

EFFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO FÓLICO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DEL HÍGADO DE RATAS CON SÍNDROME FETAL ALCOHÓLICO

M. T. Zumeta D.^{1*}, A. Herrera B.¹, M. González Bravo², V. Falcón³, M. C. de la Rosa³, I. Menéndez V.³

¹Departamento de Histología ICBP: “Victoria de Girón”. Habana. Cuba.

²Escuela Latinoamérica de Medicina, Habana, Cuba.

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba.

*Autor de Correspondencia, e-mail: taylinzd@giron.sld.cu

Recibido: Diciembre 2007 Aprobado: Abril 2009

Publicado en línea: Mayo 2009

RESUMEN

El consumo de bebidas alcohólicas se ha incrementado en mujeres adolescentes y con ello las complicaciones asociadas como es el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF). Las implicaciones de este síndrome sobre el Sistema Nervioso Central han sido ampliamente estudiadas, sin embargo el estudio de órganos diana del alcoholismo como el hígado no lo han sido en la misma medida. Con este trabajo se evidencian las alteraciones ultraestructurales del hígado en el SAF en ratas y se valorar el efecto protector del ácido fólico sobre este órgano. Material y Métodos: Se utilizaron ocho ratas Wistar gestantes, divididas en cuatro grupos: A: control, B: tratadas con ácido fólico, C: tratadas con etanol y D: tratadas con etanol y ácido fólico. El tratamiento fue administrado mediante una cánula intragástrica, durante toda la gestación hasta el parto. A los 35 días de nacidas se estudiaron dos crías por madre, una de cada sexo. Se tomaron fragmentos de hígado para estudio con el Microscopio Electrónico de Transmisión. Resultados: En los hepatocitos de ratas con SAF se observaron mitocondrias con electrodensidad aumentada e hinchadas, así como dilatación del retículo endoplasmático. Los canalículos biliares también se encontraron muy dilatados. En los hepatocitos de ratas con SAF y tratadas con ácido fólico estas alteraciones fueron mínimas. Conclusiones: En ratas con SAF se producen cambios histopatológicos en los hepatocitos y en sus canalículos biliares y el ácido fólico suministrado a la madre que ingiere etanol durante la gestación tiene efecto protector sobre el hígado de su descendencia.

Palabras clave: Síndrome alcohólico fetal, microscopía electrónica, hepatocito.

FOLIC ACID PROTECTOR EFFECT ON THE ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF RAT LIVER WITH FETAL ALCOHOL SYNDROME

ABSTRACT

The alcoholic drink consume was increase in woman adolescent and the associate complications like Fetal Alcohol Syndrome (FAS). The implications of this Syndrome in Central Nervous System was plentiful investigate, bay the wait the study of significant organ that liver is not study in the same case. The main scope of this work is to study the electron microscopy alterations on liver of rats with FAS and the possible protecting effect of folic acid on this organ. Methods and Materials: Eight Wistar adolescent and pregnant rats divided in four groups were used: A: control, B: folic acid treated, C: ethanol treated, and D: ethanol and folic acid treated. The treatments were applied using an intragastric fathom model through the whole pregnancy period up to the birthing day. There were chosen two thirty-five year-old cubs with different sex, for every mother, and used for studying proposes. There were taken liver samples of the chosen animals to be analyzed by the electron transmission microscopy technique. Results: Swelled mitochondria with electron dense characteristics as well as dilatation of endoplasmic reticulum were observed in liver cells of rats with FAS. It was also found that biliary channel were clearly bloated. It was observed that these alterations were minimized in liver cells of rats with FAS that were treated with folic acid. Conclusions: Rats with FAS show histology liver disorder in liver cells and biliary channel. The application of folic acid to pregnant ethanol-consuming mothers through the gestation has a protecting effect on their descendents.

Key words: electron microscopy, Fetal Alcohol Syndrome, liver cell.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un incremento en el consumo de bebidas alcohólicas entre adolescentes [1,2] sobre todo del sexo femenino, con ello han aumentado las complicaciones biopsicosociales asociadas a esta drogadicción, como es el Síndrome alcohólico fetal (SAF) [3].

La repercusión del SAF sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, sus efectos sobre las características histológicas de órganos diana del alcoholismo como el hígado, han sido poco estudiados [4,5]. Por otra parte tampoco se reportan trabajos que aborden esta problemática en la descendencia de las madres adolescentes, que ingieran el tóxico durante el embarazo.

