

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LOS EMBRIONES DE POLLO COMO MODELO PARA EL
ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GENÉTICA POR ESTRÓGENOS DURANTE LA
NEURULACIÓN”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA

ANA LAURA RAMÍREZ OLVERA

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

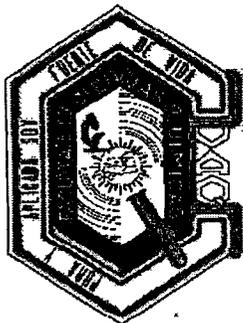
No. Adq. H69510

No. Título _____

Clas. TS

619.5

R173e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LOS EMBRIONES DE POLLO COMO MODELO PARA EL
ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GENÉTICA POR ESTRÓGENOS DURANTE LA
NEURULACIÓN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ANA LAURA RAMÍREZ OLVERA

DIRIGIDA POR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA.
SINODAL

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
SINODAL

QB. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

Agradecimientos.

Doy gracias a Dios, por permitirme llegar a este momento de mi vida y ver cumplido uno de mis más grandes objetivos.

Gracias *mamá* por tu apoyo incondicional, por tus desvelos, por tus consejos y sobre todo por ser instrumento para darme esta vida que vale la pena vivir.

A mí *papá* y *hermanos* doy gracias por acompañarme en el recorrido para alcanzar esta meta.

Gracias a la *Dra. Guadalupe* por hacerme participe en el desarrollo de este proyecto y llevarlo acabo con su apoyo.

Gracias a la *Dra. Rosalía*, a la *Dra. Berúmen* y al *Mtro Sergio* por ser parte de este proyecto.

Gracias a todos mis maestros y en especial a la *Mtra. Lety* de la *Isla*, el *Mtro Sierra*, a la *Q. Saby* y al *Mtro. Pedraza*, por transmitirme sus conocimientos.

Gracias a mis compañeros de grupo por la colaboración que tuvimos durante la carrera, en especial a *Judith* y *Adriana* por el equipo de trabajo que hicimos y por todos los momentos que compartimos, a *David* y *Ariadna* por hacer tan llevadero y ameno nuestros estudios.

Gracias a *Marco*, *Gaby V*, *Elva* y *Crity* por su amistad incondicional, por aceptarme tal y como soy, sobre todo por el aliciente que me dieron y por recordarme que soy capaz de alcanzar mis sueños.

Dedicatoria.

Dedico este esfuerzo a mi *Mamá*, a *Luis* y a *Marco* por haber confiado en mí y por creer que juntos llegaríamos a este instante.

A si mismo lo dedico a quienes si Dios lo permite conoceré en un futuro, mis hijos.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
Resumen	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Regulación de la expresión génica	2
2.2 Mecanismo de acción de los estrógenos	6
2.3 Formación del Sistema Nervioso	10
2.4 Efectos de los estrógenos durante el desarrollo	18
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	22
General	22
Específicos	22
5. Metodología	23
5.1 Materiales	23
5.2 Método	24
5.3 Método Estadístico	28
5.4 Diseño Experimental	30
6. Resultados	31
7. Discusión de Resultados	47
8. Conclusiones	50
9. Bibliografía	51

INDICE DE CUADROS

Contenido	Página
1. Diagrama de los grupos experimentales	30

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Expresión génica	3
2. Fenómeno regulatorio a distancia	5
3. Estrógenos	7
4. Interacción entre un molécula esteroidea con su receptor	9
5. Diferencias entre los tipos de huevo en las aves	11
6. Segmentación de un huevo	11
7. Formación del blastocele	12
8. Gastrulación	13
9. Anencefalia	16
10. Microcefalia	17
11. Neurulación embrionaria	25
12. Grupo control	32
13. Grupo Blanco	33
14. Embrión normal	34
15. Grupo 1. Estrógenos 0.125mg	36
16. Grupo 2. Estrógenos 0.250mg	38
17. Grupo 3. Estrógenos 0.375mg	40
18. Microcefalia	41
19. Anencefalia	41
20. Aplasia generalizada	42
21. Resorción	42
22. Relación Dosis-respuesta	43
23. Tipo de anormalidades encontradas grupo 1	44
24. Tipo de anormalidades encontradas grupo 2	45
25. Tipo de anormalidades encontradas grupo 3	46

RESUMEN

Los estrógenos son hormonas esteroideas que al unirse a su receptor pueden participar en la expresión de genes durante el desarrollo del sistema nervioso. En este trabajo se utilizaron embriones de pollo como modelo para el estudio de la alteración en expresión génica por efecto de estrógenos durante la neurulación, que es inicio de la formación del sistema nervioso. Se utilizaron huevos fértiles, para el diseño experimental que constó de un grupo control que no fue inoculado; mientras que los grupos tratados se inocularon con el vehículo (grupo blanco) o con 0.125 mg, 0.250 mg y 0.375 mg de estrógenos a las 14hrs en el estadio 4. A las 45.5hrs de incubación se llevó a cabo la disección de los embriones y fueron observados en el microscopio estereoscópico, para su clasificación como normales, anormales y resorciones. En cada grupo se estudió un mínimo de 15 embriones por tratamiento y fueron reproducidos en tres distintos lotes para obtener los resultados que fueron sometidos a un análisis estadístico. Los resultados mostraron alteraciones morfológicas tales como anencefalia, microcefalia, aplasia generalizada y vesículas cerebrales anormales. Además la exposición a estrógenos durante la neurulación generó resorciones y se observó embrioletalidad dependiente de la dosis de estrógenos administrada.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sistema nervioso inicia con la formación de la placa neural que posteriormente se invagina para dar origen al surco neural, el cual una vez fusionado se conoce como tubo neural. La división celular continúa en la parte anterior del tubo neural y se forman las vesículas cerebrales que más tarde se convertirán en el encéfalo.

Durante el desarrollo del sistema nervioso se activan distintos genes en el proceso conocido como expresión génica que consiste en transcripción y traducción. La expresión génica puede controlarse en diferentes procesos, como la transcripción la cual puede verse alterada por distintos químicos, entre los que se encuentran los estrógenos. Los estrógenos son hormonas esteroides cuyos receptores se encuentran a nivel nuclear, el complejo hormona-receptor participan en la activación de genes que pueden alterar el desarrollo normal del sistema nervioso.

Es importante llevar a cabo estudios acerca de la toxicología de los esteroides del tipo estrógeno porque son utilizados como anticonceptivos y además se encuentran químicos de este tipo como contaminantes ambientales de tal manera que la población en edad reproductiva estaría potencialmente sujeta a un exceso de dichas moléculas que pueden influir durante el desarrollo embrionario.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Regulación de la expresión génica.

En el núcleo de las células eucariotas se localiza el DNA que es el material genético con la información necesaria para iniciar el proceso de transcripción, el cual formará los diferentes RNA y más tarde las distintas proteínas que se expresan en un organismo. Una vez formado el RNA mensajero en el núcleo es madurado por la adición de un residuo de 7 metilguanósina, una serie de adeninas en la parte final y la escisión de intrones. Los transcritos maduros atraviesan los poros nucleares hasta el citosol donde se lleva a cabo la traducción.

La expresión génica puede ser controlada en distintos puntos del proceso:

- a) Regulando el momento y la frecuencia de la transcripción de genes concretos (control transcripcional).
- b) Controlando la maduración o procesamiento de los transcritos primarios de RNA (control del procesamiento del RNA).
- c) Seleccionando los mRNA maduros que serán enviados al citoplasma.
- d) Control de los mRNA citoplasmáticos que van a ser traducidos por ribosomas (control traduccional).
- e) Desestabilizando selectivamente algunas moléculas de mRNA (control de la degradación de los mRNA).
- f) Activando, inactivando o ubicando de modo selectivo las proteínas ya sintetizadas (control de la actividad proteica).

En la mayoría de los genes los controles transcripcionales son los más importantes (Alberts y col., 2000).

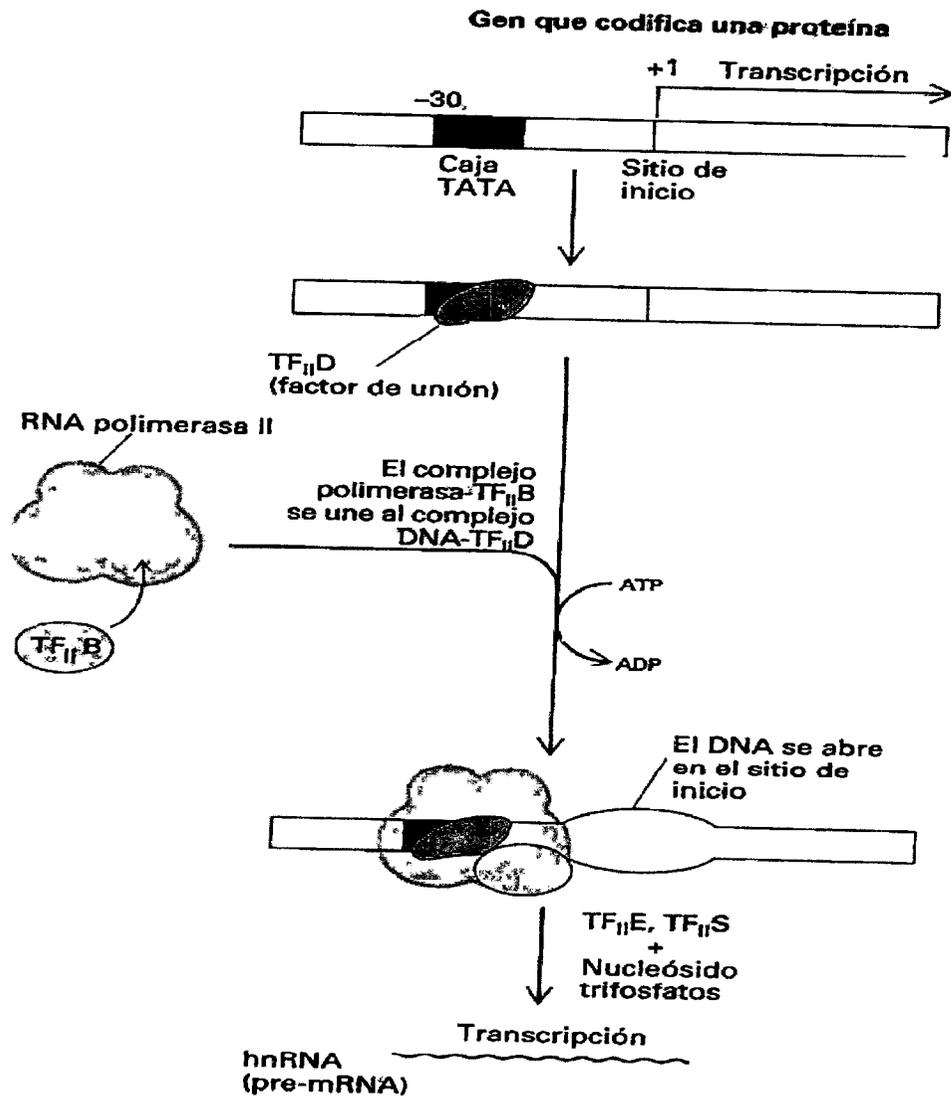


Figura1. Expresión génica. Ensamblaje de los factores generales de transcripción necesarios para la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II. El primer factor de transcripción general que se une al promotor es el TFIID, que entra en contacto directo con la caja TATA a través de la proteína fijadora de TATA (TBP). Una vez unido el TFIIB los otros factores de transcripción generales se unen secuencialmente y por último se reclutan la ARN polimerasas II y los factores asociados (Darnell y col., 1990).

El paso inicial de la expresión génica es la síntesis de los RNA, para lo cual se ubican las RNA polimerasas entre otros factores junto a una secuencia del DNA a la altura del denominado promotor del gen a ser transcrito. La RNA Pol II transcribe los genes que determinan los RNAm (Griffiths y col., 2000). Las RNA polimerasas no pueden iniciar la transcripción por sí mismas, necesitan de unas proteínas llamadas factores generales de transcripción que se unen al promotor para iniciar el proceso.

El ensamblaje comienza con la unión de TFIID a la secuencia TATA formada esencialmente por nucleótidos T y A que es un componente de casi todos los promotores. El factor de transcripción TFIID está formado por muchas subunidades. Figura 1 entre ellas esta TBP que es la responsable de reconocer la secuencia TATA, cuando se ha unido TFIID al DNA los demás factores de transcripción y la RNA Pol II también se unen, después de la unión al promotor, se separan del complejo los factores generales de transcripción para poder iniciar este proceso. Una etapa clave de la transcripción se realiza por el factor TFIIH que es una quinasa cuya función es fosforilar la enzima RNA Pol II, para dar inicio a la transcripción.

