

DENSIDAD OLIGODENDROGLIAL EN NERVIÓ ÓPTICO MURINO POR CONSUMO CRÓNICO DE METANOL

OLIGODENDROGLIAL DENSITY IN MURINE OPTIC NERVE BY CHRONIC CONSUMPTION OF METHANOL

JOSÉ RAFAEL DÍAZ RUDAS

Universidad Norbert Wiener

PALMER HERNÁNDEZ

Universidad Norbert Wiener

MARÍA DE LOS ÁNGELES RIVERA

Universidad Norbert Wiener

RESUMEN

La mayoría de bebidas alcohólicas que se consumen en el Perú no cuentan con un registro sanitario; además, presentan componentes diferentes de los previstos en la norma. La adulteración de estas bebidas alcohólicas se evidencia en los niveles altos de etanol y bajos de metanol. El consumo agudo de concentraciones altas de metanol produce daño del nervio óptico y disminución de mielina y oligodendrocitos. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del consumo crónico de concentraciones bajas de metanol en los oligodendrocitos del nervio óptico. Se utilizaron 60 ratas albinas macho, *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman, edad 8 semanas. Fueron distribuidas aleatoriamente en 5 grupos de 12 ratas albinas cada uno: 1 grupo *blanco* y 4 grupos experimentales. Se utilizaron bebidas alcohólicas adulteradas: pisco (*p*), anisado (*a*) y cognac (*c*), y bebidas alcohólicas autorizadas: Pisco (*P*) y Cerveza (*C*) para elaborar los preparados alcohólicos correspondientes (grupos experimentales): *pac*, *pac+C*, *Pisco* y *Pisco+C*. La concentración de metanol en las bebidas alcohólicas adulteradas fue de 14,1 mg/100 ml (valor límite 150 mg/100 ml para bebidas destiladas según la Norma Técnica Peruana–Indecopi). El grupo *blanco* recibió agua *ad libitum*, y los grupos experimentales, una dosis diaria de 5,06 gramos de etanol/kg de peso corporal por sonda orogástrica. Luego de 12 semanas las ratas albinas fueron sacrificadas por corte medular a nivel cervical; se extrajo y fijó el nervio óptico en formol neutro al 10 %. Posteriormente, se realizó un corte transversal a nivel proximal del nervio óptico y se procedió al estudio histopatológico de los oligodendrocitos, axón y mielina con la coloración de Hematoxilina & Eosina. Se estudió la densidad oligodendroglial con el método estereológico del *point counting*, no encontrándose una diferencia significativa entre los 5 grupos mediante la prueba HDS Tukey ($p=0,290$). No existió variación en la densidad oligodendroglial. Se concluye que el consumo crónico de metanol a bajas concentraciones no produce alteración en la densidad oligodendroglial.

Palabras clave: metanol, nervio óptico, oligodendrocito, estereología, bebida alcohólica adulterada.

ABSTRACT

Consumption of alcoholic beverages in Peru do not have a sanitary registry presenting components different from the regulations. fte adulteration of these alcoholic beverages is evidenced in high levels of ethanol and very low levels of methanol. Acute consumption of high concentration of methanol causes optic nerve damage with myelin and oligodendrocytes loss. fte purpose of this study was to investigate the effect of chronic consumption of low concentration of methanol on optic nerve oligodendrocytes. 60 male Holtzman rats, *Rattus norvegicus*, 8 weeks of age were used. Rats were randomly divided into five groups (1 control and 4 experimental). We used adulterated alcoholic beverages: pisco (*p*), aniseed (*a*) and cognac (*c*) and licensed alcoholic beverages: Pisco (*P*) and Beer (*C*) to prepare the corresponding alcoholic mixed drinks (experimental groups): *pac*, *pac+C*, *Pisco*, *Pisco+C*. fte concentration of methanol in the adulterated alcoholic beverages was 14.1 mg/100 ml (limit value 150 mg/100 ml for distilled beverages according to the Peruvian Technical Standard–Indecopi). fte control group received water ad libitum and the experimental groups a dose of 5.06 g of ethanol/kg body weight by orogastric tube. Twelve weeks later, the extraction of the optic nerve was carried out, fixing it in neutral buffer formalin 10% and then performing a transverse section at the proximal level of the optic nerve. Subsequently, a transversal section was made at the proximal level of the optic nerve and histopathological study of oligodendrocytes, axon and myelin with Hematoxylin & Eosin staining was carried out. Oligodendroglial density was studied with the stereological method of point counting, and no significant difference was found between the 5 groups using the Tukey HDS test ($p = 0.290$). Although there was no alteration in the oligodendroglial density. It is concluded that methanol at low concentration does not produce alteration in oligodendroglial density.

Key words: methanol, optic nerve, oligodendrocyte, stereology, adulterated alcoholic beverage.

