

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO DE EMBRIONES DE  
POLLO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS DURANTE LA NEURULACIÓN  
(EL CASO DE PROGESTERONA)"

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H 695093  
No. Título \_\_\_\_\_  
Clas. TS  
619.5  
92161



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO DE EMBRIONES DE  
POLLO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS DURANTE LA NEURULACIÓN  
(EL CASO DE PROGESTERONA)”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**SINODALES**

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
DIRECTOR

---

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**  
SINODAL

---

**M. en C. SALVADOR LECONA URIBE**  
SINODAL

---

**Q.B. SERGIO PACHECO HERNANDEZ**  
SINODAL

---

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice general	i
Índice de figuras	ii
Índice de cuadros	iii
Resumen	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
II.1 Progesterona	2
II.2 Expresión genética	10
II.3. Desarrollo del sistema nervioso	13
III. Hipótesis	24
IV. Objetivos	25
General	25
Específicos	25
V. Metodología	26
V.1 Materiales	26
V.2 Métodos	26
V.3 Diseño experimental	27
V.4. Método estadístico	28
VI. Resultados	31
VII. Discusión de resultados	45
VIII. Conclusiones	49
IX. Bibliografía	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Figuras	Página
1.	Rutas de biosíntesis.	3
2.	Control de la expresión genética.	11
3.	La segmentación.	13
4.	Neurulación.	14
5.	Diferenciación temprana del mesodermo embrionario.	16
6.	Sistema nervioso a las 4 semanas.	18
7.	Esquemas que explican la base embriológica de los Defectos del Tubo Neural.	20
8.	Variantes de espina bífida.	22
9.	Mielomeningocele.	23
10.	Embrión normal de ED 13 (25X).	32
11.	Grupo Control.	33
12.	Grupo Blanco.	34
13.	Aplasia generalizada.	35
14.	Grupo Progesterona 2.5 mg.	36
15.	Grupo Progesterona 3.75 mg.	37
16.	Deficiencia en la formación de los primordios.	38
17.	Grupo Progesterona 5.0 mg.	39
18.	Resorciones	40
19.	Grupo Progesterona 10.0 mg.	41
20.	Anencefalia.	41
21.	Relación Dosis–Respuesta.	42
22.	Relación dosis-respuesta con corrección de Abbott.	43
23.	Anormalidades observadas.	44

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Parámetros de las edades embrionarias.	31

## RESUMEN

Las características estructurales, funcionales y de comportamiento de cualquier célula se deben en gran medida a la expresión génica, o sea a la transcripción de la información genética y su traducción en proteínas. Las secuencias de genes son transcritas en copias de ARN para ser traducidas en una secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Diversos componentes de la célula supervisan estas funciones que pueden ser afectadas por otros compuestos como las hormonas sexuales que en su forma activada se unen con alta afinidad a secuencias específicas de genes en la región del promotor. La progesterona se difunde a través de la membrana plasmática de las células blanco uniéndose a receptores intracelulares para promover un efecto supresor o activador sobre la transcripción de un gen. El uso terapéutico desmedido de progesterona para el tratamiento del aborto espontáneo es controversial por el riesgo de inducir defectos en el tubo neural. Para estudiar el efecto de la progesterona usamos como modelo biológico al pollo, del cual estudiamos sus diferentes edades embrionarias (ED) o estadios, conociendo así sus características y medidas de cada estadio como también elegimos el estadio al cual el embrión se expondrá con la progesterona y el estadio en el que se exploraran sus efectos fenotípicos. El objetivo de este proyecto es probar la funcionalidad del modelo biológico de pollo, y comprobar la estabilidad del modelo. Corroborando las ventajas de utilizar al pollo como modelo ya que los embriones son fácilmente accesibles y pueden manipularse *in ovo*. Finalmente se trabajó con los grupos de investigación a 5 dosis diferentes de progesterona, administradas en el estadio 4 y posteriormente explorando el embrión en el estadio 13, observando un efecto en el desarrollo normal del embrión, teniendo como resultado un número aumentado de las anomalías en comparación con el grupo control. El modelo de embriones de pollo es importante en los estudios de teratogénesis porque mostraron resultados consistentes en los diferentes grupos estudiados.

## I. INTRODUCCIÓN

Los esteroides sexuales como la progesterona, se difunden directamente a través de la membrana plasmática de células blanco y se unen a sus receptores intracelulares que se ensamblan en secuencias específicas de ADN adyacente a los genes. La unión de la proteína receptora al ligando altera su conformación y activa o en ocasiones suprime la transcripción del gen que posteriormente se traduce en los ribosomas para formar nuevas proteínas. Estas proteínas codificadas actúan como enzimas, proteínas de transporte o estructurales entre otras funciones a nivel celular.

El control de la expresión genética es un proceso en el que intervienen varios factores. El efecto de una sola proteína reguladora puede ser decisivo para prender o apagar cualquier gen en particular. Si un número diferente de genes contienen el sitio de regulación para la misma proteína, esta puede ser usada para regular la expresión de todos ellos.

Se han realizado diversos estudios sobre la conexión entre agentes progestacionales y su relación con la teratogénesis no genital, como lo son anomalías cardíacas, anomalías vertebrales, defectos en extremidades, etc. Los resultados del efecto teratogénico de la progesterona son poco claros, por lo que es importante precisar su acción durante el inicio de la formación del sistema nervioso.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 PROGESTERONA

La progesterona es una hormona esteroide femenina que regula numerosas biosíntesis y eventos metabólicos, los cuales modifican el crecimiento de células específicas en órganos sexuales, la actividad biosintética del estradiol (Figura 1) y cambios en el promotor secretor en el endometrio durante la última mitad del ciclo sexual femenino, de este modo prepara el útero para la implantación del óvulo fertilizado.

Los receptores de la progesterona se localizan en el núcleo y representan una familia de factores de transcripción con seis regiones homólogas que contribuyen al dominio funcional de los receptores. El mecanismo molecular por el cual las hormonas esteroides regulan la transcripción de genes blancos por estos receptores ha sido activamente investigado en los últimos 30 años. En ausencia de ligando, los receptores son asociados con proteínas chaperonas y son transcripcionalmente inactivados.

Hay un gen único que codifica para receptores de progesterona, pero en algunos tejidos se observan dos formas del receptor, las llamadas formas A y B. Esas surgen a partir de la utilización de dos codones de inicio de la traducción. El receptor A es la forma más pequeña y constituye una forma truncada del receptor B. Ambas modalidades de receptores se unen a la hormona y son activos como factores de transcripción, pero se desconoce la importancia fisiológica y farmacológica de las dos formas.

Los receptores de las hormonas esteroides pueden ser activados por dos mecanismos. El primero, ligando dependiente consiste en la unión de la hormona al ligando LBD. El segundo mecanismo es ligando independiente y es resultado de la integración de otras vías de señalización, usualmente receptores de membrana que resultan en la activación de las cinasas y la fosforilación de los receptores (De Mayo y col., 2002).

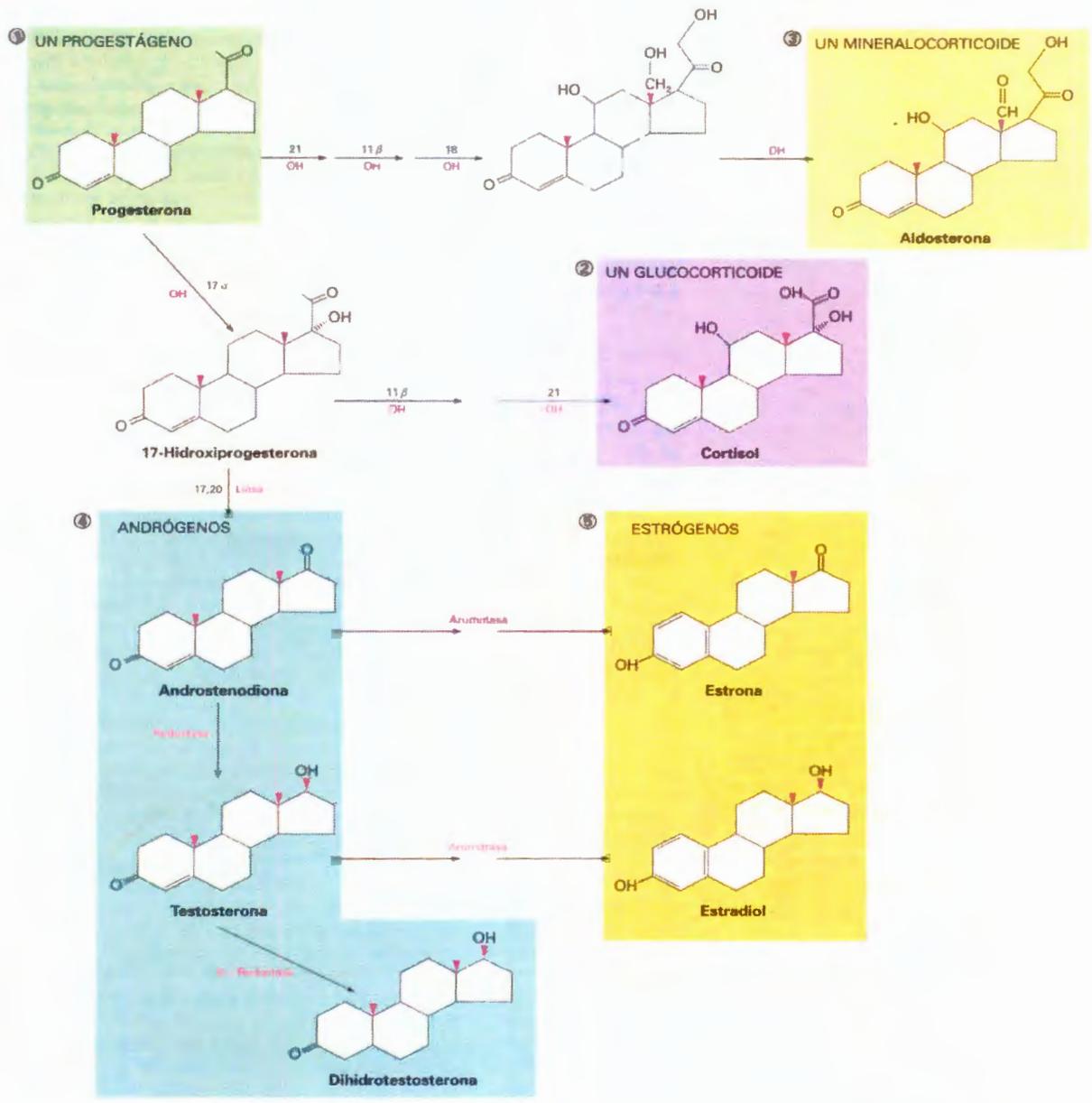


Figura 1. Rutas de biosíntesis que van desde la progesterona a otras hormonas esteroideas. Los progestágenos regulan los fenómenos que se producen durante el embarazo y son las precursoras de todas las demás hormonas esteroideas. (Mathews, 1998).

Las hormonas esteroideas ejercen efectos biológicos por la inducción de un incremento en la síntesis de ARN y proteínas. La progesterona entra a la célula por difusión pasiva mediada por proteínas transportadoras y se unen a receptores citosólicos y nucleares específicos. El receptor experimenta un cambio alostérico de conformación convirtiendo el complejo receptor de una forma inactiva a una forma activa. La activación del complejo receptor tiene una alta afinidad por secuencias específicas nucleares, estos tienen características de los elementos clásicos del reforzador. La unión del complejo hormona-receptor da lugar típicamente a la activación genética e incrementa la síntesis de mRNA que se traslada a los ribosomas citoplasmáticos de tal modo que aumenta la síntesis de proteínas, las cuales pueden modificar las funciones celulares, crecimiento y/o diferenciación (Maier y Herman, 2001). Las hormonas esteroideas poseen una estructura química basada en el núcleo similar al colesterol; estas hormonas son secretadas por: a) la corteza suprarrenal: cortisol y aldosterona, b) los ovarios: estrógenos y progesterona, c) los testículos: testosterona y d) la placenta: estrógenos y progesterona. El principal y más abundante progestágeno es la progesterona (Mathews y col., 1998), aunque cabe mencionar que también se secretan pequeñas cantidades de otro progestágeno, la 17-alfa-hidroxiprogesterona que tiene esencialmente los mismos efectos (Flores y Amado, 1997.; Goodman y Gilman, 1996).

Estudios hechos en diferentes animales como la rata, el hámster, el conejo y el perro sugieren efectos tóxicos leves producidos por la progesterona, como disminución del peso corporal, alteraciones hepáticas y ovarios agrandados, así como atrofia de testículos y vesícula seminal (Maier y Herman, 2001, Sarabia y García-Alcocer, 2002).

También aparece una colesterolemia en los animales tratados con progesterona, a causa de una perturbación en la formación de la bilis, por un efecto fisiopatológico o bioquímico en el hepatocito (Maier y Herman, 2001).

Estudios in vitro de cultivo de linfocitos humanos indican que la progesterona no causa mutaciones genéticas, pero puede ser clastogénica, causando daño estructural a los cromosomas. Estos daños se caracterizan por un incremento en el intercambio entre cromátidas hermanas como: aberraciones cromosómicas y algunas aneuploidías (Maier y col., 2001).