En el proceso de ensamblaje la velocidad de inicio de la transcripción puede aumentar o disminuir como respuesta a señales de regulación que son dadas por proteínas reguladoras unidas al DNA que pueden actuar incluso cuando el segmento de DNA se localiza a miles de nucleótidos de distancia del promotor que regulan. Entre las proteínas que participan, unas ejercen la función de activadoras del proceso, estas proteínas tienen al menos dos dominios; uno de ellos reconoce la secuencia reguladora específica del DNA, este dominio se activa presentando en la superficie un grupo de aminoácidos cargados negativamente (ácidos), de tal forma que aceleran el ensamblaje de los factores de transcripción en el promotor. Se cree que gracias a los activadores ácidos superan la etapa limitante a la entrada de TFIIIB para facilitar así el ensamblaje. Otras proteínas ejercen la función de represoras génicas impidiendo la transcripción (Alberts y col., 2000).

Durante el proceso de regulación, el DNA actúa como una cuerda ocasionando que interactúen las proteínas del incrementador y del promotor, de esta manera se obtiene el efecto deseado de acelerar la transcripción. EL DNA existente entre el incrementador y el promotor se dobla, lo que permite a las proteínas unirse e interactuar con los factores generales de transcripción Figura 2 (Alberts y col., 2000).

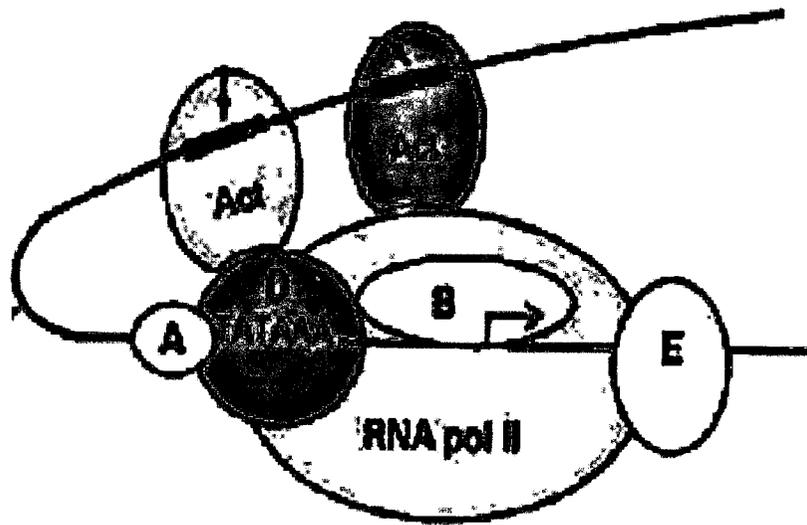


Figura 2. Fenómeno regulatorio a distancia. El DNA existente entre el incrementador y el promotor se dobla permitiendo que las proteínas unidas al incrementador interactúen directamente con uno de los factores generales de transcripción o con la propia RNA polimerasa (Alberts y col., 2000).

2.2. Mecanismo de acción de los estrógenos.

La expresión génica puede ser alterada por compuestos químicos como hormonas esteroideas del tipo estrógeno Figura 3. Estas hormonas al unirse a sus receptores, actúan regulando la transcripción de genes específicos. Una vez que la hormona se ha unido a su receptor se ensambla a la secuencia específica del promotor de genes responsables de la regulación de la transcripción. Una segunda familia de esteroides es la familia de coactivadores del receptor (SRC), que han sido utilizados para modular la actividad transcripcional de los receptores de la hormona.

El receptor nuclear para estrógenos, representa la familia más grande de los factores de transcripción. La estructura de estos receptores contienen seis regiones de homología. Los dominios funcionales de los receptores son tres: El dominio obligatorio del ligando (LBD), el dominio obligatorio de la DNA (DBD) y el dominio de la activación (AF). El DBD da los receptores específicos para los genes blancos que el receptor regula y AF es responsable de ligar los receptores al mecanismo celular transcripcional y regular la transcripción de los genes blancos.

Los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas esteroides ováricas regulan la transcripción de los genes blanco son a través de sus receptores, que se asocian a proteínas chaperonas en ausencia del ligando. El receptor esteroide de la hormona se puede activar por dos mecanismos: El primero es un mecanismo dependiente del ligando tradicional en el cual los receptores son activados por la unión de la hormona al ligando LBD, Figura 4.

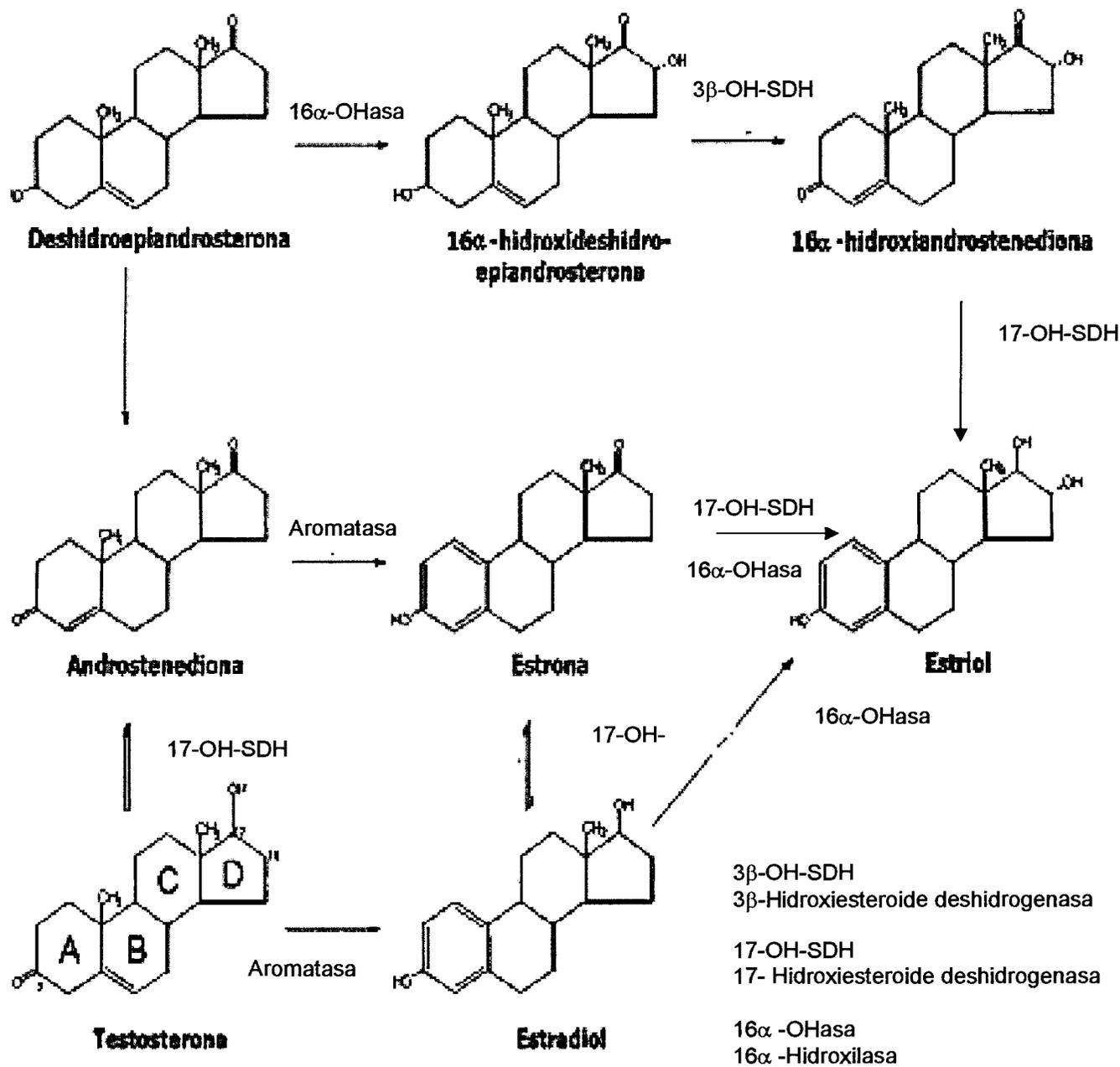


Figura 3. Estrógenos. Estructura química de los estrógenos (Florez y Amado, 1997).

El segundo es un mecanismo independiente del ligando y es el resultado de la integración de otras vías de señalización y resulta de la activación de kinasas y la fosforilación del receptor. El receptor activado entonces experimenta un cambio conformacional que da como resultado la dimerización de los receptores. Alternadamente, estos receptores logran la capacidad de unir el ERE (Elemento de Respuesta a los Estrógenos) del DNA en el promotor del gen blanco. Una vez que se ha unido el receptor activo interactúa con coactivadores los cuales posteriormente se unirán a la hormona esteroidea. Los coactivadores no solamente unen el receptor a la maquinaria transcripcional si no que también modifican covalentemente la estructura de la cromatina. Estos coactivadores acetilan las histonas y sufren un cambio conformacional que permite al DNA que incremente la accesibilidad del promotor del gen blanco al receptor activado. Estos coactivadores incluyen los miembros de la familia esteroidea del receptor (SRC), una proteína obligatoria de CREB, una proteína relacionada p300 (CBP/P300), una proteína de grupos de alta movilidad (HMGs) y ligasas de la proteína del ubiquitina E3 (E6-ap y Rpf-1). El último grupo de coactivadores dirigen al receptor activado de la hormona esteroide al complejo del proteosoma para la degradación del receptor (De Mayo y col., 2002)

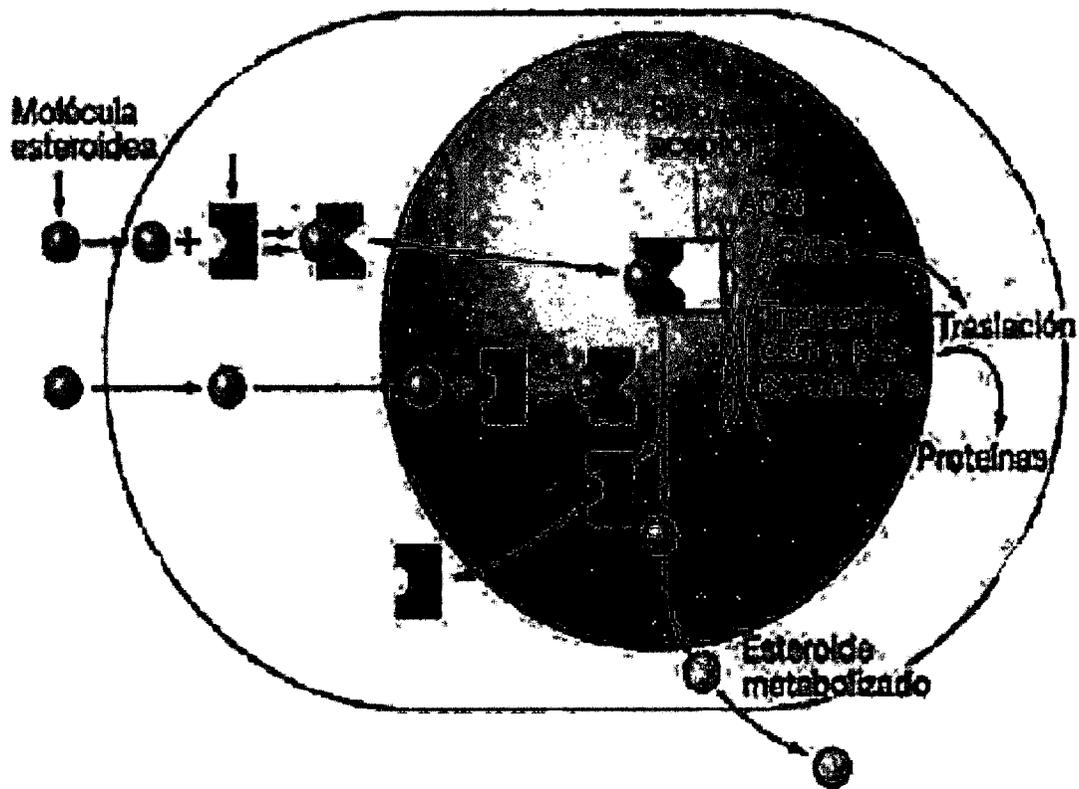


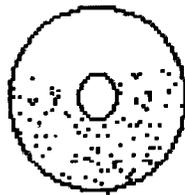
Figura 4. Interacción entre una molécula esteroidea con su receptor. Ilustración sobre la manera como los receptores de estrógenos (RE) se acoplan a los segmentos ERE (Florez y Amado., 1997).

2.3 Formación del Sistema Nervioso

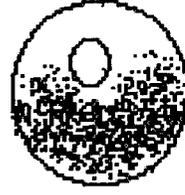
La alteración de la expresión genética por estrógenos puede modificar los procesos de desarrollo del sistema nervioso que inician cuando se lleva a cabo la fecundación por la unión del óvulo y el espermatozoide. Esta célula es totipotencial, es decir capaz de generar un individuo completo. Aproximadamente cuatro días después de la fecundación en humanos las células que se han dividido por mitosis se induce un aumento de su tamaño. Estas células se denominan blastómeras, las cuales poseen la capacidad de generar todos los tejidos y órganos del individuo en formación (células troncales o progenitoras) pero no pueden formar todos los tipos celulares necesarios para el desarrollo fetal y se les denominan pluripotentes. A medida que estas células pluripotentes se van dividiendo y diferenciando van perdiendo potencialidad evolutiva, esto es la capacidad de originar muchos tejidos diferentes, cuando alcanzan el máximo grado de diferenciación quedan circunscritas a formar un único tipo celular.