La prevalencia del consumo de alcohol durante el embarazo, se ha incrementado desde un 12.4% hasta un 16.3% entre 1991 y 1995, manteniendo similar comportamiento en la actualidad [4]. En Cuba ha aumentado el número de bebedores adolescentes, en especial en la población femenina, afectando la calidad de vida no sólo del adicto, sino también de los que conviven con él [2]. Hecho preocupante por la gran vulnerabilidad de los mismos y su asociación a trastornos nutricionales, en particular el déficit vitamínico que incluye al ácido fólico [6].

El alcoholismo, es capaz de producir déficit severo de folatos que contribuye a la patogenia de la hepatitis alcohólica y a estados carenciales en otras enfermedades [7]. Aspecto importante a considerar en una gestante adolescente, teniendo en cuenta los requerimientos elevados de esta vitamina tanto durante la gestación como en esta etapa del desarrollo [6].

El exagerado anabolismo de la adolescencia, hacen a esta etapa muy sensible a las restricciones calóricas, proteínicas, vitamínicas y de oligoelementos [8]. La ingestión de bebidas alcohólicas agrava estos problemas en la joven adolescente, repercutiendo doblemente sobre

la descendencia en caso de una gestación.

En la adolescencia también se inician las relaciones íntimo-afectivas de pareja, donde la primera consecuencia potencialmente grave es el embarazo [8]. Una de cada 10 mujeres del grupo entre 15 a 19 años de edad queda embarazada, por lo que las tasas de natalidad entre las adolescentes siguen siendo altas, y en lugar de disminuir, aumentan [8].

El hígado es el órgano diana del alcoholismo por excelencia [9]. Este órgano participa en la eliminación de sustancias tóxicas por lo que se considera un órgano central de defensa xenobiótica [10]. Los daños del etanol sobre el mismo han sido agrupados en tres categorías: esteatosis hepática, hepatitis tóxica y cirrosis hepática [10-13]. Entre las alteraciones histológicas descritas se encuentran: el aumento de volumen celular, el incremento del retículo endoplasmático liso y de los peroxisomas, aumento de volumen mitocondrial, y presencia de cuerpos esféricos acidófilos denominados cuerpos de Mallory, entre otras [11-14].

Teniendo en cuenta lo antes planteado en la presente investigación se pretende: conocer como se afectan las características ultra estructurales del hígado en el SAF, y si el ácido fólico administrado a ratas adolescentes que ingieren dosis elevadas de etanol durante la gestación posee efectos protectores para el hígado de las crías.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo, donde se utilizaron las crías de ratas adolescentes, de la línea Wistar, como modelo biológico. Las ratas fueron suministradas por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Se utilizaron 16 ratas como progenitoras, ocho de cada sexo, escogidas al azar mediante una tabla de números aleatorios. Las ocho hembras eran adolescentes, vírgenes y tenían entre 58 y 72 días de nacidas, con un peso promedio entre 180 y 200 gramos y los machos eran adultos con un peso de 200 a 270 gramos. A hembras y

machos se les suministró agua y dieta ratonina ad libitum, producida en el CENPALAB. Se mantuvieron en adecuadas y similares condiciones higiénicas y ambientales. Las hembras fueron apareadas con machos diferentes. Se les determinó el primer día de la gestación mediante smear vaginal.

Con las ratas gestantes se conformaron cuatro grupos al azar utilizando una tabla de números aleatorios: Cada grupo quedó constituido por dos ratas madres, las que fueron tratadas a partir del tercer día posterior al apareamiento hasta el parto de acuerdo al esquema que se explicará más adelante. La vía de administración para todos los grupos, fue oral a través de una cánula intraesofágica, según Tsukamoto [15]. Grupo A: (control negativo) se le suministró agua en la misma dosis, hora y mediante el mismo procedimiento que a las ratas experimentales. Grupo B: (control positivo) se le suministro ácido fólico a razón de 400 microgramos por Kg. por día [16], diluido en agua en una dosis diaria. Grupo C: (experimental) recibieron tratamiento con etanol al 40% a razón de 5 g por Kg. de peso corporal [10], en dosis única diaria y Grupo D. (experimental) tratado con etanol y ácido fólico a las mismas concentraciones y dosis que los dos grupos anteriores, aunque para este grupo el intervalo entre ambos tratamientos fue de dos horas.

