



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# Grao en Bioloxía

## Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Revisión bibliográfica: El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal.**

**Revisión bibliográfica: O peixe cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para o estudo do Síndrome Alcohólico Fetal.**

**Literature review: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for the study of Fetal Alcohol Syndrome.**



**Claudia Valiña Gerpe**

Julio, 2020

*Director Académico: Ibán Lamas Criado*

*Codirectora: M<sup>a</sup> Luz Díaz Prado*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de Ciencias**

**Grado en Biología**

**Departamento de Biología**

**Área de Biología Celular**

Revisión bibliográfica: El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal.

Revisión bibliográfica: O peixe cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para o estudo do Síndrome Alcohólico Fetal.

Literature review: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for the study of Fetal Alcohol Syndrome.

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna de Biología Claudia Valiña Gerpe bajo la dirección de D. Ibán Lamas Criado y Dña M<sup>a</sup> Luz Díaz Prado.

Fdo. Ibán Lamas Criado

Fdo. M<sup>a</sup> Luz Díaz Prado

A Coruña, 22 de Julio de 2020.

# Índice

<i>Resumen/Resumo/Summary</i> .....	0
<i>Palabras clave/Palabras chave/Keywords</i> .....	0
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Distribución geográfica de <i>Danio rerio</i> .....	2
1.2. Hábitat y dieta de <i>Danio rerio</i> .....	3
1.3. Desarrollo y reproducción de <i>Danio rerio</i> .....	3
1.4. <i>Danio rerio</i> como organismo modelo .....	4
1.5. El Síndrome Alcohólico Fetal.....	5
1.6. Antecedentes del Síndrome Alcohólico Fetal .....	8
1.7. Enfoque social del Síndrome Alcohólico Fetal .....	9
1.8. <i>Danio rerio</i> como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal.....	10
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>12</b>
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Conclusiones/Conclusións/Conclusions</b> .....	<b>18</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>20</b>

## 0. Resumen

El término Trastornos del Espectro Alcohólico Fetal (FASD), se refiere al conjunto de efectos perjudiciales resultantes de la exposición embrionaria al etanol. En esta revisión recapitulo información sobre cómo los modelos animales, específicamente el pez cebra (*Danio rerio*), han facilitado nuestra comprensión del FASD y, en concreto, del Síndrome Alcohólico Fetal (FAS), el nivel de afectación más grave producido por la teratógenesis del alcohol, incluido en el término FASD, mediante revisión bibliográfica.

Primero proporciono una breve introducción acerca de la biología del pez cebra y su importancia como organismo modelo. Posteriormente proporciono una introducción al FASD y a la importancia de comprender los mecanismos teratógenos del alcohol dada su elevada incidencia en la población.

Para finalizar, evalué la capacidad del pez cebra como organismo modelo para el FASD y FAS. Detallando cómo se ha utilizado el pez cebra para modelar algunos de los principales defectos presentes en FAS y proporcionando información sobre cómo la investigación en el pez cebra nos ha ayudado a comprender los mecanismos teratógenos del alcohol y cómo nos puede ayudar a caracterizar las interacciones gen-etanol que pueden ser la base del FASD.

**Palabras clave:** Alcohol, gen, organismo modelo, pez cebra, Síndrome Alcohólico Fetal, teratogénesis, Trastornos del Espectro Alcohólico Fetal (FASD).

## 0. Resumo

O termo Trastornos do Espectro Alcohólico Fetal (FASD) refírese ao conxunto de efectos nocivos resultantes da exposición embrionaria ao etanol. Nesta revisión recupero información sobre como os modelos animais, especialmente o peixe cebra (*Danio rerio*), facilitaron a comprensión do FASD e, especificamente, a do Síndrome Alcohólico Fetal (FAS), o nivel máis grave de afectación causado pola teratoxénese alcohólica, incluído no termo FASD, mediante revisión bibliográfica.

Primeiro ofrezco unha breve introdución á bioloxía do peixe cebra e a súa importancia como organismo modelo. Posteriormente proporciono unha

introdución ao FASD e a importancia de comprender os mecanismos teratoxénicos do alcol dada a súa alta incidencia na poboación.

Finalmente, avaliei a capacidade do peixe cebra como organismo modelo para o FASD e FAS. Detallando como se usou o peixe cebra para modelar algúns dos maiores defectos presentes no FAS e proporcionando información sobre como a investigación sobre o peixe cebra nos axudou a comprender os mecanismos teratoxénicos do alcol.

**Palabras chave:** Alcol, xen, organismo modelo, peixe cebra, Síndrome Alcólico Fetal, teratoxénesis, Trastornos do Espectro Alcólico Fetal (FASD).

## 0. Summary

The term Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) refers to the entire suite of deleterious outcomes resulting from embryonic exposure to ethanol. In this review I recap information on how animal models, specifically zebrafish (*Danio rerio*), have informed our understanding of FASD and specifically Fetal Alcohol Syndrome (FAS), the most serious level of involvement caused by alcohol teratogenesis, included in the term FASD, through bibliographic review.

I first provide a brief introduction to the biology of the zebrafish and its importance as a model organism. Later I provide an introduction to FASD and the importance of understanding the teratogenic mechanisms of alcohol given its high incidence in the population.

Finally, evaluating the capacity of the zebrafish as a model organism for the FASD and FAS. Detailing how zebrafish has been used to model some of the major defects present in FAS and providing information on how research on zebrafish has helped us understand the teratogenic mechanisms of alcohol and how it can help us characterize the gene-ethanol interactions that can be the basis of FASD.

**Keywords:** alcohol, ethanol, model organism, zebrafish, Fetal Alcohol Syndrome, teratogenesis, Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD).

## 1. Introducción

El pez cebra o zebrafish, de nombre científico *Danio rerio* (Hamilton, 1822), es un pez teleósteo de agua dulce perteneciente a la Familia *Cyprinidae*, Orden *Cypriniformes*, Clase *Actinopterygii*, Superclase *Osteichthyes* (Tabla 1) (NCBI Taxonomy Browser: NCBI:txid7955).

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Chordata
<b>Clase</b>	Actinopterygii
<b>Orden</b>	Cypriniformes
<b>Familia</b>	Cyprinidae
<b>Género</b>	<i>Danio</i>
<b>Especie</b>	<i>Danio rerio</i>

Tabla 1. **Taxonomía de *Danio rerio***. Información obtenida de NCBI. Taxonomy Browser: NCBI:txid7955.

Según *The IUCN Red List of Threatened Species* (Vishwanath, 2010), *Danio rerio* se incluye en la categoría de preocupación menor (LC), pero la tendencia de la población es decreciente debido a la pesca y utilización de sus recursos acuáticos. Esta lista es un inventario sobre el estado de conservación de las especies vegetales, animales y hongos, que permite clasificar a las especies en 8 categorías de amenaza; la categoría preocupación menor de la lista incluye a todos los taxones abundantes y de amplia distribución, que no se encuentran bajo amenaza de desaparecer en un futuro próximo (<https://www.iucnredlist.org>).

El pez cebra, es un pequeño pez tropical, cuyo tamaño oscila entre 3-5 cm de largo. Morfológicamente tiene aspecto fusiforme con boca súpera, ojos centrales y dos pares de barbillas (Vishwanath, 2010; Spence et al., 2008). Debe su nombre, zebrafish, a la presencia de 5 franjas laterales de coloración oscura que se extienden desde el opérculo hasta la aleta caudal y que recuerdan a las rayas de una cebra. Los machos y hembras de esta especie presentan diferencias morfológicas externas visibles (Figura 1) (Crowder et al., 2017).

