

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TARTRAZINA EN EL PROCESO DE
NEURULACIÓN DE EMBRIONES DE POLLO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DEYANIRA AIDÉ RAZO SORIA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUÁDALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H59065

No. Título _____

Clas TS

636.08495

R278c



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TARTRAZINA EN EL PROCESO
DE NEURULACION DE EMBRIONES DE POLLO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DEYANIRA AIDÉ RAZO SORIA

DIRIGIDA POR

Dr. MARÍA GUÁDALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MARÍA GUÁDALUPE GARCIA ALCOCER
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

Q.F.B. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIERREZ
SINODAL

Q.F.B JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA
SINODAL

ÍNDICE

Contenido	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE FIGURAS	ii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Tartrazina	2
II.2 Antecedentes toxicológicos	3
II.3 Regulación de la expresión genética	9
II.4 Desarrollo del sistema nervioso	11
II.5 Teratogénesis	14
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
IV.1 General	17
IV.2 Específicos	17
V. METODOLOGÍA	18
V.1 Materiales	18
V.2 Métodos	18
V.2.1 Métodos biológicos	18
V.3 Diseño experimental	20
V.4 Método estadístico	21
VI. RESULTADOS	24
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Azocompuestos y sus metabolitos	5
2	Patrones de expresión de genes que regulan la diferenciación del somita	13
3	Gráfica de embriones normales	24
4	Embrión normal en estadio 13 2.5X	25
5	Gráfica de embriones anormales	26
6	Aplasia generalizada más DFV en estadio 13 2.5X	27
7	Embrión con DFV en estadio 13 2.5X	28
8	Gráfica de resorciones	29
9	Embrión que sufrió una resorción en estadio 13 2.5X	30
10	Gráfica de corrección de Abbott.	31

RESUMEN

La tartrazina más comúnmente conocida como amarillo número 5, es un colorante de la familia de los azocompuestos empleado como aditivo en alimentos, bebidas y como excipiente en numerosos medicamentos. Los metabolitos de tartrazina son sustancias reactivas con alto poder carcinogénico. En este trabajo se estudió el efecto embriotóxico de la tartrazina en embriones de pollo. Los efectos embriotóxicos pueden deberse a que el químico actúe sobre procesos moleculares y bioquímicos que pudieran conducir a una disminución en la proliferación celular. En los vertebrados, el inicio de la gastrulación, es un período muy sensible a las agresiones de las sustancias embriotóxicas que pueden clasificarse como: agentes infecciosos; agentes físicos y agentes químicos como la tartrazina. Los efectos embriotóxicos de la tartrazina son poco conocidos, por lo que en este trabajo se utilizó como modelo los embriones de pollo. Los resultados indicaron una diferencia significativa en las anomalías encontradas en los embriones tratados comparados con el control.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario es un proceso complejo que involucra la activación de muchos genes, para llevar a cabo la síntesis de las proteínas específicas que han de formar el animal completo y bien diferenciado. Los efectos teratógenos de las sustancias químicas son más claros durante el desarrollo temprano del sistema nervioso, cuando se está llevando a cabo la neurulación. La tartrazina es un colorante utilizado como aditivo de alimentos y los estudios acerca de su efecto teratógeno no son concluyentes, por lo que es necesario realizar estudios en donde se exploren sus efectos embriotóxicos y embriolétales. En este trabajo se usará como modelo los embriones de pollo, que permiten llevar a cabo estudios con condiciones controladas, que son muy importantes para la confiabilidad de los resultados. Los embriones libres de patógenos se incubarán y se les inoculará el químico para posteriormente estudiar sus efectos tóxicos. La gastrulación puede verse interrumpida por procesos teratógenos o por causas genéticas. En este caso, las lesiones presentadas, pueden ocasionar defectos en el disco germinativo, lo cual ocasiona deficiencias en la línea craneofacial, prosencéfalo pequeño y ventrículos laterales fusionados. También provoca formación deficiente del mesodermo, tejido que más adelante contribuirá a la formación de extremidades. dichas lesiones serán localizadas en el modelo experimental de este trabajo, el cual consiste en la relación del consumo del colorante azoico, tartrazina con alteraciones genéticas que conducen al desarrollo deficiente del tubo neural en embriones de pollo.

II. ANTECEDENTES

II.1 Tartrazina.

La tartrazina es conocida como amarillo FD&C Núm. 5; Está certificado como un colorante artificial, usado en comidas, drogas y cosméticos. El FD&C amarillo Núm. 5 (tartrazina) es la sal trisódica principal del 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-4-[4-sulfofenil-azo]-1H-pirazol-3-ácido carboxílico. Para la fabricación del aditivo, el ácido 4-aminobencensulfónico es diazotizado usando ácido clorhídrico y nitrito de sodio. El diazocompuesto se acopla con 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-1H-pirazol-3-ácido carboxílico o con metil- ester, etil- éster o la sal del ácido carboxílico, el colorante resultante, es purificado y aislado, así como la sal de sodio (Balbani y col., 2006).

El código general de la federación, en 1969 sección 74.705, aprobó el uso del azo compuesto tartrazina como colorante de alimentos en general, sujeto en banda de certificación. Entre los años 1985 y 1994 su uso fue restringido a fármacos que solamente fueran aplicados de manera externa no incluyendo el área de los ojos.

Para la prescripción de drogas para seres humanos administradas vía oral, nasal, vaginal o rectal, la etiqueta del producto requiere una leyenda, “este producto contiene FD&C amarillo Núm. 5 (tartrazina) que puede causar reacciones alérgicas, (incluyendo asma bronquial) en personas susceptibles”. Esta leyenda debe aparecer en la sección de precaución, de la etiqueta (Balbani y col., 2006).

Debido a que las reacciones alérgicas que presenta una persona a FD&C amarillo Núm. 5 (tartrazina) son muy bajas, es frecuente ver a personas que también son sensibles al ácido acetilsalicílico, presentar hipersensibilidad a tartrazina (Kasper y col., 2005).

II.2 Antecedentes toxicológicos

La tartrazina fue estudiada para comprobar las sospechas de que la urticaria y el angioedema estaban relacionados con el consumo de tartrazina por personas hipersensibles, los resultados indicaron que solamente el 1% de la población analizada presentó reacciones desfavorables después de consumir 5 mg de tartrazina (Nettis y col., 2003).

Los efectos tóxicos de los azocompuestos, pueden deberse a sus metabolitos (Figura 1), los cuales pueden asociarse a episodios agudos de asma, sin embargo se ha suscitado controversia acerca de la frecuencia con que la tartrazina y otros colorantes puedan ser los causantes de reacciones cruzadas en personas asmáticas (Kasper y col., 2005).

El estudio de mutagenicidad realizado con microsomas hepáticos homogenizados de ratas macho Sprague-Dawley para observar las curvas dosis-respuesta en *Salmonella typhimurium* demostró que muchos de los colorantes que se creían inocuos, producen metabolitos que tienen alto poder mutagénico y teratogénico; obteniendo rangos de 1-1000 y 5-5000 μg de dosis máxima, por lo que se consideraron mutagénicos los colorantes que sobrepasaron esta concentración más de dos veces (King - Thom y col., 1981).

Se ha reportado que los efectos tóxicos del consumo de azocompuestos se asocian a las cantidades ingeridas tanto en la comida como en las bebidas que los contienen, por alteración de etiquetas en países como la India, en los que la ingesta se encuentran por encima de los estándares fijados por la FDA (7.5 mg/Kg de peso corporal en humanos) (Rao y col., 2004).

Los estudios del efecto teratogéno del amarillo Núm. 5 fueron evaluados en ratas Osborne-Mendel dentro del segundo trimestre de gestación; en los que no se encontraron evidencias significativas de sus efectos, sin embargo, en algunas de ellas se observaron cambios en el esqueleto (Collins y col.,1992).

El estudio de toxicidad de la tartrazina durante la reproducción y neurocomportamiento se llevó a cabo en ratones a los que se les administró 83, 259, 773 mg/Kg/día, los resultados indican algunos efectos adversos en el neurocomportamiento durante el período de lactancia con la dosis más elevada. La dosis aceptada en Francia para humanos es 7.5 mg/Kg de peso corporal que es distinta a la usada en ese experimento, sin embargo debe considerarse el incremento de las dosis en los diferentes productos que usan tartrazina (Tanaka, 2006; Elhkim y col., 2007). La dosis usada en los experimentos de este trabajo se basó en la reportada para humanos y se llevaron a cabo experimentos con dosis menores y mayores.