Las ratas madres se pesaron una vez por semana en una balanza marca Yamamoto LM-3200. Con los valores obtenidos se calculó la cantidad de etanol y ácido fólico a suministrar durante la semana siguiente. Las mismas se enumeraron y fueron colocadas en cajas individuales.

El tratamiento fue suspendido de inmediato después del parto. Pasadas 72 horas se homogeneizó la camada, utilizando una tabla de números aleatorios, de manera que todas las madres quedaran con igual número de hijos. Los hijos se mantuvieron junto a sus madres, debidamente marcados, hasta el destete, efectuado a los 21 días de nacidos.

De cada grupo (A, B, C y D) se estudiaron dos crías por

madre (cuatro por grupo). Las que fueron escogidas al azar mediante una tabla de números aleatorios. Por tanto, el universo quedó constituido por 16 ratas hijas, distribuidas en cuatro integrantes por cada grupo, divididos equitativamente en ambos sexos.

Después del destete estas ratas se mantuvieron, en cajas múltiples (dos ratas por caja), separadas por sexo y de acuerdo al grupo al que pertenecieron las madres. Recibieron agua y dieta ratonina ad libitum y no se les suministró tratamiento alguno. Las condiciones ambientales e higiénicas fueron similares y adecuadas para todos los grupos hasta los 35 días de vida postnatal. Luego de este período se practicó la eutanasia. Al concluir el experimento, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal, a una dosis de 40 mg/Kg.

Para el análisis de las estructuras subcelulares del hepatocito se tomaron fragmentos de aproximadamente un milímetro cúbico. Para la observación de estas muestras al microscopio electrónico se procedió como sigue [17]: Los tejidos se fijaron en solución de glutaraldehído al 3,2 % y buffer de cacodilato (BDH Chemical Ltd) 0,1 M a pH 7,2 a 4° C durante 1 hora, se lavaron en el mismo buffer, para posterior fijación en tetraóxido de osmio al 1 % (BDH Chemical Ltd) en solución tampón cacodilato (BDH Chemical Ltd) 0,1 M con pH 7,2 durante una hora. Seguidamente se realizaron lavados con el mismo tampón por 1 hora., la deshidratación se realizó en acetona de 30%, 50%, 70%, 100%. Las tres primeras a 4° C durante 10 minutos para cada una, y con la concentración del 100% se realizaron tres pases a temperatura ambiente por un período de 20 minutos cada uno. La infiltración: Se realizó en mezclas de concentraciones crecientes de Spurr y acetona como sigue: Mezcla 1: Spurr. 25%, acetona 75% durante 1 hora a temperatura ambiente. Mezcla 2: Spurr. 50%, acetona 50% durante 1 hora a temperatura ambiente. Mezcla 3: Spurr. 75%, acetona 25% durante 24 horas a temperatura ambiente. Mezcla 4: Spurr. En estufa a 60° C por 45

minutos. Para la inclusión: cada fragmento de tejido se colocó en los moldes a los cuales se les añadió la mezcla con la resina anterior y se polimerizaron en estufa a 60°, por 72 horas [19].

Los bloques obtenidos se cortaron en un ultra micrótomo (NOVA, LKB), con cuchillas de vidrio. Se realizaron cortes semifinos de 1µm de grosor, para la localización de los hepatocitos. Los cortes tuvieron un grosor de 40-50 nm y luego se montaron sobre rejillas de cobre y níquel de 400 orificios. Se contrastaron con acetato de uranilo (BDH Chemical Ltd) y citrato de plomo (BDH Chemical Ltd) según el método de Reynolds. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico JEOL JEM 2000 EX (JEOL, Japón), a una aceleración de 60 Vol. Se le tomó foto en películas planas de 8,2-11,8 cm. (Agfa Gevaert).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hepatocitos de las ratas descendientes de madres controles, presentaron núcleos con características morfológicas normales, eucromáticos y nucléolos prominentes, ver Fig. 1. El retículo endoplasmático (rugoso y liso) se dispuso formando cisternas paralelas, en su mayoría agrupadas, y con la luz poco dilatada. Las mitocondrias presentaron una membrana externa íntegra, lisa y una membrana interna con crestas bien definidas, con características morfológicas y densidad electrónica, normales.

El aparato de Golgi se dispuso por todo el citoplasma. Los lisosomas, en su mayoría se localizaron cercanos al canalículo biliar y con características también normales. El glucógeno fue abundante. La luz de los canalículos biliares estuvieron dentro de límites normales y bien limitada por desmosomas, ver Fig. 2. Los sinusoides hepáticos presentaron una apariencia normal.

