fetal o Embriofetopatía alcohólica

La asociación entre el consumo materno de alcohol durante el embarazo y determinados defectos del desarrollo en la descendencia se estableció desde muy pronto. Tenemos constancia del conocimiento de esta relación a través de numerosos antecedentes históricos (Warner, R.H. y Rosett, H.L., 1975). La biblia se refiere a este hecho (Jueces, 13,3-4) cuando narra como un ángel se apareció a la madre de Sansón, antes de quedar embarazada, diciéndole "... Mira que eres estéril y no has tenido hijos, pero concebirás y darás a luz un hijo. Cuidado, pues, no bebas vino o bebida fuerte, y no comas nada impuro ...". Platón advertía a los griegos: "... nadie debería beber, hombre o mujer, cuando se proponga procrear hijos ..." (Leyes, 2674), o bien "... No está bien que la procreación se efectúe cuando los cuerpos están disueltos por la borrachera, sino que el embrión debe formarse como es debido ..." (Leyes, 6775). La mitología romana presenta a Vulcano como un dios deforme, que fue concebido cuando su padre, Júpiter, estaba borracho. Una ley prohibía a los cartagineses beber en la noche de bodas, probablemente para prevenir los defectos de nacimiento relacionados con el consumo de alcohol.

Durante mucho tiempo éstas, y otras, advertencias fueron ignoradas y ha sido necesario esperar hasta el siglo XVIII para que se le empezase a prestar atención, de nuevo, al problema. Warner, R.H. y Rosett, H.L. (1975), señalan que fue el inglés Sedgewick, en 1725, uno de los primeros médicos que sugirió la relación entre la venta incontrolada de ginebra y los altos porcentajes de mortalidad infantil en Inglaterra, durante la "epidemia de ginebra". El Royal College of Physicians advertía al Parlamento sobre el problema, afirmando que la ingesta excesiva de alcohol era responsable del nacimiento de niños enfermos. En 1813, T. Trotter señalaba, en relación con el consumo abusivo de alcohol, "... los órganos de la generación deben sufrir por igual, en ambos sexos, por la intoxicación frecuente; y si, por desgracia, la descendencia fuera engendrada por estos padres, ¿podemos dudar de que sus partes corporales estén enfermas y encienques y que sus facultades intelectuales estén por debajo del nivel de un ser racional? ...". Del mismo modo, en 1837, M. Ryan previene contra el consumo de alcohol durante el embarazo, "... Los licores dañan a la mujer embarazada y la exponen a un peligro durante el parto y posteriormente a fiebre o

inflamación, en tanto detienen el crecimiento y destruyen la salud del feto ...". El primer estudio epidemiológico lo realizó S. Howe, en 1848, sobre una muestra de 300 casos de niños retrasados mentales, encontrando que casi la mitad de ellos procedían de padres alcohólicos. Sullivan, W.C. en un trabajo publicado en 1899, en el que, estudiando la descendencia (600 niños) de un grupo de 120 madres alcohólicas de la prisión de Liverpool, encuentra un aumento en los porcentajes de abortos y mortalidad neonatal (aproximadamente el 56%), y en las frecuencias de epilepsias en los nacidos vivos.

Fue necesario esperar hasta el final de la década de los 60 para que por vez primera se abordara, con cierto rigor, el estudio del problema. En 1967 Lamache, M.A., llama la atención sobre los efectos adversos del abuso de alcohol en el desarrollo del feto. Publica un trabajo realizado sobre 3352 niños con anomalías físicas y psíquicas, de los cuales 1245 eran hijos de padres alcohólicos, y señala que estos últimos mostraban a menudo retraso en el crecimiento, deficiencia mental y anomalías congénitas, sugiriendo que las lesiones eran más pronunciadas sobre todo cuando la intoxicación era de manera continuada durante todo el embarazo. En 1968, otros autores franceses (Lemoine, P. y cols.) estudiando 127 niños nacidos de padres alcohólicos crónicos (padre y madre, sólo madre o sólo padre), describen por primera vez, un síndrome malformativo, hoy conocido como SAF, concluyendo que el alcoholismo materno es el responsable de la aparición de las malformaciones que definen el Síndrome. Por desgracia los trabajos de Lemoine no tuvieron la suficiente difusión entre la comunidad científica. Aún cuando cuatro años más tarde Ulleland, C.N., en 1972, publica un detallado informe, tras el estudio de 10 niños con retrasos en el crecimiento y nacidos de mujeres alcohólicas (Abel, E. L., 1986), son Jones, K.L. y Smith, D.W. (1973) quienes 5 años más tarde los redescubren, introduciendo el término SAF para describir las alteraciones físicas y mentales que acompañan a los descendientes de madres alcohólicas (Jones, K.L. y cols., 1973; Clarren, S.K. y Smith, D.W., 1978), y definiendo las anomalías más típicamente asociadas con la teratogenicidad del etanol.

En la actualidad el SAF se conoce como una entidad clínica diferente, habiéndose descrito muchos casos.

I. 6. 1. 1.- Concepto y características clínicas

En la actualidad sabemos que el SAF se caracteriza por la presencia de un conjunto de malformaciones congénitas asociadas, cuya magnitud depende, en gran medida, del período de ingesta de etanol por parte de la madre (edad gestacional). En la tabla 3 se muestran los signos más frecuentes (Clarren, S.K. y Smith, D.W., 1978).

Tabla 3
Principales características clínicas del SAF

Característica	Manifestación
ALTERACIONES DEL SNC	
- Intelectuales	Retraso mental moderado (CI=60)*
- Neurológicas	Microcefalia*, hipotonía**
- De comportamiento	Irritabilidad*, dificultad en aprender*, escasa coordinación**
DEFICIT DE CRECIMIENTO	Defectos en el desarrollo (pre y postnatal)*
ANOMALIAS FACIALES	
- Ojos	Blefarofimosis*, epicanthus*, ptosis palpebral**
- Nariz	Puente nasal ancho*
- Mandíbula	Hipoplasia**
- Orejas	Rotación**, anomalías de implantación**
- Boca	Labio superior delgado*, paladar hendido**

(*) Más del 80% de los pacientes, (**) Entre el 50 y 80% de los pacientes

El Fetal Alcohol Study Group of the Research Society on Alcoholism (Rosett, H., 1980), recomienda que el diagnóstico debe hacerse sólo cuando el paciente presenta signos en cada una de las siguientes tres categorías:

- a) Retraso en crecimiento prenatal o postnatal (peso, talla o perímetro cefálico debajo del percentil 10 para su edad gestacional)

b) Afectación del SNC. Signos de anomalías neurológicas, retraso del desarrollo o retraso mental.

c) Dismorfismo facial característico, con al menos dos de los siguientes signos: microcefalia, microftalmía y/o fisura palpebral pequeña, *filtrum* poco desarrollado, labio superior grueso e hipoplasia maxilar.

Hemos de tener en cuenta que se calcula que el SAF, tal y como lo hemos descrito (SAF "completo"), representa sólo una cuarta parte de todos los casos conocidos de niños nacidos con problemas directamente relacionados con la ingestión materna de etanol. Desde 1983 (Streissguth, A.P. y cols.) utilizamos el término Efectos Fetales del Alcohol (EFA) para referirnos a las situaciones en las que pueden presentarse aspectos parciales o atenuados del SAF que incluyen, principalmente, retraso mental en mayor o menor grado, hiperactividad, problemas en la coordinación motora, etc.

I. 6. 1. 2.- Incidencia

Los datos de que se dispone indican que la incidencia del SAF varía en función de la población específica en que se haga el estudio, y por lo tanto de sus hábitos de consumo de alcohol. Como promedio mundial se estiman cifras comprendidas entre 1,1 y 1,9 casos por cada 1000 nacimientos vivos (Randall, C.L., 1987, Abel, E.L. y Sokol, R.J., 1991). En nuestro país los datos se sitúan alrededor de 1/500 casos de SAF (Cahuana, A. y Gairi, J.M., 1985). Cuando se estima esta incidencia en una población constituida exclusivamente por mujeres bebedoras, la media está comprendida entre 24 y 29 casos por cada 1000 nacimientos de alcohólicos (Abel, E.L., 1984, Hanson, J.W. y cols., 1978, Sokol, R.J. y cols. 1980). En cuanto al retraso mental (que es una de las secuelas más dramáticas en relación con el consumo de etanol), hoy día se considera al etanol como una de las principales causas identificables de este problema (Clarren, S.K. y Smith, D.W., 1978).

La incidencia del EFA es más difícil de determinar debido a que los criterios de diagnosis no están bien determinados, pero se estima que por cada 1000 nacimientos vivos se producen entre 3 y 5 casos de niños con EFA (Hoyseth, K.S. y Jones, J.H., 1989).

I. 6. 1. 3.- Síndrome Alcohólico Fetal y Sistema Nerviosos Central

Como se ha señalado con anterioridad, una de las principales características asociadas al SAF es la afectación del SNC (Clarren, S.K. y cols., 1978, Guerri, C., 1981, 1987). Las alteraciones estructurales severas del cerebro (distrofia pre y postnatal, retraso en el desarrollo y microcefalia), encontradas en niños expuestos a altas dosis de etanol durante el período prenatal, pueden tener su explicación como el resultado de la acción de la droga sobre cualquiera de los estadios de desarrollo del SNC, y especialmente sobre el período inicial de neurohistogénesis y organogénesis (Clarren, S.K. y Smith, D.W., 1978). Sin embargo, el etanol también puede interferir en fases más tardías del desarrollo del SNC. Se demostró, tanto en el hombre como con animales de experimentación (Cameron, R.S. y Rakic, P., 1991), que existe un período especialmente vulnerable a la acción teratógena del etanol, conocido como "brain growth spurt", en la cual se inicia la mielinización, se desarrolla el cerebelo, las neuronas completan su migración y proliferación axonal, y establecen sus sinapsis, y las glías se multiplican y maduran (Dobbing, J. y Sands, J., 1979, Detering, N. y cols., 1980, Grant, K.A. y Samson, H.H., 1982).

Sea como fuere, la prueba más dramática de la acción neuropatológica del etanol en el desarrollo del feto, la encontramos en los estudios *postmortem* de niños que habían sido expuestos al etanol en período prenatal, fallecidos en épocas perinatales. El examen de sus cerebros demuestra un conjunto de anomalías, que sugieren una migración neuronal y un desarrollo glial aberrantes, entre las que destacan como más frecuentes: fusión de los *girus* corticales, incompleto desarrollo cortical, dilatación y/o fusión de los ventrículos laterales, agenesias del cuerpo calloso, de la comisura posterior y de los bulbos olfatorios, y subdesarrollo del cerebelo y del núcleo caudado, (Jones, K.L. y Smith, D.W., 1973, Clarren, S.K. y cols., 1978, Peiffer, J. y cols., 1979), además de otros defectos del tubo neural como exencefalias y anencefalias.

I. 6. 1. 4.- Oftalmología del Síndrome Alcohólico Fetal

Desde finales de la década de los 70, algunos autores se han interesado por las alteraciones oculares en los niños afectados de SAF. En 1976, Altman, B., publica los

resultados del examen pormenorizado de tres niños con SAF y con anomalías oculares, describiendo *telecantus*, fisuras palpebrales pequeñas, ptosis, estrabismo, ojos pequeños y en uno palidez del disco óptico. También, a comienzos de los años 80 se describen, en niños diagnosticados de SAF, anomalías faciales y alteraciones del segmento anterior del ojo, entre las que se incluyen anomalías de refracción (con mayor incidencia de alta miopía), opacidades corneales y cataratas (Miller, M.T., Israel J. y Cuttone, J., 1981). Con posterioridad, se describieron anomalías oculares referidas fundamentalmente a la retina y nervio óptico, esto es, malformaciones de la papila óptica y anomalías de los vasos de la retina, que ocasionaban, a menudo, un déficit visual (Strömmland, K., 1982). En 1984 (Miller, M.T. y cols.), se vuelve a publicar la existencia de anomalías de segmento anterior, de Peters y de Axenfeld, en niños con SAF.

Pero, hasta ahora, el estudio más completo en relación con las alteraciones oculares observadas en niños con SAF, lo realizó Strömmland, K., en 1985, determinando, en una muestra representativa, los tipos de anomalías y sus frecuencias, y prestándole una atención especial al nervio óptico y los vasos sanguíneos. Los niños con SAF se compararon con dos grupos de referencia, concluyendo que todas las partes de los ojos y sus anexos se afectan en los pacientes de SAF (el 90% de los niños presentaba algún tipo de alteración ocular), destacando como más típicas la hipoplasia del nervio óptico (48%), un incremento de la tortuosidad de los vasos retinianos (49%), el 12% presentaban una gran pérdida de visión, el 46% una reducción moderada, estrabismo el 43%, ptosis el 20%, y en el 10% se encuentra miopía alta. Considerando la embriología ocular normal, este autor indica que el tiempo de mayor riesgo (período crítico para éste órgano) sería la 6ª semana de gestación, cuando se desarrollan las células ganglionares, y, puesto que los vasos retinianos aparecen en la semana 16ª, sugiere que el período de susceptibilidad ocular al etanol comenzaría en la 6ª semana y se prolongaría hasta el final del embarazo.

En relación con este mismo problema, haciendo referencia al momento del embarazo en que ocurre la exposición al etanol, y con respecto a la patología del segmento anterior, se piensa que, aunque la mayoría de los eventos del desarrollo del ángulo iridocorneal ocurren durante el 3º trimestre, la acción del etanol sobre el

embrión en etapas más tempranas (3ª a 5ª semanas), puede inducir una secuencia anormal de los eventos, provocando una disgenesia del segmento anterior del ojo (Cook, C.S., 1989).

La variedad de patologías oculares descritas se puede explicar, además de por el tiempo de actuación del tóxico, por la diferente constitución genotípica (Miller, M.T., 1992), de tal forma que en los individuos de raza caucásica predominarían las alteraciones de origen neural (Strömmland, K., 1987 y Chan, T. y cols., 1991), mientras que en aquellos de raza negra serían más frecuentes las anomalías del polo anterior del ojo (Miller, M.T. y cols., 1981, 1984).

Se piensa que estas anomalías oculares en afectos de SAF son tan características, que incluso habrían de servir para hacer un diagnóstico etiológico, pues a través de un examen ocular se consigue un diagnóstico de SAF en casos en los cuáles no se sospechaba previamente (25%). Podemos concluir que un examen ocular, en los niños con retraso mental, puede ser de gran ayuda para revelar el origen prenatal de la deficiencia, y su relación con el SAF (Strömmland, K., en 1990).

El etanol puede afectar a la visión, no solo por perturbar el desarrollo ocular de forma directa, sino mediante una alteración del desarrollo ontogénico de otras partes embrionarias. En este sentido, existen algunas referencias, como la descripción de un síndrome de Duane bilateral tipo III, en una niña de 11 años de edad con SAF, que podría estar causado, en opinión de algunos autores (Holzman, A.E. y cols., 1990), por una hipoplasia bilateral de los núcleos del VI par craneal, por acción del etanol en los primeros meses del embarazo. Se sugieren también otros mecanismos, al proponer que el etanol alteraría el desarrollo de las crestas neurales, mediante un daño que incluso puede pasar desapercibido, tal como señalan Carones, F. y cols. (1992), investigando anomalías del endotelio corneal, un tejido derivado de la cresta neural, en 8 niños con SAF sin anomalías del segmento anterior conocidas. Estos autores hipotetizan que las alteraciones endoteliales encontradas, pueden ser el resultado de los efectos tóxicos inducidos por el alcohol en las células de la cresta neural, y destinadas a formar el endotelio corneal y el órgano de Corti, en el mismo período embrionario.

En los últimos años, varios autores (Martín, X.D. y Rabineau, P.A., 1990,

Traboulsi, E. I. y Maumenee, I.H., 1992) describen casos de malformaciones oculares en niños, relacionadas con anomalías sistémicas características del SAF. Incluso existen estudios anatomopatológicos que confirman los diagnósticos clínicos, como los resultados de una autopsia publicada en 1993, donde, entre los hallazgos más relevantes, se describe una anomalía cerebral e hipoplasia del nervio óptico (Coulter, C.L. y cols.), o las alteraciones presentes en un ojo enucleado, donde se describe un estafiloma anterior y la anomalía de Peters (Hinzpeter, E.N. y cols., 1992).

Con la intención de conocer los mecanismos a través de los cuales el etanol puede alterar el desarrollo ontogénico ocular, algunos autores han realizado estudios experimentales con animales, utilizando distintos modelos de intoxicación alcohólica.

El primer estudio del que tenemos constancia data de 1910, y en él Stockard, C.R. señala que el alcohol causa anomalías oculares en peces y pollos, incluso antes de que en humanos se le prestara atención al mismo problema. Estos resultados pasaron desapercibidos hasta que, hacia los años 80, comenzaron las descripciones de anomalías oculares en los afectados por el SAF. En 1983 se describe como, en ratones, el etanol induce cambios teratogénos en el prosencéfalo (Sulik, K.K. y cols.), del cual se desarrollarán las vesículas ópticas. Del efecto del etanol sobre el desarrollo del ojo y la retina se ocuparon, en 1986, Kennedy, L.A. y Elliot, M.J., en el embrión de ratón, después de una administración única de etanol más timidina en el día 13 de gestación. Estos autores, a la vista de sus resultados, sugieren que muchas de las anomalías observadas en el SAF en humanos se pueden reproducir en un embrión de ratón.

También en un modelo de ratón, Cook, C.S. y cols., en 1987, estudiando el desarrollo ocular, señalan que la exposición al etanol durante la gastrulación, ocasiona una deficiencia en el cerebro anterior, que se acompañará de microfaquia, afaquia, lenticonus anterior y posterior, y cataratas.

En primates (Clarren, S.K. y cols. en 1990), encuentran alteraciones oculares como microftalmía (en 3 de los 26 animales expuestos) y un descenso en el número de células ganglionares en todos los animales expuestos al etanol.

En 1992, Ferriero, D.M., Sheldon, R.A. y Domingo, J., analizando el efecto de la exposición al etanol en la retina en desarrollo de las ratas, se inclinan por un

mecanismo de acción químico indirecto, tras observar la elevada concentración de somatostatina en la retina de los fetos expuestos al etanol. El aumento de este péptido se asocia con una excesiva formación de conexiones y una migración inadecuada de las neuronas que contienen somatostatina en las edades posnatales tempranas. Estas alteraciones provocarían un fallo en el desarrollo de las células ganglionares, ocasionando una hipoplasia del nervio óptico.

Pinazo-Durán, M.D. y cols. (1992, 1993), tras demostrar un retraso en el crecimiento y la maduración de los astrocitos del nervio óptico de fetos de rata expuestos al etanol, indican que la alteración de las células gliales, o de sus precursoras, podría explicar la hipoplasia del nervio óptico. Las anomalías en las células macrogliales pueden inducir alteraciones en la diferenciación de las células ganglionares y cambios en el transporte axoplásmico, la morfología y crecimiento axonal.

Aunque se sabe que una lesión de los núcleos geniculados laterales puede modificar el desarrollo de la retina, Ashwell, K.W. y Zhang, L.L. (1994), estudiando el efecto del etanol tras una exposición prenatal aguda en ratones grávidas, observan diferencias en la cantidad de axones y en la mielinización del nervio óptico, mientras que no las hallan en las poblaciones neuronales de los núcleos geniculado lateral y en el *colliculus superior*, por lo que sugieren que el déficit axonal está causado por un daño directo sobre la retina, y no por un incremento de pérdida postnatal de los axones, consecuencia de una lesión de los núcleos que reciben las proyecciones retinianas.

En suma, desafortunadamente, y a pesar de todo el esfuerzo realizado hasta ahora, aún nos quedan muchas cosas por conocer, desde el modelo dosis-respuesta, o la dosis umbral responsable de la manifestación de un SAF o unos EFA, hasta bastantes de los mecanismos moleculares responsables del conjunto de trastornos causados por la exposición al etanol, que no están totalmente esclarecidos todavía. Creemos que esta información es vital, entre otras cosas, para el desarrollo de pruebas de pronóstico capaces de identificar los fetos afectados. Además, puesto que el SAF es una entidad que se puede prevenir en su totalidad, estamos obligados a hacer grandes esfuerzos para disminuirla.

I. 7.- Objetivos de la investigación

Una vez revisada la bibliografía, y comprobada la escasa información disponible, el objetivo fundamental del presente trabajo consiste en ampliar el conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales el etanol ejerce su acción tóxica sobre las primeras fases del desarrollo ontogénico ocular.

Con tal fin, ante la obvia dificultad de trabajar con material humano, hemos desarrollado en nuestro laboratorio un modelo experimental, utilizando embriones de pollo, que reproduce muchas de las características propias de la embriofetopatía alcohólica.

Los embriones se someten a la acción directa del etanol en la temprana fase de blástula-gástrula, antes de que el epiblasto se haya diferenciado en neuroectoblasto, delimitándose las condiciones experimentales en lo concerniente a:

- la concentración de etanol que llega al embrión
- que su acción es directa, no a través de sus metabolitos
- que toda la ontogenia del ojo está sometida a la acción del etanol.

El conocimiento exhaustivo de la embriología de las Aves, así como su fácil manejo, nos permiten hacer los diversos muestreos de aquellos períodos, especialmente relevantes, del desarrollo embriológico de las diferentes partes del ojo, con el fin de:

- 1) Determinar la respuesta embriológica ante la acción tóxica directa y específica del etanol, desde fases muy tempranas del desarrollo.
- 2) Estudiar las posibles alteraciones del desarrollo ontogénico ocular inducidas por la acción directa del etanol, determinando qué partes del ojo se ven más afectadas, cómo y desde qué momento.
- 3) Analizar si las alteraciones se pueden relacionar con las encontradas en niños con Síndrome Alcohólico Fetal, con el fin de acercarnos a la comprensión de sus mecanismos de origen.

II.- Material y Métodos

II. 1.- Material biológico

Los estudios descritos en esta memoria se realizaron con huevos fertilizados de ambos sexos procedentes de gallinas de la raza White Leghorn, con menos de seis días desde la puesta, de morfología correcta y peso comprendido entre los 55-65 gramos. Los huevos fueron suministrados por la Granja Santa Isabel de Córdoba.

Tras su desinfección, y tratamiento cuando procedía, fueron incubados a $37,7 \pm 0,4$ °C y humedad relativa de 60-70%, en incubadora Masalles, mod. 65, con ventilación forzada y volteo automático (un movimiento cada hora).

A partir del 6º día de incubación, la viabilidad de los huevos se determinó con un ovoscopio, por transiluminación y en semioscuridad, con objeto de eliminar los huevos infértiles o abortados.

II. 1. 1.- Modelo experimental

Antes que nada, es necesario tener en cuenta la "particularidad" de que la alcoholdependencia es una enfermedad exclusivamente humana, pues el hombre (*homo sapiens sapiens*) es el único animal capaz de hacerse espontáneamente dependiente para el alcohol (Paille, F. y Barrucand, D., 1983). Así, se ha comprobado que los animales de experimentación, incluso después de períodos de alcoholización experimental, y en trance de abstinencia, beben muy poco alcohol.

Han sido muchos y diversos los modelos empleados por los investigadores para

aproximarnos al conocimiento de la acción teratógena del etanol y su manifestación en forma de SAF. Creemos conveniente, por lo tanto, establecer las bases experimentales sobre las que se sustenta el modelo por nosotros utilizado, con el fin de delimitar el marco de nuestras aportaciones.

Nuestra aproximación al SAF es solamente a través del estudio de la acción tóxica directa del etanol, y siendo conscientes de que es tan solo una de las partes que habrán de contribuir a la comprensión de los complejos mecanismos fisiopatológicos que ocurren en el período embrionario, y que están detrás de la inducción del SAF.

El embrión de pollo proporciona un modelo satisfactorio para el análisis de determinados aspectos de la acción teratógena del etanol en varios niveles de organización, presentando inconvenientes y ventajas en relación con otros sistemas (Brodie, Ch. y Vernadakis, A., 1990).

Su principal ventaja e inconveniente es la de no ser un Mamífero. En efecto, se trata de un sistema de desarrollo embrionario autosuficiente (no exige aportes externos al sistema). El embrión obtiene sus propios nutrientes en condiciones estériles, eliminando, de este modo, las adicionales y características interacciones fisiológicas uterinas, placentarias o útero-placentarias, propias de los mamíferos. Está bien demostrado que el estado fisiológico de la madre es de considerable importancia para el embrión. La acción negativa del etanol, o de sus metabolitos, sobre la actividad metabólica materna y/o sobre su estado nutricional, puede conducir a un retraso del crecimiento intrauterino, y otras anomalías propias de la exposición *in utero* (Jones, K.L. y Smith, D.W., 1973), que no ayudan a la comprensión del fenómeno. La característica de nuestro modelo es que permite estudiar la acción directa del etanol, en la seguridad de que no existen los metabolitos del tóxico. Así, sabemos que antes del día 9º de incubación los embriones de pollo no poseen actividad ADH, siendo a partir de ese día cuando se puede medir la actividad de la ADH hepática, de tal modo que una dosis única de etanol, administrada al comienzo de la incubación (día 0), se elimina lentamente, y por mecanismos pasivos de respiración y difusión a través de las membranas y la cáscara antes de ese día (Rahn, H. y cols., 1979). Además, la contribución relativa de otras rutas coadyuvantes de eliminación del etanol (sistemas microsomales de oxidación del etanol y catalasa) es inapreciable durante este período

de desarrollo (Wilson, R.W. y cols., 1984). Descartamos con ello en nuestra experiencia, que abarca el período de desarrollo temprano (2° a 6° días de incubación, ambos inclusive), la posible intervención indirecta de metabolitos del etanol (tal como el acetaldehído, fruto de la acción enzimática de la ADH sobre el etanol), cuya prominente acción tóxica ya ha sido descrita (Jones, K.L. y Smith, D.W., 1973, Korsten, M.A. y cols., 1975, Guerri, C., 1979, O'Shea, K. y Kaufman, M., 1979, Dreosti, I. y cols., 1981, Sreenathan, R. y cols., 1982, Guerri, C. y Sanchis, R., 1986).

Entre otras características que se tuvieron presentes a la hora de elegir el embrión de pollo como modelo experimental, destacan el gran conocimiento que se posee de su desarrollo embriológico y, en relación con su aparato visual, la gran importancia que tiene el sentido de la vista en las Aves, por lo que están dotadas de un aparato visual muy desarrollado y perfectamente estructurado, que lo hace especialmente idóneo para estudios como el que hemos abordado.

Sin olvidar la importancia del genotipo, la acción del etanol sobre el desarrollo embrionario depende principalmente de dos factores: dosis de etanol administrada y momento de la exposición al tóxico (Wilson, J.C., 1977). Sobre estas dos variables básicas está sustentado el enorme rango de anomalías presentes en afectos de SAF (Randall, C.L., 1987). Es conveniente, por tanto, reflexionar sobre la realidad de este binomio en nuestra experiencia.

En relación con la dosis, algunos autores que son partidarios del modelo agudo en ratas (Kennedy, L.A. y Elliot, M.J., 1986), sostienen que muchas de las anomalías del SAF se pueden reproducir en un embrión, tras un episodio único de intoxicación materna en un período crítico de ontogénesis ocular.

Fang, T. T. y cols. (1987) y Bruyere, H.J. y Kapil, R.P. (1990), sugieren que concentraciones de etanol comprendidas entre 0,43 y 3,03 mg ml⁻¹, en huevos de pollo, son comparables a los niveles de etanol en sangre humana cuando existe intoxicación.

Nosotros utilizamos un modelo de intoxicación aguda antes de la incubación, que, como se expondrá con posterioridad, presenta unos niveles de mortalidad aceptables y que, durante el período experimental, conduce a niveles de etanol en sangre comprendidos dentro de los anteriormente señalados.

Desde la perspectiva cronológica, sabemos que muchas de las alteraciones

inducidas por el etanol son dependientes del estadio de desarrollo embrionario (Hanson, J.W. y cols., 1978 y Leonard, B.E., 1988). Algunos autores (Hoyseth, K.S. y Jones, P., 1989) sugieren que clínicamente la manifestación del SAF no requiere altos, y continuos, niveles de etanol en sangre, sino que ha de estar presente sólo durante determinados períodos críticos. Chan, T. y cols., (1991) sostienen, en relación con las alteraciones oculares observadas en niños afectados de SAF, que es difícil identificar un período crítico en el cual el desarrollo del ojo, o de alguna de sus partes, sea especialmente sensible a la acción teratógena del etanol, sino que, más bien, cada una de sus partes es igual de susceptible a la citada acción teratógena, desde el mismo momento en que empieza a desarrollarse.

En nuestra experiencia, una sola dosis de etanol administrada antes de la incubación, es decir, cuando el embrión se encuentra en la fase de blástula-gástrula, es suficiente como para estar presente más allá del período comprendido entre los días 1º a 6º de incubación. En este vulnerable, sensitivo y crítico período, que comprende desde la gastrulación hasta la organogénesis, acontecen los principales eventos del desarrollo ontogénico ocular.

II. 1. 2.- Características diferenciales del ojo de las Aves

El ojo de las Aves, aunque siendo muy similar al de los Mamíferos, posee un conjunto de peculiaridades que le dotan de una mayor agudeza visual. En comparación con éstos, las diferencias más notables son las siguientes:

- en la retina, ausencia de vasos sanguíneos, y aparición de dos o tres regiones de máxima agudeza visual (fóveas), e incluso de una banda central de visión especial
- en el humor vítreo, presencia de una estructura vascular especial (pecten)
- en la esclerótica presencia, en su porción anterior, de placas óseas
- el músculo del cuerpo ciliar e iris es estriado, por lo que, posiblemente, el proceso de acomodación sea característico.

La mayoría de estas diferencias representan adaptaciones específicas para la visión durante el vuelo y, como hemos señalado anteriormente, contribuyen directa o indirectamente a la mejor visión de las Aves en relación con los Mamíferos.

II. 1. 3.- Grupos de estudio y tratamiento

En las experiencias se utilizaron tres grupos de estudio. Un primer grupo control (C) no fue sometido a ningún tipo de manipulación física o tratamiento. Fue utilizado para establecer los patrones de normalidad y evaluar las posibles variaciones de fertilidad y viabilidad de los huevos embrionados, en función de la estacionalidad.

Los otros dos grupos, vehículos (V) y tratados con etanol (T), fueron inyectados antes de la incubación (día 0), respectivamente, con 200 μ l de agua bidestilada estéril, apirógena (que es el vehículo de la solución alcohólica), y con 200 μ l de una solución acuosa de etanol (50% v/v, entre 1,2 y 1,4 g de etanol Kg^{-1} huevo, dependiendo del peso de los huevos).

La administración se realizó en cámara estéril, practicando con una lanceta dos pequeños orificios de aproximadamente 1 mm de diámetro en la zona roma del huevo, precisamente en la porción ocupada por la cámara de aire, que había sido delimitada con anterioridad con objeto de evitar traumatismos. De los dos orificios (que atravesaban la cutícula, la cáscara y la membrana externa de la cáscara) uno fue utilizado para administrar la dosis correspondiente, y el otro para favorecer la penetración de las soluciones. Tras la inyección, en una rápida manipulación, ambos orificios se cerraban con parafina líquida, con el fin de iniciar la incubación inmediatamente.

La concentración de etanol se determinó en embriones de 4, 6, 8, 11, 14 y 20 días de incubación (d.i.). Para analizar los estadios de desarrollo embrionario, se compararon los embriones de los tres grupos experimentales a las 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas de incubación (h.i.). Puesto que no se encontraron diferencias entre los embriones controles y los vehículos, en lo concerniente al estudio de la acción del etanol sobre el desarrollo ontogénico de los ojos, utilizamos exclusivamente los dos grupos experimentales controles y expuestos al etanol. Así, para estudiar los posibles efectos del etanol sobre la ontogenia ocular, se analizaron vesículas ópticas y globos oculares de embriones, de los grupos control y tratados, de 40, 64, 90, 114 y 137 h.i.

II. 1. 4.- Determinación de etanol

Para determinar la concentración de etanol en diferentes tejidos y fases del

desarrollo embrionario se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer, mod. sigma 300) equipado con un detector de ionización de llama y un dosificador semiautomático para la técnica de espacio de cabeza (HS-6). Las condiciones operativas fueron las siguientes: columna de acero inoxidable de 2m de largo y 1/8 pulgadas de diámetro interno empaquetada con carbowax 1500 al 15% en chromosorb w (80-100 mallas). La temperatura de la columna fue de 100°C y las del inyector y detector de 150 y 200°C respectivamente. La velocidad de flujo del gas portador (nitrógeno) fue de 30ml/min.

Las muestras de tejidos (cada muestra constituida por un "pool" tisular de 7-8 embriones) fueron tratadas, inmediatamente tras la extracción, mediante homogenización con agua destilada (1:10, peso/volumen) y centrifugación (4000 g) a 4°C. Para los análisis de etanol se usaron los líquidos sobrenadantes. Las muestras de líquido amniótico se analizaron sin pretratamiento.

El proceder analítico fue el siguiente: en viales de espacio de cabeza (2ml) se introdujeron alícuotas de 1,0 ml de las muestras previamente tratadas y 100 µl de una disolución de *n*-propanol (E. Merck) de 0,5 mg/ml como patrón interno. Después de 30 minutos de incubación a 60 °C, los viales fueron automáticamente dosificados (tiempo de inyección 5 seg) y cuantificados bajo las condiciones anteriormente expuestas. Los patrones de calibrado se prepararon para cada experiencia a partir de etanol absoluto (E. Merck) y fueron tratados de forma similar a la descrita (Molina, F. y cols., 1992).

II. 1. 5.- Medida del desarrollo ontogénico

Una muestra representativa de los tres grupos experimentales fue estudiada en varias fases del desarrollo embrionario, a las 24, 36, 48, 60, 72 y 84 h.i. (E24, E36, E48, E60, E72 y E84, respectivamente), para determinar, en relación con los controles, la acción de la solución de etanol, y del agua, sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario, precisamente aquellas en que tienen lugar los acontecimientos esenciales de la morfogénesis del ojo.

Las placas embrionarias se fijaron *in ovo* con una solución al 1% de tetróxido de osmio, en tampón cacodilato 0,1M, pH 7,4, hasta alcanzar la coloración adecuada para su estudio. Tras la extracción, las placas se montaron en portaobjetos para ser analizadas y catalogadas con ayuda de un microscopio estereoscópico WILD M8.

Puesto que no siempre existe una correlación exacta entre la edad estructural y la cronológica de un embrión, para asignar a cada embrión el estadio de desarrollo en que se encontraba se utilizó la clasificación propuesta por Hamburger, V. y Hamilton, H.L. (1951, 1992). Así, dependiendo del desarrollo del embrión, fueron aspectos característicos de ese momento, los determinantes a la hora de su clasificación. En la primera extracción (E24) fueron las características del tubo neural, en la 2ª y 3ª (E36 y E48), el número de somitos, y en las siguientes extracciones (E60, E72 y E84), las características del tubo neural, las curvaturas del embrión y, sobre todo, la forma y tamaño de los primordios de los miembros.

Una primera aproximación al estudio del posible efecto del etanol sobre el desarrollo ocular, se hizo determinando su grado de madurez. El desarrollo del tubo nervioso, y las características de las vesículas ópticas, nos sirvieron para catalogar los embriones de la primera extracción (E40). En las siguientes extracciones (E64, E90, E114 y E137) nos basamos en los trabajos de O'Rahilly, R. y Meyer, D.B. (1959) y O'Rahilly, R. (1962), sobre el desarrollo ocular, para clasificar los primordios oculares en estadios de Hamburger y Hamilton (H.H.).

II. 2.- Preparación de las muestras

Embriones enteros (E40 y E64) o las porciones cefálicas de los embriones (E90, E114 y E137) fueron fijados, inmediatamente tras su extracción, en una solución de glutaraldehído al 1,5% y formaldehído al 0,8% en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4 durante 60 min. a 4°C. Tras la fijación las muestras se lavaron tres veces con tampón cacodilato 0,1M, pH 7,4 durante 120 min. a 4°C. Las muestras se postfijaron en una solución acuosa de tetróxido de osmio al 2%, conteniendo 0,8-1% de ferrocianuro potásico $[\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_3]$, durante 180 min., a temperatura ambiente y en oscuridad. Con posterioridad se procedió al lavado (tres veces) de las piezas en agua bidestilada, durante 15 minutos.

Con posterioridad las muestras se contrastaron en bloque en una solución acuosa de acetato de uranilo 1%, durante 45 min., a temperatura ambiente y en oscuridad, tras lo cual fueron lavadas varias veces en agua bidestilada.

La deshidratación se realizó en gradientes de etanol (50%, 5 min.; 75%, 5 min.;

95%, 5 min. y absoluto, 10+10 min.). Por último las piezas se orientaron adecuadamente y se incluyeron en Epon-812 (Tousimis) según el protocolo convencional.

Los cortes semifinos ($\approx 1\mu$ de espesor) se obtuvieron con ultramicrotomos LKB III, LKB IV o Reichert-Jung (Ultracut E).

Los cortes semifinos seriados, correspondientes a la zona de estudio (*fundus*) y con la orientación precisa (utilizamos los cortes anteriores a la zona de estudio para orientar adecuadamente la pieza), se montaron directamente sobre portaobjetos, se les quitó la resina con bromo y fueron teñidos con azul de toluidina 1% en caliente. Los cortes se analizaron alternativamente con cámara clara incorporada a microscopio óptico Leitz y en microscopios ópticos Leitz Orthoplan y Leitz DMBR, y fueron fotografiados con equipo fotográfico Wild MPS45 incorporado al último microscopio.

Las medidas se realizaron siempre en la misma zona de ojo (porción medio sagital del *fundus*). Las diferentes medidas de cada individuo (espesores de los estratos de la retina, nº de mitosis en el epitelio germinal, y diámetros y espesores de los epitelios del cristalino), son el resultado del cálculo de la media de seis cortes consecutivos, y separados entre sí 5μ , cubriéndose un espesor total de 30μ correspondientes a la zona de estudio anteriormente indicada. En número de mitosis se cuantificó lo largo de las 500μ centrales del *fundus*.

II. 3.-Tratamiento de los datos

Los datos se han procesado con la hoja de cálculo Quattro Pro para Windows, versión 5.0, de Borland Internacional.

Para la comparación de los resultados de los diferentes parámetros y estadios estudiados se utilizó en primer lugar la *F* de Snedecor para determinar la igualdad o desigualdad de la varianzas de los grupos experimentales. La comparación de las medias se hizo utilizando el test de la *t* de Student para la comparación de medias.

III.- Resultados

III. 1.- Concentración de etanol en los embriones

Estudios de nuestro laboratorio demuestran que, entre los días 1º y 6º de incubación (período que abarca nuestro estudio), el desarrollo ontogénico ocurre bajo la acción directa del etanol (Molina, F. y cols., 1992). Las concentraciones de etanol estaban comprendidas entre la máxima, correspondiente al 4º d. i. (primera determinación), y la del 14º d.i., en que se había eliminado todo el etanol (gráfico 1, tabla 4).

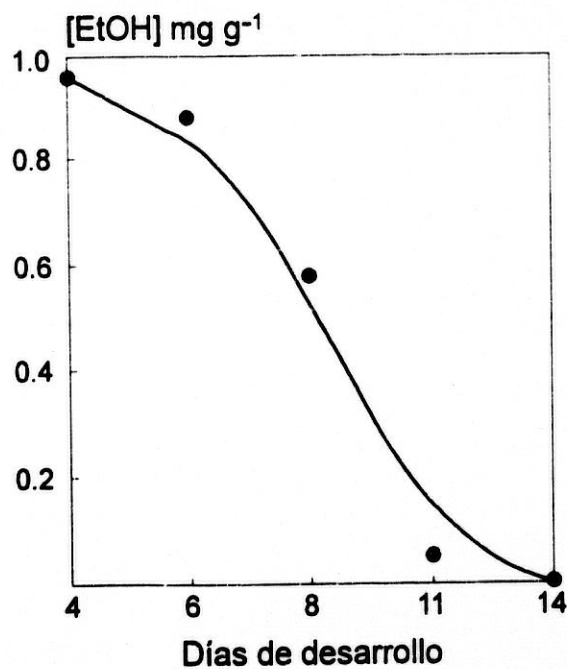


gráfico 1

Tabla 4
Concentración de etanol en diferentes tejidos de embrión de pollo

Días de desarrollo	Tejido	Concentración de etanol (mg g ⁻¹)
4	"Pool" embrionario	0.96 ± 0.02
6	"Pool" embrionario	0.88 ± 0.04
8	Cabeza	0.58 ± 0.03
8	Cuerpo	0.58 ± 0.02
11	"Pool" cerebral	0.05 ± 0.03
11	Líquido amniótico ¹	(40.1 - 9.0)
14	Cerebro	N.D.
14	Líquido amniótico ¹	(6.0 - N.D.)
20	Cerebro	N.D.
20	Líquido amniótico ¹	N.D.

Los datos, en mg g⁻¹, representan la media de 4-6 muestras (por triplicado)

¹ Sin pretratamiento (mg l⁻¹)

N.D. = no detectado o por debajo del límite de determinación

III. 2.- Efectos sobre el desarrollo ontogénico temprano

Una muestra representativa de los tres grupos experimentales fue estudiada en varios momentos del desarrollo embrionario (E24, E36, E48, E60, E72 y E84), para determinar la acción de la solución de etanol (grupo tratados), y del agua (grupo vehículos), sobre las primeras fases del desarrollo embrionario, precisamente aquellas en que tienen lugar los acontecimientos esenciales de la morfogénesis del ojo.

La acción más dramática del alcohol sobre el embrión en desarrollo consistió en provocar su muerte. Nuestros resultados se muestran en la tabla 5 y los gráficos 2 y 3. La mortalidad en el grupo de embriones tratados fue mayor que la encontrada en los grupos control y vehículos, destacando dos períodos del desarrollo especialmente sensibles a la acción teratógena del etanol: el 4º d.i. y el comprendido entre los d.i. 18 y 21.

Tabla 5
Mortalidad embrionaria acumulada (%)

Días de desarrollo	Controles	Vehículos	Tratados
1	6,223	6,459	8,307
3	6,223	6,659	8,673
5	6,223	6,914	14,241
7	6,358	6,878	14,450
9	6,936	7,407	15,230
11	7,514	7,407	15,625
13	7,514	7,636	16,406
15	7,514	7,636	17,187
17	7,514	7,636	17,578
19	8,092	10,053	22,656
21	9,248	10,053	34,765
23	9,248	10,053	34,765

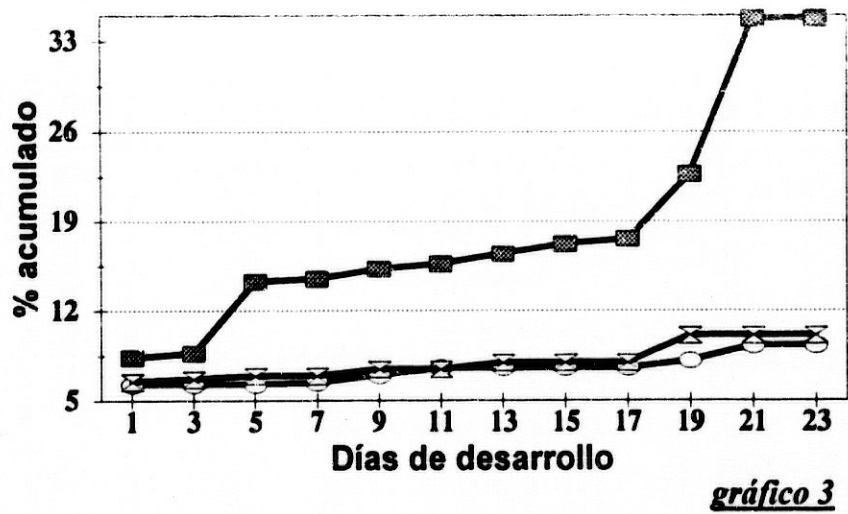
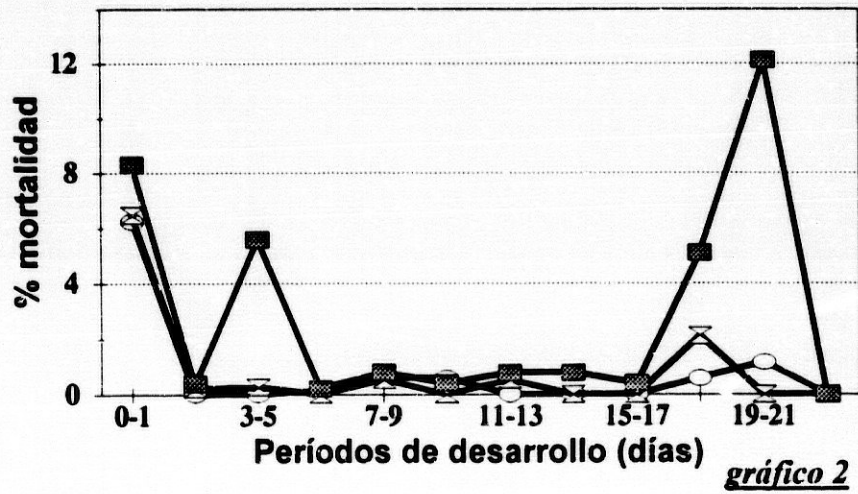
controles n=173; vehículos n=189; tratados n= 256

Durante las diferentes etapas de desarrollo nos servimos de determinados aspectos muy representativos de aquellas fases para el diagnóstico exacto del estadio en que se encontraba cada embrión.