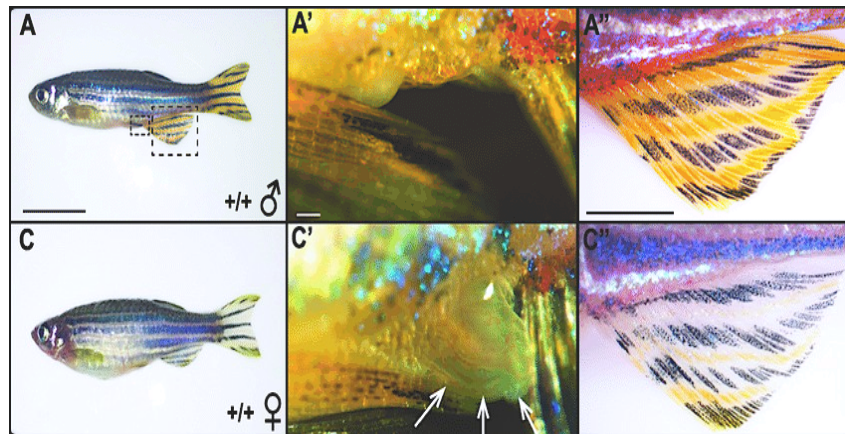


Figura 1. **Diferencias morfológicas externas visibles entre individuos macho y hembra del pez cebra (*Danio rerio*).** (A) Los peces de tipo salvaje macho tienen una forma delgada del cuerpo, (A') carecen de una papila genital extendida y (A'') tienen una aleta anal dorada. (C) Las hembras de tipo salvaje tienen forma de cuerpo redondeada con un abdomen prominente, (C') papila genital extendida (flechas) y (C'') una aleta anal plateada. Imagen tomada de Crowder et al., 2017.

### 1.1. Distribución geográfica de *Danio rerio*

Como se observa en la Figura 2, el pez cebra es una especie originaria del sureste asiático y su rango de distribución natural incluye las cuencas del río Ganges y Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Bután y el norte de Myanmar.

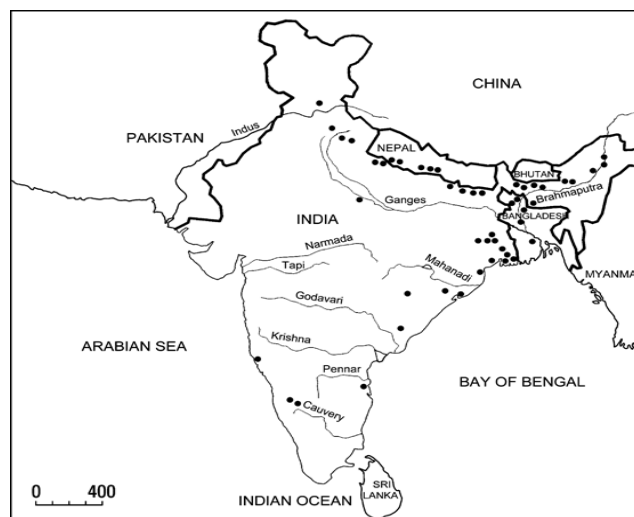


Figura 2. **Distribución natural del pez cebra.** Principales sistemas fluviales indicados. Los puntos negros indican donde se ha registrado su presencia. Imagen tomada de Spence et al., 2008.

## 1.2. Hábitat y dieta de *Danio rerio*

En la naturaleza, los individuos adultos habitan en aguas estancadas o con movimiento lento, a menudo adyacentes a cultivos de arroz. Esta asociación con el cultivo de arroz parece estar relacionada con el uso de fertilizantes que pueden promover el crecimiento del zooplancton, un componente importante de la dieta del pez cebra (Spence et al., 2008). El pez cebra es omnívoro, su dieta consiste principalmente en zooplancton e insectos. Aunque el análisis de su contenido intestinal muestra también la presencia de fitoplancton, algas filamentosas, material vegetal vascular, esporas, huevos de invertebrados, escamas de peces, arácnidos y detritos (Dutta, 1993; McClure et al., 2006; Spence et al., 2007).

## 1.3. Desarrollo y reproducción de *Danio rerio*

El pez cebra es una especie ovípara con fecundación externa que muestra un patrón de apareamiento común a muchos peces ciprínidos, siendo reproductores grupales y dispersores de huevos (Breder y Rosen, 1966).

En su hábitat natural, la temporada de desove es estacional comenzando con el monzón; sin embargo, en condiciones de laboratorio, los huevos se producen durante todo el año. En ambos casos, la ovulación depende de la exposición femenina a las feromonas gonadales masculinas y la presencia de un macho es esencial para que las hembras desoven (Talling y Lemoalle, 1998).

En la Figura 3 se muestran las principales etapas del desarrollo del pez cebra que, según Kimmel et al. (1995), son las siguientes: **Cigoto** (0 horas), **Período clivaje** (0.7 – 2.2 horas), **Período blástula** (2.15 – 5.15 horas), **Período gástrula** (5.15 – 10 horas), **Segmentación** (10 – 24 horas), **Período faríngeo** (24 – 48/72 horas), **Período de eclosión** (72 horas aproximadamente) y **Larva temprana**.

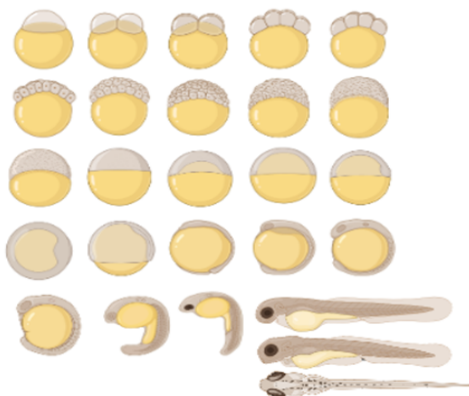


Figura 3. Principales etapas del desarrollo del pez cebra. Imagen realizada con BioRender.



El desarrollo del pez cebra, ocurre de forma muy rápida, durando aproximadamente entre 2 y 4 días. Entre 48 y 72 horas después de la fecundación (hpf), el desarrollo de la mayoría de los órganos está completo, excepto los órganos del tracto gastrointestinal. A las 76 hpf, el hígado, el páncreas y el intestino están completamente desarrollados, y a las 96 hpf, el tracto gastrointestinal está completamente desarrollado (Cassar et al., 2020). Los juveniles del pez cebra presentan la mayoría de las características de los adultos; sin embargo, se consideran adultos a partir de los 3 meses, cuando ya han alcanzado la madurez sexual (Figura 4).

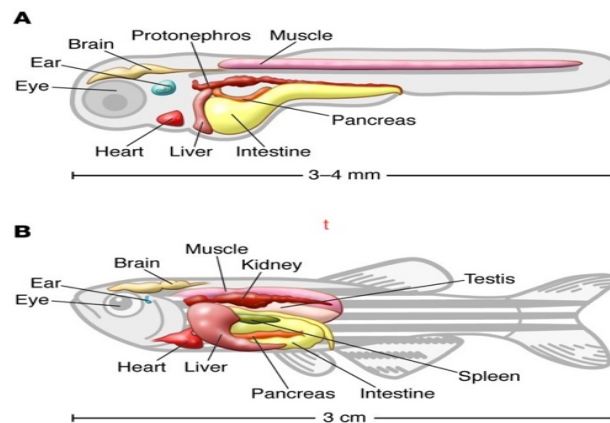


Figura 4. **Representación del pez cebra.** En la fase larval (A) de 3 a 5 días después de la fertilización y representación del pez cebra adulto (B) tres meses después de la fertilización. Imagen tomada de Santoriello y Zon, 2012.