I. INTRODUCCIÓN

El nervio óptico, también llamado segundo nervio craneal, transmite la información visual desde la retina hasta el cerebro. Nace de las células ganglionares de la retina y termina en el quiasma óptico (origen aparente), para luego llamarse tracto óptico. Los axones de las células ganglionares de la retina están mielinizados por los oligodendrocitos y se sitúan por fuera del globo ocular; estos axones forman el nervio óptico. El nervio óptico está rodeado por meninges a lo largo de todo su recorrido. Se origina a partir del tallo óptico en la semana siete del desarrollo embrionario

y está compuesto por los axones de las células ganglionares de la retina y células gliales^{1,2}. La historia de la numeración de los nervios se remonta a la clasificación de Galeno en 7 pares (siglo II d. C.), para pasar luego a los 9 pares de Willis (1664) y, finalmente, a la versión moderna de los 12 pares de Soemmerring (1778). Sin embargo, desde finales del siglo XIX se genera un debate sobre el verdadero origen del nervio óptico. Se ha reconocido que el segundo par craneal es diferente de los once pares craneales restantes, y debe considerarse parte del sistema nervioso central (SNC) por poseer oligodendrocitos y células de Schwann, como el sistema nervioso periférico (SNP)^{3,4,5}.

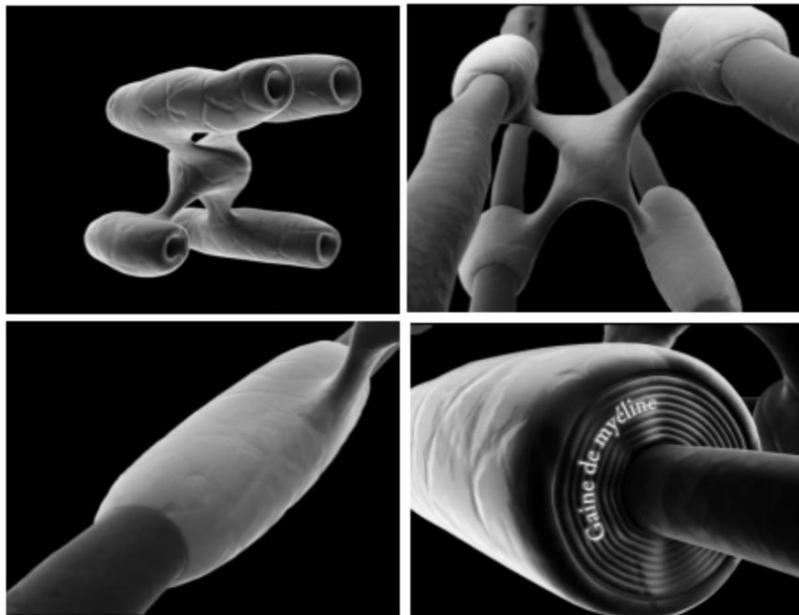
Existen dos tipos de oligodendrocitos, también llamados oligodendroglías: los oligodendrocitos interfasciculares –que se encargan de la producción de la vaina de mielina y aislamiento del axón– y los oligodendrocitos satelitales, de los cuales aún no se precisa su función. Desde nuestro conocimiento sobre el oligodendrocito humano la biología es limitada; los resultados de estudios de roedores son a menudo extrapolados a los humanos. El gran número de oligodendrocitos en humanos es exponencialmente elevado, aunque la densidad de oligodendrocitos por mm³ es notablemente similar entre roedores y humanos⁶ (véase Figura 1).

Los oligodendrocitos son células postmitóticas que se desarrollan de células precursoras de oligodendrocitos (OPC), que migran dentro de la sustancia blanca en desarrollo desde sus zonas germinales. El número final de oligodendrocitos en cualquier parte del SNC podría, en principio, depender de la cantidad de OPC que migran a él, la cantidad de veces que los OPC se dividen antes de que se diferencien, y la cantidad de oligodendrocitos y OPC que experimentan muerte celular normal en la región^{7,8,9}.

Bebida alcohólica adulterada es aquella que ha sido privada parcial o totalmente de

FIGURA 1

Oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son más pequeños y tienen menos prolongaciones que los astrocitos. Cada oligodendrocito envía varias prolongaciones que se enrollan en los axones, formando entre 30 a 100 capas concéntricas alrededor del mismo. Un oligodendrocito puede mielinizar de 30 a 50 axones adyacentes.



Fuente: <http://neuromatiq.com/fr/chapitres/3-principes-de-base/03-les-cellules-gliales>

sus elementos característicos, reemplazándolos o no por otros inertes o extraños de cualquier naturaleza para disimular u ocultar alteraciones, deficiente calidad de materias primas, defectos de elaboración, o para modificar la medida del producto. La producción informal e ilícita de bebidas alcohólicas se practica en muchas partes del mundo, incluso en países donde el alcohol está prohibido. Algunos nombres comunes para estas bebidas son *moonshine* (EUA), *kumi kumi* (Kenia), *tuak* (Malasia), *tonayán* (México), *racumín*, *tumbaloco* y *penal* en el Perú. Los consumidores eligen estas bebidas alcohólicas adulteradas debido a su bajo costo^{10,11}.

El metanol o alcohol metílico es un producto de la fermentación, especialmente cuando los mostos de uva son macerados con las cáscaras, y se encuentra tanto en bebidas fermentadas alcohólicas como no alcohólicas. El metanol aparece en toda la fase de destilación del pisco, en mayor proporción en la primera parte o cabeza; la cabeza es la primera porción de destilado que sale de los alambiques, cuyo grado alcohólico es alto. La única razón por la que un pisco podría presentar niveles de metanol por encima de la norma es porque ha sido mal elaborado o por adulteración¹².