El primer resultado a destacar en todas las extracciones, es la homogeneidad de los embriones pertenecientes a los grupos controles y vehículos, estando los embriones en la misma etapa de desarrollo. Sin embargo, los tratados con etanol presentaban una gran heterogeneidad, poniéndose de manifiesto que el efecto del etanol sobre los embriones depende en gran medida de su componente genotípico.

Clasificamos los embriones de la primera extracción (E24), en estadios de Hamburger y Hamilton, teniendo en cuenta el número de pares de somitos. Los embriones controles (C24 y V24) presentaban entre 7 y 10 pares de somitos (el primer par, que estaba desapareciendo, no se incluyó en el recuento). La porción cefálica del tubo neural estaba más ensanchada que la porción caudal, con las tres vesículas

Mortalidad



○ controles △ vehículos ■ tratados

cerebrales primarias formadas: el cerebro anterior o prosencéfalo, el cerebro medio o mesencéfalo, y el cerebro posterior o rombencéfalo. De las paredes laterales del prosencéfalo emergían las vesículas ópticas primarias, las cuales aún no estaban constreñidas en su base. Los pliegues neurales estaban cerrándose, sin embargo, aún no se había cerrado el extremo rostral del cerebro, el neuroporo anterior (lámina I, figuras 1 y 3).

Los embriones expuestos al etanol (T24), además de presentar una morfología y grado evolutivo diferente a los otros dos grupos, eran desiguales entre sí, como hemos señalado anteriormente. El número de pares de somitos osciló entre aquel de los embriones más atrasados, en el que todavía no se observaban zonas segmentarias del mesodermo paraaxial (lámina I, figura 2), y los más evolucionados que mostraron hasta 4 pares (lámina I, figura 4), es decir, entre 3 y 10 pares de somitos de diferencia con respecto a los grupos controles. Los más atrasados en el desarrollo, mostraban una línea primitiva definitiva y la notocorda como una estructura medial bien definida. El primordio del sistema nervioso era muy diferente del descrito con anterioridad para los dos grupos no expuestos al etanol, pues el pliegue cefálico aún no era evidente (lámina I, figura 3). Otros embriones de este mismo grupo estaban más desarrollados, mostrando somitos, y siendo visibles los pliegues neurales en la región cefálica, a ambos lados de la notocorda (lámina I, figura 4).

Atendiendo a estas características se clasificaron los embriones en estadios de Hamburger y Hamilton. Los embriones controles y vehículos pertenecían a los estadios H.H. 9 y H.H. 10, mientras que los tratados se encontraban entre los estadios H.H. 4 y H.H. 8. El porcentaje de embriones expuestos al etanol que estaban atrasados en el desarrollo, con respecto a los grupos controles, fue del 70% (tabla 6).

Estos resultados nos muestran que las diferencias de desarrollo son significativas al comparar los grupos controles (C24 y V24) con los tratados con etanol (T24), como se muestra en la tabla 7. Sin embargo no encontramos diferencias entre los grupos controles (C24) y vehículos (V24).

En la segunda extracción, realizada a las 36 horas de desarrollo embrionario, los embriones controles (C36 y V36), mostraban un número de pares de somitos comprendido entre 16 y 22. La cabeza ya estaba torcida completamente a la

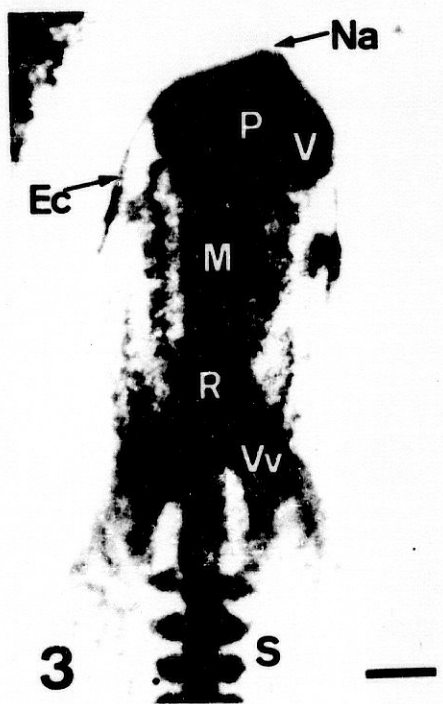
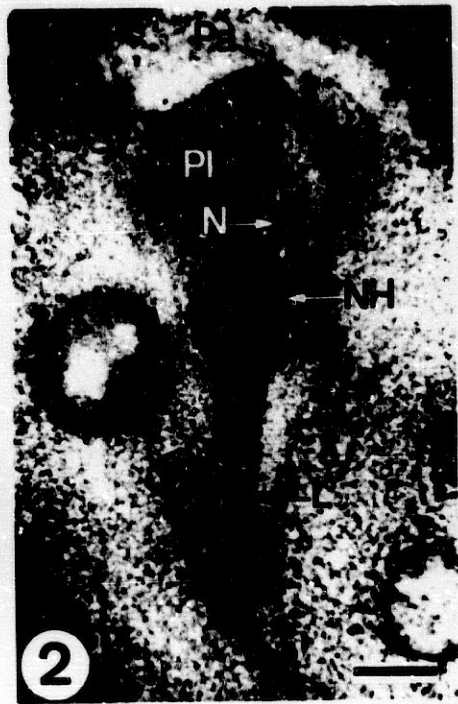
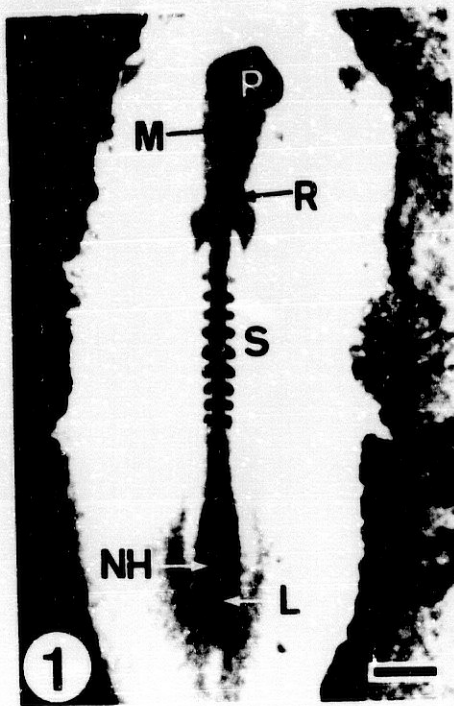
Lámina I.- Microfotografías de embriones de 24 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embrión control (H.H. 10). Se distinguen las tres vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo (P), mesencéfalo (M) y rombencéfalo (R). De las paredes laterales del prosencéfalo, o cerebro anterior, cuyo neuroporo anterior (Na) aún está abierto, emergen las vesículas ópticas primarias (V) que aún no están constreñidas en sus bases.

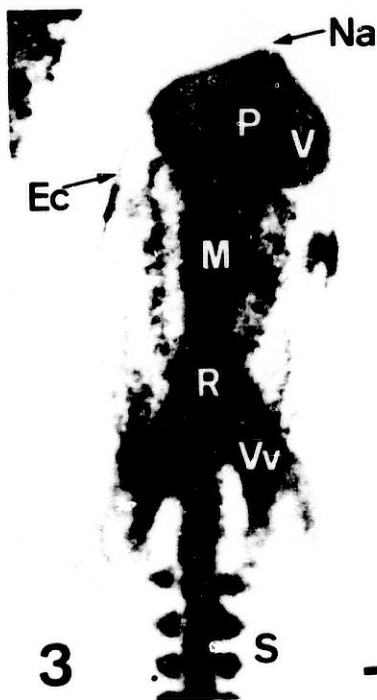
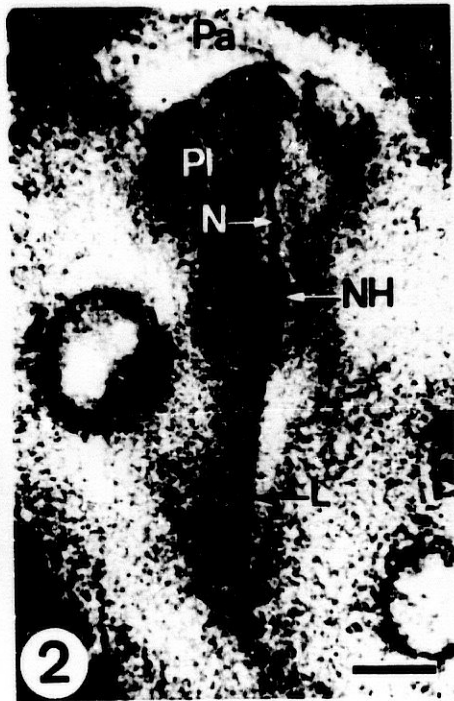
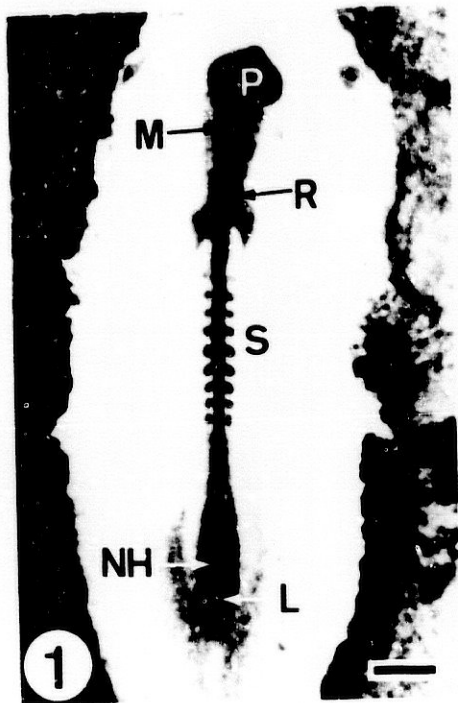
Figuras 2 y 4.- Embriones tratados (H.H. 5 y H.H. 8 respectivamente). El embrión de la figura 2, muy atrasado en el desarrollo, muestra la placa neural (PI), sin pliegue cefálico. En la figura 4 se presenta un embrión algo más evolucionado, observándose en la región cefálica, a ambos lados de la notocorda, los pliegues neurales (Pn), que delimitan el surco neural (Sn).

Ec: ectodermo cefálico, **L:** línea primitiva, **N:** notocorda, **NH:** nudo de Hensen, **Pa:** proamnios, **S:** somitos, **Vv:** vena vitelina.

Figuras 1 y 2: barra = 500 μm , **figuras 3 y 4:** barra = 250 μm .



LAMINA I



LAMINA I

Tabla 6
Porcentaje de embriones tratados con etanol
que presentan retraso manifiesto en el desarrollo

Horas de desarrollo	Porcentaje
24	70
36	60
48	60
60	60
72	50
84	60

n = 10 para cada una de las de extracciones.

izquierda. El prosencéfalo presentaba una constricción, que indicaba una inminente división de éste en diencéfalo y telencéfalo. Las vesículas ópticas se convirtieron en cúpulas ópticas de paredes dobles, que se comunicaban con las paredes ventrolaterales del diencéfalo a través de angostos pedículos ópticos. La invaginación de las fositas auditivas dio lugar a la formación de las vesículas auditivas (lámina II, figura 1).

El número de pares de somitos de los embriones expuestos al etanol (T36) fue variable, y comprendido entre 1 y 14. En los embriones más atrasados, el número de somitos oscilaba entre uno y cuatro pares. Los pliegues neurales eran visibles en la región cefálica a ambos lados de la notocorda (lámina II, figura 2). Otros embriones de este grupo estaban más desarrollados, pudiendo distinguirse: las tres vesículas cerebrales primarias, las vesículas ópticas primarias -que aún no tenían constreñida su base-, y el neuroporo anterior que permanecía abierto (lámina II, figura 3). Los embriones más evolucionados del grupo (T36) mostraron una cantidad superior de pares de somitos (que oscilaba entre 12 y 14), y una flexión craneal tenue, así como un inicio de torsión de la cabeza a la izquierda. El neuroporo anterior se había cerrado y las vesículas ópticas estaban constreñidas en sus bases, por lo que el tallo óptico se hizo patente (lámina II, figura 4).

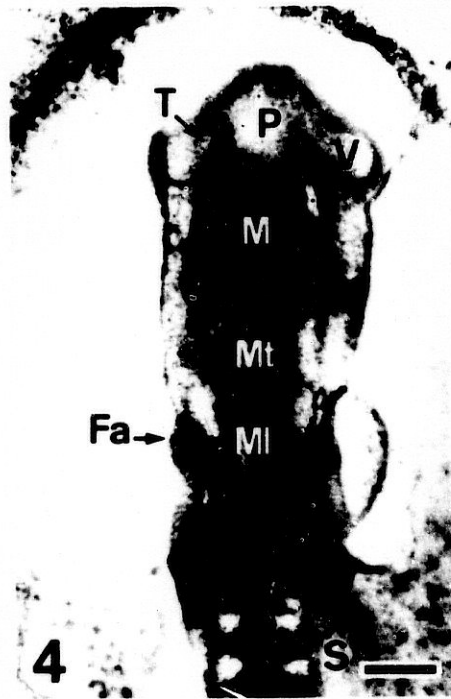
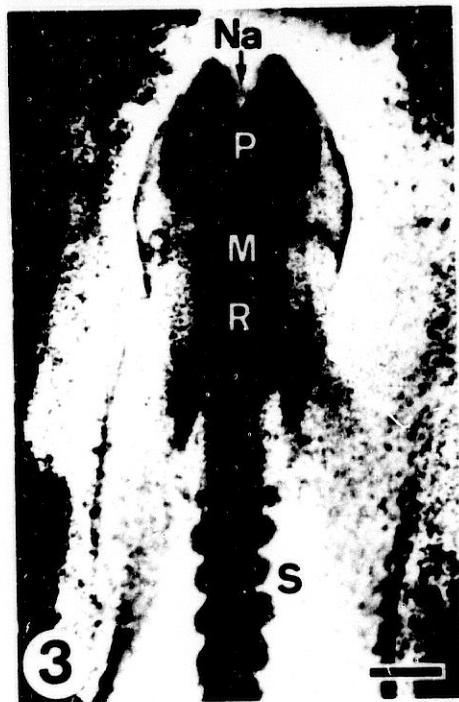
Lámina II.- Microfotografías de embriones de 36 horas de incubación

Figura 1.- Embrión control (H.H. 13). La cabeza ya presenta la curvatura craneal (está torcida completamente a la izquierda). En el prosencéfalo (P), aparece una constricción leve, que indica la inminente división de éste en diencefalo y telencefalo. Las vesículas ópticas se han convertido en cúpulas ópticas (Co), que se comunican con las porciones ventrolaterales del diencefalo a través de los pedículos ópticos. Tras el mesencéfalo aparece el rombencéfalo, con indicios de subdivisión en metencéfalo (Mt) y mielencéfalo (MI).

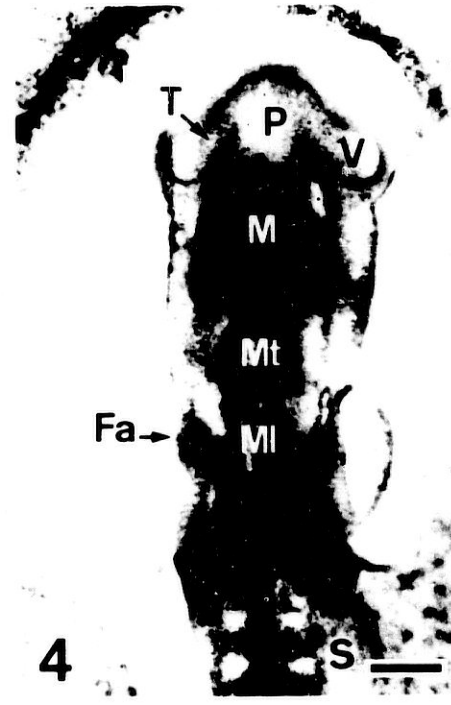
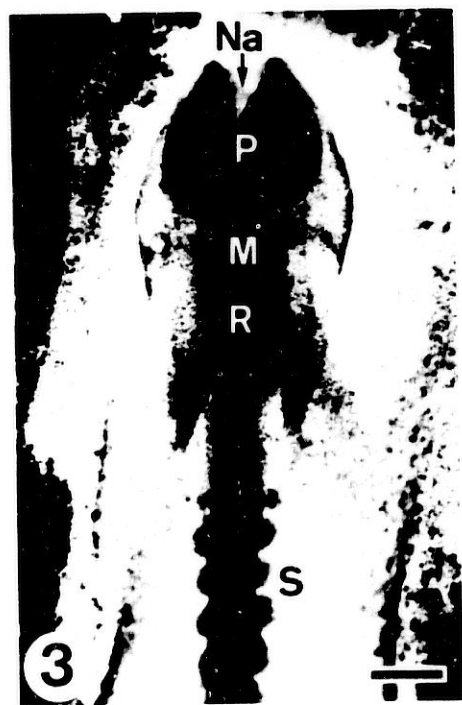
Figuras 2, 3 y 4.- Embriones tratados con etanol que muestran diferente retraso en el desarrollo. El embrión de la figura 2 (H.H. 8) presenta tan solo 3 pares de somitos. Los pliegues neurales (Pn) son visibles en la región cefálica, a ambos lados de la notocorda. En la figura 3 (H.H. 9), se observa un embrión en el que se distinguen las tres vesículas cerebrales primarias, y el neuroporo anterior (Na) abierto. En la figura 4 se muestra un embrión más desarrollado (H.H. 11), donde el neuroporo anterior ya se ha cerrado, las vesículas ópticas (V) están constreñidas en sus bases, y el tallo óptico (T) es patente.

Fa: Fosita auditiva, **M:** mesencéfalo, **R:** rombencéfalo, **Vt:** ventrículo.

Figura 1, barra = 500 μ m; figuras 2, 3 y 4, barra = 250 μ m.



LAMINA II



LAMINA II

Tabla 7

Evolución embrionaria atendiendo a los estadios de H.H.

Horas de desarrollo	Controles		Tratados		Vehículos
	H.H. ($\bar{x} \pm ds$)	Signif.	H.H. ($\bar{x} \pm ds$)	Signif.	H.H. ($\bar{x} \pm ds$)
24	9,9 \pm 0,3	p \leq 0,001	6,7 \pm 1,5	p \leq 0,001	9,8 \pm 0,4
36	13,0 \pm 0,8	p \leq 0,001	10,0 \pm 1,6	p \leq 0,001	12,9 \pm 0,7
48	15,6 \pm 0,5	p \leq 0,001	13,3 \pm 1,2	p \leq 0,001	15,6 \pm 0,5
60	18,3 \pm 0,7	p \leq 0,001	15,2 \pm 1,5	p \leq 0,001	18,0 \pm 0,5
72	19,9 \pm 0,3	p \leq 0,05	17,8 \pm 1,7	p \leq 0,05	19,7 \pm 0,5
84	22,0 \pm 0,7	p \leq 0,001	19,1 \pm 1,3	p \leq 0,001	21,9 \pm 0,6

(n = 10 para los tres grupos experimentales y cada una de las de extracciones).

Tras clasificar los embriones en estadios, según Hamburger y Hamilton, y compararlos, obtuvimos como resultado que los controles se encontraban en los estadios H.H. 12, 13 y 14, al igual que el grupo vehículos, en tanto que el grupo de tratados oscilaba entre el H.H. 7 y el H.H. 12, de los que un 60% estaban atrasados en el desarrollo, con respecto a los de los grupos controles (tabla 6). Entre los grupos controles (C36 y V36) no hubo diferencias de desarrollo, mientras que el desarrollo de éstos fue significativamente mayor que el del grupo de embriones bajo la acción del etanol (T36), como se muestra en la tabla 7.

El examen de los embriones de la siguiente extracción analizada (E48), nos mostró cómo en los grupos controles y vehículos las flexiones son más acentuadas, la rotación se extiende a los pares de somitos 14-15 (que ya resultaron difíciles de contar), y aparecen los primordios del miembro superior (yemas apendiculares anteriores). El primordio ocular estaba compuesto por la cúpula óptica, bien desarrollada, que presentaba una amplia fisura coroidea y el cristalino en formación (lámina III, figuras 1 y 3). En los embriones expuestos a la acción del etanol (T48) aún se podía contar el número de somitos (entre 13 y 24 pares). Los más atrasados no presentaban torsiones de la cabeza, y el neuroporo anterior estaba aún abierto (lámina III, figuras 2 y 4). En otros embriones, algo más evolucionados (entre 16 y 22 somitos), la cabeza estaba torcida completamente a la izquierda y las vesículas ópticas se

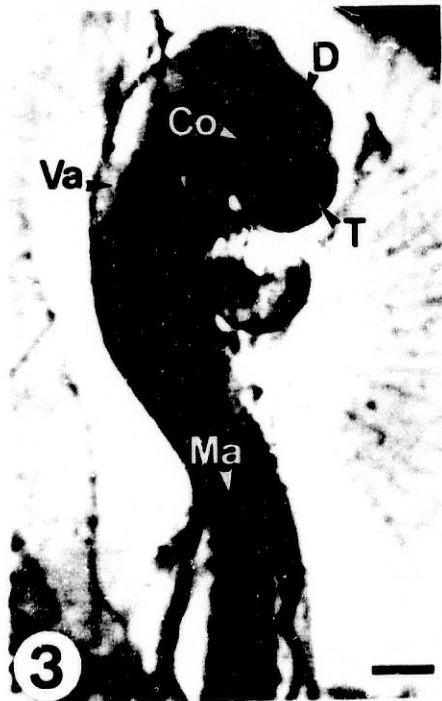
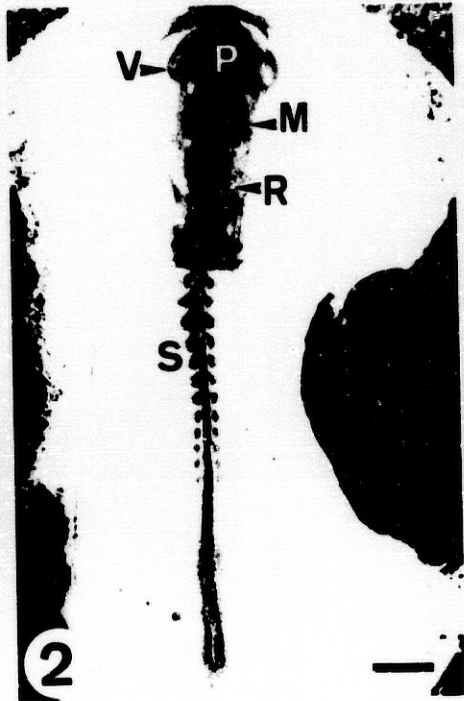
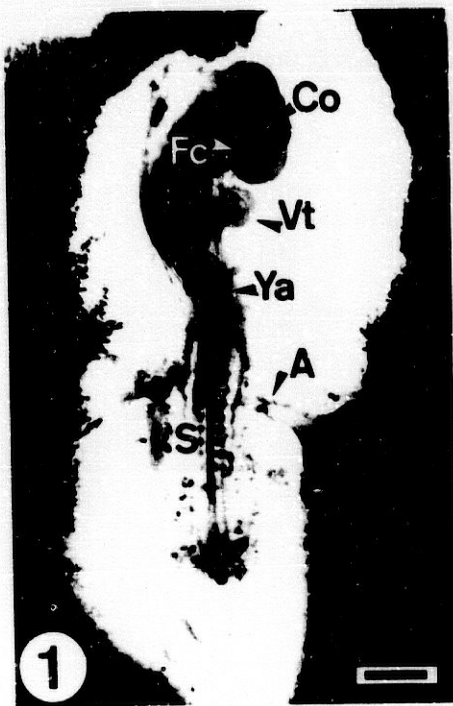
Lámina III.- Microfotografías de embriones de 48 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embriones controles (H.H. 15-16). Las flexiones están muy acentuadas y la torsión se extiende a los somitos 14-15. Se observan los primordios del miembro superior (yemas apendiculares anteriores, **Ya**) y el amnios (margen del amnios, **Ma**), que se extiende a los somitos 10-12. Se aprecia la subdivisión del prosencéfalo en diencéfalo (**D**) y telencéfalo (**T**). En la cúpula óptica (**Co**), se aprecia la fisura coroidea (**Fc**), y se intuye el cristalino en formación.

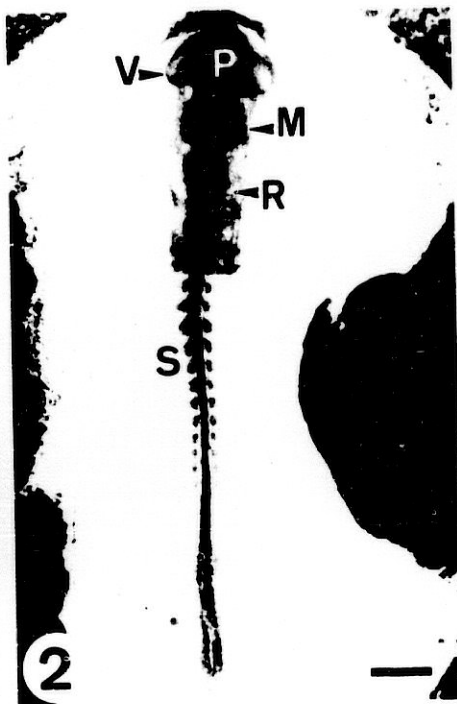
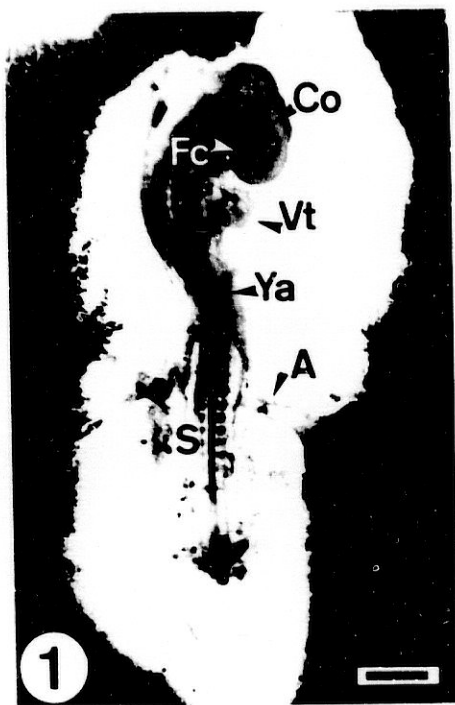
Figuras 2 y 4.- Embriones tratados (H.H. 12). En la figura 2 se muestra un embrión con 13 pares de somitos, que no presenta torsiones de la cabeza y con el neuroporo anterior (**Na**) aún abierto. En la figura 4 se presenta la porción cefálica de un embrión, donde el neuroporo anterior está abierto, las vesículas ópticas (**V**) están comenzando a constreñirse en sus bases, y el tubo nervioso está en fase de 3 vesículas (**P**: prosencéfalo, **M**: mesencéfalo, **R**: rombencéfalo).

A: arteria vitelina, **S:** somitos, **Vt:** ventrículo, **Va:** vesículas auditivas.

Figura 1: barra = 1 mm, figuras 2 y 3: barra = 500 μ m, figura 4: barra = 250 μ m.



LAMINA III



LAMINA III

habían transformado ya en cúpulas ópticas de paredes dobles. En los embriones más evolucionados de este grupo (22-24 somitos) se intuían los primordios del miembro superior.

Según estas características, clasificamos los embriones controles (C48 y V48) en los estadios H.H. 15 y 16, mientras que los embriones tratados los catalogamos como comprendidos entre los estadios H.H. 11 a H.H. 15. El porcentaje de embriones, de entre los expuestos al etanol, que estaban atrasados en el desarrollo con respecto a los de los grupos controles, fue del 60% (tabla 6). Los datos demuestran que el etanol es capaz de inducir un significativo retraso en el desarrollo, en comparación con los controles (tabla 7).

En la cuarta extracción (embriones de 60 h.i.), en los controles (C60 y V60), los primordios de los miembros estaban más crecidos, aunque ligeramente mayores las yemas apendiculares posteriores (que ocultaban la alantoides). Con respecto a la curvatura de los embriones, en la porción cervical, el eje de la médula y el eje del tronco posterior formaban un ángulo recto y la rotación se extendía a la parte posterior del cuerpo. Los ojos no estaban aún pigmentados, la fisura coroidea estaba presente y el cristalino formado (lámina IV, figuras 1 y 3).

En los embriones más inmaduros del grupo tratados con etanol (T60), aún pudimos contar el número de pares de somitos (entre 18 y 20). La cabeza aparecía torcida completamente a la izquierda, y la parte anterior del embrión hacia la derecha. Las vesículas ópticas estaban transformándose en cúpulas ópticas (lámina IV, figuras 2 y 4). Otros embriones mostraron un desarrollo mayor, las flexiones eran más acentuadas, la rotación se extendía a los pares de somitos 14-15 y aparecieron los primordios del miembro superior (yemas apendiculares anteriores). En los embriones más evolucionados de este grupo no encontramos diferencias con los controles y vehículos del mismo tiempo de incubación.

Los embriones controles (C60) se encontraban en los estadios H.H. 18 y 19, los vehículos (V60) en los estadios H.H. 17, 18 y 19, mientras que aquellos que estuvieron bajo la influencia del etanol (T60) se encasillaron entre los estadios H.H. 13, a H.H. 17. El porcentaje de embriones, de entre los expuestos al etanol, que estaban atrasados en el desarrollo fue del 60% (tabla 6). Por tanto, el etanol retrasaba de manera

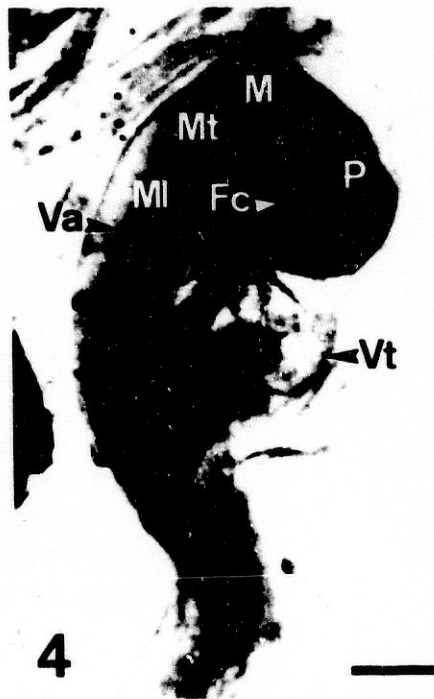
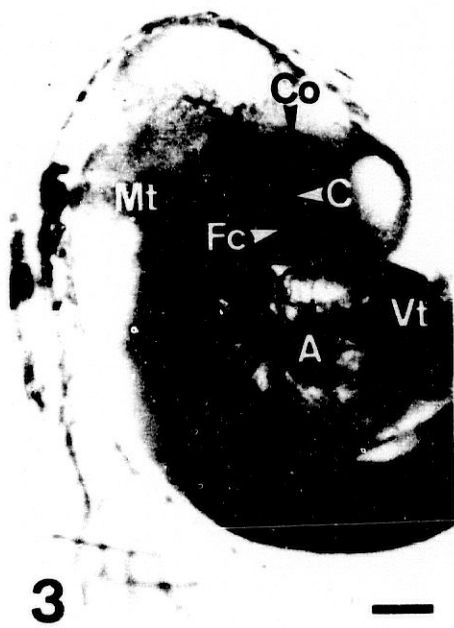
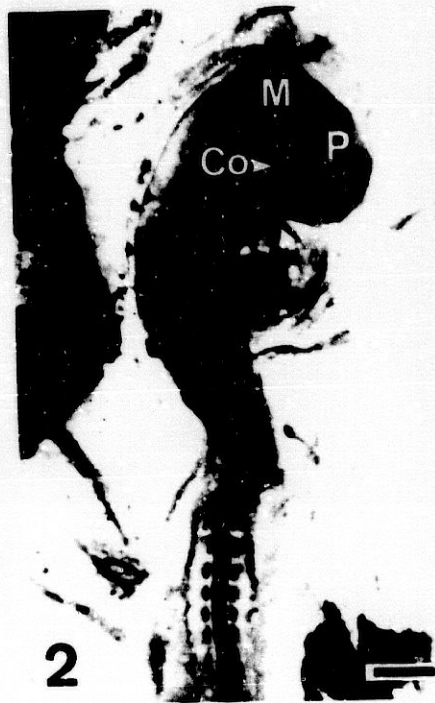
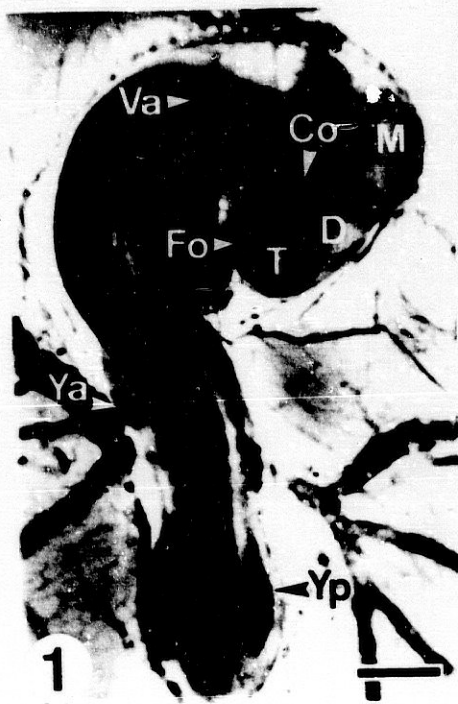
Lámina IV.- Microfotografías de embriones de 60 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embriones controles (H.H. 18). Se puede ver que la curvatura forma un ángulo recto entre el eje de la médula (a nivel cervical) y el eje del tronco posterior. Los primordios de los miembros continúan desarrollándose, siendo ligeramente mayores las yemas apendiculares posteriores (Yp) que las anteriores (Ya). En la porción cefálica del tubo neural observamos la división del prosencéfalo en telencéfalo (T) y diencéfalo (D). Los ojos no están pigmentados, aunque el cristalino ya está formado (C).

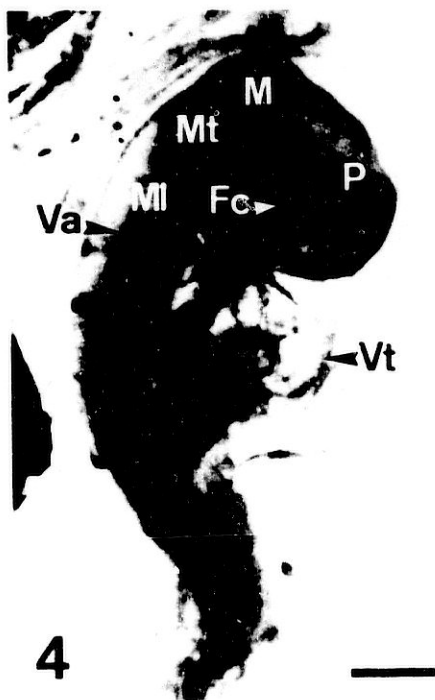
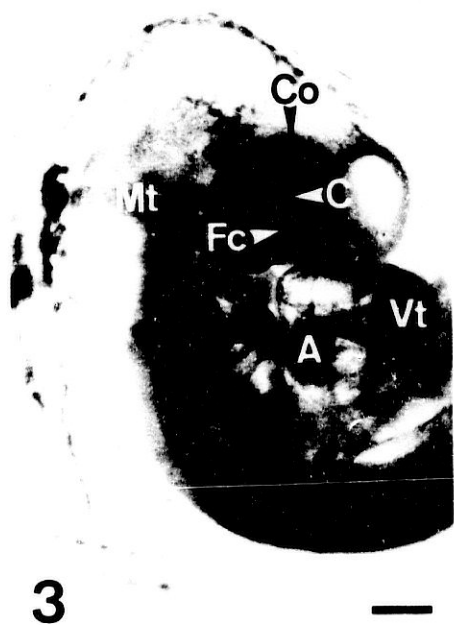
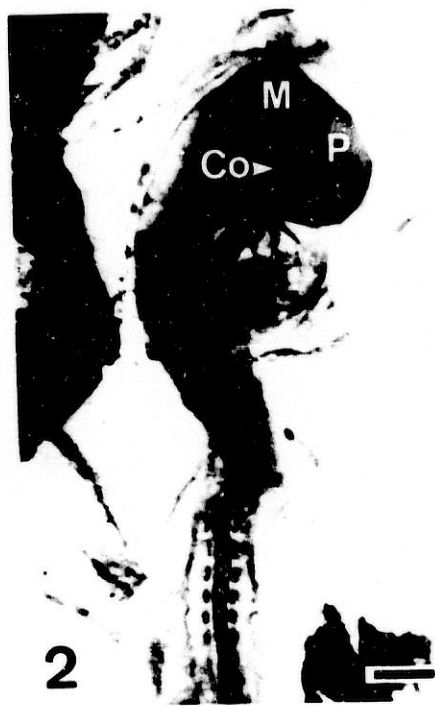
Figuras 2 y 4.- Embriones tratados (H.H. 15). En relación con los controles, se observa que aparecen menos encorvados. El tubo nervioso se muestra menos desarrollado. Está comenzando la subdivisión del prosencéfalo (P) en diencéfalo y telencéfalo, y del rombencéfalo en metencéfalo (Mt) y mielencéfalo (MI). En la cúpula óptica (Co) aún se observa la fisura coroidea (Fc).

A: aurícula, **Fc:** fisura coroidea, **Fo:** fosita olfatoria, **Vt:** ventrículo, **Va:** vesícula auditiva.

Figura 1: barra = 1000 μm ; figuras 2, 3 y 4: barra = 500 μm .



LAMINA IV
52



LAMINA IV

significativa el desarrollo de los embriones, llegando en algunos a 24 horas de retraso, tanto en relación con los controles como con los vehículos, en este momento del estudio (tabla 7).

Los embriones de los grupos controles y vehículos de 72 h.i. presentaban una flexión cervical aún más acentuada, habiéndose completado la rotación. Las yemas apendiculares eran más grandes, simétricas las anteriores y asimétricas las posteriores, que ya no ocultan a la vesícula alantoentérica (muy crecida en esta fase). El tubo nervioso se encontraba en fase de 5 vesículas bien delimitadas. Los ojos, que ya presentaban una pigmentación gris, estaban bien desarrollados, y la fisura coroidea ya no era evidente macroscópicamente (lámina V, figuras 1 y 3).

Los embriones expuestos al etanol, de 72 h.i., mostraron distintos grados de desarrollo. En algunos, los más atrasados, la rotación se extendía a los pares de somitos 14-15 (que son difíciles de contar en estos embriones), las yemas apendiculares anteriores empujaban hacia fuera del blastodermo, por envolvimiento del pliegue corporal lateral, no se habían pigmentado los ojos y la fisura coroidea se observaba claramente (lámina V, figuras 2 y 4). Otros embriones (T72), mostraron los primordios de los miembros más crecidos, siendo ligeramente mayores las yemas apendiculares posteriores (la alantoides se encontraba oculta por éstas, siendo aún pequeña), que las yemas apendiculares anteriores. Con respecto a la curvatura de los embriones, en la flexión cervical se formó un ángulo recto entre el eje de la médula y el eje del tronco posterior y la rotación se extiende a la parte posterior del cuerpo. Los ojos no estaban aún pigmentados, estando ya el cristalino formado. No existían diferencias entre los embriones más evolucionados de este grupo (T72) y aquellos de los grupos controles del mismo período.

Los embriones controles (C72 y V72) estaban en los estadios H.H. 19 y 20, mientras que los tratados (T72) los clasificamos en los estadios H.H. 14, 16, 17, 18, 19 y 20. El porcentaje de embriones expuestos al etanol, que están claramente retrasados en el desarrollo con respecto a los de los grupos controles fue del 50% (tabla 6). Así, el etanol retrasó de manera significativa el desarrollo de los embriones, con respecto a los grupos a los que no se les administró el tóxico (tabla 7). De igual manera, el retraso fue desigual dentro del grupo.

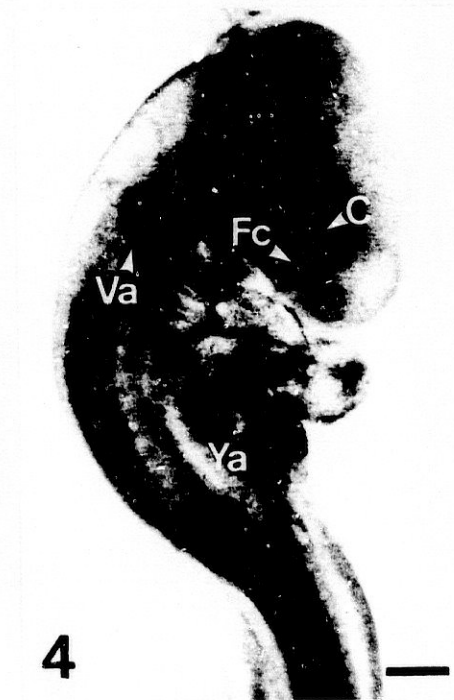
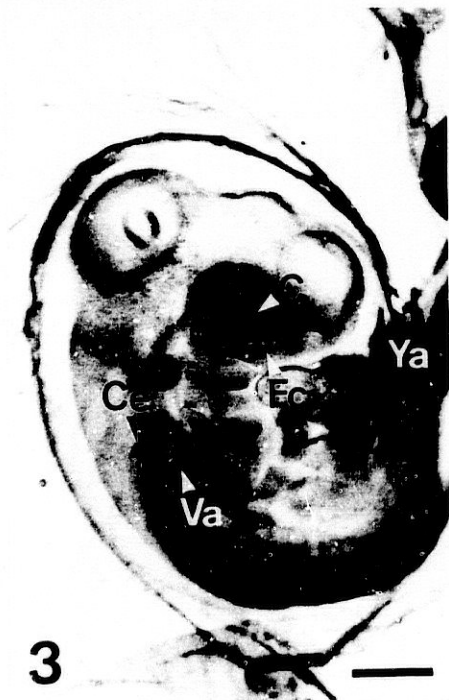
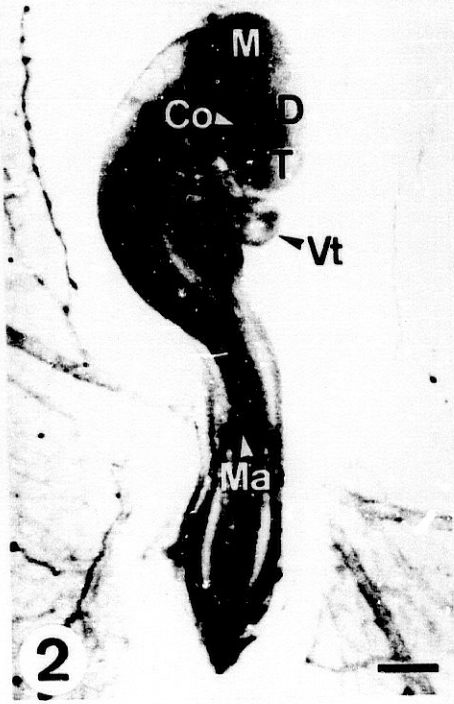
Lámina V.- Microfotografías de embriones de 72 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embrión control (H.H. 20). Se advierte cómo la flexión cervical está muy acentuada y la rotación se ha completado. Las yemas apendiculares son más grandes (Ya y Yp). Las cinco divisiones principales del tubo nervioso están bien delimitadas y las vesículas telencefálicas (T) se están invaginando para formar las paredes laterales del diencéfalo. La pigmentación de los ojos (O) es evidente, así como el cristalino. La fisura coroidea (Fc) apenas es visible. Destaca el gran crecimiento del alantoides (Al).