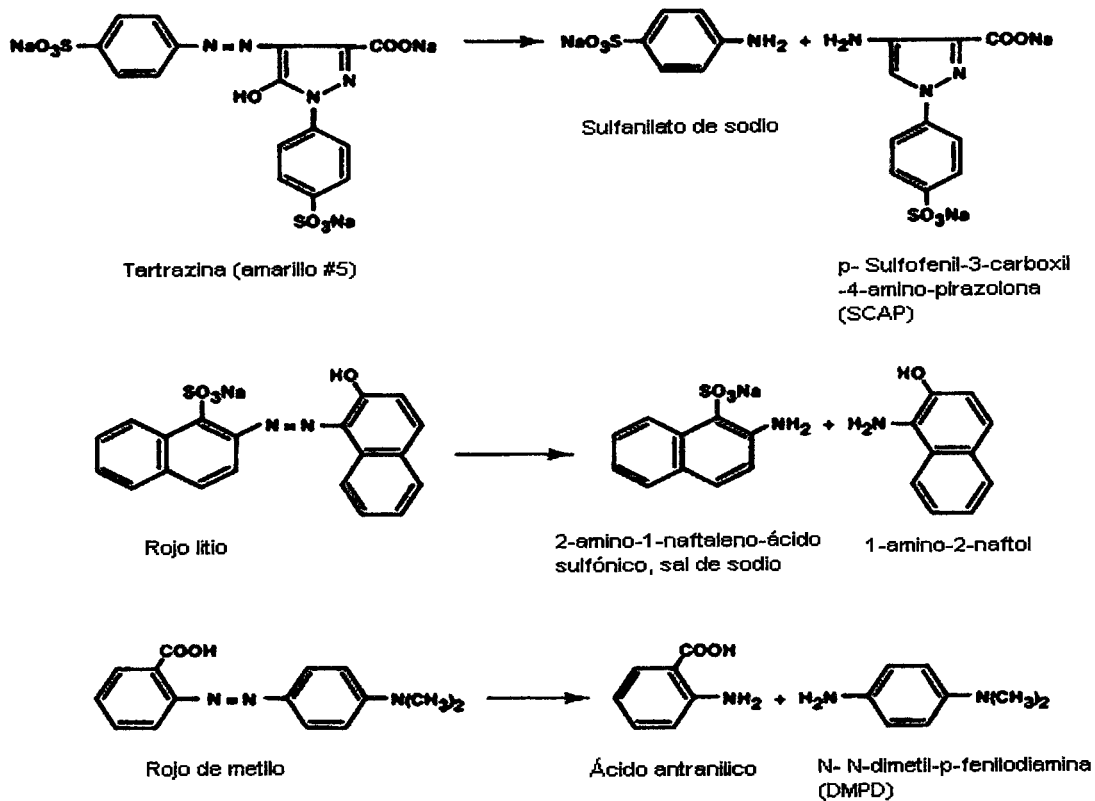


Figura 1. Azocompuestos y sus metabolitos. Los azocompuestos usados como colorantes en la industria farmacéutica y alimentaria, cuyos metabolitos pueden relacionarse con procesos de carcinogénesis (King-Thom y col., 1981)

La mutagenicidad de azocompuestos como el amaranto y tartrazina usados cautelosamente en la industria alimentaria fueron probados en ensayos de Ames con *Salmonella typhimurium* en ausencia de hígado de rata S9. Los resultados indicaron ausencia de actividad mutagénica en cepas TA 98 y TA 100 (Izbirak y col., 1990).

En los estudios realizados en el protozooario *Tetrahymena pyriformis* para medir la cantidad de DNA que pudiera modificarse por acción de aditivos alimenticios entre los que se encontró la tartrazina, los resultados indicaron un incremento significativo del contenido del DNA, lo que sugiere estimulación de la actividad mitótica celular (Stefanidou y col., 2003).

La tartrazina que se utiliza en alimentos y fármacos puede ser la causa de las reacciones de intolerancia de los alimentos en pacientes que presentan reacciones alérgicas del tipo asmáticas y urticaria, sin embargo los mecanismos patológicos que inducen dichas reacciones son poco conocidos (Elhkim y col., 2007).

En el estudio realizado en ratas macho para explorar los efectos tóxicos de la tartrazina se encontró una disminución de la hemoglobina y del conteo de células rojas, así como un depósito marrón en el tracto portal, células de van Kúpffer, en el tejido intersticial y tubular de células renales (Aboel-Zahab y col., 1997).

Con la intención de conocer la toxicidad en médula ósea de ratones CBA X C57BL/6 y la mutagenicidad cepas K-12 de *Escherichia coli*, los resultados en los dos modelos estudiados indicaron que las dosis utilizadas de 400 mg/Kg de peso no indujeron cambios cromosómicos ni mutagenicidad en las cepas de *Escherichia coli* por lo que se propone que el uso de la tartrazina como aditivo de alimentos es seguro (Karpliuk y col., 1984).

En estudios realizados en linfocitos humanos para determinar la relación entre la citotoxicidad y los efectos inmunosupresores de los aditivos alimenticios, se reportó que la tartrazina induce efectos inmunosupresores pero no citotóxicos en los modelos estudiados (Koutsogeorgopoulou y col., 1998).

Los colorantes usados como aditivos de alimentos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos y dar lugar a compuestos conjugados covalentes, que hace propenso a un individuo a convertir sustancias en especies inmuno-reactivas o metabolitos activos bajo condiciones fisiológicas (Weliky y Heiner, 1985).

La bilis y heces de ratas tratadas con tartrazina fueron utilizadas para hacer ensayos de Ames con cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100. En bilis no fueron encontrados compuestos que sugirieran mutagenicidad; sin embargo los

extractos de heces en presencia de S-9 demostraron efecto tóxico para la cepa TA 100 (Münzner y Wever, 1987).

Con la idea de explorar los efectos de la tartrazina en fibroblastos, las células de fibroblasto M muntjac fueron sometidas a un rango de 5-20 $\mu\text{g/ml}$ de tartrazina en un estudio *in vitro*; donde el porcentaje total de aberraciones cromosómicas después de dos periodos de cultivo se incrementó significativamente sobre niveles de células control (Patterson y Butler, 1982).

Para conocer los efectos de la tartrazina durante la gestación, las ratas fueron expuestas a dosis de 0 a 2% de tartrazina en un nivel dietético, durante el periodo gestacional y de lactancia, no se observaron cambios en el desarrollo del sistema nervioso de las ratas; tampoco anomalías morfológicas en el peso del cerebro, sólo se reportó un incremento en las células rojas y la reducción del timo (Sobotka y col., 1977).

En el estudio realizado para explorar el efecto de la tartrazina en un grupo de 50 ratas hembra y otro grupo de ratas macho de la especie F344, se reportaron pólipos endometriales y mesoteliomas, respectivamente, sin embargo el grupo control, que no ingirió tartrazina, también reportó desarrollo de tumores, lo que se atribuye a padecimientos propios de la especie de ratas y no de la administración de tartrazina (Maekawa y col., 1987).

En estudios para explorar los efectos adversos de la tartrazina se usaron ratas Charles River como F0 (60 /sexo/grupo) a las cuales se les aplicaron dosis de 0.0, 0.1, 1.0 ó 2.0% y un grupo con la dosis alta 0.0 y 5.0%. Para la generación F1 fueron usados los mismos parámetros incluyendo 3 grupos control. No se encontraron efectos adversos, al igual que en el experimento de dosis elevadas cuyas dosis fueron de 2641 y 3348 mg/Kg/día tanto en machos como hembras (Borzelleca y Hallagan, 1988).

En el estudio realizado en ratones no se registraron efectos adversos, con la concentración más elevada de 5% de tartrazina en un periodo de 104 semanas usando una población de 60 ratones hembra y 60 ratones macho Charles River CD-1 (Borzelleca y Hallagan, 1988).

En el estudio realizado en el intestino delgado de cobayos, se encontró que la tartrazina actúa sobre los receptores muscarínicos de acetilcolina, asociados a la inervación parasimpática que se encuentra en dicho intestino, se encontró que el efecto de la tartrazina es dosis dependiente partiendo de una dosis mínima efectiva de menos de 10 μM y no hubo respuesta en otros colorantes utilizados (Hutchinson y col., 1992).

Los colorantes alimenticios aprobados por la FDA fueron examinados para potenciales promotores anticancerosos, por medio de un ensayo con el virus de Epstein-Barr *in vitro*, por medio de activación antigénica en células Raji, en respuesta al promotor tumoral 12-O- lo que originó como resultado que la tartrazina, carmín índigo y eritrosina son potentes inhibidores del promotor de tumores en la piel de ratones tratados con DMBA y TPA (Kapadia y col., 1998).

Los estudios realizados en ratones demostraron cambios en habilidades exploratorias en tres generaciones: F0, F1, F2 al incorporar niveles de tartrazina en la dieta de 0.0%, 0.05%, 0.15%, 0.45% desde las cinco semanas de edad en F0 hasta nueve semanas de edad en F2 (Tanaka y col., 2008).

II.3 Regulación de la expresión genética.

La tartrazina es un compuesto que puede participar alterando la expresión genética y con ello modificando la diferenciación celular. Cientos de tipos celulares diferentes llevan a cabo funciones especializadas que son dependientes únicamente de los genes que son activados en dicho tipo celular. Tal diferenciación se origina porque las células producen y acumulan distintos grupos de moléculas de RNA y proteínas, es decir expresan genes distintos. Cada tipo celular está encargado de generar proteínas especializadas, responsables de las propiedades celulares características.

Para esto es necesaria la presencia tanto de promotores como de otras moléculas que mencionaré más adelante. Los promotores pueden estar en cualquier lado del gen y se denominan reguladores cis (adyacentes al gen estructural que regulan) o trans (no adyacentes al gen estructural que regulan) (Klug y Cummings, 2000). Estos promotores contienen un sitio de iniciación, donde se comienza la transcripción y una secuencia de aproximadamente 50 nucleótidos que se dirige corriente arriba. Esta región presenta sitios específicos para que la RNA polimerasa se una al promotor. Además del promotor, los genes independientemente si son bacterianos o eucarióticos, contienen cadenas de DNA reguladoras empleadas para activar o inhibir genes. Algunas de ellas, solo constan de 10 pares de nucleótidos y responden a una sola señal. Sin embargo las cadenas DNA reguladoras de eucariontes son de hasta 10,000 pares de nucleótidos y responden a varias señales, estos a su vez determinan la frecuencia con la que inicia la transcripción. Las cadenas reguladoras de DNA trabajan acompañadas de proteínas reguladoras génicas. Dichas proteínas se unen al DNA por medio de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos o enlaces covalentes. Para el inicio de la transcripción dentro de una célula eucarionte se tiene la intervención de distintas RNA polimerasas, como la tipo I, II y III que son responsables de la transcripción de distintos genes. La tipo I y la tipo II transcriben genes que codifican el tRNA, rRNA y sRNA. La RNA polimerasa tipo II transcribe la mayoría de los genes que codifican

proteínas. Las RNA polimerasas requieren de la intervención de factores de transcripción génica que se ensamblan en el promotor junto con la polimerasa. Las proteínas reguladoras génicas afectan la velocidad de la transcripción, aún si se haya muy lejos del promotor. Por último se tiene que el DNA tiene que estar localizado en formas compactas.