#### 1.4. *Danio rerio* como organismo modelo

Los organismos modelo más comunes son pequeños mamíferos (ratas y ratones) que, aunque presentan ventajas significativas, son caros de mantener, difíciles de manipular embrionariamente y limitados para estudios genéticos a gran escala. En los años treinta, Jane Oppenheimer (1936) propuso el pez cebra como un organismo muy adecuado para la embriología experimental. Posteriormente, a principios de los años ochenta, George Streisinger y sus colaboradores comenzaron a usar esta especie como organismo modelo para el estudio genético y del desarrollo de los vertebrados.

Existen muchas razones por las cuales el pez cebra se ha convertido en un importante organismo animal y una alternativa a los mamíferos para estudios de toxicología, genética, biología celular y embriología (Cassar et al., 2020), así como para el estudio de enfermedades humanas y el descubrimiento de nuevas terapias (Santoriello y Zon, 2012). El pez cebra es fácil y económico de criar y mantener, lo que hace posible la manipulación de varios peces a la vez en un laboratorio a un coste razonable (Santoriello y Zon, 2012). Presenta la biología conservada de los vertebrados, un corto tiempo de generación (3 meses), desarrollo rápido (2-4 días), alta fecundidad (200 y 300 huevos/semana) y embriones transparentes que se desarrollan fuera del cuerpo (Spence et al., 2008; Cassar et al., 2020). Aunque existen diferencias anatómicas y fisiológicas importantes, la mayoría de los órganos del pez cebra realizan las mismas funciones que sus contrapartes humanas y exhiben una fisiología bien conservada (Zon y Peterson, 2005). Además, se ha secuenciado el genoma del pez cebra y se ha observado que el 70% de los genes humanos presentan un homólogo en el pez cebra, mientras que en el caso de genes humanos asociados a enfermedades la homología alcanza el 82% (Santoriello y Zon, 2012).

### **1.5. El Síndrome Alcohólico Fetal**

El alcohol es un teratógeno, un agente ambiental que afecta al desarrollo normal de un embrión. Numerosos estudios han demostrado que el alcohol se difunde a través de la placenta y se distribuye rápidamente en el compartimento fetal, donde produce un efecto prolongado en el feto debido a su acumulación amniótica, a concentraciones reducidas de enzimas metabólicas fetales y a su reducida excreción (Gupta et al., 2016).

El consumo de alcohol durante el embarazo desencadena anomalías en el desarrollo prenatal variables según la dosis de alcohol consumida durante la gestación, la genética, el metabolismo materno y la fase prenatal expuesta al alcohol. Los efectos del alcohol pueden afectar al desarrollo prenatal normal, en casi cualquier punto de la gestación (Bilotta et al., 2004).

El término Trastornos del Espectro Alcohólico Fetal (FASD), se utiliza para describir el rango de efectos producidos por la exposición al alcohol durante el desarrollo prenatal. Estos efectos pueden incluir:

- **Retraso del crecimiento intrauterino y extrauterino.**
- **Dismorfología facial característica.**
- **Disfunción del sistema nervioso central.**
- **Discapacidades (deficiencias) neuroconductuales.**

Las personas que presentan todos estos efectos son las más gravemente afectadas por la teratogenicidad del alcohol, el Síndrome Alcohólico Fetal (FAS). (Joya et al., 2014).

Los efectos del alcohol pueden ser variables por lo que bajo el termino FASD, además del FAS se incluyen: el Síndrome Alcohólico Parcial (PFAS), el Trastorno del Neurodesarrollo Relacionado con el Alcohol (ARND) y el Daño Cerebral Relacionado con el Alcohol (ARBD). Cada categoría se distingue por la presencia o ausencia de los cuatro efectos mencionados anteriormente (Denny, et al., 2017).

La restricción del crecimiento intrauterino se puede determinar a partir de los datos de referencia publicados por Oken et al. (2003) por edad gestacional. Definimos la deficiencia de crecimiento como el décimo percentil, o menos, utilizando medidas de altura y peso de crecimiento estándar (Denny, et al., 2017; Oken, et al., 2003). La restricción del crecimiento intrauterino se produce por una reducción de la proliferación celular en el feto y un desarrollo inadecuado de la placenta provocado por la exposición al alcohol. Esto último impide el correcto intercambio de nutrientes entre la madre y el embrión, lo que se traduce en desnutrición intrauterina (Carter et al., 2007). Las deficiencias en el crecimiento pueden ser simétricas o asimétricas dependiendo del momento gestacional expuesto al alcohol. Si el alcohol afecta a la proliferación celular en el primer y segundo trimestre, o de manera constante durante todo el embarazo, las deficiencias de crecimiento serán simétricas y se observarán en todo el feto en desarrollo. Sin embargo, si el alcohol afecta a la proliferación celular durante el tercer trimestre, las deficiencias de crecimiento serán asimétricas, y se observara un tamaño en la cabeza normal, pero una cavidad abdominal más pequeña de lo normal. Esta restricción de crecimiento asimétrico se produce porque en el tercer trimestre el feto puede redistribuir los recursos cardíacos a órganos como cerebro y corazón, a expensas de otros procesos menos vitales como la digestión (O'Neil, 2011).

Estas deficiencias de crecimiento persisten después del nacimiento, la anemia causada por déficit de hierro materno y fetal puede ser un factor potencial que contribuye al bajo peso en el momento del nacimiento y a los retrasos sostenidos en el crecimiento infantil (Carter et al., 2007).

La dismorfología facial característica del FAS incluye, un patrón característico de anomalías faciales, fisuras palpebrales cortas, labio superior delgado y filtrum liso. También pueden incluir cara media plana, ptosis de los párpados, pliegues epicantales, puente nasal plano y orejas subdesarrolladas. La presencia de una frente pequeña asociada a la microcefalia es común (Figura 6).

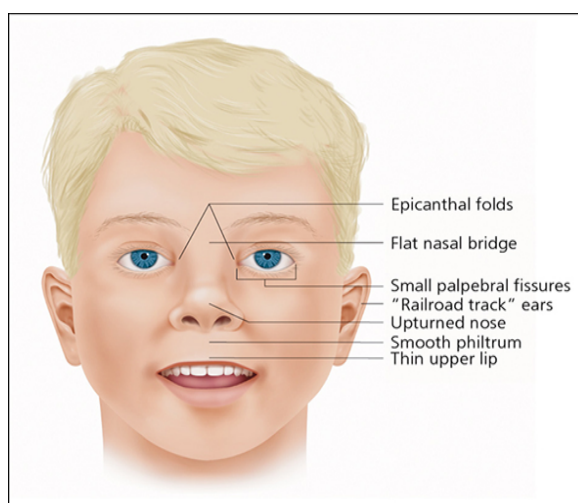


Figura 6. **Dismorfología facial característica de FAS.** Imagen tomada de Wattendorf y Muenke,2005.

La disfunción del sistema nervioso central debe incluir un crecimiento cerebral deficiente y estructura o neurofisiología anormales. Así, la resonancia magnética ha identificado anomalías cerebrales estructurales en niños con FAS (p. ej., asimetría del lóbulo temporal, cambio de tamaño o forma del cuerpo calloso, cerebelo o ganglios basales), y puede usarse en la evaluación de sospecha de FAS.

Las discapacidades neuroconductuales en FAS incluyen una capacidad intelectual y cognición global deficiente, además de alteraciones del comportamiento y de las habilidades adaptativas. Aunque no están incluidos en los criterios de diagnóstico para FAS, también se han descrito múltiples anomalías congénitas asociadas con la exposición prenatal al alcohol, a menudo presentes en el FAS (Denny et al., 2017) (Tabla 2).