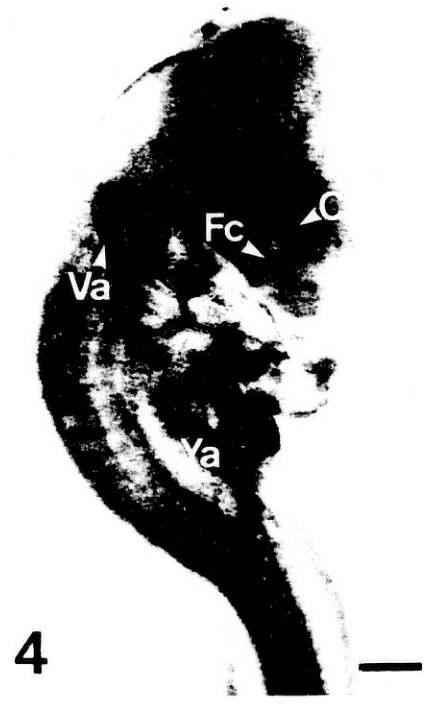
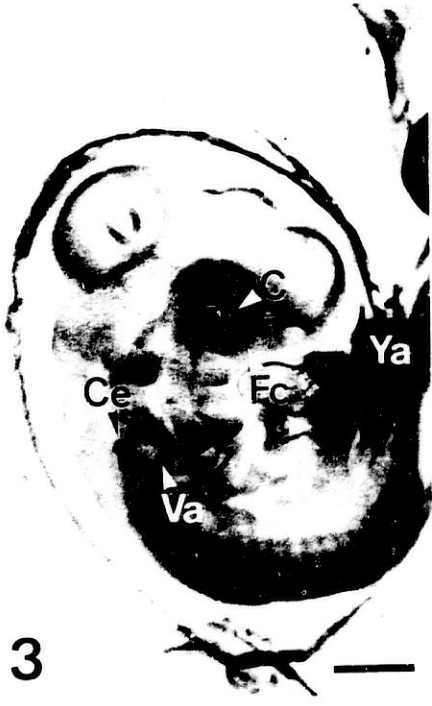
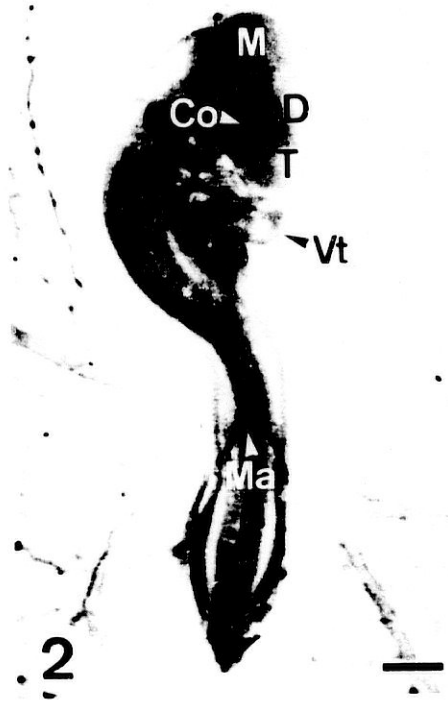
Figuras 2 y 4.- Embrión tratado (H.H. 16). El embrión se muestra bastante menos encorvado, y la rotación se extiende solo hasta los somitos 14-15. Las yemas apendiculares anteriores, las primeras en aparecer, son más pequeñas. Las vesículas telencefálicas están menos desarrolladas, así como las cúpulas ópticas, donde se observa claramente la fisura coroidea. El ojo está sin pigmentar.

C: cristalino, **Ce:** conducto endolinfático, **D:** diencéfalo, **Fc:** fisura coroidea, **Ma:** margen del amnios, **Va:** vesícula auditiva, **Vt:** ventrículo, **Ya:** yema apendicular anterior, **Yp:** yema apendicular posterior.

Figuras 1, 2 y 3, barra = 1000 μ m; figura 4, barra = 500 μ m.



LAMINA V



LAMINA V

Por último, examinamos los embriones de 84 h.i.. Los controles y vehículos, que no presentaron diferencias entre ellos, mostraron como principales diferencias morfológicas externas con los embriones controles de 72 h.i., unos miembros mayores (que llegaban a tener la misma longitud que espesor), un alantoides voluminoso y una mayor pigmentación en los ojos (lámina VI, figuras 1 y 3).

Entre los embriones tratados con etanol (T84) había diferencias de desarrollo. En los más atrasados de este grupo (T84), las yemas apendiculares posteriores eran ligeramente mayores que las yemas apendiculares anteriores. La flexión cervical formó un ángulo recto entre el eje de la médula y el eje del tronco posterior y la rotación se extiende a la parte posterior del cuerpo. Los ojos no estaban aún pigmentados, el cristalino ya estaba formado, y la fisura coroidea aún era grande (lámina VI, figuras 2 y 4). En los más evolucionados (T84) las yemas apendiculares anteriores, como las posteriores, eran asimétricas y su eje próximo-distal se dirigía en sentido caudal. El alantoides llegaba a la cabeza y la pigmentación del ojo era débil.

Atendiendo a su desarrollo, los embriones controles (C84 y V84), se encasillaron en los estadios H.H. 21, 22 y 23, mientras que los tratados (T84) en los estadios H.H. 17, 18, 19, y 20. El porcentaje de embriones expuestos al etanol, que estaban claramente retrasados en el desarrollo con respecto a los de los grupos controles fue del 60% (tabla 6). De manera análoga a lo encontrado anteriormente, los datos muestran que el etanol es capaz de inducir un retraso en el desarrollo, altamente significativo, en comparación tanto con los controles, como con los vehículos (tabla 7); este retraso no se produce en todos los expuestos al etanol, ni con la misma intensidad.

En el gráfico 4 (pág. 60), se representan los resultados anteriores. Como puede verse en dicho gráfico, la evolución del desarrollo medio de los embriones controles y vehículos se superpone en todo el período analizado. Sin embargo, el desarrollo medio de los embriones expuestos al etanol se sitúa siempre por debajo del desarrollo de los otros dos grupos, y a una distancia similar durante todo el estudio. Es importante destacar, además, que las proporciones de los embriones atrasados dentro del grupo de tratados (no todos los embriones se afectan por igual, como ya se ha expuesto) se mantiene prácticamente igual en todo el período estudiado (tabla 6).

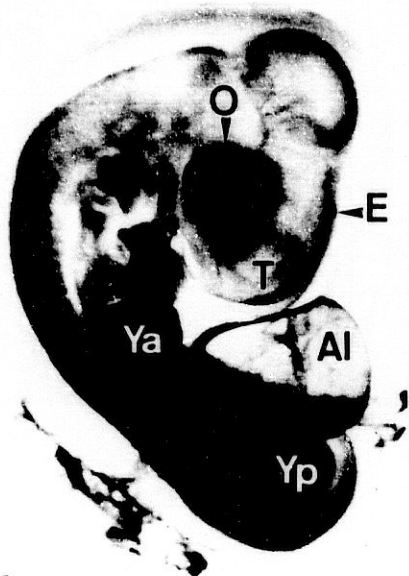
Lámina VI.- Microfotografías de embriones de 84 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embrión control (H.H. 22). Se observa cómo han crecido ambas yemas apendiculares, llegando a tener la misma longitud que espesor. El alantoides (AI) es voluminoso. Los ojos (O) presentan una pigmentación mayor, un cristalino (C) bien delimitado y la práctica desaparición de la fisura coroidea.

Figuras 2 y 4.- Embrión tratado (H.H. 18). Se aprecia que la flexión cervical es menor que en los controles de la misma edad. Las yemas apendiculares posteriores son ligeramente mayores que las yemas apendiculares anteriores. Los ojos no están aún pigmentados y todavía se distingue la fisura coroidea.

E: epífisis, **Fc:** fisura coroidea, **M:** mesencéfalo, **T:** telencéfalo, **Ya:** yema apendicular anterior, **Yp:** yema apendicular posterior.

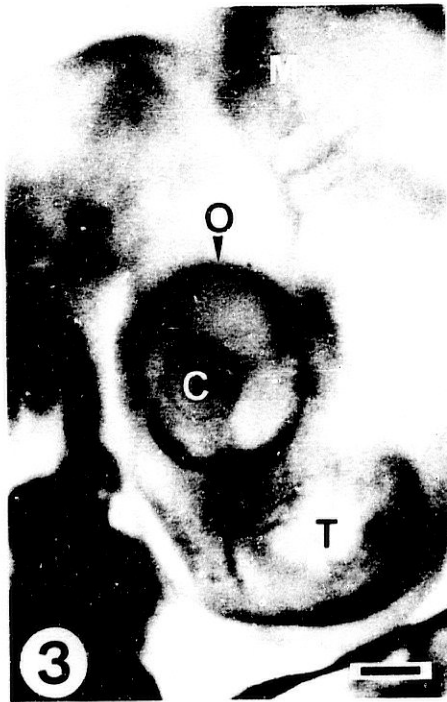
Figuras 1 y 2, barra = 1000 μm ; figuras 3 y 4, barra = 500 μm .



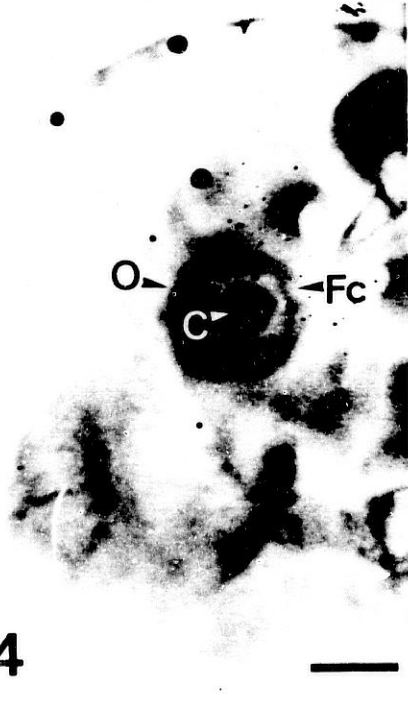
1



2

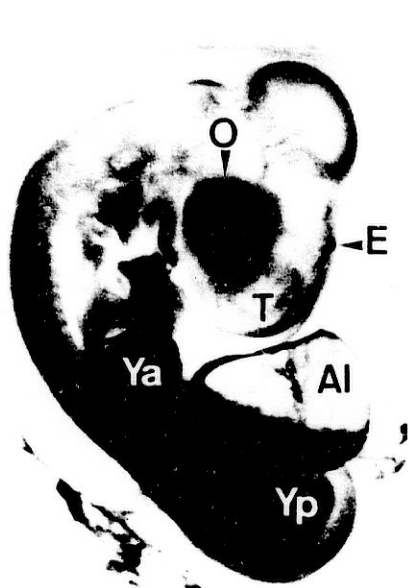


3



4

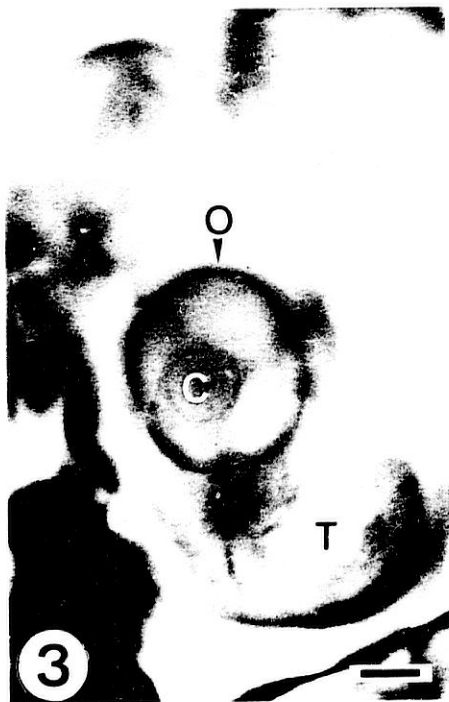
LAMINA VI



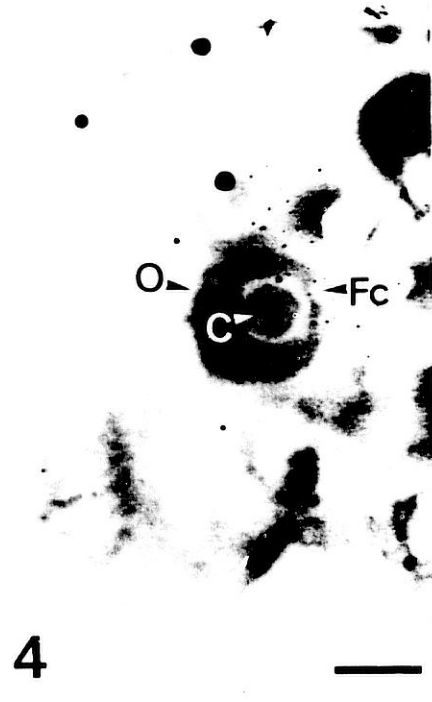
1



2



3



4

LAMINA VI

III. 3.- Efectos sobre el desarrollo ontogénico ocular

III. 3. 1.- Estudio del retraso en el desarrollo ocular

Una primera aproximación para estudiar el efecto de la exposición al etanol en el desarrollo ocular se hizo determinando el grado de atraso en el desarrollo de los ojos de los embriones expuestos, en relación con los controles. El desarrollo del tubo nervioso y las características de las vesículas ópticas nos sirvieron para catalogar los embriones de la primera extracción (E40). En las siguientes extracciones (E64, E90, E114 y E137) nos basamos en los trabajos de O'Rahilly, R. y Meyer, D.B. (1959), para clasificar los primordios oculares en estadios de Hamburger y Hamilton.

En cada una de las extracciones, los ojos de los embriones controles presentaron una evolución homogénea, mientras que, los embriones expuestos al etanol manifestaron una gran dispersión. A las 40 y 64 h.i., el retraso medio de desarrollo ocular de los embriones tratados estaba comprendido entre 2 y 3 estadios,

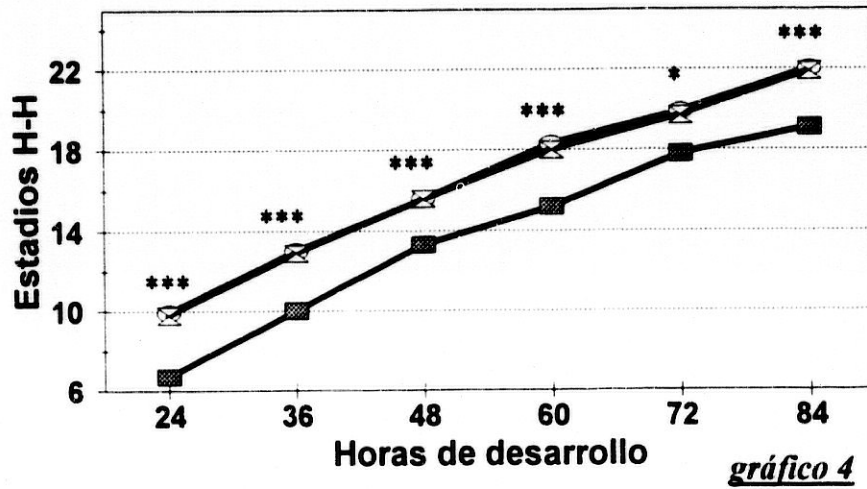
Tabla 8
Evolución del desarrollo de los ojos

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad de las diferencias
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
40	5	11,0 \pm 0,7	6	8,6 \pm 1,1	p \leq 0,05
64	6	16,8 \pm 0,4	6	14,7 \pm 1,1	p \leq 0,05
90	6	22,0 \pm 0,8	7	18,0 \pm 2,6	p \leq 0,01
114	8	28,0 \pm 0,6	4	24,1 \pm 1,9	p \leq 0,001
137	4	29,5 \pm 0,4	5	27,4 \pm 1,1	p \leq 0,01

Valores en estadios de Hamburger y Hamilton

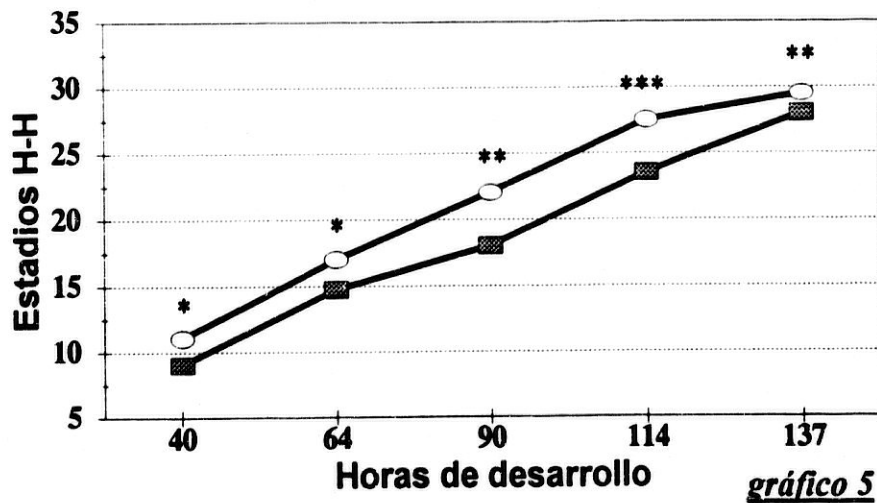
lo que representa un retraso aproximado entre 12 y 14 horas. En la 3ª y 4ª extracción (E90 y E114), el desarrollo de los ojos pertenecientes al grupo de los tratados, se retrasó alrededor de 4 estadios en relación con los controles, lo que significa un retraso cronológico medio de unas 16 horas. Por último, a las 137 h.i., el retraso medio del desarrollo ocular de los embriones tratados estaba comprendido entre 2 y 3 estadios, lo que en tiempo corresponde a 15 horas aproximadamente. El análisis estadístico de los resultados nos mostró que los globos oculares de los embriones

Desarrollo ontogénico embrionario



○ controles ◻ vehículos ◼ tratados

Desarrollo ontogénico ocular



expuestos a la acción del etanol estaban significativamente más atrasados que aquellos de los controles, durante todo el período estudiado. Estos resultados se recogen en la tabla 8, expresados como valores promedio \pm la desviación estándar.

El desarrollo ontogénico ocular, medido según su estadio de Hamburger y Hamilton, se ha representado en el gráfico 5, en el cual se pone de relieve cómo el retraso medio de los ojos tratados se mantiene durante todo el período investigado.

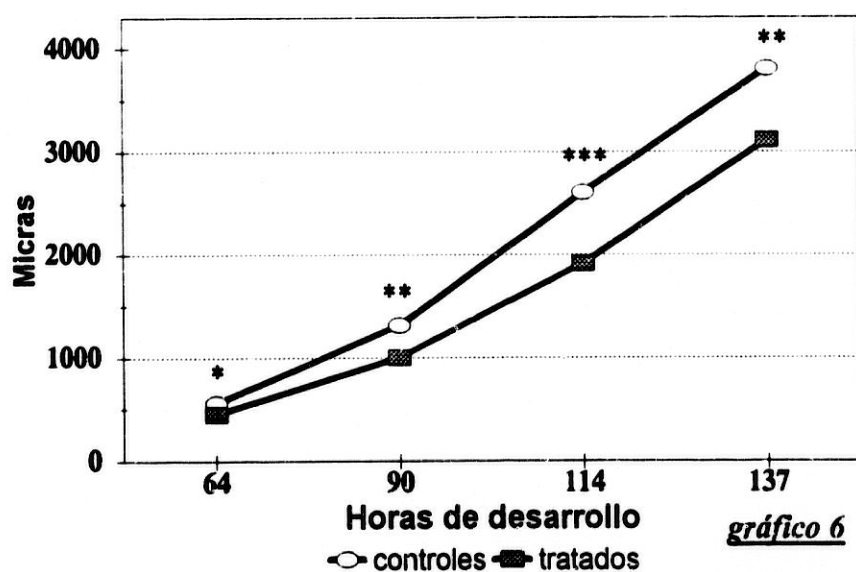
III. 3. 2.- Estudio del retraso en el crecimiento del globo ocular

El diámetro mayor del ojo es un buen índice del tamaño ocular (tabla 9, gráfico 6).

Tabla 9
Evolución del diámetro mayor del ojo (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	6	560,2 \pm 54,3	6	448,6 \pm 107,8	$p \leq 0,05$
90	6	1313,8 \pm 85,0	7	1000,2 \pm 199,3	$p \leq 0,01$
114	8	2603,5 \pm 202,9	4	1914,6 \pm 342,1	$p \leq 0,001$
137	4	3804,2 \pm 74,1	5	3113,3 \pm 285,7	$p \leq 0,01$

Diámetro mayor del ojo



Los valores obtenidos del diámetro mayor del ojo de los embriones expuestos al etanol fueron significativamente inferiores a los obtenidos en el grupo de embriones controles, en todas las etapas analizadas. Estas diferencias entre diámetros aumentan conforme avanzamos en el desarrollo.

Existía por tanto un efecto depresor en el crecimiento del globo ocular inducido por el etanol que se mantuvo durante todo el estudio, en plena fase proliferativa, cuando más rápidamente crece el tamaño ocular.

III. 3. 3.- Análisis estructural

III. 3. 3. 1.- La retina

La retina está formada por dos capas, la externa o epitelio pigmentario y la interna o capa sensorial. La última contiene varios estratos de células del mismo tipo que las encontradas en otras partes del cerebro, del cual la retina es una parte integrante.

Directamente sobre la capa pigmentada (1) están los conos y bastones (2), los cuales son neuronas especializadas y los receptores sensoriales del ojo. Porciones de estas células se proyectan más allá de la membrana limitante externa (3) de la retina sensorial, extendiéndose dentro de la capa pigmentaria. Dirigiéndonos hacia el humor vítreo nos iremos encontrando el resto de estratos: la capa nuclear externa (4), la capa reticular externa (5), la capa nuclear interna (6), la capa reticular interna (7), la capa de células ganglionares (8), la capa de fibras del nervio óptico (9) y la membrana limitante interna (10).

Las capas nucleares se componen de los cuerpos celulares de las neuronas, mientras las capas reticulares de fibras de las anteriores y sus conexiones sinápticas. Las únicas fibras que saldrán de la retina (las cuales son los axones de las células ganglionares) constituirán el nervio óptico. Los elementos nerviosos de la retina se soportan por células las de Müller y elementos de la neuroglía.

En las Aves, la retina es considerablemente más gruesa que en otras muchas especies, los elementos retinianos son finos y estrechamente dispuestos y los estratos de la capa sensorial están más claramente definidos que en otros Vertebrados.

La primera indicación morfológica de la formación del ojo (y de la retina) es un

desembolsamiento de la pared del diencéfalo. Estas depresiones bilaterales tempranas, los surcos ópticos, constituyen unas concavidades de poca profundidad que más adelante formarán las vesículas ópticas primarias. Es difícil identificar la localización donde aparecerán definitivamente las vesículas ópticas. Será en el estadio H.H. 9 cuando se reconozcan definitivamente. Al ir creciendo estas evaginaciones se irán formando los tallos ópticos vacíos, a través de los cuales se comunican con el cerebro; la porción distal formará la vesícula óptica, también hueca. La pared lateral o externa de cada vesícula se invagina, y oblitera la cavidad previamente formada. Tendremos entonces formada la cúpula óptica con doble pared (o vesícula óptica secundaria) que es la retina primitiva. Una vez formada la cúpula óptica, sus paredes interna y externa seguirán distintas vías de diferenciación. La pared externa se torna más delgada, pigmentándose más adelante, y dando lugar a la capa pigmentaria de la retina, en tanto que la pared interna se irá haciendo más gruesa, diferenciándose sus células en elementos neuronales, será la capa neural (sensorial) de la retina.

En los embriones de 40 horas de desarrollo (E40), analizamos y comparamos las vesículas ópticas, así como los diámetros transversales y dorsoventral, y la luz del prosencéfalo, a nivel de éstas. Los dos diámetros embrionarios medidos fueron mayores en los controles, al igual que la luz del prosencéfalo (tabla 10, gráficos 7y 8).

Tabla 10

Acción del etanol sobre el desarrollo embrionario y de la vesícula óptica (E40)

	Controles		Tratados		Signif.
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
Diámetro transversal	4	1057,5 \pm 83,8	4	817,7 \pm 119,4	p \leq 0,01
Diámetro dorsoventral	4	660 \pm 121,1	4	505 \pm 136,3	
Diámetro int. prosencéfalo	4	500 \pm 102,9	4	305 \pm 157,2	
Espesor epitelio V. O.	4	46 \pm 8,3	4	79,5 \pm 20,9	p \leq 0,05
Espesor ectodermo	4	20 \pm 1,6	4	17,3 \pm 5,7	
Rel. Ep. V. O. / Ect.	4	2,3 \pm 0,5	4	4,7 \pm 0,6	p \leq 0,01

Valores en micras

Embrión de 40 horas

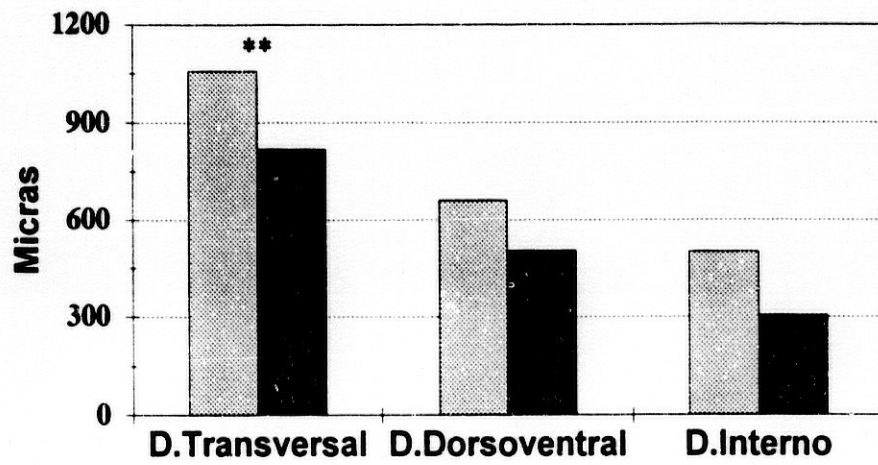


gráfico 7

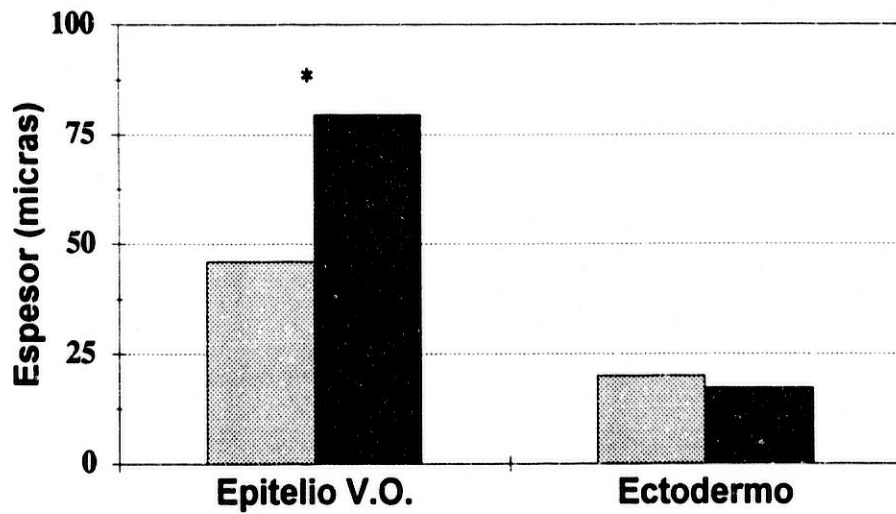


gráfico 8

■ controles ■ tratados

Los embriones controles de 40 h.i., que anteriormente encasillamos en el estadio H.H. 11, mostraron unas vesículas ópticas que eran muy semejantes entre sí y con un volumen mayor que aquellas de los embriones tratados. La pared de la vesícula óptica, similar en estructura al pliegue neural, contenía 4-5 capas nucleares y muchos de los núcleos presentaban 2 nucléolos prominentes eosinofílicos. La cavidad (ventrículo óptico) de la vesícula óptica era de mayor tamaño que la de los embriones tratados, adecuándose a la expansión lateral de sus paredes, lo cual facilitó que la vesícula óptica se mantuviera en contacto lateralmente con la superficie del ectodermo, apareciendo ligeramente engrosada en sus porciones laterales (inducción de segundo grado). Cada vesícula óptica presentaba un pedículo, que aparecía relativamente constreñido en su base. Existía una clara profusión de mitosis adyacentes a la luz de la vesícula (lámina VII, figuras 1 y 3).

Las vesículas ópticas de los embriones expuestos al etanol las hallamos menos diferenciadas, ya que pertenecían a embriones en estadios H.H. 9, 10 y 11. No todas las vesículas ópticas estaban en el mismo grado de desarrollo, ya que no todas se afectaron por igual ante la exposición al etanol. En algunos embriones incluso no estaban formadas como tales, y el volumen del ventrículo óptico era muy pequeño, debiéndose hablar entonces de surcos ópticos (lámina VII, figura 2). Al estar poco expandidas sus paredes, éstas aparecían engrosadas en las secciones transversales, con 6-7 capas de núcleos y mitosis en la capa contigua a la luz del prosencéfalo. No eran observables los pedículos ópticos, por no estar aún constreñidas las vesículas. El ectodermo que rodeaba la vesícula óptica no estaba engrosado y solo se observaba en contacto con ella en su mitad dorsal (lámina VII, figuras 2 y 4).

En la tabla 10, gráfico 8, se muestra cómo el espesor del epitelio de la vesícula óptica de los embriones controles de 40 h.i. fue menor que en los tratados del mismo tiempo de incubación.

Una vez formada la retina primitiva (desde la 2ª extracción, 64 h.i., excepto en algunos embriones del grupo de los tratados de esta fase, que aún se encontraban en fase de vesícula óptica) observamos que las dimensiones eran muy distintas, tanto el espesor total como el de las capas que lo componen: la capa sensorial y el Epitelio pigmentario.

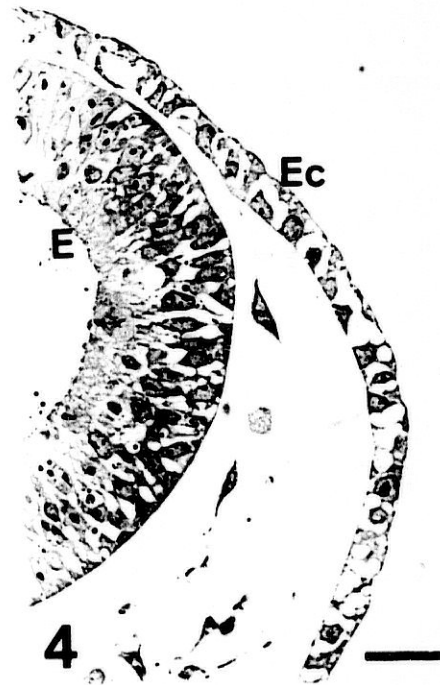
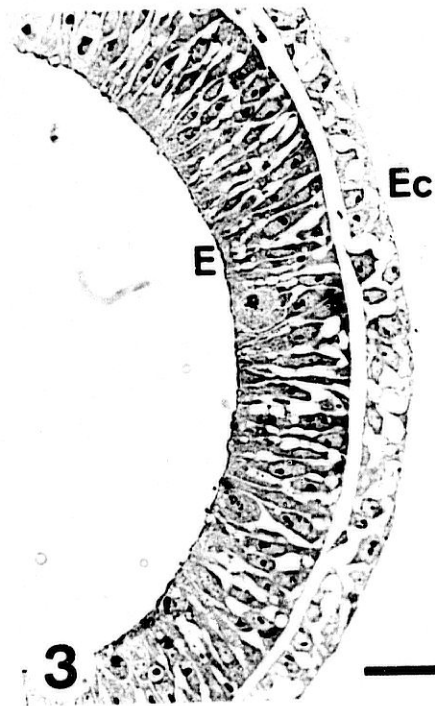
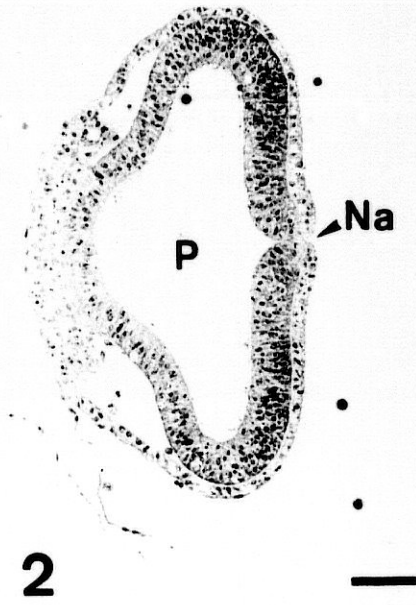
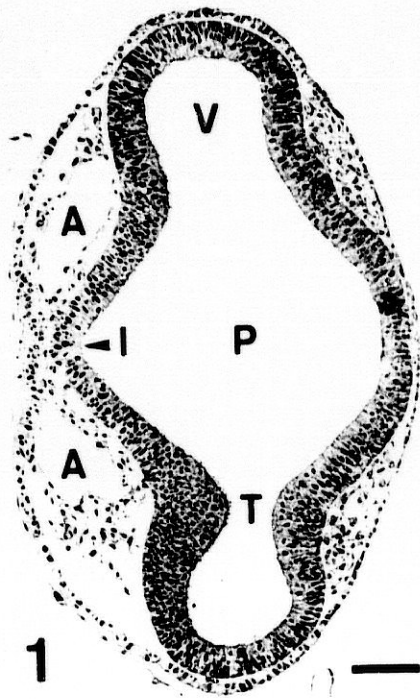
Lámina VII.- Microfotografías de secciones transversales de embriones de 40 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embrión control (estadio H.H. 11). Se muestran cortes transversales a la altura del prosencéfalo (P) y las vesículas ópticas (V), formadas por el epitelio y el ventrículo. Las vesículas ópticas están expandidas lateralmente y relativamente constreñidas en sus bases, lo que indica el comienzo de la formación del tallo óptico (T). El ectodermo que las rodea está apositado sobre ellas. En la figura 3, observamos como el epitelio de la vesícula óptica está formado por células similares a las que componen el tubo neural. La superficie ectodérmica aparece ligeramente engrosada, para transformarse en ectodermo cristaliniario. El espacio entre ambos epitelios es muy pequeño.

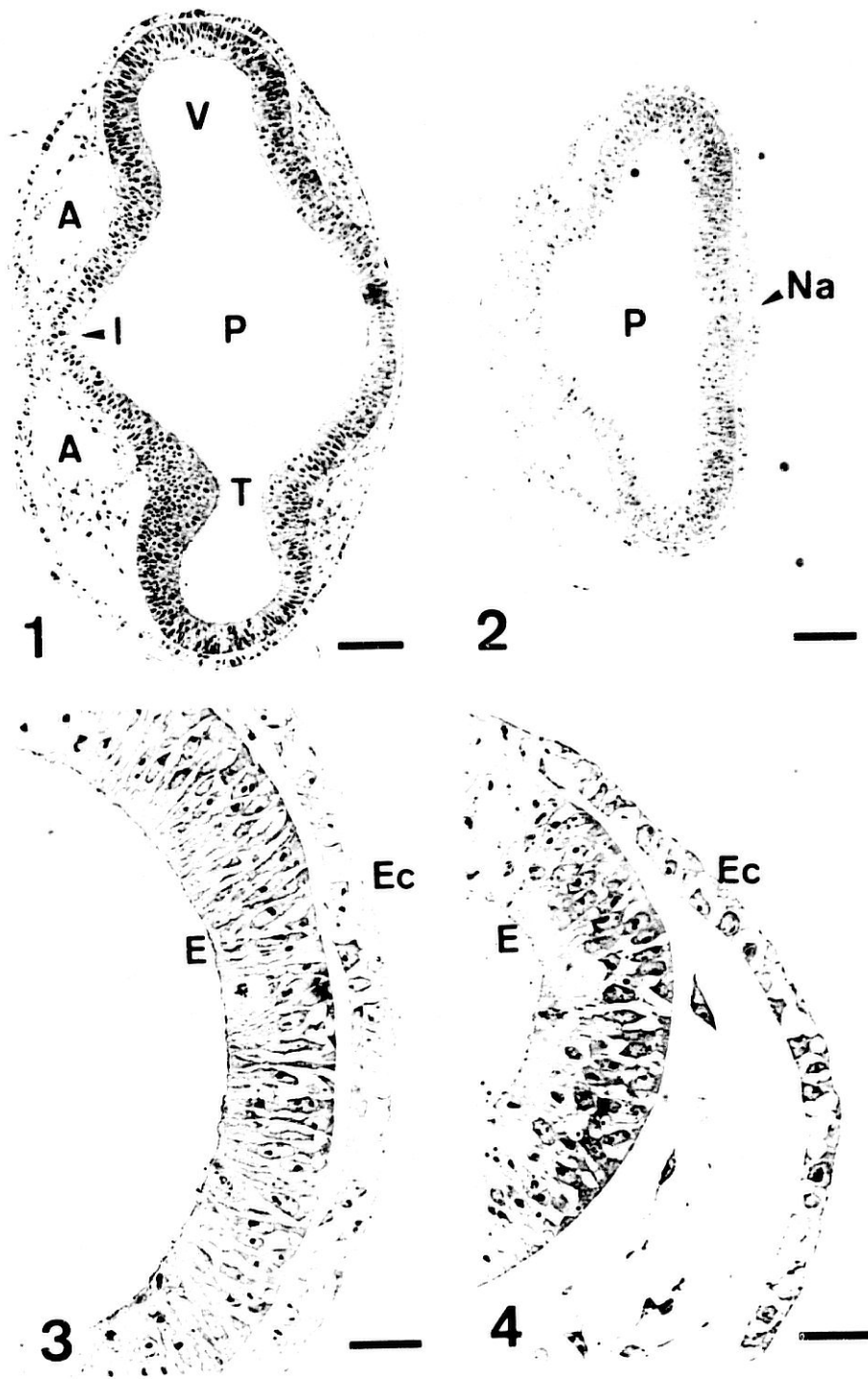
Figuras 2 y 4.- Embriones tratados con etanol (estadio H.H. 9). El prosencéfalo (P) es mucho más pequeño que el control. Se observa cómo las vesículas ópticas, poco desarrolladas, están comenzando a emerger lateralmente. El neuroporo anterior (Na) todavía es visible. En la figura 4, el epitelio (E) aparece engrosado, como consecuencia de la poca expansión de la vesícula óptica. El ectodermo (Ec) no está engrosado y está solo parcialmente apositado sobre el epitelio, por lo que el espacio entre ambos es grande.

A: aorta dorsal, I: *infundibulum*.

Figuras 1 y 2, barra = 100 μ m; figuras 3 y 4, barra = 30 μ m.



LAMINA VII



LAMINA VII

El análisis del espesor de estas capas desde el momento de su formación, nos pareció de sumo interés por estar directamente relacionado con los procesos de proliferación y diferenciación celular de la retina. Del mismo modo, también calculamos la relación entre ambas (espesor de la retina sensorial / espesor del E. pigmentario) pues, durante el desarrollo, una capa aumenta su espesor mientras que la otra lo disminuye y, por tanto, la relación será una buena medida de la diferenciación retiniana, que nos servirá para indagar los posibles efectos del etanol sobre esta parte del ojo.

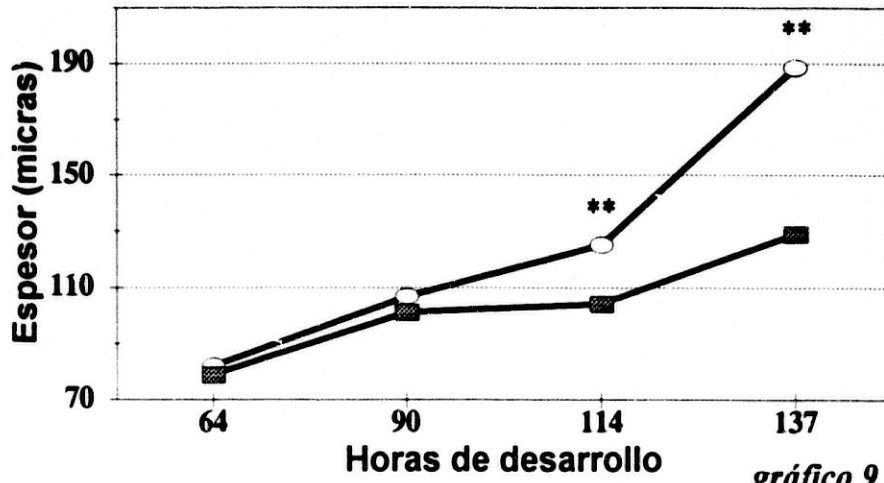
Como es normal, el espesor y la superficie de la retina fue aumentando conforme avanzaba el desarrollo embrionario, tanto en los controles como en los tratados con etanol. Las diferencias entre ambos grupos en estudio fueron pequeñas en la primera mitad del período analizado, aumentando posteriormente (tabla 11, gráfico 9). La similitud del espesor de la retina de controles y tratados, en las primeras fases del estudio, no se debe a su semejanza estructural, sino al diferente comportamiento de las capas que la componen. Las diferencias de espesor en la segunda mitad del período analizado se explican como consecuencia del mayor crecimiento de la capa neurosensorial.

Tabla 11
Evolución del espesor de la Retina (μ)

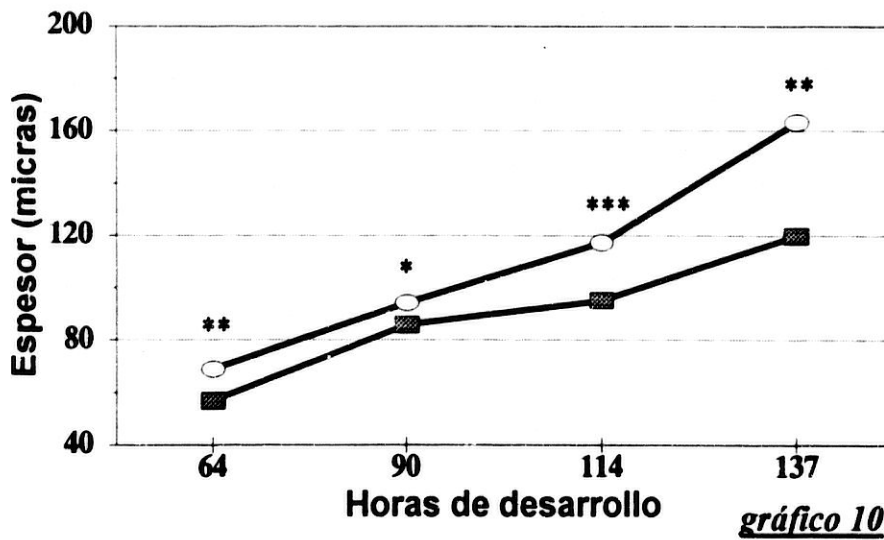
HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	4	81,9 \pm 9,2	4	78,7 \pm 13,3	
90	6	106,7 \pm 3,7	7	100,9 \pm 10,8	
114	8	125 \pm 6,8	4	104 \pm 6,5	p \leq 0,01
137	4	188,6 \pm 21,2	5	128,9 \pm 4,7	p \leq 0,01

A lo largo de todo el estudio, el espesor de la retina neurosensorial (medido en su zona central o *fundus*) de los ojos pertenecientes a los embriones del grupo tratados, fue menor en comparación con los controles (tabla 12, gráfico 10). También pudimos observar cómo la diferencia entre controles y tratados aumentaba a lo largo del período de desarrollo estudiado, lo que sugiere que el etanol frenó el crecimiento

Retina



Retina neurosensorial



○ controles ■ tratados

de la retina, posiblemente disminuyendo su capacidad proliferativa.

Tabla 12
Evolución del espesor de la retina neurosensorial (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	4	68,7 \pm 4,6	4	56,5 \pm 3,02	$p \leq 0,01$
90	6	94,06 \pm 5,8	7	85,6 \pm 6,7	$p \leq 0,05$
114	8	117,1 \pm 7,2	4	94,9 \pm 9,8	$p \leq 0,001$
137	4	183,1 \pm 19,2	5	119,6 \pm 18,7	$p \leq 0,01$

Tanto en los embriones controles como en los tratados, el espesor del epitelio pigmentario (medido, como anteriormente se expuso, en el *fundus*), fue menor que el de la capa interna, incluso en los primeros estadios, y fue disminuyendo conforme avanzaba el desarrollo. Entre los 4-5 días de incubación se produjo un marcado descenso de la actividad mitótica, coincidiendo con la aparición de los gránulos de melanina en el epitelio pigmentario, confirmando descripciones anteriores (Coulombre, A.J., 1955).

A lo largo del desarrollo, y hasta el último momento examinado (E137), el espesor del epitelio pigmentario siempre ha sido mayor en los ojos de los embriones tratados con etanol que en los controles (tabla 13, gráfico 11).