El huevo contiene la información genética necesaria para todo el desarrollo embrionario así como las sustancias nutritivas para el embrión. La mayoría de las células huevo van a tener cierta polaridad cuando el vitelo se acumula en uno de los polos del huevo. Se llama polo vegetativo donde se acumula el vitelo y polo animal al contrario, hay varios tipos de huevo según la cantidad y localización de vitelo. El huevo de pollo es telolecito Figura 5 es decir que la mayor parte del vitelo queda localizado en un polo.

CÉLULAS HUEVO



huevo poco
telolecito



huevo muy
telolecito

Figura 5. Diferencias entre los tipos de huevo en las aves. Se determina el tipo de célula al que pertenece el embrión de pollo ya que la ubicación del vitelo es de suma importancia para el desarrollo del sistema nervioso.

La segmentación Figura 6 es una serie de divisiones mitóticas que no están acompañadas por crecimiento celular. La segmentación termina en una mórula, que es un disco de 16 células que descansa sobre una masa de vitelo.

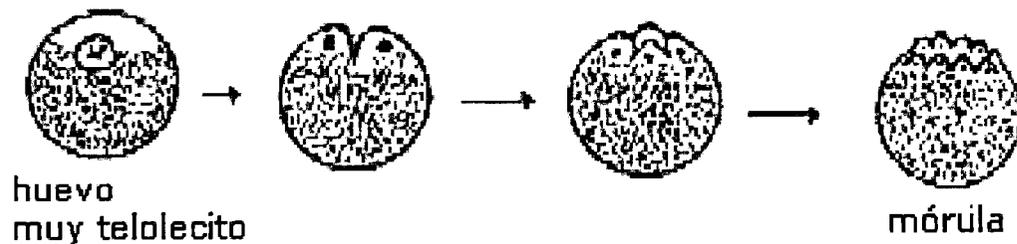


Figura 6, Segmentación de un huevo telolecito. Etapas de división por las que pasa el huevo hasta llegar a formar lo que es la mórula.

La cantidad y localización de vitelo determina la velocidad con que las células se dividen. En las zonas donde hay más vitelo la división es más lenta, los huevos se pueden dividir en planos paralelos al eje de polaridad (plano longitudinal). La segmentación que se lleva a cabo en el embrión de pollo es holoblástica, es decir desigual Figura 7. La tercera división es latitudinal (más arriba de la ecuatorial) debido a que el vitelo está acumulado en el polo vegetativo y cuando ocurre la división se hace por la zona de menor resistencia. La mórula tiene un polo animal formado por muchas células pequeñas y un polo vegetal con pocas células grandes.

La segmentación puede modificarse por las diferentes cantidades de vitelo y los patrones de división producen una masa de células llamada blástula (blastocisto en mamíferos). En el blastocisto no hay aumento del tamaño simplemente hay más células pero son más pequeñas, lo que sí aumenta es el material genético (acumulación de RNA durante la maduración del ovocito) en muchos animales estas células se disponen alrededor de una cavidad llena de fluido llamada blastocele. En las blástulas que ocurre esto se les llaman celoblásticas (donde el blastocele es excéntrico) (Salder, 1990)..

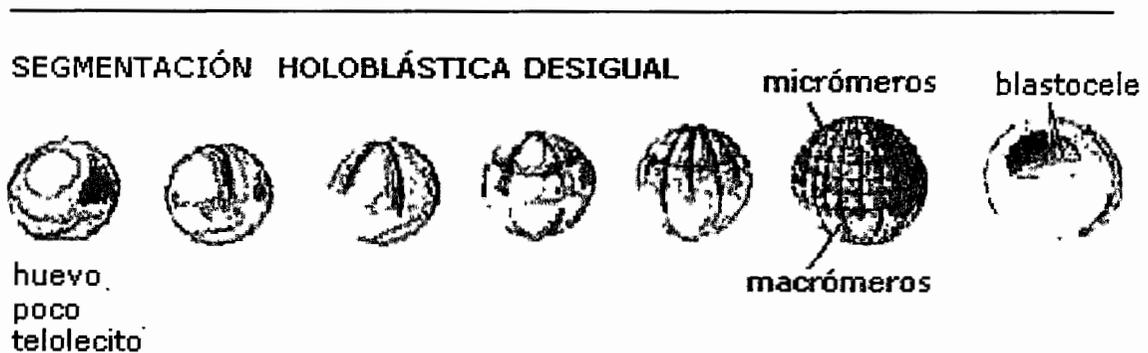


Figura 7. Formación del blastocele. Representa como se llevan a cabo las divisiones mitóticas, así como la cantidad de segmentaciones debidas a la cantidad de vitelo acumulado en cada polo.

Los macrómeros del polo animal se multiplican por mitosis y son desplazados. Puede dar como resultado que los micrómeros pueden o no llegar a unirse en el polo vegetativo. En esta gástrula la capa de células exterior (micrómeros) serán el ectodermo y las células internas (macrómeros) serán el endodermo Figura 8.

Las blástulas se convierten en gástrulas durante el proceso de gastrulación que implica un crecimiento embrionario. También se lleva a cabo una reorganización celular que induce la aparición de las capas germinales. Ahora aparecen dos de estas capas, el endodermo y el ectodermo, los primeros movimientos celulares de la gastrulación son muy parecidos en todos los animales.

En la gástrula aparece una tercera capa germinal entre el ectodermo y el endodermo a partir del ectodermo y se le conoce como ectomesodermo o mesénquima si se forma a partir del endodermo se le llama endomesodermo o mesodermo verdadero.

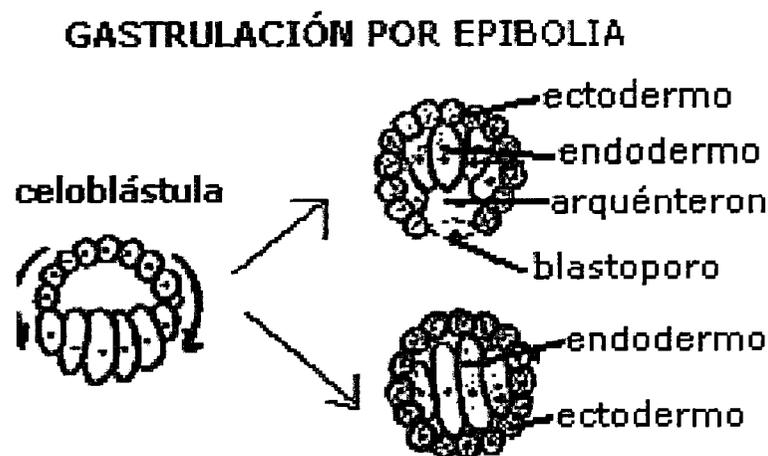


Figura 8. Gastrulación. En la cual implica un crecimiento embrionario a diferencia de las demás etapas en esta se observa el desarrollo de las capas germinales que darán origen a todos los órganos tanto internos como externos, además de la formación del SNC.

El destino de las capas germinales es: A) El mesodermo da origen a la mayoría de los órganos internos, revestimiento de las cavidades torácica y abdominal, los órganos del sistema urogenital, el riñón, las gónadas, el sistema circulatorio, la sangre, la médula ósea, el tejido linfático, el músculo esquelético, el hueso y el tejido conjuntivo. B) El endodermo que forma parte del tubo digestivo, el epitelio del tracto respiratorio, la faringe, la tiroides, el hígado y el páncreas. C) El ectodermo cubre el exterior del cuerpo, el tegumento y otras estructuras derivadas como pelo, uñas, glándulas epiteliales. revestimiento de la boca, esmalte dental, oído interno, epitelio nasal y olfativo, tubo neural a partir del que se forma el encéfalo, la médula espinal y los nervios motores; la cresta neural a partir de la que se forman: los ganglios sensoriales y los nervios, la médula adrenal, los ganglios simpáticos, el cráneo y los arcos branquiales. (Nolte, 1998).

La formación del tubo neural en el embrión ocurre cuando los bordes laterales de la lámina se curvan dorsalmente y se forman los pliegues neurales, estos se elevan cada vez más, acercándose a la línea media y finalmente se encuentran y fusionan para originar el tubo neural. La fusión de los pliegues comienza en la región de la lámina en la zona limítrofe de la médula espinal y el encéfalo, progresando hacia adentro y hacia atrás. Las últimas porciones que se cierran están situadas en los extremos cefálicos y caudal y las aberturas son conocidas como neuroporo anterior y posterior respectivamente. Al desaparecer los neuroporos, los pliegues neurales se han transformado completamente en un tubo neural cerrado. El tubo formado tiene una porción anterior agrandada, el encéfalo y una porción más angosta, la médula espinal. En la pared epitelial del tubo neural se pueden distinguir cuatro láminas o zonas; una ventral media, lámina del piso; una dorsal media, lamina del techo donde se hizo la fusión y dos láminas laterales. A medida que las paredes se engrosan, el surco limitante aparece entre el techo y el piso, dividiéndola en una porción dorsal y otra ventral, las láminas alar y basal, respectivamente. Los grupos de las células motoras se desarrollan en la lámina basal las receptoras o sensoriales en la lámina alar.

Al cerrarse la lámina neural tiene lugar una diferenciación de células a lo largo de cada borde lateral y se forma una zona intermedia entre la lámina neural y el ectodermo cutáneo. Cuando la placa se convierte en un tubo, estas zonas se juntan naturalmente en el punto de unión de los pliegues neurales, se fusionan así mismo y se desprenden del ectodermo que los cubre. La cresta neural se ubica a lo largo de la superficie dorsal del tubo neural y es acuñada entre los pliegues neurales que se fusionan. Como resultado de la desigualdad de la proliferación celular, dichas eminencias originariamente indivisas, se fragmentan en una serie de masas o bloques celulares situados a ambos lados del tubo neural, estas masas o acúmulos corresponden al metamerismo de las somitas primitivas. Son los rudimentos de los ganglios cerebrospinales, los cuales dan nacimiento a las neuronas aferentes periféricas y por lo menos en parte a las neuronas simpáticas eferentes y a algunas otras estructuras (Truex, 1963).

El cierre defectuoso del neuroporo origina la mayor parte de las malformaciones congénitas del cerebro que pueden ser ocasionadas tanto por factores genéticos como por ambientales, entre ellas se encuentran la exencefalia, meroencefalia y anencefalia. Estas graves malformaciones se producen cuando el neuroporo anterior no se cierra en forma adecuada, por consiguiente el primordio del prosencéfalo es anormal o se encuentra ausente y la bóveda craneana es defectuosa o falta por completo.

En la exencefalia parte del encéfalo del embrión tiende a salir del cráneo y se induce una mayor vascularización. Debido a la estructura y vascularización anormal del cerebro en un embrión exencefálico, el tejido nervioso se degenera y los residuos del cerebro aparecen como una masa esponjosa y vascular que contiene principalmente la estructura del romboencéfalo. Aunque esta condición se denomina anencefalia (del griego, an, sin + enkefalos, cerebro), suele estar presente un tronco cerebral rudimentario.

La meroanencefalia (anencefalia) Figura 9, es una malformación común, ocurre en aproximadamente uno de cada 1000 nacimientos y es cuatro veces más común en mujeres que en hombres. La vida extrauterina prolongada es imposible en los recién nacidos con meroanencefalia, por lo general sobreviven con mucho, unas cuantas horas después del nacimiento (Moore, 1985).



Figura 9. Anencefalia. Ausencia de la bóveda craneal así como falta de parte del encéfalo (Moore, 1985).

La microcefalia (del griego, mikros, pequeño + kephale, cabeza) Figura 10, es una rara alteración que consiste en que la bóveda craneana y el cerebro son pequeños, pero la cara es de tamaño normal. En el caso del ser humano, los recién nacidos tienen retraso mental agudo por la falta de desarrollo del cerebro (Langman, 1981).



Figura 10. Microcefalia. Muestra una cara típica, de tamaño normal, y bóveda craneal pequeña recubierta con piel laxa y arrugada (Langman, 1981).

2.4 Efectos de los estrógenos durante el desarrollo.

Los estrógenos son hormonas esteroideas que entre otras funciones participan en la regulación de la reproducción de mamíferos, así como en la expresión genética a través de su participación en la transcripción de genes. La acción de los estrógenos está mediada por receptores específicos que actúan como factores de transcripción. Una vez que los receptores se unen a la hormona interactúan con secuencias en cis en la región del promotor responsable de la transcripción de genes (De Mayo y col., 2002).