Entre las propiedades físicas del metanol destacan su densidad de 792 kg/m³ y punto de ebullición de 64,7 °C, por lo que se evapora antes que el alcohol etílico o etanol, y se encuentra en cantidades importantes en la cabeza de los destilados, pero también en la cola, el último chorro, con un nivel muy bajo de alcohol; ambos son desechados en la destilación. La dosis letal mínima oral en humanos es de 0,3-1 g/kg de peso corporal, y dosis mayores a 1,4 g/kg causan la muerte. La ingestión de 10-30 ml (dosis tóxica) de metanol puro

en adultos puede causar daño permanente en el nervio óptico, mientras que el coma y la muerte ocurren con volúmenes de 30-240 ml (dosis letal). El metanol, cuando se encuentra en concentraciones ligeramente superiores a las permitidas, se percibe irritante en boca y nariz, con matices intensos de olor. De acuerdo al Reglamento de la Denominación de Origen Pisco¹³, la concentración de metanol deberá encontrarse en los rangos de 4-150 mg/100ml^{14,15,16}.

El etanol es absorbido en el estómago e intestino delgado. Su metabolismo está controlado en gran parte por el hígado, cuyos hepatocitos contienen la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y oxidan el etanol en acetaldehído. Luego, este es oxidado a ácido acético dentro de la mitocondria del hepatocito. Existe una segunda vía menos conocida localizada en el cerebro: el complejo enzimático Microsomal Ethanol Oxidizing System (MEOS), que presenta citocromos, los cuales son inducidos por el etanol—igual como sucede en el hígado—. El metanol es absorbido y rápidamente distribuido por el agua del cuerpo, no se une a proteínas y su vida media oscila entre 2 y 24 horas. De modo similar al etanol, el metanol es metabolizado principalmente en la mitocondria del hepatocito en el hígado. La enzima ADH lo oxida a formaldehído y subsecuentemente por el aldehído-deshidrogenasa a ácido fórmico. Tanto el etanol como el metanol compiten por la enzima ADH, aunque esta enzima prefiere metabolizar el etanol (afinidad 20 veces mayor); por ello, el tratamiento para la intoxicación por metanol se basa en el uso de etanol y hemodiálisis del metabolito (ácido fórmico) en casos graves¹⁷⁻²¹.

Los estudios sobre intoxicación por metanol corresponden a un consumo agudo, en un solo momento, y tratan respecto a las

lesiones producidas sobre todo en el tejido nervioso debido a las altas concentraciones que presentarían algunas bebidas alcohólicas adulteradas, suceso que ocurre esporádicamente en el Perú. Poco se ha estudiado sobre intoxicación crónica con metanol a concentraciones bajas. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del consumo crónico de concentraciones bajas de metanol –presente en las bebidas alcohólicas adulteradas– en los oligodendrocitos del nervio óptico de rata albina, para así extrapolar los hallazgos a humanos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Muestra

Se utilizaron 60 ratas albinas, *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman. Edad: 8 semanas, sexo masculino, 120 ± 20 gramos de peso corporal. Lugar de manutención y procedimientos: bioterio animal de la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Norbert Wiener (UNW); alimentación con cebada (10 g de cebada/100 g de peso corporal) y agua *ad libitum*. Cada rata albina fue colocada en una jaula funcional de malla metálica de 12 litros de volumen (30 cm de profundidad x 20 cm de alto x 20 cm de ancho). El bioterio se mantuvo con 12 horas de luz/oscuridad y temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Bebidas alcohólicas

Se compró botellas de pisco adulterado, cognac adulterado y anisado adulterado. Fueron obtenidas en el centro de la ciudad de Lima, a un costo de 22 soles por las 3 botellas. Asimismo, se compró botellas de pisco de venta autorizada, el más barato del mercado, y botellas de cerveza marca Pilsen. Se rotuló Pisco –en mayúsculas– a

la bebida autorizada (*P* es su abreviatura) y pisco –en minúsculas– a la bebida adulterada (*p* es su abreviatura) para poder diferenciarlas; asimismo, Cerveza –con mayúsculas– a la bebida autorizada (*C* es su abreviatura).

Sonda orogástrica

Para la administración diaria de las bebidas alcohólicas se confeccionó una sonda de 12 cm de largo a partir de una aguja de punción lumbar n.º 20 tipo Quincke, a la cual se le dio una curvatura y se le retiró el bisel; en su lugar se colocó una esfera hueca y roma de aleación de plata y bronce.

MÉTODOS

Preparados alcohólicos. A partir de las bebidas alcohólicas mencionadas se hicieron los siguientes preparados:

- “Tumbaloco”, al que llamamos *pac*: partes iguales de pisco adulterado + anisado adulterado + cognac adulterado.
- “Penal”, al que llamamos *pac+C*: partes iguales de pisco adulterado + anisado adulterado + cognac adulterado + cerveza Pilsen.
- “Pisco”, al que llamamos *Pisco*: el pisco de venta autorizada más barato del mercado.
- “Pisco+Cerveza”, al que llamamos *Pisco+C*: tres partes del pisco de venta autorizada más barato del mercado + una parte de cerveza autorizada.