Tabla 13
Evolución del espesor del Epitelio Pigmentario (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	4	13,2 \pm 1,6	5	22,2 \pm 9,2	
90	6	12,7 \pm 0,7	7	15,3 \pm 2,3	$p \leq 0,05$
114	8	7,9 \pm 0,9	4	9,1 \pm 1,8	
137	4	5,5 \pm 0,7	5	9,3 \pm 3,3	

La diferencia entre ambos grupos es grande cuando se está formando la retina,

pero va disminuyendo conforme avanza el desarrollo embrionario. Sin embargo, la pigmentación en los embriones expuestos al etanol se mantiene inferior, no correspondiéndose con su estadio de desarrollo.

Tanto en los embriones controles como en los alcoholizados, la relación entre los espesores de ambas capas de la retina fue aumentando, desde la formación de la cúpula óptica hasta el final de nuestro experimento, debido a que el espesor de la retina sensorial crece, mientras que el de la capa pigmentaria disminuye. Esta relación fue significativamente mayor en los controles a lo largo de todo el período estudiado (tabla 14, gráfico 12), aumentando las diferencias, que llegan a ser el doble en la retina de los embriones estudiados con más edad (C137).

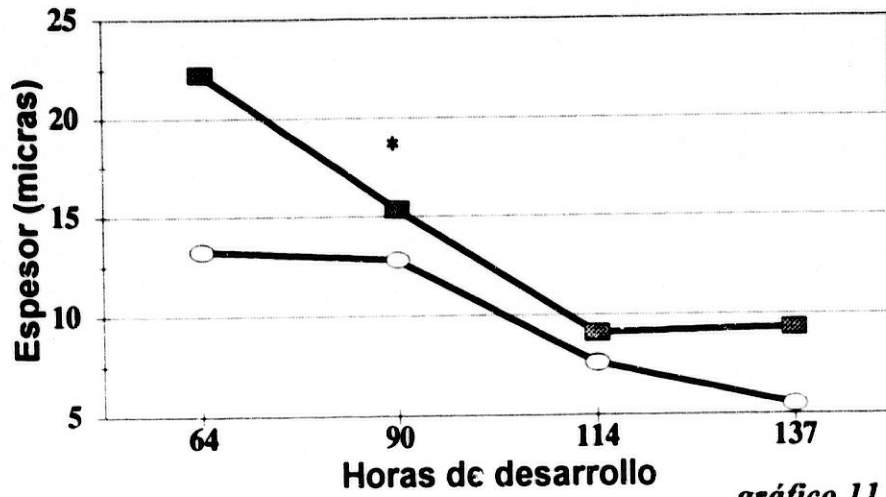
Tabla 14
Evolución de la relación espesor Retina neural / E. Pigmentario

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	4	5,3 \pm 0,8	5	2,9 \pm 1,0	p \leq 0,01
90	6	7,4 \pm 0,5	7	5,7 \pm 1,2	p \leq 0,01
114	8	15,6 \pm 1,6	4	10,9 \pm 3,6	p \leq 0,01
137	4	29,9 \pm 4,6	5	14,6 \pm 6,2	p \leq 0,01

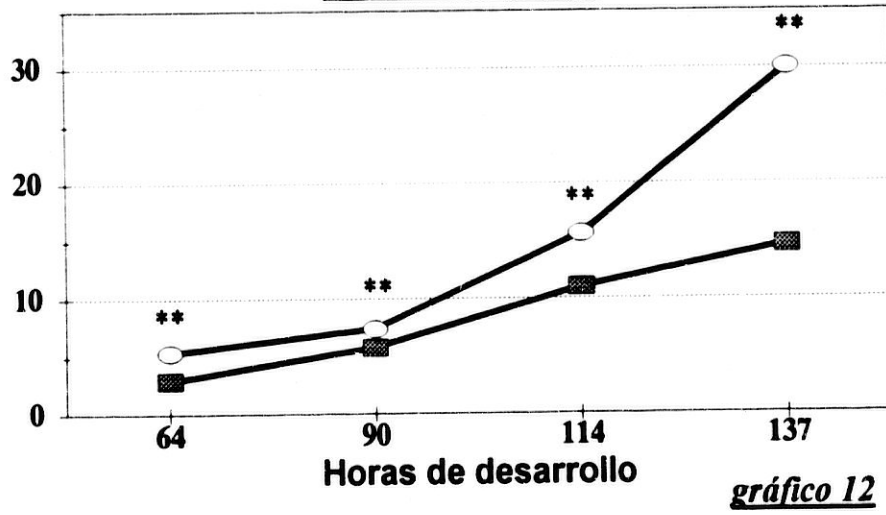
Para tratar de comprender las diferencias encontradas, se analizó pormenorizadamente la evolución de cada una de las partes que forman la retina.

El epitelio pigmentario, en los embriones controles de 64 h.i., era una lámina externa delgada, que permanecía apositada a la capa interna, y contenía 1-2 filas de núcleos. Las células que componían este estrato eran cúbicas y ya se intuía el comienzo de la pigmentación (lámina VIII, figura 3). Los embriones expuestos al etanol de 64 h.i. mostraban un diferente grado de desarrollo (entre el estadio H.H. 14 y el 16). En algunos de ellos, los más atrasados y catalogados en el estadio H.H. 14, la luz de la vesícula óptica primaria todavía era amplia, siendo el epitelio pigmentario muy diferente al observado en los controles (lámina VIII, figuras 2 y 4). Antes de producirse la invaginación de la cúpula óptica, las células del futuro epitelio pigmentario ya eran distintas de aquellas que forman los elementos visuales, al poseer núcleos mayores

Epitelio Pigmentario



Relación Er/Ep



○ controles ■ tratados

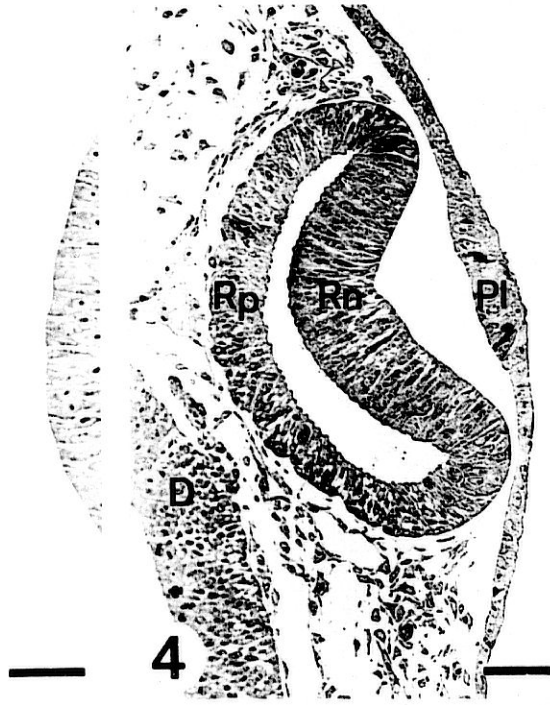
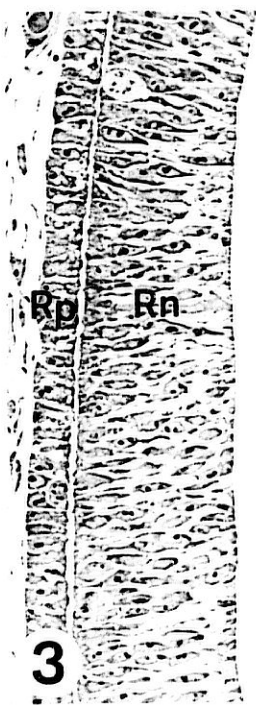
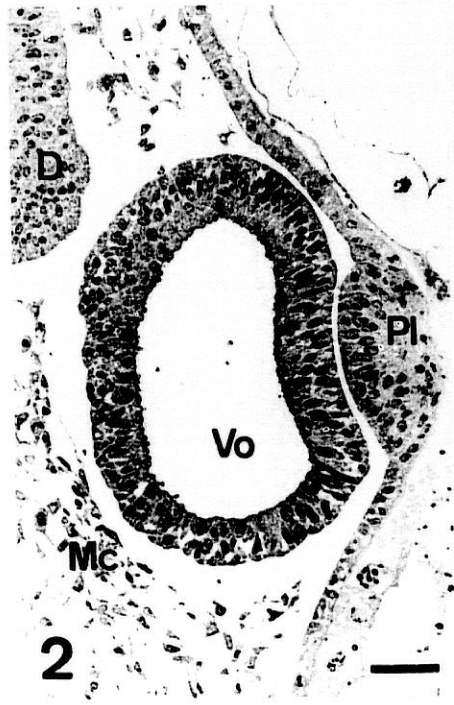
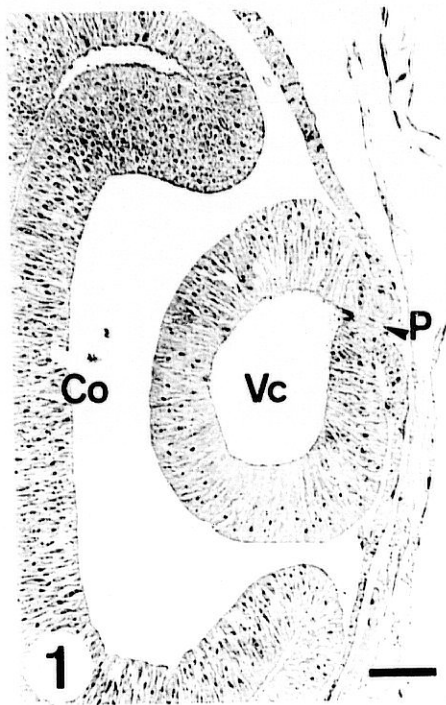
Lámina VIII.- Microfotografías de secciones sagitales de copas ópticas de embriones de 64 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Embrión control (H.H. 17). La cúpula óptica (Co) y la vesícula cristaliniana (Vc) están bien definidas. El cristalino muestra un poro (P) casi cerrado, estando próximo a separarse de la superficie ectodérmica. En la figura 3 se muestra la retina primitiva, que está compuesta de un grueso estrato interno o nervioso, futura retina neural (Rn), y un estrato externo o futura retina pigmentaria (Rp). Ambas capas permanecen apositadas en toda su extensión, excepto en la zona periférica, donde se continúa una con la otra.

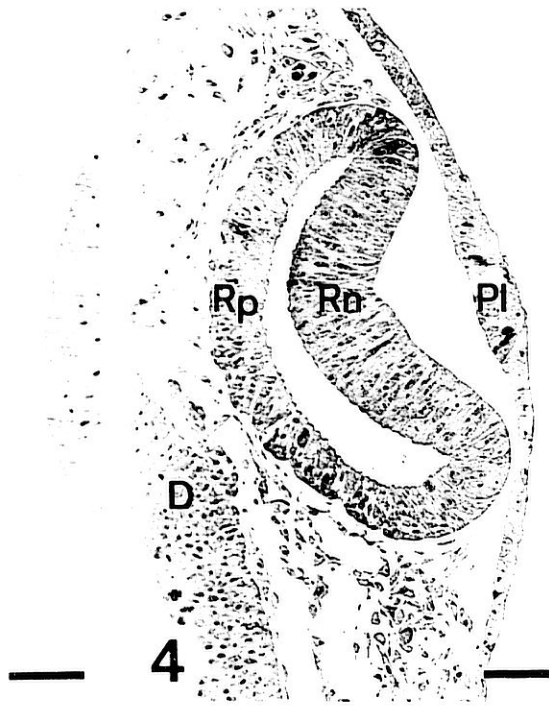
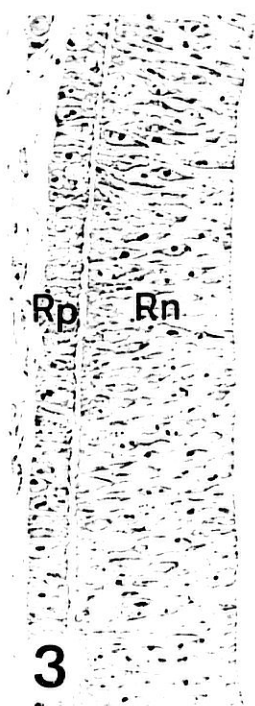
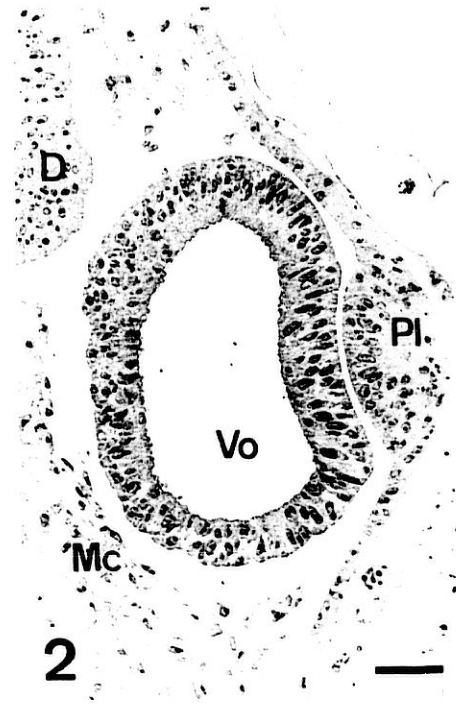
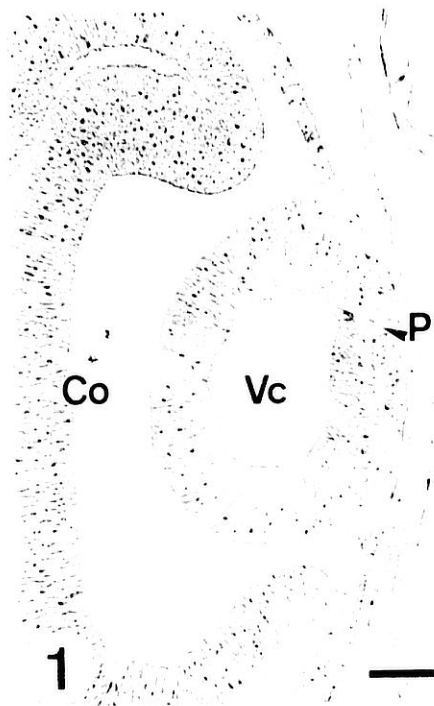
Figuras 2 y 4.- Vesícula y cúpula óptica de embriones tratados. En la figura 2 (H.H. 14), se observa cómo todavía no se ha formado la retina primitiva, pues la vesícula óptica (Vo) está invaginándose. El cristalino todavía se encuentra en fase de placoda (PI), haciendo protrusión sobre la pared lateral de la vesícula. En la figura 4 (H.H. 15), se observa cómo las dos capas que van a formar la retina son ya diferentes, pues la capa interna (Rn) ha engrosado (aunque no muestra un espesor uniforme) y la externa (Rp) ha disminuido. El cristalino aún permanece en fase de placoda (PI).

D: diencéfalo, **Ec:** ectodermo, **Mc:** mesodermo cefálico.

Figuras 1, 2 y 4, barra = 50 μ m; figura 3, barra = 30 μ m.



LAMINA VIII



LAMINA VIII

y menos citoplasma. El epitelio pigmentario adelgazó de forma notoria, pero seguía manteniendo un espesor mayor que el mostrado por los controles. Hay que señalar que las dos capas no estaban apositadas en los embriones de este grupo, variando el tamaño de este espacio intrarretiniano de unos a otros (lámina VIII, figuras 2 y 4).

Una de las características más sobresalientes de la retina en los embriones controles de 90 h.i. es su pigmentación. La capa externa adopta un color marrón difuso, por la presencia de los gránulos de melanina que se disponen, fundamentalmente, en la porción externa de las células (lámina IX, figura 3). Esta capa externa o pigmentada era más delgada en la región axial (*fundus*), donde ya consta de una sola capa de células, mientras que en los márgenes de la copa óptica está compuesta por dos capas de células. El epitelio pigmentario de los embriones tratados (T90) era poco plano y pseudoestratificado en su porción central, explicando que el espesor sea mayor (tabla 13). En algunos ojos existían indicios de pigmentación y en otros no, pero en ninguno aparecía una pigmentación franca (lámina IX, figura 4; lámina X, figura 2). La actividad mitótica fue más duradera en los márgenes que en la región axial, donde, al mismo tiempo que aumenta la pigmentación, se observa una disminución marcada en las mitosis. El estrato pigmentario de los embriones controles de 114 h.i. era delgado y muy pigmentado (lámina XI, figura 1), mientras que la pigmentación en los ojos de los embriones tratados con etanol era inferior a los controles de incluso menos horas de desarrollo y más grueso. También la pigmentación de los tratados de 137 h.i. era inferior a la de los controles de la misma edad (lámina XII, figuras 1 y 2).

La retina neurosensorial, en los embriones controles de 64 h.i. (estadio de 30 somitos, H.H. 17) estaba, en todos ellos, bien estructurada (lámina VIII, figuras 1 y 2; lámina XIV, figuras 1 y 2). Permanecía apositada al epitelio pigmentario, por tanto el espacio entre ambas era virtual, excepto en la porción periférica, donde se unían. La distensión de la copa óptica por el humor vítreo fue un factor de crecimiento de la retina, lo cual permitió que un gran número de células persistieran en la zona proliferativa. Esta capa interna mostraba de 6 a 7 filas de núcleos: un epitelio germinativo con muchas mitosis, y seis capas más internas de neuroblastos que se iban diferenciando conforme se acercaban a su vertiente interna. El espesor de la retina neurosensorial era uniforme (a diferencia de lo que ocurría en los embriones

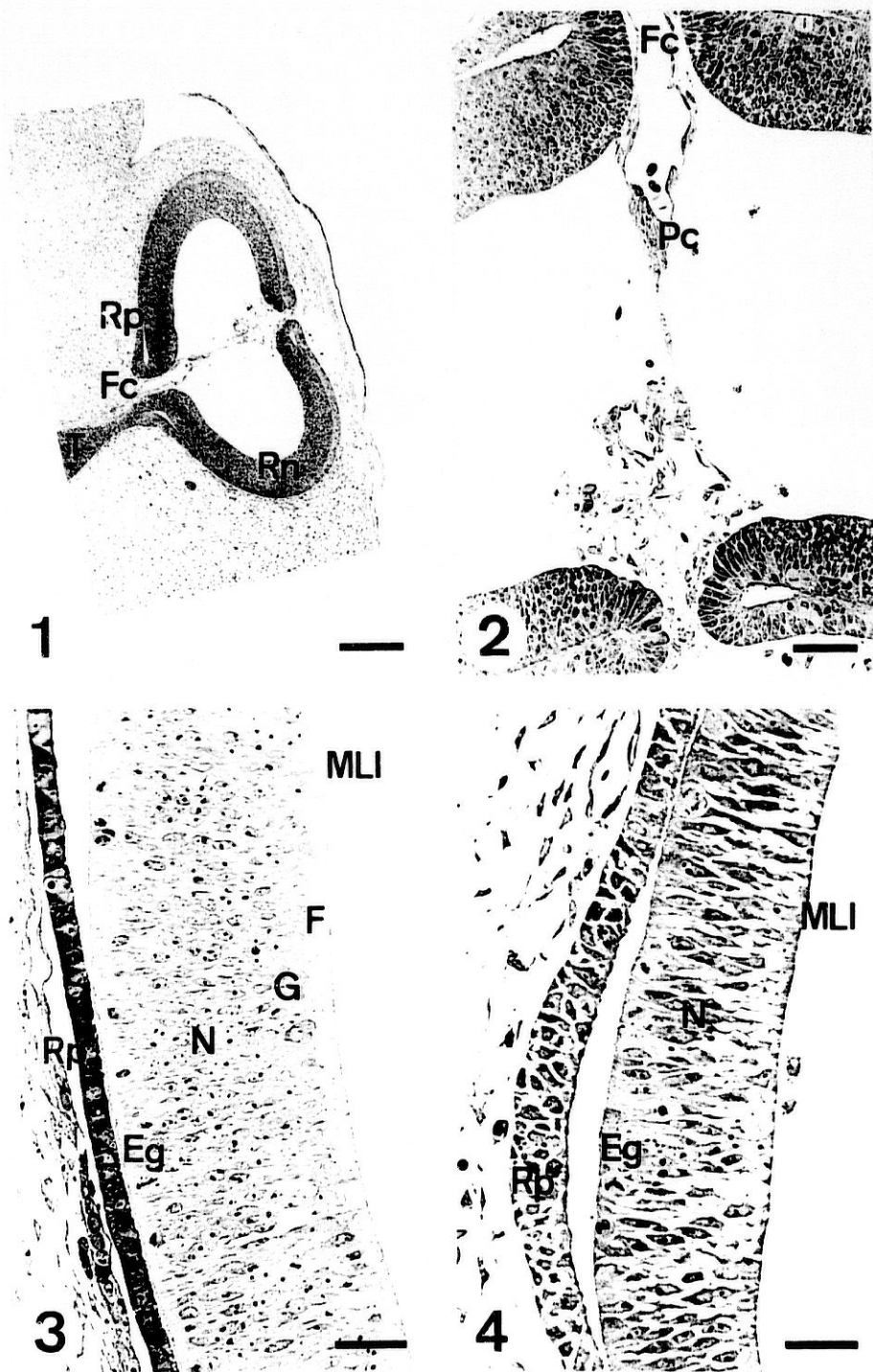
Lámina IX.- Microfotografías de secciones transversales de globos oculares de embriones de 90 horas de incubación

Figuras 1 y 2.- Sección lateral de globo ocular de un embrión control (H.H. 23). Se observa la fisura coroidea (Fc), que afecta a la porción distal del tallo óptico (T), así como a la cúpula óptica, que está formada por una capa interna (Rn) y una capa externa (Rp). A través de la fisura se proyecta, en la cavidad vítrea, una lámina delgada, el pecten (Pc). En la figura 2 se puede observar la estructura vascular del pecten, que penetra por la fisura coroidea, soportada por un tejido conectivo.

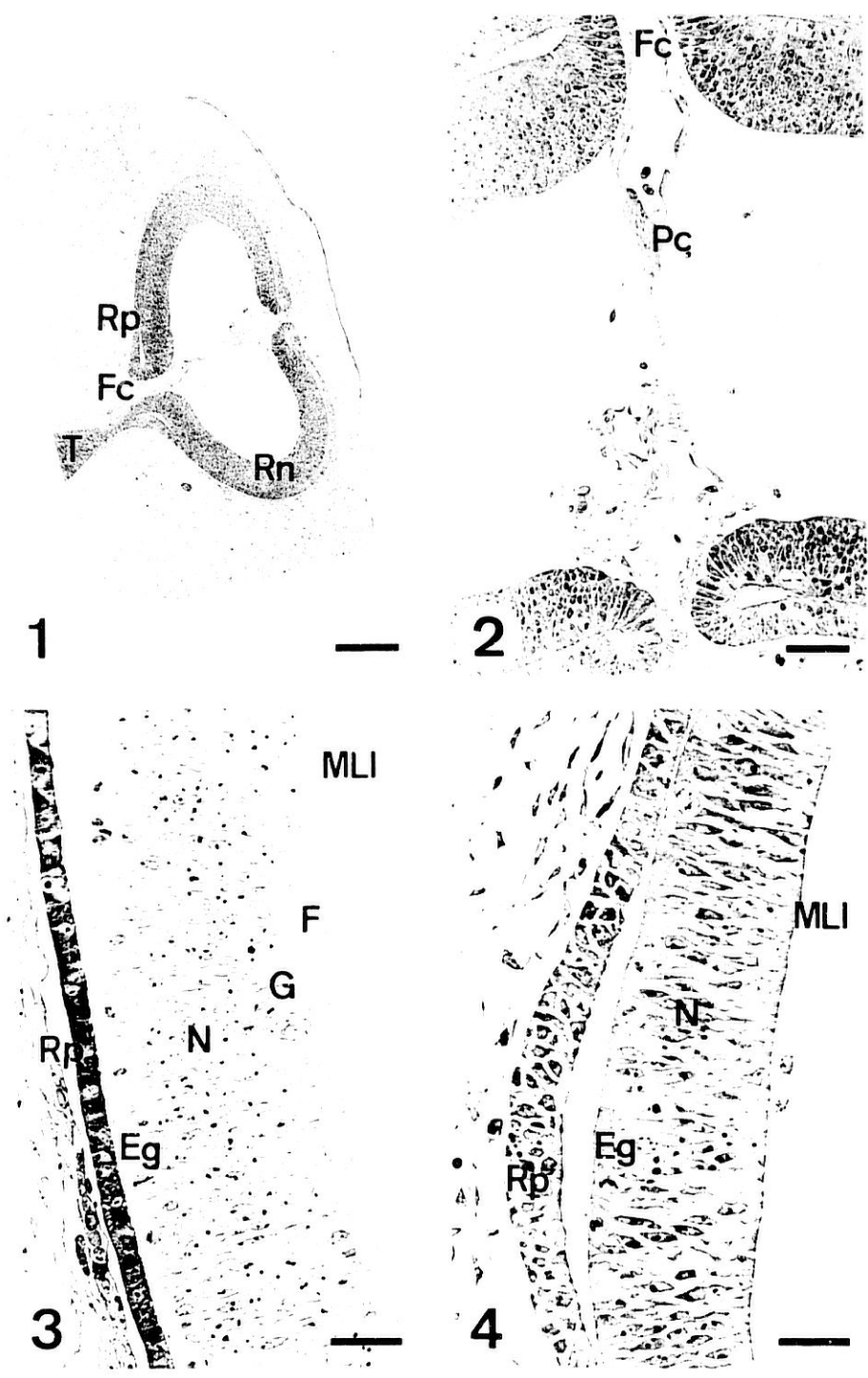
Figura 3.- Retina de un embrión control (H.H. 23). Observamos una capa interna (Rn) estratificada que, de dentro a fuera, presenta: la membrana limitante interna (MLI), la capa de fibras nerviosas (F), la capa de células ganglionares (G), la capa neuroblástica externa (N), que presenta de 8-12 filas de núcleos, y el epitelio germinal (Eg), que es la fila de células más externas, con numerosas células en mitosis. La capa externa o pigmentada (Rp) está formada por una sola fila de células, en cuyo interior se distinguen los gránulos de melanina.

Figura 4.- Retina de un embrión tratado (H.H. 18). Se observa una capa interna (Rn) más delgada, y menos estratificada, que la de los controles. La MLI no está completamente formada, no se ha diferenciado la capa de células ganglionares, y por tanto tampoco la capa de fibras nerviosas. Los neuroblastos (N) forman de 5 a 8 filas de núcleos, siendo la capa más externa el epitelio germinal (Eg), en el cual hay menos células en división. La capa externa (Rp) se muestra más gruesa y estratificada (en esta zona, que se corresponde con la región axial), no estando pigmentada.

Figura 1, barra = 200 μm ; figura 2: barra = 50 μm ; figuras 3 y 4, barra = 30 μm .



LAMINA IX



LAMINA IX

bajo el efecto del etanol), y mayor en la parte central, disminuyendo progresivamente conforme se hacía periférica, para acabar uniéndose a la capa externa (lámina VIII, figuras 1 y 3).

Como se ha señalado con anterioridad, los embriones expuestos al etanol de 64 h.i. mostraban un diferente grado de desarrollo (entre el estadio H.H. 14 y el 16). En algunos de ellos, los más atrasados (catalogados en el estadio H.H. 14), la luz de la vesícula óptica primaria todavía era amplia y se continuaba con la luz del prosencéfalo, siendo la porción distal de la vesícula óptica la que comenzó a allanarse, tan pronto como se formó la placoda cristalina (lámina VIII, figuras 2 y 4). A la vez que la copa óptica comenzó a invaginarse, la futura capa sensorial aumentó en grosor, especialmente en la región axial o central. Este temprano crecimiento de la capa interna de la retina está causado por la división mitótica de sus núcleos más externos (aquellos más cercanos a la capa pigmentaria), que constituyen una capa germinativa. Otros embriones expuestos al etanol de esta misma extracción se encontraban más desarrollados (estadio H.H. 16), por lo que la luz de la vesícula óptica se fue reduciendo, a medida que se iba completando la invaginación, hasta quedar una ranura vestigial entre las capas interna y externa de la cúpula recién formada. Por tanto, cabe señalar que las dos capas no estaban apositadas en los embriones de este grupo, oscilando el tamaño de este espacio intrarretiniano entre unos y otros (lámina VIII, figuras 2 y 4). Esta invaginación que originó la cúpula óptica no solo se llevó a cabo en el centro de la vesícula óptica, sino además de modo excéntrico, en dirección de su margen ventral, produciendo una hendidura en la pared de la cúpula óptica, la fisura coroidea, que era amplia en estos embriones. La capa interna (con 5-6 filas, en los embriones en que estaba formada), a la vez que se "desplomó", se fue engrosando, lo que nos indicó el inicio de una serie de intrincados cambios mediante los cuales se transforma en la capa sensorial de la retina. A diferencia de lo que observamos en los controles, el engrosamiento fue poco uniforme en los embriones tratados de este período en que existía cúpula óptica (lámina VIII, figura 4).

Las secciones transversales de los globos oculares de 90 h.i. mostraron una capa interna más estratificada, que comenzó a diferenciarse en el *fundus* y crecía

bajo el efecto del etanol), y mayor en la parte central, disminuyendo progresivamente conforme se hacía periférica, para acabar uniéndose a la capa externa (lámina VIII, figuras 1 y 3).

Como se ha señalado con anterioridad, los embriones expuestos al etanol de 64 h.i. mostraban un diferente grado de desarrollo (entre el estadio H.H. 14 y el 16). En algunos de ellos, los más atrasados (catalogados en el estadio H.H. 14), la luz de la vesícula óptica primaria todavía era amplia y se continuaba con la luz del prosencéfalo, siendo la porción distal de la vesícula óptica la que comenzó a allanarse, tan pronto como se formó la placoda cristaliniiana (lámina VIII, figuras 2 y 4). A la vez que la copa óptica comenzó a invaginarse, la futura capa sensorial aumentó en grosor, especialmente en la región axial o central. Este temprano crecimiento de la capa interna de la retina está causado por la división mitótica de sus núcleos más externos (aquellos más cercanos a la capa pigmentaria), que constituyen una capa germinativa. Otros embriones expuestos al etanol de esta misma extracción se encontraban más desarrollados (estadio H.H. 16), por lo que la luz de la vesícula óptica se fue reduciendo, a medida que se iba completando la invaginación, hasta quedar una ranura vestigial entre las capas interna y externa de la cúpula recién formada. Por tanto, cabe señalar que las dos capas no estaban apositadas en los embriones de este grupo, oscilando el tamaño de este espacio intrarretiniano entre unos y otros (lámina VIII, figuras 2 y 4). Esta invaginación que originó la cúpula óptica no solo se llevó a cabo en el centro de la vesícula óptica, sino además de modo excéntrico, en dirección de su margen ventral, produciendo una hendidura en la pared de la cúpula óptica, la fisura coroidea, que era amplia en estos embriones. La capa interna (con 5-6 filas, en los embriones en que estaba formada), a la vez que se "desplomó", se fue engrosando, lo que nos indicó el inicio de una serie de intrincados cambios mediante los cuales se transforma en la capa sensorial de la retina. A diferencia de lo que observamos en los controles, el engrosamiento fue poco uniforme en los embriones tratados de este período en que existía cúpula óptica (lámina VIII, figura 4).

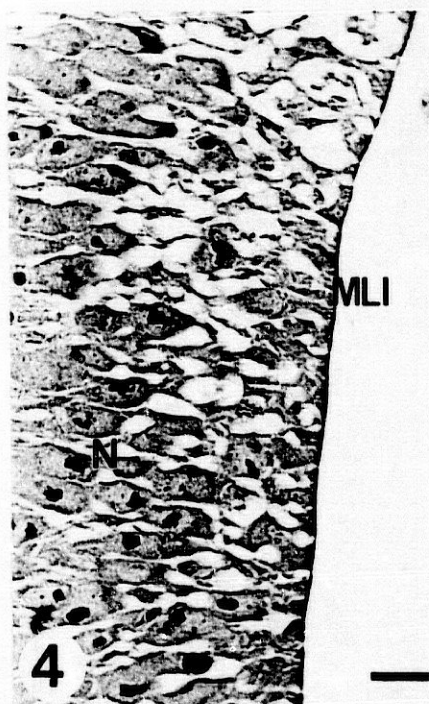
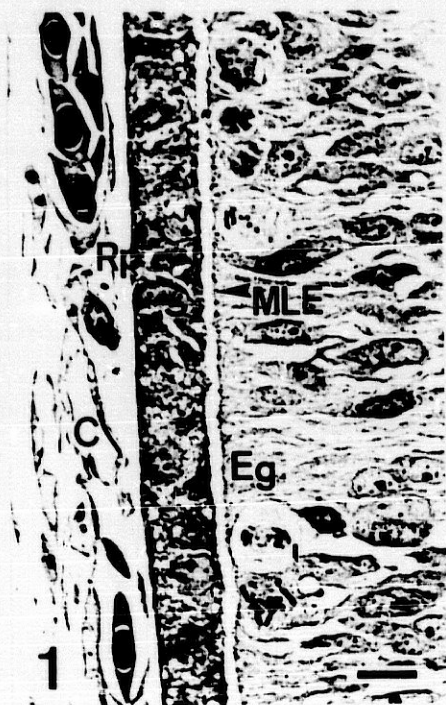
Las secciones transversales de los globos oculares de 90 h.i. mostraron una capa interna más estratificada, que comenzó a diferenciarse en el *fundus* y crecía

Lámina X.- Microfotografías de secciones transversales de globos oculares de embriones de 90 horas de incubación

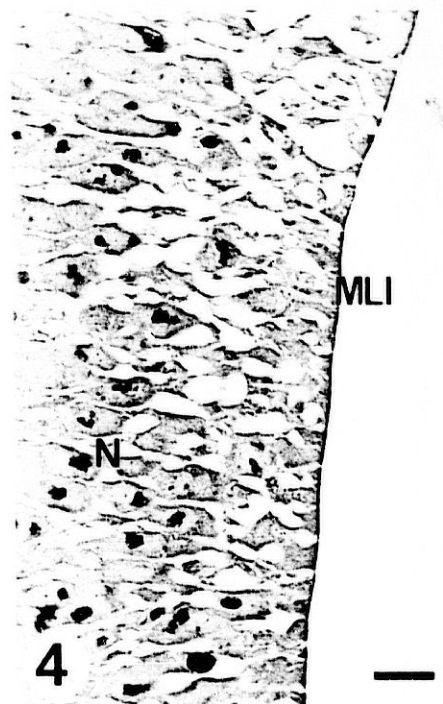
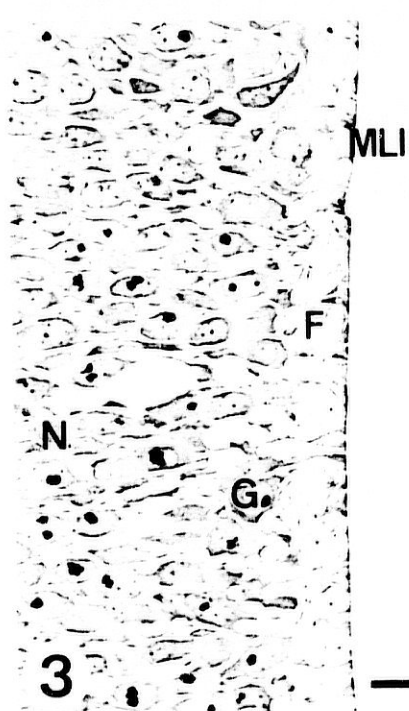
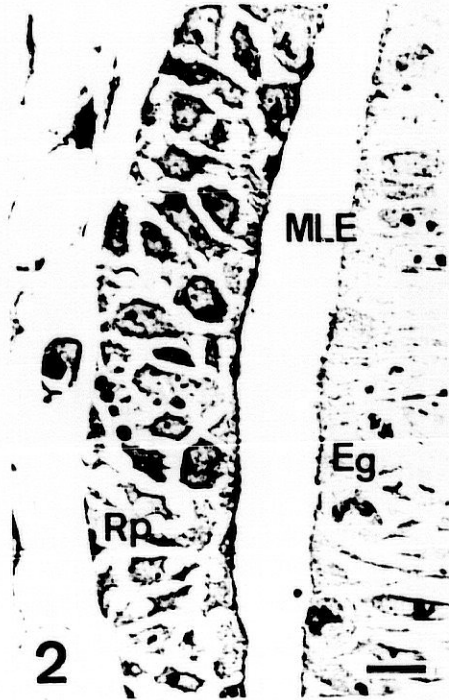
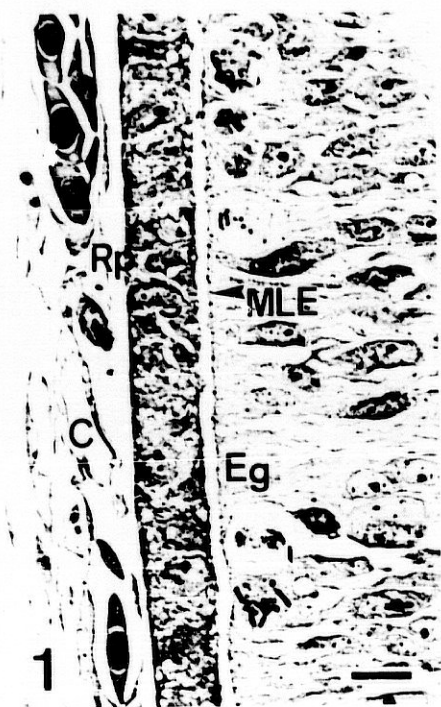
Figuras 1 y 3.- Retina de un embrión control (H.H. 23). En la figura 1 se observa el epitelio pigmentario (Rp), y como la pigmentación se dispone fundamentalmente en la porción externa de las células. En relación con el estrato pigmentario se advierte la lámina coriocapilar (C). Interna al epitelio pigmentario se observa la MLE, y a continuación el epitelio germinal (Eg), con células en mitosis. En la figura 3, se muestra la porción interna de la retina neurosensorial que, de dentro hacia fuera, presenta: la MLI; la capa de fibras nerviosas (F), que son los axones de las células ganglionares; la capa de células ganglionares (G); y la porción más interna de la capa de neuroblastos (N).

Figuras 2 y 4.- Retina de un embrión tratado (H.H. 18). En la figura 2 se muestra el epitelio pigmentario (Rp) no pigmentado, que permanece grueso y estratificado en la región axial. Interno a la MLE se aprecia un epitelio germinativo que también presenta mitosis. En la figura 4, se observa un detalle de la capa interna (Rn). Está compuesta de 5-6 capas de núcleos y una capa germinativa externa con algunas células en mitosis. En relación con la MLI aún no se ha diferenciado la capa de células ganglionares, aunque algunas células parecen estar cambiando su morfología. Obviamente, la capa de fibras nerviosas tampoco está diferenciada.

Barra = 10 μ m.



LAMINA X



LAMINA X

hacia los márgenes. En la retina de los embriones controles (H.H. 22) aparecía una estructura vascular, en forma de lámina delgada, pigmentada, que se proyectaba en el cuerpo vítreo desde la superficie ventral del ojo, el pecten. Consta de una malla vascular soportada por un tejido conectivo pigmentado (células de la glia) y cubierta por una membrana que se continua con la membrana limitante interna de la retina (lámina IX, figuras 1 y 2). Así mismo, a la vez que se generaba el pecten, comenzó el cierre de la fisura coroidea, en el extremo proximal de ésta. Por lo tanto, la fisura coroidea afectaba a la porción distal del tallo óptico así como a la copa óptica. La fusión de los bordes de la fisura se acompañó, en esta región, de una separación completa de las dos capas de la retina. La fila de células más externas de la capa interna continuaba constituida por el epitelio germinal, donde aparecían numerosas mitosis (lámina X, figura 1). El número de mitosis era inferior en las retinas de los embriones tratados. De igual modo, al analizar el epitelio germinal de los embriones de 114 y 137 h.i. advertimos que el número de células en mitosis era inferior en el epitelio germinal de los embriones expuestos (tabla 15, gráfico 13, pág. 86).

Tabla 15
Evolución del número de mitosis

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	6	23 \pm 1,9	8	15,2 \pm 2,7	$p \leq 0,001$
114	8	21,6 \pm 2,3	4	16,9 \pm 1,5	$p \leq 0,01$
137	4	22,2 \pm 0,9	5	20,7 \pm 1,0	$p \leq 0,05$

Conforme avanzó el desarrollo, el número de mitosis evolucionó en el sentido de disminuir las diferencias entre ambos grupos pero, como hemos dicho, la diferencia siempre fue significativa. El número de mitosis prácticamente era estable en los controles, mientras que en las retinas expuestas al etanol iba aumentando, lo cual podría explicar que la diferencia entre el espesor de la retina de ambos grupos fuera aumentando conforme ésta se desarrollaba, como ya se ha indicado.

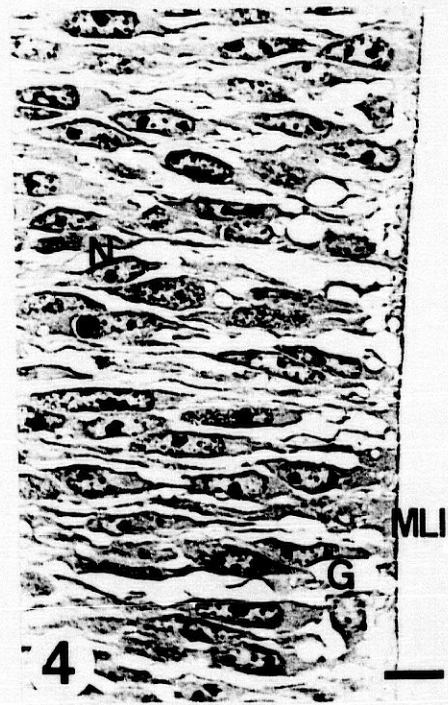
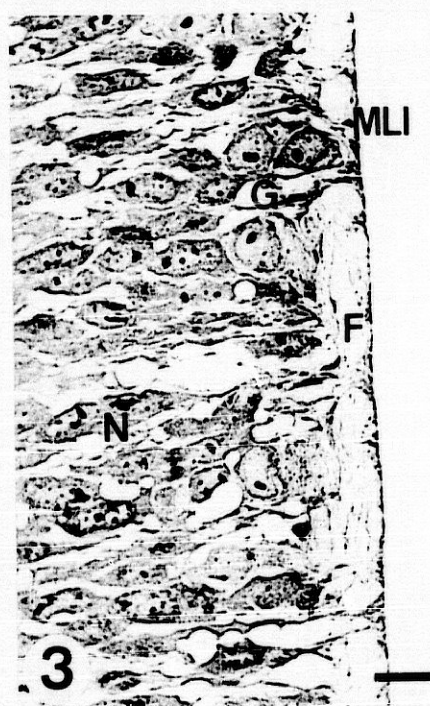
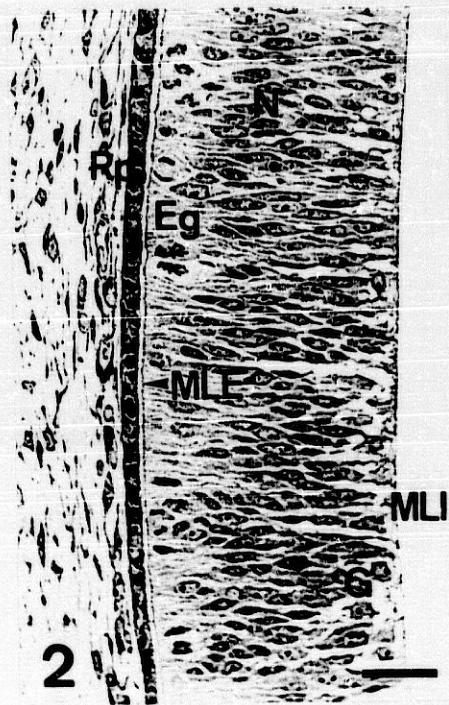
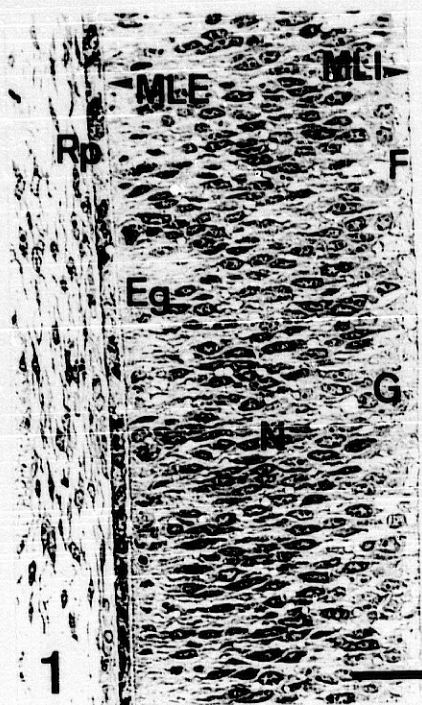
Los neuroblastos de la capa neuroblástica externa, originados por mitosis del epitelio germinal, forman la mayor parte del espesor de la retina neurosensorial.