Los estrógenos alteran el desarrollo del sistema reproductivo de mamíferos, por ejemplo en ratones machos expuestos prenatalmente a diestribestrol u otros estrógenos se han reportado malformaciones estructurales en la formación de órganos sexuales (McLachlan y col., 2001). En diferentes especies como ratón y rana ha sido revisado por (Taisen y col., 2001) quienes reportaron que los roedores expuestos a hormonas sexuales durante el período prenatal y el postnatal temprano causan alteraciones permanentes e irreversibles de los órganos endocrinos y reproductivos como el ovario, útero, cérvix, vagina y glándulas mamarias en hembras, así como testículos, próstata y vesículas seminales en machos y otros órganos entre los que se incluyen los del sistema inmune y del sistema nervioso de ambos sexos.

En otras especies como los changos rhesus se observó que al aplicar dosis de estrógenos de 10, 100 y 1000 veces las de humanos en edades tempranas del desarrollo se presentaban efectos embriotóxicos (Hendrickx y col. 1987).

Se ha estudiado el efecto de estrógenos asociados a otros compuestos como la nicotina en los ratones y se observó que estas hormonas participan en el desarrollo del encéfalo aunque no se encontraron diferencias en la asociación con nicotina. (Fujii-Hannamoto y col., 1999).

En ratones se estudió el efecto de la administración de 20 μg de estriol en embriones estadio 3 de ratón aplicándolo por vía intramuscular por cuatro veces durante el período prenatal. Los resultados indican que los estrógenos afectan el desarrollo del encéfalo fetal (Seiki y col., 1997).

En hamsters se aplicaron estrógenos a machos el día de nacimiento y se indujeron cambios en los tractos reproductivos, en estos experimentos se encontró que el diestribestrol es mucho más potente que el estradiol (Shafiq y col., 1998).

(Berg y col., 1999) realizaron estudios utilizando huevos de codorniz y en base a los resultados obtenidos proponen que este sistema puede ser utilizado como una prueba in vivo para evaluar el efecto de los compuestos estrogénicos, en los que se presentan cambios morfológicos dosis dependientes. En especies acuáticas se ha observado que la exposición a estrógenos provoca cambios durante la gametogénesis (Weber y col., 2003).

Los estrógenos son morfógenos que regulan directamente el patrón de expresión de genes Hox posteriores en una manera análoga a la regulación inducida para genes Hox por el ácido retinoico. Las alteraciones en la expresión de genes Hox son un mecanismo molecular por el cual DES afecta el desarrollo del tracto reproductivo. Por lo que cambios en la expresión de los genes Hox son un marcador potencial para los efectos de la droga en útero que aparentemente actúa solo en períodos tardíos del desarrollo (Block y col., 2000).

Por tal motivo se plantea que la administración de estrógenos durante el embarazo se relaciona con algunas malformaciones congénitas, ya que una vez dentro de las células los estrógenos se unen a sus receptores nucleares que actúan como factores transcripcionales específicos y así los cambios en la expresión genética pueden afectar el desarrollo del sistema nervioso, para tal efecto se plantea la siguiente hipótesis.

3. Hipótesis:

Los estrógenos inducen cambios fenotípicos durante la neurulación en embriones de pollo.

4. OBJETIVOS

General.

Estudiar los cambios fenotípicos durante la neurulación de embriones de pollo por la administración de estrógenos.

Específicos.

- ❖ Explorar la dosis mínima a la cual los estrógenos inducen efecto teratógeno en embriones de pollo.
- ❖ Estudiar los cambios morfológicos asociados a la dosis-respuesta.
- ❖ Clasificar las diferentes anomalías a los embriones de pollo por efecto de estrógenos.
- ❖ Comparar el número de resorciones en los grupos tratados y controles al aplicar la corrección de Abbot.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales.

- Cámara digital
- Análisis de imagen
- Bioscopio
- Microscopio estereoscópico
- Incubadora: incumatic 2000
- Micropipeta
 - 1000 μ l
- Estuche de disección
- Tijeras :
 - curvas
 - rectas
- Pinzas para micro disección
 - curvas
 - rectas
- Espátula de disección
- Microtijeras para disección
- Embriones de pollo
- Jeringas de:
 - 5 ml
 - 1ml
- Cinta adhesiva
- Cloruro de sodio 0.9%
- Agua destilada
- Estrógenos: benzoato de estradiol
5 mg en solución inyectable
BENZO - GINESTRYL
Hoechst Marion Roussel

5.2 Método.

El presente trabajo se realizó en embriones de pollo libres de patógenos y se analizaron 15 embriones. Los huevos se mantuvieron a 20°C durante el período previo a la incubación.

Los embriones se incubaron un total de 45.5 h que corresponde al estadio 13 a 37 °C y una humedad de 55 % (estas condiciones permanecen siempre constantes). A las 14 h (estadio 4) después de la incubación se sacaron de la incubadora para ser inoculados con la ayuda de una micropipeta; previo a esto se realizó un pequeño orificio con una aguja, para permitir el paso de la punta de la pipeta de tal forma que se inoculen los estrógenos, una vez terminado esto se selló con cinta adhesiva y se volvieron a incubar, para completar el período de tiempo, el grupo utilizado como control también fue sometido a los diferentes cambios de condiciones.

Trascurridas las 45.5 h, (estadio 13) de incubación se procedió a abrir el cascarón del huevo por la mitad con ayuda de unas tijeras de disección, para observar la ubicación del embrión y extraerlo, con unas micro tijeras, se corta el vitelo (una membrana muy permeable que permite el paso de los nutrientes, y además protege), esto permitió maniobrar el embrión sin riesgo de que se rompa.

Una vez realizada la extracción de los embriones se colocaron en una caja petri con solución salina y se examinaron en el microscopio estereoscópico, para contar el número de somitas; se midió la longitud cráneo-caudal y caudal, así como el ancho y la apertura del tubo neural, para encontrar modificaciones en la expresión génica por los cambios fenotípicos.

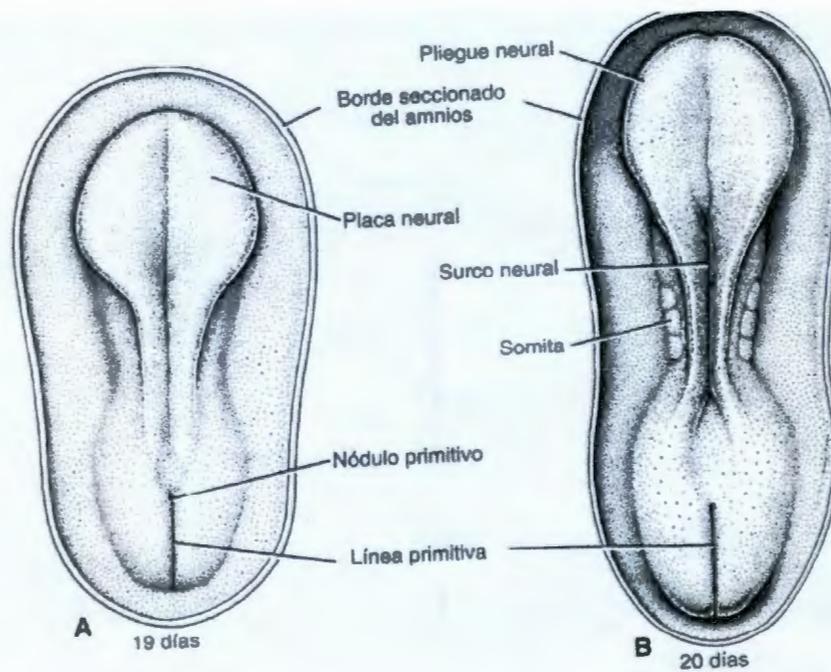


Figura 11. Neurulación embrionaria. **A.** Vista dorsal de un embrión en período presomítico. Se advierte la placa neural. **B.** Nótese la formación del surco neural y de los pliegues neurales (Salder, 1990).

La morfología de cada uno de los estadios en relación a las horas de incubación fue comparada con la reportada por Hamburger y Hamilton 1951.

Etapa 1 (4 h): Un protector embrionario puede ser visible hacia la mitad posterior del blastodermo (es una masa de células).

Etapa 2: (6-7 h) La raya inicial primitiva es corta y cónica mide (0.3-0.5 mm).

Etapa 3: (12-13 h) la raya primitiva (conocida como la placa neural) extiende sobre el centro de la raya definitiva (denominada surco neural) Figura 11.

Etapa 4: (18-19 h) La raya primitiva (cuando los bordes laterales de la lámina se curvan dorsalmente) ha alcanzado su máxima longitud 1.88 mm. El surco primitivo (es la fisión de la lámina limítrofe de la médula espinal y el encéfalo), y el nodo de Hensen está presente (que es una abertura situada en los extremos cefálicos y caudal).

Etapa 5: (19-22 h) El proceso de neurulación se extiende hacia el nodo de Hensen.

Etapa 6: (23-25 h) Los somitas aún no son visibles.

Etapa 7- 14: Se basa sobre todo en los números de pares de somitas visibles.

Etapa 7: Un par de somitas visible (23-26 h) que es realmente el segundo par del somitas, los primeros no se observan todavía claramente. Los dobleces de los nervios son visibles en la región principal.

Etapa 8: Cuatro pares de somitas (26-29 h) los dobleces de los nervios satisfacen el nivel de las islas de la sangre del cerebro medio, están presentes por la mitad posterior del blastodermo.

Etapa 9: Siete pares de somitas (29 – 33 h) presentan las vesículas ópticas primarias. El primordio del corazón comienza.

Etapa 10: Diez pares de somitas (33-38 h) primera indicación de la flexión craneal. Tres vesículas primarias del cerebro son claramente visibles. Corazón doblado levemente.

Etapa 11: Trece pares de somitas (40-45 h) leve flexión craneal. Cinco neuronas del cerebro posterior, el neuroporo anterior se está cerrando. En la base las vesículas ópticas se estrechan; el corazón inicia su formación y se dobla a la derecha.

Etapa 12: Dieciséis pares de somitas (45-49 h) la cabeza se inclina sobre el lado izquierdo. El neuroporo anterior se cierra, el telencéfalo indica las vesículas ópticas primarias y el tallo óptico en desarrollo. El primordio ótico es profundo pero se abre de par en par.

La etapa 13: Diecinueve pares de somitas (48-52 h). Las flexiones craneales y cervicales hacen amplias curvas. Ampliación del telencéfalo, el canal atrio-ventricular indicado por la constricción cubre el cerebro posterior, el cerebro medio y partes anteriores del cerebro anterior.

Etapa 14: Veintidós pares de somitas (50-53 h). La flexión craneal del cerebro posterior y del cerebro anterior casi forman un ángulo recto. La flexión cervical es una amplia curva.

5.3 Método estadístico.

El método utilizado fue la diferencia entre dos proporciones y se considera como una prueba de análisis de datos de un experimento comparativo, en el que se está interesado. Se realizaron experimentos entre los tratamientos y el grupo control y la finalidad es probar hipótesis con respecto a los parámetros de las poblaciones (Montgomery y Runger. 1996).

En general se desea probar la hipótesis nula de que dos proporciones o parámetros binomiales son iguales. Esto es, probar que $\rho_1 = \rho_2$ en contraposición a las alternativas $\rho_1 < \rho_2$, $\rho_1 > \rho_2$ o $\rho_1 \neq \rho_2$, esto equivale a probar la hipótesis nula de que $\rho_1 - \rho_2 = 0$ en contraposición a las alternativas $\rho_1 - \rho_2 < 0$, $\rho_1 - \rho_2 > 0$ o $\rho_1 - \rho_2 \neq 0$. El estadístico sobre el cual se basa la decisión es la variable aleatoria \hat{p}_1 y \hat{p}_2 , se seleccionan al azar muestras independientes de tamaño n_1 y n_2 de dos poblaciones y se calcula las proporciones de éxito \hat{p}_1 y \hat{p}_2 para ambas muestras.

$$\mu_{\hat{p}_1 - \hat{p}_2} = \rho_1 - \rho_2$$

Por lo tanto la región de aceptación y crítica pueden establecerse mediante la variable normal estándar:

$$Z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{pq[(1/n_1) + (1/n_2)]}}$$

(Walpole y Myers. 1992).

Sean ρ_1 y ρ_2 las proporciones de anomalías encontradas en los tratamientos y en el grupo control respectivamente, se determina si hay diferencia significativa entre la proporción de anomalías encontradas mediante la decisión de la hipótesis:

En donde:

$H_0: \rho_1 = \rho_2$ (la proporción de anomalías encontradas es igual para los tratamientos como para el grupo control).

$H_1: \rho_1 > \rho_2$ (la proporción de anomalías encontradas es mayor para los tratamientos comparada con el grupo control).

De esta forma al caer z en la región de rechazo, no se acepta la hipótesis de $\rho_1 = \rho_2$ y concluimos que los datos presentan suficiente evidencia para decir que el porcentaje de anomalías de los tratamientos es mayor que el de los controles (Mendenhall W. 1987).