Los factores de transcripción ayudan a anclar y a posicionar la RNA polimerasa con el promotor. Dicho proceso inicia con el apareamiento del factor de transcripción general TFIID a una secuencia corta del DNA de doble hélice compuesta principalmente por adenina y timina (caja TATA). Posteriormente el TFIID genera una deformidad local en el DNA, esta deformación sirve como referencia para otros factores de transcripción.

Una vez que la RNA polimerasa II se fijó al promotor del DNA en el complejo de iniciación de la transcripción, debe liberarse del complejo de factores de transcripción para que inicie la producción de una molécula de RNA. En esta liberación la fosforilación de RNA polimerasa llevada a cabo por TFIIH contribuye a que la RNA polimerasa se libere del grupo de factores de transcripción, permitiendo el inicio de la transcripción y el desplazamiento de las moléculas que procesan el transcrito junto a la RNA polimerasa. El DNA una vez liberado de los factores de transcripción esta listo para iniciar de nuevo la transcripción.

Todas las células son capaces de inhibir o activar genes pero los organismos multicelulares lo hicieron en un grado muy especializado. Una célula en un organismo llega a diferenciarse en tipos celulares específicos, la elección se mantiene generalmente a través de muchas generaciones, esto se conoce como memoria celular. Cuando una célula eucarionte recibe una señal para dividirse, se activan conjuntamente para desarrollar los procesos que finalmente llevaran a la división celular. Aún cuando el control de la expresión génica es combinatorio en células eucariontes, el efecto de una única proteína reguladora génica es decisivo en la activación o inhibición de genes. La misma proteína puede completar la

combinación para varios genes distintos. La capacidad para activar o reprimir muchos genes diferentes usando una sola proteína es útil en la regulación diaria, pero también representa uno de los medios por el cual se diferencian en el período embrionario. Los organismos multicelulares requieren de mecanismos génicos interruptores para la generación y mantenimiento de distintos tipos celulares. Los cambios en la expresión génica que dan lugar a células diferenciadas deben recordarse y transmitirse a células hijas (Alberts y col., 1999).

II.4 Desarrollo del sistema nervioso

Las alteraciones en la expresión de genes pueden inducir cambios en la formación del sistema nervioso, en este estudio se explorarán los efectos de la tartrazina durante el inicio de la formación del sistema nervioso conocido como neurulación.

El proceso de neurulación se inicia cuando la placa neural se extiende gradualmente hacia la línea primitiva; una vez formada la placa neural, los bordes laterales se elevan y se forman los pliegues neurales, y la porción media deprimida constituye el surco neural. Estos pliegues se aproximan unos con otros en la línea media, para fusionarse, donde darán lugar a lo que más tarde constituirá la formación del cuello (quinto somita). Este avanza hacia la cabeza y hacia la cola y su resultado es la formación del tubo neural. Hasta que se completa la fusión en los extremos cefálicos y caudal del embrión; el tubo queda en comunicación con la cavidad amniótica por medio de los neuroporos craneal y caudal, respectivamente.

El neuroporo craneal se cierra aproximadamente en los vertebrados al formarse de 18 a 20 somitas, mientras que el neuroporo posterior se cierra cuando se han formado 25 somitas. El proceso de neurulación se ha completado y el sistema nervioso central está representado por una estructura tubular cerrada con una porción caudal estrecha, la médula espinal y una porción cefálica mucho más ancha caracterizada por varias dilataciones, las vesículas cerebrales. A medida que estos pliegues se elevan y fusionan, las células que se encuentran en el borde

lateral o cresta del neuroectodermo, comienzan a dissociarse de las que se encuentran en sus alrededores, esta población celular, la cresta neural, a su salida del neuroectodermo experimenta una transición de epitelial a mesenquimática para penetrar en el mesodermo subyacente por migración activa y desplazamiento (mesodermo se refiere a las células derivadas del epiblasto y de los tejidos extraembrionarios; mesenquima es el tejido conectivo embrionario laxo). Cuando el tubo neural se ha cerrado, se hacen notar en la región cefálica del embrión otros dos engrosamientos ectodérmicos bilaterales, las placodas óticas y las placodas del cristalino.

Las señales para la diferenciación del somita se originan desde las estructuras que lo rodean, incluyendo la notocorda, el tubo neural, la epidermis y la lámina lateral del mesodermo. La proteína de secreción, producto del gen *Sonic hedgehog (Shh)* producido por la notocorda y la placa del piso del tubo neural, inducen a la porción ventromedial del somita a convertirse en esclerotoma. Una vez inducido, las células del esclerotoma expresan el factor de transcripción PAX1 (Figura 2), que tiene a su cargo el inicio de la cascada de genes que participan en la formación de cartílago y hueso de la vértebra. La expresión de PAX3, regulada por las proteínas Wnt producidas por la porción dorsal del tubo neural, especifica la región del dermatomiotoma del somita. Las proteínas Wnt secretadas por la porción del tubo neural tienen también como blanco la porción dorsomedial del somita, provocando que esté inicie la expresión del gen específico del músculo *Myf5* y se transforme en musculatura epaxial. La interacción entre la proteína inhibidora BMP-4 secretada desde la lamina lateral del mesodermo y productos de activación de Wnt secretados desde la epidermis, dirigen la porción dorsolateral del somita a expresar otro gen específico del músculo *MyoD*, para formar los músculos del miembro y la pared corporal. La porción media del epitelio dorsal del somita es dirigida por neurotrofina 3 (NT-3), secretada por la región dorsal del tubo neural, para formar la dermis (Sadler, 2002).

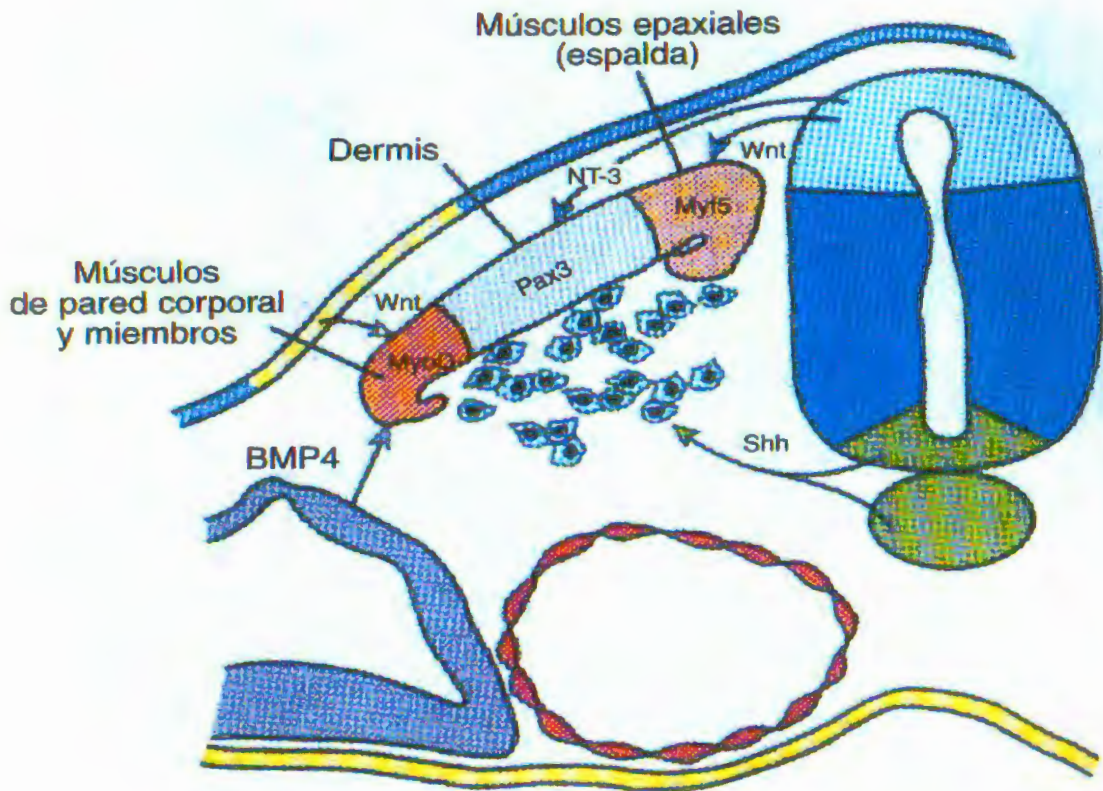


Figura 2. Patrones de expresión de genes que regulan la diferenciación del somita. La proteína Sonic hedgehog (SHH), secretada por la notocorda y la placa del piso del tubo neural, hace que la parte ventral del somita forme el esclerotoma y exprese PAX1, que a su vez controla la condrogénesis y la formación vertebral (Sadler, 2002).

II.5 Teratogénesis.

La gastrulación en si misma puede verse interrumpida por alteración de la expresión genética, dando como consecuencia efectos teratógenos. Los factores que determinan la capacidad de que un agente se convierta en teratógeno, es decir para provocar defectos congénitos, quedaron definidos como los procesos de teratología de una sustancia, que son resumidos de la siguiente manera:

- 1.- La susceptibilidad a la teratogénesis depende del genotipo del producto de la concepción y de cómo esta composición genética interactúa con el ambiente. El genoma materno representa gran importancia en este proceso; debido a que actúa directamente con el metabolismo de la droga, resistencia a la infección y otros procesos bioquímicos y moleculares que pueden incidir sobre el producto de la fecundación.
- 2.- La susceptibilidad de los agentes teratógenos varía según la etapa embrionaria que se esté llevando a cabo y también el grado de exposición en dichas etapas, donde el periodo más sensible es de la tercera a la octava semana, sin omitir que antes o después del proceso de embriogénesis se pueden producir defectos, de manera que se tiene que poner especial cuidado a las exposiciones con agentes que pudieran ser fuente potencial de malformaciones para el producto.
- 3.- Las malformaciones dependerán del tiempo y dosis de exposición al teratógeno.
- 4.- Los agentes teratógenos tienen modos específicos de actuar, sobre las células y tejidos en desarrollo para dar lugar a una embriogénesis anormal, lo que comúnmente se conoce como patogenia.