<b>Sistema</b>	<b>Condición</b>
<b>Auditivo</b>	Otitis media serosa crónica, hipoacusia conductiva y/o neurosensorial.
<b>Cardíaco</b>	Grandes vasos aberrantes, defectos del tabique auricular, defectos del tabique ventricular.
<b>Gastrointestinal</b>	Neuropatía entérica.
<b>Musculo esquelético</b>	Campodactilia, clinodactilia, uñas hipoplásticas, sinostosis radioulnar, escoliosis, malformaciones espinales.
<b>Neurológico</b>	Microcefalia, trastorno convulsivo, anormalidades de la médula espinal. Anormalidades estructurales del cerebro.
<b>Oftalmológico</b>	Ptosia, malformación retiniana, estrabismo, discapacidad visual.
<b>Orofacial</b>	Labio leporino, paladar hendido.
<b>Psiquiátrico / neuroconductual</b>	Trastorno por déficit de atención, hiperactividad, trastorno de conducta, discapacidad intelectual, trastornos del lenguaje, problemas de aprendizaje, trastornos del estado de ánimo, trastornos por consumo de sustancias.
<b>Renal</b>	Riñones aplásicos / displásicos / hipoplásticos, riñón en herradura, hidronefrosis, duplicaciones uretales.

Tabla 2. **Condiciones comúnmente asociadas con FAS.** Información obtenida de Denny et al., 2017.

### 1.6. Antecedentes del Síndrome Alcohólico Fetal

El cuadro completo del Síndrome Alcohólico fetal, con todas las características clínicas, fue descrito por primera vez en 1957, en la tesis doctoral de la pediatra francesa Jacqueline Rouquette. Posteriormente, tres artículos publicados en la revista médica británica *The Lancet* (Jones et al., 1973, 1974; Jones y Smith, 1973) sentaron las bases para el reconocimiento y diagnóstico del Síndrome Alcohólico Fetal.

En el primer artículo titulado, "Patrón de malformación en la descendencia de madres alcohólicas crónicas", Jones et al. (1973) señalaron las anomalías compartidas entre niños, cuyas madres habían consumido alcohol durante la gestación. Los autores concluyeron sus observaciones alegando que "los datos son suficientes para establecer que el alcoholismo materno puede causar un desarrollo fetal aberrante". El término "Síndrome Alcohólico Fetal" se introdujo por primera vez en el segundo artículo (Jones y Smith, 1973) y en el tercer artículo, los autores proporcionaron más evidencias de la teratogenicidad del alcohol. Seguidamente en la comunidad médica, se reconoció que los resultados físicos y neuroconductuales de la exposición prenatal al alcohol eran variables,

desde el Síndrome Alcohólico Fetal, hasta algunas anomalías menores. Dada esta situación, en 1978, Clarren y Smith introdujeron el término “Sospecha de Efectos del Síndrome Alcohólico Fetal” (FAE) para indicar la expresión parcial del síndrome. Posteriormente en 1996, un comité designado por el Instituto de Medicina (OIM) recomendó adoptar un nuevo término para englobar todas las alteraciones relacionadas al consumo gestacional de etanol, en un grupo de trastornos a los que denominan Trastornos del Espectro Alcohólico Fetal (FASD). Estos FASD engloban, por un lado, los casos de FAS y, por el otro, a lo que primeramente se denominó “Sospecha de Efectos del Síndrome Alcohólico Fetal” (FAE) y que hoy se desglosa en FAS parcial, Daño Cerebral Relacionado con el Alcohol (ARBD) y Trastorno del Neurodesarrollo Relacionado con el Alcohol (ARND).

### **1.7. Enfoque social del Síndrome Alcohólico Fetal**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que una de cada 67 embarazadas que consumen alcohol dan a luz a un niño con FAS, lo que se traduce en unos 119 000 niños que nacen cada año con FAS en todo el mundo. Un análisis reciente sugiere que la prevalencia mundial de FAS está entre 0,09% y 0,023% y la prevalencia de FASD es sorprendentemente mayor (Popova et al., 2017). Según estas cifras, se constata que el consumo del alcohol durante el embarazo es común en muchos países y que FAS es un defecto congénito relativamente prevalente que puede ser superior a algunos defectos congénitos comunes y más conocidos como el síndrome de Down y la trisomía 18. Además, incluso en el sector de la salud, los FASD son una afección relativamente nueva y el FAS es comúnmente omitido o diagnosticado erróneamente, y aunque la evidencia científica de los efectos teratogénicos del alcohol se publicó por primera vez hace 63 años, y la conciencia sobre sus efectos perjudiciales ha aumentado desde entonces, se ha logrado poco para prevenir efectivamente los daños del consumo de alcohol durante el embarazo. En conclusión, las cifras son preocupantes dado que el alcohol es el teratógeno más común y el FASD es la causa más común de discapacidad intelectual no hereditaria, por lo que el consumo de alcohol durante el embarazo debería reconocerse como un problema grave de salud pública y se deberían invertir más esfuerzos en

promover estrategias de prevención más eficaces centradas específicamente en el consumo del alcohol antes y durante el embarazo.

### **1.8 *Danio rerio* como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal**

Los estudios que utilizan humanos para investigar los efectos del alcohol como teratógeno tienen una serie de limitaciones, incluida la falta de control en la dosis, la duración de la exposición y las medidas de respuesta. Debido a la falta de control en estudios con participantes humanos, los científicos han investigado los efectos de la exposición prenatal al alcohol utilizando modelos animales (Bilotta et al., 2004).

Se han utilizado una variedad de modelos animales (gusanos, moscas de la fruta, ratones, pollos, cerdos, ovejas, primates no humanos) para estudiar los efectos teratógenos del alcohol (Fernandes et al., 2018). En esta revisión nos centraremos en la contribución del pez cebra como organismo modelo animal para la investigación del FASD y en concreto del FAS.

Como se indica en el apartado 1.4., el pez cebra, se ha convertido en un importante modelo animal por numerosas razones y presenta una serie de ventajas sobre otros modelos para el estudio del FAS. La ventaja más significativa es el control preciso sobre las condiciones experimentales. Los huevos del pez cebra son transparentes y los embriones semitransparentes, así se pueden examinar los procesos internos durante el desarrollo embrionario sin alterar el proceso. Además, algunos productos químicos (como el etanol) pasan sin obstáculo a través del corion, por lo que el impacto del etanol sobre el desarrollo físico se puede controlar desde el inicio de la fertilización (Blader y Strähle, 1998), permitiendo determinar con precisión cuándo y cómo el etanol afecta el desarrollo embrionario (Fernandes et al., 2018).

Dado que los peces cebra son reproductores prolíficos, se puede obtener un gran número de sujetos en un corto período de tiempo. Por lo tanto, el modelo de pez cebra proporciona un medio para emplear grandes tamaños de muestra que permite el uso de estadísticas inferenciales con un poder estadístico más adecuado (Bilotta et al., 2004).

Por otra parte, los sistemas de órganos afectados por la exposición al alcohol (cerebro, cara, órganos sensoriales y corazón) evolucionaron antes de la

divergencia de animales vertebrados e invertebrados. En los vertebrados, todos estos sistemas y órganos se forman durante la etapa filotípica, una etapa resistente al cambio evolutivo. Por lo tanto, aunque existen diferencias entre los órganos de los peces cebra y los humanos, la estructura y la función de los mismos está bien conservada entre ambos.