Aleatorización y distribución de la muestra. La muestra fue distribuida al azar en 5 grupos (1 grupo *blanco* y 4 grupos experimentales) de 12 ratas albinas cada uno, a las cuales se les administró de manera diaria y durante 12 semanas: agua *ad libitum* (grupo *blanco*) y las bebidas alcohólicas anteriormente mencionadas (grupos: *pac*, *pac+c*, *Pisco* y *Pisco+C*).

Análisis cuantitativo de etanol y metanol en las bebidas alcohólicas adulteradas y autorizadas. Fue realizado en el Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental (Cicotox) de la UNMSM, siguiendo el método de espectrofotometría UV-visible para límites de detección de 0,02 mg/ml y cromatografía de gases para límites de detección de 0,01 mg/ml.

Cálculo de la dosis. Se siguió el cálculo realizado por Díaz²². Al grupo experimental se le administró una dosis estandarizada de etanol obtenida por extrapolación de una persona adulta de sexo masculino de 70 kg de peso corporal que consume una botella diaria (750 ml) de bebida alcohólica adulterada al 15 % de etanol durante un periodo mayor de 5 años.

Una de las mayores confusiones al administrar una dosis adecuada de etanol en ratas albinas es la ligereza con la que se revisan las condiciones experimentales al efectuar comparaciones entre diferentes estudios. El metabolismo basal, es decir, la producción de calor durante 24 horas en condiciones de reposo, al ser calculado por kilogramo de peso corporal resultó mayor mientras menor fuera el peso corporal del animal a estudiar. Según la medición del metabolismo o ley de la superficie corporal de Voit, la cantidad de Kcal/Kg/día en el hombre es de 32,1; para la rata albina es de 128,4. Por tanto, el metabolismo basal para la rata albina es aproximadamente 4 veces mayor que en el hombre, por lo que se les administró diariamente a las ratas una dosis multiplicada por el factor 4, en comparación con el ser humano.

El grupo experimental recibió una dosis de 5,06 gramos de etanol/kg de peso corporal. La LD50 para consumo oral de

etanol en ratas albinas es de 7,06 g/kg de peso corporal; la dosis diaria aplicada fue inferior a esta. El volumen administrado fue de 4 ± 2 ml; el volumen máximo del estómago de una rata albina adulta es de 7 ml; el volumen administrado fue inferior a este. La LD50 para consumo oral de metanol en ratas albinas es de 5,628 g/kg de peso corporal; la dosis diaria administrada fue mucho menor a esta.

Manipulación de la rata albina y sondeo. Se sujetó suavemente a la rata albina, con la mano izquierda, colocando la palma sobre el dorso del animal de experimentación, con el dedo índice y medio alrededor del cuello, y los demás alrededor del tórax. Una vez inmovilizada, con la mano derecha se procedió al deslizamiento de la sonda orogástrica por la boca y esófago hasta llegar a la luz del estómago. Luego, con el dedo índice, se presionó lentamente el émbolo de la jeringa para administrar el volumen de bebida alcohólica asignado.

Sacrificio del animal de investigación. El sacrificio fue por un corte medular a nivel cervical; previamente, la rata albina fue anestesiada con la bebida alcohólica a la cual fue sometida de manera crónica durante el estudio.

Extracción del nervio óptico y globo ocular. Se observó si el nervio óptico seguía aún unido al quiasma óptico; en caso estuvieran unidos, se les separó mediante un corte transversal con hoja de bisturí n.º 11. Estando el nervio óptico unido solo al globo ocular y a la piel, músculo y hueso que lo rodean, se procedió a cortar la piel restante, y, con tijera recta, el hueso maxilar en sentido recto hacia la nariz. El corte se realizó teniendo como soporte una sonda acanalada, la cual se atravesó por encima del globo ocular; luego se fragmentó

el hueso que estuvo alrededor del globo ocular con una pinza hemostática. Esta acción se realizó con precisión, pues aquí se encuentra el agujero por donde transcurre el nervio óptico; luego se removió la parte ósea con pinza plana. Se procedió a extraer el nervio óptico junto a otros pares craneales (pares oculomotores y nervio trigémino) (véase Figura 2). Con una pinza recta se cogió el nervio óptico desde su inicio en el globo ocular y se cortaron los músculos que los mantenían unidos. Luego se colocó el nervio óptico y globo ocular en un fragmento de depresor lingual de madera (bajalenguas), de dimensiones 2 cm de ancho x 3 cm de largo x 1 mm de ancho, mediante hilo de seda negra, atando en un extremo el globo ocular y en el otro la parte distal del nervio óptico. Se estiró suavemente la muestra extraída y se le anudó al depresor lingual. Posteriormente se colocó el depresor lingual en un frasco de formol neutro al 10 %, de manera que la cara que

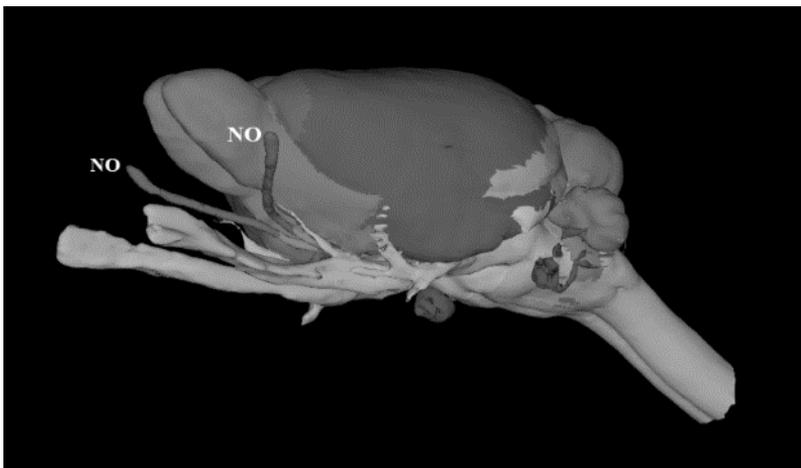
contenía al nervio óptico quedara en contacto directo con el formol.