Lámina XI.- Microfotografías de secciones transversales de globo ocular de embriones de 114 horas de incubación

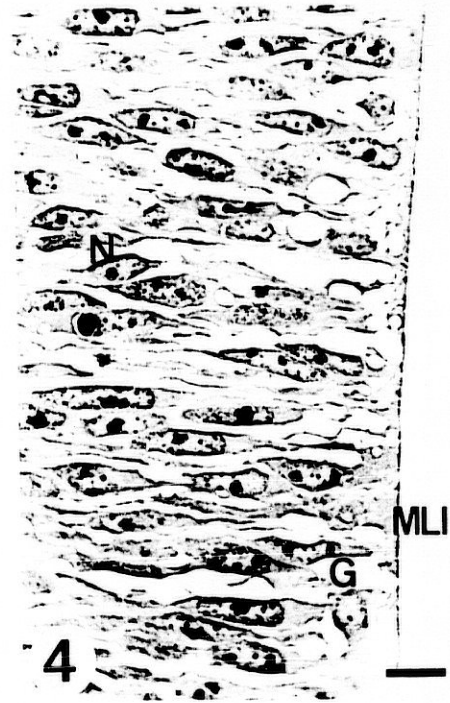
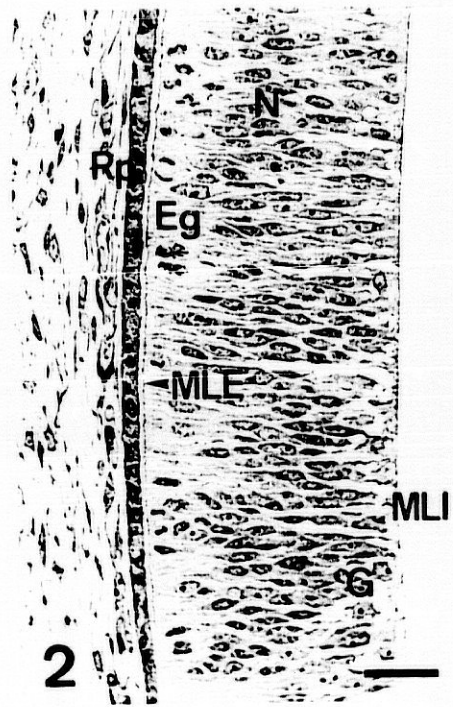
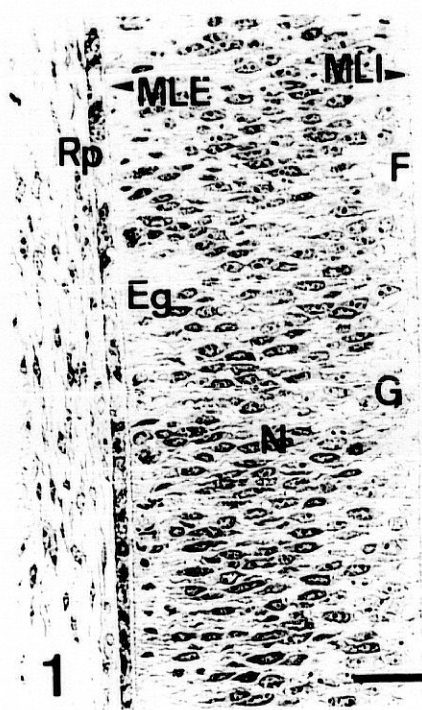
Figuras 1 y 3.- Sección transversal de la retina de un embrión control (H.H. 27). En la gruesa capa interna se pueden observar 6 estratos que, de dentro a fuera, son: la membrana limitante interna (MLI), la capa de fibras nerviosas (F), bien estructurada, que incluye células de Müller; la capa de células ganglionares (G), con dos filas de núcleos; la capa primitiva o neuroblástica externa (N); la capa proliferativa o germinal (Eg) con abundantes células en mitosis; y la membrana limitante externa (MLE). La capa externa o pigmentaria (Rp) ha aumentado su pigmentación y sus células siguen allanándose, por lo que disminuye su espesor. En la figura 3, se observan los haces de fibras nerviosas (F). Externamente a las fibras nerviosas están las células ganglionares, dispuestas en una capa de 2-3 filas de núcleos.

Figuras 2 y 4.- Sección transversal de la retina de un embrión tratado (H.H. 24). Presenta las capas menos desarrolladas que las vistas en los controles, así, la capa de fibras nerviosas (F) tiene un espesor menor, las células ganglionares (G) no forman una capa clara y los neuroblastos (N) forman menos cantidad de filas nucleares. La capa más externa de los neuroblastos la forma la capa proliferativa o germinativa (Eg). En la figura 4 aún no se observan con claridad las fibras nerviosas que, por lo tanto, no forman una capa. Externamente a las fibras nerviosas hay algunas células ganglionares (G), aunque en menor número que en los embriones controles.

Figuras 1 y 2: barra = 30 μ m, figuras 3 y 4: barra = 10 μ m.



LAMINA XI



LAMINA XI

A lo largo de todo nuestro estudio, la citada capa presentaba menor espesor en los embriones sometidos a la acción del etanol, y por consiguiente contenía menor número de células. Así, mientras que los embriones controles a las 64 h.i. presentaban 6-7 filas de núcleos, en los tratados de la misma edad sólo contamos de 5 a 6. Con posterioridad (E90), la retina del grupo no expuesto contenía entre 8 a 12 filas, por las 7 a 8 de en los embriones tratados. De igual modo, los embriones tratados de 114 y 137 h.i. mostraban una retina con menos número de filas de neuroblastos.

Una vez concluida la mitosis, comienza la diferenciación neuroblástica, que ocurre en primer lugar en el centro y gradualmente se dirige hacia la periferia (Coulombre, A.J., 1955; O'Rahilly, R. y Meyer, D.B., 1959; Rager, U., Rager, G. y Frei, B., 1993). Los primeros neuroblastos formados están destinados a formar la capa ganglionar. Esta capa, que ya se mostraba bien definida en los embriones controles de 90 h.i., se sitúa inmediatamente externa a la capa de fibras nerviosas, que también estaba bien configurada, y que está formada por los axones de las células ganglionares (lámina IX, figura 3, lámina X, figura 3). La capa de células ganglionares estaba formada por 1 o 2 filas de células (lámina X, figura 3). Había células elongadas de soporte, mezcladas con las células ganglionares, que se diferenciarán en las células de Müller (la fusión de las terminales internas de las futuras células de Müller dio lugar a la formación de la membrana limitante interna de la retina, que apareció primero sobre la retina adyacente al tallo óptico). La capa interna de la retina de los embriones expuestos al etanol (T90) presentaba algunas células ganglionares, pero no formaban una capa clara, (lámina IX, figura 4; lámina X, figura 4). La retina de los embriones de 114 h.i. constaba de 7 capas, de las cuales, la capa de células ganglionares (neuroblástica interna) presenta de 2-3 filas de núcleos en el área central en las retinas controles (lámina XI, figuras 1 y 3), apareciendo en algunos embriones tratados con etanol menos desarrollada (lámina XI, figuras 2 y 4). En los embriones de 137 h.i. también se observaba una capa de células ganglionares menos desarrollada en los embriones tratados (lámina XII, figuras 2 y 4).

La capa de fibras nerviosas, formada por los axones de las células ganglionares, aparece configurada en los embriones controles de 90 h.i. (lámina X,

figura 3, lámina XI, figura 3), mientras que en los embriones expuestos al etanol aún no se ha formado (lámina X, figura 4, lámina XI, figura 4). A las 114 h.i., la capa de fibras nerviosas (incluyendo fibras de Müller) ha aumentado en tamaño, estando bien establecida en los controles (lámina XI, figuras 1 y 3), donde las fibras nerviosas convergían en el área de salida de todas las direcciones excepto a lo largo de la fisura retiniana. En este momento del desarrollo muchas fibras pasaban ya de la porción ventral de la retina al tallo óptico en las retinas controles investigadas, sin embargo, en algunos ojos de embriones bajo el efecto del etanol, la capa estaba menos desarrollada, la porción nasal apenas presentaban fibras, y las pocas que se observaban no pasaban al nervio óptico. Por tanto, en los tratados tendrá menos espesor (tabla 16), en la parte nasal apenas presenta fibras, y estas no pasan al nervio óptico (lámina XI, figuras 2 y 4). En los controles de 137 h.i., observamos una capa de fibras del nervio óptico muy desarrollada, ocupando toda la extensión de la retina (también en la porción ventral), y aprovechando las fibras la fisura retiniana en igual cantidad tanto del lado temporal como ventral (lámina XII, figuras 1 y 3). En los tratados, está menos desarrollada, siendo solamente algunas fibras nerviosas ventrales las que encuentran los bordes de la fisura retiniana (lámina XII, figuras 2 y 4).

El análisis de la capa de fibras del nervio óptico (en el *fundus*), nos muestra como los valores del espesor en los controles eran mayores que los obtenidos en los embriones bajo el efecto del etanol en el período estudiado (tabla 16, gráfico 14).

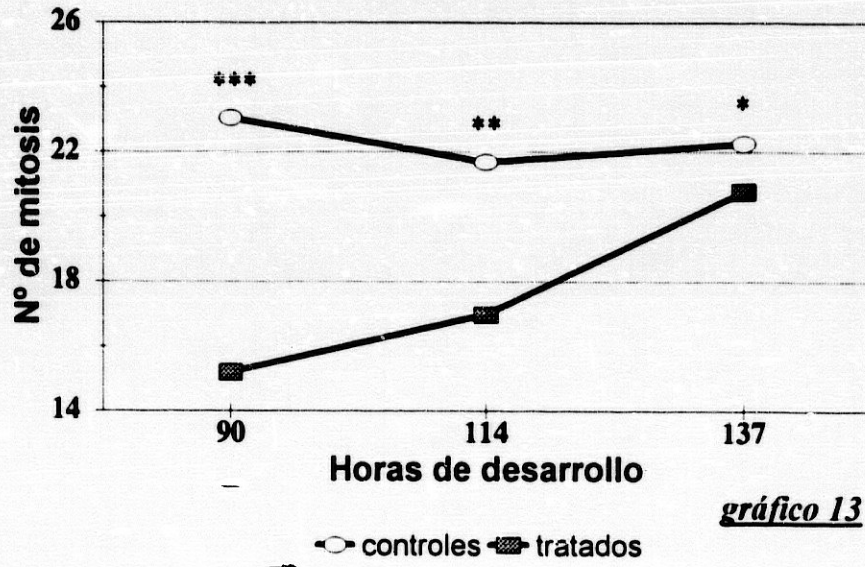
Tabla 16

Evolución del espesor de la Capa de fibras del Nervio Optico (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
114	8	8,16 \pm 1,10	4	5,45 \pm 1,40	$p \leq 0,01$
137	4	13,75 \pm 4,4	5	8,23 \pm 1,03	

La diferencia de espesor aumenta entre ambos grupos, en la etapa de desarrollo analizada. Estos resultados, en definitiva, son acordes con una capa de células ganglionares menos desarrollada, al igual que una retina sensorial que crecía

Epitelio germinal de la retina



Capa fibras N.O.

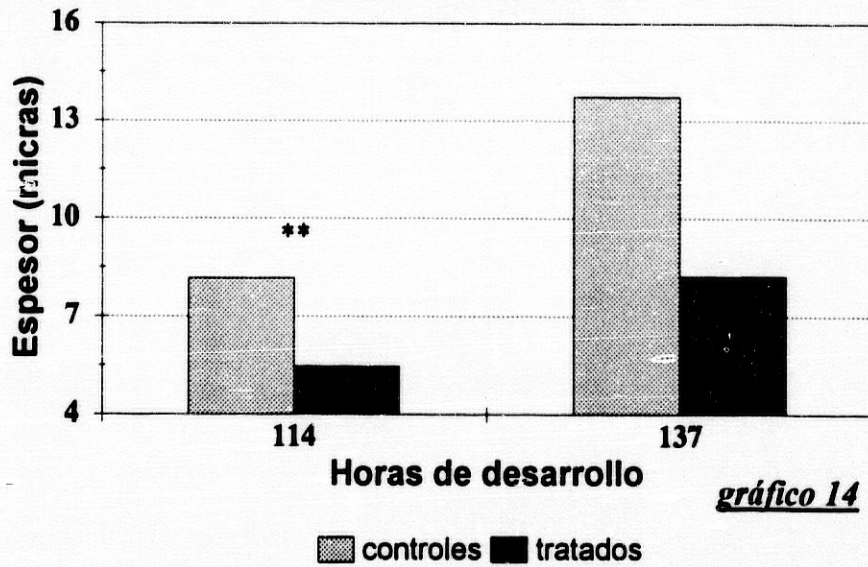
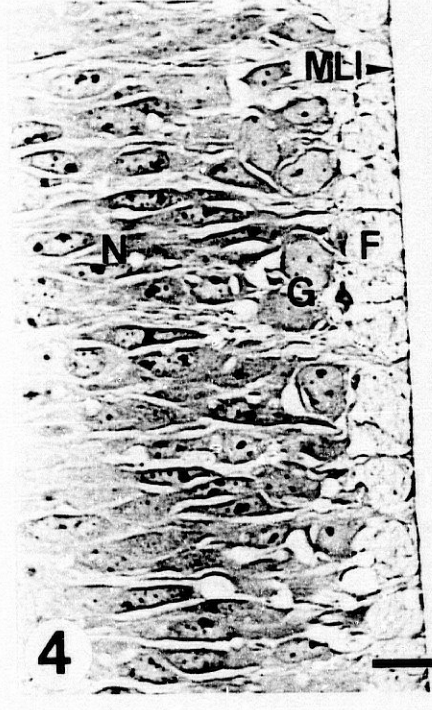
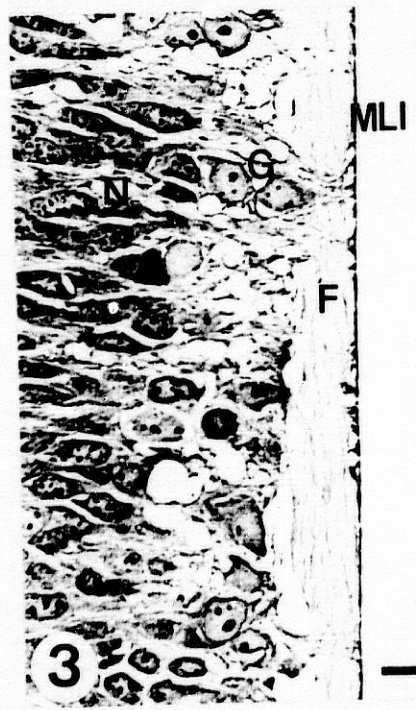
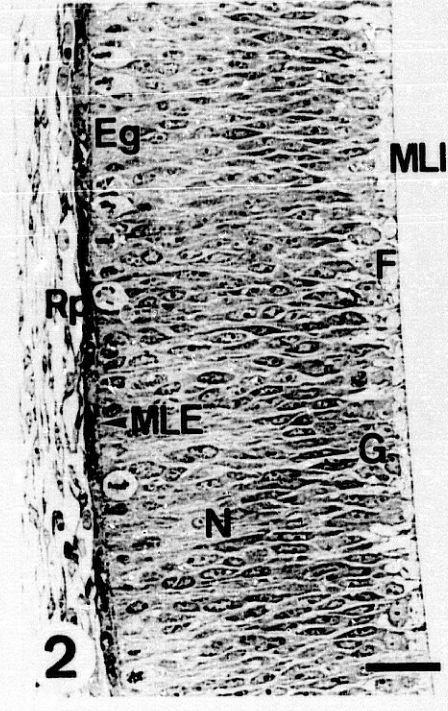
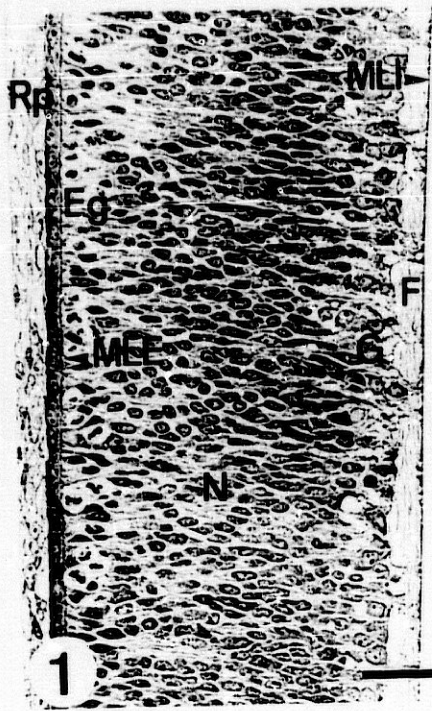


Lámina XII.- Microfotografías de secciones transversales de retinas de globos oculares de embriones con 137 horas de incubación

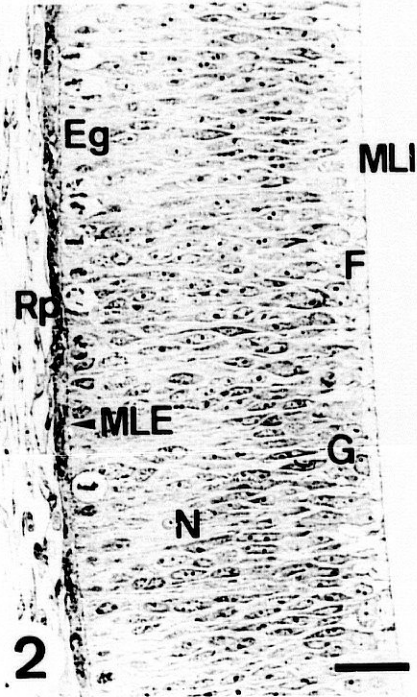
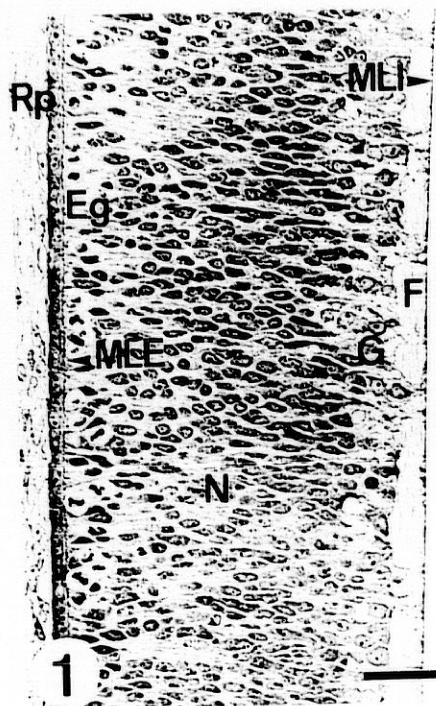
Figuras 1 y 3.- Sección transversal de la retina de un embrión control (H.H. 29). En la capa interna se distinguen perfectamente los estratos que la constituyen: **MLI** capa de fibras nerviosas (**F**), bien estructurada, capa de células ganglionares (**G**), con dos filas de núcleos, capa primitiva o neuroblástica externa, con mayor densidad celular (**N**), capa proliferativa o germinal (**Eg**), con abundantes células en mitosis, y membrana limitante externa (**MLE**). La capa externa o pigmentaria (**Rp**) está muy pigmentada. En la figura 3 se observan los haces de fibras nerviosas, externos a la MLI, y a continuación las células ganglionares, dispuestas en una capa con 2-3 filas de núcleos.

Figuras 2 y 4.- Sección transversal de la retina de un embrión tratado con etanol (H.H. 27), que está menos desarrollada que la mostrada por los embriones controles de la misma edad. La capa de fibras nerviosas (**F**) tiene un espesor menor y la capa neuroblástica externa (**N**) tiene menos cantidad de filas nucleares de neuroblastos. La capa proliferativa o germinativa (**Eg**), presenta menor número de células en mitosis. En la figura 4 se observan los haces de fibras nerviosas y la capa de células ganglionares (**G**), menos desarrolladas que en los embriones controles.

Figuras 1 y 2: barra = 30 μ m, figuras 3 y 4: barra = 10 μ m.



LAMINA XII



LAMINA XII

a un ritmo menor en los tratados con etanol. Por tanto, en este período, la cantidad de fibras que salen del globo ocular es superior en los controles que en los tratados. Además, la parte ventral, como ya hemos mencionado, aporta menos caudal de fibras a la cabeza del nervio óptico. en los embriones expuestos al etanol, en este período de la evolución.

En los controles de 137 h.i. aparece cartilago escleral, que se formó a partir de unas condensaciones mesenquimales, en la vecindad del nervio óptico, mientras que en los tratados, en unos, se observaba una área cartilaginosa cercana al nervio óptico y en otros no apreciamos signos de condricación.

III. 3. 3. 2.- El cristalino

El desarrollo del cristalino hacia la formación de una estructura transparente que posea cualidades ópticas adecuadas, implica una secuencia altamente organizada de fenómenos diferenciadores inter e intracelulares (Piatigorsky, J., 1981). La vesícula óptica induce la formación del cristalino. Esta inducción depende del contacto de esta vesícula con la superficie del ectodermo. Posiblemente, debido a la acción de ciertas moléculas de la superficie de la vesícula óptica, se produce una reorientación y fijación de moléculas complementarias en la superficie basal de las células ectodérmicas, las cuales sufrirán cambios histológicos, hasta adoptar el aspecto típico de placoda cristalina.

En los primeros estadios, un área muy extensa de la superficie del ectodermo posee la capacidad de producir tejido cristalino. Se han observado vesículas ópticas que tras ponerse en contacto con el ectodermo, en zonas anómalas, han inducido la formación de cristalinos. Más tarde se determinó que el embrión posee esta capacidad inductiva hasta el estadio de 4 somitos, el ectodermo cefálico hasta el 4º d.i. y el ectodermo precorneal hasta el 5º d.i. El tejido retiniano puede inducir células cristalinas incluso en un ectodermo extraño (no propio). Ambas, la capa sensorial y pigmentaria, poseen la capacidad de inducción cristalina (Romanoff, A.L., 1960).

Nuestros embriones de 40 horas, de ambos grupos experimentales, aún no presentan cristalino, sino el ectodermo a partir del cual se forma. Este ectodermo, que

rodea la vesícula óptica, se muestra diferente en aquéllos expuestos al etanol. Así, mientras en los embriones controles se aprecia un engrosamiento ectodérmico local (directamente sobre el área de contacto con la vesícula óptica, inducción de 2º grado), hecho que normalmente indica el comienzo de la formación del cristalino (lámina VII, figuras 1 y 3, pág. 67), en algunos embriones expuestos al etanol, no encontramos cambios morfológicos apreciables con respecto al resto del ectodermo que rodea al embrión, permaneciendo separado de la vesícula en su mayor parte (lámina VII, figuras 2 y 4, pág. 67). El engrosamiento del ectodermo cristaliniario, observado en los controles, consistió en una condensación y contracción de la superficie del ectodermo; provocándose un aumento de la densidad celular (más que en número de células), elongación del citoplasma y núcleo, estratificación y orientación de núcleos de forma perpendicular a la superficie. El espesor del ectodermo de los embriones tratados, por tanto, fue menor que el de los embriones controles (tabla 10, gráfico 8, págs. 63 y 64). También encontramos diferencias en la relación de los espesores: vesícula óptica/ectodermo (tabla 10, pág. 63), lo cual podría interpretarse como un resultado relacionado con el retraso existente en el desarrollo de los embriones de este grupo (T40).

En el resto de las extracciones nos llamó la atención lo diferentes que eran los cristalinos en desarrollo de ambos grupos, tanto su morfología como en su tamaño.

Tabla 17
Evolución del diámetro mayor del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	6	253,9 \pm 18,4	5	190,8 \pm 22,8	p \leq 0,001
90	4	577,7 \pm 47,2	6	441,4 \pm 30,7	p \leq 0,001
114	7	860,9 \pm 68,2	4	651,2 \pm 120,6	p \leq 0,01
137	4	1042,9 \pm 29,3	4	965,4 \pm 25,5	p \leq 0,01

Los embriones expuestos al etanol siempre presentaban cristalinos más pequeños que aquellos pertenecientes a los embriones controles, como se puso de manifiesto cuando comparamos su diámetro mayor. El análisis de los resultados

obtenidos muestra que las diferencias son significativas a lo largo de todo el período estudiado (tabla 17, gráfico 15).

Como consecuencia de un crecimiento diferente del eje anteroposterior del cristalino, en el grupo tratados, la evolución morfogénica fue distinta, condicionando una mayor curvatura de su cara posterior.

Tal como se muestra en la tabla 18, gráfico 16, el diámetro antero-posterior, de los embriones controles, es significativamente mayor en las tres primeras fases estudiadas, no así en la cuarta donde acaba siendo mayor en los embriones tratados.

Tabla 18
Evolución del diámetro menor del Cristalino (μ)

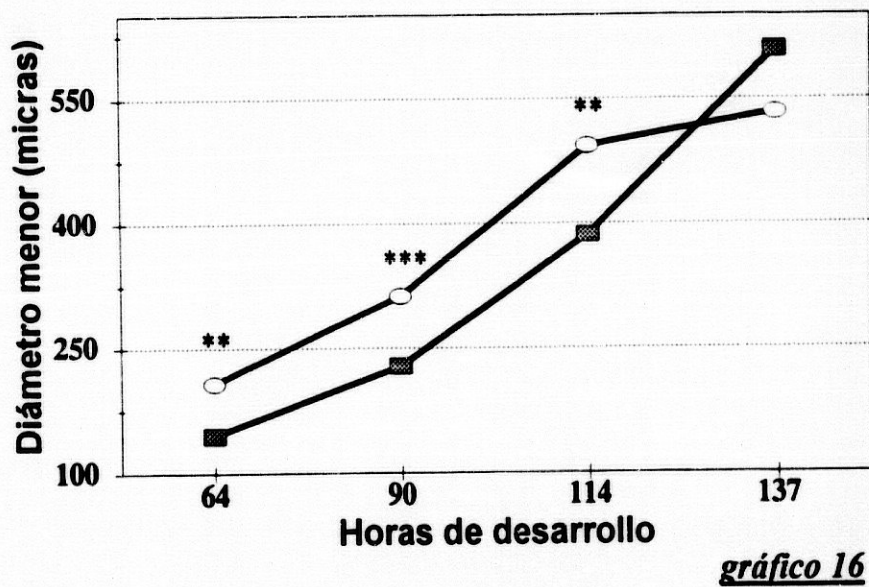
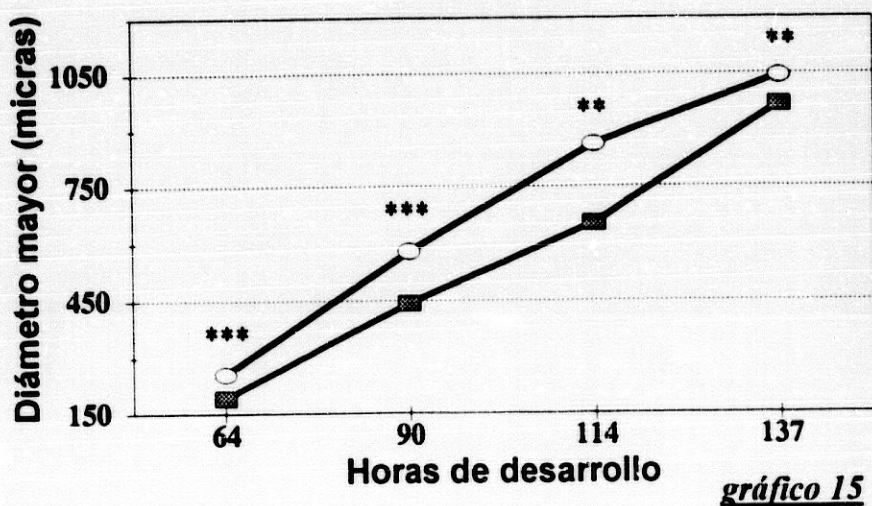
HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	6	206,7 \pm 17,8	5	144,4 \pm 31,2	$p \leq 0,01$
90	4	311,8 \pm 35,9	6	227,1 \pm 23,2	$p \leq 0,001$
114	7	493,3 \pm 52,9	4	386,2 \pm 71,8	$p \leq 0,01$
137	4	533,1 \pm 34,4	4	607,9 \pm 70,5	

Al analizar los resultados nos encontramos que, mientras el diámetro anteroposterior del cristalino de los embriones controles seguía creciendo hasta casi estabilizarse entre las dos últimas extracciones, en los expuestos a la acción del etanol se mantiene un crecimiento lineal durante todo el período, llegando a superar al de los controles.

Esta característica evolución del cristalino de los embriones alcoholizados se relaciona con dos circunstancias: a) el mayor crecimiento de las fibras cristalinas dándole un aspecto más esférico, y b) un ralentizamiento en la disminución del espesor del epitelio anterior del cristalino.

El estudio de la relación entre ambos diámetros cristalinos, indica un comportamiento diferente entre las dos últimas extracciones: aumenta en los embriones controles, por el allanamiento ya mencionado, y disminuye en los tratados, a consecuencia de un mayor aumento del diámetro axial del cristalino, tal como se

Cristalino



○ controles ■ tratados

muestra en la tabla 19 y el gráfico 17).

Tabla 19

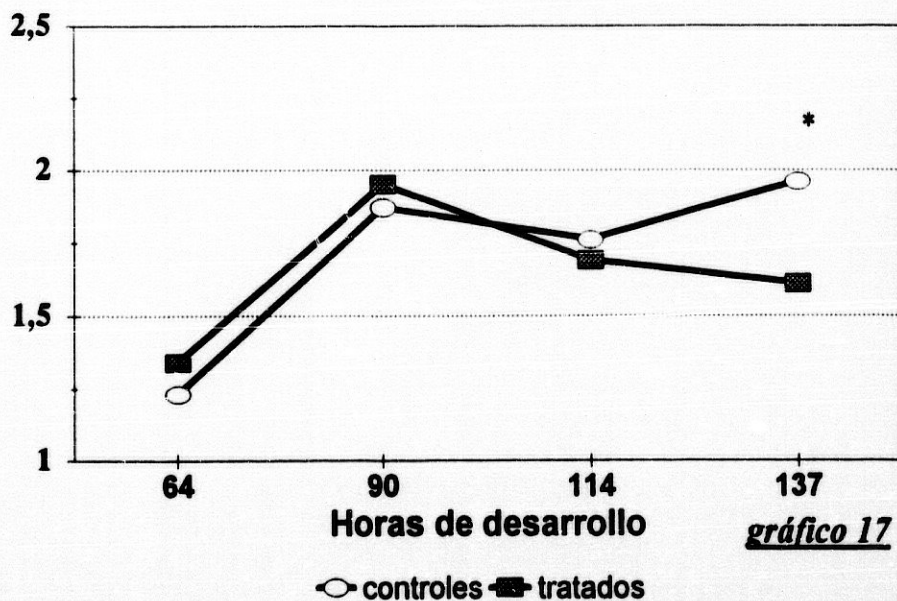
Evolución de la relación diámetro mayor / diámetro menor del Cristalino

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
64	6	1,23 \pm 0,08	5	1,34 \pm 0,14	
90	4	1,87 \pm 0,28	6	1,95 \pm 0,19	
114	7	1,76 \pm 0,2	4	1,69 \pm 0,11	
137	4	1,96 \pm 0,09	4	1,61 \pm 0,22	$p \leq 0,05$

Las mencionadas desigualdades, en el tamaño y en la forma, se acompañan de diferencias en la formación del cristalino y en el desarrollo de las partes que lo componen.

Los cristalinos de los embriones controles de 64 h.i. mostraban una vesícula bien formada y un poro cristaliniario cerrado. En el área de fusión, entre la vesícula y el ectodermo, las células eran más pequeñas y numerosas, con núcleos picnóticos. Con el análisis de secciones seriadas, comprobamos que esta unión con el ectodermo era muy pequeña, ya que sólo se mantuvo entre 10-15 μ (lámina VIII, figura 1, pág. 74).

Relación Dma/Dme



En los embriones expuestos al etanol (T64) nos encontramos con tres situaciones, que ponían de relieve el retraso en el desarrollo de los cristalinos, en relación con los controles. Una parte de ellos todavía se encontraba en fase de placoda (lámina VIII, figuras 2 y 4, pág. 74), que, en condiciones normales, se hace visible hacia el segundo d.i. (H.H. 13-14). En otros embriones de este grupo, con 21-25 somitos y catalogados en los estadios H.H. 14 a 15, el ectodermo cristaliniario estaba todavía invaginándose, formando una vesícula abierta, en la cual la placoda cristaliniaria invaginada y la superficie ectodérmica mantenían la continuidad, y permaneciendo la cavidad cristaliniaria en contacto con el exterior (lámina XIII, figuras 1, 2 y 3). En los embriones más evolucionados de este grupo (H.H. 15), la cavidad cristaliniaria seguía en contacto con el exterior mediante un poro situado excéntricamente. Esta unión entre la vesícula cristaliniaria y el ectodermo se mantiene durante más tiempo y con mayor superficie de contacto, induciendo, posiblemente, un retraso anómalo en el desprendimiento de las vesículas (lámina XIII, figura 4). En resumen, en el proceso de formación del cristalino de los embriones sometidos a la acción del etanol, nos encontramos con morfologías propias de situaciones de desarrollo muy anteriores a las características de esta edad (64 h.i.), que estaban comprendidas entre una placoda cristaliniaria establecida y una vesícula en formación.

Una vez constituido el cristalino como un cuerpo epitelial redondeado, ubicado en la abertura de la cúpula óptica, analizaremos su desarrollo fijándonos en la evolución de las partes que lo componen.

Debido fundamentalmente al epitelio posterior, los cristalinos de los embriones de 90 h.i. de ambos grupos son muy diferentes. Aquellos pertenecientes al grupo controles ya no son estructuras vesiculares, al haber crecido las células que formaban el epitelio posterior de la vesícula cristaliniaria, obliterando la luz de la cavidad, de tal forma que al cerrarse la parte central del ventrículo aparecía un *sinus* circular periférico (lámina XIV, figuras 1 y 3). Los núcleos de las células del cuerpo del cristalino (epitelio posterior) se sitúan ocupando la zona media (lámina XIV, figuras 1 y 3), que se llamará ahora porción lenticular del cristalino. Estas células de la porción lenticular adoptan un aspecto más fibroso, y con contorno hexagonal.

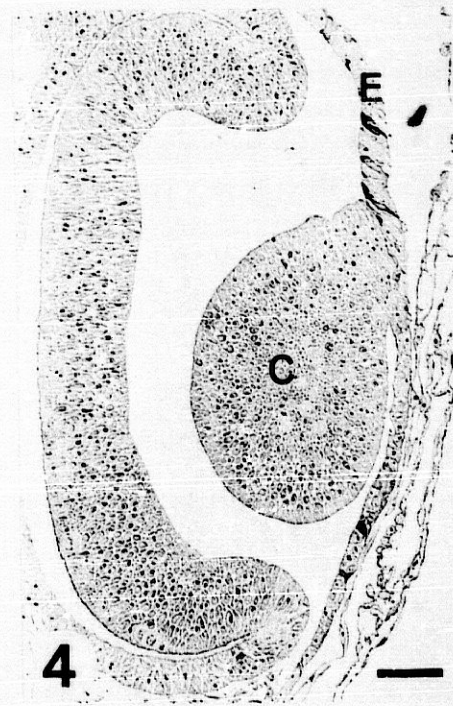
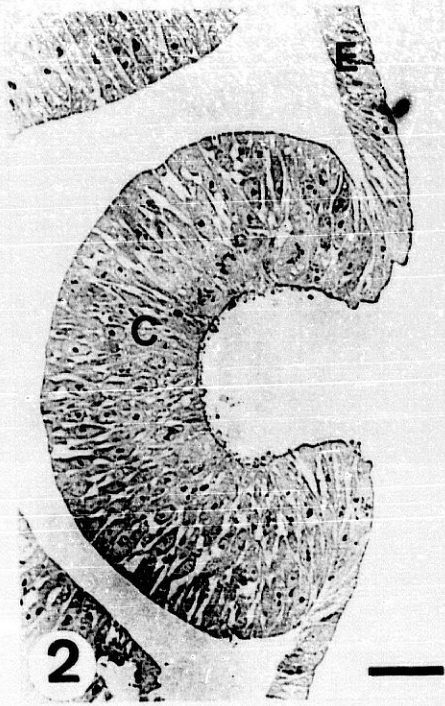
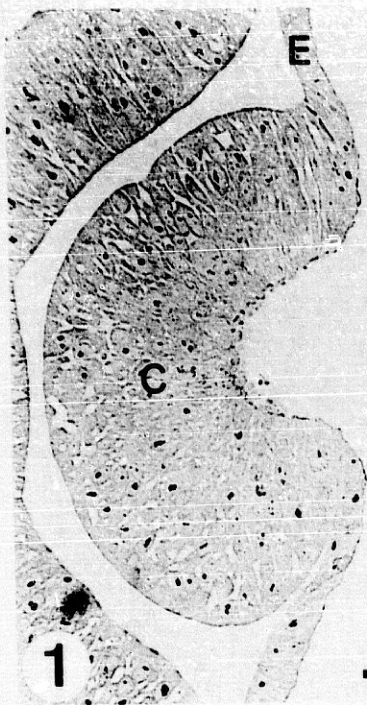
Por el contrario, la estructura ocular de los embriones expuestos al etanol (T90)

Lámina XIII.- Microfotografías de cortes transversales de las copas ópticas de embriones tratados de 64 horas de incubación

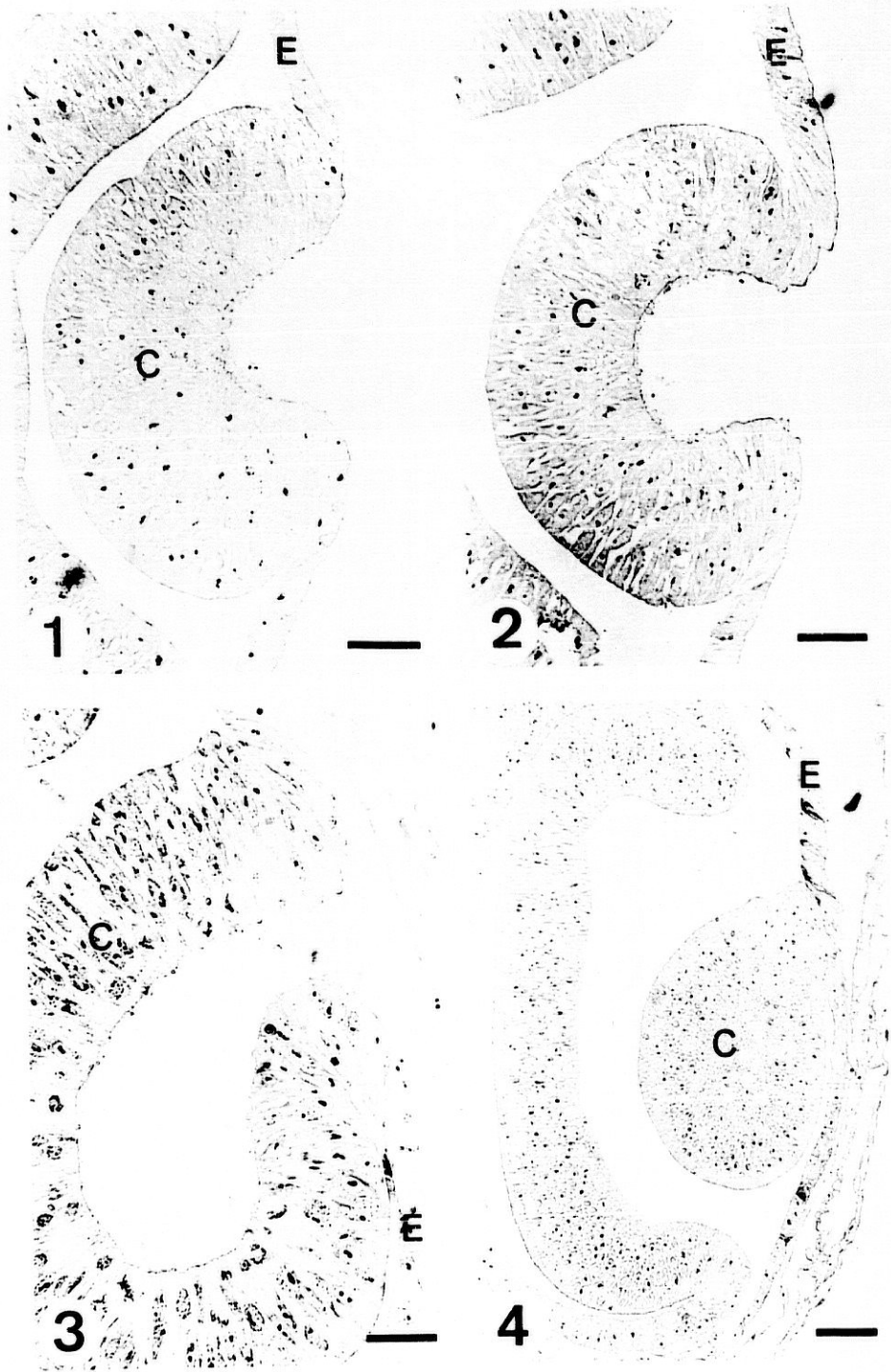
Figuras 1, 2, y 3.- Empezando por las figuras 2 y 4 de la lámina VIII (placodas cristalinianas, PI), se muestran sucesivas fases de la ontogenia del cristalino (C). Se observan tres estadios consecutivos de la formación de la vesícula cristaliniana. En todos ellos permanece la comunicación entre el interior de la vesícula y el exterior.

Figura 4.- Unión paracentral entre el cristalino en formación (C) y el ectodermo (E), que formará el epitelio corneal primitivo, en un embrión en el que ya está bien formada la cúpula óptica.

E: ectodermo. Figuras 1, 2 y 3: barra = 30 μm ; figura 4: barra = 50 μm .



LAMINA XIII



LAMINA XIII

todavía consistía en vesículas cristalinas tempranas, las cuales habían sufrido un desarrollo asimétrico, en el que las células más profundas se estaban alargando (lámina XIV, figuras 2 y 4). Se produjo un incremento del número de células en la pared medial (o profunda) y una elongación citoplásmica anterior, sobre todo de aquéllas que ocupaban las porciones axiales. Los núcleos de las futuras fibras iban dibujando una curva de convexidad anterior, al ascender más los de situación central. En lo concerniente al crecimiento de las células del polo profundo (epitelio posterior), encontramos diferencias entre los cristalinos de los embriones de este grupo (T90), que iban desde un epitelio donde sus células estaban comenzando a alargarse (y por lo tanto persistía una gran cavidad), a otros cristalinos más evolucionados en los que las fibras se habían prolongado lo suficiente como para establecer contacto con el epitelio externo o anterior (reduciendo así la cavidad original de la vesícula a una ranura potencial). En los embriones tratados de 114 h.i., los cristalinos ya no son vesiculares, pero las curvaturas anterior y posterior siguen siendo grandes, existiendo una mayor dispersión de los núcleos de la porción lenticular (lámina XV, figuras 2 y 4, pág. 106). En los controles los núcleos de la porción lenticular continúan centrándose (lámina XV, figuras 1 y 3, pág. 106). En el cristalino de los embriones controles de la última extracción analizada (C137) las curvaturas posterior y anterior -en menor medida-, han disminuido, y los núcleos están muy agrupados (lámina XVI, figuras 1 y 3, pág. 117). Por el contrario, el epitelio posterior es más grueso en los tratados, la curvatura posterior es grande y existe mayor dispersión de los núcleos de la porción lenticular (lámina XVI, figuras 2 y 4, pág. 117).

En los embriones expuestos al etanol, el espesor del epitelio posterior del cristalino fue menor que el de los controles en las dos primeras fases estudiadas, mientras que en la última etapa analizada se hace mayor, como se observa en la tabla 20, gráfico 18. Los resultados fueron similares a los anteriormente comentados acerca del diámetro menor del cristalino, pues depende fundamentalmente de este epitelio.