5.- Las manifestaciones de desarrollo anormal son, malformaciones, retardo en el crecimiento y trastornos funcionales. Dicho de esta manera, el agente teratógeno actúa en procesos moleculares y/o bioquímicos específicos; involucrando muerte celular, disminución de la proliferación celular u otros comportamientos celulares (Henschler y Wild, 1995).

III. HIPÓTESIS

La tartrazina induce cambios fenotípicos en embriones de pollo durante el proceso de neurulación.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Estudiar los cambios fenotípicos inducidos por la tartrazina en embriones de pollo durante la neurulación.

IV.2 Específicos

- Observar los cambios fenotípicos en los embriones de pollo sin tratamiento.
- Explorar los efectos inducidos por la tartrazina en embriones de pollo.
- Comparar los cambios fenotípicos en embriones de pollo con los inducidos en embriones tratados con tartrazina.
- Explorar la respuesta de embriotoxicidad a distintas dosis.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

Se trabajó empleando como material biológico, huevos fértiles libres de patógenos de la empresa ALPES; se usó una incubadora Incumatic 200 serie TZ4ST con capacidad para 200 huevos; higrómetro, Vortex Gene 2 marca Scientific Industries para homogeneizar las dosis de colorante, mechero Fisher, jeringas de 5 mL balanza analítica marca Sartorius para el pesaje del colorante; tartrazina de marca SIGMA-ALDRICH; cinta adhesiva para cubrir el orificio de los huevos, tubos cónicos de polipropileno marca Falcon con capacidad de 15 mL; estuche de disección usado en la extracción de los embriones, cajas petri donde se colocó a los embriones disecados, micropipetas automáticas de 0.2 μ L- 20 μ L y 100 μ L puntas para pipetas estériles de 100 μ L y 200 μ L, escala milimétrica que se utilizó para medir la longitud del embrión, vaso de precipitado de 50 mL marca Pyrex, donde se colocó la clara extraída de cada huevo; solución salina isotónica al 0.9% CS, soluciones preparadas en un área estéril, con tartrazina de marca SIGMA-ALDRICH; estereoscopio marca Zeiss, paraformaldehído al 4% en PBS para la conservación de los embriones y un microscopio Axiostar plus marca Zeiss para la posterior documentación de imágenes.

V.2 Métodos

V.2.1 Métodos biológicos

Los embriones se mantuvieron a una temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 2$. El día del inicio del experimento los embriones se incubaron durante un período de 14.5 horas, a una temperatura constante de 37°C , se mantuvieron las condiciones de humedad relativa entre 60-70% con la ayuda de un higrómetro.

Transcurridas las 14.5 horas fueron sacados de la incubadora, los embriones se separaron en los distintos grupos que se estudiaron, en este caso se contó con cuatro grupos constituidos por 15 huevos cada uno. Uno de los grupos funcionó como grupo control. A todos los grupos, a excepción del grupo control, se les hizo un orificio pequeño en la sección más estrecha del cascarón con la ayuda de una aguja; este orificio sirvió para inocular las dosis de la sustancia en estudio (tartrazina).

Las dosis que se administraron fueron resultado de ensayos preliminares que fueron llevados a cabo a partir de las dosis reportadas en otros estudios (Tanaka, 2006; Elhkim y col., 2007; Rao, 2004). Las dosis motivo de estudio, se aplicaron con una micropipeta en el orificio que se hizo anteriormente; una vez terminada la inoculación se selló los orificios con una cinta adhesiva, y se incubó a los huevos, bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad para continuar con el desarrollo del embrión.

Terminado el tiempo de 45.5 horas se sacaron de la incubadora, se extrajo la clara excedente con ayuda de una jeringa y posteriormente se abrieron los cascarones a aproximadamente la mitad, se mantuvo sumo cuidado de no romper la yema. Una vez abiertos los cascarones, la yema quedó expuesta, lo que facilitó la extracción de los embriones dentro del saco vitelino, posteriormente se disecaron con la ayuda de tijeras y unas pinzas, con las que se sostuvo a los embriones, mientras fueron cortados de una manera circular alrededor del saco vitelino. Este procedimiento se llevó a cabo con gran precisión para evitar perder los embriones. Cada uno de los embriones que se extrajeron se separaron por grupo de tratamiento y se colocaron en una caja petri que contuvo solución salina isotónica y se les dejó a temperatura ambiente hasta su estudio bajo el estereomicroscopio.

De cada uno de los embriones se midió su longitud cráneo-caudal, longitud craneal, tanto ancho y apertura cráneoal; el número de somitas, se observó la presencia de

los primordios óptico, ótico y cardiaco; después se analizó el conjunto de cambios fenotípicos inducidos por la tartrazina, mismos que se compararon con el grupo control (García, 2005).

Al término de su análisis, se llenó un tubo Falcon con capacidad de 15 mL, con paraformaldehído al 4%. Cada grupo de embriones se colocó en tubos distintos rotulados con su clave de grupo, fecha y dosis inoculada; incluido el grupo control. Esto con el fin de conservar los embriones en condiciones óptimas de refrigeración para tener un registro fotográfico del experimento y los resultados obtenidos.

V.3 Diseño experimental

Se trabajó con 4 grupos experimentales:

Se observó y midió a los embriones del grupo control (G0), así como los de los grupos experimentales (G1-G3) de acuerdo a los parámetros incluidos en los métodos biológicos (Hamburger y Hamilton, 1951).

Posteriormente se estableció una comparación entre el grupo control y las características propuestas por trabajos previos de investigación en los cuales se señaló el desarrollo de 16.8 ± 1.2 pares de somitas, la curvatura craneal y cervical y la aparición del atrio ventricular, en condiciones normales de desarrollo embrionario.

Se trabajó con tres grupos problema (G1- G3) y un grupo control, cada grupo se constituyó por 15 huevos. Estos fueron incubados a una temperatura de 37°C por un período de 14.5 horas, al término estas horas de incubación, se inoculó con soluciones preparadas con FD &C amarillo Núm. 5 (tartrazina) en polvo y como diluyente, solución isotónica de cloruro de sodio. Se trabajó en un área estéril, con ayuda de un mechero Fisher y puntas para pipeta previamente estériles. La dosis que se aplicó en el experimento para cada grupo, se basó en las dosis de ingestión

diaria admisible para una persona; que fue de 7.5 mg/Kg de peso corporal (Tanaka, 2006; Elhkim y col., 2007; Rao, 2004). A su vez dicha dosis de ingestión diaria admisible se transfirió con relación al peso de un huevo de 64 g. De manera que las dosis aplicadas fueron, una vigésima parte de la dosis normal, mitad de la dosis normal y dosis normal (23 $\mu\text{g}/64\text{g}$; 233 $\mu\text{g}/64\text{g}$ y 466.5 $\mu\text{g}/64\text{g}$ respectivamente). Para la preparación de cada una de ellas se realizó una solución con 280 μg de tartrazina diluida en 3000 μl de solución salina isotónica) Se identificó a los grupos como G1, G2 y G3; siendo las dosis administradas para cada uno 23 $\mu\text{g}/64\text{g}$; 233 $\mu\text{g}/64\text{g}$ y 466.5 $\mu\text{g}/64\text{g}$ respectivamente (G1 se aplicaron 2.5 μl de la solución; G2 se aplicaron 25 μl de la solución; G3 se aplicaron 50 μl de la solución) Con el fin de obtener resultados acordes con la investigación planteada. Posteriormente se incubó de nuevo por un periodo de 31 horas, para completar el periodo total de 45.5 horas. Se registraron los cambios en la morfología de los primordios óticos, ópticos y cardiacos, también se midió a los embriones y se reportó el número de anomalías (como aplasias, anancefalias, deficiencia en la formación de vesículas cerebrales (DFV), deficiencia del cierre del tubo neural (DCTN)) y las resorciones que correspondieron a pérdidas del embrión. Los resultados que se obtuvieron se asociaron en tablas para someterlos a análisis estadísticos y se mostraron en gráficas.

V.4 Método estadístico

La cantidad de embriones manejados permitió 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:

Las partes funcionales de esta prueba estadística son:

- p_1 fracción de alterados 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

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).

Al comparar los tratamientos con el grupo control, no se vio reflejado el comportamiento de los mismos con relación a las poblaciones iniciales, con lo que al ser utilizada la fórmula de Abbott (Ehab, 2002), se incluyó a las alteraciones espontáneas en el grupo control.

Para corregir el porcentaje de alteraciones con respecto al control se utilizó la fórmula de Abbott. Esta fórmula fue utilizada en algunos procedimientos generales

donde se midió el efecto de sustancias químicas en grupos tratados y se comparó contra grupos control.

La fórmula de Abbott es:

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

En donde:

% A porcentaje de alteración corregida

m_e alteración en el tratamiento

m_b alteración en el control

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron producto de cuatro experimentos conformados por 4 grupos de 15 huevos cada uno, (G0, G1, G2 y G3); de esta manera se utilizó un total de 240 huevos. En la Figura 3 se observa la gráfica obtenida. Los resultados indican una media de embriones normales en el grupo control (G0) 94.048 ± 2.00 ; en el grupo G1 65.71 ± 4.40 ; en el grupo G2 61.43 ± 8.39 y en el grupo G3 48.57 ± 5.75 . Los resultados muestran diferencias significativas entre el grupo control y los tratados ($p > 0.05$). La Figura 4 presenta un embrión normal en el estadio 13.