Separación nervio óptico-globo ocular. Una semana después del proceso de fijación en formol se realizó, mediante corte transversal, la separación del nervio óptico del globo ocular en su porción rostral; el nervio fue colocado en forma perpendicular al molde de base metálica para su inclusión posterior en parafina.

Deshidratación, aclaramiento e inclusión. Este proceso se llevó a cabo en el Departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN). Se deshidrató la muestra utilizando soluciones de alcohol en orden creciente. Para el aclaramiento se utilizó butoxietano en lugar de xilol. Posteriormente se colocó la muestra en parafina para proceder a realizar cortes transversales de nervio óptico de 8 μ m de espesor. Se montaron

FIGURA 2

Encéfalo murino. Esquema del encéfalo de nervio óptico en vista lateral izquierda mostrando ambos nervios ópticos (NO).



Fuente: fte Waxholm Space Sprague Dawley rat atlas of Papp et al. (2014).

los cortes en láminas y se empleó la tinción Hematoxilina & Eosina (H&E).

Micrografiado a 400x. Se utilizó un microscopio biológico Eclipse Ci-L Nikon con una cámara adaptada al fototubo del mismo. Tres campos de nervio óptico fueron estudiados por cada rata albina.

Morfometría, estereología. La estereología es el conjunto de métodos con el cual se obtienen datos cuantitativos tridimensionales a partir de secciones bidimensionales. Se trata de una extrapolación del plano al espacio, de acuerdo con el resultado de diferentes conceptos teóricos de estadística, geometría integral y probabilidad geométrica. Es importante resaltar que es una herramienta libre de sesgo, pues presenta medidas de cuantificación aprovechando propiedades geométricas intrínsecas de la estructura a estudiar: tamaño, forma, tipología y función.

Se realizó en primer lugar el estudio morfométrico identificando la morfología o citoarquitectura de los oligodendrocitos, para confirmar que el campo de estudio correspondiera al nervio óptico y no al nervio periférico (aquí se encuentran las células de Schwann). Ya identificados los oligodendrocitos, se procedió a diferenciarlos de los astrocitos y células ganglionares.

Para realizar la morfometría de las láminas de nervio óptico en corte transversal se utilizó el software JMicroVision versión 1.2.7; se evaluó la densidad de los oligodendrocitos por campo con el método del *point counting* de acuerdo a la siguiente fórmula: número de puntos que toca a un oligodendrocito multiplicado por el número de puntos estudiados y dividido todo entre el número de puntos totales del campo (llámese número de puntos estudiados

a aquellos puntos que excluyen las partes que estén vacías en el número de puntos totales de campo). El número de puntos totales que existen en nuestra cuadrícula y se superponen a un campo de 400x es de 70: 10 puntos a lo largo y 7 puntos a lo ancho.

Estadística. Se empleó el software IBM SPSS Statistics versión 22 y se realizó un análisis descriptivo utilizando el estadístico promedio. Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar la media aritmética entre los 5 grupos (grupo blanco y grupos experimentales), pues los datos presentaron una distribución no normal. Para la prueba de comparaciones múltiples se utilizó la prueba HSD de Tukey.

Ética. Se siguieron las normas establecidas en la Ley 30407, Ley de protección y bienestar animal, que estipula las condiciones éticas para el manejo de animales de laboratorio. Se rechaza así cualquier acto de crueldad y se evita, de la misma manera, sufrimiento innecesario para el animal de laboratorio²³.

III. RESULTADOS

En contraste con lo hallado por Díaz 2015¹⁷, en los últimos 13 años, periodo 2004-2017, la concentración de etanol ha aumentado en 3 veces, mientras que la concentración de metanol ha disminuido hasta en 150 veces. El valor límite de metanol es de alrededor de 300 mg/100 ml (o su equivalente en 3000 mg/l o 3 g/l), según las distintas normas internacionales, y es de 150 mg/100 ml según la NTP-Indecopi. El promedio de metanol en las bebidas alcohólicas adulteradas del estudio fue de 14,13 mg/100 ml, mientras que el promedio en las bebidas alcohólicas autorizadas del estudio fue menor a 0,01 mg/100 ml.

Esto se contrapone a la cantidad de metanol hallada en 2004, que fue 15 veces superior a la NTP²² (véase Tablas 1 y 2).