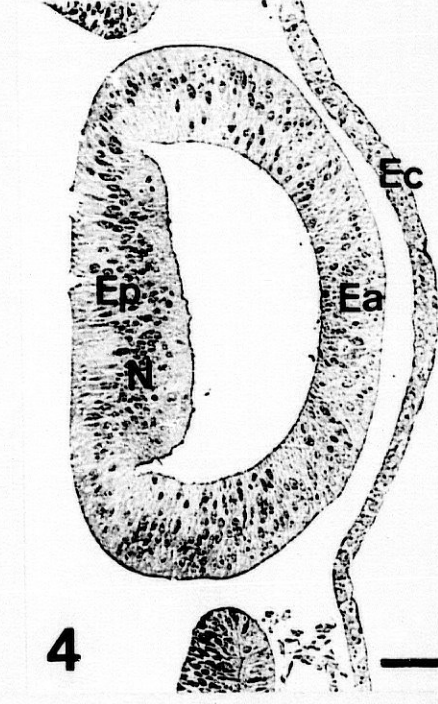
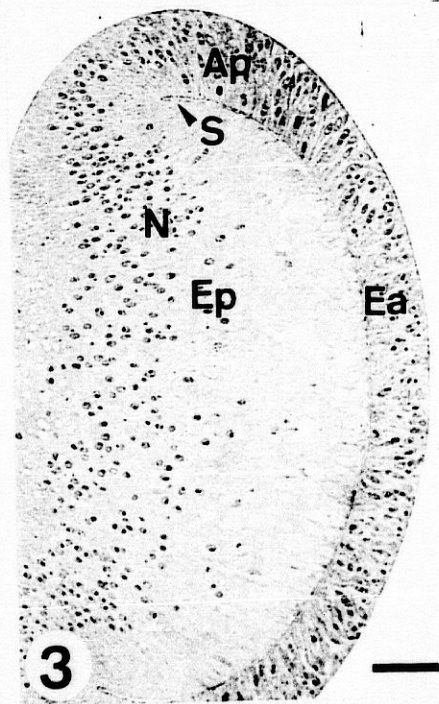
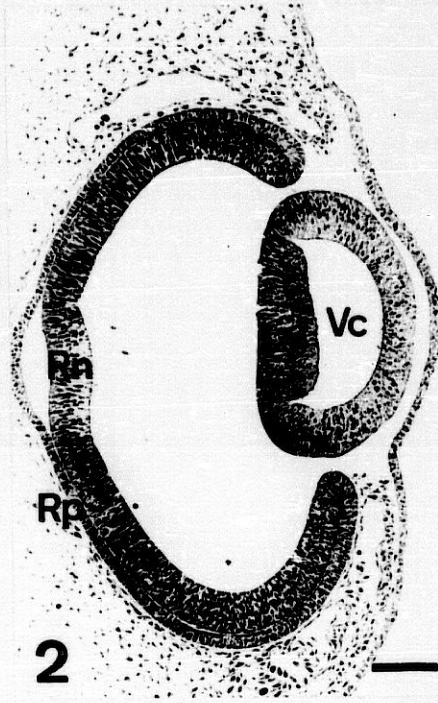
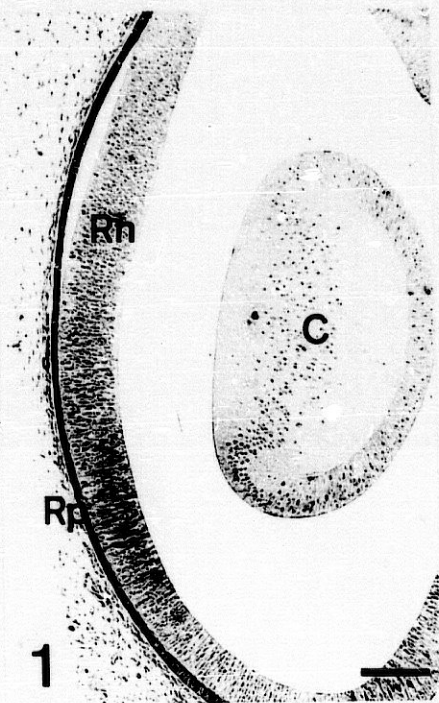
A la vez que crecen las fibras cristalinas, sus núcleos se desplazan a lo largo del citoplasma, en dirección apical, desde posiciones basales. Todo este proceso morfogénico se ve afectado por la acción del etanol, como expondremos a continuación.

Lámina XIV.- Microfotografías de secciones transversales de globos oculares de embriones de 90 horas de incubación

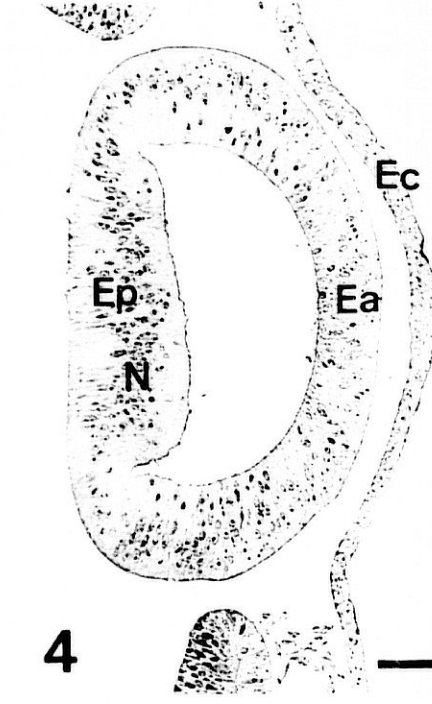
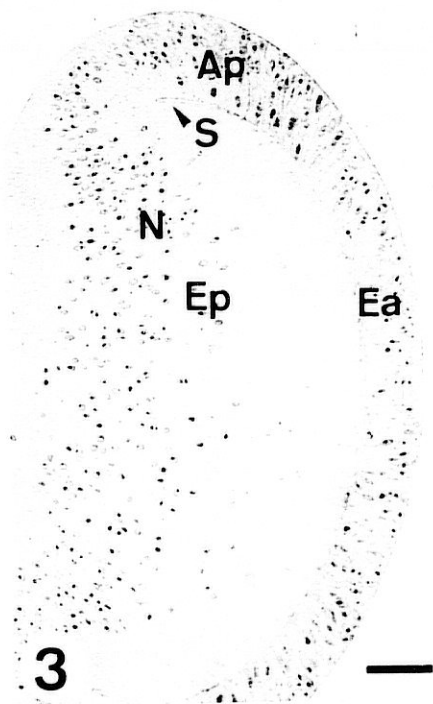
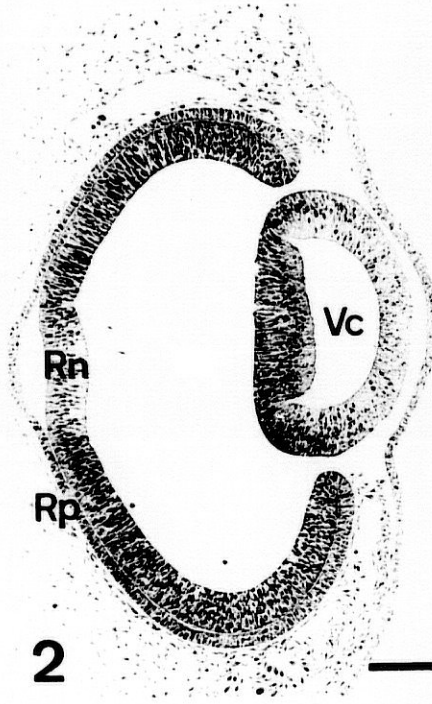
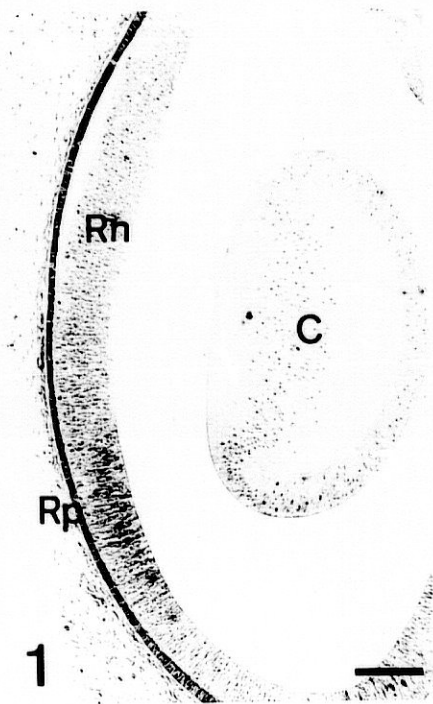
Figuras 1 y 3.- Porción de globo ocular de un embrión control (H.H. 23). Se observa el cristalino (que está luxado a cámara vítrea) como una estructura maciza (C). La retina neural (Rn) aparece gruesa y estratificada, y el estrato externo (Rp) delgado y pigmentado. En el cristalino de la figura 3, se observa como, por crecimiento de las células que formaban el epitelio posterior, solo queda un espacio virtual entre las capas que lo forman, excepto un *sinus* circular periférico (S). El epitelio anterior (Ea) aparece delgado, haciéndose más grueso en la porción ecuatorial, el *annular pad* (Ap). Los núcleos (N) de las células del epitelio posterior (Ep) están ascendiendo, a lo largo del citoplasma, para situarse en porciones centrales.

Figuras 2 y 4.- Globo ocular de embrión tratado (H.H. 18). En relación con los controles de la misma edad, el ojo es mucho más pequeño. El cristalino aún está en fase de vesícula (Vc), pudiéndose observar como las células del epitelio posterior (Ep) están alargándose hacia el interior de la vesícula. El epitelio anterior (Ea) es más grueso. Un epitelio corneal primitivo (Ec) rodea la vesícula cristaliniana.

Figuras 1 y 2: barra = 100 μ m, figuras 3 y 4: barra = 50 μ m.



LAMINA XIV



LAMINA XIV

Tabla 20

Evolución del espesor del Epitelio posterior del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	267,4 \pm 39,7	6	105,8 \pm 22,7	$p \leq 0,001$
114	7	465,7 \pm 53,8	4	354,2 \pm 75,9	$p \leq 0,01$
137	4	516,5 \pm 35,5	4	580,8 \pm 67,6	

Puesto que los núcleos forman una banda en el epitelio posterior, hemos analizado diferentes parámetros en relación con los límites anterior y posterior de dicha banda.

La distancia comprendida entre la cápsula posterior del cristalino y el límite posterior es significativamente menor en los tratados al comienzo de la formación del cristalino (T90 y T114), pues los núcleos ocupan posiciones más basales, como consecuencia de un menor desarrollo.

Epitelio posterior

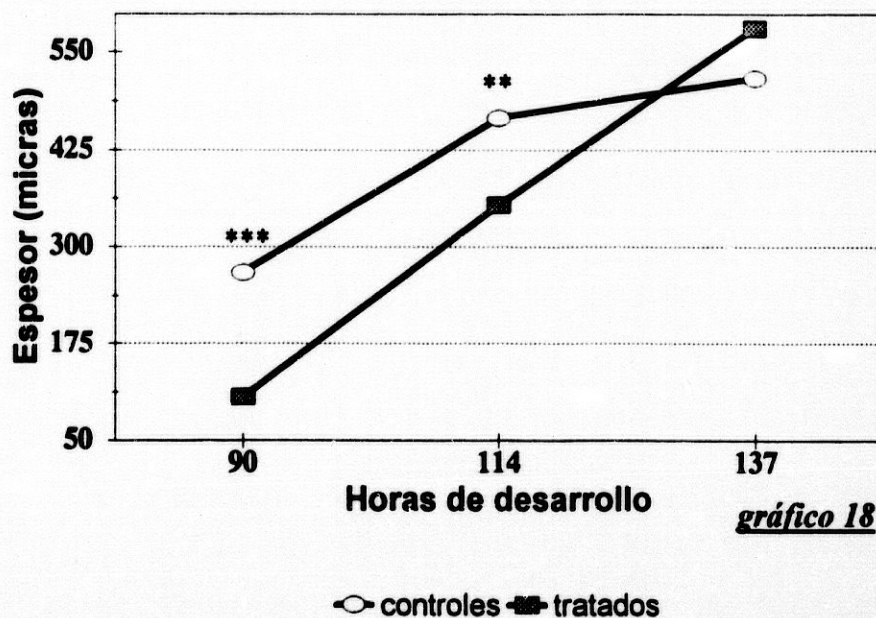


gráfico 18

○ controles ■ tratados

Con posterioridad, esta distancia prácticamente se hace similar en ambos grupos, lo que nos indica que los núcleos ascendieron en menos tiempo (más rápidamente) en los tratados (tabla 21 y gráfico 19).

Tabla 21

Evolución de la distancia entre la cápsula posterior del Cristalino y el límite posterior de la banda de núcleos del E. posterior del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	93,5 \pm 21,8	6	42,1 \pm 11,2	$p \leq 0,01$
114	7	174,0 \pm 41,2	4	108,3 \pm 40,5	$p \leq 0,05$
137	4	215,4 \pm 48,9	4	216,6 \pm 23,1	

A las 90 y 114 h.i., en los cristalinos procedentes de los embriones tratados, la distancia comprendida entre la cápsula posterior y el límite anterior de la banda de núcleos es menor que la medida en los controles. Sin embargo, en la última fase examinada fue significativamente mayor en los tratados con etanol, debido a la mayor dispersión de los núcleos y a un mayor crecimiento de las fibras (tabla 22, gráfico 20).

Tabla 22

Evolución de la distancia entre la cápsula posterior del Cristalino y el límite anterior de la banda de núcleos del E. posterior (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	155,4 \pm 27	6	73,4 \pm 15,4	$p \leq 0,001$
114	7	263,5 \pm 58,9	4	175,4 \pm 51,2	$p \leq 0,05$
137	4	289,7 \pm 35,7	4	365,4 \pm 49,1	$p \leq 0,05$

El espesor de la banda de núcleos en los controles (obtenido como resultado de restar las distancias de la cápsula posterior del cristalino al límite anterior y posterior de la banda de núcleos), aumenta con el desarrollo (pues existía cierta asimetría en el relleno de la vesícula cristaliniiana por parte de las fibras, lo que

Núcleos Cristalino

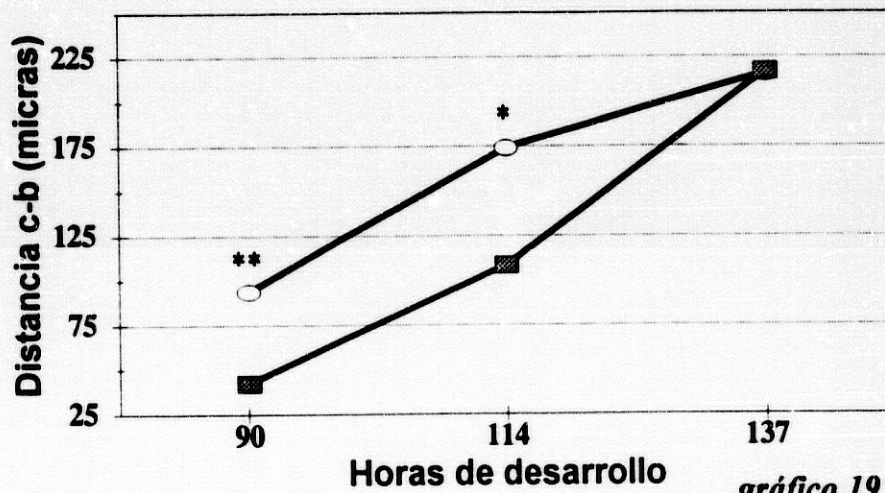


gráfico 19

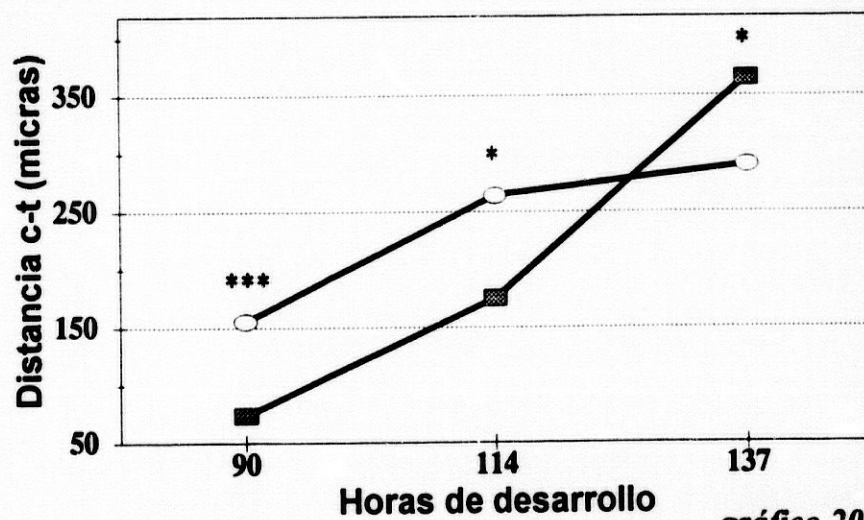


gráfico 20

○ controles ■ tratados

provocó mayor dispersión), para después disminuir, como consecuencia de haberse completado la ascensión de los núcleos. Por el contrario, en los tratados con etanol de 90 h.i., como se puede observar en la figura 4 de la lámina XIV (pág. 99), casi no han empezado a ascender los núcleos, por lo que la banda ocupa posiciones muy basales, y sin apenas espesor, encontrando diferencias significativas entre ambos grupos. Con el desarrollo irá aumentando el espesor, siendo al final del estudio (E137) significativamente mayor en los tratados, por haber crecido más y estar más dispersos (tabla 23 y gráfico 21). Esta dispersión nos podría indicar una alteración en la estructuración definitiva de las fibras del cristalino, aspecto fundamental en la transparencia y elasticidad de éstas.

Tabla 23

Evolución del ancho de la banda de núcleos del E. posterior del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	60,8 \pm 12,9	6	31,4 \pm 6,4	$p \leq 0,001$
114	7	89,5 \pm 29,6	4	67,1 \pm 13,6	
137	4	74,4 \pm 17,7	4	148,7 \pm 36,2	$p \leq 0,01$

Con posterioridad analizamos la distancia de la cápsula posterior del cristalino a la altura media de la banda de los núcleos (obtenida como la media entre las distancias de los límites de la banda de núcleos, tabla 24, gráfico 22).

Tabla 24

Evolución de la distancia entre la cápsula posterior y la línea media de la banda de núcleos del E. posterior del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	124,5 \pm 23,6	6	57,7 \pm 13,0	$p \leq 0,001$
114	7	218,8 \pm 48,6	4	141,8 \pm 45,6	$p \leq 0,05$
137	4	252,6 \pm 41,9	4	291,0 \pm 33,8	

Núcleos

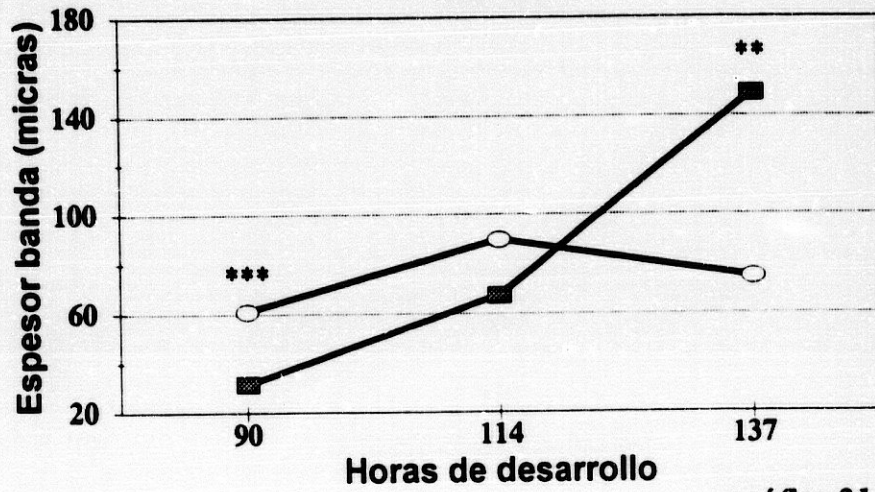


gráfico 21

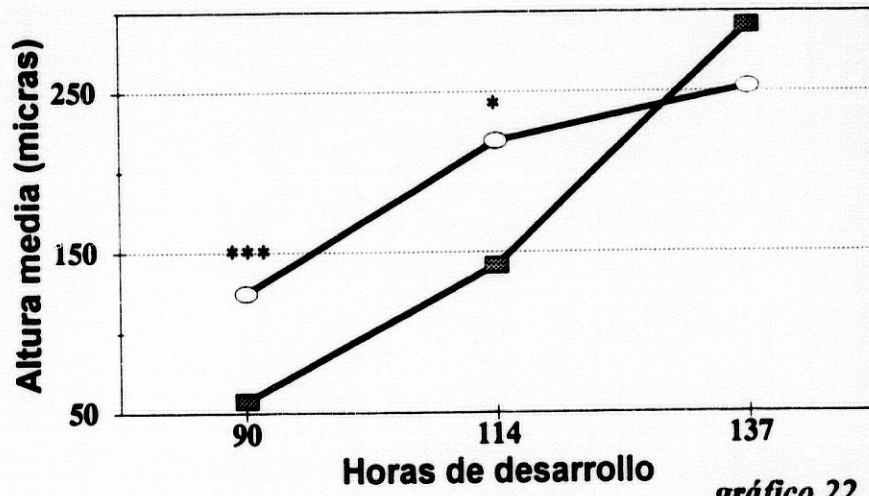


gráfico 22

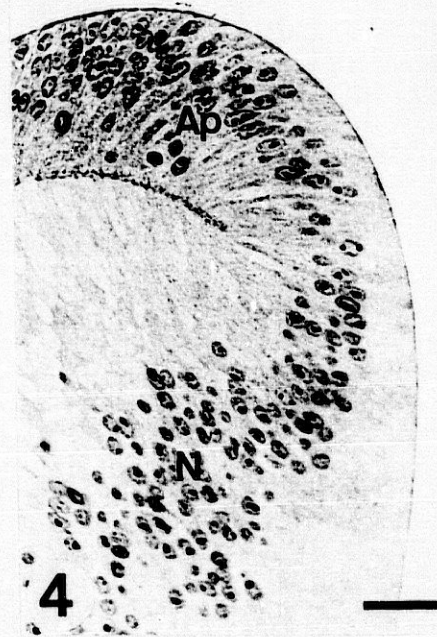
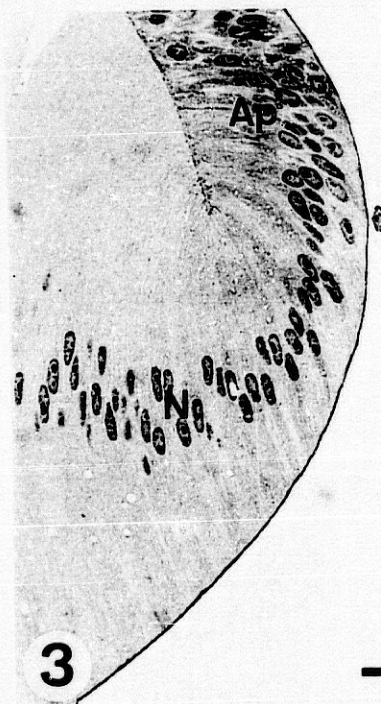
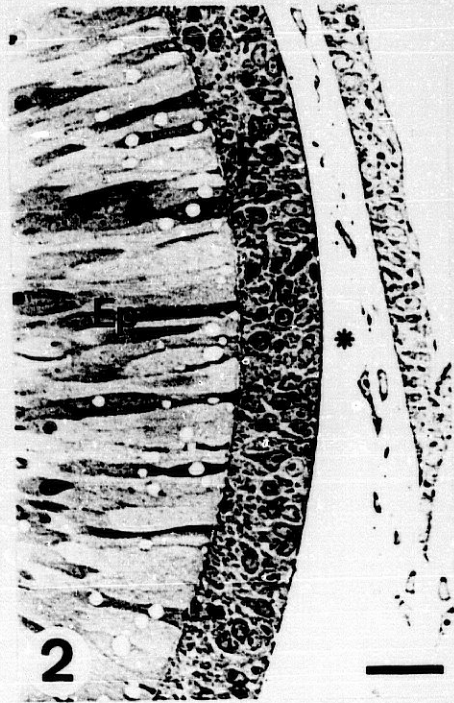
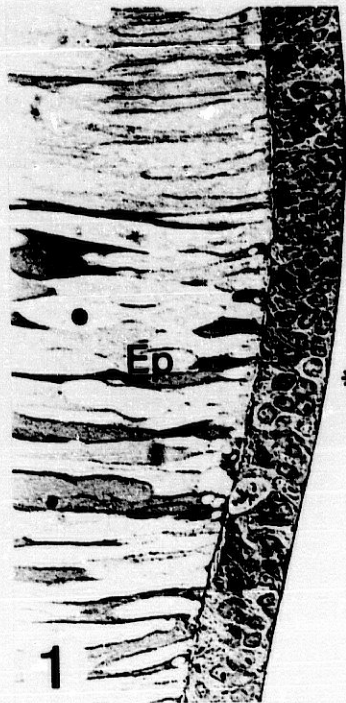
○ controles ■ tratados

Lámina XV.- Microfotografías de secciones transversales de globos oculares de embriones de 114 horas de incubación

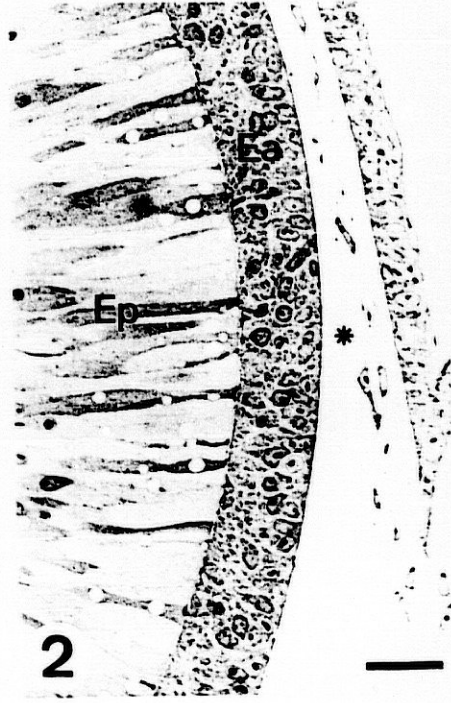
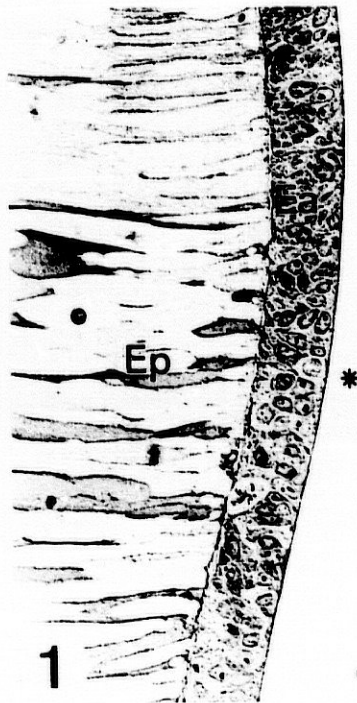
Figuras 1 y 3.- Cristalinos de embriones controles (H.H. 27). En la figura 1 se presenta un detalle de la porción anterior central del cristalino a cuyo epitelio anterior (Ea), que presenta varias capas celulares, llegan las fibras del epitelio posterior (Ep). La curvatura anterior del cristalino (*) es pequeña. En la figura 3 se muestra la porción ecuatorial del cristalino. En esta zona de transición, *annular pad* (Ap), se van transformando las células en fibras, mientras los núcleos (N) van ascendiendo.

Figuras 2 y 4.- Embriones tratados con etanol (H.H. 24). En la figura 2, se observa un detalle de la porción anterior central del cristalino, en la que aparece el epitelio anterior (Ea) más engrosado que el mostrado por los controles, con más capas nucleares y más convexo (*). En la figura 4 se observa como la porción ecuatorial es más gruesa y con más núcleos (N) que la mostrada por los controles, además de existir mayor dispersión en el ascenso nuclear.

Barra = 30 μ m.



LAMINA XV



LAMINA XV

En los resultados apreciamos como la altura media de los núcleos es significativamente menor en los tratados al comienzo de la formación del cristalino, con el desarrollo se iguala, para finalmente hacerse superior.

Esto nos indica que el ascenso de los núcleos comienza antes en los controles, mientras en los tratados, que empezaron más tarde, ascienden en menos tiempo, hasta igualar e incluso superar la altura de los núcleos en los controles.

Con el fin de dilucidar si la acción del etanol sobre el desarrollo de las fibras que componen el cuerpo del cristalino, era exclusivamente efecto de un retraso en el desarrollo, y/o se modificaba su patrón ontogénico, consideramos interesante examinar la relación entre la altura de la línea media de la banda de núcleos (que acabamos de analizar) y el diámetro menor del cristalino. Si solamente existe retraso, esta relación será la misma para los dos grupos, pero desplazada en el tiempo en el grupo de los embriones expuestos al etanol. Si la acción del tóxico ha modificado el patrón de desarrollo del cristalino, la relación será distinta, lo cual debería demostrarse como un desfase entre el ascenso de los núcleos (reflejo del crecimiento de las fibras cristalinas) y el crecimiento del diámetro menor del cristalino.

Tal como se muestra en la tabla 25, gráfico 23, en los controles, esta relación aumentó muy poco en el tiempo, pues casi crecieron simultáneamente ambos parámetros, estabilizándose también a la vez. Sin embargo, en los embriones expuestos al etanol esta relación aumentó con el tiempo más rápidamente, debido a que la velocidad de ascensión de los núcleos, que es mayor en los tratados, no está tan acompañada con el aumento del diámetro axial del cristalino.

Tabla 25

Evolución de la relación entre distancia a la línea media de núcleos del E. posterior / diámetro menor del Cristalino

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	0,39 \pm 0,05	6	0,26 \pm 0,07	$p \leq 0,01$
114	7	0,44 \pm 0,06	4	0,36 \pm 0,07	
137	4	0,47 \pm 0,07	4	0,48 \pm 0,05	

Relación alm / dme

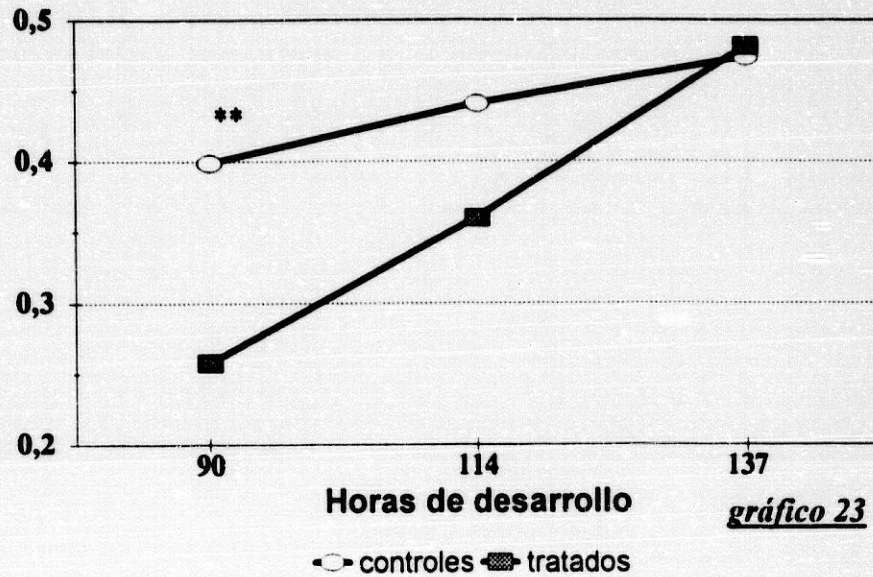


gráfico 23

La pared exterior o distal del cristalino (el epitelio anterior cristalino), cuyo espesor va a ir disminuyendo desde que se formó la vesícula cristalina en ambos grupos, también mostró un comportamiento diferente en los embriones alcoholizados (lámina XV, figuras 1 y 2, y lámina XVI). El espesor del epitelio anterior del cristalino fue siempre mayor en aquellos embriones expuestos al etanol, como se puede apreciar en la tabla 26 y gráfico 24.

Tabla 26

Evolución del espesor del Epitelio anterior del Cristalino (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	44,6 \pm 4,9	6	47,7 \pm 5,6	
114	7	28,1 \pm 2,3	4	32 \pm 4,5	
137	4	16,58 \pm 3,8	4	27,3 \pm 4,7	p<0,01

Conforme avanza el desarrollo, se aprecia un aumento de la diferencia del espesor del epitelio anterior, lo cual nos demuestra una evolución distinta de este epitelio en los embriones tratados, cuyo espesor disminuye más lentamente.

La relación entre los epitelios anterior y posterior, fue significativamente menor

en los embriones tratados. La diferencia entre las relaciones aumentó con el tiempo como consecuencia del mantenimiento del espesor del epitelio anterior en los embriones tratados (tabla 27 y gráfico 25).

Tabla 27

Evolución de la relación Epitelio posterior / Epitelio anterior del Cristalino

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	6,11 \pm 1,48	6	2,25 \pm 0,51	p \leq 0,01
114	7	16,7 \pm 2,7	4	11,5 \pm 3,9	p \leq 0,05
137	4	32,3 \pm 8,1	4	21,6 \pm 3,3	p \leq 0,05

La porción ecuatorial del epitelio anterior, que aparecía engrosada donde se continuaba con la porción lenticular, constituye el epitelio de transición del cristalino, donde las células, provenientes del epitelio anterior, se van transformando en fibras.

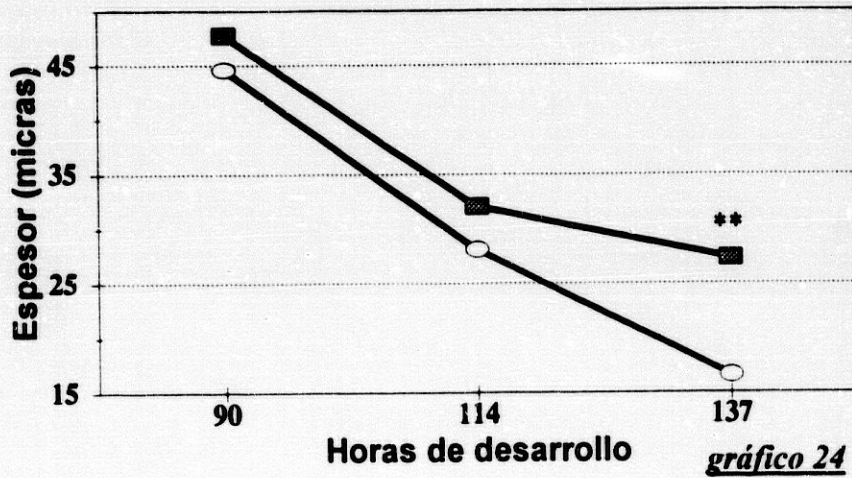
Este engrosamiento se observa por primera vez en los embriones controles de 90 h.i., no observándose en los tratados de la misma edad. El espesor de este engrosamiento ecuatorial del epitelio, denominado *annular pad*, es significativamente menor en los expuestos al etanol al comienzo de su formación (tabla 28, gráfico 26, láminas XIV, XV y XVI, págs. 99, 106 y 117, respectivamente).

Tabla 28

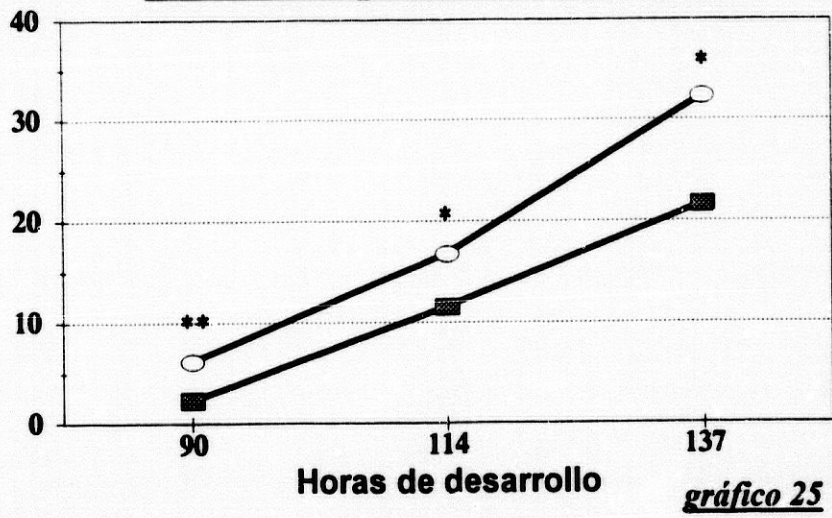
Evolución del espesor del epitelio lateral del cristalino (*annular pad*) (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
90	4	67,5 \pm 5,0	4	53,7 \pm 4,8	p \leq 0,01
114	4	70,2 \pm 2,2	4	81,7 \pm 46,3	
137	4	50,2 \pm 3,7	4	48,2 \pm 2,9	

Epitelio anterior

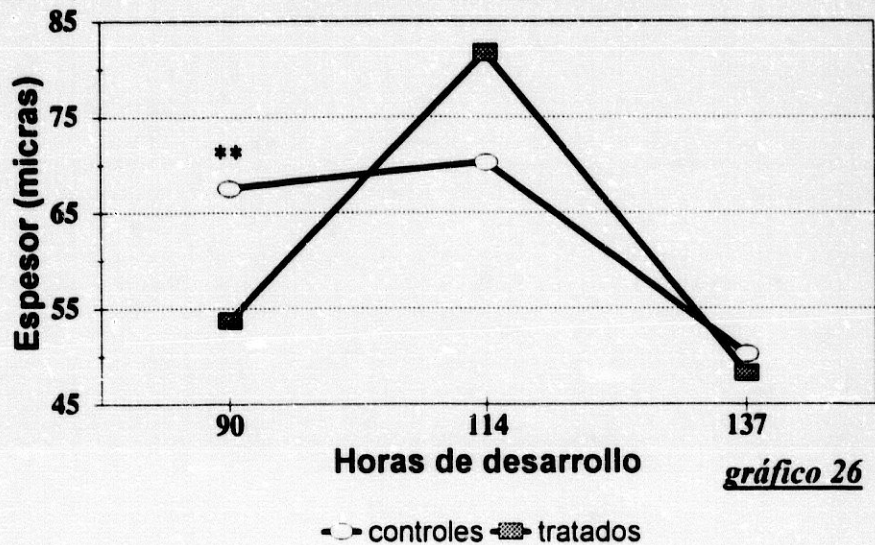


Relación E. posterior / E. anterior



○ controles ■ tratados

Epitelio de transición



III. 3. 3. 3.- La córnea

Durante la vida posnatal, la córnea es una estructura de capas múltiples que, al igual que el cristalino, debe ser transparente y carecer de aberraciones ópticas, para que los rayos de luz lleguen a la retina sin distorsionarse. La córnea madura consta de un epitelio exterior sostenido por una membrana basal, la membrana de Bowman, un endotelio interior, también sustentado por otra membrana basal, la membrana de Descemet, y entre ambas membranas aparece un grueso estroma, que está formado por fibroblastos y capas de fibras de colágeno, que se disponen perpendicularmente.

En los embriones controles, y en general, a partir de las 64 h.i., pudimos apreciar el primordio de la córnea. No así en muchos de los tratados, ya que en esta fase todavía no se había formado. El análisis estructural de los ojos en formación de los embriones controles nos mostró como, al estar desprendiéndose la vesícula cristaliniana de la superficie ectodérmica (H.H. 17), se está formando una capa continua, sobre la anterior, que será el epitelio anterior de la córnea (lámina VIII, figura 1, pág. 74).

Como consecuencia de un desprendimiento más tardío de la vesícula cristaliniana en los embriones expuestos al etanol (T64), comprobamos que este epitelio no estaba formado como tal, existiendo mientras tanto uniones entre el

ectodermo y la vesícula cristalina en formación (en aquellos embriones donde se estaba formando la vesícula, pues algunos otros estaban en fase de placoda, lámina VIII, figuras 2 y 4, pág. 74), que perduraron más que en los embriones controles (lámina XIII, figuras 1, 2, 3 y 4, pág. 96).

Los embriones controles de 90 h.i. presentaban una córnea más evolucionada. Se incrementó la altura de las células basales, las cuales participaron en la secreción de una matriz de colágeno (el estroma primario). Sobre la superficie interna de este estroma primario, acelular, se pudieron apreciar células que, provenientes de las crestas neurales, migraban. El epitelio, aún muy inmaduro, estaba formado por dos capas, superficial y profunda. La capa superficial formada por una fila de células escamosas, y la profunda por dos filas de núcleos redondeados (lámina XIV, figuras 2 y 4, pág. 99).

La córnea de los embriones de 114 h.i., constaba de un epitelio exterior, un endotelio interior y, entre ambos, un estroma que todavía era acelular y que por consiguiente, se sigue denominando primario.

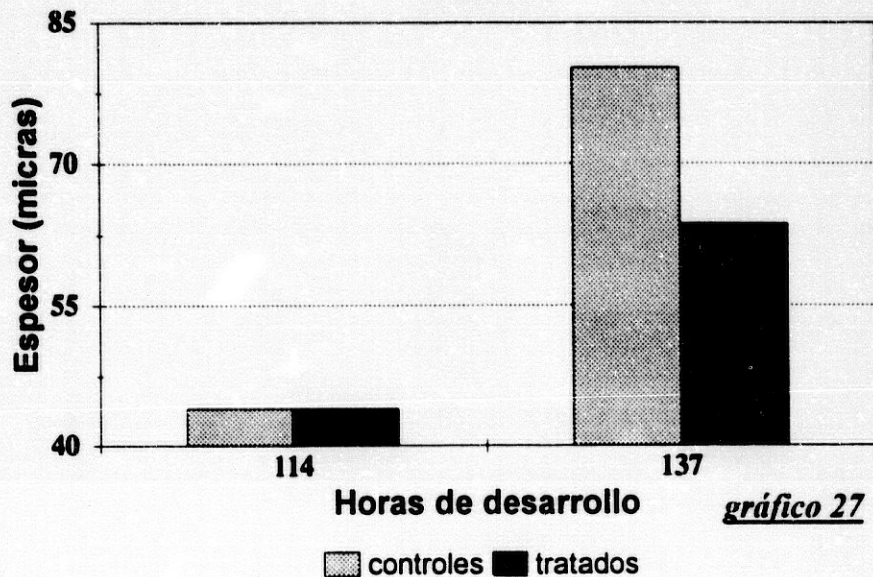
No se encontraron diferencias entre el espesor total de las córneas de los embriones de ambos grupos a esta edad. Si las hubo a las 137 h.i., debido fundamentalmente a la capa estromal, como veremos más adelante.

La tabla 29 y el gráfico 27 nos muestran la evolución de estos resultados, poniéndose de relieve como el crecimiento en espesor de las córneas de los embriones tratados es más lento.

Tabla 29
Evolución del espesor total de la córnea (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
114	6	44,0 \pm 2,2	4	44,0 \pm 4,4	
137	4	80,2 \pm 13,5	4	63,7 \pm 17,6	

Córnea



A las 114 h.i. las células endoteliales habían acabado su recorrido y formaban el revestimiento interno de la córnea, en ambos grupos experimentales. Esto nos indica que la migración de las primeras células, provenientes de la cresta neural (primera "oleada"), se había completado (comenzó en la fase anterior en los embriones controles).

En los controles (H.H. 25), la morfología de estas células está cambiando de escamosa a cuboidea, cambio que está ausente en los embriones expuestos al etanol. El retraso en los acontecimientos morfogénicos, propios de esta capa, explicaría el menor espesor del endotelio en los tratados, como se observa en la tabla 30, gráfico 28. El incremento en espesor es más rápido en los tratados con etanol.

Tabla 30

Evolución del espesor del endotelio corneal (μ)

HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
114	6	$5,0 \pm 0,6$	4	$2,5 \pm 0,5$	
137	4	$7,7 \pm 0,9$	4	$5,5 \pm 0,6$	$p \leq 0,05$

En los controles de 137 h.i. se había completado el cambio morfogénico

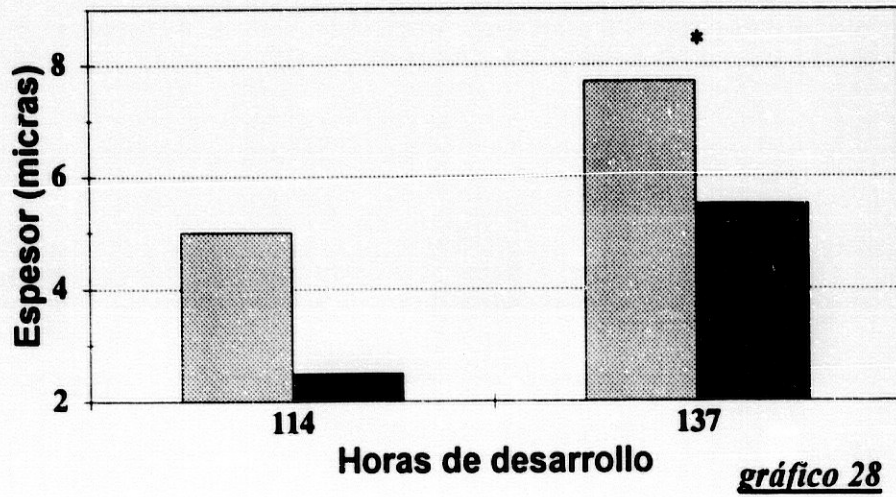
endotelial (lámina XVI, figura 3), no así en los tratados, que aún mostraban las células más escamosas (lámina XVI, figura 4). El estroma de los embriones controles había crecido a consecuencia de la síntesis de grandes cantidades de ácido hialurónico (que posteriormente se hidratará). Esta matriz henchida es un substrato adecuado para la migración celular de los fibroblastos, provenientes de la cresta neural, que ya aparecen en estas córneas. Invaden el estroma primario para comenzar a dividirse en su interior y formar el estroma secundario, H.H. 30 (lámina XVI, figuras 1 y 3). No contenía fibroblastos el estroma de la córnea de los embriones tratados con etanol, que presentaba características típicas de un estroma primario, siendo de menor grosor (lámina XVI, figuras 2 y 4).