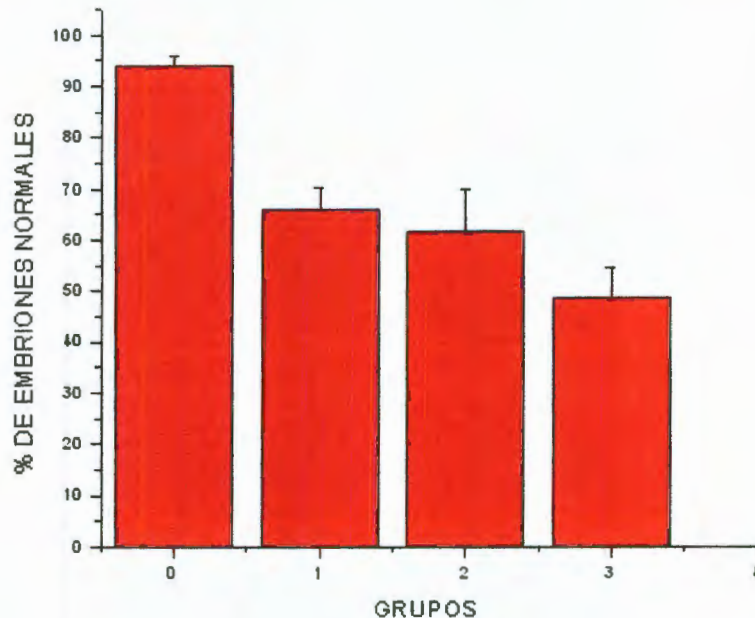


Figura 3. Gráfica de embriones normales. Representa la relación de la fracción de embriones normales, graficado en el eje de las ordenadas, con respecto a los grupos tratados en el experimento, graficado en el eje de las abscisas. Los grupos G0, G1, G2 y G3 corresponden a las dosis estudiadas en este trabajo, siendo $0.00 \mu\text{g}/64\text{g}$; $23 \mu\text{g}/64\text{g}$; $233 \mu\text{g}/64\text{g}$ y $466.5 \mu\text{g}/64\text{g}$ respectivamente.

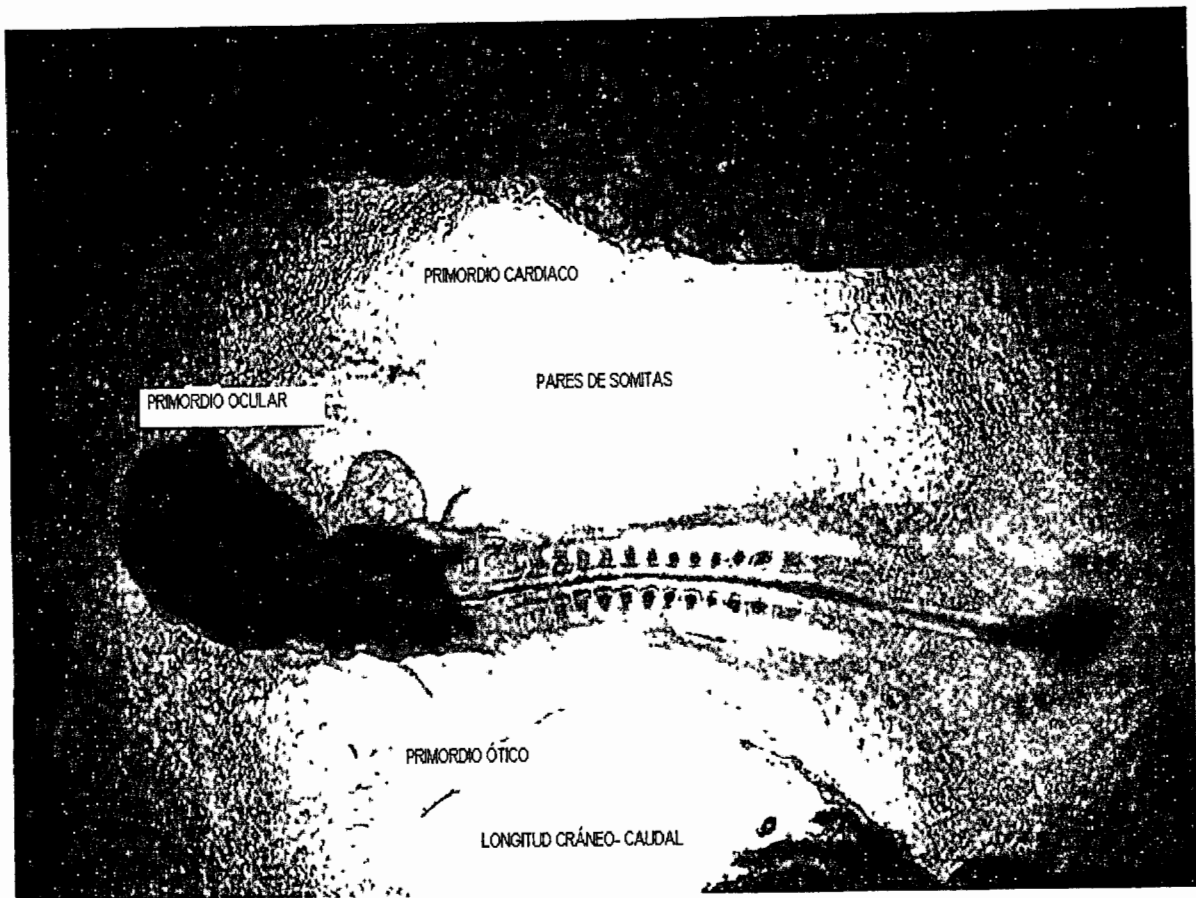


Figura 4. Embrión normal en estadio 13 observado con el objetivo de 2.5X. Se observan e indican los primordios óticos, ópticos y cardíacos; así como la presencia de somitas y la longitud cráneo-caudal.

Las anomalías que fueron encontradas en este experimento se refieren a aplasias y deficiencia en la formación de vesículas, las aplasias se caracterizan por la incapacidad que tiene el embrión de desarrollar la longitud cráneo-caudal adecuada proporcional al estadio en el que se encuentran, según Hamburger y Hamilton 1951, la longitud CC, debe ser de 6 milímetros de largo, presentando el desarrollo de primordios óticos, cardíacos y oculares; (acorde al estadio número 13). Las aplasias fueron consideradas como aquellos embriones cuya CC era 4 milímetros o menor.

La otra anomalía presente (DFV) se caracterizó por la afectación de sistemas orgánicos, como los ojos y el esbozo encefálico debido a la destrucción de células

de la línea media anterior del disco germinativo, cuyo resultado son estructuras craneales deficientes. En la Figura 7 se observa un embrión con DFV (deficiencia de formación de vesículas), en ocasiones en un sólo espécimen se suele encontrar más de un defecto.

En esta gráfica se presenta las anomalías en el eje de las ordenadas contra los grupos de experimentación en el eje de las abscisas. Los resultados indican una media de embriones anormales en el grupo control 5.95 ± 2.00 ; en el grupo G1 28.93 ± 6.56 ; en el grupo G2 26.07 ± 4.42 y para el grupo G3 33.93 ± 4.75 . Los resultados mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

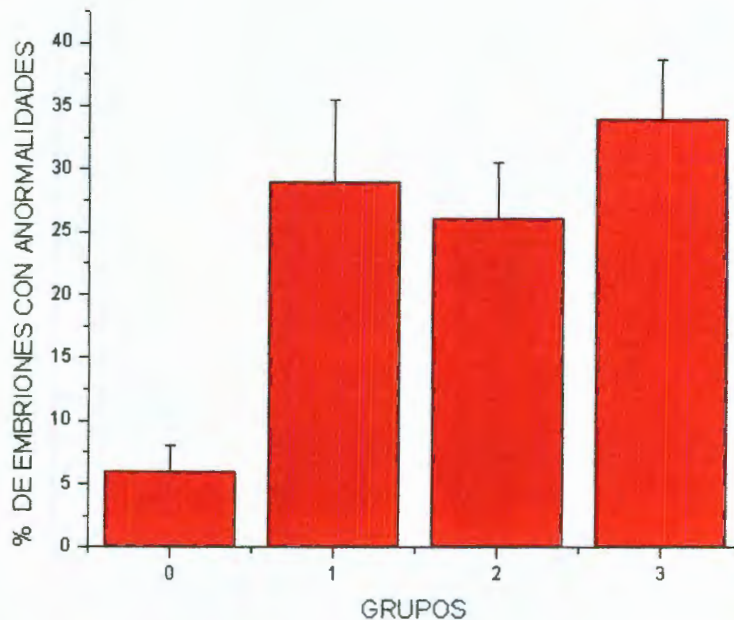


Figura 5. Gráfica de embriones anormales. La gráfica indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2, sin embargo hay aumento de anomalías dosis dependiente entre el tratamiento 1 y 3 en conjunto con el grupo control.