El tamaño de nervio óptico en las ratas albinas es de 20 mm; el humano es de 50 mm. Se logró una buena técnica de exten-

dido del nervio óptico al colocarlo junto al paquete muscular en un fragmento del depresor lingual de madera, lo que evitó su retracción y espiralización. Ello facilitó realizar los cortes transversales. Al microscopio óptico se evidenció y confirmó que la ubicación de la arteria central de la reti-

TABLA 1
Bebidas alcohólicas. Concentración de metanol y etanol.

| Bebidas alcohólicas | Metanol (mg/100 ml) | | Etanol (ml/100 ml) | |
|-------------------------------|---------------------|-----------|--------------------|----------|
| | Año 2004 | Año 2017 | Año 2004 | Año 2017 |
| <i>p = pisco adulterado</i> | 2951 | 10,0 | 23,68 | 33,00 |
| <i>a = anisado adulterado</i> | 1967 | 17,4 | 14,16 | 23,60 |
| <i>c = cognac adulterado</i> | 1725 | 15,0 | 13,17 | 35,50 |
| <i>P = Pisco autorizado</i> | no estudiado | menor a 1 | no estudiado | 42,00 |
| <i>C = Cerveza autorizada</i> | no estudiado | menor a 1 | no estudiado | 5,00 |

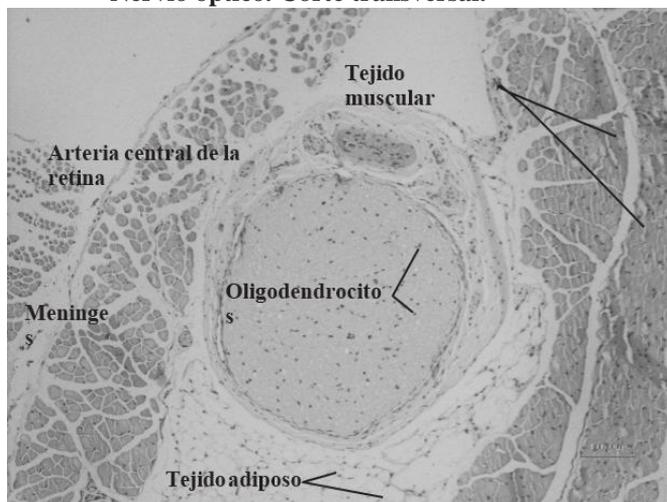
TABLA 2
Preparados alcohólicos. Concentración de metanol y etanol.

| Preparados alcohólicos | Metanol (mg/100 ml) | | Etanol (ml/100 ml) | |
|------------------------|---------------------|-----------|--------------------|----------|
| | Año 2004 | Año 2017 | Año 2004 | Año 2017 |
| <i>pac</i> | 2210 | 14,13 | 16,90 | 30,70 |
| <i>pac + C</i> | 1658 | 10,60 | 13,90 | 24,20 |
| <i>Pisco</i> | no estudiado | menor a 1 | no estudiado | 40,00 |
| <i>Pisco + C</i> | no estudiado | menor a 1 | no estudiado | 31,20 |

na murina es por fuera del nervio óptico, a diferencia del humano que discurre por el centro del nervio óptico (véase Figura 3). El nervio óptico presentó una fina cubierta de meninges, a diferencia del nervio periférico, que está cubierto de epineuro. El color del nervio óptico en H&E es de un tono más violeta que el nervio periférico, lo cual ayudó a diferenciarlos de manera rápida.

En el estudio morfométrico se observa que el tamaño del oligodendrocito es el mismo en todos los grupos; no hubo alteración en su morfología nuclear, ligeramente ovalada, ni en sus prolongaciones citoplasmáticas (no evidenciadas en condiciones normales en coloración H&E al microscopio óptico). El diámetro mayor fue de 5 µm, y el diámetro menor, de 3

FIGURA 3
Nervio óptico. Corte transversal.



µm; presentaron una tinción nuclear eosinófila oscura y, en la mayoría de casos, rodeados de un halo blanco citoplasmático en forma de huevo frito. Asimismo, en un corte transversal del nervio óptico se encontró una distribución aleatoria de oligodendrocitos y no lineal, como en un corte longitudinal.

Respecto al debate sobre si el nervio óptico debería considerarse parte del SNC, nuestra propuesta es que sí: se presentó como glías formadoras de mielina a los oligodendrocitos y no a las células de Schwann. La distribución aleatoria de oligodendrocitos fue la misma que el SNC. Incluso, de no saber que el tejido era el nervio óptico, podríamos haber afirmado que estábamos en sustancia blanca de SNC. Explicado esto, se comprendió por qué el globo ocular es considerado una prolongación del cerebro.

No existe atrofia ni disminución de superficie del nervio óptico en su corte transversal que enmascare la pérdida de oligodendrocitos; el nervio óptico presentó una estructura homogénea y, así mismo, una distribución aleatoria de los oligodendrocitos. La estereología es el mejor método de conteo de la densidad oligodendroglial, pues no se contaron todos los oligodendrocitos existentes en un campo de 400x, sino que se utilizó el método del *point counting* mediante una cuadrícula colocada al azar que nos permitió contar solo los oligodendrocitos tocados por los puntos de conteo (intersección de líneas).

Para la densidad oligodendroglial se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas; como resultado se observó una distribución no normal de los datos. Por tal motivo, y por tener 5 grupos para comparar, se utilizó la prueba no paramétrica de

Kruskal Wallis, la cual nos indicó que no existen diferencias significativas ($p=0,556$) entre los 5 grupos. Se realizó el test HSD de Tukey, el cual confirmó que no existen diferencias significativas entre los grupos al compararlos entre sí (véase Tabla 3).