Tabla 31
Evolución del espesor del estroma corneal (μ)

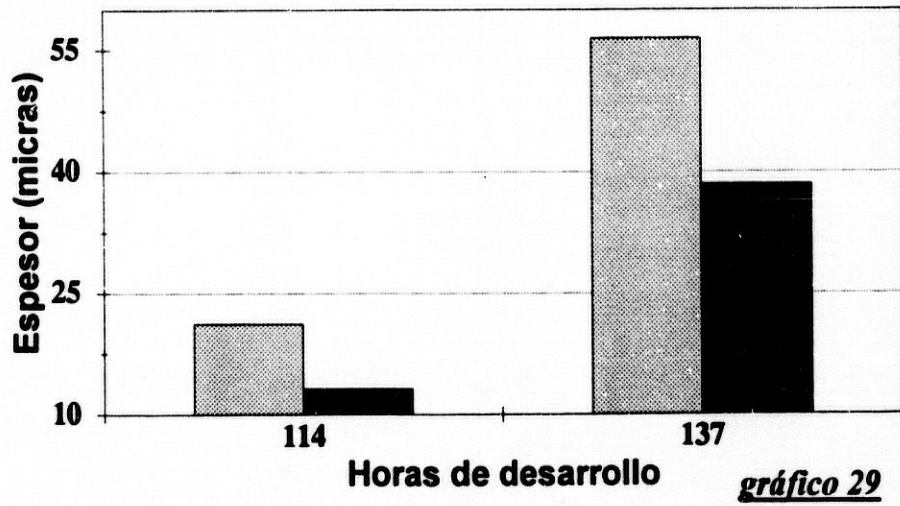
HORAS DE DESARROLLO	Controles		Tratados		Significatividad
	n	$\bar{x} \pm ds$	n	$\bar{x} \pm ds$	
114	6	21,2 \pm 1,9	4	13,2 \pm 3,7	
137	4	56,5 \pm 19,1	4	38,5 \pm 18,8	

El espesor del estroma corneal, tal como se muestra en la tabla 31, gráfico 29, aumenta rápidamente en ambos grupos. Sin embargo, comparando los resultados obtenidos para ambos grupos, observamos que en los expuestos el estroma está menos desarrollado, quizás como consecuencia de una menor síntesis de colágeno.

Endotelio corneal



Estroma corneal



■ controles ■ tratados

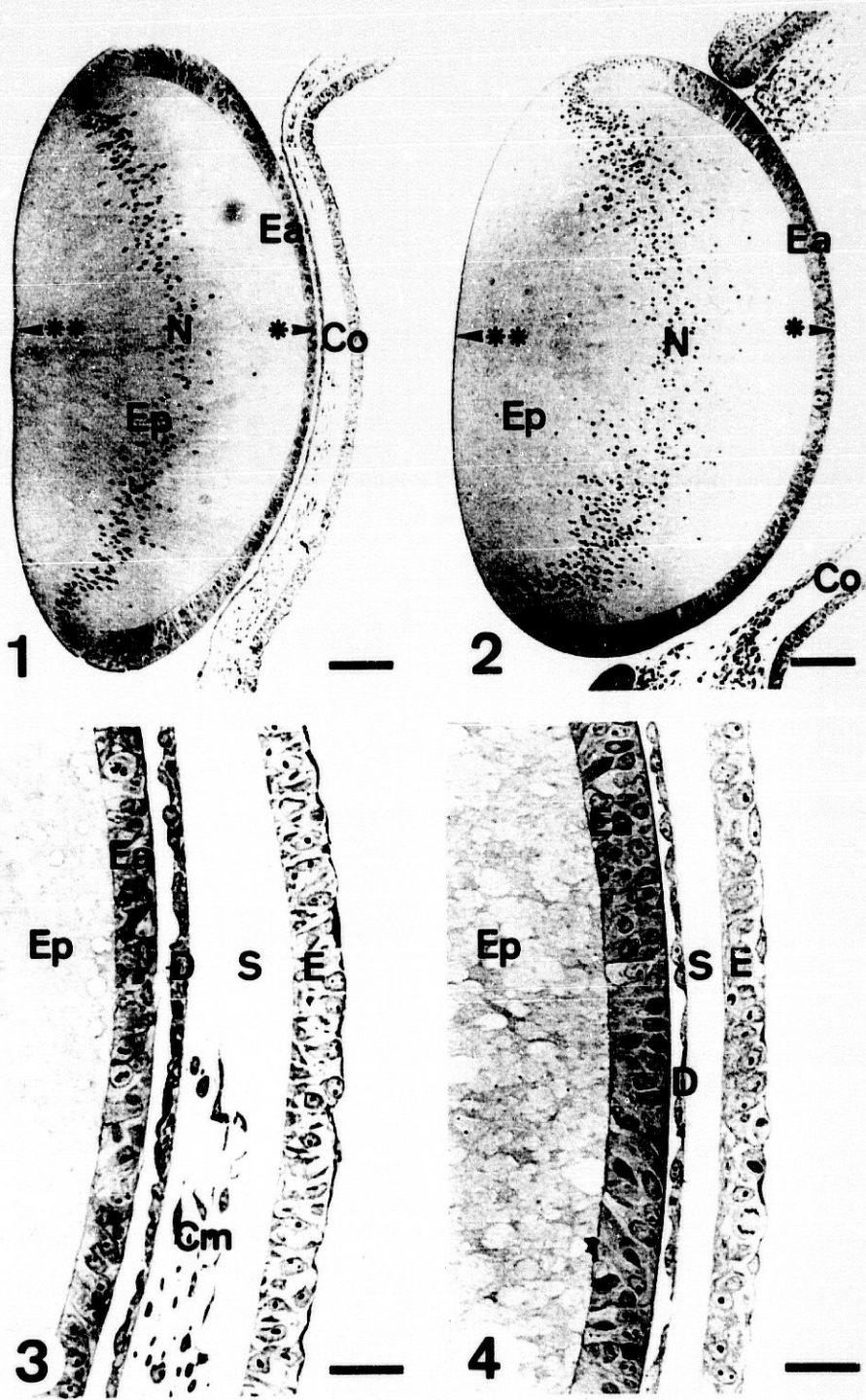
Lámina XVI.- Microfotografías de secciones transversales semifinas de globos oculares de embriones de 137 horas de incubación

Figuras 1 y 3.- Cristalino y córnea de un embrión control (H.H. 29). Las caras anterior (*) y posterior (**) del cristalino son menos convexas que en estadios anteriores. El epitelio anterior (Ea), que ha ido adelgazándose, es plano y lo forman dos filas nucleares. Los núcleos (N) del epitelio posterior (Ep) están centrados, formando un arco de convexidad anterior. La córnea (Co) presenta 3 capas: el epitelio (E), con dos capas celulares, el estroma (S), que es secundario por contener células mesoblásticas (Cm) invadiendo las fibras de colágeno, y el endotelio (D).

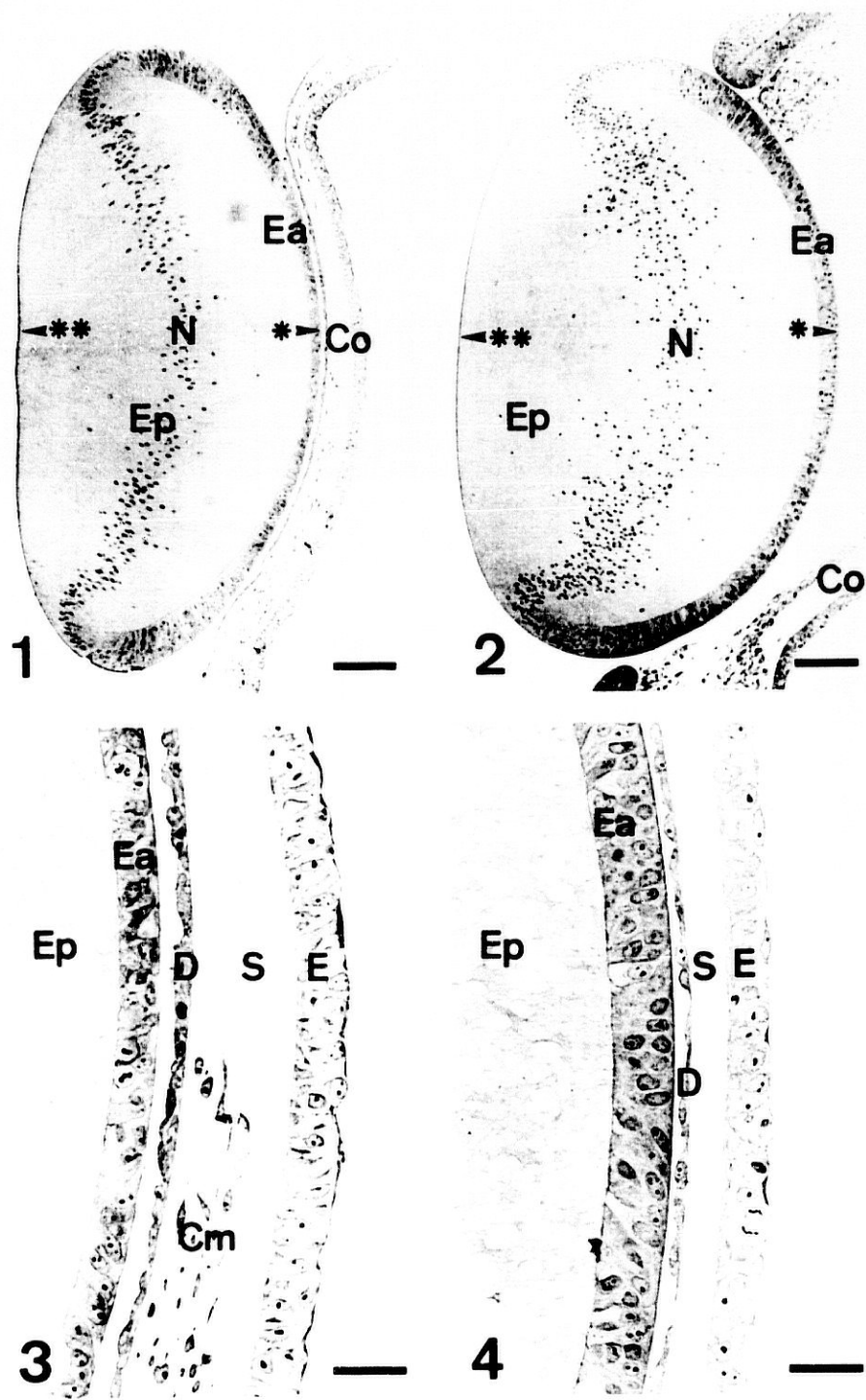
Figura 2.- Cristalino de un embrión de la misma edad, tratado con etanol (H.H. 27). Se observa que presenta un diámetro vertical más pequeño, mientras que las curvaturas anterior (*) y posterior (**), el espesor del epitelio anterior (Ea), y el diámetro anteroposterior del cristalino, son mayores. Los núcleos (N) de las fibras cristalinas del epitelio posterior, aparecen más dispersos que aquellos de los embriones no expuestos al etanol.

Figura 4.- Córnea y porción anterior del cristalino de un embrión tratado (H.H. 27). La córnea es más delgada, fundamentalmente por poseer un estroma (S) menos desarrollado, que todavía es primario (acelular). El endotelio corneal (D) también es más delgado, por no haberse completado el cambio citomorfológico característico de esta capa. Obsérvese como el epitelio anterior (Ea) del cristalino es más grueso que el de los controles de la misma edad.

Figuras 1 y 2: barra = 100 μ m, figuras 3 y 4: barra = 30 μ m.



LAMINA XVI



LAMINA XVI

IV.- Discusión

IV. 1.- El etanol en el embrión

El etanol depositado sobre la membrana interna de la cáscara, antes de comenzar la incubación, difunde pasiva y rápidamente alcanzando el embrión un poco después de la inyección (Bruyere, H.J y Kapil, R.P., 1990). Con posterioridad, a las 50-60 h.i. (H.H. 17), y tras la puesta en marcha del corazón, entra en el torrente circulatorio a través de los principales vasos sanguíneos (vena vitelina anterior, *sinus terminalis* y arteria onfalomesentérica), de tal modo que los diferentes tejidos embrionarios evolucionan bajo la acción del alcohol, al menos hasta el 11º día de incubación (Molina, F. y cols. 1992).

Respecto a los sistemas de eliminación del etanol, a lo largo de nuestra experiencia, haciendo la salvedad de que una pequeña parte del etanol inyectado en la cámara de aire pueda eliminarse lentamente por difusión pasiva a través de la cáscara (Pennington, S.N., 1988), la actividad ADH no es patente hasta pasado el 9º d.i., y la contribución de otras rutas coadyuvantes (MEOS) es inapreciable (Wilson, R.W. y cols., 1984). Descartamos con ello la importante intervención indirecta de los metabolitos del etanol (tal como el acetaldehído), característica de los mamíferos (Jones, K.L. y Smith, D.W., 1973, Korsten, M.A. y cols., 1975, O'Shea, K. y Kaufman, M., 1979, Sreenathan, R. y cols., 1982). Por lo tanto, nos estamos refiriendo, exclusivamente, a la acción tóxica directa del etanol sobre la embriogénesis y ontogenia ocular.

IV. 2.- Acción embrio- y neurotóxica

El etanol, administrado en los primeros estadios del desarrollo embrionario, tiene serias repercusiones teratológicas, tan severas que, en algunos casos -cuando se afectan procesos o partes implicados en esos momentos en determinadas funciones vitales-, conducen inexorablemente a la muerte.

La diferente sensibilidad de los embriones a la acción del etanol fué ya descrita por Gee, W., en 1916, quien observó que una dosis letal para algunos embriones de pollo, en otros sólo producía efectos de poca consideración.

En la mujer, el consumo abusivo de alcohol durante el primer trimestre de embarazo (particularmente desde la segunda a la octava semana) se ha relacionado con una mayor frecuencia de abortos espontáneos y muerte perinatal, cuyos niveles de incidencia aún no son bien conocidos (Jones, K.L. y cols., 1973, 1974, Olegard, R. y cols., 1979, Hoyseth, K.S. y Jones, J.H., 1989). Autores como Miller, N.S. y Gold, M.S., en 1993, señalan que los abortos espontáneos durante el segundo trimestre de la gestación, son aparentemente tres veces más frecuentes en mujeres bebedoras.

Nuestros resultados experimentales muestran que, debido a la acción directa del etanol, aumentan los niveles de mortalidad a lo largo de todo el desarrollo embrionario (en concordancia con Stockard, C.R., 1910, Gee, W., 1916, Sandor, S. y Elias, S., 1968), aunque especialmente en dos períodos. El primero de ellos comprendido entre los 0 y 4 d.i. (H.H. 1-23), que abarca casi toda la organogénesis. El segundo, menos importante, ocurre en épocas perinatales, entre el día 19 (H.H. 45) y la eclosión (H.H. 46), etapa en la que la falta de desarrollo o crecimiento adecuado de algunos individuos, les impide afrontar, con éxito, el esfuerzo necesario para la eclosión.

Entre la mortalidad pre o perinatal (a la que nos acabamos de referir) y determinados trastornos neurológicos, a veces tan sutiles que no se acompañan de otras anomalías físicas (el otro extremo), la clínica demuestra que existe todo un abanico de alteraciones, diversos grados de SAF, o EFA, que son el resultado de la combinación e interacción de tres variables: el genotipo (o susceptibilidad genética), la dosis, y el momento de la exposición al etanol. Para algunos autores (Jones, K.L. y cols., 1974), el porcentaje de niños de madres alcohólicas con el SAF "completo" es

de aproximadamente un 40%. Olegard, R. y cols., en 1979, señalan para Suecia, un riesgo aproximado del 30%, lo cual coincide bastante bien con los 32 de cada 100 niños nacidos de madres alcohólicas, propuestos por Lamache, M.A. (1967).

En un intento de normalización, el Fetal Alcohol Study Group de la Research Society on Alcoholism (Rosett, H., 1980), recomienda que el diagnóstico de SAF debe hacerse solo cuando el paciente presenta signos en cada una de las siguientes tres categorías de alteraciones: a) retraso en crecimiento prenatal o postnatal (peso, talla o perímetro cefálico debajo del percentil 10 para su edad gestacional), b) afectación del SNC, signos de anomalías neurológicas, retraso del desarrollo o retraso mental, y c) dismorfismo facial característico (Streissguth, A.P. y cols., 1978), con al menos dos de los siguientes signos: microcefalia, microftalmía y/o fisura palpebral pequeña, *filtrum* poco desarrollado, labio superior grueso e hipoplasia maxilar.

El retraso del crecimiento, antes y después del nacimiento, es una de las alteraciones más frecuentes que se asocian con la exposición prenatal al etanol. Con frecuencia se ha discutido, tanto desde un punto de vista clínico como experimental, la hipótesis de si el alcohol *per se* es responsable del citado efecto, o bien es secundario a otros factores de riesgo relacionados con el consumo de etanol, tales como el estado insalubre de la madre y el consumo de otras drogas, entre otros.

Experiencias de nuestro laboratorio, en fase de publicación, indican que una sola dosis de etanol (similar a la utilizada en este trabajo), administrada en el día 0, induce en el embrión de pollo una significativa disminución de su peso, entre los días 13 y 19 de incubación. El ritmo de ganancia de peso de los embriones tratados es regularmente inferior al de los controles en ese período. Entre los 19 y 21 días de incubación, la trascendencia del retraso somático es tal, que los embriones demoran importantes aspectos fisiológicos, como el de reabsorción del saco vitelino -razón por la que siguen creciendo en peso durante estos días-, o como el inicio de la ventilación pulmonar, lo que provoca que se retrase el día de la eclosión (retrasos de hasta 48 horas). Las repercusiones funcionales más dramáticas de los citados retrasos, tienen su primera manifestación en el incremento de la mortalidad perinatal, a la que ya nos hemos referido.

Mientras que algunas de las alteraciones somáticas mencionadas pueden ser

reversibles con una buena terapia, las alteraciones que afectan al SNC, incluida la porción sensorial del ojo, son irreversibles (Aronson, M. y Olegard, R., 1985). El examen anatómopatológico de cerebros de niños expuestos al etanol en épocas prenatales, y que murieron en períodos perinatales, pone de manifiesto la más nociva acción neuropatológica del alcohol, describiéndose anomalías entre las que destacan fusión de *girus* corticales, desarrollo cortical incompleto, ventrículos laterales dilatados, agenesia del cuerpo caloso, y subdesarrollo del cerebelo, entre otros (Abel, E.L., 1986). Si pensamos en una acción del etanol ¿menos agresiva?, no podemos olvidar estimaciones que indican que entre un 10 y un 20% de los retrasos mentales tienen su origen en la bebida de alcohol en período gestacional.

Distrofias pre y postnatales, microcefalia e hipoplasia cerebral van asociadas de modo característico a la acción teratógena del etanol, tanto en el hombre (Jones, K.L. y Smith, D.W., 1973, Pierce, D.R. y West, J.R., 1986, Leonard, B.E., 1988) como en animales de experimentación (Abel, E.L., 1978, Díaz, J. y Samson, H.H., 1980) o pollo (Sandor, S. y Elias, S., 1968, Boyd, J. y cols., 1984, Pennington, S.N., 1988).

Se han postulado muchos mecanismos para explicar esta acción negativa sobre el SNC: muerte celular y reducción de la proliferación celular (Miller, M.W., 1986, 1989), inhibición y fallos en la migración neuronal y glial, alteraciones de la membrana neural y sináptica (Guerri, C. y Grisolia, S., 1983, Lyon, R.C. y Goldstein, D.B., 1983, Guerri, C., 1987, Harris, R.A. y cols., 1987), modificación de la composición glicoprotéica, sitios de reconocimiento, receptores específicos, o de la actividad ATP-ásica (Guerri, C. y cols., 1978, Guerri, C. y Grisolia, S., 1982, Noronha, A.B. y Druse, M.J., 1982, Rudeen P.K. y Guerri, C., 1985, Marqués, A. y Guerri, C., 1988), entre otros.

A lo largo de la gestación, el SNC atraviesa por diferentes etapas de desarrollo, en el curso de alguna de las cuales el crecimiento del cerebro es especialmente susceptible a influencias teratógenas (Wilson, J.G., 1973). A pesar de que no existen evidencias de la existencia de algún período más vulnerable a la acción específica del etanol, una de las hipótesis más aceptada propone como período extremadamente crítico el conocido como "brain growth spurt period", el momento de mayor crecimiento estructural y funcional del cerebro, que en el hombre comprende los 3 últimos meses

antes y el primero después, del nacimiento (Dobbing, J., 1968, 1974, Dobbing, J. y Sand, J., 1979).

Para el embrión de pollo, Romanoff, A.L., en 1960, propone que el desarrollo morfogénico del cerebro ocurre esencialmente en tres fases. La primera, o fase temprana, que se extiende hasta el 4º-5º día de incubación, comienza con la diferenciación de la placa neural y acaba con el establecimiento de estructuras relativamente simples y su evolución hacia la formación de las diferentes partes del encéfalo, caracterizándose por el crecimiento y proliferación propios de una activa neurogénesis y neuroorganización (Brodie, Ch. y Vernadakis, A., 1990). En la segunda fase, los cambios se deben a la evolución de la citoarquitectura definitiva, a través de procesos como la diferenciación y proliferación. Al final de este período (día 12 de incubación), las características esenciales del encéfalo adulto están presentes. El último período se caracteriza, fundamentalmente, por un crecimiento continuado del cerebelo y de los hemisferios cerebrales (brain growth spurt).

Aunque en estudios previos ya encontramos que el peso encefálico de los embriones tratados con etanol era significativamente inferior al de los controles entre los días 13 y 21 de incubación, lo que está de acuerdo con la característica hipoplasia encefálica, en esta experiencia nuestros resultados se refieren, exclusivamente, a la acción directa del etanol sobre la primera fase (de organogénesis, crecimiento y proliferación) de la ontogenia del SNC.

En este período, y en aquellos genotipos que sobreviven, el tejido nervioso se adapta a la presencia de etanol en su micromedioambiente a costa de la imposición de un menor ritmo de crecimiento, respecto a los controles, que ocurre en la gran mayoría de los tratados y a lo largo de toda la experiencia. Parece lógico pensar que este desfase espacio-temporal de la organogénesis del SNC, afecte procesos eminentemente de carácter inductivo y proliferativo que, en condiciones normales, están perfectamente determinados y regulados, y cuya alteración se podría muy bien relacionar con numerosas minusvalías nerviosas características del SAF.

IV. 3.- Acción tóxica sobre el ojo en formación

Aunque aparentemente las anomalías faciales de los afectos de SAF sean

clínicamente menos relevantes, son las primeras que llamaron la atención. Algunos autores (Majewski, F., 1981) consideran que esta facies es tan característica que incluso permite hacer el diagnóstico de alcoholismo de la madre. Clarren, S.K. y Smith, D.W., 1978, piensan que las hendiduras palpebrales más cortas son una de las anomalías faciales más frecuentes asociadas al síndrome, y que indican una deficiencia del crecimiento de los ojos. El menor crecimiento de los ojos induce la presencia de microftalmía en algunos niños afectados, que se reconoce como signo característico del SAF (Roset, H., 1980).

Los datos publicados no proporcionan una idea exacta de cual es la incidencia de microftalmía en animales expuestos al etanol. Así, Cook, C.S. y cols., en 1987, con un modelo de ratón, obtiene un 46% de fetos con los ojos más pequeños de lo normal. Clarren, S.K. y cols. en 1990, estudiando el efecto de dosis crecientes de etanol en macacas grávidas encuentran que 3 de los 26 animales expuestos presentan microftalmía. Pinazo-Durán, M.D. y cols., en 1993, trabajando con ratas, hallan una disminución del peso ocular en los descendientes de madres alcoholizadas. No hemos encontrado información cuantitativa acerca de la microftalmía en afectos de SAF. Por otra parte, y según Strömmland, K., 1985, es difícil valorar la microftalmía en clínica, señalando la presencia de 2 ojos de tamaño claramente anormal en los 30 niños estudiados. Chan, T. y cols., 1991, describen en un caso analizado (de un total de 8) la presencia de microftalmía.

No hemos encontrado estudios que analicen la acción del etanol sobre el tamaño de los ojos en el período embrionario, y cuantifiquen las diferencias. Nuestros resultados muestran que los embriones expuestos al etanol presentan unos ojos claramente más pequeños durante el desarrollo. En relación con los controles, y a lo largo del período que abarca nuestro estudio, nuestra investigación indica que los globos oculares de los embriones tratados poseen un menor crecimiento mientras se desarrollan, que de mantenerse en el tiempo acabaría en una microftalmía. Este menor crecimiento tiene lugar en plena fase proliferativa, y cuando más rápidamente se multiplica el tamaño ocular.

Aunque se sabe que el etanol retrasa el crecimiento embrionario, no conocemos la existencia de trabajos que estudien como afecta este retraso al desarrollo ocular. En

nuestra experiencia encontramos un menor desarrollo ontogénico de los ojos de los embriones tratados durante todo el período investigado. Esta acción del etanol no provoca el mismo efecto sobre el desarrollo ocular en todos los embriones expuestos, como ya ocurriera con el desarrollo embrionario.

Podemos decir que la afectación ocular por la exposición temprana al etanol, al igual que ocurría con el embrión, está regida por las tres variables: genotipo, momento y dosis.

La interacción del genotipo con el medio ambiente (intoxicación alcohólica), explicaría la variedad de fenotipos (patologías oculares) descritos por diferentes autores, y que forman parte del SAF. Así, la mayoría de los casos publicados por Miller, M.T. y cols. (1981, 1984), se refieren a individuos de raza negra, mientras que los presentados por Strömmland, K. (1987) y Chan, T. (1991), son caucásicos. El substrato genotípico puede, por tanto, ser responsable, en cierta medida, de los diferentes grados de susceptibilidad al etanol, y en consecuencia explicar las diferentes patologías características del fenotipo clínico del SAF.

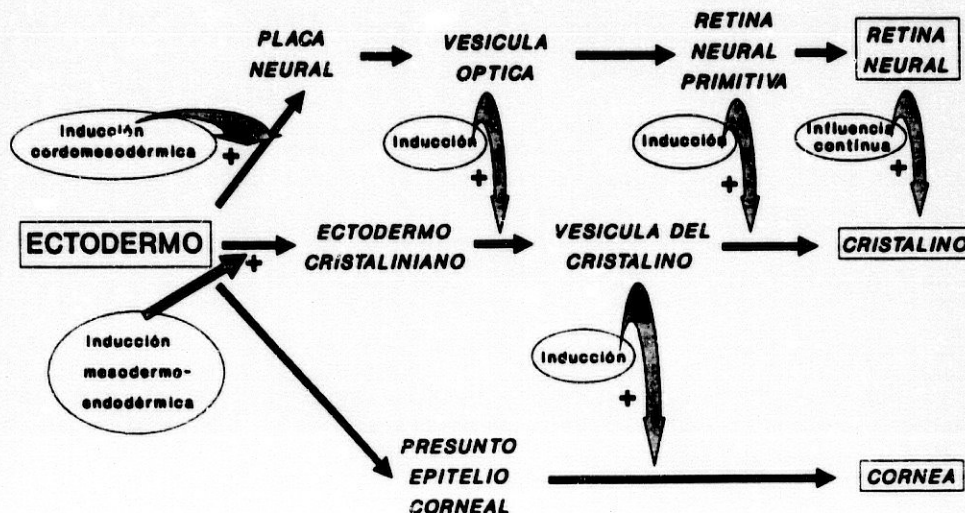
Un segundo factor a considerar es el momento del desarrollo ontogénico en el que ocurre la agresión. En el hombre, uno de los períodos ontogénicos vulnerables al etanol abarca los primeros estadios después de la concepción, siendo característicos de este período los dismorfismos faciales provocados por un gran abuso maternal del alcohol (Ernhart, C.B. y cols., 1987). Estudios experimentales señalan a la gastrulación como la fase embrionaria más susceptible a la acción teratógena del etanol, en lo que concierne al ojo en desarrollo y a la vía visual (Sulik, K.K. y Johnston, M.C., 1983, Sulik, K.K. y cols., 1983, Kennedy, L.A. y Elliot, M.J., 1986, Cook, C.S. y cols., 1987).

El tercer factor es la concentración de etanol en el embrión, que sería responsable, en gran medida, de la gravedad del daño ocular. Aún no se ha determinado la cantidad mínima de alcohol ingerido durante el embarazo, que pueda ser responsable de una acción teratógena, entre otras cosas por la diferente susceptibilidad genotípica. Los casos descritos en clínica tienen en común un gran abuso maternal de alcohol, sobre todo durante el primer trimestre del embarazo.

La embriogénesis de la porción sensorial del ojo (como parte integrante del SNC) comprende una serie de procesos de desarrollo fundamentales, que podrían

verse afectados por agentes externos de distinta naturaleza (por ejemplo, químicos).

ESQUEMA 1



Estos procesos fundamentales son los siguientes: 1) la inducción, que abarca tanto la inducción primaria de la placa neural como las inducciones secundarias que emanan del cerebro y afectan al ojo (esquema 1), 2) la proliferación, en respuesta a las inducciones primarias como prelude a la morfogénesis y el crecimiento de porciones específicas del sistema nervioso, 3) la comunicación celular y la adhesión de células semejantes, 4) la migración celular, de la cual existe una serie asombrosa de ejemplos en varias etapas y regiones, 5) la diferenciación neuronal y de las células gliales, incluyendo la maduración funcional y estructural, 6) la formación de conexiones específicas entre grupos de neuronas, 7) la estabilización o eliminación de conexiones interneuronales que ocasionan la muerte de células inconexas, y 8) el desarrollo de la función neural integrada, que permite al embrión y recién nacido realizar actividades coordinadas (Carlson, B.M., 1990).

De estos procesos estamos interesados en los cinco primeros, de los que depende el desarrollo temprano de muchos de los componentes del ojo en el período que abarca nuestro estudio y los cuales se podrían alterar por la presencia del etanol.

Como parte más noble del ojo, la retina, en caso de dañarse su desarrollo por acción del etanol, tendría una gran repercusión funcional. El desarrollo de la retina y sus conexiones centrales no solo implican la diferenciación de un tejido neural muy

complejo, sino que además constituye uno de los casos mejor comprobados de integración entre las partes embrionarias entre sí.

A partir de la placa neural, que se origina por una inducción cordomesodérmica (inducción primaria) del ectodermo, se forman las vesículas ópticas, de las cuales proceden ambas capas de la retina (esquema 1). Si las evaginaciones ópticas tempranas son destruidas no habrá una regeneración del ojo de la región prosencefálica. Las capas sensorial y pigmentaria de la retina se determinan en el temprano estadio de 6 a 8 somitos, no pudiendo constituirse una a expensas de la otra. Sin embargo, hasta los estadios 12 a 14 somitos cada capa tiene la capacidad de regenerarse de sí misma.

Como hemos mencionado con anterioridad, existe poca información del posible efecto del etanol en estas etapas tan tempranas del desarrollo ocular. En un modelo de ratón, Sulik, K.K. y cols., en 1983, comprueban que el etanol induce cambios teratogénicos en el prosencéfalo. Estudiando esta acción durante la gastrulación, Cook, C.S. y cols., en 1987, también en un modelo de ratón, indican que este tóxico ocasiona una deficiencia en el cerebro anterior que provoca la formación de un surco óptico pequeño y, por lo tanto, unas vesículas ópticas pequeñas. La orientación de la vesícula óptica, y su aposición a la superficie ectodérmica en los embriones expuestos al etanol, fue anormal en comparación con los embriones controles de su tiempo de gestación. Esta circunstancia provocó una localización más inferior de la vesícula óptica y la placoda cristaliniiana, en los embriones de 10 días. Las hipótesis que plantean para explicar sus resultados son: 1) la exposición al etanol podría afectar el desarrollo del mesodermo procordal, responsable de la inducción del neuroectodermo que formará el cerebro anterior, y consecuentemente retrasar la inducción, o bien alterarla, 2) puede haber una acción directa sobre el neuroepitelio, responsable de una disminución en la proliferación celular, o bien un aumento de la muerte celular.

Nuestra investigación indica que, en efecto, el etanol podría interferir el proceso de inducción. Lo observamos en las vesículas ópticas de los embriones de 40 horas, en el sentido de provocar un retraso en la inducción o bien una alteración de ésta. Las vesículas ópticas de los embriones expuestos al etanol estaban menos diferenciadas e incluso, en algunos casos, no estaban formadas como tal.

Estas vesículas ópticas atrasadas, más pequeñas y con menor área de contacto con el ectodermo, son similares a las obtenidas por Cook, C.S. y cols., en 1987. Nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis fisiopatológica expresada por estos autores, según la cual la exposición al etanol podría afectar el desarrollo del mesodermo procordal, responsable de la inducción del neuroectodermo que formará el cerebro anterior y, consecuentemente, retrasar o alterar el proceso de inducción. Todo ello sin olvidar que también puede haber una acción directa sobre el neuroepitelio, probablemente responsable de una disminución de la proliferación celular, aunque la hipótesis de un aumento de la muerte celular no la hemos contrastado con nuestros resultados. Con nuestro modelo, además, podemos asegurar que los efectos descritos son consecuencia directa del etanol, argumento más difícil de demostrar con un modelo de mamífero.

A la vista de estos resultados, es importante remarcar que el período vulnerable o crítico del desarrollo ocular podría ser anterior a la formación de estructuras oculares identificables, cuyo período gestacional equivalente en la especie humana sería tan precoz, que muchas mujeres aún no sabrían que están embarazadas.

Se tiene muy poco conocimiento del efecto de la exposición al etanol sobre la retina primitiva, a pesar de ser crucial para descubrir los mecanismos implicados en la afectación ocular en el SAF, así como de los déficit visuales presentes en los niños con SAF.

Kennedy, L.A. y Elliot, M.J. (1986), estudiaron el desarrollo del ojo en el embrión de ratón en presencia de etanol, llegando a la conclusión de que se reducía el espesor de la capa neural de la retina. Según estos autores, muchas de las anomalías presentes en el SAF se pueden reproducir en un embrión de ratón, tras un episodio único de intoxicación materna, en un período crítico de ontogénesis ocular, que provoca, en primer lugar, una alteración del patrón normal de ordenación de las células progenitoras, así como su pérdida durante la ontogénesis retiniana.

En los embriones expuestos al etanol de nuestra experiencia, el crecimiento en espesor de la capa interna fue menor, y poco uniforme, en relación con los controles. Cabe pensar nuevamente en una inducción anómala, y una acción directa sobre los neuroblastos, como pasara en el epitelio de la vesícula óptica. Pensamos que estas

alteraciones pueden tener consecuencias irreparables, por haberse producido en un momento trascendental de la ontogenia ocular.

Para Coulombre, A.J. (1955), hay 3 períodos característicos en la formación de la retina de pollo. El primer período que comienza el 4° d.i., se caracteriza por el incremento en espesor de la retina neural, debido a una gran proliferación. En el segundo período, que abarca del 8° al 10° d.i., la retina comienza a estratificarse hasta adquirir la citoarquitectura definitiva. Durante el tercer período de transición, que se inicia el día 15 de incubación, se produce la diferenciación y maduración estructural y funcional de esta parte del ojo.

En los niños afectados de SAF, el signo de mayor importancia clínica es la hipoplasia del nervio óptico, estando presente en el 48% de niños afectados. Las causas pueden ser muy diversas, aunque el único factor que aparece en todas las madres es el abuso de etanol. Puesto que las células ganglionares aparecen en humanos en la 6ª semana de gestación, se puede pensar que sea en este momento cuando se produce la acción teratogénica sobre la retina (Strömmland, K., 1985, 1987, 1988). En el embrión de ratón, Kennedy, L.A. y Elliot, M.J. (1986), encuentran un aumento de la muerte celular y una disminución de la capacidad proliferativa de la retina de embriones expuestos al etanol. También en un modelo de ratón, en 1987, Cook, C.S. y cols., señalan una posible disminución de la proliferación celular y/o aumento de la muerte celular. Más tarde, Clarren, S.K. y cols., 1990, demuestran un descenso en el número de células ganglionares en todos los animales expuestos al etanol (primates).

En gran medida, nuestros resultados en la retina ponen de relieve la probable alteración que induce el etanol sobre la proliferación celular, consecuencia de una acción directa sobre la retinogénesis.

La influencia de los ganglios geniculados laterales (o su correspondencia espacial con la retina, Trisler, D. y Collins, F., 1987), y el córtex calcarino, son fundamentales para un buen desarrollo de la retina, habiéndose demostrado que la alteración de estas estructuras influye negativamente (Hughes, W.F. y Lavelle, A., 1975). Puesto que la citada acción es posterior al período que abarca nuestro estudio, podemos descartarla como causante de la hipoplasia retiniana observada en nuestros embriones expuestos. En este sentido, nuestros resultados son acordes con los de

Ashwell, K.W. y Zhang, L.L., 1994, quienes, examinando el nervio óptico de ratones expuestos prenatalmente al etanol, observan diferencias en el número de axones y en la mielinización, no hallándolas en las poblaciones neuronales de los núcleos geniculado lateral y el *colliculus* superior, por lo que sugieren que el déficit axonal está causado por un daño directo sobre la retina, y no por un incremento de pérdida postnatal de los axones, consecuencia de una lesión de los núcleos que reciben las proyecciones retinianas.

Como hemos visto, la proliferación celular se ha determinado haciendo siempre referencia al resultado final (al número de células o fibras nerviosas), y nunca a la multiplicación celular en sí. Nosotros investigamos el número de células en mitosis en la capa germinativa de la retina, un parámetro ligado de forma directa a la proliferación celular de la retina sensorial. En los embriones expuestos al etanol, el número de células en división siempre fue significativamente menor, lo cual justifica que la diferencia del espesor de la retina fue aumentando, en relación con los controles, conforme ésta se desarrollaba. Estas diferencias podrían ser irreversibles. Algo similar ocurrió con el globo ocular, como ya hemos comentado en el apartado correspondiente.

Con respecto al epitelio pigmentario, siempre fue mayor el espesor en los embriones tratados con etanol. La diferencia, que es grande al principio, va disminuyendo conforme avanza el desarrollo ontogénico. Sin embargo, la pigmentación se mantiene inferior en los embriones expuestos al etanol, no correspondiéndose con el estadio de desarrollo. La exposición al etanol parece alterar el ritmo de adquisición de pigmento de las células del epitelio pigmentario, a pesar de que la estructura celular de los tratados acaba siendo similar a la de los controles.

El incremento de las diferencias entre las relaciones de ambas capas de la retina, nos está indicando que además de ser una retina hipoplásica, su citoarquitectura es diferente, más atrasada.

De la correcta diferenciación de las células ganglionares dependerá la adecuada formación anatomofuncional del nervio óptico (Straznicky, C. y Chehade, M., 1987). La maduración de las células ganglionares coincide cronológicamente con la vascularización retiniana (Provis, M. y cols., 1983). Puesto que el aumento de la

tortuosidad vascular retiniana y la hipoplasia del nervio óptico son signos de frecuencia similar en el SAF (Strömland, K., 1987), es plausible imaginar que el tóxico pudo alterar ambos procesos a la vez. Sin embargo, en el embrión de pollo, el fenotipo de las células ganglionares se manifiesta tan pronto como la célula acaba de dividirse (McLoon, S.C. y Barnes, R.B., 1989), siendo los primeros neuroblastos, resultantes de la mitosis del epitelio germinal, los destinados a diferenciarse en células ganglionares. Es por esto que la posible alteración de la diferenciación de estas células, por acción del etanol, puede comenzar una vez concluida la mitosis.

Nuestros resultados parecen indicar que el origen de la hipoplasia del nervio óptico puede ser diverso. La acción directa del etanol sobre las células ganglionares y sobre su diferenciación, así como la acción sobre los procesos inductivos del desarrollo de la retina, podrían ser algunos de estos mecanismos. Se sabe con certeza que las células de la glía juegan un papel fundamental en el desarrollo de las estructuras nerviosas, y, por tanto, de la retina sensorial. Las células de Müller ejercen un relevante papel en la migración y la diferenciación de los procesos de las neuronas retinales y los hallazgos ultraestructurales le asignan una función en la mielinización de los axones provenientes de la retina (Prada, F.A. y cols., 1989).

El etanol parece afectar el proceso de migración celular desde los primeros estadios de diferenciación (Quesada, A. y cols., 1990, en cerebelo), quizás mediante cambios en la gliogénesis. *In vitro* se ha demostrado que existe un retraso en el crecimiento y la maduración de astrocitos procedentes de fetos de rata expuestos al etanol (Renau-Piqueras, J. y cols., 1989, 1992, Guerri, C. y cols., 1990, Saez, R. y cols. 1991 y Mayordomo, F., 1993). Estudios anatomopatológicos *postmortem* de afectados de SAF, así como estudios experimentales con mamíferos, demuestran que el etanol altera la neuro- y la gliogénesis, la sinaptogénesis, la migración neuronal, y la producción de factores neurotróficos (Cameron, R.S. y Rakic, P., 1991). En el nervio óptico, también se han demostrado alteraciones ultraestructurales de los astrocitos (Pinazo-Durán, M.D. y Guerri, C., 1992, Phillips, D.E. y Krueger, S.K., 1992, Pinazo-Durán, M.D. y cols., 1992, 1993). Las anomalías en las células macrogliales pueden inducir alteraciones en la diferenciación de las células ganglionares y en el transporte axoplásmico, y por tanto alterar la morfología y el crecimiento axonal (Pinazo-Durán,

M.D. y cols., 1993). Heaton, M.B. y cols., en 1992, en el embrión de pollo, encuentran que el etanol altera algunas de estas señales neurotróficas. Ferriero, D.M. y cols., 1992, estudian el efecto de la exposición al etanol sobre la expresión de la somatostatina en la retinogénesis de las ratas, observando que la concentración de somatostatina aumenta en la retina de los fetos expuestos al etanol. El aumento de este péptido se asocia con una excesiva formación de conexiones y una migración inadecuada de las neuronas. Este autor opina que estas alteraciones provocarían un fallo en el desarrollo de las células ganglionares, lo que ocasionaría una hipoplasia del nervio óptico.

Nuestros resultados muestran cómo en la retina de los embriones tratados, las células ganglionares, forman una capa más delgada y menos desarrollada. Estos hallazgos son compatibles con una alteración del proceso de diferenciación celular, ya sea de manera directa por el alcohol o bien secundariamente, a partir de un substrato distinto como consecuencia de una inducción y/o proliferación anómalas.

Como ya hemos destacado, hay estudios clínicos y experimentales que analizan el efecto del etanol sobre la formación del nervio óptico (Strömland, K. y Pinazo-Durán, M.D., 1994, entre otros). Nosotros hemos cuantificado la evolución del espesor de la capa de fibras del nervio óptico durante la formación de la retina. El menor espesor de esta capa, en los tratados, concuerda con la existencia de una capa de células ganglionares menos diferenciada, lo que nos indica que, en este período, la cantidad de fibras que salen del globo ocular es superior en los controles.

El ectodermo cristaliniario se forma por la acción inductora mesodermo-endodérmica, pero el desarrollo del cristalino como tal, depende del contacto de la vesícula óptica y la superficie del ectodermo cefálico, no formándose si no se produce esta condición. Otras zonas del ectodermo, por inducción de las vesículas ópticas, son capaces de formar cristalinos. El ectodermo cefálico mantiene esta capacidad (competencia) hasta el cuarto día y el ectodermo precorneal hasta el quinto. Una vez formada la placoda cristaliniaria, la inducción de la vesícula óptica condiciona la formación de la vesícula cristaliniaria, la que a su vez, por inducción de la retina neural primitiva, evolucionará para formar el cristalino, que estará sujeto a una inducción continua de la retina neural (esquema 1, pág. 125).