Seegmiller y col. en 1983 realizaron estudios en ratones inyectados por administración subcutánea con caproato de la alfa-hidroxiprogesterona 17 en los días 6-15 de gestación. El tratamiento fue dado diariamente en las dosis 10, 100, y 200 veces la dosis terapéutica humana. El día 18 los fetos fueron extraídos del útero y examinados para las malformaciones y otros efectos fetotóxicos. El tratamiento con las dos dosis más altas dio lugar a muertes maternas de 8 y del 13%, y todas las dosis dieron lugar a un aumento leve (4-12% sobre control) en frecuencia de la resorción.

Hendrickx y col. en 1987 evaluaron los efectos embriotóxicos en Macacos; utilizaron caproato de hidroxiprogesterona (HPC) solo y en conjunto con valerato de estradiol (EV) que fue administrado intramuscularmente a los monos hembras embarazados en los intervalos de entre 20 y 146 días de gestación; examinando los fetos después de cesárea en 150 +/- 2 días. HPC fue probado con dosis de 0.01 a 10 veces el equivalente a la dosis en humano. Los resultados indicaron que en ese periodo de exposición a la progestina, HPC en útero, sola o conjuntamente con EV en monos, son embrioletales pero no teratogénicos en las dosis hasta diez veces la terapéutica humana.

Los efectos teratogénicos de los agentes progestacionales administrados durante el embarazo temprano fueron investigados en un estudio anticipado histórico controlado de 2754 infantes, de madres que habían sangrado durante el primer trimestre del embarazo. El grupo de estudio consistió en 1608 recién nacidos de madres tratadas con progestágenos (sobre todo acetato del medroxiprogesterona) en el primer trimestre. El grupo de control abarcó a 1146 infantes de madres no

tratadas. Examinaron a todos los recién nacidos en los primeros días de la vida, con especial atención a la detección de malformaciones clasificadas según los diversos sistemas anatómicos. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los tratados y los grupos control con respecto a malformaciones en cualquiera de los sistemas examinados. El índice total de malformaciones era 120 por 1000 en el grupo de estudio y 123.9 por 1000 en el grupo de control. Las malformaciones importantes ocurrieron en los índices de 63.4 y 71.5 por 1000, respectivamente. El estudio no pudo demostrar un aumento en teratogenicidad después de la administración de progestagenos durante el primer trimestre del embarazo (Katz y col., 1985).

Un análisis de datos epidemiológicos induce a concluir que el uso de hormonas exógenas durante el embarazo humano no parece causar anomalías en el desarrollo de órganos y tejidos no-genitales. Esta conclusión es apoyada más a fondo por los datos de laboratorio en estudios de modelos animales. La importancia de la evidencia en esta investigación indica una carencia de la asociación entre el uso hormonal durante el embarazo y las malformaciones no-genitales del descendiente. La calidad de los datos epidemiológicos no permiten tener una conclusión definitiva sobre las hormonas del sexo durante el embarazo; bajo condiciones definidas, existe cierto efecto nocivo en el desarrollo prenatal humano. Sí hay riesgos crecientes de malformaciones no-genitales asociadas a la administración de ciertos esteroides, los riesgos son muy pequeños, pudiendo no ser causales, y están substancialmente debajo del riesgo espontáneo de malformaciones. A pesar del actual grado de incertidumbre, los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio permiten la formulación de un acercamiento racional a manejar los problemas relacionados con el uso y la exposición de hormonas sexuales esteroides en mujeres embarazadas (Wilson y Brent, 1981).

Aunque los datos que apoyan el potencial teratogénico de la progestina están careciendo, persiste la preocupación de que estas drogas tienen el potencial para

ocasionar teratogénesis no-genital, puesto que los defectos se pueden producir durante procesos anormales durante la organogénesis.

Se realizó un estudio sobre los efectos del acetato del medroxiprogesterona (MPA) en el desarrollo endocrondal intrauterino, así como el desarrollo embriofetal total. Los ratones fueron tratados vía subdermal, en las dosificaciones de 5.0, 50.0, y 500.0 mg/kg/día en los días 7 a 19 de gestación. Estas dosis eran 25, 250, y 2,500 sobre el equivalente en humano. No se observó ningún aumento en malformaciones no-genitales en ningún nivel evaluado de la dosificación de MPA. En los grupos de 250 y de la dosificación de 2,500, el MPA mostró un efecto embriotóxico que inducía resorciones de 48 y del 100% respectivamente. Los datos demostraron que el MPA permitió la supervivencia del embrión y no indujo aumentos en la frecuencia de la teratogénesis no-genital (Carbone y col., 1990).

La distribución del receptor de progesterona se ha localizado en vías reproductoras femeninas, glándulas mamarias, sistema nervioso central (incluso, la región del generador de impulsos en el hipotálamo) e hipófisis, pero por lo general tiene una distribución más limitada en los tejidos que los receptores de estrógenos u otras hormonas esteroideas. En muchas células, los estrógenos inducen la expresión de los receptores de progesterona.

La secuencia de acontecimientos en la función esteroide es esencialmente la siguiente: 1) La hormona esteroide penetra en el citoplasma de la célula, donde se une a una proteína receptora específica. 2) El complejo receptor-hormona se difunde o es transportado al interior del núcleo. 3) La combinación se une ahora a puntos específicos de las cadenas de ADN de los cromosomas, lo que activa el proceso de transcripción de genes específicos para formar ARN mensajero. 4) El ARN mensajero, se difunde al interior del citoplasma, donde promueve el proceso de traducción en los ribosomas para formar nuevas proteínas.

Los dos usos más frecuentes de los progestágenos comprenden: a) la anticoncepción, sea sola o con estradiol o mestranol en anticonceptivos orales, b) combinadas con estrógenos para hormonoterapia de restitución en posmenopáusicas. Los progestágenos también se administran en varias situaciones graves de supresión ovárica, por ejemplo, dismenorrea, endometriosis, hirsutismo y hemorragia uterina. En general esas aplicaciones de las progestinas por vía oral extienden los efectos fisiológicos de la progesterona sobre el control neuroendocrino de la función ovárica y sobre el endometrio. También se han utilizado progestágenos para tratar síndrome premenstrual, pero su eficacia en este padecimiento no se ha establecido mediante estudios clínicos controlados (Goodman y Gilman, 1996).

Aún cuando los progestágenos se emplearon de manera extensa en el pasado para prevenir amenaza de aborto, no se han usado para este propósito durante al menos un decenio (Goodman y Gilman, 1996). No hay pruebas de que los progestágenos sean eficaces en un número importante de esas situaciones; así mismo, su utilización genera riesgos potenciales para el feto (por ejemplo, virilización y deformidades genitales).

En el aparato reproductor la progesterona liberada durante la fase luteínica del ciclo disminuye la proliferación endometrial impulsada por estrógenos y conduce al desarrollo de un endometrio secretor. La declinación repentina de la liberación de progesterona, al final del ciclo, constituye el principal determinante del inicio de la menstruación. Cuando se alarga artificialmente la duración de la fase luteínica, ya sea al sostener la función luteínica o mediante tratamiento con progesterona, es posible inducir cambios deciduales en el estroma endometrial similares a los que se observan al principio del embarazo. La progesterona tiene mucha importancia en la conservación del embarazo. Los principales efectos de la hormona constituyen la supresión de la menstruación y la contractilidad uterina. Esos efectos para conservar el embarazo han conducido al uso histórico de progestágenos para evitar amenaza de aborto. Como quiera que sea, el beneficio de ese tipo de tratamiento

es cuestionable tal vez porque el aborto espontáneo rara vez depende de progesterona disminuida.

Los progestágenos poseen muchos efectos metabólicos. Por ejemplo, la progesterona incrementa las concentraciones basales de insulina, pero normalmente no causa un cambio de la tolerancia a la glucosa. La progesterona estimula la actividad de lipoproteinlipasa y parece aumentar el depósito de lípidos. Se ha informado que la progesterona y sus análogos, generan acciones nulas o reducciones moderadas de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de alta densidad. La progesterona también reduce las acciones de la aldosterona en los túbulos renales causando decremento en la resorción de sodio; lo que puede aumentar la secreción de mineralocorticoides a partir de la corteza suprarrenal.

Sobre el equilibrio electrolítico, grandes cantidades de progesterona, así como los estrógenos, la testosterona y las hormonas corticosuprarrenales, pueden facilitar la reabsorción de sodio, cloro y agua en los túbulos distales renales. Sin embargo, aunque parezca extraño es más frecuente que la progesterona provoque un aumento de la excreción de sodio y agua. La causa de ello es que la progesterona y la aldosterona compiten con las mismas proteínas receptoras que inducen el transporte de iones de sodio a través de las células epiteliales tubulares. Cuando la progesterona se combina con estas proteínas, la aldosterona no puede hacerlo. Sin embargo, el efecto de la progesterona sobre el transporte de sodio es varias veces menor. Por ello, a pesar de que en condiciones apropiadas la progesterona puede provocar una débil retención de sodio y de agua por los túbulos renales, bloquea el efecto mucho más potente de la aldosterona, causando así pérdida neta de sodio y de agua corporales (Guyton, 1997).

## II.2 EXPRESIÓN GENÉTICA

La progesterona puede participar durante la expresión genética que consiste en el paso de ADN a proteínas por los procesos de transcripción y traducción, dichos procesos pueden ser regulados para mantener el orden en la síntesis de proteínas. La transcripción de cada uno de los genes en las células es activada o desactivada por proteínas de regulación génica y pueden dividirse en seis categorías:

- 1) Regulación transcripcional: Consiste en controlar y vigilar la transcripción de genes y la constancia en la que se utilizan genes específicos.
- 2) Regulación del procesamiento del ARN: Se lleva a cabo durante la maduración de los transcritos primarios. Control de la formación del extremo 3' por ruptura y adición de poli-A.
- 3) Regulación del transporte de ARN: Controla la identificación de los mARN ya procesados que van a dirigirse al citoplasma para ser traducidos a proteínas.
- 4) Regulación traduccional: Selecciona los mARN que se encuentran ya en el citoplasma para ser traducidos en los ribosomas. Control de la iniciación de la traducción.
- 5) Regulación de la degradación de los mARN: Por la selección de moléculas de mARN citoplasmático y la desestabilización para ser degradadas posteriormente.
- 6) Regulación de la activación proteica: Ubicando controladamente las proteínas en su lugar, activándolas así o en su caso inactivándolas.

La mayoría de estos procesos de control requieren el reconocimiento de secuencias específicas o de estructuras que sean reguladas en la molécula de ARN (Figura 2). Este reconocimiento se puede llevar a cabo ya sea por una proteína reguladora o por una molécula reguladora de ARN (Alberts y col., 1998; Griffiths y col. 2000).

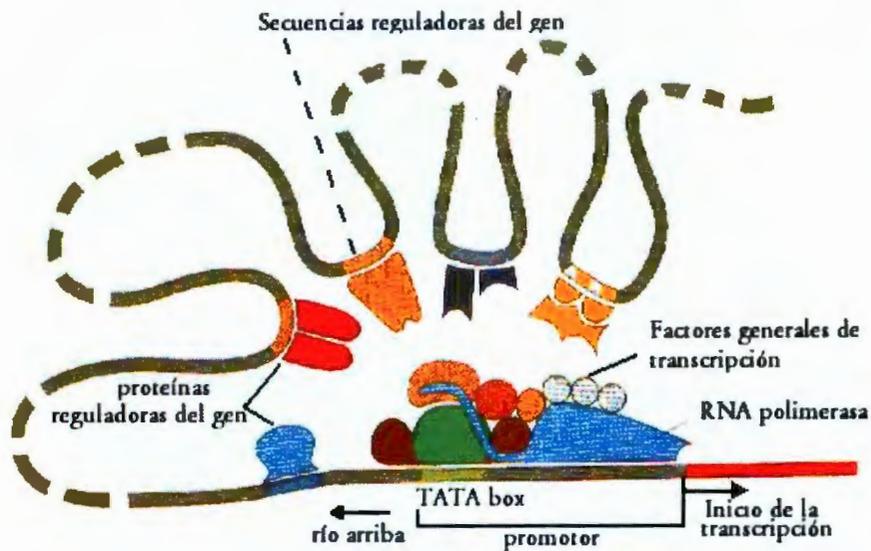


Figura 2. Control de la expresión genética. El promotor es la secuencia de ADN donde los factores generales de transcripción y la ARN polimerasa se ensamblan. La característica más importante de los promotores de genes transcritos por la ARN polimerasa es el TATA box, el cuál sirve como el punto de partida para el ensamble de factores de transcripción general. Las secuencias reguladoras pueden ser localizadas en forma adyacente al promotor. Las vueltas de ADN permiten que las proteínas reguladoras del gen unidas a sitios distantes del promotor interaccionen con las proteínas que ensamblan el promotor, (Alberts y col., 1998).

Las proteínas encargadas de la regulación génica distinguen secuencias específicas de ADN determinando cual de todos los genes será transcrito. La secuencia de aminoácidos que se pliega en el dominio de reconocimiento determina la secuencia de ADN que será reconocida.