IV. DISCUSIÓN

Para el análisis de la concentración de metanol en las bebidas alcohólicas adulteradas y autorizadas se seleccionó la norma técnica ecuatoriana de determinación de metanol, que tuvo éxito tanto en ese país como a nivel mundial debido a la innovación en la detección de metanol en bebidas alcohólicas adulteradas. Se utilizó el método de análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-visible²⁴.

Sobre el origen de las bebidas alcohólicas adulteradas (pisco, anisado y cognac adulterados) se plantean tres posibilidades: se trataría de alcohol industrial, alcohol rectificado o fracciones desechadas de la destilación, es decir, cabeza y cola. No po-

dría tratarse de alcohol industrial pues al ser este un subproducto del etanol tendría un alto contenido de aldehídos y ésteres, entre otros. Podría el origen del metanol de las bebidas alcohólicas adulteradas provenir de la cabeza, al ser el metanol uno de los alcoholes más livianos en el proceso de destilación. Al analizar el metanol y etanol de las bebidas alcohólicas adulteradas se encontró cantidades elevadas de etanol, pero muy bajas de metanol, incluso por debajo de los valores permitidos; tal es el caso del pisco adulterado, que contiene 10 mg/100 ml, cuando la NTP establece márgenes comprendidos entre 4 y 150 mg/100 ml. El promedio encontrado en el pisco de venta autorizada fue de 65 mg/100 ml. Por lo antes expuesto, las concentraciones bajas de metanol no provendrían ni del alcohol industrial ni de las fracciones desechadas de la destilación, quedando abierta la posibilidad de tratarse de alcohol rectificado. Esto explicaría el por qué de la Ley 29632²⁵, cuyo fin es desnaturalizar el alcohol rectificado y evitar así su utilización en la producción de bebidas alcohólicas.

TABLA 3
Pruebas de comparaciones múltiples

| HSD Tukey | Densidad oligodendrogial | |
|---------------------|--------------------------|-------|
| | N | |
| Bebidas alcohólicas | N | 1 |
| Pac | 12 | 2,12 |
| Pisco | 12 | 2,77 |
| Blanco | 12 | 2,89 |
| Pac + c | 12 | 3,44 |
| Pisco + C | 12 | 3,80 |
| Significatividad | | 0,290 |

La prueba *pos hoc* de Tukey muestra que no existe diferencia significativa entre los 5 grupos.

Las concentraciones bajas de metanol encontradas en las bebidas alcohólicas adulteradas están por debajo de la NTP; consiguientemente, no llegan al LD50 para consumo oral de etanol en ratas albinas. La neuropatía óptica por consumo crónico de concentraciones bajas de metanol podría ser acumulativa en el tiempo, pero a su vez el metabolismo basal de la rata albina es elevado y depuraría el metanol sistémico.

El *point counting* fue el método estereológico escogido para el estudio de la densidad oligodendroglial, pues el tamaño del oligodendrocito es mayor al punto de intersección de las líneas de la cuadrícula; por tanto, no hay sesgo en el conteo de los mismos.

Los oligodendrocitos no tienen capacidad regenerativa del nervio óptico, y por ello no pueden aumentar en número en el SNC. La alteración en el número de estos implicaría una injuria que perjudicaría el axón o su mielina; frente a esto, el número de oligodendrocitos aumentaría como mecanismo de defensa. Sin embargo, frente a una injuria en el SNC los axones lesionados no se regeneran debido a que los oligodendrocitos y la mielina liberan factores inhibidores de crecimiento axonal, tales como Nogo-A, glicoproteína asociada a mielina (MAG) y glicoproteína oligodendrocito de mielina (MOG)²⁶⁻³⁰.

Pero, ¿qué se daña con el metanol exactamente en el nervio óptico? ¿La neuropatía óptica por metanol a bajas concentraciones daña el axón, la mielina o el oligodendrocito? El mecanismo del daño del nervio óptico por metanol no está del todo esclarecido. Estudios previos mencionan un daño primario de la retina (neuronas que dan origen al nervio óptico), mientras que otros estudios mencionan un daño primario del

nervio óptico, con daño posterior de la retina. No hubo, en nuestro estudio, alteración alguna del número de axones, mielina u oligodendrocitos, por lo que es probable que el daño se observe, si lo hubiera, en la retina misma, en las células ganglionares.

Es posible que el nervio morfológicamente esté intacto, llámese nervio al paquete que incluye axón, cubierta de mielina y oligodendrocito. Cabe recordar que los estudios de microscopía óptica evalúan la morfología tisular y a partir de ello se infieren posibles alteraciones en la fisiología normal del tejido; por tanto, existe la posibilidad de una alteración fisiológica no cuantificada al momento del estudio por microscopía óptica o que el daño aún no se evidencie y sea inminente.

En una investigación previa, Díaz 2017, encontramos que el consumo crónico de pisco de venta autorizada más barato del mercado causa mayor densidad neuronal aponecrótica en la corteza piriforme. La pregunta ahora es ¿por qué no se produce aquel mismo daño en el nervio óptico? Posibles respuestas: los daños son distintos según los tejidos, la concentración de metanol administrada a la rata albina fue baja, o la morfología es normal, pero la fisiología está alterada.