Se utilizó la corrección de Abbott como una prueba complementaria, la cual consiste en ajustar los datos de los tratamientos con el control y eliminar las anomalías consideradas como permitidas dejando solo las que se presentaron por el fármaco de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Corrección} = 100 * \left(1 - \frac{P_{\text{no_afectados_en_el_TRATAMIENTO}}}{P_{\text{no_afectados_en_el_CONTROL}}} \right)$$

5.4 Diseño experimental.

Cuadro 1. Diagrama de los grupos experimentales.

Grupo	Estadio de inoculación	Tiempo de incubación	Estadio de Observación	Tiempo de incubación	Tratamiento
Control	_____	14 h	13	45 h	_____
Blanco	4	14 h	13	45 h	H ₂ O Estéril
1	4	14 h	13	45 h	0.125 µg/estrógenos
2	4	14 h	13	45 h	0.250 µg/estrógenos
3	4	14 h	13	45 h	0.375 µg/estrógenos

6. RESULTADOS

Control

Con objeto de conocer los cambios fenotípicos que ocurren durante la neurulación de los embriones de pollo de manera espontánea, se realizaron tres experimentos en los cuales se analizaron en promedio 15 embriones. En este y todos los grupos subsiguientes las condiciones de temperatura y humedad se mantuvieron constantes de acuerdo a lo planteado en la metodología.

El resultados del total de embriones 14.50 ± 0.84 ee se obtuvieron medias de 12.33 ± 0.71 ee embriones normales Figura 14 de 1.83 ± 0.47 ee embriones anormales y 0.33 ± 0.21 ee corresponde a las resorciones. La suma de los embriones anormales más las resorciones es 2.16 ± 0.40 ee, ver Figura 12.

Blanco

Para controlar el efecto del vehículo se plantearon experimentos con un grupo blanco en el que se les administró agua a los embriones de pollo.

Los resultados indican que del total de embriones 14.33 ± 0.33 ee se obtuvieron medias de 12.33 ± 0.33 ee embriones normales, el 1.33 ± 0.33 ee embriones anormales y 0.33 ± 0.33 ee corresponde a las resorciones. La suma de los embriones anormales más las resorciones es 1.66 ± 0.33 ee, ver Figura 13.

Al comparar los resultados de embriones anormales, resorciones y de la suma de los embriones anormales con las resorciones del grupo blanco contra el grupo control no se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros estudiados.

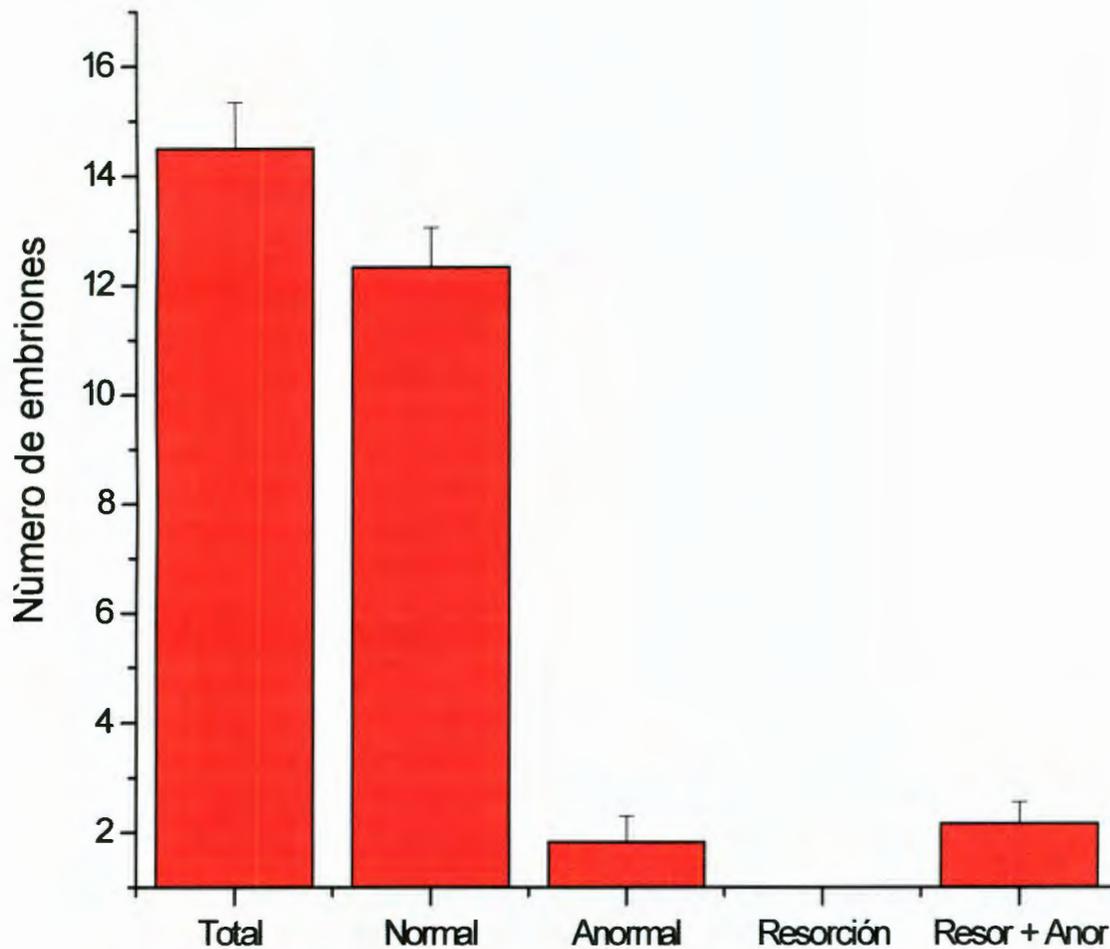


Figura 12. Grupo Control. En el grupo control se analizaron en promedio 15 embriones. En esta gráfica y subsecuentes en el eje de la abscisas se presentan los diferentes grupos analizados y en el eje de las ordenadas el valor obtenido para cada uno. La altura de las barras corresponde a la media \pm ee. Nótese que las resorciones más las anomalías da como resultado 2.16 ± 0.40 ee.

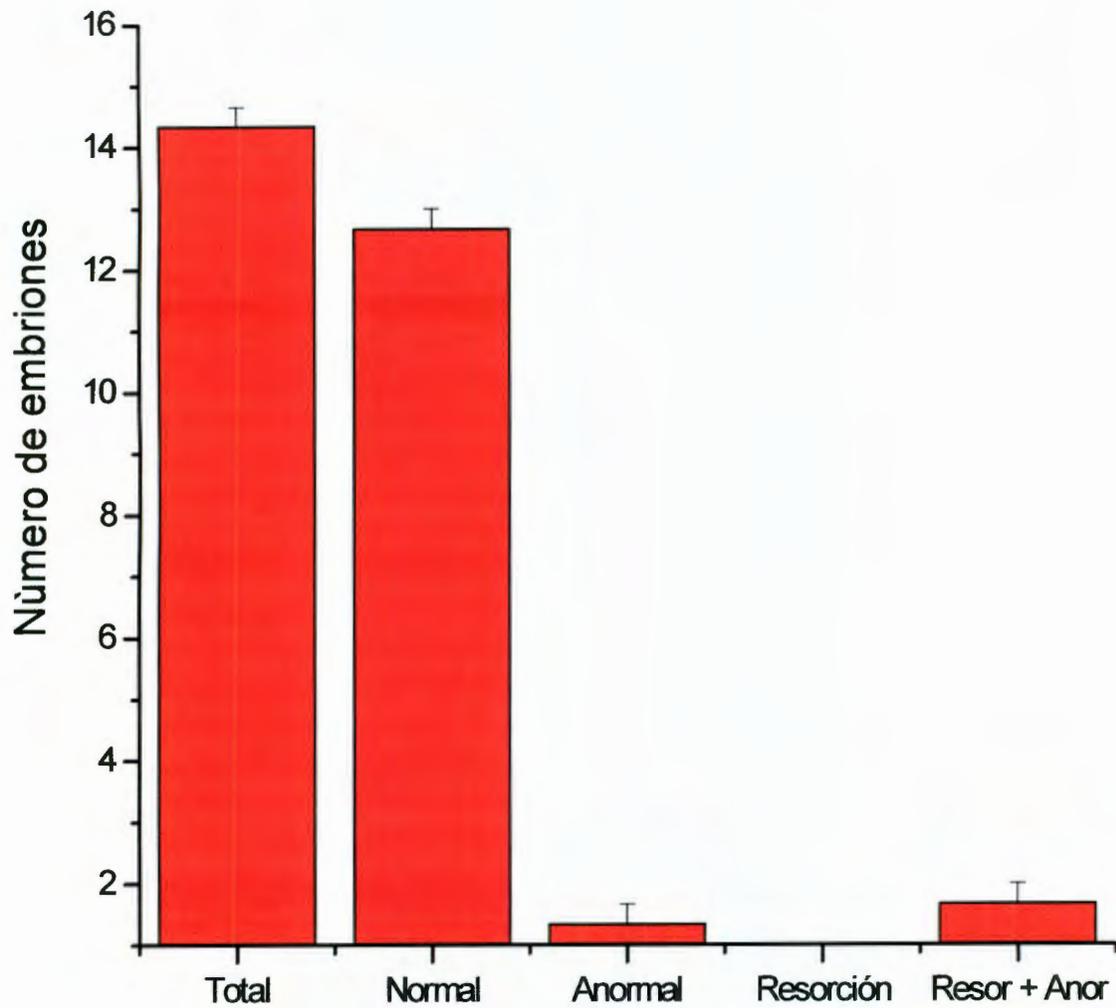


Figura 13. Grupo Blanco. A este grupo se inculó agua estéril a las 14 h, para observar el comportamiento del vehículo y observados alas 45.5 h de incubación que corresponde al estadio 13.

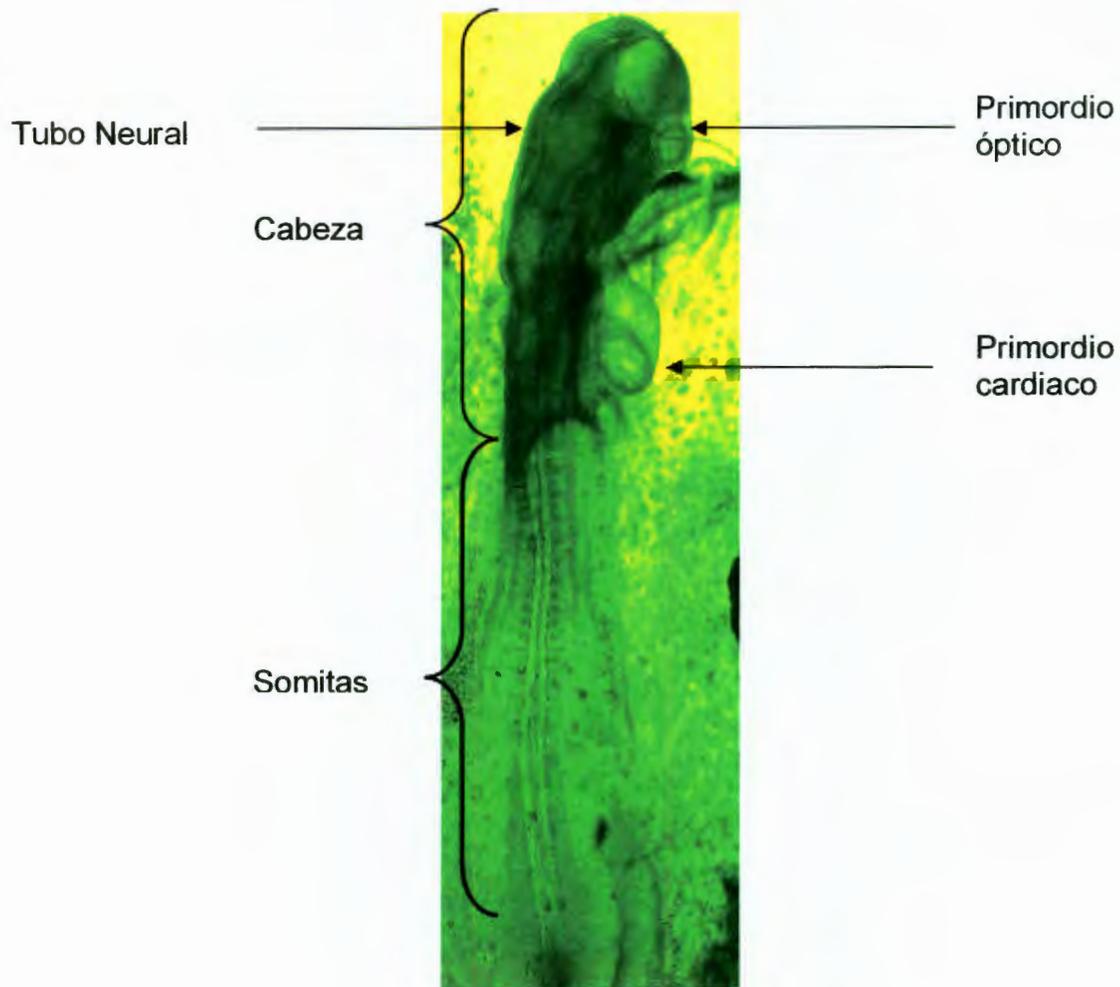


Figura 14. Embrión Normal. De 45.5 h de incubación que corresponde al estadio 13, el neuroporo posterior se encuentra cerrado y una parte del anterior abierta, se observan los somitas, los primordios óptico y ótico, así como el corazón.