Los hepatocitos de las ratas hijas provenientes de madres tratadas sólo con ácido fólico presentaron núcleos y citoplasmas con características histológicas normales.

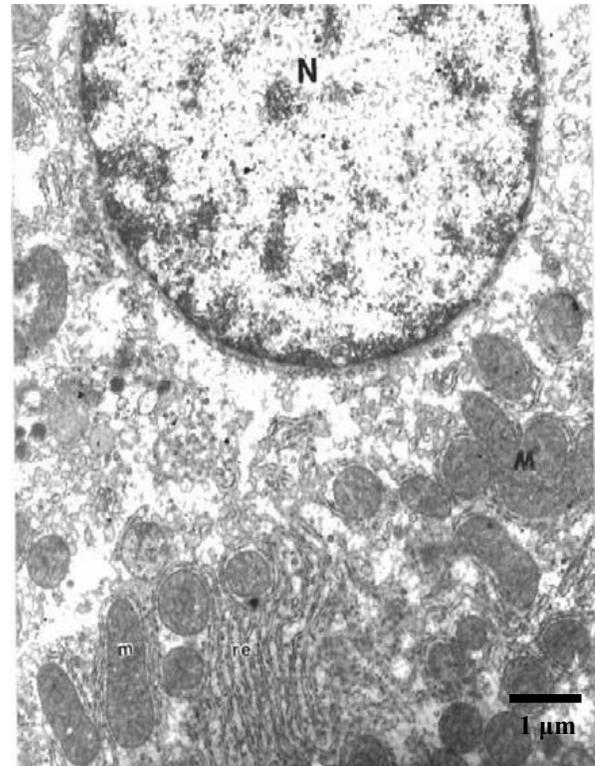


Fig. 1: Porción del citoplasma de un hepatocito de una rata hija de madre del grupo control. Núcleo (N), mitocondrias (M) y retículo endoplasmático rugoso (RER) con características normales.

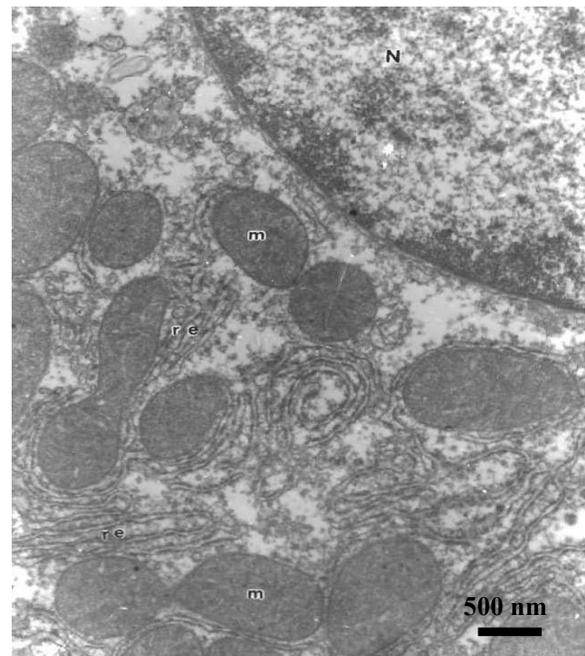


Fig. 2: Porción del citoplasma de un hepatocito de una rata hija de madre del grupo control. Canalículo biliar (cb) con características normales.

Con un patrón muy similar al descrito para el grupo control. El resto de los componentes también presentaron características dentro de límites normales, ver Fig. 3.

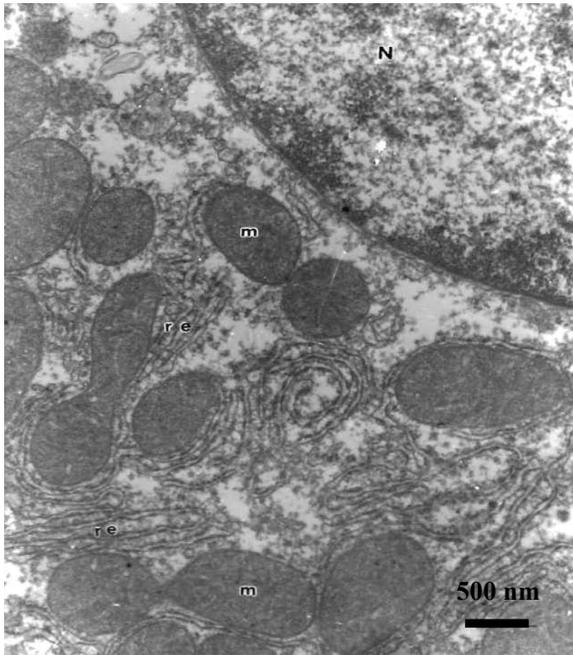


Fig. 3: Porción del citoplasma de un hepatocito de una rata hija de madre del grupo control positivo. Núcleo (N), mitocondrias (m) y retículo endoplasmático rugoso (re) con características normales.