Estas proteínas se unen a secuencias específicas de ADN cerca del lugar donde dará inicio la transcripción por la ARN polimerasa y dependiendo del tipo de proteína reguladora y de la localización precisa de su secuencia de unión, pueden tanto activar como inhibir la transcripción del gen.

Sin embargo, las ARN polimerasas en células eucariotas requieren el ensamblaje previo sobre el lugar promotor de factores generales de transcripción. Estos factores se ensamblan en un cierto orden, que se inicia con la unión del TFIID a la secuencia TATA, una secuencia de ADN situada justo por delante de muchos lugares de inicio de la ARN polimerasa.

El aparato molecular que controla la transcripción en las células humanas consta de tres tipos de componentes. Los factores de transcripción basales, los cuales, en respuesta de señales de los activadores, estos factores sitúan a la polimerasa del ARN en el sitio de inicio de la transcripción y arrancan el proceso. Los activadores, se unen a los genes en sitios conocidos como intensificadores, aumentando la tasa de transcripción y los represores, se unen como silenciadores, disminuyendo los niveles de transcripción. Los activadores y represores se comunican con los factores basales por medio de coactivadores, los cuales están íntimamente asociados a la proteína de unión a TATA, integrando señales.

Además de las proteínas de regulación que difunden, en los eucariotas también se utilizan ciertos estados de compactación de la cromatina, heredables, para regular la expresión génica.

Muchos de los pasos de la ruta que va desde el ARN hasta la proteína están regulados por las células para controlar la expresión génica. Se cree que la mayoría de los genes están regulados en múltiples niveles, aunque habitualmente predomina el control de la iniciación de la transcripción (control transcripcional). Sin embargo, algunos genes son transcritos a un nivel constante, activados y desactivados exclusivamente por mecanismos reguladores post-transcripcionales.

### II.3. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

El desarrollo del sistema nervioso depende de una precisa expresión genética precisa durante su formación, que puede verse alterada por la presencia de sustancias químicas como hormonas del tipo progesterona. El desarrollo del sistema nervioso inicia con la fecundación que consiste en la unión de un espermatozoide con un óvulo para generar una célula diploide llamada cigoto. La división mitótica del cigoto en dos células hijas llamadas blastómeros comienza después de la fecundación. Varias divisiones subsecuentes siguen una después de la otra formando una bola sólida de 16 blastómeros aproximadamente llamada mórula (Figura 3). Esta entra al útero y el líquido que está en la cavidad uterina pasa a su interior y se acumula entre sus células separándolas en dos partes: una masa externa de células llamada trofoblasto, el cual forma más tarde la mayor parte de la placenta y una masa celular interna (embrioblasto) que se diferenciará subsecuentemente para formar el embrión. A este conjunto celular se le denomina blástula.

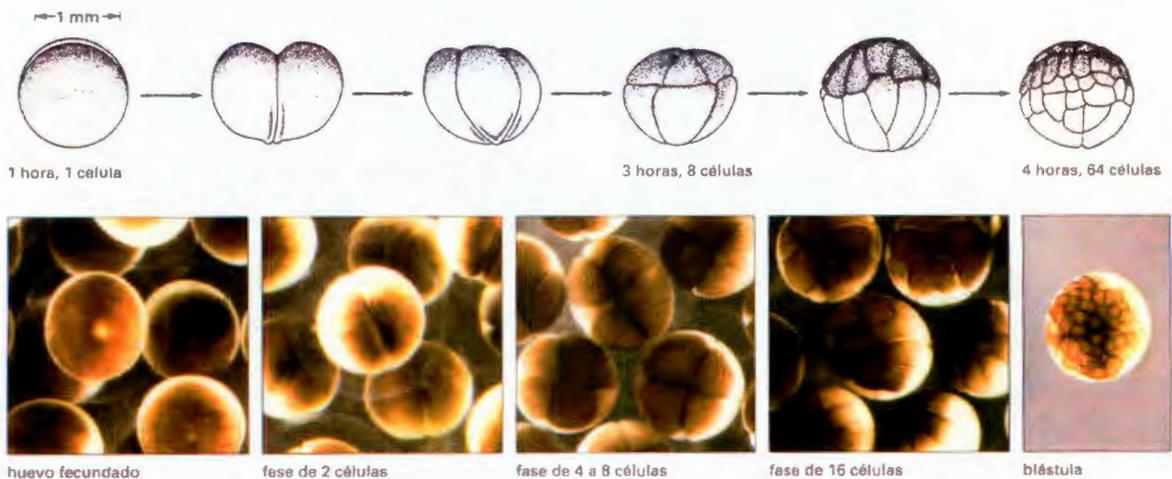


FIGURA 3. La segmentación. Después de la fecundación inicia la división mitótica hasta formar la mórula que esta compuesta de 16 blastómeros aproximadamente. El embrioblasto se diferenciará subsecuentemente para formar el embrión. Este conjunto se denomina blástula. (Alberts y col., 1998)

Luego de la implantación, la blástula experimenta cambios morfológicos en la masa celular interna que dan por resultado la formación de un disco embrionario que consiste de dos capas: el epiblasto y el hipoblasto (Colas y Schoenwolf, 2001). Durante la gastrulación este disco embrionario bilaminar se diferencia en un disco embrionario trilaminar, formando las tres capas germinativas primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo.

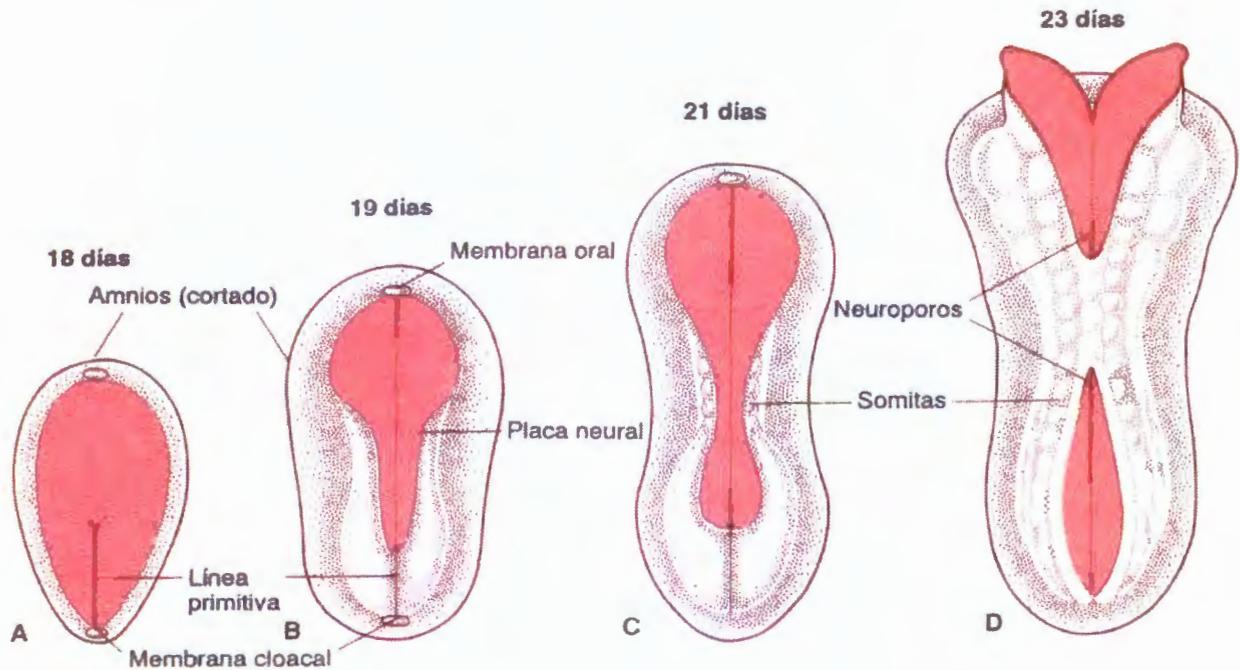


Figura 4. Neurulación. La formación del sistema nervioso corresponde desde el ED 4 hasta el ED 8 en pollo. Nótese la aparición de somitas, la formación del surco neural y de los pliegues neurales (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

El primer signo de aparición del sistema nervioso ocurre cuando la notocorda y el mesodermo paraxial inducen al ectodermo suprayacente a engrosarse y formar la placa neural (Figura 4). Las células que forman esta placa se llaman células neuroectodérmicas. La parte rostral ensanchada de la placa neural es la placa cerebral; la porción caudal estrecha origina la medula espinal. El proceso de formación del sistema nervioso a partir del ectodermo se denomina neurulación.

En el día 18 o 19 en humanos (en pollo corresponde a el ED 4, de acuerdo a la morfología descrita por Hamburger and Hamilton, 1951), la placa neural muestra en la línea media un surco neural flanqueado por los pliegues que se juntan para formar el tubo neural. La fusión de los pliegues neurales comienza al nivel del cuarto par de somitas y progresa simultáneamente en dirección rostral y caudal. A lo largo de la línea de fusión una delgada capa de mesodermo pasa entre el tubo y el ectodermo superficial.

Las células junto a las crestas de los pliegues neurales escapan del tubo neural durante el cierre, se colocan a todo lo largo del tubo neural y constituyen las crestas neurales. El tubo neural forma el cerebro y la medula espinal, el canal neural del tubo se convierte en el sistema ventricular en el cerebro y en el conducto de la medula espinal.

La mayor parte de los órganos y sistemas principales se forman entre la tercera y la octava semana en humanos (del ED 7 hasta alrededor del ED 15 en pollo). Por lo tanto, este lapso se denomina periodo de organogénesis y es el periodo crítico para el desarrollo normal. Las células primordiales están formando esbozos de los órganos y estas interacciones son susceptibles a los efectos de influencias genéticas y ambientales. Esto lo hace un periodo crítico y es el lapso durante el cual se generan los principales defectos estructurales del nacimiento (Sadler, 2001).

Los tejidos derivados del neuroectodermo incluyen: el sistema nervioso central y periférico, la retina del ojo y el lóbulo posterior de la glándula pituitaria. Los tejidos derivados de la cresta neural incluyen: los ganglios espinales y autónomos, la médula suprarrenal y las células pigmentadas de la piel y la retina. Algunas células de la cresta neural derivadas de la placa cerebral se comportan como células mesodérmicas: son capaces de formar tejido conjuntivo.

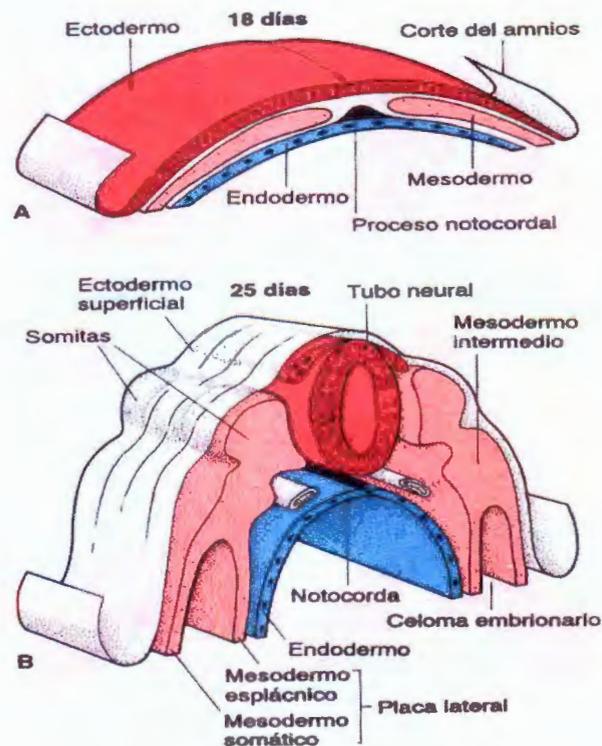


Figura 5. Diferenciación temprana del mesodermo embrionario. En el periodo somítico, los somitas se observan en el ectodermo superficial. Dependiendo del nivel que ocupan, se conocen como occipitales, cervicales, torácicos, lumbares, sacros o coccígeos. (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

Los tejidos derivados del ectodermo superficial incluyen: la epidermis de la piel, junto con los folículos pilosos y las glándulas cutáneas incluso las glándulas mamarias, el cristalino, las células sensitivas especializadas del oído interno, el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, y el esmalte de los dientes.

La porción del mesodermo que flanquea al eje medio del embrión es el paraxial (Figura 5). En su mayor parte conlleva un proceso de segmentación en dirección rostrocaudal mediante el cual crea los bloques de mesodermo denominados somitas.

Los días 20 a 30 constituyen el periodo somítico (en pollo corresponde al periodo entre los ED 7 y ED 14, llegando a formar 22 pares de somitas). Durante este periodo se forman 34 a 35 somitas que son fácilmente observables a través de la delgada cubierta del ectodermo superficial. Son más difíciles de enumerar más tarde, pero continúan apareciendo al final de la quinta semana, hasta un total de 42 a 44 pares y según el nivel que ocupan, se denominan occipitales, cervicales, torácicos, lumbares, sacros o coccígeos.

La formación de los somitas se inicia en la porción rostral del embrión comenzando por la cabeza en una secuencia cráneo-caudal. Para cuando los somitas más caudales comienzan a definirse durante la quinta semana, los más cefálicos llevan tres semanas de ventaja en el desarrollo.

Los tejidos derivados de los somitas incluyen: la columna vertebral y la musculatura esquelética del tronco, también la dermis.