Para estudiar los cambios fenotípicos inducidos por los estrógenos durante la neurulación de embriones de pollo, se trataron tres grupos experimentales con distintas concentraciones de estrógenos.

Grupo 1: 0.125 mg de Estrógenos

Se analizaron al menos tres repeticiones de embriones de pollo con estrógenos a los cuales se les administró 0.125 mg de benzoato de estradiol. El resultado del total de embriones 14.33 ± 0.66 ee se obtuvieron medias de 8 ± 1 ee embriones normales, 4.66 ± 1.20 ee embriones anormales y 1.66 ± 0.66 ee corresponde a las resorciones. La suma de los embriones anormales más las resorciones es 6.33 ± 0.88 ee . ver Figura 15.

Entre las anomalías encontradas estuvo la anencefalia Figura 19 en la cual los embriones no presentan desarrollo del encéfalo y la microcefalia Figura 18 en donde en tamaño de la cabeza es menor en relación al control.

Al comparar los resultados de embriones anormales, resorciones y de la suma de embriones anormales con las resorciones del grupo 0.125 mg de estrógenos contra el grupo control se encontró una diferencia significativa.

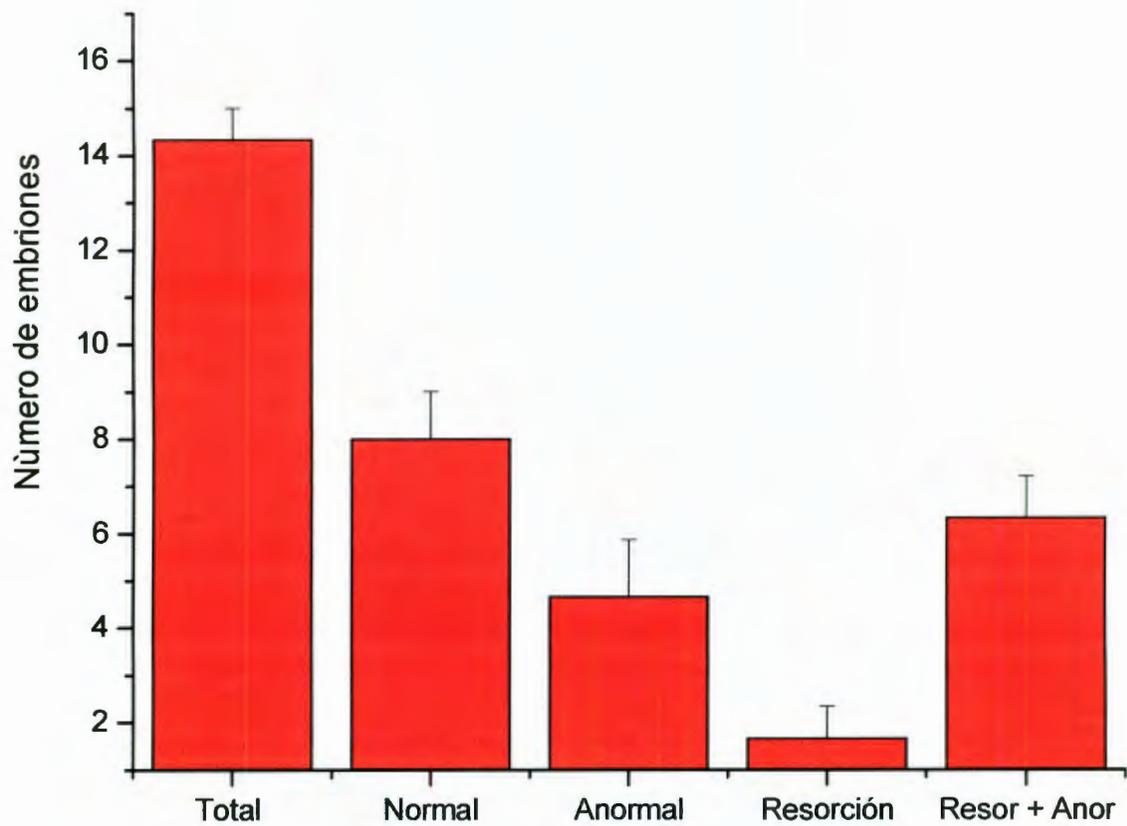


Figura 15. Grupo 1. Este grupo fue trabajado con la dosis más baja de estrógenos (0.125 mg) fueron inoculados a las 14 h y observados a las 45.5 h de incubación. En este tratamiento se puede observar un aumento en el número de resorciones y las anomalías 6.33 ± 0.88 ee, comparadas con el grupo control.

Grupo 2: 0.250 mg de Estrógenos

Se analizaron al menos tres repeticiones de embriones de pollo con estrógenos a los cuales se les administró 0.250 mg benzoato de estradiol. El resultado total de embriones 14.66 ± 0.33 ee se obtuvieron medias de 7.33 ± 0.88 ee embriones normales, 5.33 ± 1.33 ee son embriones anormales y 2 ± 0.57 ee corresponde a las resorciones. La suma de los embriones anormales más las resorciones es 7.33 ± 0.88 ee, ver Figura 16.

Entre las anomalías encontradas están la aplasia generalizada Figura 20 que es la disminución del tamaño del embrión, así como anencefalia y deficiencia de la formación de vesículas cerebrales, entre otras.

Al comparar los resultados de embriones anormales, resorciones y de la suma de embriones anormales con las resorciones del grupo 0.250 mg de estrógenos contra el grupo control se encontró una diferencia significativa.

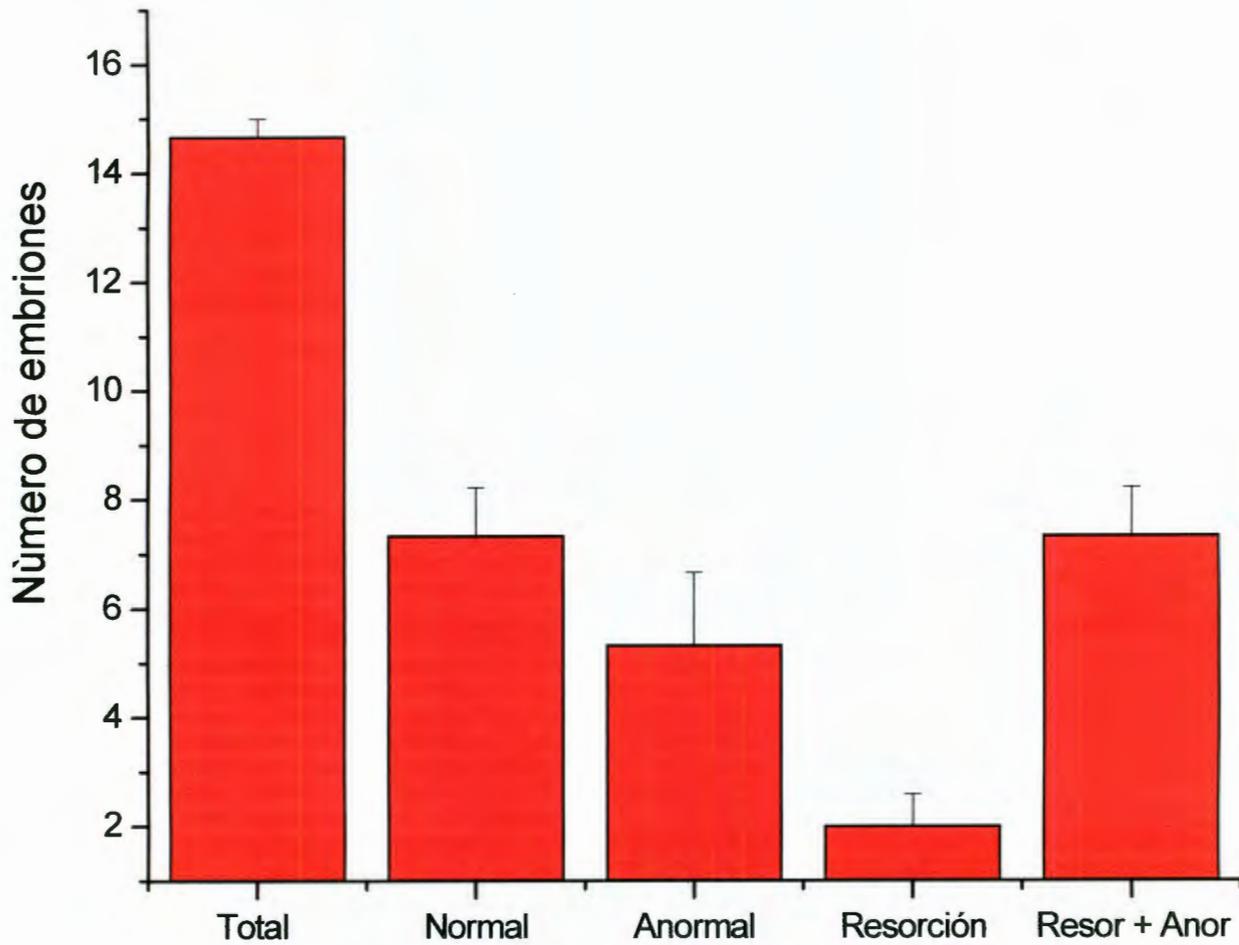


Figura 16. Grupo 2. Este grupo fue tratado con 0.250 mg de estrógenos, fueron inoculados a las 14 h y observados a las 45.5 h de incubación, mediante el estereomicroscopio. En este tratamiento se puede observar un aumento en el número de resorciones y las anomalías 7.33 ± 1.52 ee, comparadas con el grupo control.

Grupo 3: 0.375 mg de Estrógenos

El resultado total de embriones 14.66 ± 0.33 ee se obtuvieron medias de 4 ± 0.57 ee embriones normales, 8.33 ± 0.66 ee embriones anormales y 2.33 ± 0.88 ee corresponde a las resorciones. La suma de los embriones anormales más las resorciones es 10.66 ± 0.33 ee, ver Figura 17.

Las anomalías que se presentan en este grupo son aplasia generalizada, deficiencia en la formación de vesículas, así como anaencefalia, microcefalia y resorción Figura 21.

Al comparar los resultados de embriones anormales, resorciones y de la suma de embriones anormales con las resorciones del grupo 0.375 mg de estrógenos contra el grupo control se encontró una diferencia significativa.