Los hepatocitos de las ratas hijas de madres tratadas con etanol mostraron núcleos algo electrodensos. El retículo endoplasmático (rugoso y liso) presentó una luz dilatada y las cisternas se dispusieron formando hileras paralelas y separadas entre sí. Las mitocondrias estuvieron muy aumentadas de tamaño, polimorfas, con pérdida de las crestas, rotura de la membrana externa, e incremento marcado de la densidad electrónica, ver Fig.4.

Junto al polo biliar se detectaron numerosos lisosomas y gránulos de lipofucsina. Así como un incremento de las vacuolas lipídicas y una marcada disminución del glucógeno. Los canaliculos biliares mostraron luces muy dilatadas, ver Fig. 5. En los casos analizados impresionó que las hembras presentaran mayor daño celular que los machos.

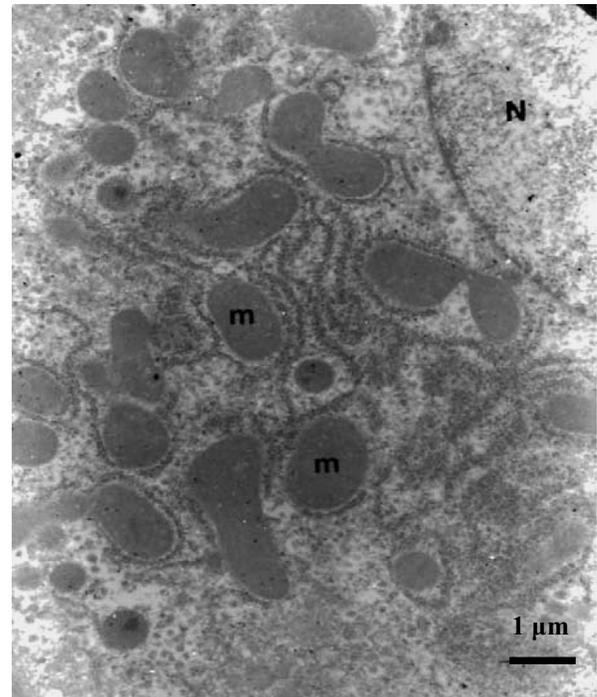


Fig. 4. Porción de un hepatocito de una rata hija de madre tratada con etanol. Mitocondrias (m) con pérdida de sus crestas.

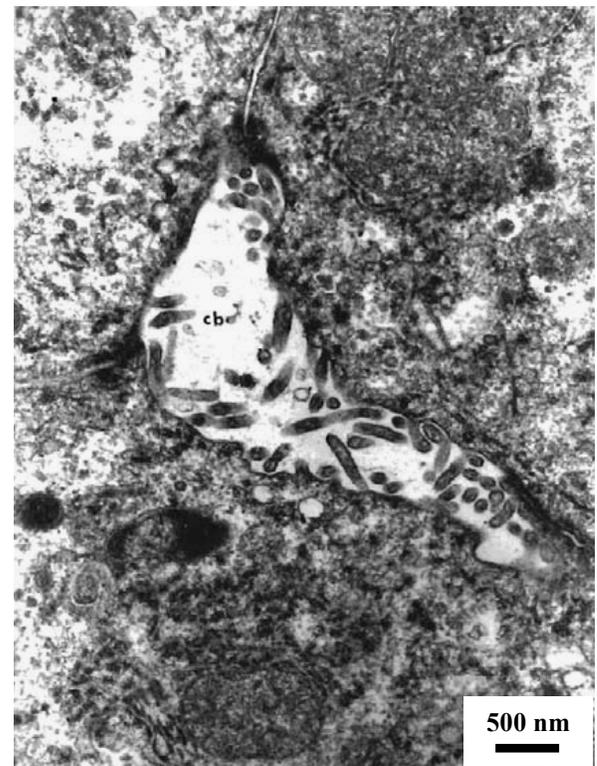


Fig. 5. Parte de una célula hepática de una rata hija de madre tratada con etanol. Canaliculo biliar (c b) muy dilatado.