Los tejidos derivados del mesodermo intermedio incluyen: los riñones y los uréteres, las gónadas, el conducto deferente y el útero y las trompas uterinas.

Los tejidos derivados del mesoderma somático incluyen: el esqueleto y musculatura de las extremidades; también el esternón y la porción anterior de las costillas. Los tejidos derivados del mesoderma espláncico incluyen el sistema cardiovascular y la sangre, el bazo, y el recubrimiento del músculo liso del tracto gastrointestinal.

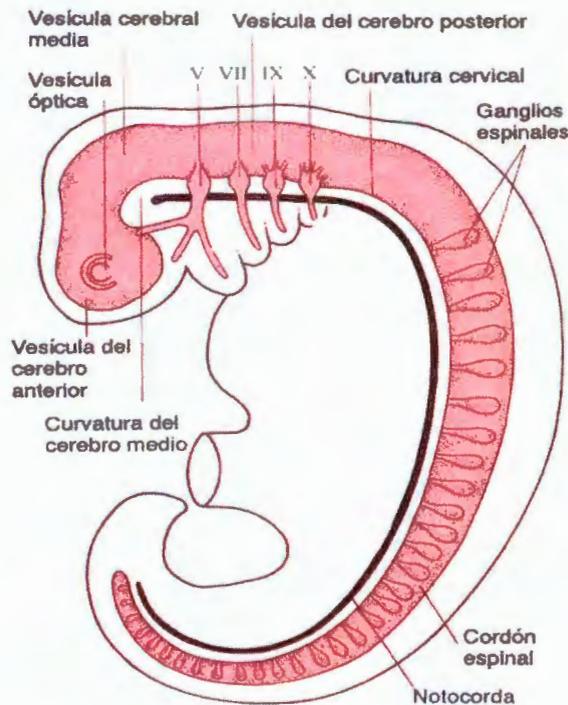


Figura 6. Sistema nervioso a las 4 semanas. En la cuarta semana (en pollo ED10), las tres vesículas cerebrales primitivas han aparecido y son las vesículas cerebrales anterior, media y posterior. La vesícula óptica se ha desarrollado del cerebro anterior; originará la retina y el nervio óptico. (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

De forma caudal a las vesículas cerebrales, la médula espinal comienza a diferenciarse a través del epitelio del tubo neural (Figura 6). Los nervios periféricos que emergen del tallo cerebral y la médula espinal muestran unos ganglios sensoriales prominentes que incluyen el ganglio trigeminal, el ganglio geniculado del nervio facial, el ganglio sensorial del glosofaríngeo y el vago, y la raíz dorsal de los ganglios de los nervios espinales. Tempranamente en la cuarta semana, un par de pliegues neurales se unen para formar el tubo neural. El mesodermo paraxial se segmenta para formar los somitas, y las células de las crestas neurales forman grumos que se corresponden con los somitas.

Inmediatamente después del cierre del neuroporo caudal del tubo neural llega caudalmente solo hasta el segundo par de somitas mesodérmicos. Los somitas remanentes, sacros y coccígeos, se diferencian desde el mesodermo paraxial durante la siguiente semana. Los niveles correspondientes del tubo neural se desarrollan desde la línea primitiva por un proceso conocido como neurulación secundaria. El cordón neural inicialmente sólido se canaliza por extensión caudal del canal neural (Kandel y Schwartz. 1995).

Cuando el desarrollo del sistema nervioso no se lleva a cabo adecuadamente surgen defectos como: La anencefalia (ausencia de los hemisferios cerebrales), es una consecuencia del defecto del proceso de neurulación en el sitio del neuroporo rostral (Figura 7). Las vesículas cerebrales son incapaces de desarrollarse sin presencia de un techo, y las neuronas inmaduras y las células gliales forman una excrescencia semejante a un hongo, que posteriormente tiene degeneración completa.

La mayor parte de los embriones anencefálicos se abortan espontáneamente. Si el embarazo continúa hasta terminar, muchos son óbitos (muertos antes de nacer); aquellos que nacen vivos rara vez sobreviven más de unas pocas horas. El cráneo del esqueleto no está presente y el tejido cerebral necrótico está expuesto.

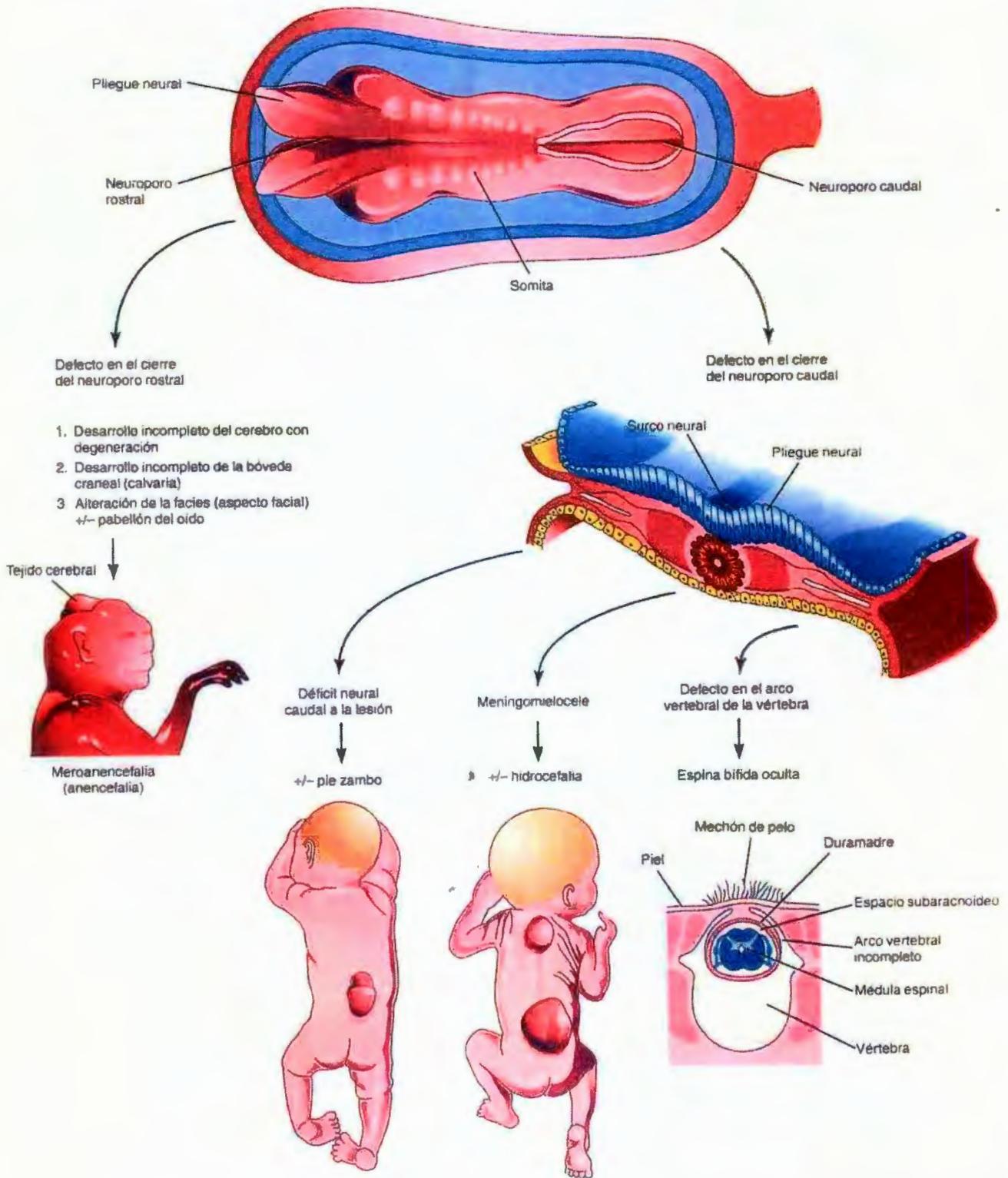


Figura 7. Esquemas que explican la base embriológica de los Defectos del Tubo Neural (DTN). La anencefalia resulta de un cierre defectuoso del neuroporo rostral y el meningocele depende del cierre defectuoso del neuroporo caudal. (Moore y Persaud, 1999)

La anencefalia es una de las malformaciones congénitas mortales más comunes. En diferentes partes del mundo la incidencia está entre uno y seis por 1000 nacimientos cerca del término o a término (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

La razón por la cual ocurre la anencefalia no es bien conocida; el defecto primario puede ser en el propio neuroepitelio, o en el mesodermo precordial que sostiene los pliegues neurales antes del cierre del neuroporo rostral durante la cuarta semana. La importancia del aporte dietético de ácido fólico en la prevención de los defectos del tubo neural está comprobado; lo ideal es que las mujeres ingieran complementos de ácido fólico durante su vida reproductiva, porque los DTN comienzan muy tempranamente, durante la segunda semana después de la ausencia del periodo menstrual.

La ocurrencia esporádica de microcefalia (cerebro pequeño) se atribuye a una mutación genética espontánea y es una causa significativa de defectos mentales serios. La microcefalia se atribuye a una detención prematura de la fase citogenética del desarrollo cerebral; la corteza cerebral muestra pocas circunvoluciones o ninguna (agiria).

Las células gliales radiales parecen ser sensibles al alcohol, el cual pasa libremente desde la sangre materna a la fetal. El efecto clínico más frecuente del consumo crónico de alcohol es el retardo mental, mismo que se hace aparente rápidamente en los primeros años postnatales. El efecto patológico común es la laminación imperfecta de la materia gris de la corteza cerebral, aparentemente por daño en las células gliales radiales.

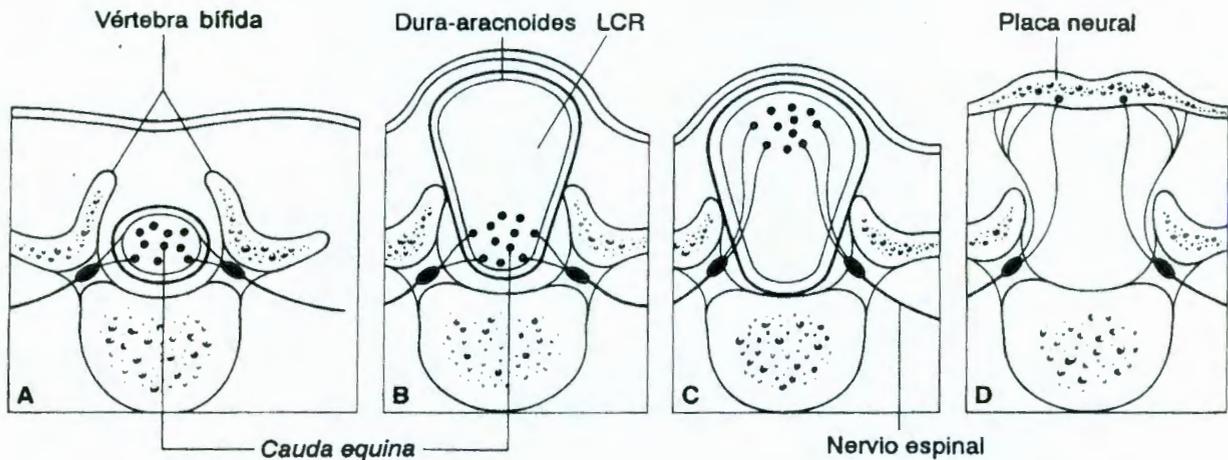


Figura 8. Variantes de espina bífida. A) Espina bífida oculta. B) Meningocele. C) Mielomeningocele. D) Mielocele. (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

El término “espina bífida” debe su origen al defecto de los arcos neurales de unirse por detrás de la médula espinal (Figura 8). Los elementos bífidos (separados) son los pares separados de láminas vertebrales. Este trastorno usualmente sucede en la región lumbosacral. En su modalidad más simple, el defecto se puede observar en un examen radiológico sistemático; esta es la llamada espina bífida oculta, una anomalía menor que ocurre en 1% de la población.

La espina bífida quística pertenece a un importante grupo de malformaciones clasificadas bajo el título general de: defectos del tubo neural (DTN). Los DTN incluyen algunas malformaciones mayores del cerebro especialmente la anencefalia (ausencia de los hemisferios cerebrales) y la hidrocefalia (agrandamiento de los ventrículos cerebrales causados por obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo). Se describen tres variantes de espina bífida. Cerca del 10% de los casos son meningoceles. En estos casos las meninges hacen protrusión como un quiste rodeado de piel intacta y el sistema nervioso usualmente no se lesiona; el restante 90% se constituye por meningomieloceles o mieloceles.

En el primero la médula espinal flota en el interior del quiste meníngeo y la piel que lo rodea es extremadamente delgada (Figura 9); la deficiencia neurológica en los miembros inferiores es la regla, junto con la incontinencia vesical y rectal. Además, la mayoría de los infantes con meningomieloceles tienen algún grado de hidrocefalia. En el mielocelo (también denominado raquisquisis) el tubo neural no pudo cerrarse en la región lumbar y el líquido cefalorraquídeo exuda desde una abertura a través del tejido neural; los miembros inferiores y los órganos pélvicos están paralizados y, finalmente, la muerte sobreviene por infección en el sistema nervioso o en el urinario.