El tiempo de administración de las bebidas alcohólicas en ratas albinas fue de 12 semanas, que corresponderían a siete años de consumo crónico en humano, tiempo suficiente para activar mecanismos compensatorios que eviten la aparición de la enfermedad. Probablemente, al inicio de la administración crónica de bebidas alcohólicas sí hubo daño morfológico cuantificable o tal vez se encontraría en un lapso mucho mayor de administración. Se trabajó estandarizando la misma dosis de etanol

y no de metanol, pues las concentraciones de metanol se encontraron incluso 10 veces por debajo de la NTP.

Nuestro estudio pretende replicar la realidad del consumo crónico del alcohol metílico, es decir, el consumo en bajas concentraciones durante un largo periodo; no se asemeja a los estudios que utilizan concentraciones elevadas de metanol para replicar intoxicaciones agudas.

Para estudios posteriores con metanol a bajas concentraciones en ratas albinas, se recomienda utilizar una larga data, mayor a doce semanas, y realizar estudios histopatológicos seriados; asimismo, estudiar la densidad de las neuronas ganglionares de la retina del globo ocular.

V. CONCLUSIÓN

El consumo crónico de metanol a bajas concentraciones, presentes en las bebidas alcohólicas adulteradas, no produce alteración en la morfología ni en la densidad oligodendrogial.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reeves C, Taylor D. A history of the optic nerve and its diseases. *Eye* 2004; 18:1096–1109.
2. Moore KL, Persaud TV. *Embriología clínica*, 9ª edición. España: Elsevier; 2013.
3. Shaw JP. A history of the enumeration of the cranial nerves by European and British anatomists from the time of Galen to 1895, with comments on nomenclature. *Clinical Anatomy* 1992 Jan; 5(6):466–484.
4. Monro TK. Optic Nerve as Part of the Central Nervous System. *Journal of Anatomy and Physiology* 1895; 30(1): 45–48.
5. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119:37–53.
6. Peters A. Observations on the connections between myelin sheaths and glial cells in the optic nerves of young rats. *Journal of Anatomy* 1964; 98(1):125–134.
7. Barres BA, Raff MC. Axonal Control of Oligodendrocyte Development. *J Cell Biol* 1999 dec; 147(6): 1123–1128.
8. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001 Apr; 81(2):871–927.
9. Schwab ME, Schnell L. Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *Journal of Neurocytology* 1989 Apr; 18(2) 161–169.
10. Giovanetti, F. Methanol poisoning among travellers to Indonesia. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2013; 11(3):190–193.
11. Gee P, Martin E. Toxic cocktail: methanol poisoning in a tourist to Indonesia. *Emergency Medicine Australasia* 2012; 24: 451–453.
12. International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria No 196: Methanol*. Geneva: World Health Organization, 1997.
13. Norma Técnica Peruana 211.001:2006. *Bebidas alcohólicas. Pisco. Requisitos*. 7.ª edición.
14. World Health Organisation. *Methanol: health and safety guide*. Geneva: World Health Organization; 1997.
15. Wood CA, Buller F. Poisoning by wood alcohol. *JAMA* 1904 oct; 43(14): 972–977.

16. Kobre M. Methanol Poisoning. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1946 Apr; 2: 95–108.
17. Díaz R. Histomorfometría de la capa granular orbitofrontal murina sometida a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2015.
18. Zakhari S. Overview: ¿How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Res Health* 2006; 29 (4): 245–254.
19. Sadun A. Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998; 96: 881–923.
20. Sharma M, et al. Methanol-Induced Optic Nerve Cupping. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 286.
21. Grzybowski A, et al. Toxic optic neuropathies: an updated review. *Acta Ophthalmol* 2015; 93: 402–410.
22. Díaz R. Aponecrosis de la corteza piriforme en ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener* 2017; 6:25–40.
23. Ley 30407, Ley de protección y bienestar animal. (*El Peruano*, 8 de enero de 2016).
24. Norma Técnica Ecuatoriana. NTE INEN 0343: Bebidas alcohólicas. Determinación de los aldehídos, 2015.
25. Ley 29632, Ley para erradicar la elaboración y comercialización de bebidas alcohólicas informales, adulteradas o no aptas para el consumo humano (*El Peruano*, 17 de diciembre de 2010).
26. Pérez-Olvera O, Arellano S, Rodríguez H. Revisión de los métodos esteoreológicos y su aplicación en biología celular. *Patología* 2012; 50(2): 63–71.
27. Cassini A, Levinas L, Pringé H. Einstein y el efecto Compton. *Sci stud* 2013; 11 (1): 185–09.
28. Garner C, Lee E. Evaluation of methanol-induced retinotoxicity. *Toxicology* 1994 Jan; 93: 113–124.
29. Qui J, Cai D, Filbin MT. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia* 2000; 29: 166–174.
30. Benowitz L, Yuqin Y. Optic Nerve Regeneration. *Arch Ophthalmol* 2010 Aug; 128(8):1059–1064.

COLABORACIÓN

Los autores agradecen la colaboración de Geraldine Santos, Carolina Huayta y Stephen Paucarcaja.