Figura 6. Aplasia generalizada más deficiencia en la formación de vesículas en el estadio 13 observado con el objetivo de 2.5X. Nótese la ausencia de vesículas tanto óticas, cardíacas y oculares; pudo haberse considerado como un embrión con DFV; solamente; sin embargo la longitud cráneo-caudal de este espécimen fue menor a 4 milímetros lo cual indica aplasia

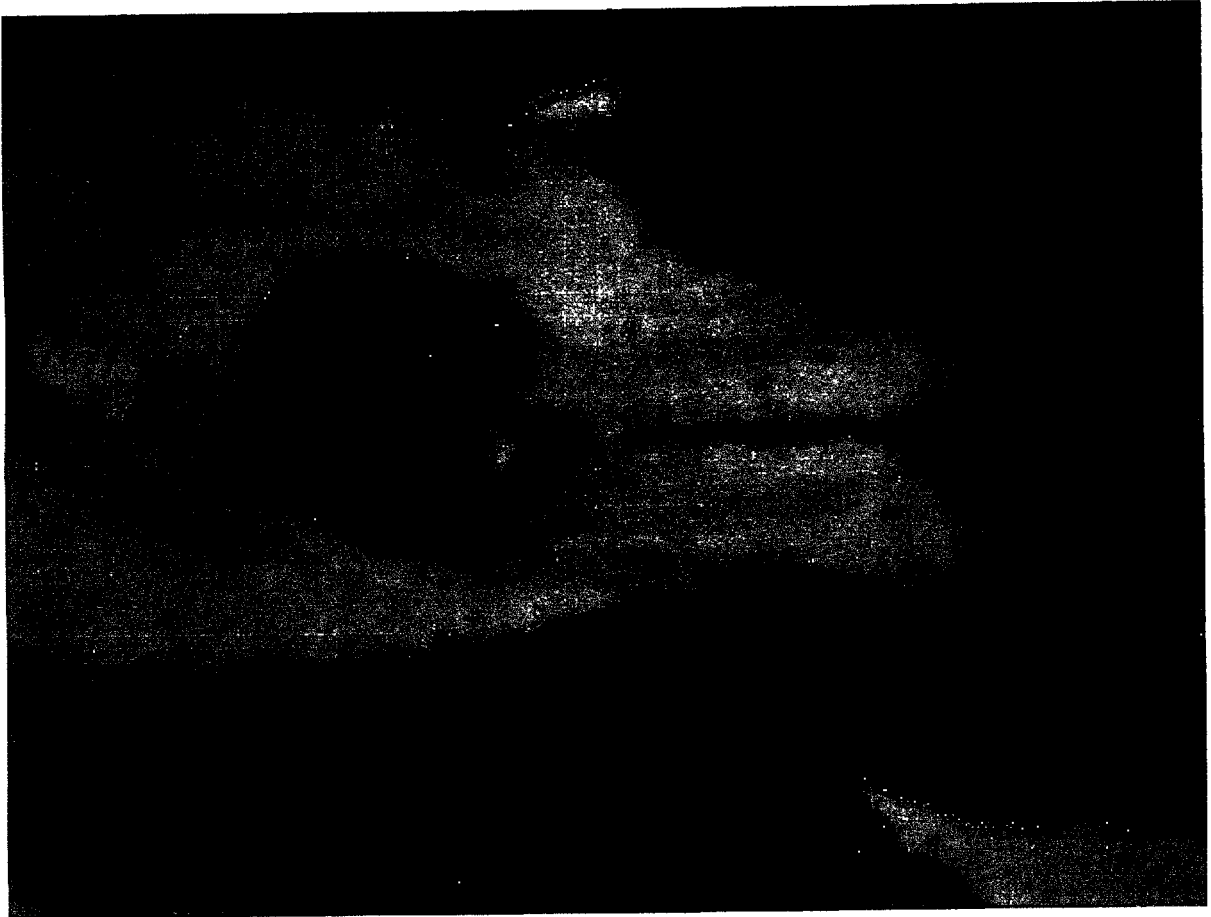


Figura 7. Embrión con DFV en estadio 13 2.5X. Este producto muestra el proceso deficiente en la formación de vesículas cerebrales, durante su desarrollo. También muestra aplasia.

Dentro del proceso de embriogénesis, pueden darse distintas alteraciones que lleven al desarrollo deficiente del producto o la destrucción de este, tales como las resorciones, también conocidas como disrupciones, que provocan alteraciones morfológicas de las estructuras ya formadas y posteriormente su destrucción, provocadas por defectos en la vascularización y en las bandas amnióticas. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica, donde se observó que a una dosis mayor de tartrazina inoculada, se provocó un porcentaje mayor de resorciones. Los resultados indican una media de 0 para el grupo G0, 5.34 ± 5.34 para G1, 12.5 ± 7.21 en G2 y 17.5 ± 6.3 para G3. Se muestran diferencias significativas entre los grupos G2 y G3 respecto al control ($p < 0.05$).

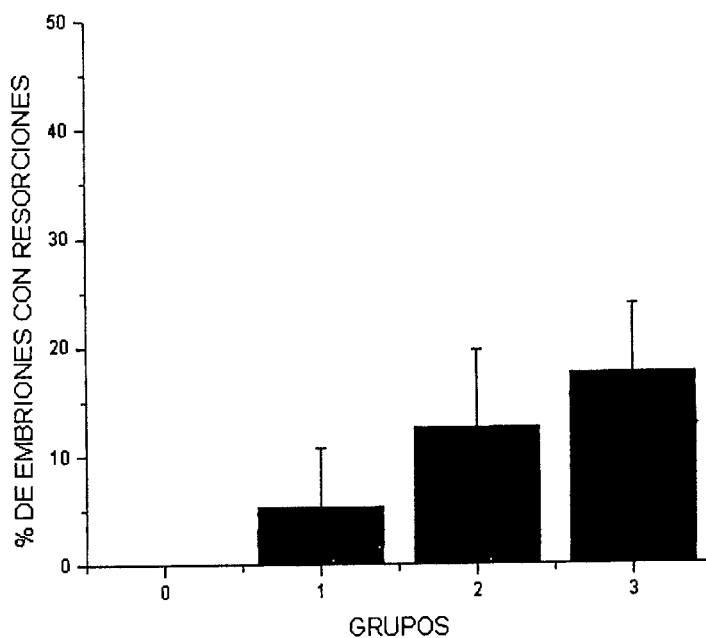


Figura 8. Gráfica de resorciones con respecto a los grupos tratados. Los grupos corresponden a las dosis estudiadas en este trabajo, siendo 0.00 $\mu\text{g}/64\text{g}$; 23 $\mu\text{g}/64\text{g}$; 233 $\mu\text{g}/64\text{g}$ y 466.5 $\mu\text{g}/64\text{g}$ respectivamente no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

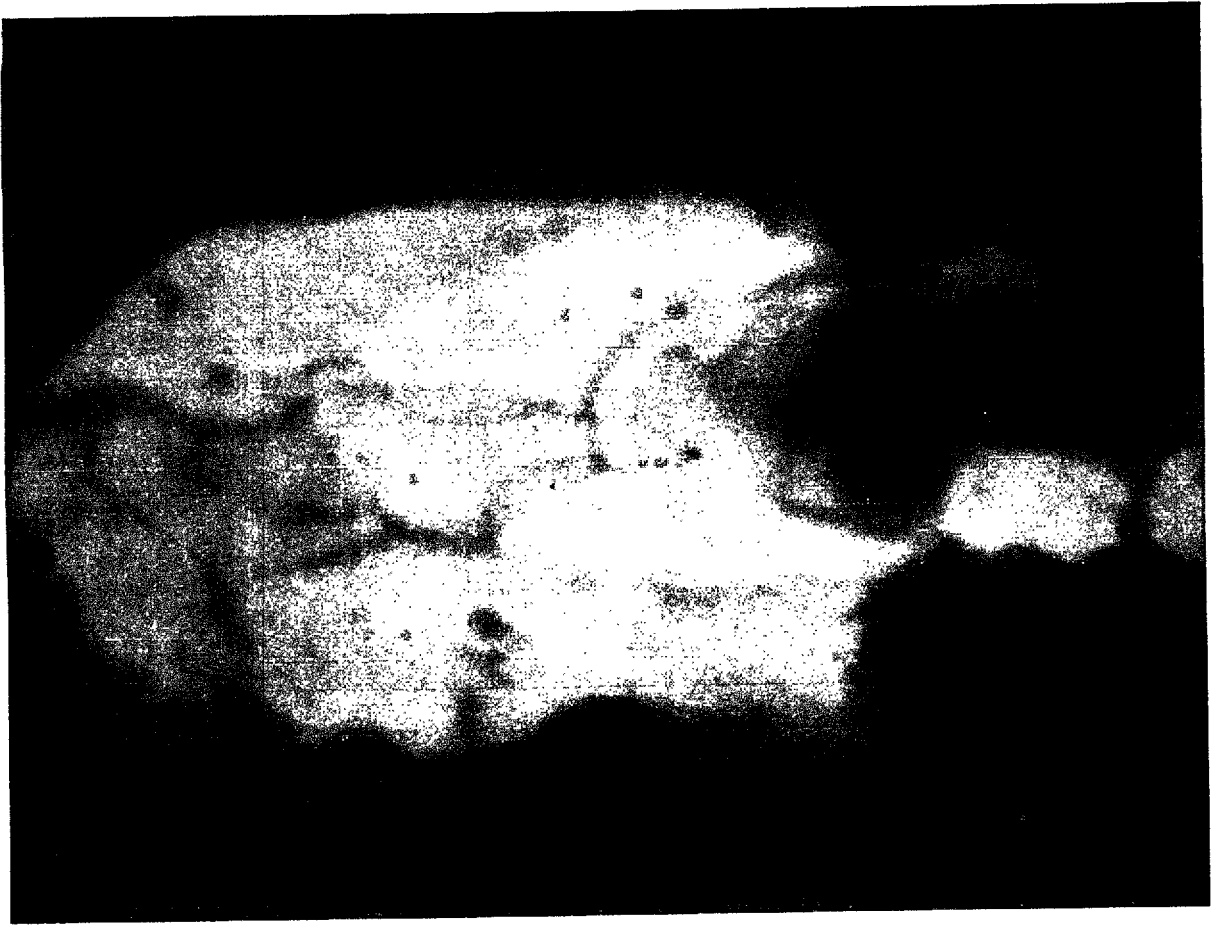


Figura 9. Embrión que sufrió una resorción 13 2.5X. Las resorciones provocan la destrucción de estructuras que ya fueron formadas.