Las lesiones citológicas encontradas en los hígados de las ratas hijas de madres que ingirieron etanol confirma que este tóxico tiene efecto teratogénico, como han postulado diferentes investigadores [3-5] y ponen en evidencia una vez más que el hígado es un órgano muy sensible al etanol [10-14,19].

Estas lesiones parecen ser debidas a que el consumo materno de etanol, según se ha planteado, induce estrés oxidativo en los tejidos fetales y que es responsable de las respuestas al tóxico. Además la baja defensa antioxidante de estos ejidos por una parte y la acumulación de productos de aldehídos tóxicos y de peroxidación lipídica, por la otra, predisponen al feto al daño oxidativo [20,21].

Alteraciones similares a las encontradas han sido descritas por otros autores en ratas tanto adultas como adolescentes, que han sido tratadas o bien por largo tiempo o con altas dosis de etanol [11-14,22]. Entre las estructuras más afectadas en los hepatocitos de la presente investigación se encontraron las mitocondrias, con pérdida total de sus crestas y con incremento de su densidad electrónica, los lisosomas, el retículo endoplasmático, y el canalículo biliar. Alteraciones como estas están descritas en la muerte celular por apoptosis [11,18,20].

El hepatocito posee tres vías principales para el metabolismo del etanol, localizadas en compartimentos subcelulares diferentes: la vía de la enzima alcohol deshidrogenasa (DA), en el citosol, el sistema de oxidación microsomal, asociada al retículo endoplasmático, y la vía de la catalasa en lisosomas y peroxisomas [20-22].

El etanol produce lesión celular por la inducción de los citocromos P450 a través del sistema de oxidación microsomal de etanol, los radicales libres que reaccionan con las proteínas y membranas, y la oxidación del etanol por la DA que al producir NADH son llevados a las mitocondrias para su reoxidación formando acetaldehído que induce peroxidación lipídica y la formación de un

compuesto acetaldehído-proteína [20-22].

Por tanto las estructuras que participan directamente en el metabolismo del etanol resultaron las más afectadas por el tóxico, y el daño observado fue muy similar al reportado en ratas adultas o adolescentes que ingieren etanol por un tiempo prolongado, como se ha planteado en la literatura [10,11,14]. Lo que demuestra que el etanol ingerido durante la gestación también resulta muy perjudicial para los hepatocitos de la descendencia.

Los hepatocitos de las crías de las ratas tratadas con etanol y ácido fólico presentaron núcleos con características normales, eucromáticos y con nucléolos prominentes. El retículo endoplasmático (rugoso y liso) se dispuso formando cisternas paralelas y agrupadas, y con discreta dilatación en su luz. Las mitocondrias mostraron tamaño, forma y electro densidad normal, con crestas bien definidas, aunque en algunos casos se observó pérdida en algunas secciones de su membrana externa, ver Fig. 6.

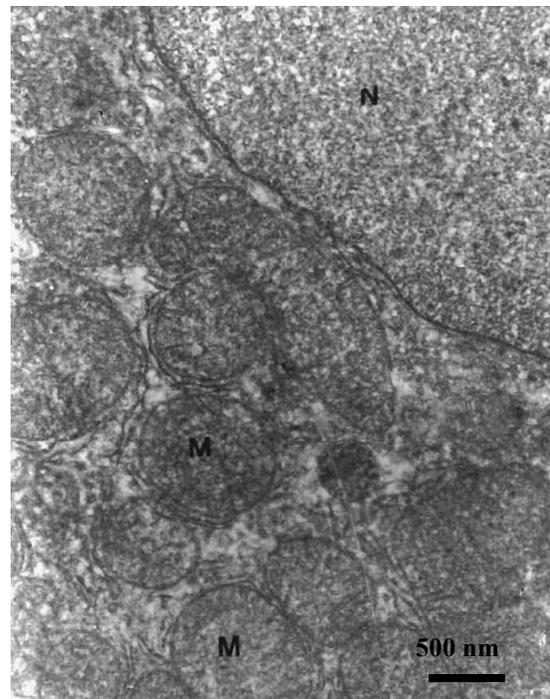


Fig. 6: Parte de una célula hepática de una ratita hija de madre tratada con etanol y ácido fólico. Mitocondrias con sus crestas (M), con ligera pérdida de sus membranas. Núcleo (N) dentro de límites normales.