Además de similitudes estructurales, el pez cebra muestra un amplio repertorio de comportamientos complejos relevantes para el estudio del FAS. Tanto en la naturaleza, como en condiciones de laboratorio, el pez cebra forma grupos sociales, un comportamiento no común en otros modelos animales. Asimismo, el pez cebra demuestra múltiples formas de aprendizaje y de memoria (a corto plazo, racional y episódica) (Fernandes et al., 2018).

Los investigadores estudian el riesgo genético y los factores de resistencia que subyacen a la teratogenicidad del alcohol y aquí, nuevamente, el pez cebra es un modelo poderoso. Por un lado, debido a las características genéticas comunes entre los humanos y el pez cebra (ya indicadas en el apartado *Danio rerio* como organismo modelo, 1.4.). Por otro lado, debido a las numerosas herramientas genéticas disponibles, como es la gran cantidad de mutantes del Centro Internacional de Recursos de Zebrafish (ZIRC) para el examen de genes específicos (Rasooly et al., 2003).

Por último, numerosos estudios han demostrado que el desarrollo físico del pez cebra se ve afectado por la exposición al etanol y los efectos producidos se superponen con el FASD y el FAS en humanos: retraso del desarrollo, reducción de la longitud del cuerpo, desarrollo ocular anormal, defectos cognitivos y deficiencias motoras (Joya et al., 2014).

## **2. Objetivos**

El objetivo de esta revisión bibliográfica es proporcionar información acerca de los Trastornos del Espectro Alcohólico Fetal (FASD) y en concreto acerca del Síndrome Alcohólico Fetal (FAS). Discutir el potencial del pez cebra como organismo modelo para FASD y FAS e indicar la importancia de los estudios en el pez cebra para avanzar en la comprensión y búsqueda de posibles métodos para revertir o prevenir los efectos del FASD y FAS.



### 3. Material y métodos

La información que se recoge en esta revisión fue obtenida a partir de fuentes bibliográficas obtenidas de PubMed Central, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Web of Science (WOS), The Zebrafish Information Network (ZFIN), Google Scholar y páginas web oficiales como, la página web de la Organización Mundial de la Salud (OMS), La lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

El proceso de búsqueda se ha llevado a cabo durante el periodo comprendido entre marzo y julio de 2020 y los criterios de inclusión que se escogieron para la elección de los artículos a revisar fueron los siguientes:

- 1- Que el artículo incluyese los Trastornos del Síndrome Alcohólico Fetal (FASD).
- 2- Que el artículo incluyese el pez cebra (*Danio rerio*).
- 3- Que el organismo modelo de estudio fuera el pez cebra (*Danio rerio*).
- 4- Que el pez cebra (*Danio rerio*) fuese organismo modelo para el estudio de los FASD.

Las imágenes que aparecen en el trabajo han sido seleccionadas de diversos artículos incluidos en la bibliografía y otras han sido rediseñadas en la aplicación BioRender (<https://biorender.com/>).

### 4. Resultados y Discusión

**Comportamiento y cognición:** Se sabe que las personas con FAS tienen déficits en el aprendizaje y la memoria y, además, se ha demostrado que el pez cebra muestra algunos de estos déficits (Carvan et al., 2004). La exposición embrionaria al etanol altera el comportamiento social en el pez cebra adulto (Parker et al 2014).

Debido a su naturaleza social, se han generado varios ensayos utilizando el pez cebra para evaluar los efectos de la exposición al alcohol en el comportamiento social. Estos ensayos han demostrado que la exposición a bajas concentraciones de etanol provoca alteraciones en el comportamiento, aprendizaje y memoria de los peces cebra. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la comprensión del FASD y FAS en humanos. Por ejemplo, Ali et al. (2011) demostraron que los embriones expuestos a 10% de etanol

durante 1 hora presentaban hipoactividad. Shan et al. (2015) comprobaron que una exposición a 0,6% de etanol provocó un aumento de las respuestas rápidas de escape (c-star: respuesta rápida de escape que presenta un pez cebra juvenil, Roberts et al., 2011) y de la velocidad de la cola, lo cual, implica hiperactividad. Así, se puede concluir que concentraciones bajas de etanol inducen hiperactividad, mientras que concentraciones superiores reducen la actividad en el pez cebra (Gerlai et al., 2000; Lockwood et al., 2004).

Como se indica en la Tabla 2, la microftalmia es una anomalía comúnmente presente en individuos con FAS y asociada a la exposición del embrión al alcohol.

Múltiples estudios han revelado que la exposición al alcohol durante el desarrollo causa microftalmia en el pez cebra y, además, afecta a la morfología retiniana y a la función visual. El alcohol interrumpe el desarrollo de los fotorreceptores de manera dosis-dependiente y causa hipoplasia del nervio óptico, por lo que el alcohol afecta negativamente al desarrollo y a la función del sistema visual en el pez cebra (Fernandes et al., 2018).

**Defectos cardíacos:** Al igual que en el sistema visual, los defectos en el sistema cardíaco son comunes tras la exposición prenatal al alcohol. Se estima que el 54% de los individuos humanos con FAS tienen deformidades cardíacas relacionadas con el alcohol (Abel, 1996). Numerosos estudios demuestran que el corazón del pez cebra es vulnerable a la exposición al alcohol de forma similar a los seres humanos (Fernandes et al., 2018). Por ejemplo, la exposición del pez cebra a 0,5% de etanol en el desarrollo, puede causar la aparición de edema cardíaco, reducción del volumen cardíaco y reducción del grosor ventricular. Dosis ligeramente superiores (0.6% –0.9%) pueden interrumpir la migración de precursores cardíacos, la formación de bucles cardíacos y la expresión de genes cardíacos (Loucks y Ahlgren, 2012).

**Crecimiento y defectos craneofaciales:** Las anomalías faciales y el retraso del crecimiento son comunes en FASD y un requisito para el diagnóstico de FAS (Stratton et al., 1996). En el pez cebra se ha demostrado que la exposición de los embriones al alcohol causa defectos físicos similares. Por ejemplo, los elementos esqueléticos del arco branquial son sensibles al 10% de

alcohol y también se ven afectados elementos craneofaciales y neurocraneales, especialmente las estructuras oculares, la cápsula óptica, la placa etmoidal y el ancho de la cabeza. Los defectos en estas estructuras varían según la cepa del pez cebra (Loucks y Carvan, 2004). Además, también se ha demostrado que la exposición embrionaria al alcohol afecta a la longitud del cuerpo del pez cebra y la distancia entre los ojos es mayor en los peces tratados con alcohol (Figura 8) (Bilotta et al., 2004).