Al analizar cada una de las gráficas anteriores se establece una relación de que a dosis mayores en la inoculación de embriones hay un incremento en las anormalidades. Con este gráfico se establece el comportamiento real de la relación dosis respuesta entre la tartrazina y los defectos obtenidos en una población.

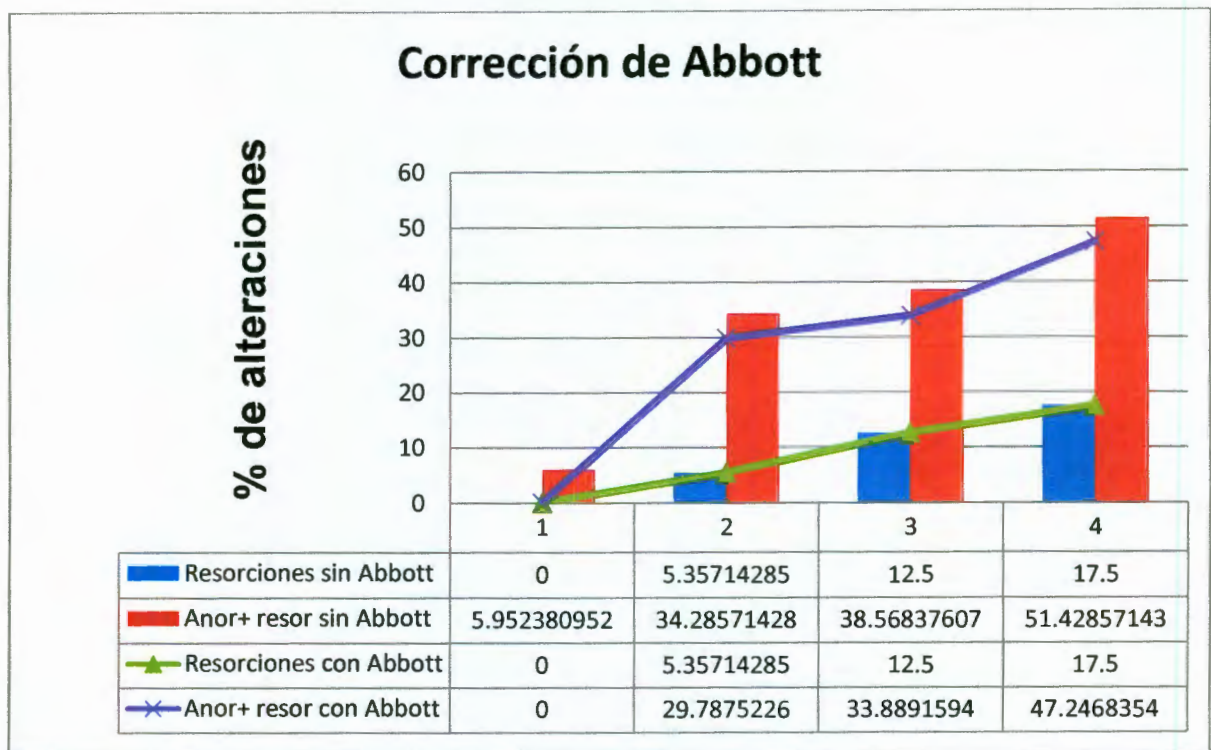


Figura 10. Gráfica de corrección de Abbott. Se presentan los resultados de los porcentajes de malformaciones con respecto a la dosis en el experimento. También se observa que las anormalidades obtenidas fueron incrementándose con respecto a las dosis aplicadas en los grupos experimentales. No se observa significancia entre los grupos de experimentación.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se estudió la relación de las dosis inoculadas de tartrazina en cada grupo experimental con el grado de anomalías obtenidas para cada uno de ellos, siendo que las manifestaciones de desarrollo anormal fueron malformaciones cráneo-caudales y disminución en el crecimiento presentados en los embriones de pollo en el estadio 13.

Dentro del grupo control se obtuvo un porcentaje de anomalías de 5.95%, lo que puede corresponder a mutaciones espontáneas, las cuales se dan de manera natural y se producen en todas las células; se pueden deber a distintas causas, siendo las principales: errores en la replicación del DNA, lesiones espontáneas y elementos genéticos transponibles. Los errores en la replicación del DNA, se deben cuando hay formas de nucleótidos ilegítimos denominados tautómeros, estos son isómeros que difieren en las posiciones de sus átomos y en los enlaces que se forman entre ellos. De tal manera que las formas imino y enol son raras en la naturaleza; y la forma ceto se encuentra de manera normal en la estructura del DNA. Dichas formas tautoméricas, producen emparejamientos erróneos: una base púrica es sustituida por otra purina distinta, o en su defecto, una pirimidina es reemplazada por una base nitrogenada pirimídica distinta.

Otra causa de mutaciones son las lesiones espontáneas, su importancia radica en, la pérdida del material genético. Estas pérdidas se ven traducidas como la eliminación del enlace glucosídico (enlace existente entre la base nitrogenada y el azúcar desoxirribosa), que implica la eliminación de un residuo de adenina o guanina; al igual que el mecanismo de desaminación de la citosina, el cual da como resultado uracilo, que produce un incorrecto apareamiento de bases GC→AT, produciendo residuos de 5-metilcitosina que están relacionados con puntos calientes mutacionales, es decir secciones de DNA más susceptibles a mutar.

Con base en la observación anterior se obtuvo que los grupos tratados con distintas dosis de tartrazina; siendo G0 el grupo control hasta G3 (dosis normal); presentaron un índice de anomalías estadísticamente significativo en comparación al grupo control. El mecanismo de acción de la tartrazina no es bien conocido, sin embargo ha sido investigada por estar relacionada por causar defectos congénitos durante el proceso embrionario, debido a que pudiese actuar en procesos moleculares y/o bioquímicos específicos; involucrando muerte celular, disminución de la proliferación celular u otros comportamientos celulares (Henschler y col., 1995).

Al comparar los valores de significancia entre los grupos donde se obtuvieron anomalías, se observa que hay diferencias significativas al ser vistas conjuntamente con los valores del grupo control, sin embargo no se observa significancia entre los grupos de experimentación; es decir pese a que en el grupo 3 se aplicó una dosis normal, (20 veces la dosis aplicada en el grupo G1) no hay diferencia significativa entre estos grupos, esto puede deberse al desarrollo regulativo dentro del embrión, ya que le confiere la habilidad de compensar regiones que han sido dañadas o eliminadas a pesar de ciertos aditivos, puedan reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos y dar lugar a compuestos conjugados covalentes que hacen propenso a un individuo a convertir sustancias en especies inmuno-reativas (Weliky y col., 1985); por lo que la exposición a teratógenos durante la segunda semana tras la fecundación comporta un riesgo mínimo de producir defectos congénitos; el desarrollo regulativo también se acompaña de mecanismos de protección durante la transcripción del DNA, como la polimerasa III y las glucosilasas del DNA que escinden enlaces N-glucosídicos generando sitiosapurínicos o apirimidínicos que posteriormente son reparados por endonucleasas AP. Lo cual explica los resultados sin diferencia significativa entre grupos experimentales (Alberts y col., 1999).

Estudios anteriores reportaron que la toxicidad es dependiente del alto consumo de azocompuestos, ya que la dosis admisible de ingesta es 7.5 mg/Kg de peso corporal en humanos (Rao y col., 2004; Tanaka, 2006; Ehlkim y col., 2007; Rao y col., 2004; Sobotka y col., 1977). Debido a lo mencionado anteriormente, se establecieron estudios para conocer la relación existente de teratogenicidad de la tartrazina en el proceso embrionario de ratas durante el periodo gestacional y de lactancia. Donde no se obtuvieron evidencias significativas de sus efectos, sin embargo se observaron alteraciones esqueléticas en el modelo de ratas Osborne-Mendel en el segundo trimestre de gestación (Collins y col.,1992). Dichos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo, ya que en el primer trimestre de gestación (estadio 13.5 en pollos) se produce la formación del tubo neural y dichas señales para la diferenciación de las somitas se originan de las estructuras que ya fueron formadas, así como la notocorda, el tubo neural y la epidermis, si hay algún tipo de alteración en la formación de las estructuras previas, es muy posible que la señalización de las somitas sea deficiente, dando como resultado alteraciones esqueléticas.

El sistema esquelético se desarrolla a partir del mesodermo paraxial, de la hoja somática y la cresta neural. El mesodermo paraxial forma bloques de tejido dispuestos en serie a cada lado del tubo neural, denominados somitóferas en la región cefálica y somitas en la región caudal. Los somitas se diferencian en una porción ventromedial, el esclerotoma y una parte dorsolateral que es el dermatomioma. Al finalizar la cuarta semana, esto es en el caso de mamíferos, las células del esclerotoma se tornan polimorfas. Las células del mesenquima son altamente versátiles y pueden diferenciarse en fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. La formación de hueso no se limita en las células provenientes del esclerotoma, sino que también aporta células para la formación de cinturas escapulares y pelvianas de los huesos largos de las extremidades. Los somitas y somitóferas occipitales participan en la formación de la bóveda craneana y de la base del cráneo. Sin embargo las células que emigran del neuroectodermo presentan una labilidad muy grande ante la presencia de agentes teratógenos, por

lo tanto se presentan deformaciones craneofaciales importantes, tales como la craneoquisis, que es el producto de la ausencia de la formación de la bóveda craneana, lo que ocasiona la exposición del tejido encefálico ante el líquido amniótico, que posteriormente sufrirá de un proceso denominado anancefalia, que fue consistente con los resultados encontrados dentro del trabajo de experimentación con tartrazina, en el grupo de anomalías. En este trabajo las alteraciones que afectan al adecuado cierre del tubo neural son: deficiencia en el cierre del neuróporo caudal y deficiencia en el cierre del neuróporo craneal de manera que dichos defectos intervienen en posteriores cascadas de señalización para la formación de esclerotoma (componente de cartílago y hueso); miotoma (componente muscular segmentario) y dermatoma (Sadler, 2002).