Los DTN, con frecuente concurrencia de defectos cerebrales y espinales representan cerca del 10% de todas las malformaciones congénitas.

Los estudios epidemiológicos indican una ligera predisposición genética y una correlación significativa con la desnutrición. Una dieta normal o superior a la normal de ácido fólico aporta una protección significativa en la población susceptible (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).



**Figura 9.** Mielomeningocele. Fotografía de un caso de Mielomeningocele, como resultado del cierre defectuoso del neuroporo caudal. (Fitzgerald y Fitzgerald, 1997).

### III. HIPÓTESIS

El modelo de pollo es una herramienta útil en el estudio del efecto de sustancias químicas como la progesterona durante la neurulación.

## IV. OBJETIVOS

### GENERAL

Implementar el modelo de pollo para el estudio de sustancias químicas durante la neurulación y validarlo con el efecto de la progesterona.

### ESPECÍFICOS

- Precisar y reproducir las diferentes edades embrionarias de desarrollo del embrión de pollo.
- Explorar el efecto de la progesterona en distintos estadios del desarrollo.
- Conocer el intervalo de tiempo de incubación donde se observen los mejores resultados con la menor dosis.
- Aplicar distintas concentraciones de progesterona y realizar una gráfica dosis-respuesta.
- Evaluar el número de anomalías así como la clasificación de las mismas.
- Analizar estadísticamente los resultados.

## V. METODOLOGÍA

### V.1. MATERIALES.

Se trabajó con embriones de pollo libres de patógenos, como modelo biológico.

Lutoginestryl F de la empresa farmacéutica Hoeschst; contiene una formulación de 50 mg de progesterona con 5 mg de benzoato de estradiol, vehículo c.b.p. 1 mL.

Para el grupo blanco se utilizó Estrógenos (Benzoato de Estradiol) en solución inyectable Benzo-Ginestryl.

Se utilizó una incubadora para huevos de pollo, así como material de disección para la extracción del embrión del cascarón.

Para la observación de las características embrionales utilizamos un microscopio estereoscópico.

### V.2. MÉTODOS

Los embriones, se mantienen, a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

El experimento inicia al incubar el embrión a una temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$  y manteniendo una humedad relativa de 60-70%.

Al haber transcurrido 14 hrs. de incubación, el embrión estará en su ED 4, los embriones se extraen de la incubadora, al cascarón se le realizó un orificio pequeño con la ayuda de una aguja. Posteriormente se inoculan de acuerdo al grupo por medio de micro-jeringa administrando el compuesto a través del orificio previamente realizado. Al terminar el proceso de inoculación el cascarón se reselló con la ayuda de cinta adhesiva; y se reincubó para continuar el desarrollo del embrión. Esta etapa tiene una duración aproximada de 10 minutos para 30 huevos.

Los embriones control, se les realiza también el orificio, pero sin adicionar ningún compuesto y de la misma manera resellado con la cinta adhesiva, por lo que también permanecen el mismo tiempo fuera de la incubadora al igual que los tratados.

Trascurrido 45.5 hrs. se les retira la incubación a los embriones y se inicia de manera inmediata la extracción del embrión de su cascaron.

Utilizando unas tijeras de disección se abre el cascarón del huevo aproximadamente a la mitad, cuidando de no perder lo que es la yema. De esta forma la yema quedara expuesta y se podrá ubicar fácilmente al embrión dentro de su saco vitelino, el cual le da al embrión una protección que nos facilita la posibilidad de manejarlo, sin que este se fracture.

Con las micro-tijeras se procede a cortar una circunferencia rodeando el saco vitelino y recogiendo el embrión se coloca en una solución salina isotónica. Aquí se mantendrán para inmediatamente después observarlos al estéreomicroscopio.

A los embriones se les observo las diferencias fenotípicas contra los controles; y se reportaron las siguientes características observadas:

- número de somitas.
- longitud cráneo-caudal.
- longitud y ancho de la porción craneal.
- Medir la apertura del tubo neural.

### V.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con 6 grupos experimentales:

Grupo Control:

En este grupo se exploraron los cambios fenotípicos durante la neurulación de los embriones sin tratamiento.

Para conocer si la progesterona altera la expresión genética durante la neurulación se planearon experimentos con cuatro grupos problemas. Todos los grupos se mantuvieron a las mismas condiciones que el grupo control y fueron tratados con las siguientes concentraciones de progesterona:

Grupo Blanco:

Este grupo de embriones fueron tratados con 1.0 mg de benzoato de estradiol.

Grupo 1:

Los embriones fértiles fueron tratados con 2.5 mg de progesterona.

Grupo 2:

La concentración aplicada a los embriones fue de 3.75 mg de progesterona.

Grupo 3:

Se les administró a los embriones 5.0 mg de progesterona.

Grupo 4:

Se les administró 10 mg de progesterona a los embriones.

Finalmente, con la ayuda del microscopio estereoscópico se exploraron los cambios fenotípicos, observando la longitud cráneo-caudal, longitud craneal, y la apertura del tubo neural, así como el primordio óptico y ótico.

#### V. 4 MÉTODO ESTADÍSTICO

La cantidad de embriones manejados permite utilizar un estadístico z para comprobar la proporción de las alteraciones en los grupos de tratamiento contra los controles y establecer la significancia de la respuesta.

$$z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\hat{p}\hat{q}\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Donde:

- $p_1$  = Fracción de afectados en el grupo tratado
- $p_2$  = Fracción de afectados en el grupo control
- $p$  = Fracción total de afectados
- $q$  = Fracción total de no afectados
- $n_1$  = Población del grupo tratado
- $n_2$  = Población del grupo control

Las partes funcionales de esta prueba estadística son:

- el conjunto de hipótesis nula  $H_0$  ( $p_1 = p_2$ ) y alternativa  $H_a$  ( $p_1 \neq p_2$ ).
- el estadístico de la prueba
- la región de rechazo asociada

La región de rechazo para la  $H_0$  con un nivel de error  $\alpha = 0.05$  es  $z > 1.96$ . (Mendenhall y col., 1994).

La comparación de los tratamientos con respecto al control, no nos refleja cómo es el comportamiento de los mismos con relación a las poblaciones iniciales, utilizando la fórmula de Abbott podremos deducirlo (Ehab, 2002), lo que nos permite tomar en cuenta las alteraciones espontáneas que ocurren en los grupos control.

Para corregir el porcentaje de alteraciones respecto al control se utilizó la fórmula de Abbott. Esta corrección es utilizada en algunos procedimientos generales donde se mide el efecto de sustancias químicas en grupos tratados y se compara contra grupos control.

La formula de Abbott es:

$$\% A = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} * 100$$

En donde:

% A = Porcentaje de alteración corregida

$m_e$  = alteración en el tratamiento

$m_b$  = alteración en el control

## VI. RESULTADOS

Los experimentos para conocer y comparar las diferentes edades embrionarias indican que la longitud cráneo-caudal y el número de somitas fueron los más representativos y se estudiaron para las distintas edades en un total de 252 embriones (Cuadro 1). En la Figura 10 se presenta un embrión normal de estadio 13 a 25X, en el que se observa el desarrollo de los primordios: óptico, ótico y cardiaco.

Cuadro 1. Parámetros de las edades embrionarias. Los parámetros que identificaron las diferentes edades embrionarias fueron: longitud cráneo-caudal y el número de pares de somitas por estadio en 252 embriones. Se muestra el promedio con el error estándar.

<b>Estadio</b>	<b>LCC (mm)</b>	<b>Pares de Somitas</b>
ED10	4.14 ± 0.17	7.00 ± 0.53
ED11	4.21 ± 0.10	10.85 ± 0.14
ED12	4.47 ± 0.12	10.93 ± 0.28
ED13	4.80 ± 0.04	13.75 ± 0.16
ED14	5.68 ± 0.09	17.10 ± 0.45
ED15	6.00 ± 0.24	17.50 ± 0.60

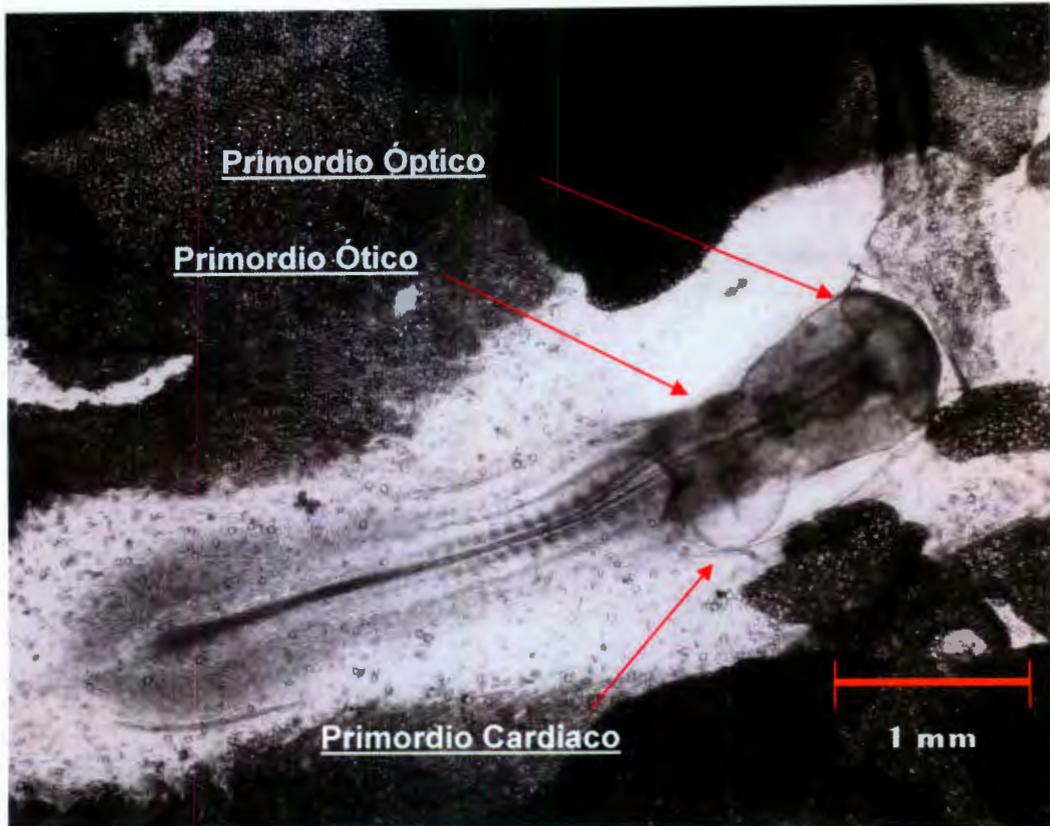


Figura 10. Embrión normal de ED 13 (25X). Se observan e indican los primordios cardíaco, óptico y ótico. El embrión tiene una longitud cráneo-caudal de 5 mm y 15 pares de somitas visibles.

En el grupo control se estudiaron un total de 132 embriones en 12 experimentos, los resultados observados indican una media de  $11.00 \pm 1.51$  ee para embriones totales,  $9.00 \pm 1.52$  ee en embriones normales,  $1.33 \pm 0.22$  ee de embriones anormales,  $0.66 \pm 0.22$  ee para resorciones y  $2.00 \pm 0.24$  ee en la suma de embriones anormales más resorciones (Figura 11).

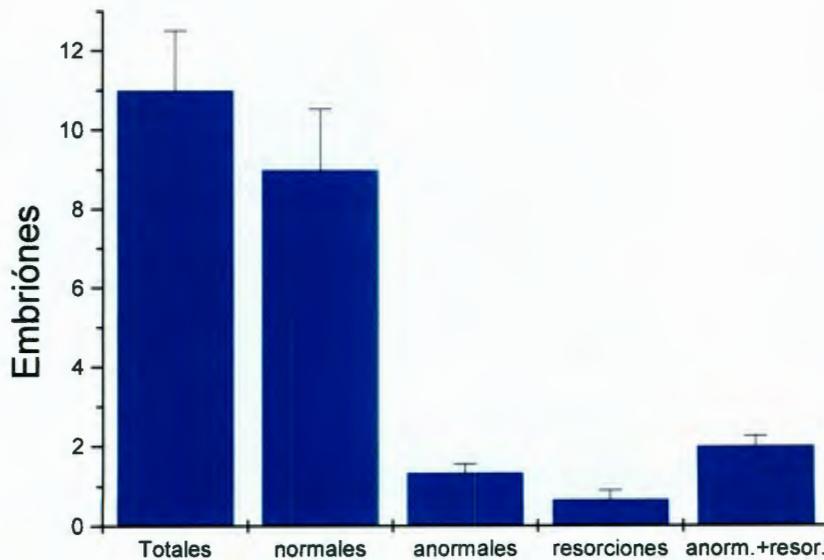


Figura 11. Grupo Control. En el eje de las abscisas se presentan los diferentes embriones estudiados y en el eje de las ordenadas el número promedio de cada clase.

La progesterona administrada en los embriones de pollo se encontraba en combinación con benzoato de estradiol, por lo que se trabajó un grupo blanco al que se le administró la concentración de este compuesto equivalente a la máxima dosis con la que se trató a los embriones de pollo, el cual corresponde a 1.0 mg de benzoato de estradiol. Este grupo se estudió con la finalidad de descartar que los efectos resultantes fueran por efecto del benzoato de estradiol.