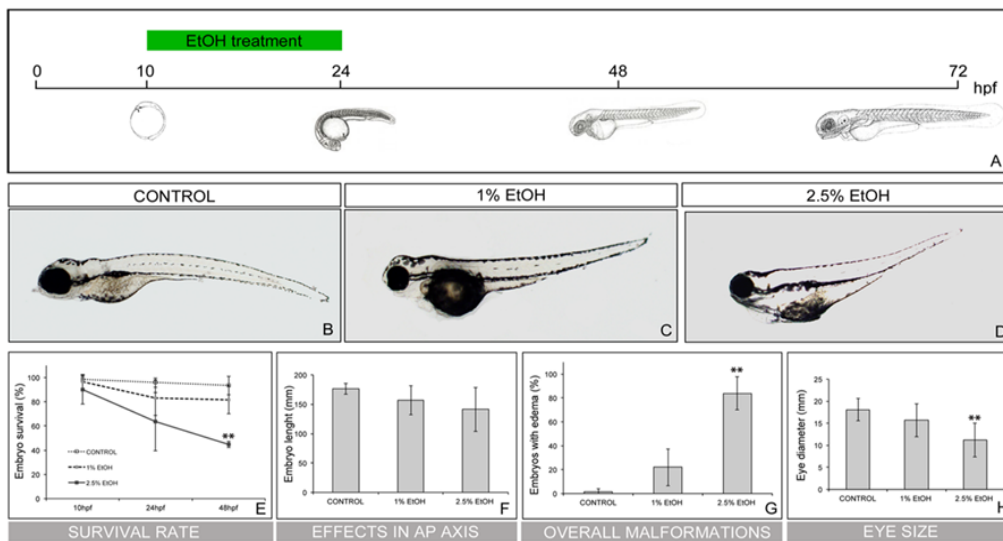


Figura 8: **Mayor incidencia de malformaciones en embriones de pez cebra expuestos a etanol.** (A) Esquema que representa las condiciones de tratamiento. (B-D) Análisis fenotípico de embriones tratados con etanol. Los tratamientos superiores al 1% de etanol produjeron malformaciones visibles, es decir, cabezas más pequeñas, colas más pequeñas y ojos subdesarrollados. (E) Tasa de supervivencia a las 24 y 48 hpf después del tratamiento con etanol. (F) Efectos en la longitud del cuerpo del embrión al aumentar las concentraciones de etanol. (G) Incidencia de la concentración de etanol en la formación de edema. (H) Análisis del tamaño del ojo. Imagen tomada de Joya et al., 2014.

Esto demuestra que dos efectos centrales del FAS, como son el retraso del crecimiento y las anomalías faciales, pueden reproducirse en el pez cebra.

**Defectos cerebrales:** Numerosos experimentos han demostrado que el SNC del pez cebra también es vulnerable a la exposición del alcohol. Por ejemplo, Buske y Gerlai (2011), demostraron que en los embriones del pez cebra, la exposición al alcohol reduce los niveles de dopamina y serotonina (Figura 10), lo cual sugiere una disfunción neural generalizada.

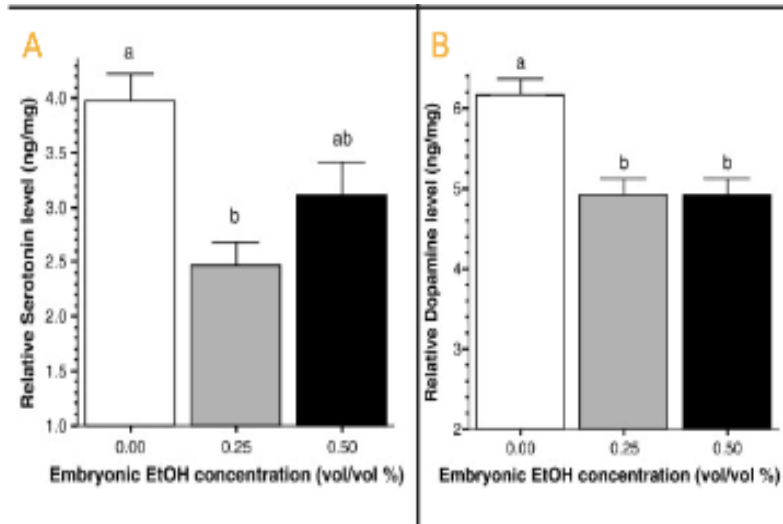


Figura 9: **Defectos cerebrales:** (A) La exposición al alcohol embrionario reduce significativamente el nivel de serotonina en el cerebro del pez cebra adulto 70 días después de la fertilización. (B) La exposición al alcohol embrionario reduce significativamente el nivel de dopamina en el cerebro del pez cebra adulto 70 días después de la fertilización. Imágenes tomadas de Buske y Gerlai, 2011 y unificadas en una misma imagen a través de BioRender.

Debido a la gran cantidad de fondos transgénicos disponibles en el pez cebra, se están obteniendo nuevos conocimientos sobre cómo el etanol altera el SNC. La exposición al 1% de etanol no interrumpe el patrón de diferenciación neuronal a lo largo de la médula espinal, pero sí reduce el número de neuronas diferenciadas y de neuronas sensoriales (Joya et al., 2014). La exposición al 0,6 % aumenta la ramificación de las neuronas motoras secundarias y disminuye el diámetro de los axones de Mauthner (Shan et al., 2015). Además, se ha encontrado que estas y otras anomalías estructurales del cerebro tienen relación con la función cognitiva y el comportamiento (Lovely et al., 2016). También existen numerosos transgénicos y marcadores para el análisis de regiones cerebrales específicas que han sido utilizados para determinar la sensibilidad específica al alcohol de cada área en determinadas etapas del desarrollo (Fernandes et al., 2018).

**Mecanismos conservados en la teratogénesis por etanol:** Es poco probable que un solo mecanismo tenga en cuenta los efectos teratogénicos del etanol, dado que es una molécula pequeña con muchos efectos pleiotrópicos potenciales. Los datos de múltiples modelos animales, incluido el pez cebra,

sugieren que varios mecanismos están involucrados en la teratogenicidad del etanol y se conservan en todas las especies (Fernandes et al., 2018).

Un mecanismo común en los modelos de FASD es la apoptosis. Las concentraciones de alcohol que inducen la apoptosis de las células de la cresta neural en ratones y pollos también causan apoptosis en el pez cebra. Además, la muerte celular inducida por etanol depende del calcio y del CamKII, que se conserva entre el pez cebra y el pollo (Flentke et al. 2014).

Otro mecanismo conservado, son las alteraciones en la adhesión y migración celular que pueden provocar interrupciones en la gastrulación (Fernandes et al., 2018).

Por último, además de los movimientos celulares, el etanol ha sido ampliamente implicado en la interrupción de dos vías críticas de señalización embrionaria: ácido retinoico (AR) y Sonic Hedgehog (Shh), otros dos mecanismos conservados de la teratógenosis por etanol. Múltiples modelos animales, incluido el pez cebra, han demostrado que exponer los embriones al alcohol reduce los niveles de AR, y que los fenotipos inducidos por etanol pueden ser rescatados o parcialmente rescatados por el tratamiento de AR (Kashyap et al., 2011).

También se ha demostrado, que los embriones expuestos al alcohol han disminuido la señalización de Shh, lo que aumenta la apoptosis de la cresta neural craneal, el desarrollo de la línea media y el desarrollo ocular interrumpido (Ahlgren et al., 2002; Aoto et al., 2008). En apoyo del papel de Shh en la teratogénesis de etanol, se descubrió que una inyección de shh-NARNm rescata las alteraciones inducidas por etanol en la longitud corporal, la forma de somita y la ciclopia (Loucks y Ahlgren, 2009) (Figura 11). Más recientemente, se ha demostrado que la señalización de Shh es un contribuyente clave a los cambios

inducidos por el alcohol en la ansiedad y el comportamiento de riesgo (Burton et al., 2017).

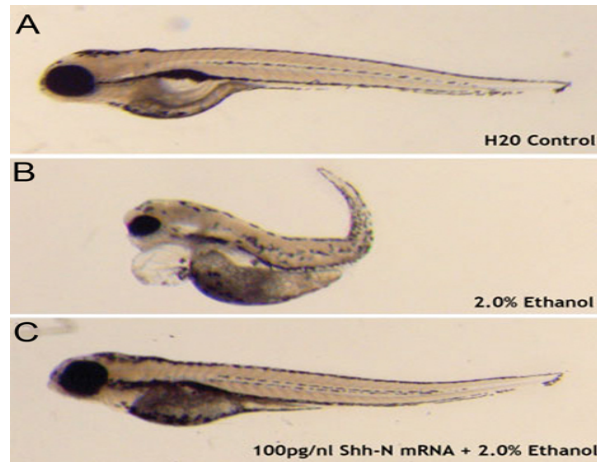


Figura.10: **La inyección de shh-NARNm rescata los graves defectos producidos por la exposición al etanol del pez cebra.** Los embriones de una o dos células fueron inyectados con 100 pg / nl de shh-NARNm y la mitad de los embriones inyectados fueron expuestos a las dosis estándar de etanol de 4.3 a 24 hpf. Los embriones se analizaron a 5 dpf. Los embriones tratados con etanol al 2.0% exhiben colas más cortas dorsalmente curvadas y defectos oculares, incluida la ciclopi. El rescate de estos fenotipos se observa en 71/76 de embriones inyectados (93%). En estos embriones, el cuerpo es recto y los ojos están completamente separados. Imagen tomada de Loucks y Ahlgren, 2012.