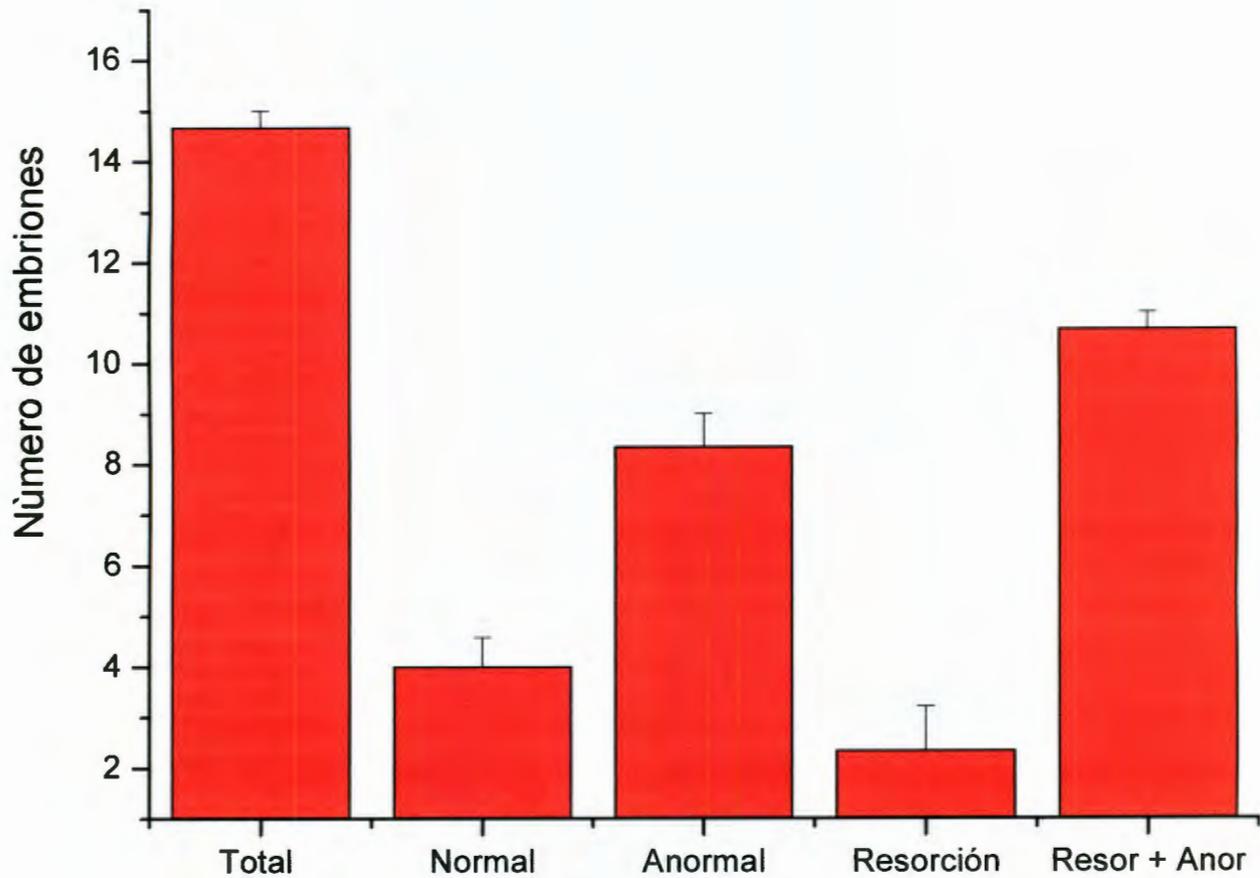


Figura 17. Grupo 3. Este grupo corresponde a la dosis más alta de 0.375mg de estrógenos, al igual que los demás grupos fueron inoculados a las 14 h y observados a las 45.5 h de incubación, mediante el estéreo microscopio. En este tratamiento se puede observar un aumento en el numero de resorciones y las anomalías 10.66 ± 0.33 ee, comparadas con el grupo control.

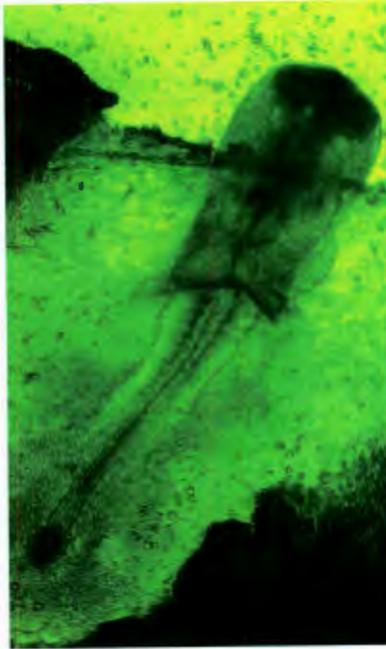


Figura 18. Microcefalia. Embrión de pollo con tratamiento de estrógenos en el cual se ve una disminución del tamaño del encéfalo respecto al control

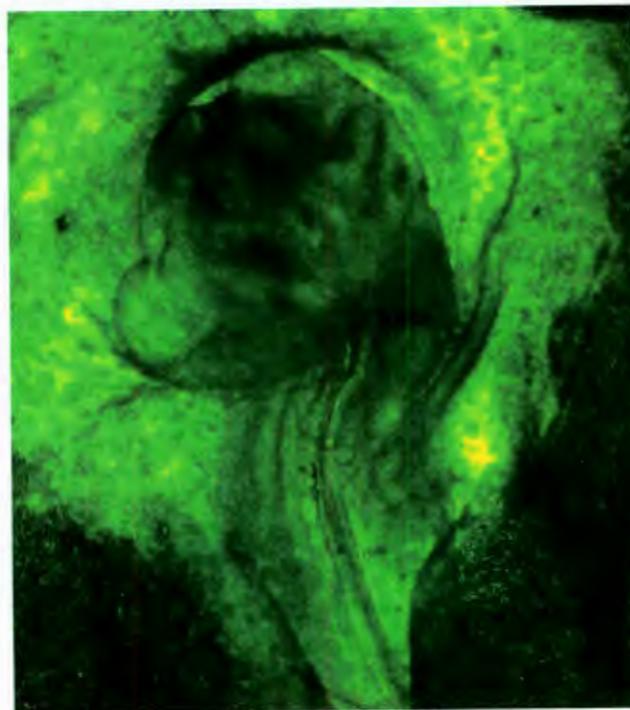


Figura 19. Anencefalia. Embrión con ausencia del encéfalo.

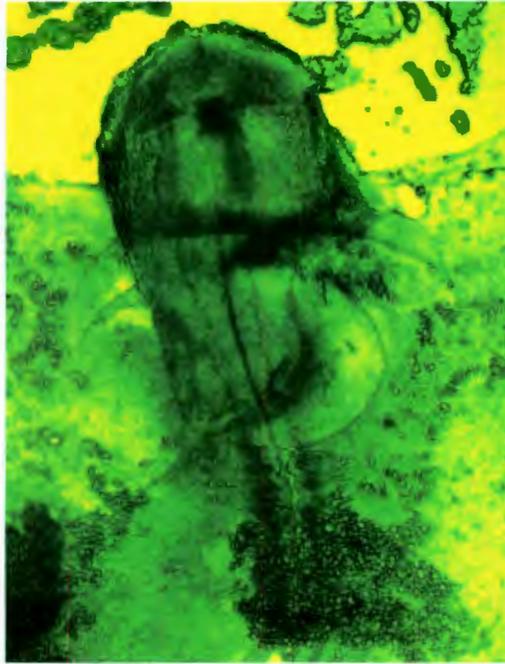


Figura 20. Aplasia generalizada. Defecto del desarrollo que da lugar a la disminución del tamaño.

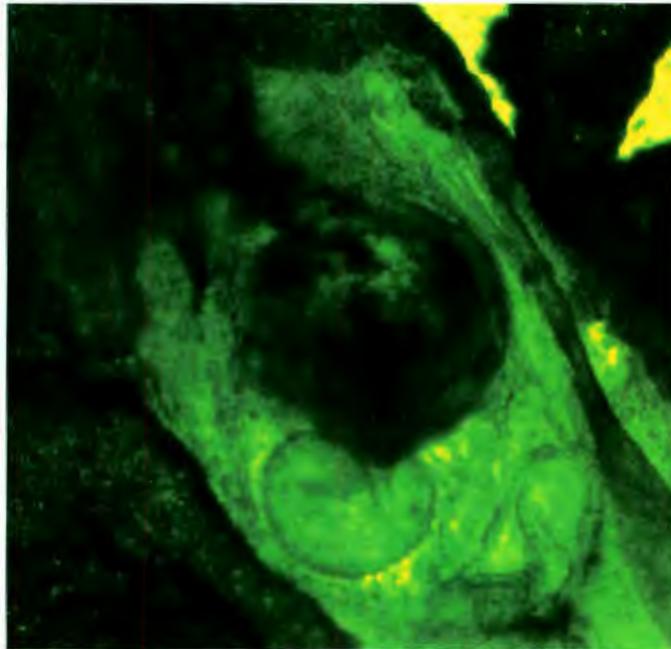


Figura 21. Resorción. La resorción se presenta cuando el embrión se ha deformado completamente.

Relación dosis respuesta y frecuencia de anomalías

Con la finalidad de conocer el efecto de la dosis respuesta en los embriones de pollo expuestos a los estrógenos, se realiza una grafica representando los grupos incluyendo el grupo control y los tres tratamientos, tal como se observa en la figura 19 se va incrementando el número de embriones anormales (dependiente de la dosis).

Con corrección de ABBOTT control por TRATAMIENTO

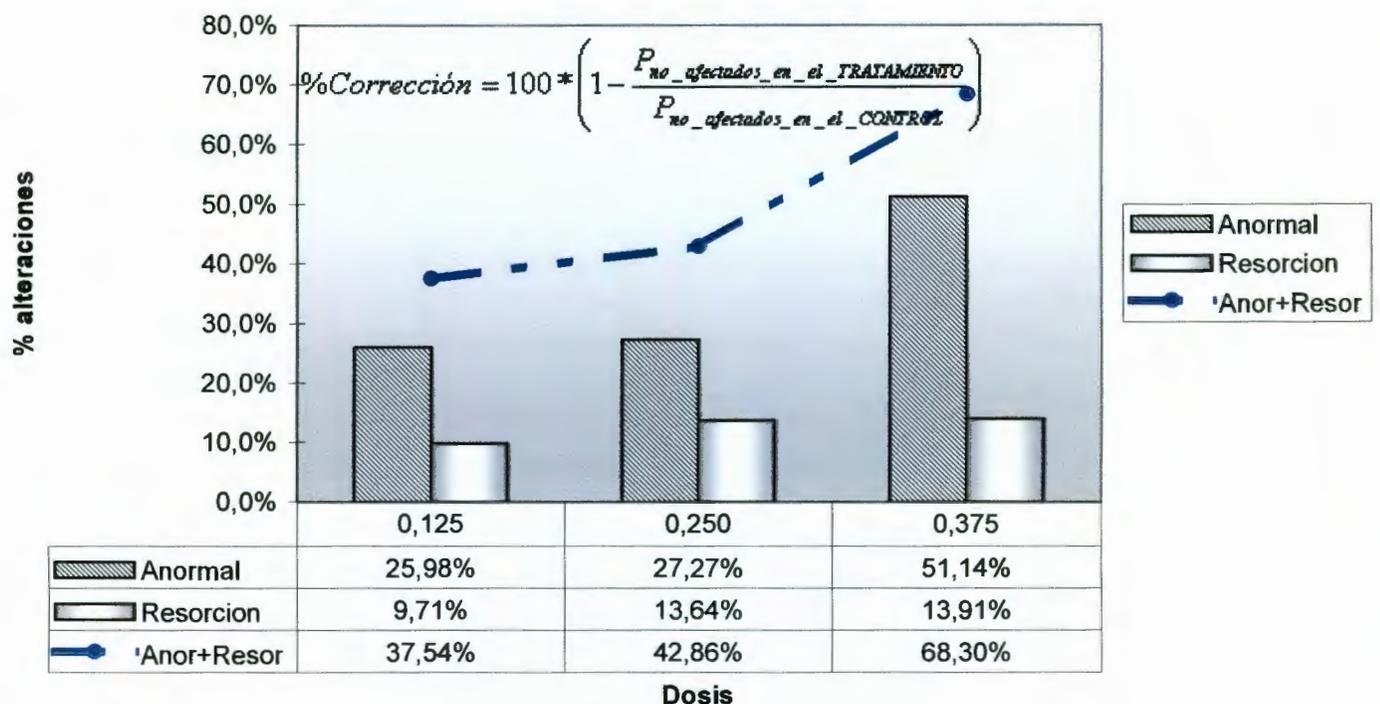


Figura 22. Relación dosis-respuesta. En este grafico se representa la Dosis Respuesta de los diferentes tratamientos en el eje de las abscisas se encuentran las diferentes dosis que se administraron y en el eje de la ordenada al origen los promedios de las anomalías más las resorciones que se presenta en cada tratamiento

Anormalidades encontradas en cada tratamiento por efectos de Estrógenos en la formación del tubo neural.

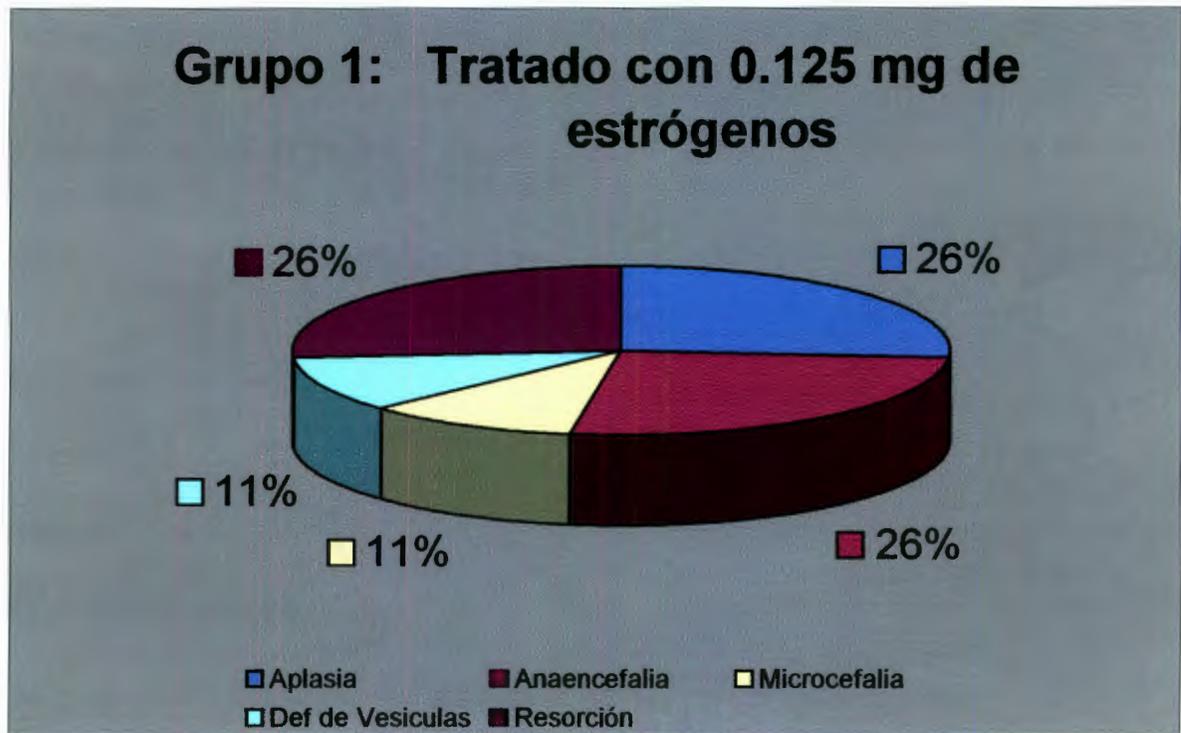


Figura 23. Tipo de anomalías encontradas grupo 1. Se observan las anomalías que se presentan y los porcentajes correspondientes a cada anomalía. Los resultados indican que la anomalía más frecuente fue la aplasia generalizada, anaencefalia y resorción con un 26%, cada uno, seguidas de la microcefalia y la deficiencia de vesículas cerebrales con 11% .respectivamente.