En el grupo blanco se inoculó una concentración de 1.0 mg de benzoato de estradiol que corresponde a la dosis administrada de esta droga en el grupo tratado con la concentración mayor de progesterona. Los resultados del estudio de 41 embriones en 3 experimentos, indican una media de  $13.66 \pm 1.2$  ee para los embriones totales,  $8.66 \pm 2.02$  ee para embriones normales,  $4.33 \pm 1.33$  ee de embriones anormales,  $0.66 \pm 0.33$  ee de resorciones y para anormales mas resorciones  $5.0 \pm 1.52$  ee. En la Figura 12, se observa que al comparar con los controles existe diferencia significativa en las anomalías y en la suma de anomalías mas resorciones ( $P > 0.05$ ). Indicándonos que hay relación entre el benzoato de estradiol y las anomalías encontradas.

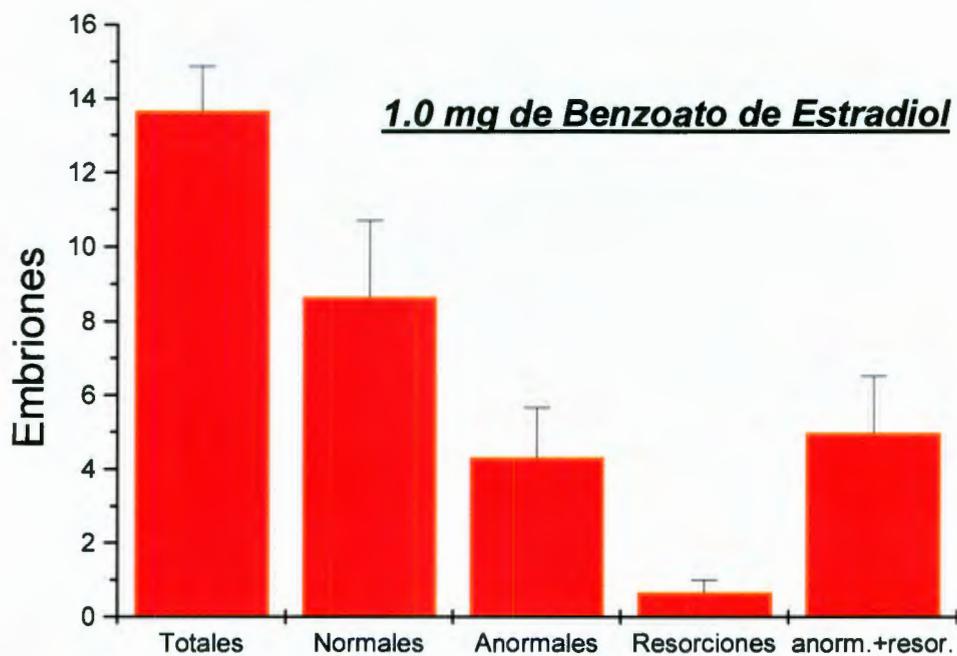
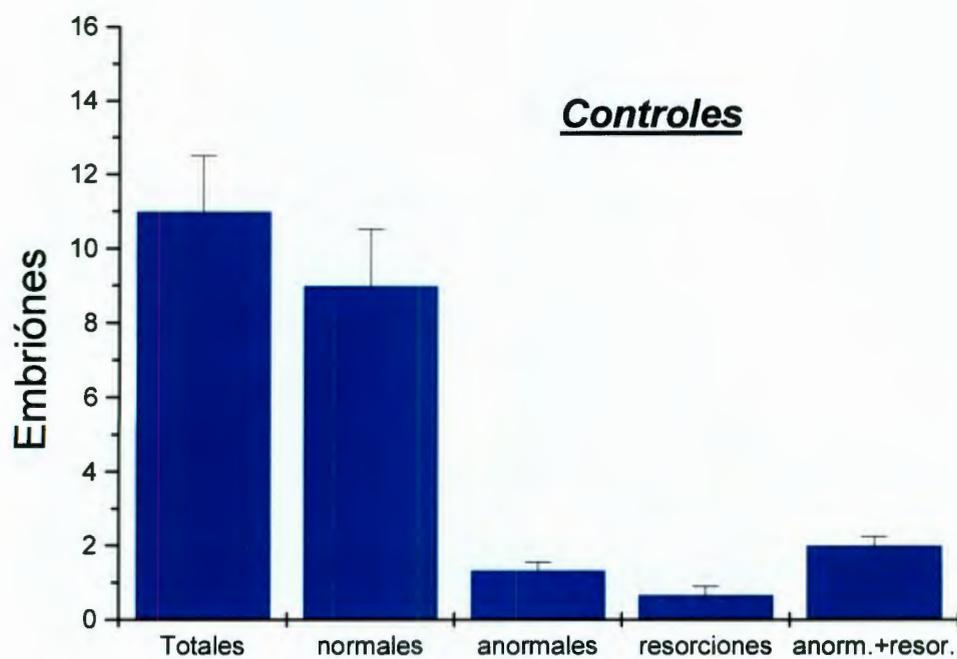


Figura 12. Grupo Blanco. En la gráfica se presentan los resultados del grupo de embriones tratados con 1.0 mg de benzoato de estradiol. Nótese el efecto del estradiol sobre el número de embriones anormales.

En el análisis estadístico al comparar las medias poblacionales del grupo blanco con el grupo de progesterona que corresponde a la misma concentración de estradiol del blanco, encontramos que no existe diferencia significativa.

Al comparar los resultados del grupo blanco con los del grupo control se observa un incremento en las anomalías. Entre las anomalías observadas podemos indicar la aplasia generalizada y malformación de los primordios óptico, ótico y cardíaco. La aplasia generalizada, como se observa en la Figura 13, corresponde a un embrión con la LCC menor de la mitad a la normal a su estadio.

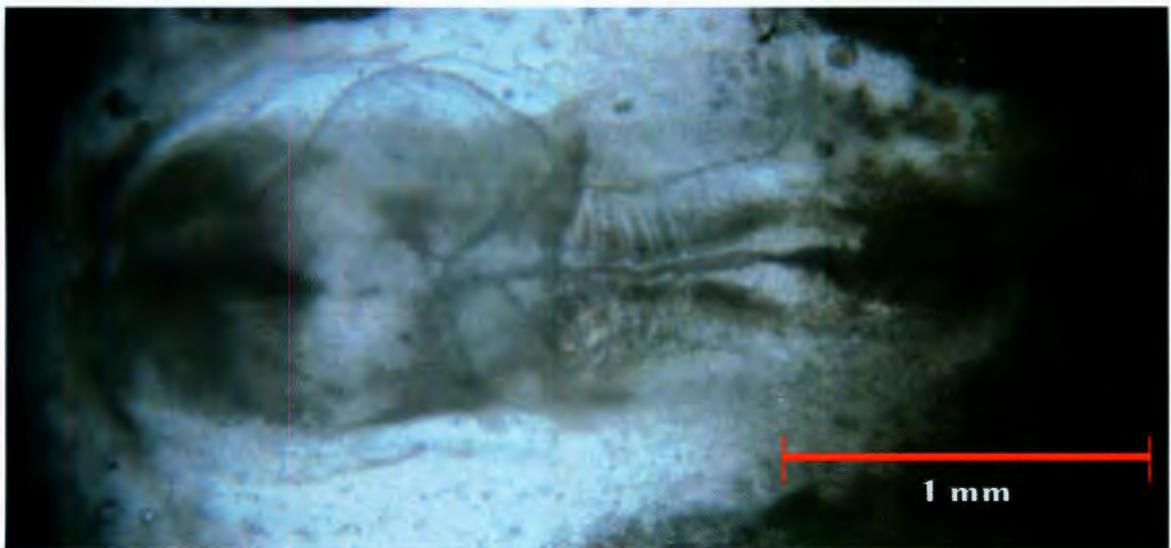


Figura 13. Aplasia generalizada. Obsérvese que el embrión presenta parámetros anormales, como son la ausencia de los primordios cardíaco, ótico y óptico, así como la LCC mas corta de la longitud normal del estadio.

Para comparar el efecto de la progesterona, realizamos experimentos inyectando 2.5 mg de progesterona combinada a 49 embriones. De estos embriones analizados se obtuvo un promedio de  $12.25 \pm 0.75$  ee para embriones totales,  $9.75 \pm 1.03$  ee de embriones normales,  $2.0 \pm 1.22$  ee para embriones anormales,  $0.5 \pm 0.5$  ee de resorciones y para anormales mas resorciones  $2.5 \pm 1.04$  ee (Figura 14). Al comparar estadísticamente este grupo con los controles, encontramos que no existe diferencia significativa.

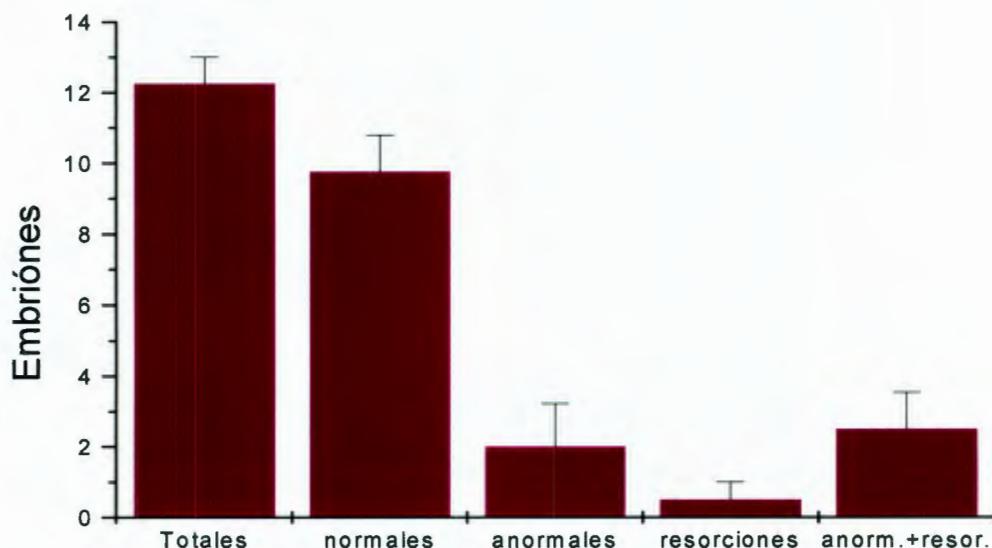


Figura 14. Grupo Progesterona 2.5 mg. La gráfica presenta los resultados de los embriones a los cuales se les administró 2.5 mg de progesterona.

En el grupo con una concentración de progesterona de 3.75 mg, la cual se les administró a un total de 47 embriones en 4 experimentos, los resultados indican una media de:  $11.75 \pm 0.47$  ee para embriones totales,  $8.5 \pm 1.25$  ee de embriones normales,  $2.25 \pm 0.47$  ee para embriones anormales,  $1.0 \pm 0.40$  ee de resorciones y para anormales más resorciones  $3.25 \pm 0.85$  ee. Como se observa en la Figura 15 existe un incremento en los embriones afectados. Al comparar el experimento estadísticamente con los controles no se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

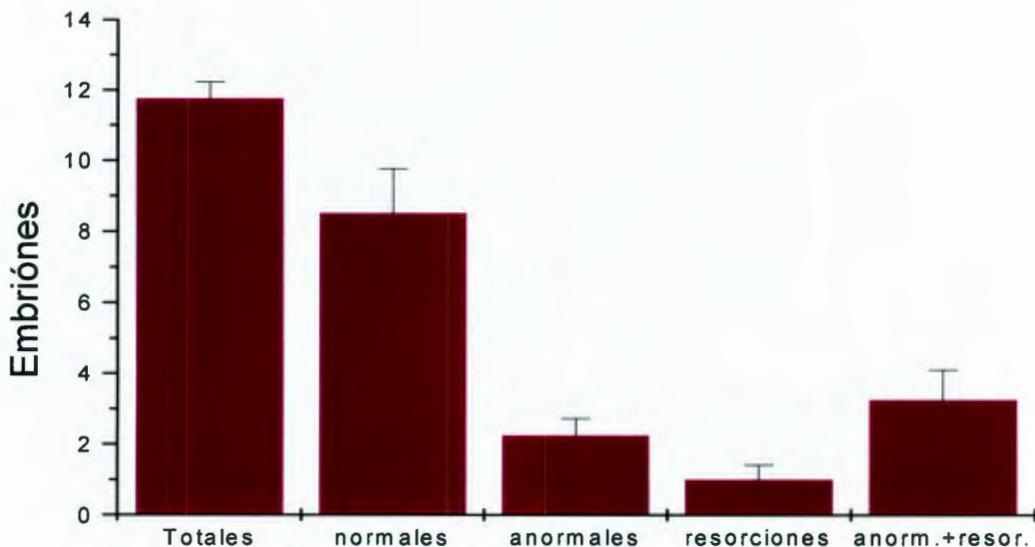


Figura 15. Grupo Progesterona 3.75 mg. Los resultados indican un aumento en la relación dosis-respuesta. Nótese que hay un incremento del número de embriones anormales.