Los estudios realizados para observar la relación existente entre la dosis de tartrazina inoculadas y el neurocomportamiento en ratas solo se vio afectado al aplicar la dosis más elevada que fue de 773 mg/Kg/día (Tanaka, 2006; Elhkim y col., 2007). Los estudios llevados a cabo en este trabajo difieren con los obtenidos por Tanaka, debido a que las anomalías y resorciones son obtenidas a partir de una dosis de tartrazina inoculada veinte veces menor a la dosis normal en los grupos de experimentación en este trabajo, por lo tanto a una dosis normal se tiene un porcentaje de 47.24% de anomalías. Pese que en el grupo G1 se administró una dosis de 23 µg/64g de peso, se obtuvieron valores ligeramente más altos que en comparación al grupo 2, a pesar de que este fue diez veces mayor 233 µg/64g, lo que indica que el embrión tiene un límite de saturación hacia las sustancias inoculadas, que implica un aumento en el número de anomalías obtenidas. Dado que en embriones de mamíferos se produce desarrollo en mosaico en los órganos en desarrollo y durante una fase corta antes de la diferenciación, este proceso es la base de los efectos dañinos de agentes teratogénicos; que actúan causando la muerte de células susceptibles, produciendo malformaciones congénitas tras la gastrulación; ya que es el punto de partida de la organogénesis y determina el déficit de compensación de daño celular.

Debido a que la tartrazina muestra un incremento de anomalías y resorpciones considerable a medida que la dosis inoculada aumenta, podemos decir que es una sustancia teratógena por sí misma y no por la intervención de metabolitos generados por agentes externos en el modelo estudiado, cabe mencionar que los procesos teratogénicos en embriones de pollo, no están sujetos a la susceptibilidad materna hacia la droga, metabolismo y estado nutricional; por ser un sistema que se desarrolla de manera autocontrolada e independiente, precisamente la importancia del estudio en el estadio 13.5, debido a que durante esta etapa se forma el tubo neural del pollo y aún no hay aparición de un sistema enzimático tal como es el hígado, que pueda producir metabolitos reactivos por acción del sistema P450, y producir daño en el tejido embrionario en desarrollo.

Sin embargo la presencia de un sistema enzimático en conjunto con la tartrazina en ensayos de Ames, tienen como resultado, que los metabolitos de azocompuestos, incluidos la tartrazina, tienen alto poder mutagénico por lo tanto la exposición accidental a un mutágeno puede incrementar el riesgo de defectos congénitos durante toda la vida del individuo expuesto (King - Thom y col., 1981; Münzner y col., 1987). Cabe mencionar que la exposición a un teratógeno incrementa el riesgo de defectos congénitos en la gestación actual, pero no en las futuras, además el riesgo depende fundamentalmente del momento y del grado de exposición durante la gestación.

VIII. CONCLUSIONES

- 1 Los embriones de pollo son un modelo sensible hacia la embriotoxicidad inducida por la tartrazina durante el proceso de neurulación.
- 2 La tartrazina es teratógena a dosis inoculadas de 23 $\mu\text{g}/64\text{g}$; 233 $\mu\text{g}/64\text{g}$ y 466.5 $\mu\text{g}/64\text{g}$ durante el proceso de neurulación.
- 3 La tartrazina es un agente teratógeno por sí solo, sin la necesidad de la presencia de un sistema metabólico como el hígado.
- 4 El modelo de embriones de pollo esta libre de variables dependientes provenientes de la madre, sin embargo está sujeto a condiciones que podemos controlar.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aboel-Zahab, H., el-Khyat, Z., Sidhorn, G., Awadallah, R., Abdel-al, W., Mahdy, K. 1997. Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Biochemistry Farmacology*.Vol. 136(10): 615-627

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walker, P., 1999. *Introducción a la biología celular*.1ra Ed.,Ediciones Omega; Barcelona:266-285.

Balbani, AP, Stelzer LB, Montovani JC., 2006. Pharmaceutical excipients and the information of drug lebel. *Braz J Otorhinolaryngol*. Vol. 72(3): 400-406.

Borzelleca, JF. y Hallagan, JB. 1988. A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD & C Yellow No. 5 (tartrazine) in mice. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 3: 189-194

Borzelleca, JF. y Hallagan, JB. 1988. A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD & C Yellow No. 5 (tartrazine) in rats. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 3: 179-187

Collins, TF., Black, TN., O' Donnell, MW Jr., Bulhack, P. 1992. Study of the teratogenic potential of FD & C yellow No. 5 when given in drinking water. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 30(4): 263-268.

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

Elhkim, MO., Héraud, F., Bernrha, N., Gauchard, F., Lorino, T., Lambré, C., Frémy, JM., Poul, JM. 2007. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Vol. 47(3): 308-316.

Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations. **2002**. Food Ingredients and Packaging section 74.705 FD&C amarillo N°5. Vol. 1(21): 396.

García, DG. 2005. Implementación del modelo de embriones de pollo para el estudio del efecto de sustancias químicas durante la neurulación (el caso de progesterona). Santiago de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 26-27

Hamburguer V. y Hamilton H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Morphology*: 88: 49-92.

Henschler, D. y Wild, D. 1985. Mutagenic activity in rat urine after feeding with the azo dye tartrazine. *Archives of Toxicology*. Vol. 57(3): 214-215

Hutchinson, AP., Carrick, B., Miller, K., Nicklin, S. 1992. Adverse reactions to synthetic food colours: interactions between tartrazine and muscarinic acetylcholine receptors in isolated guinea-pig ileum. *Toxicology letters*. Vol. 60(2): 165-173

Izbirak, A., Sumer, S., Diril, N. 1990. Mutagenicity testing of some azo dyes as food additives. *Mikrobiyoloji bültani*. Vol. 24(11): 48-56

Kapadia, GJ., Tokuda, H., Sridhar, R., Balasubramian, V., Takayasu, J., Bu, P., Enjo, F., Takasaki, M., Konoshima, T., Nishino, H. 1998. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. *Cancer letters*. Vol. 129(1): 87-95

Karpliuk, IA., Volkova, NA., Okuneva, LA., Gogol', AT., Rybakova, KD. 1984. Mutagenic effect of the food-coloring agents tartrazine and indigo carmine. *Vopr-Pitan*. Vol. 2: 58-61

Kasper, LD., Braunwald, E., Fauci, AS., Hauser, SL., Longo, DL., Jameson, JL., Isselbacher, KJ. 2005. Harrison, Principios de Medicina Interna. 16^a. ed., McGraw-Hill, Chile: 1668-1669

King-Thom, C., Fulk, GE., Andrews, AW. 1981. Mutagenicity testing of some commonly used dyes. Environmental Microbiology. Vol. 42: 641-648

Klug, WS. y Cummings, MR. 2000. Conceptos de Genética. 5^a. Ed., Prentice Hall, 344-375

Koutsogeorgopoulou, L., Maravelias, C., Methenitou, G., Koutselinis, A. 1998. Immunological aspects of the common food colorants, amaranth and tartrazine. Veterinary and Human Toxicology. Vol. 40(1): 1-4

Maekawa, A., Matsuoka, C., Onodera, H., Tanigawa, H., Furuta, K., Kanno, J., Jang, JJ., Hagashi, Y., Ogiu, T. 1987. Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) in the F344 rat. Food and Chemical Toxicology. Vol. 12: 891-896

Mendenhall, W., Wackerly, D., Sheaffer, R. 1994. Estadística matemática con aplicaciones. 2da ed. Grupo editorial Iberoamericana. México: 399-440

Münzner, R. y Wever, J. 1987. Mutagenic activity of the feces of rats following oral administration of tartrazine. Archives. of Toxicology. Vol. 60(4): 328-330

Nettis, E., Colanardi, MC., Ferrannini, A., Tursi, A. 2003. Suspected tartrazine induced acute urticaria/angiodema is only rarely reproducible by oral rechallenge. Clinical and Experimental Allergy. Vol. 33: 1725-1729

Patterson, RM. y Butler, JS. 1982. Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. Food and Chemical Toxicology. Vol. 20(4): 461-465

Rao, P., Bhat, RV., Sudershan, RV., Krshna, TP., Naidu, N. 2004. Exposure assessment to synthetic food colours of a selected population in Hyderabad, India. Food additives and Contaminants. Vol. 21: 415-421

Sadler, T.W. 2002. Embriología médica con orientación clínica. 8va. ed., Médica Panamericana, Buenos Aires: 84-90 , 92-95 , 118, 119

Sobotka, T.J., Brodie, RE., Spaid, SL. 1977. Tartrazine and the developing nervous system of rats. Toxicol Enviromental Health.Vol. 2(5): 1211-1220

Stefanidou, M., Alevisopoulos, G., Chatziioannou, A., Koutselinis, A. 2003. Assessing food additive toxicity using a cell model. Veterinary and Human Toxicology. Vol. 45: 103-105

Tanaka, T. 2006. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. Food and Chemical Toxicology. Vol. 44: 179-187

Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S., Ogata, A. 2008. Effects of tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. Reproduction Toxicology. Vol.26(2): 156-163

Weliky, N. y Heiner, DC. 1985. A common pathway for chemical-induced tissue injury and immune responses leading to hypersensitivity and/or carcinogenesis. Medical Hypotheses. Vol. 16(1): 69-91