**Identificación de interacciones gen-etanol:** En humanos, los gemelos monocigóticos son 100% concordantes para FAS, mientras que los gemelos dicigóticos son solo concordantes al 64% (Streissguth y Dehaene, 1993). Además, se han observado defectos dependientes de la cepa en ratones, pollos y pez cebra. Si bien existe una fuerte y creciente evidencia de factores de riesgo genético para FAS, solo se han identificado un pequeño número de interacciones gen-etanol. Debido a su capacidad genética discutida anteriormente, el pez cebra es un organismo ideal para identificar y caracterizar las interacciones gen-etanol.

En resumen, el pez cebra representa un modelo útil para estudiar los efectos que causa la exposición embrionaria al etanol; así como también constituye una herramienta de exploración para investigar tratamientos viables o estrategias de prevención de los efectos del alcohol en el desarrollo embrionario. Tan fácilmente como se introduce etanol en el embrión de pez cebra, se pueden introducir otros

químicos para probar hipótesis sobre los mecanismos exactos que causan un desarrollo anormal. Por otra parte, también se ha demostrado en los estudios realizados en el pez cebra que la concentración de etanol y el momento de la exposición al etanol son factores importantes en la gravedad de los efectos y, al igual que en humanos, a medida que aumenta la concentración de etanol, también aumentan la gravedad de las anomalías incluida la mortalidad. En general, cuando la exposición al etanol es temprana dentro de las primeras 24 horas los efectos son más graves que en cualquier otro período del desarrollo del pez cebra.

En el trabajo de Bilotta et al., 2004, se demostró que incluso con la concentración más baja de etanol y con la duración de exposición más corta, se producen efectos en el desarrollo físico del pez cebra, aun cuando los sujetos exhibían una apariencia externa normal.

Esto sugiere que, si hay un umbral para los efectos del etanol en el desarrollo físico, entonces es un umbral muy bajo si la exposición es muy temprana en el desarrollo embrionario.

## **5. Conclusiones**

Los Trastornos del Síndrome Alcohólico Fetal (FASD) son la causa más común de discapacidad intelectual no hereditaria. Además, los déficits causados por la exposición prenatal al alcohol duran toda la vida y reducen severamente la calidad de vida de las personas afectadas. Por lo tanto, una comprensión completa de los fundamentos del FASD es esencial. Los estudios realizados en el pez cebra han modelado algunos de los principales efectos presentes en el Síndrome Alcohólico Fetal (FAS) y han sido útiles para deducir los eventos bioquímicos, moleculares y genéticos que conducen al FASD y al FAS.

Los estudios que relacionan los organismos modelo con pacientes humanos son necesarios para avanzar en nuestra comprensión del FASD y FAS y el pez cebra es particularmente adecuado para ello debido a su alta fecundidad, fertilización externa, transparencia embrionaria, tiempo de desarrollo rápido y alto grado de conservación genética con los humanos. Por todo ello, los estudios en el pez cebra deberían facilitar en gran medida nuestra comprensión acerca del FASD y FAS y ayudar en la búsqueda de métodos para revertir o prevenir los efectos del FASD y FAS.

## **5. Conclusións**

Os Trastornos do Síndrome Alcohólico Fetal (FASD) son a causa máis común de discapacidade intelectual non hereditaria. Ademais, os déficits causados pola exposición prenatal ao alcohol duran toda a vida e reducen severamente a calidade de vida das persoas afectadas. Por iso, un coñecemento completo dos fundamentos da FASD é esencial. Os estudos realizados no peixe cebra modelaron algúns dos principais efectos presentes no Síndrome Alcohólico Fetal (FAS) e foron útiles para deducir os eventos bioquímicos, moleculares e xenéticos que conducen a FASD e FAS.

Os estudos que relacionan organismos modelo con pacientes humanos son necesarios para avanzar na comprensión do FASD e o FAS, e o peixe cebra é especialmente adecuado para iso debido á alta fecundidade, fertilización externa, transparencia embrionaria, tempo de desenvolvemento rápido e alto grao de conservación xenética cos humanos. Polo tanto, os estudos no peixe cebra deberían facilitar en gran medida a nosa comprensión do FASD e do FAS así como axudar na busca de métodos para revertir ou previr os efectos do FASD e do FAS.

## **5. Conclusions**

Fetal Alcohol Syndrome Disorders (FASD) are the most common cause of non-hereditary intellectual disability. Furthermore, deficits caused by prenatal alcohol exposure last a lifetime and severely reduce the quality of life for affected individuals. Therefore, a complete understanding of the fundamentals of FASD is essential. Studies in zebrafish have modeled some of the main effects present in Fetal Alcohol Syndrome (FAS) and have been useful in deducing the biochemical, molecular, and genetic events leading to FASD and FAS.

Studies linking model organisms to human patients are necessary to advance our understanding of FASD and FAS, and zebrafish is particularly well suited for this due to its high fecundity, external fertilization, embryonic transparency, rapid development time, and high degree of genetic conservation with humans. So studies in zebrafish should greatly accelerate our understanding of FASD and FAS and aid in the search for methods to reverse or prevent the effects of FASD and FAS.



## 6. Bibliografía

- Abel, E.L. (1996). Fetal alcohol syndrome: from mechanism to prevention. *CRC Press*, Boca Raton, Fla.
- Ahlgren, S. C., Thakur, V., y Bronner-Fraser, M. (2002). Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10476–10481. <https://doi.org/10.1073/pnas.162356199>.
- Ali, S., Champagne, D. L., Alia, A., y Richardson, M. K. (2011). Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience. *PloS one*, 6(5), e20037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020037>.
- Aoto, K., Shikata, Y., Higashiyama, D., Shiota, K., y Motoyama, J. (2008). Fetal ethanol exposure activates protein kinase A and impairs Shh expression in prechordal mesendoderm cells in the pathogenesis of holoprosencephaly. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 82(4), 224–231. <https://doi.org/10.1002/bdra.20447>.
- Bilotta, J., Barnett, J. A., Hancock, L., y Saszik, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and teratology*, 26(6), 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.011>.
- BioRender: <https://biorender.com> (acceso 3 Julio de 2020).
- Blader, P., y Strähle, U. (1998). Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Developmental biology*, 201(2), 185–201. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8995>.
- Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2017; 95:320-321.  
DOI/doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.17.030517> (acceso 10 abril de 2020).
- Burton, D. F., Zhang, C., Boa-Amponsem, O., Mackinnon, S., y Cole, G. J. (2017). Long-term behavioral change as a result of acute ethanol exposure in zebrafish: Evidence for a role for sonic hedgehog but not retinoic acid signaling. *Neurotoxicology and teratology*, 61, 66–73.
- Buske, C., y Gerlai, R. (2011). Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult

- zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 698–707.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.009>.
- Breder, C.M. y Rosen, D.E. (1966). Modes of reproduction in fishes. *T.F.H. Publications*, pp. 941.
- Carter, R. C., Jacobson, S. W., Molteno, C. D., y Jacobson, J. L. (2007). Fetal alcohol exposure, iron-deficiency anemia, and infant growth. *Pediatrics*, 120(3), 559–567. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0151>.
- Carvan, M. J., Loucks, E., Weber, D. N., y Williams, F. E. (2004). Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicology and teratology*, 26(6), 757–768. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.016>.
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., y Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical research in toxicology*, 33(1), 95–118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>.
- Clarren, S.K. y Smith, D. (1978). The fetal alcohol syndrome. *New England Journal of Medicine*, 298: 1063-1067.
- Crowder, C.M., Lassiter, C.S., y Gorelick, D.A. (2017). Nuclear androgen receptor regulates testes organization and oocyte maturation in zebrafish. *Endocrinology* 159. DOI:10.1210/en.2017-00617.
- Denny, L., Coles, S., y Blitz, R. (2017). Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol spectrum disorders. *Am Fam Physician*, 96 (8): 515-522.
- Dutta, S.P.S. (1993). Food and feeding habitat of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu. *Journal of Freshwater Biology*, 5: 165-168.
- Fernandes, Y., Buckley, D. M., y Eberhart, J. K. (2018). Diving into the world of alcohol teratogenesis: a review of zebrafish models of fetal alcohol spectrum disorder. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 96(2), 88–97. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0122>.
- Flentke, G. R., Klingler, R. H., Tanguay, R. L., Carvan, M. J. y Smith, S. M. (2014). An evolutionarily conserved mechanism of calcium-dependent neurotoxicity in a zebrafish model of fetal alcohol spectrum

- disorders. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 38(5), 1255–1265. <https://doi.org/10.1111/acer.12360>.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., y Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 67(4), 773–782. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00422-6).
- Google Scholar: <https://scholar.google.com/> (acceso 14 marzo de 2020).
- Gupta, K. K., Gupta, V. K., y Shirasaka, T. (2016). An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 40(8), 1594–1602. <https://doi.org/10.1111/acer.13135>.
- Jones, K.L., y Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, 2: 999-1001.
- Jones, K.L., Smith, D.W., Ulleland, C.N., y Streissguth, A.P. (1973). Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet*, 1: 1267-1271.
- Jones, K.L., Smith, D.W., y Streissguth, A.P. (1974). Myriantopoulos Outcome in offspring of chronic alcoholic women. *Lancet*, 1: 1076-1078.
- Joya, X., Garcia-Algar, O., Vall, O., y Pujades, C. (2014). Transient exposure to ethanol during zebrafish embryogenesis results in defects in neuronal differentiation: an alternative model system to study FASD. *PloS one*, 9(11), e112851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112851>.
- Kashyap, B., Frey, R.A. y Stenkamp, D.L. (2011). Ethanol-Induced Microphthalmia is Not Mediated by Changes in Retinoic Acid or Sonic Hedgehog Signaling During Retinal Neurogenesis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35: 1644-1661. doi:[10.1111/j.1530-0277.2011.01511.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01511.x).
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., y Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., y Guo, S. (2004). Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale

- screening. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 77(3), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.01.003>.
- Loucks, E. J., y Ahlgren, S. C. (2009). Deciphering the role of Shh signaling in axial defects produced by ethanol exposure. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 85(6), 556–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20564>.
- Loucks, E., y Ahlgren, S. (2012). Assessing teratogenic changes in a zebrafish model of fetal alcohol exposure. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (61), 3704. <https://doi.org/10.3791/3704>.
- Loucks, E., y Carvan, M.J. (2004). Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6):745-755. doi:10.1016/j.ntt.2004.06.017.
- Lovely, C.B., Fernandes, Y., y Eberhart, J.K. (2016). Fishing for fetal alcohol spectrum disorders: Zebrafish as a model for ethanol teratogenesis. *Zebrafish*, 13 (5), 391–398. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1270>.
- McClure, M.M., McIntyre, P.B., y McCune, A.R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69: 553-570.
- Oken, E., Kleinman, K. P., Rich-Edwards, J., y Gillman, M. W. (2003). A nearly continuous measure of birth weight for gestational age using a United States national reference. *BMC pediatrics*, 3, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-3-6>.
- O'Neil, E. (2011). Cronología del desarrollo de defectos de nacimiento inducidos por alcohol. *Embryo Project Encyclopedia*. ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/2101>.
- Oppenheimer, J.M. (1936) Structures developed in amphibians by implantation of living fish organizer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 34, 461-463.
- Parker, M. O., Annan, L. V., Kanellopoulos, A. H., Brock, A. J., Combe, F. J., Baiamonte, M., Teh, M. T., y Brennan, C. H. (2014). The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Progress in neuro-*

*psychopharmacology & biological psychiatry*, 55, 94–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.011>.

Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., y Rehm, J. (2017). Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Global Health* 5: 290-299.

PubMed of the National Center for Biotechnology Information (NCBI):

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acceso 14 marzo de 2020).

Rasooly, R.S., Henken, D., Freeman, N., Tompkins, L., Badman, D., Briggs, J., et al. (2003). Genetic and genomic tools for zebrafish research: the NIH zebrafish initiative. *Dev. Dyn.* 228: 490-496.

Roberts, A. C., Reichl, J., Song, M. Y., Dearinger, A. D., Moridzadeh, N., Lu, E. D., Pearce, K., Esdin, J., y Glanzman, D. L. (2011). Habituation of the C-start response in larval zebrafish exhibits several distinct phases and sensitivity to NMDA receptor blockade. *PLoS one*, 6(12), e29132.

Rouquette, J. (1957) Influence de la toxicomanie alcoolique parental sur le développement physique & psychique des jeunes enfants. Université de Paris, Faculté de Médecine. Paris, [Thèse]. Pág. 62.

Santoriello, C., y Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2337–2343.  
<https://doi.org/10.1172/JCI60434>.

Shan, S. D., Boutin, S., Ferdous, J., y Ali, D. W. (2015). Ethanol exposure during gastrulation alters neuronal morphology and behavior in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 48, 18–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.01.004>.

Spence, R., y Smith, C. (2007). The role of early learning in determining social preferences based on visual cues in the zebrafish, *Danio rerio*. *Ethology*, 113(1): 62-67.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., y Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83(1), 13-34.

Stratton, K.R., Howe, C.J., and Battaglia, F.C. (Ed.). (1996) *Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment*. National Academy Press, Washington, D.C.

- Streisinger, G., Singer, F., Walker, C., Knauber, D., & Dower, N. (1986). Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*, 112(2), 311–319.
- Streissguth, A. P., y Dehaene, P. (1993). Fetal alcohol syndrome in twins of alcoholic mothers: concordance of diagnosis and IQ. *American journal of medical genetics*, 47(6), 857–861.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320470612>.
- Talling, J.F., y Lemoalle, J. (1998) Ecological Dynamics of Tropical Inland Waters. Cambridge University Press, Cambridge.
- The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T166487A6219667.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T166487A6219667.en>  
(acceso 13 de mayo de 2020).
- The Zebrafish Information Network (ZFIN): <https://zfin.org/> (acceso 16 marzo 2020).
- Vishwanath, W. 2010. Danio rerio. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T166487A6219667. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T166487A6219667.en> (acceso 13 de mayo de 2020).
- Wattendorf, D.J., y Muenke M. Fetal alcohol spectrum disorders. *Am Fam Physician*. 2005;72(2):279-285.
- Web of Science (WOS): <https://www.fecyt.es/es/recurso/recursos-cientificos>  
(acceso 14 marzo de 2020).
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(1), 35–44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>.