En la Figura 16 se ilustra una fotografía de un embrión en ED 13, el cual no presenta primordios óptico y ótico, por efecto del tratamiento administrado.



Figura 16. Deficiencia en la formación de los primordios. Fotografía de un embrión de ED 13 tratado, obsérvese la deficiencia de los primordios óptico y ótico.

En el siguiente grupo experimental se aplicaron 5.0 mg de progesterona, se realizaron 4 experimentos, analizando un total de 55 embriones. El experimento indicó una media de  $13.75 \pm 1.49$  ee para embriones totales,  $9.0 \pm 1.58$  ee de embriones normales,  $3.75 \pm 0.85$  ee para embriones anormales,  $1.0 \pm 0.40$  ee de resorciones y para anormales mas resorciones  $4.75 \pm 1.03$  ee (Figura 17). Al comparar estadísticamente este experimento con los controles ( $P < 0.05$ ), existe una diferencia significativa, sugiriendo la relación entre las anomalías encontradas y la progesterona.

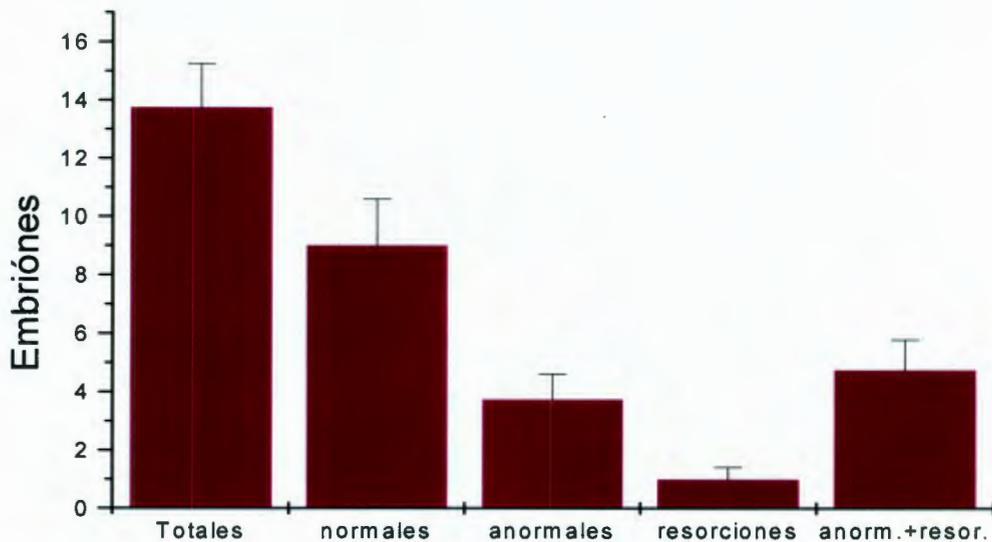


Figura 17. Grupo Progesterona 5.0 mg. Los resultados del grupo presentan un incremento notable en las anomalías.

En la Figura 18 se muestra dos fotografías de resorciones encontradas en los experimentos. Las resorciones se encontraron en todos los grupos con tratamiento y los grupos controles.

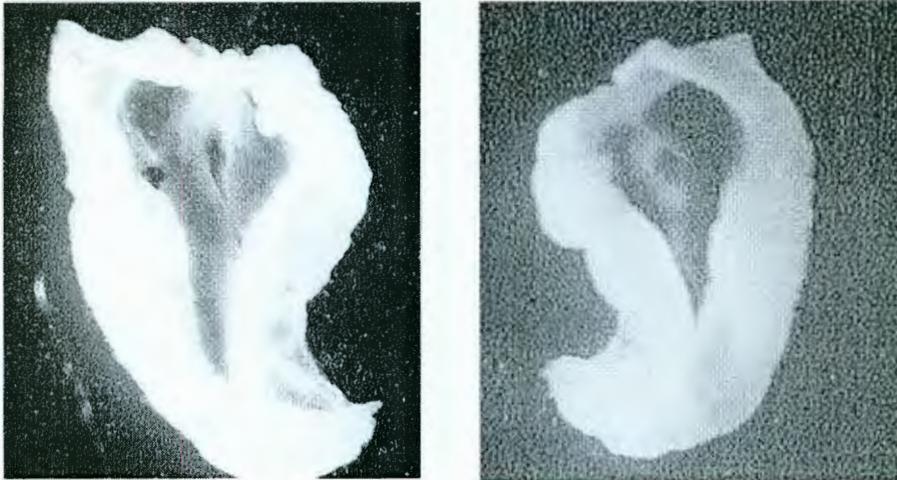


Figura 18. Resorciones. Fotografías de dos resorciones, provocada por la administración de progesterona.

En el experimento siguiente se duplicó la dosis administrada en el experimento anterior, administrando 10 mg de progesterona a 46 embriones, estos embriones fueron analizados en 4 experimentos. Dando como resultado una media para embriones totales de  $11.5 \pm 0.5$  ee, en embriones normales  $5.5 \pm 0.28$  ee, para embriones anormales  $5.25 \pm 0.25$  ee, en las resorciones de  $0.75 \pm 0.25$  ee y para anormales más resorciones  $6.0 \pm 0.40$  ee. Al comparar los resultados de este experimento con los controles ( $P < 0.05$ ), encontramos que existe diferencia significativa en los embriones anormales (Figura 19).

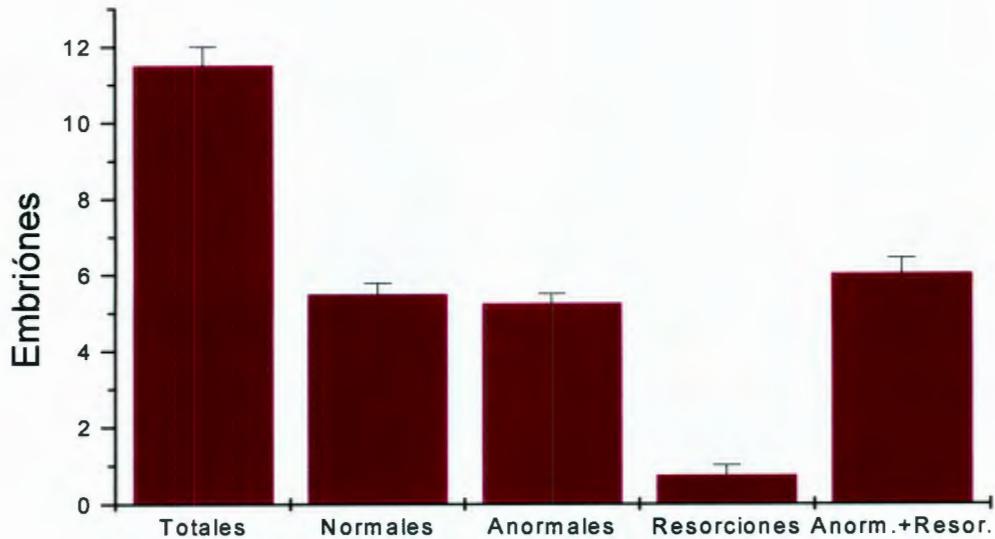


Figura 19. Grupo Progesterona 10.0 mg. Obsérvese el amplio impacto que ejerce el fármaco sobre el desarrollo normal del embrión.

La Figura 20 corresponde a un embrión que presenta anencefalia, una de las mayores anomalías encontradas en los experimentos.



Figura 20. Anencefalia. Nótese la ausencia en la formación de vesículas cerebrales.

La comparación entre la dosis administrada y la respuesta sin la corrección de Abbott se ilustra en la Figura 21 donde en el eje de las abscisas se encuentran los diferentes experimentos estudiados y en el eje de las ordenadas el porcentaje de embriones encontrados en cada clase.

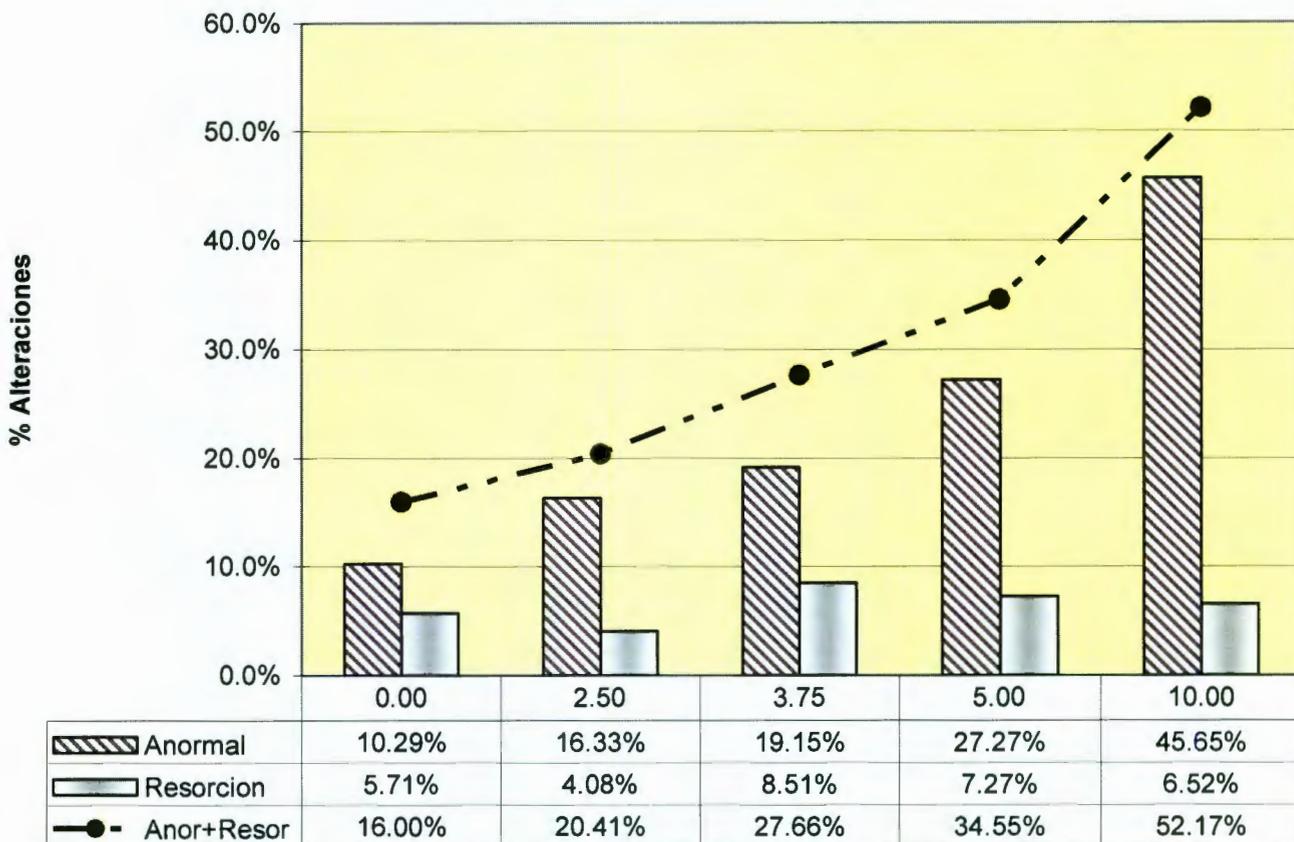


Figura 21. Relación Dosis–Respuesta. En la grafica se presentan los porcentajes entre la dosis administrada y el resultado observado. Obsérvese como el incremento de anomalías es proporcional a la dosis administrada.

Al realizar la corrección de Abbott observamos un claro aumento en las anomalías de acuerdo a la dosis (Figura 22). Obsérvese que el porcentaje de resorciones se mantiene a pesar de los tratamientos.

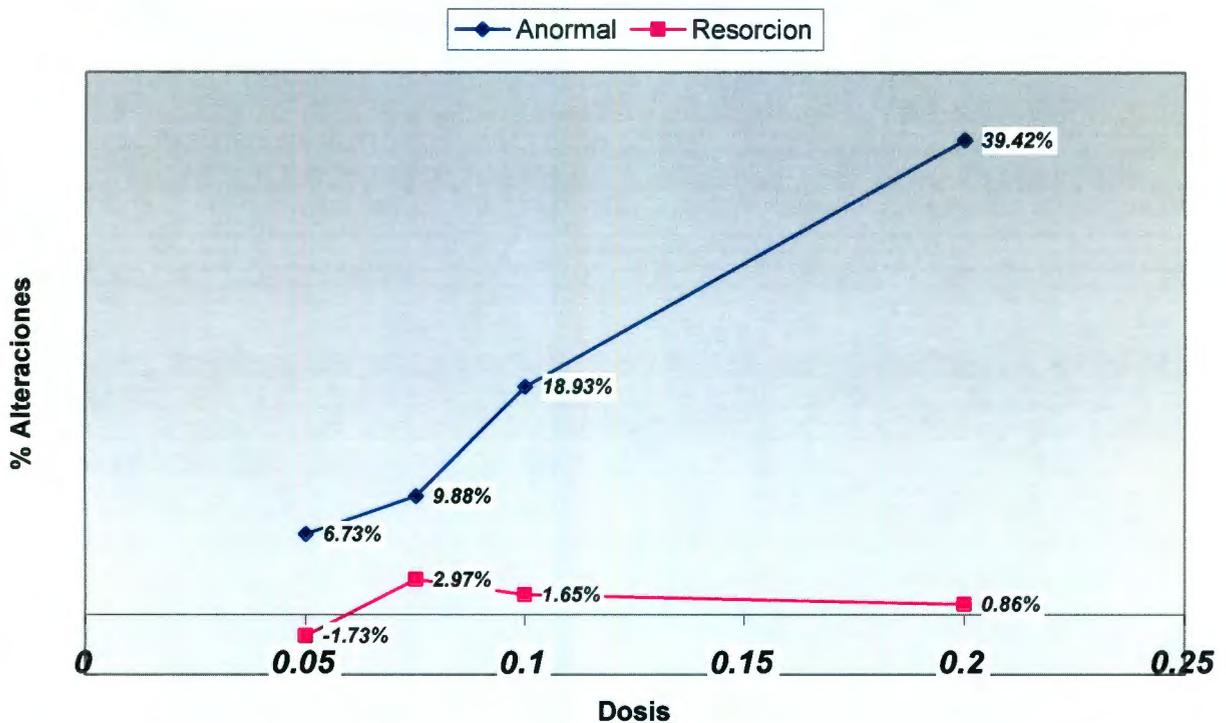


Figura 22. Relación dosis-respuesta con corrección de Abbott. Es considerable el efecto de la corrección de Abbott, ya que disminuye el porcentaje natural de anomalías.