El aparato de Golgi y los lisosomas mostraron características normales. El glucógeno fue abundante y sólo se observaron aisladas vacuolas lipídicas. Se observó una dilatación moderada de los canalículos biliares y los sinusoides presentaron características dentro de límites normales.

Con relación al grupo tratado con etanol y ácido fólico, en el presente estudio se observó mejoría en los patrones estructurales de los hepatocitos, al compararlos con el grupo tratado sólo con etanol. Pues a pesar de que en algunas zonas se observaron mitocondrias con pérdida parcial de sus membranas externas, estas conservaron su tamaño y densidad electrónica. A favor de este criterio se encuentran la normalidad estructural del retículo endoplasmático, los lisosomas y peroxisomas.

En el presente trabajo ambos grupos: las tratadas solo con etanol y las tratadas con etanol y ácido fólico recibieron la misma dosis y durante igual período de tiempo. A pesar de esto las lesiones en los hepatocitos de los animales provenientes de madres tratadas además con ácido fólico fueron menos marcadas, lo que habla a favor de un posible efecto hepato protector de esta vitamina en el SAF.

Estos resultados concuerdan con estudios bioquímicos de estrés oxidativo, donde se realizan determinaciones enzimáticas de glutatión reductasa, gamma glutamil transpectidasa, peróxido de hidrógeno, entre otras y se observa que los efectos del etanol son mitigados cuando las ratas gestadas son tratadas con folatos [18,20,23]. Sin embargo, en la literatura revisada no se reportan datos con los que puedan ser comparados los hallazgos histológicos obtenidos en la presente investigación.

Los bajos niveles de antioxidantes en tejidos fetales y la exagerada respuesta de la mitocondria fetal a la estimulación prooxidante *in vitro* sugiere que las células fetales están fuertemente predispuestas al estrés oxidativo. Por otra parte, estudios recientes han sugerido que los tejidos fetales son también propensos a la formación y subsiguiente acumulación de al menos un

producto de peroxidación lipídica tóxico, por lo que este efecto es revertido por un tratamiento con antioxidantes [18,23]. La capacidad antioxidante del ácido fólico parece estar involucrada en la prevención del daño hepático en la descendencia de ratas tratadas con etanol.

En la bibliografía consultada no encontramos reportes de SAF ni en animales, ni en humanos, donde pudieran ser comparados nuestros resultados con respecto a la prevalencia por sexos. Para humanos adolescentes y adultos se reportan daños hepáticos más severos en el sexo femenino, por ser este más vulnerable [11]. Pues en general las mujeres tienen menor talla que los hombres, y poseen entre un cinco y un diez por ciento menos de agua en el cuerpo que estos últimos, por lo que las mujeres obtienen una concentración de etanol en sangre más alta con una dosis similar de alcohol. A esto también se le suma que la mujer cuenta con bajo nivel en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa. Todos estos elementos la hacen más susceptible a padecer de enfermedades hepáticas ocasionadas por el consumo de etanol, en un período de tiempo más corto y tras consumir menos bebidas alcohólicas que los hombres [11,24-27].

CONCLUSIONES

El hígado de ratas con síndrome alcohólico fetal presenta cambios anatomopatológicos correspondientes a hepatitis alcohólica, con alteraciones marcadas en los canalículos biliares.

Las estructuras subcelulares más afectadas en el hígado de ratas con SAF son las mitocondrias y el retículo endoplasmático.

El ácido fólico suministrado a la madre que ingiere etanol durante la gestación, tiene un efecto protector sobre el desarrollo del hígado de su descendencia, minimizando las alteraciones histológicas que la ingestión del tóxico provoca.