En clínica, existen descripciones de afectación del desarrollo del cristalino en niños con SAF. Así, entre los 9 casos de SAF descritos por Miller, M.T. y cols., 1981, uno de ellos presentaba una catarata. En estos niños, Strömmland, K., 1987, observa un 13% de anomalías en segmento anterior y medio del ojo, entre las que figuran las cataratas. Miller M.T. y cols., 1984, publican 8 casos de anomalías del segmento anterior ocular asociadas al SAF, siete de ellos presentaban la anomalía de Peters y uno la anomalía de Axenfeld. Analizando los hallazgos oftalmológicos de 8 casos infantiles de SAF, Chan, T. y cols., 1991, describen un caso de anomalía de Peters, con una opacificación cristaliniiana.

Hemos encontrado pocas publicaciones experimentales que estudien el efecto del etanol durante el desarrollo del cristalino. Como se expuso con anterioridad, en 1987, Cook, C.S. y cols. publican, en un modelo de ratón, el efecto de la exposición al etanol en el desarrollo ocular. Sus resultados, con respecto al cristalino, muestran cómo la orientación de la vesícula óptica y su aposición a la superficie ectodérmica, en los embriones expuestos al etanol, fue anormal (lo que ocasionaría un área de contacto ectodérmico pequeño). Esta circunstancia indujo una localización más inferior de la vesícula óptica y la placoda cristaliniiana. La formación de una copa óptica más pequeña se acompañó a menudo de la invaginación de una vesícula cristaliniiana pequeña, que mantenía su unión a la superficie ectodérmica. En el día 14 de gestación encuentran los siguientes resultados: microfaquia/afaquia, *lenticonus* anterior y unión persistente del cristalino a la superficie ectodérmica. Potnataalmente presentaban: microfaquia, afaquia, *lenticonus* anterior y posterior, y cataratas. Las hipótesis que se proponen, para explicar estas alteraciones del desarrollo ocular, son: 1) un área de contacto pequeña, entre la vesícula óptica y la superficie del ectodermo, induciría un cristalino pequeño, 2) la microfaquia se asociaría a un retraso en el desprendimiento del cristalino de la superficie ectodérmica, 3) el núcleo fetal del cristalino no se afectaría, al estar asociada la anormalidad a la cápsula y al epitelio del cristalino, que permanecen en posición anterior durante todo el desarrollo, 4) el retraso en el desprendimiento del cristalino podría ser el resultado de una interferencia mecánica de la migración de las células de la cresta neural, aunque no haya evidencias de que la cresta neural se afecte por acción del etanol en estos primeros estadios.

Nuestros resultados, en general, son acordes con los hallazgos de estos autores. El espesor del ectodermo, que rodea la vesícula óptica, de los embriones expuestos de 40 horas, es menor que el de los controles, lo que podríamos explicarlo como el resultado de un retraso en la inducción, que alteraría y/o retrasaría la formación del ectodermo cristalino. La relación entre el espesor del epitelio de la vesícula óptica y el espesor del ectodermo, también es diferente, lo cual podría interpretarse como un resultado relacionado con el retraso existente en el desarrollo de los embriones bajo el efecto del etanol. La mayor separación entre la vesícula óptica y el ectodermo, característica en los embriones expuestos de 40 h.i., estaría en consonancia con los hallazgos de los autores antes citados (un área de contacto ectodérmico pequeña), lo que podría ser una de las causas de la formación de un cristalino más pequeño (microfaquia).

La invaginación de la placoda cristalina y la formación de la vesícula, también ocurre de forma distinta en los embriones tratados de 64 h.i., encontrándonos unos cristalinios en fase de placoda y otros con un importante retraso en el desprendimiento de las vesículas cristalinas. No creemos que este retraso esté en relación con la formación de un cristalino más pequeño, sino con anomalías en el desarrollo ocular, que podrían explicar los hallazgos patológicos descritos en afectos de SAF en clínica, como la anomalía de Peters, donde aparece una conexión entre el cristalino y el defecto corneal posterior, que sugiere una separación primaria incompleta de la vesícula cristalina. Pensamos que el origen de estas placodas y vesículas anómalas habría que buscarlo en una inducción previa, que ocurrió de manera anómala en el tiempo y/o espacio, junto a una alteración en la inducción de la retina primitiva, afectada por la presencia del etanol.

Una vez formada la vesícula, las células de la pared profunda se alargan para formar las fibras primarias del cristalino, que constituyen el núcleo primario del mismo. Las células de la pared superficial de la vesícula permanecen con su forma cuboidal, constituyendo el epitelio del cristalino. En la región ecuatorial se establece una zona de transición en la que las células epiteliales progresivamente se alargan, originándose así las fibras cristalinas secundarias, que se depositan alrededor del núcleo, ocurriendo esta secuencia de diferenciación citomorfológica durante el

desarrollo pre- como postnatal. Dado que este proceso continúa durante toda la vida, una fibra madura pudo encontrarse, durante su período embrionario, en la región ecuatorial o formando parte de su epitelio.

Los primordios de los cristalinos de los embriones tratados siempre fueron más pequeños. De continuar así a lo largo del desarrollo se provocaría una microfaquia, cuyo posible origen discutimos más arriba. La morfología de los cristalinos era diferente, siendo más esféricos los de los embriones tratados. Estas circunstancias (cristalinos más pequeños y más esféricos) podrían ser responsables de una microesferofaquia en algunos de los embriones expuestos.

Hemos demostrado también el diferente comportamiento cronológico de la génesis del núcleo embrionario del cristalino. Se comienza a formar con retraso en los embriones alcoholizados, y a una velocidad también distinta, lo que condiciona una estructura diferente, como lo muestra el aumento del espesor del epitelio posterior y la mayor dispersión de núcleos, que no están agrupados tan uniformemente como en los embriones controles. Además, el efecto del etanol sobre el epitelio anterior, podría alterar las fibras que se siguen apositando de manera continua alrededor del núcleo embrionario. Hemos de señalar, por tanto, que en este sentido, nuestros resultados no concuerdan con los de Cook, C.S. y cols., 1987, cuando señalan que el núcleo fetal del cristalino no se afectaría por la acción del etanol.

Sin embargo, las diferencias morfológicas del epitelio anterior del cristalino encontradas en nuestro trabajo, son compatibles con las descripciones hechas por los citados autores en 1987. Estas diferencias se podrían explicar como el resultado de un intento de compensar el retraso en el desarrollo (se trata de un epitelio proliferativo), o bien por el retraso en el desprendimiento de la vesícula cristaliniiana.

El análisis de los diferentes parámetros, nos confirma que la morfogénesis cristaliniiana es diferente en los embriones expuestos al etanol, pues la ascensión de los núcleos no está acompañada con el crecimiento del cristalino.

La córnea se desarrolla por inducción positiva de la vesícula del cristalino sobre el presunto epitelio corneal y por migración de células mesoblásticas, provenientes de la cresta neural (esquema 1, pág. 125). Anteriormente hemos hecho referencia a la patología corneal encontrada en algunos niños con SAF. Los primeros autores que

señalan patologías corneales en afectos de SAF, fueron Miller, M.T. y cols., 1981, que describen dos casos de opacidades corneales. Con posterioridad, 1984, Miller, M.T. y cols., publican 8 casos de anomalías del segmento anterior en niños con SAF, 7 de los cuales presentan la anomalía de Peters y uno la anomalía de Axenfeld. Strömmland, K., 1987, estudiando 30 casos de niños diagnosticados de SAF, encuentra que un 10% de ellos presentaba alteraciones en el segmento anterior y medio (microcórnea, catarata, defectos en iris), no encontrando anomalías de Peters o de Axenfeld. Experimentalmente, Cook, C.S. y cols. 1987, describen, en periodos postnatales, una vascularización y opacificación corneal progresiva, relacionadas con defectos en la membrana de Descemet y en el endotelio corneal. Con posterioridad Cook, C.S., en 1989, hace una revisión, clínica y experimental, de los síndromes relacionados con alteraciones, espontáneas o heredadas, de la ontogenia del segmento anterior del ojo. Argumenta que, aunque la mayoría de los eventos del desarrollo del ángulo iridocorneal ocurren en el hombre durante el 3º trimestre, la agresión al embrión en etapas más tempranas (3 a 5 semanas), puede inducir una secuencia anormal de los eventos, que ocasione una disgenesia del segmento anterior. Clarren, S.K. y cols., 1990, con un modelo crónico de intoxicación alcohólica de macacas grávidas, encuentran que varios de los 33 descendientes vivos, presentaban anomalías comparables con las propias del SAF, incluyendo la presencia de microcórnea. También en 1990, Martin, X.D. y Rabineau, P.A., describen, en una niña de 13 años afecta de SAF, un caso de malformación de la cámara anterior, con hipertensión ocular bilateral combinada con malformaciones oculares múltiples, entre otras: embrioxon posterior, sinequias periféricas a la línea de Schwalbe e hipoplasia del estroma iridiano en la forma de anomalía de Rieger, mielinización de los nervios corneales, astigmatismo miópico horizontal y ambliopía relativa bilateral. Más recientemente, Chan, T. y cols., 1991, estudiando las anomalías oculares de 8 niños con SAF, encuentran que uno de ellos presentaba una anomalía de Peters. En un estudio de 5 niños con embriofetopatía alcohólica, Hinzpeter, E.N. y cols., en 1992, describen los cambios histopatológicos hallados en un ojo enucleado de uno de los niños, que presentaba estafiloma anterior y anomalía de Peters. A la inversa, al revisar los hallazgos clínicos en 29 pacientes con anomalía de Peters, Traboulsi, E. I. y

Maumenee, I.H. (1992), encuentran que uno de ellos presentaba un SAF.

Pero, en los niños con SAF, no siempre son evidentes las alteraciones del polo anterior ocular. Carones, F. y cols., en 1992, analizaron las anomalías del endotelio corneal (un tejido derivado de la cresta neural), en 8 niños con SAF, y sin malformaciones aparentes del segmento anterior. En comparación con 80 niños sanos, los afectados mostraron menor densidad celular, polimegatismo y menor porcentaje de células hexagonales en el endotelio. También se encontró relación entre la afectación endotelial y la disfunción auditiva. Los autores sugieren que estas alteraciones pueden ser consecuencia de la acción tóxica del alcohol sobre las células de la cresta neural, que están destinadas a formar el endotelio corneal y el órgano de Corti, en el mismo período embrionario. La migración de las células de la cresta neural ocurre en tres oleadas, y forman parte de distintas estructuras en el segmento anterior del ojo. En lo que concierne a la córnea, la primera oleada será responsable de la formación del endotelio y la tercera de los queratocitos estromales (Tripathi, B.J. y Tripathi, R.C., 1989).

Clásicamente, las anomalías corneales, que parecen tener su origen en una alteración de la migración de las células mesenquimales, desde la cresta neural, se han agrupado bajo el diagnóstico de disgenesia mesenquimal (Kenyon, K.R., 1975, Kupfer, C. y Kaiser-Kupfer, M.I., 1979, Kenyon, K.R. y cols., 1994). A este grupo pertenecen las anteriormente descritas en niños con SAF. Por tanto, cualquier alteración de la inducción o migración de la primera oleada de las células de la cresta neural, puede provocar una modificación en la estructura final del endotelio corneal.

No existen trabajos que analicen la acción del etanol sobre la morfogénesis de los distintos estratos corneales, a pesar de que, como hemos visto, se han descrito malformaciones corneales en algunos afectados por el SAF.

Nuestros resultados muestran que el etanol, administrado en las primeras fases del desarrollo embrionario, modifica este proceso morfogénico. Así, como consecuencia de un desprendimiento tardío de la vesícula cristaliniiana, el epitelio corneal no estaba aún formado a las 64 h.i., persistiendo mientras tanto uniones entre el ectodermo y la vesícula cristaliniiana en formación, de acuerdo con los resultados obtenidos por Cock, C.S. y cols. (1987). Posteriormente, a las 90 h.i., no encontramos

células endoteliales en las córneas de los embriones tratados, ni estroma primario (los controles mostraban células migrando sobre la superficie interna del estroma primario corneal, que es acelular). Las córneas de los embriones tratados de más horas de incubación (137) nos mostraron un estroma primario, sin fibroblastos y un endotelio en que las células aún están cambiando su morfología, mientras que en los controles las células endoteliales ya eran cúbicas, y los fibroblastos provenientes de la cresta neural habían migrado a través del estroma (que ahora es secundario). En cuanto al espesor de las córneas, observamos que el crecimiento es más lento en los embriones expuestos, debido al desarrollo del estroma, cuyo análisis nos sugiere una disminución en la síntesis de colágeno. Al estar el endotelio menos diferenciado, el espesor de esta capa es menor.

Estos resultados nos hacen pensar en varios posibles mecanismos de afectación corneal por acción del etanol. De acuerdo con Strömmland, K., Miller, M.T. y Cook, C.S., 1991, probablemente se trate de una interferencia, inducida por el etanol, sobre la proliferación, migración, diferenciación, y muerte de los elementos mesenquimales derivados de la cresta neural, y destinados a formar el endotelio y las células estromales. Otro mecanismo en el que podríamos pensar, sería la alteración de la cadena de inducciones que deben de tener lugar para un normal desarrollo corneal, que ocasionaría entre otros, una matriz de colágeno que aún no está preparada para permitir la migración de las células, debido a un retraso en la maduración epitelial y endotelial, y por tanto a un estroma menos diferenciado.

V.- Conclusiones

- 1.- La exposición al etanol desde las primeras fases del desarrollo (blástula-gástrula) induce cambios adaptativos en los embriones que toleran su presencia, siendo el más significativo el ralentizamiento de su desarrollo. Este retraso ontogénico afecta de manera desigual a los embriones expuestos, y no ocurre en todos ellos, dependiendo de la respuesta genotípica. Los otros embriones -genotipos-, que no toleran su presencia, mueren.

- 2.- El tamaño ocular de los embriones expuestos es netamente inferior al de los controles de la misma edad. El etanol retrasa significativamente el desarrollo ontogénico del ojo a lo largo de toda la experiencia, alterando el calendario de procesos morfogénicos y la normal cronología secuencial de fenómenos inductivos. Algunas de estas alteraciones podrían ser tan irreversibles como las ya conocidas que afectan al SNC.

- 3.- El etanol altera la normal evolución ontogénica de la parte más noble del ojo, la retina. La capa interna o retina neural, encargada de la función sensitiva, se presenta hipoplásica como resultado de una interferencia, durante la retinogénesis, sobre la proliferación, migración y diferenciación neuroblástica. La consecuencia más sobresaliente es la formación de una menor cantidad de fibras nerviosas y, por consiguiente, una hipoplasia del nervio óptico. Además, el etanol retrasa el proceso

de adquisición de pigmento durante el desarrollo de la capa externa o epitelio pigmentario.

- 4.- El cristalino de los embriones expuestos presenta una evolución morfológica diferente, cuya consecuencia más inmediata es la disminución de su tamaño. Se altera el desarrollo de los dos epitelios constituyentes. El análisis de la evolución de los constituyentes celulares del epitelio posterior indica que ha tenido lugar un crecimiento, proliferación y diferenciación distintos, y el del epitelio anterior, que se ha producido un retraso en el desprendimiento de la vesícula cristaliniiana, y una disminución de su espesor a un ritmo mucho menor. La evolución de ambos epitelios ha condicionado un mayor diámetro axial.

- 5.- La disminución del espesor corneal, observada en los embriones tratados de las últimas extracciones de nuestra experiencia, sugiere que el etanol también modifica el normal desarrollo de esta capa ocular. Del estudio estructural de los primordios corneales se desprende la existencia de un retraso y alteración en el desarrollo, por acción del etanol sobre los procesos implicados en su diferenciación. Esta acción se puede explicar como consecuencia, en primer lugar, de una interferencia sobre la proliferación, migración, diferenciación celular, y muerte de los elementos mesenquimales derivados de la cresta neural, y destinados a formar el endotelio y las células estromales, y, en segundo lugar, de la posible modificación espacio-temporal de la normal secuencia de inducciones implicadas, que han de tener lugar en un momento y sitio adecuado.

- 6.- Las conclusiones anteriores ponen de relieve una clara afectación del desarrollo ontogénico del ojo, como resultado de su exposición directa al etanol. Es aceptable pensar que parte de las anomalías oculares, observadas en niños afectados de SAF, puedan ser consecuencia primaria de un efecto tóxico directo del etanol sobre el embrión, en sus primeros momentos del desarrollo.

VI.- Bibliografía

ABEL, E.L. Effects of ethanol on pregnant rats and their offspring. *Psychopharmacologia*, **57**: 5-11 (1978).

ABEL, E.L. Fetal Alcohol Syndrome, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, Florida (1982).

ABEL, E.L. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Effects. Plenum Press, New York (1984).

ABEL, E.L. Síndrome Alcohólico Fetal. En: "Marihuana, tabaco, alcohol y reproducción". Ed: Díaz de Santos, S.A., Madrid, Barcelona (1986).

ABEL, E.L. y SOKOL, R.J. A revised conservative estimate of the incidence of FAS and its economic impact. *Alcohol Clin. Experim. Res.*, **15**: 514-524 (1991).

ALONSO-FERNANDEZ, F. Alcoholdependencia. Personalidad del alcohólico. 3ª ed. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona (1992).

ALTMAN, B. Fetal alcohol syndrome. *J. Ped. Ophthalmol.*, **13**: 255-258 (1976).

ARONSON, M. y OLEGARD, R. Fetal alcohol effects in pediatrics and child psychology. En: "Alcohol and the developing brain". Rydberg, U. y cols. eds., Raven Press, New York (1985).

ASHWELL, K.W. y ZHANG, L.L. Optic nerve hipoplasia in an acute exposure model of the fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol. Teratol.*, **16**(2): 161-167 (1994).

BALLUS, C. y ORTEGA, L. Alcoholismo. En: "Bases de la Medicina Interna". Carmena, R., Dolman, M. y Foz, M. eds., Toray S.A. Barcelona (1987).

- BOYD, J., KALMUS, G. y PENNINGTON, S. Ethanol-induced inhibition of chick brain growth. *Alcohol: clin. Exp. Res.*, **8**: 343-346 (1984).
- BRAVO, F. y BRAVO, J.M. Consumo moderado de bebidas alcohólicas: salud y civilización. Ed. INESIBA, Madrid (1993).
- BRODIE, C. y VERNADAKIS, A. Critical periods to ethanol exposure during early neuroembryogenesis in the chick embryo: cholinergic neurons. *Dev. Brain Res.*, **56**: 223-228 (1990).
- BRUYERE, H.J y KAPIL, R.P. Cardioteratogenic dose of ethanol in the chick embryo results in egg white concentrations comparable to human blood alcohol levels *J. Appl. Toxicol.*, **10**: 69-71 (1990).
- CABALLERO, J.M. Lo que sabemos del vino. Ed. Gráficas Torroba, Madrid (1967).
- CAHUANA, A. y GAIRI, J.M. Incidencia de la embriofetopatía alcohólica y relación con el consumo de alcohol por la mujer gestante. En: "Síndrome Alcohólico Fetal". Cahuana, A. y cols. eds., Fundación Valgrande, Madrid (1985).
- CAMERON, R.S. y RAKIC, P. Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and synthesis. *Glia*, **4**: 124-137 (1991).
- CARLSON, B.M. Embriología básica de Patten, 5ª ed., Interamericana, México, D.F. (1990).
- CARONES, F., BRANCATO, R., MAGNI, R., BIANCHI, S. y VENTURI, E. Corneal endothelial anomalies in the FAS. *Arch. Ophthalmol.*, **110**: 1128-1131 (1992).
- CLARREN, S.K. y SMITH, D.W. The fetal alcohol syndrome: A review of the world literature. *N. Engl. J. Med.*, **298**: 1063-1067 (1978).
- CLARREN, S.K., ALVORD, E.C., SUMI, S.M. y STREISSGUTH, A.P. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatr.*, **92**: 64-67 (1978).
- CLARREN, S.K., ASTLEY, S.J., BOWDEN, D.M., LAI, H., MILAM, A.H. RUDEEN, P.K. y SHOEMAKER, W.J. Neuroanatomic and neurochemical abnormalities in nonhuman primate infants exposed to weekly doses of ethanol during gestation. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **14**(5): 674-683 (1990).
- COMAS, D. Los jóvenes y el uso de las drogas en los años 90. Ministerio de Asuntos Sociales. Instituto de la Juventud. Madrid (1994).
- COMISIONADO PARA LA DROGA. Los andaluces ante las drogas (III). Junta de Andalucía. Consejería de Asuntos Sociales. Dep. leg. CA-256/93 (1993).
- CONDE, V., FRANCO, M.A., MACIAS, J.A. y BALLESTEROS, M.C. Heredobiología del

alcoholismo. En: "Psicopatología y alcoholismo". Monografías de Toxicomanías. Coordinado por: Casas, M., Gutiérrez, M. y San, L. Ediciones en Neurociencias. Barcelona (1994).

COOK, C.S., NOWOTNY, A.Z. y SULIK, K.K. FAS. Eye malformations in a mouse model. *Arch. Ophthalmol.*, **105**: 1576-1581 (1987).

COOK, C.S. Experimental models of anterior segment dysgenesis. *Ophthalmic Paediatr. Genet.*, **10**(1): 33-46 (1989).

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

COULTER, C.L., LEECH, R.W., SCHAEFER, G.B., SCHEITHAUER, B.W. y BRUMBACK, R.A. Midline cerebral dysgenesis, dysfunction of the hypothalamic-pituitary axis, and fetal alcohol effects. *Arch. Neurol.*, **50**(7): 771-775 (1993).

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

DETERING, N., COLLINS, R., HAWKINS, R.L., OZARD, P.T. y KARAHASAN, A.M. The effects of ethanol on developing catecholamine neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **132**: 721-727 (1980).

DIAZ, J. y SAMSON, H.H. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science*, **208**: 751-753 (1980).

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. En: "Applied neurochemistry". Davison, A.N. y Dobbing, J. eds., Blackwell Scientific, Oxford (1958).

DOBBING, J. The later development of the brain and its vulnerability. En: "Scientific Foundation of Pediatrics". Davis, J.A. y Dobbing, J. eds., W.B. Saunders, Philadelphia (1974).

DOBBING, J. y SAND, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.*, **3**: 79-83 (1979).

DREOSTI, I., BALLARD, F., BELLING, G., RECORD, I., MANUEL, S. y HETZEL, B. The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and on fetal development in the rat. *Alcohol: Clin. Exp. Res.*, **5**: 357-362 (1981).

EDWARDS, G.E., y cols. Nomenclature et classification des problèmes liés à la consommation de drogue et alcool. Memorandum OMS. *Bulletin de l'O.M.S.*, **60**(2): 499-520 (1982).

EL PAIS SEMANAL. Jóvenes y alcohol, nº 138 (1993).

ERNHART, C.B., SOKOL, R.J., MARTIER, S., MORON, P., NADLER, D., AGER, J.W. y WOLF, A. Alcohol teratogenicity in the human: A detailed assessment of specificity, critical period, and threshold. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **156**: 33-39 (1987).

FANG, T.T., BRUYERE, H.J., KARGAS, S.A., NISHIKAWA, T., TAKAGI, Y. y GILBERT, E.F. Ethyl alcohol-induced cardiovascular malformations in the chick embryo. *Teratology*, **35**: 95-103 (1987).

FERREIRO, D.M., SHELDON, R.A. y DOMINGO, J. Somatostatin is altered in developing retina from ethanol-exposed rats. *Neurosci. Lett.*, **147**(1): 29-32 (1992).

FREIXA, F. Estado actual de los problemas del alcohol en España. En: "Psicopatología y alcoholismo". Monografías de Toxicomanías. Coordinado por: Casas, M., Gutiérrez, M. y San, L. Ediciones en Neurociencias. Barcelona (1994).

GEE, W. Effects of acute alcoholization on the germ cells of *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, **31**: 279-292 (1916).

GRANT, K.A. y SAMSON, H.H. Ethanol and tertiary butanol induced microcephaly in the neonatal rat: Comparison on brain growth parameters. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **4**: 315-321 (1982).

GUERRI, C., WALLACE, R. y GRISOLIA, S. 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).

GUERRI, C. Bases bioquímicas de la toxicidad del alcohol. Importancia del acetaldehído. *Drogalcohol*, **4**(3): 111-118 (1979).

GUERRI, C. Síndrome alcohólico fetal: Patogenia de las malformaciones cerebrales. *Drogalcohol*, **6**(3): 137-140 (1981).

GUERRI, C. y GRISOLIA, S. Effects of prenatal and postnatal exposure of rats to alcohol: Changes in (Na-K)ATPase. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **17**(5): 927-932 (1982).

GUERRI, C. y GRISOLIA, S. Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrane-bound enzymes. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**: 45-50 (1983).

GUERRI, C. y SANCHIS, R. Acetaldehyde and alcohol levels in pregnant rats and their fetuses. *Alcohol*, **2**: 267-270 (1985).

GUERRI, C. y SANCHIS, R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Science*, **38**(17): 1543-1556 (1986).

GUERRI, C. Síndrome alcohólico fetal: Patogenia de las alteraciones cerebrales. *Rev. Esp. Drogodep.*, **12**(4): 219-232 (1987).

GUERRI, C. Synaptic membranes alterations in rat exposed to alcohol. *Alcohol and Alcoholism*, suppl. 1: 467-472 (1987).

GUERRI, C., SAEZ, R., SANCHO-TELLO, M., MARTIN DE AGUILERA, E. y RENAUPQUERAS, J. Ethanol alters astrocytes development: A study of critical periods using primary cultures. *Neurochem. Res.*, 15: 559-565 (1990).

GUTIERREZ-FISAC, J.L. Indicadores de consumo de alcohol en España. *Med. Clin. (Barc)*, 104: 544-550 (1995).

HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88: 49-92 (1951).

HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195: 231-272 (1992).

HANSON, J.W., STREISSGUTH, A.P. y SMITH, D.W. The effects of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. *J. Pediatr.*, 92: 457-460 (1978).

HARRIS, R.A., BURNETT, R., MEQUILKIN, S., MAC CLARD, A. y SIMON, F.R. Alcohol and the cell, Rubin E., Ed. *Ann. New York Acad. Sci.*, 492: 125-135 (1987).

HEATON, M.B., SUANSON, D.J., PAIVA, M. y WALKER, D.W. Ethanol exposure affects trophic factors activity and responsiveness in chick embryo. *Alcohol*, 9: 161-166 (1992).

HINZPETER, E.N., RENZ, S. y LOSER, H. Augenveränderungen bei alkoholembyopathie (Eye manifestations of fas). *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 200(1): 33-38 (1992).

HOLZMAN, A.E., CHROUSOS, G.A., KOZMA, C. y TRABOULSI, E.I. Duane's retraction syndrome in the fetal alcohol syndrome. *Am. J. Ophthalmol.*, 110(5): 565-566 (1990).

HORTON, D. Functions of alcohol in primitive societies: a cross-cultural study. *Quart. J. Stud. Alc.*, 4: 199-319 (1943).

HORTON, D. Functions of alcohol in primitive societies. *Alcohol Science and Society*, 1: 151-177 (1950).

HOYSETH, K.S. y JONES, J.H. Ethanol induced teratogenesis: characterization, mechanisms and diagnostic approaches. *Life Sciences*, 44: 643-649 (1989).

HUGES, W.F. y LAVELLE, A. J. The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J. Comp. Neur.*, 163: 265-284 (1975).

- JEFFS, J. El vino de Jerez. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. Univ. Cádiz (1994).
- JELLINEK, E.M. Le role de l'alcool dans la société. *Alcool ou Santé*, 16: 3-7 (1965).
- JONES, K.L. y SMITH, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, II: 999-1001 (1973).
- JONES, K.L., SMITH, D.W., ULLELAND, C.N. y STREISSGUTH, A.P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet*, I: 7815-7820 (1973).
- JONES, K.L., SMITH, D.W., STREISSGUTH, A.P. y MYRIANTHOPOULOS, N.C. Outcome in offspring of chronic alcoholic women. *Lancet*, I: 1076-1078 (1974).
- KENNEDY, L.A. y ELLIOT, M.J. Ocular changes in the mouse embryo following acute maternal ethanol intoxication. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4(4): 311-317 (1986).
- KENYON, K.R. Mesenchymal dysgenesis in Peters' anomaly, sclerocornea and congenital endothelial dystrophy. *Exp. Eye Res.*, 21: 125-142 (1975).
- KENYON, K.R., HERSH, P.S., STARCK, T. y FOGLE, J.A. Corneal Disgeneses, Dystrophies, and Degenerations. En: "Duane's Clinical Ophthalmology", Vol. 4, Chap. 16. J.B. Lippincott Company, Philadelphia (1994).
- KORSTEN, M.A., MATZUZAKI, S., FEINMAN, L. y LIEBER, C.S. High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Differences between alcoholic and nonalcoholic subjects. *N.Engl. J. Med.*, 292: 386-389 (1975).
- KUPFER, C. y KAISER-KUPFER, M.I. Observations on the development of the anterior chamber angle with reference to the pathogenesis of congenital glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.*, 88: 424-426 (1979).
- LAMACHE, M.A. Réflexions sur la descendance des alcooliques. *Bull. Acad. Nat. Médecine*, 151 (25-26): 517-521 (1967).
- LEMOINE, P., HAROUSSEAU, H., BORTERYU, J.P. y MENUET, J.C. Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées, à propos de 127 cas. *Ouest Med.*, 21: 476-482 (1968).
- LEONARD, B.E. Alcohol as a social teratogen. *Progress in Brain Res.*, 73: 305-317 (1988).
- LIEBER, C.S. Metabolism and metabolic effects of alcohol. *Med. Clin. N. Amer.*, 68: 3-31 (1984).
- LIEBER, C.S. Biochemical and molecular basis for alcohol-induced injury to liver and

other tissues. *N. Engl. J. Med.*, **319**: 1639-1650 (1988).

LIEBER, C.S. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **15**: 537-592 (1991).

LYON, R.C. y GOLDSTEIN, D.B. Change in synaptic membrane order associated with chronic ethanol treatment in mice. *Mol. Pharmacol.*, **23**: 86-91 (1983).

MAJEWSKI, F. Alcohol embryopathy: some facts and speculations about pathogenesis. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **3**: 129-144 (1981).

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).

MARTIN, X.D. y RABINEAU, P.A. Dysgenese de la crete neurale, de l'ectoderme, du mesoderme et syndrome alcoolique foetal. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, **196**(5): 279-284 (1990).

MAYORDOMO, F. Efecto de la exposición prenatal al etanol sobre las características estereológicas y citoquímicas de los astrocitos durante las fases de proliferación y diferenciación en cultivo primario. Tesis Doctoral. Univ. Valencia (1993).

McLOON, S.C. y BARNES, R.B. Early differentiation of retinal ganglion cells: an axonal protein expressed by premigratory and migrating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.*, **9**(4): 1424-1432 (1989).

MENDELSON, J.H. y MELLO, N.K. The diagnosis and treatment of Alcoholism. McGraw-Hill Book Co., New York (1985).

MILLER, M.T. Ocular teratology. Observations, speculations, questions, principles reaffirmed. *Eye*, **6**(2): 177-180 (1992).

MILLER, M.T., ISRAEL, J. y CUTTONE, J. Fetal alcohol syndrome. *J. Pediatr. Ophthalmol. Estrabismus*, **21**(1): 8-18 (1981).

MILLER, M.T., EPSTEIN, R., SUGAR, J., GAMMON, J.A., MITTELMAN, D., DENNIS, R. e ISRAEL, J. Anterior segment anomalies associated with the fetal alcohol syndrome. *J. Pediatr. Ophthalmol. Estrabismus*, **21**(1): 8-18 (1984).

MILLER, M.W. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science*, **233**: 1308-1310 (1986).

MILLER, M.W. Effects of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex. II. Cell proliferation in the ventricular and subventricular zones of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **287**: 326-338 (1989).

MILLER, N.S. y GOLD, M.S. Alcohol. Ediciones en Neurociencias, Citran, Fisp. Sitges,

Barcelona (1993).

MINISTERIO DE SANIDAD y CONSUMO. Estudio de los hábitos de consumo de alcohol de la población española. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (1984).

MINISTERIO DE SANIDAD y CONSUMO. Encuesta Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (1989).

MINISTERIO DE SANIDAD y CONSUMO. Estudio de los estudios de vida de la población adulta española. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (1992).

MOLINA, F., BOSQUE-SENDRA, J.M., PLA, A. y MEGIAS, L. Determination of ethanol in biological samples by head space gas chromatography. *J. Pharmaceutical & Biomed. Anal.*, **10**: 1069-1071 (1992).

NORONHA, A.B. Y DRUSE, M.J. Maternal ethanol consumption and synaptic membrane glycoproteins in offspring. *J. Neurosci. Res.*, **8**: 83-97 (1982).

OLEGARD, R., SABEL, K.G., ARONSSON, M., SANDIN, B., JOHANSSON, P.R., CARLSSON, C., KYLLERMAN, M., IVERSEN, K. y HRBEK, A. Effects on the child of alcohol abuse during pregnancy - retrospective and prospective studies. *Acta Paediatr. Scand. (suppl.)*, **275**: 112-121 (1979).

O'RAHILLY, R. y MEYER, D.B. The early development of the eye in the chick. *Acta Anat.*, **36**: 20-58 (1959).

O'RAHILLY, R. The development of the sclera and the choroid in staged chick embryos. *Acta Anat.*, **48**: 335-346 (1962).

O'SHEA, K. y KAUFMAN, M. The teratogenic effect of acetaldehyde: implications for de study of the fetal alcohol syndrome. *J. Anat.*, **128**: 65-76 (1979).

PAILLE, F. y BARRUCAND, D. L'alcooldependence. Le point sur la question en 1983. *Revue de l'alcoolisme*, **29**(4): 201-232 (1983).

PEIFFER, J., MAJEWSKY, F., FISCHBACH, H., BIERICH, J.R. y BOLK, B. Alcohol embryo- and fetopathy: neuropathology of three children and three fetuses. *J. Neurol. Sci.*, **41**: 125-137 (1979).

PENNINGTON, S.N. Alcohol metabolism and fetal hipoplasia in chick brain. *Alcohol*, **5**: 91-94 (1988).

PERRIN, P. Qu'est-ce que l'alcoolisme. Limites et définitions. *Rev. Alcoolisme*, **6**: 345-350 (1960).

PERRIN, P. Les causes psychiques du comportement alcoolique et de l'alcoolomanie. *Rev. Alcoolisme*, **6**: 351-372 (1960).

- PERRIN, P. Un essai de codification de l'usage des boissons alcooliques. *Rev. Alcoolisme*, **6**: 513-518 (1960).
- PHILLIPS, D.E. y KRUEGER, S.K. Effects of combined pre- and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on glial cell development in rat optic nerve. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **10**(3): 197-206 (1992).
- PIATIGORSKY, J. Lens differentiation in Vertebrates. *Differentiation*, **19**: 134-153 (1981).
- PIEDROLA, G. y SALLERAS, LL. Medicina preventiva y salud pública. Ed. Salvat. Barcelona (1988).
- PIERCE, D.R. y WEST, J.R. Alcohol-induced microcephaly during the third trimester equivalent: Relationship to dose and blood alcohol concentration. *Alcohol*, **3**: 185-191 (1986).
- PINAZO-DURÁN, M.D., RENAU-PIQUERAS, J. y GUERRI, C. Morphometric and stereologic analysis of the macroglialgenesis and myelogenesis on the optic nerve of the Wistar rat. *St. Ophthalmol.*, **11**: 31-34 (1992).
- PINAZO-DURÁN, M.D., RENAU-PIQUERAS, J. y GUERRI, C. Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. *Teratology*, **48**: 305-322 (1993).
- PINAZO-DURÁN, M.D. y GUERRI, C. Estudio de la teratogenicidad del alcohol, sobre el nervio óptico de la rata. *St. Ophthalmol.*, **11**: 103-112 (1992).
- PRADA, F.A., MAGALHAES, M.M., COIMBRA, A. y GENIS-GALVEZ, J.M. Morphological differentiation of the Müller cell: golgi and electron microscopy study in the chick retina. *J. Morphol.*, **201**: 11-22 (1989).
- PROVIS, M., BILLSON, F. y RUSSELL, P. Ganglion cell topography in human fetal retinae. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **24**: 1316-1320 (1983).
- QUESADA, A., PRADA, F.A., ESPINAR, A. y GENIS-GÁLVEZ, J.M. Effects of ethanol on the morphohistogenesis and differentiation of cerebellar granule cells in the chick embryo. *Alcohol*, **7**: 419-428 (1990).
- RAGER, U., RAGER, G. y FREI, B. Retinal central area is not the site where ganglion cells are generated first. *J. Comp. Neurol.*, **334**(4): 529-544 (1993).
- RANDAL, C.L. Alcohol as a teratogen: A decade of research review. *Alcohol and Alcoholism*, **suppl. 1**: 125-132 (1987).
- RAHN, H., AMOS, A. y PAGANELLI, C.V. Como respiran los huevos. *Investigación y Ciencia*, **Abril**: 16-26 (1979).

RENAU-PIQUERAS, J., ZARAGOZA, R., DE PAZ, P., BAGUENA-CERVELLERA, R., MEGIAS, L. y GUERRI, C. Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**: 229-240 (1989).

RENAU-PIQUERAS, J., GUERRI, C., BURGAL, M., DE PAZ, P., SÁEZ, R. y MAYORDOMO, F. Prenatal exposure to ethanol alters plasma membrane glucoproteins of astrocytes during development in primary culture as revealed by concavalin A binding and 5'-nucleotidase activity. *Glia*, **5**: 65-74 (1992).

ROMANOFF, A.L. *The Avian Embryo. Structural and Functional Development.* McMillan Co. New York (1960).

ROSETT, H. A clinical perspective of the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism: clinical and experimental research*, **4**: 119-122 (1980).

RUDEEN, P.K. y GUERRI, C. The effect of in utero alcohol exposure on acetylcholinesterase, Na-K ATPase and Ca⁺⁺ATPase activities in six regions of rat brain. *Alcohol and Alcoholism*, **20(4)**: 417-425 (1985).

SAEZ, R., BURGAL, M., RENAU-PIQUERAS, J., MARQUES, A. y GUERRI, C. Evolution of several cytoskeletal proteins of astrocytes in primary culture: Effect of prenatal alcohol exposure. *Neurochem. Res.*, **16**: 737-747 (1991).

SALLERAS, L. y BACH, L. Alcohol y Salud. En: "Medicina Preventiva y Salud Pública". Piédrola, G. y cols. eds., Ed. Salvat. Barcelona (1988).

SANCHEZ, M.C. Adaptaciones moleculares de membranas subcelulares a la presencia del etanol. Tesis Doctoral. Univ. Granada (1990).

SANDOR, S. y ELIAS, S. The influence of ethyl-alcohol on the development of the chick embryo. *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol.*, **5**: 51-76 (1968).

SCHUCKIT, M.A. y HAGLUND, R.M.J. An overview of the etiologic theories on alcoholism. En: "Alcoholism: Development, Consequences, and Interventions". Estes, N. y Heinemann, E. eds., St. Louis, MO (1982).

SEITZ, H.K. y SIMANWSKI, V.A. Alcohol and carcinogenesis. *Ann. Rev. Nutr.*, **8**: 99-119 (1988).

SOKOL, R.J., MILLER, S.I. y REED, G. Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiologic study. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, **4**: 135-148 (1980).

SREENATHAN, R., PADMANABHAN, R. y SINGH, S. Teratogenic effects of acetaldehyde in the rat. *Drug Alcohol Depend.*, **9**: 339-350 (1982).

- STOCKARD, C.R. The experimental production of various eye abnormalities and an analysis of the development of the primary parts of the eye. *Arch. f. Vergl. Ophthalmol.*, **1** (4): 473-480 (1910).
- STOCKARD, C.R. The influence of alcohol and other anaesthetics on embryonic development. *Am. J. Anat.*, **10**: 369-392 (1910).
- STRAZNICKY, C. y CHEHADE, M. The formation of the area centralis of the retinal ganglion cell layer in the chick. *Development*, **100**: 411-420 (1987).
- STREISSGUTH, A.P., HERMAN, C.S. y SMITH, D.W. Intelligence, behavior and dysmorphogenesis in the fetal alcohol syndrome: A report of 20 clinical cases. *J. Pediatr.*, **92**: 363-367 (1978).
- STREISSGUTH, A.P., LANDESMANN-DWYER, S., MARTIN, J.C. y SMITH, D.W. Teratogenic effects in human and laboratory animals. *Science*, **209**: 353-361 (1980).
- STREISSGUTH, A.P., BARR, H.M. y MARTIN, J.C. Maternal alcohol use and neonatal habituation assessed with the Brazelton scale. *Child Dev.*, **54**: 1109-1118 (1983).
- STROMLAND, K. Eye ground malformations in fetal alcohol syndrome. *Birth Defects*, **18**: 651-655 (1982).
- STROMLAND, K. Ocular abnormalities in the fetal alcohol syndrome. *Acta Ophthalmol., Suppl.* **171P**: 1-50 (1985).
- STROMLAND, K. Ocular involvement in the fetal alcohol syndrome. *Surv. Ophthalmol.*, **31**(4): 277-284 (1987).
- STROMLAND, K. Ocular malformations in children exposed to drugs during gestation. *Clinical Pediatrics*, **27**(4): 257-258 (1988).
- STROMLAND, K. Contribution of ocular examination to the diagnosis of foetal alcohol syndrome in mentally retarded children. *Ment. Defic. Res.*, **34**(5): 429-435 (1990).
- STRÖMLAND, K., MILLER, M. y COOK, C. Ocular teratology. *Surv. Ophthalmol.*, **35**: 429-446 (1991).
- STROMLAND, K. y PINAZO-DURÁN, M.D. La hipoplasia del nervio óptico en el síndrome alcohólico fetal. *Arch. Soc. Españ. Oftalmol.*, **66**: 473-480 (1994).
- SULIK, K.K. y JOHNSTON, M.C. Sequence of developmental alterations following acute ethanol exposure in mice: Craniofacial features on the fetal alcohol syndrome. *Am. J. Anat.*, **166**: 257-269 (1983).
- SULIK, K.K., JOHNSTON, M.C., SCHAMBRA, U., PIFFER, R.L., ZAYTOUN, H.S. y

DEHART, C.B. Brain and eye malformations following acute maternal ethanol exposure of gastrulation stage mouse embryos. *Teratology*, **7**: 78-79 (1983).

SURGEON GENERAL'S ADVISORY ON ALCOHOL AND PREGNANCY. *FDA Drug Bull.*, **11**: 1-2 (1981).

THALER, H. Las lesiones hepáticas de origen alcohólico. En: "Adquisiciones en Hepatología" Ed. Forum Medici Zyma. Lyon (1980).

TRABOULSI, E. I. y MAUMENEE, I.H. Anomalia de Peters y malformaciones congénitas asociadas. *Arch. Ophthalmol.*, **110**(12): 1739-1742 (1992).

TRIPATHI, B.J. y TRIPATHI, R.C. Embryology of the anterior segment of the human eye. En: "The Glaucomas". Ritch, R., Shields, H.B., Krupin, T. eds., St. Louis, Mo: Mosby-Year Book (1989).

TRISLER, D. y COLLINS, F. Corresponding spatial gradients of top molecules in the developing retina and optic tectum. *Science*, **237**: 1208-1209 (1987).

URBANO-MARQUEZ, A. y ESTRUCH, R. Alteraciones del sistema nervioso asociadas al alcoholismo crónico y carencias nutricionales. En: "Bases de la medicina interna". Carmena, R., Dolman, M. y Foz, M. eds., Ed. Toray S.A. Barcelona (1987).

VALBUENA, A. Manual de Toxicomanías y Alcoholismo. Problemas médicos y psiquiátricos. 2ª ed., Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Barcelona (1993).

VAQUERA ORTE, J. El alcoholismo como problema de salud. Lección inaugural del curso 1994-95. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de León, León (1994).

WALSH, D. Surveillance for alcohol abuse. En: "Surveillance in health and disease". Eilenbosch, W.S. y Noah, N.D. eds., Oxford University Press (1988).

WARNER, R.H. y ROSETT, H.L. The effects of drinking in offspring: An historical survey of the American and British literature. *J. Stud. Alcohol*, **36**: 1395-1420 (1975).

WERNITZ, A. Alcohol=Droga, nº 1. Ed. Bitácora (1990).

WILSON, J.C. Current status of teratology. En: "Handbook of teratology". Wilson, J., Frase, F.C. eds., Plenum Press, New York (1977).

WILSON, J.G. Environment and birth defects. Academic Press, New York (1973).

WILSON, R.W., KALMUS, G.W. y PENNINGTON, S.N. Alcohol dehydrogenase activity in the developing chick embryo. *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**(1): 191-196 (1984).