Analizando las anomalías encontramos que se presentó con mayor frecuencia la anencefalia. Le siguieron las alteraciones a los primordios óptico y ótico, estos primordios fueron característicamente siempre afectados en los embriones tratados. También se presentaron anomalías como aplasia generalizada y microcefalias (Figura 23).

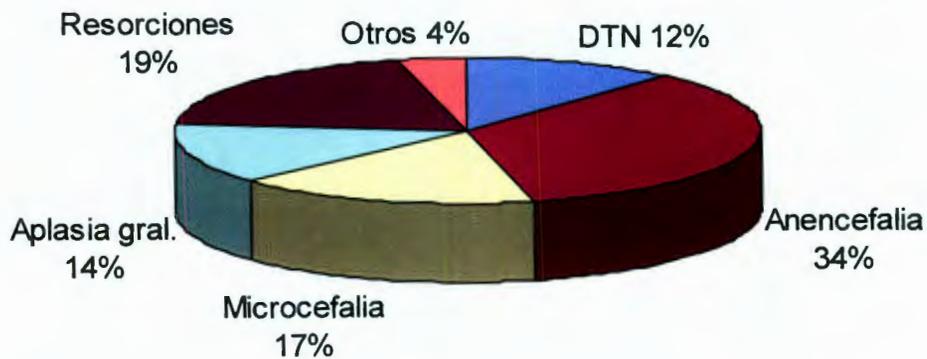


Figura 23. Anomalías observadas. Se indican los diferentes porcentajes de las anomalías encontradas en todos los experimentos. Nótese como la anomalía más común es la anencefalia, siguiéndole las resorciones.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo embrionario y la susceptibilidad a los teratógenos se modifican en horas, por lo que era indispensable comprobar los cambios morfológicos de los embriones en relación a los tiempos de incubación en el laboratorio, los resultados obtenidos son consistentes con el reporte clásico para el desarrollo de embriones de pollo reportado por Hamburguer y Hamilton, 1951.

En los experimentos realizados para conocer el efecto en el desarrollo embrionario debidos a la metodología empleada se realizó un pequeño orificio en el cascarón, los resultados obtenidos en este trabajo no difieren del grupo control y fueron consistentes con los publicados por Fisher y Schoenwolf, 1983; Mann y Persaud, 1978, reportan que el procedimiento del orificio en etapas tempranas, aumenta la frecuencia y la severidad de las anormalidades; tales efectos son eliminados al sellar con cinta adhesiva la pequeña ventana.

En el grupo control se encontró el 1% de anormalidades en los embriones que pueden explicarse por modificaciones en la expresión genética debidas a mutaciones de cambio de sentido originadas espontáneamente por una posible falla en la función de las enzimas polimerasas que participan durante la replicación del ADN, un cambio así puede originar la pérdida de función de un gen (Griffiths, 2000). Otra posibilidad es que al manipular el embrión pudiera participar otro factor como los iones de tipo calcio en la modulación de la expresión genética, mismos que pudieran desprenderse de la parte interna del cascarón. No obstante las razones antes mencionadas, las anormalidades en los embriones de este grupo son muy bajas por lo que este modelo puede utilizarse para comparar los resultados entre los grupos controles y los tratados.

El compuesto utilizado para la realización de estos experimentos fue una mezcla de estrógeno y progestágeno, por lo que era indispensable conocer el efecto de dichos químicos durante la neurulación. En el grupo blanco tratado con estrógenos se

encontró una diferencia significativa al compararlo con el grupo control, estos resultados nos indican que los estrógenos se unieron a sus receptores nucleares y participaron en la expresión de genes como los tipo Fos y Jun que intervienen en estas etapas tempranas del desarrollo y modificaron su expresión genética.

Los grupos tratados con progesterona presentaron un incremento dosis dependiente en las anormalidades observadas dichos efectos biológicos pueden asociarse a un incremento en la síntesis de ARN y proteínas. Los esteroides del tipo progesterona entra a la célula por difusión pasiva mediada por proteínas transportadoras y se unen a receptores citosólicos y nucleares específicos, los cambios observados pueden deberse a que el receptor experimenta un cambio alostérico de conformación convirtiendo el complejo receptor de una forma inactiva a una forma activa. La activación del complejo receptor tiene una alta afinidad por secuencias específicas nucleares, estos tienen características de los elementos clásicos del reforzador. La unión del complejo hormona-receptor da lugar típicamente a la activación genética e incrementa la síntesis de mRNA que se traslada a los ribosomas citoplasmáticos de tal modo que aumenta la síntesis de proteínas, las cuales pueden modificar las funciones celulares, crecimiento y/o diferenciación. Otra posibilidad es que el complejo hormona-receptor pueda actuar como represor de genes normales lo que puede originar una deficiencia proteica (enzimática) que puede asociarse a modificación de la expresión genética por disminución de enzimas que participan durante el proceso de neurulación.

Los resultados de este trabajo pueden asociarse a dos mecanismos que participan en la función del complejo hormona receptor: El primero, ligando dependiente consiste en la unión de la hormona al ligando LBD. El segundo mecanismo es ligando independiente y es resultado de la integración de otras vías de señalización, usualmente receptores de membrana que resultan en la activación de las cinasas y la fosforilación de los receptores (De Mayo y col. 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan diferencia estadística solo en la dosis más alta administrada y difieren de los obtenidos en rata por Sarabia y García-Alcocer en 2002, una probable explicación para esto es que de acuerdo a Mathews, 1998, los progestágenos son las precursoras de todas las demás hormonas esteroideas, entre ellas los estrógenos y en el modelo de embriones de pollo no se tiene la activación metabólica para llevar a cabo esta modificación química, por lo que sugerimos que la progesterona en rata al pasar por el hígado fue metabolizada hasta ser transformada en estrógenos y de esta forma causar tal daño a los productos analizados en rata. Con lo anterior se propone que el efecto de la progesterona en el desarrollo embrionario es débil comparada con los estrógenos, esta explicación puede relacionarse con los datos obtenidos en diferentes animales como la rata, el hámster, el conejo y el perro en los que se sugiere un efecto tóxico leve producidos por la progesterona, como disminución del peso corporal, alteraciones hepáticas y ovarios agrandados, así como atrofia de testículos y vesícula seminal (Maier y col., 2001). Por otro lado autores como Seegmiller y col. 1983 sugieren que la progesterona tiene efectos fetotóxicos.

En el grupo de 10 mg de progesterona se obtuvo un incremento tanto en anomalías como en resorciones, estos resultados sugieren que el efecto de los estrógenos más la progesterona presentan alteración en la expresión genética que se ve incrementada por lo que el número de receptores nucleares que unen estrógenos puede ser diferente al de progesterona y en caso de ser el mismo se propone que no está saturado a las concentraciones utilizadas en este trabajo. Otra posibilidad del efecto de la progesterona puede estar asociada al efecto clastogénico que se ha reportado para la progesterona en estudios in vitro de cultivo de linfocitos humanos en los que se sugiere que esta hormona puede causar daño estructural a los cromosomas. Estos daños se caracterizan por un incremento en el intercambio entre cromátidas hermanas como: aberraciones cromosómicas y algunas aneuploidías (Maier y col., 2001).

Es importante continuar el estudio del efecto teratogéno de los diferentes tipos de progestágenos para precisar la información reportada en la literatura en la que Katz y col. 1985, no reportaron diferencia significativa en anormalidades y embriotoxicidad en humanos y por otro lado Carbone y col. en 1990 proponen que hay embrioletalidad pero no malformaciones.

## VIII. CONCLUSIONES

1. El modelo de embriones de pollo es importante en los estudios de teratogénesis porque se obtuvieron resultados consistentes en los diferentes grupos estudiados.
2. Los estrógenos inducen efecto teratígeno en embriones de pollo.
3. La progesterona presenta un efecto dosis dependiente.
4. Las anomalías en los embriones tratados con progesterona y estrógenos son las mismas e independientes de la dosis.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

**Alberts, B., Dennis, G., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1998.** *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Garland Publishing, Inc. New York y Londres: 403-467.

**Carbone, J.P., Figurska, K., Buck, S. y Brent, R.L. 1990.** Effect of gestational sex steroid exposure on limb development and endochondral ossification in the pregnant C57Bl/6J mouse: I. Medroxyprogesterone acetate. *Teratology*: 42(2):121-30.

**Colas, J. F. y Schoenwolf G. C. 2001.** Towards a Cellular and Molecular Understanding of Neurulation. *Developmental Dynamics*: 221. 117-145.

**DeMayo, F. J., Zhao, B., Takamoto N. y Tsai S. Y. 2002.** Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone. *Annals of the New York Academy Of Sciences*: 955.

**Ehab, B. 2002.** <http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm>

**Fisher, M. y Schoenwolf, G. C. 1983.** The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. *Teratology*: 27. 65-72.

**Fitzgerald, M.J.T. y Fitzgerald, M. 1997.** *Embriología Humana*. Manual Moderno, México: 31-35, 56-58, 65-70, 80-82, 223-232, 241-244.

**Flores, J. y Amado J. A. 1997.** *Farmacología Humana*. Ed. Masson, S.A. España: 875-879

**Goodman y Gilman. 1996.** *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Mc. Graw Hill Interamericana, México: 1514-1518.

**Griffiths**, J. F. A., Gelbart, W. M., Miller, J. H. y Lewontin, R. C. **2000**. Genética Moderna. Primera edición. Mc Graw Hill Interamericana, España: 450-452

**Guyton**. **1997**. Tratado de Fisiología Medica. Novena edición. McGraw Hill Interamericana, México: 1011, 1015-1016, 1121-1124, 1138-1339.

**Hamburguer**, V. and Hamilton H. L. **1951**. A series of normal stages in the development of the chick embryo J. Morphol: 88: 49-92.

**Hendrickx**, A.G., Korte, R., Leuschner, F., Neumann, B.W., Poggel, A., Binkerd, P., Prahalada, S. y Gunzel, P. **1987**. Embryotoxicity of sex steroidal hormones in nonhuman primates: II. Hydroxyprogesterone caproate, estradiol valerate. Teratology: 35(1):129-36.

**Kandel**, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. **1995**. Essentials of neural science and behavior. Primera edición. Lange y Appleton.

**Katz**, Z., Lancet, M., Skornik, J., Chemke, J., Mogilner, B.M. y Klinberg, M. **1985**. Teratogenicity of progestogens given during the first trimester of pregnancy. Obstet Gynecol: 65(6):775-80.

**Maier**, W. E. y Herman, J. R. **2001**. Pharmacology and Toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. Toxicology and Pharmacology: 34: 53-58.

**Mann**, R. A. y Persaud, T. V. **1978**. Teratogenic effect of windowing eggs at early stages of avian development. Experimental Pathology: 15: 324 - 334.

**Mathews**, C. K. y Van Holde, K. E. **1998**. Bioquímica. Segunda edición. Mc Graw Hill Interamericana, España: 756-759

- Mendenhall, W., Wackerly, D y Scheaffer, R. 1994.** Estadística matemática con aplicaciones. Grupo editorial Iberoamericana. Segunda edición. México: 399-440.
- Moore, K. L y Persaud T. V. N. 1999.** Embriología clínica. Editorial McGraw Gill. Sexta edición. México: 478 – 516.
- Sadler, T. W. 2001.** Langman Embriología médica con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana. Octava edición. España: 30 – 153.
- Sarabia, A. G. y García-Alcocer, M. G. 2002.** Modificación de la expresión genética durante la Neurulación en embriones de rata por efecto de la progesterona. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.
- Seegmiller, R.E., Nelson, G.W., Johnson, C.K. 1983.** Evaluation of the teratogenic potential of delalutin (17 alpha-hydroxyprogesterone caproate) in mice. *Teratology*: 28(2):201-208.
- Wilson, J.G. y Brent, R.L. 1981.** Are female sex hormones teratogenic?. *Am J Obstet Gynecol*: 141(5):567-580.