REFERENCIAS

- [1] Philpot R. M, Badanich KA, Kirstein CL. (2003). “Place conditioning age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol”. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27(4): 593-9.
- [2] Maddock J, Glanz K. (2005) “The relationship of proximal normative belief and global subjective norms to collage student’s alcohol consumption”. *Addict Behav*; 30(2):315-23.
- [3] Jacobson JL, Jacobson SW. (2002). “Effects of prenatal alcohol exposure of child development”. *Alcohol Research and Health.* 26(2): 282-86.
- [4] Thackray HM, Tiffit C. (2001). “Fetal Alcohol Síndrome”. *Pediatrics in Review.* 22: 47-55.
- [5] Aros Aránguiz S. (2000) “Síndrome alcohol fetal” . *RMS Revista Médica de Santiago. Boletín del departamento de Pediatría de la Universidad de Chile.* 3(11).
- [6] Hillman RS. (2001). “Factores hematopoyéticos. Factores del crecimiento, minerales y vitaminas. Ácido Fólico. En Goolman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica”. Vol. 2. 10 ma ed. p. 1526-30.
- [7] Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ, (2002) “Metabolic interaction of alcohol and float”. *J. Nutr*; 132(8):2367s-2372s.
- [8] Bermúdez SA. (2003). “Adicciones y sus consecuencias. En Peláez MJ. Adolescencia y juventud. Desafíos actuales”. Habana: *Ed. Científico Técnica*; p. 156-69.
- [9] Mann RE, Smart RG, Govoni R. (2003).”The Epidemiology of Alcoholic Liver Disease”. *Alcohol Research & Health.* 27(3): 209-19.
- [10] Herrera Batista A, González Bravo M, Céspedes ME, Sánchez SG. (1999) “Efectos del alcoholismo crónico sobre el hígado de ratas albinas adolescentes”. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18(3):189-96.
- [11] González Menéndez R. (2004). “Alcoholismo abordaje integral”. Santiago de Cuba: *Editorial Oriente*, p. 95-7.
- [12] Susman S, Dent CW, Leu L. (2000). “The one year prospective prediction of substance abuse and dependence among high risk adolescents”. *J Susbt Abuse.* 12(4): 373-86.
- [13] Malherbe Pérez J T, Herrera Batista A, Puldón Seguí G. (2005) “Compotamiento de las variables morfométricas en el hígado de ratas machos alcohólicas adolescentes inoculadas con Heber-biovac HB”. Disponible en: <http://WWW.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp>
- [14] González Bravo M, Herrera Batista A, Domínguez Álvarez C, Coro Antich RM, Lebreo Álvarez I. (2004). “Efectos del alcoholismo crónico sobre las características morfológicas y Ultramicroscópicas del hígado de ratas adolescentes”. Disponible en: <http://conganat.sld.cu/autores/trabajos/T342/index.html>
- [15] Tsukamoto H, Lu SC. (2001). “Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury”. *FASEB Journal*; 15: 1335- 49.
- [16] Pamukçu Baran Ö., Yıldırım A., Akkuş M. (2004). “The protective role of folic acid and vitamin e against toxic effects of valproic acid on liver tissue during period of gestation”. *Dicle Tıp Dergisi.* :31(4):17-23.
- [17] Spurr A. (1969). “A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Ultrastruct” *Res.* 26: 31-43.
- [18] Cano MJ, Ayala A, Murillo ML, Carreras O. (2001). “Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period”. *Free Radic Res.* 34(1):1-8.
- [19] Svinarich DM, DiCerbo JA, Zaher FM, Gonik B. (1998) “Ethanol-induced expression of cytokines in a first-trimester trophoblast cell line”. *Am J Obstet*

Gynecol; 179(2): 470-5.

- [20] Donohue TM, Osna NA. (2003). “Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury”. *Alcohol Research & Health*. 27(4): 317-24.
- [21] Wheeler MD. (2003). “Endotoxin and Kupffer Cell Activation in Alcoholic Liver Disease”. *Alcohol Research & Health*. 27(4): 300-6.
- [22] Granville DJ, Gottlieb RA. (2002). “Mitochondria regulators of cell death and survival”. *Scientific World J*; 2: 1569-78.
- [23] Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. (1999): “Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus”. *Front Biosci*. 15(4): 541-50.
- [24] Marsano LS, Mendez C, Hill D, McClain CJ. (2003). “Diagnosis and Treatment of Alcoholic Liver Disease and Its Complications”. *Alcohol Research & Health*; 27(3): 247-56.
- [25] Refaai MA, Nguyen PN, Steffenson TS, Evans JR, Cutte-Brown JE and Laposata M. (2002). “Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake”. *Clin Chem*; 48(1): 77-83.
- [26] Carol A. Prescott, Ph.D. (2002). “Sex Differences in the Genetic Risk for Alcoholism”. *Alcohol Research & Health*; 26(4): 264-73.
- [27] Collins RL, McNair LD. (2002). “Minority Women and Alcohol Use”. *Alcohol Research & Health*; 26(4): 251-6.