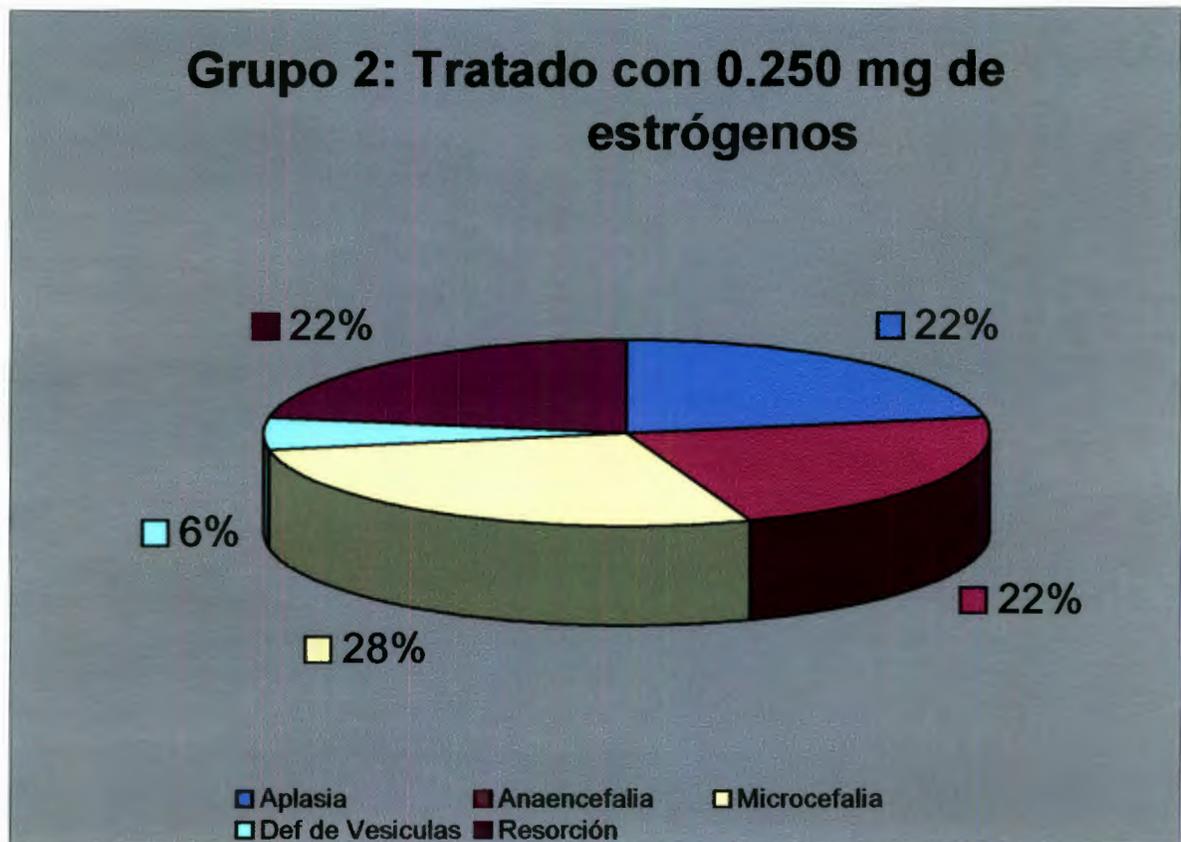


Figura 24. Tipo de anomalías encontradas grupo 2. En la periferia se observan las anomalías que se presentan y los porcentajes correspondientes a cada anomalía. Los resultados indican que la anomalía más frecuente es la microcefalia con un 28%, seguidas de la aplasia generalizada, anaencefalia, y resorción con un 22% y por último la deficiencia de vesículas cerebrales con 6%.

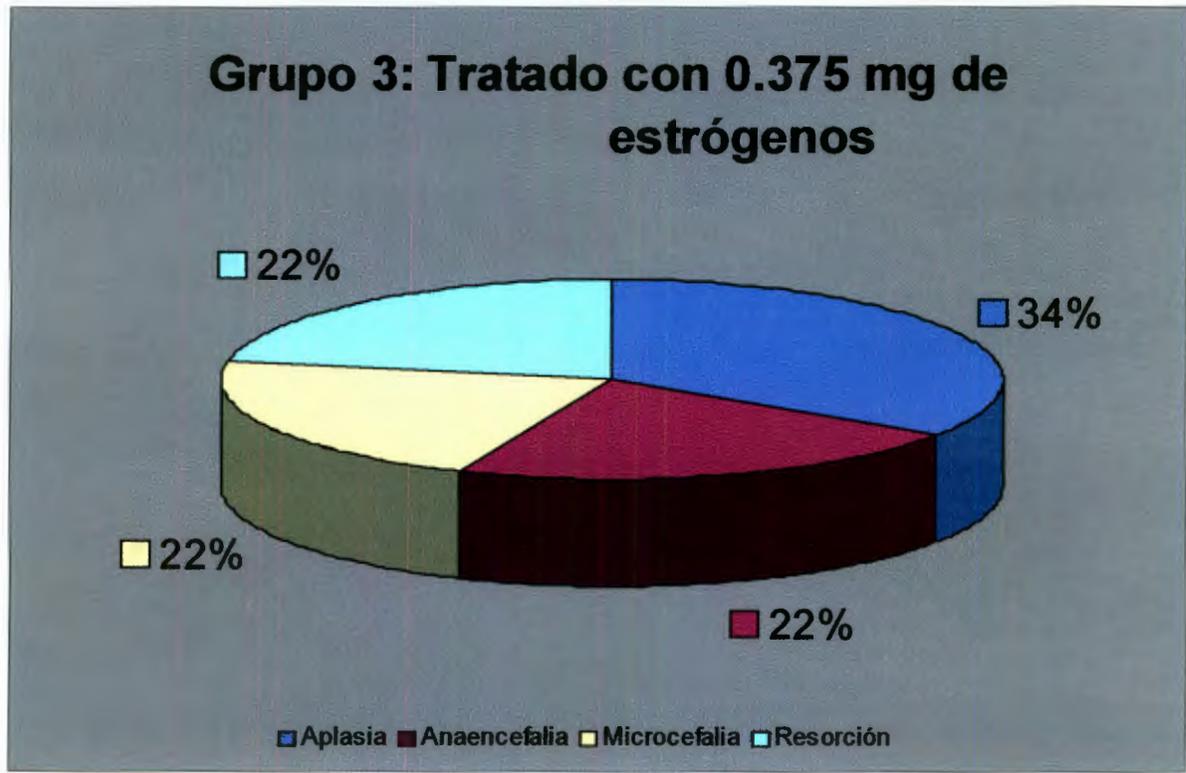


Figura 25. Tipo de anomalías encontradas grupo 3. Se observan las anomalías que se presentan y los porcentajes correspondientes a cada anomalía. Los resultados indican que la anomalía más frecuente es la aplasia generalizada con 34%, seguidas de la anaencefalia, microcefalia, deficiencia de vesículas cerebrales y resorción con 22%.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con los resultados de parámetros morfológicos del presente estudio, se puede decir que los embriones tratados y controles se encontraban en la misma etapa de desarrollo, por lo cual los cambios encontrados son efecto del químico

Las anomalías observadas en el grupo control pueden estar asociadas a mutaciones espontáneas en los que se ve alterado el programa genético originando un error en la replicación del DNA (Griffiths y col., 2000). Otra posibilidad puede relacionarse con los cambios durante la traducción o bien por efecto de algún elemento génico transponible, otra posibilidad sería asociada a la pérdida de la función de un gen responsable de la activación de otros genes o la ganancia de función de un gen que inhibe la activación del gen o genes que participan en el desarrollo del embrión durante la neurulación. De acuerdo a lo anterior las anomalías que presenta el grupo control pueden ser dadas por una gran gama de cambios hereditarios que inducen modificaciones fenotípicas, no obstante la diversidad de factores que pueden intervenir durante el desarrollo, en todos los grupos control del presente estudio los resultados fueron consistentes como lo indican los resultados.

Entre los mecanismos de acción que pudieran explicar el efecto de los estrógenos en los embriones de pollo está la afirmación de Yager, y col., 1991 quien lo asocia a la interacción con factores de crecimiento y su participación en la actividad mitógena celular, dicho efecto puede incrementar una vez metabolizado el químico como lo proponen Ni y Yager en 1994.

Con los resultados de este trabajo se puede sugerir que los estrógenos se unen eficazmente a sus receptores nucleares y esta unión hormona receptor interacciona con diferentes genes, los activa a nivel transcripcional y forma proteínas que actúan regulando su función, o reprimiendo la unión del complejo de transcripción de los genes, induciendo así la expresión en esta etapa del desarrollo generando anomalías en el embrión. Es importante considerar que no todos los estrógenos actúan de manera similar como el dietilbestrol que es 100 veces más potente que el tamoxifen y la unión a los receptores puede ser distinta (Beyer y Juchau, 1988).

Es posible que las anomalías encontradas puedan asociarse a que la concentración de estrógenos se acumulen en la célula y aumenten los receptores ocupados por este teratógeno de tal forma que se potencializa la acción de los estrógenos al permanecer más tiempo en el núcleo el complejo hormona receptor, provocando así daños severos a los tejidos en donde se presentan estos receptores estrogénicos.

Otra posible explicación de los resultados encontrados en este trabajo puede deberse a que la hormona y el receptor aumenten la susceptibilidad del tejido a ser afectados por la unión a proteínas chaperonas que son transcripcionalmente activos impidiendo la unión del complejo de transcripción de los genes que son expresados en la etapa del desarrollo, provocando así anomalías morfológicas en el embrión.

Tal como lo menciona Kolja Paech, 1997 los dos receptores descubiertos hasta el momento, desempeñan múltiples funciones de regulación de la transcripción genética, dependiendo de la sustancia o ligando asociado a ellos, y de la vía de inducción que utilicen

Los receptores estrogénicos unidos a su receptor pueden actuar como reguladores de la transcripción del ADN lo que puede relacionarse con la presencia de anomalías Figura 18, 19, 20 y 21.

El problema del efecto de embriotoxicidad de los estrógenos es importante por el uso de anticonceptivos así como los químicos liberados al medio ambiente que presentan efecto estrogénico y puede influir en los procesos tanto del desarrollo del sistema nervioso como del funcionamiento del sistema endocrino (Nishimura y col., 1997, Thorpe y col., 2003).

La actividad de los estrógenos en los cambios fenotípicos de los embriones estudiados puede asociarse a su participación en el crecimiento y diferenciación de neuritas durante el desarrollo del sistema nervioso por la mediación directa o indirecta de respuestas autócrinas o mecanismos locales parácrinos a través de interacciones con factores de crecimiento como las neurotrofinas y sus receptores, esto se ha comprobado por la coexpresión de los mensajeros que codifican para receptores de estrógenos y los mensajeros tanto de neurotrofinas como sus receptores. Los estrógenos y los factores de crecimiento pueden influenciar otras acciones por la regulación del receptor y su disponibilidad para unirse al ligando así como la regulación recíproca de los niveles de las señales de transducción o transcripción de genes. Las neurotrofinas pueden servir como "switches" para regulación de los receptores a estrógenos (Toran-Allerand CD. 1996).

8. CONCLUSIONES

- ❖ Hay cambios fenotípicos durante la neurulación de embriones de pollo por efecto de hormonas estrogénicas.
- ❖ Entre las anomalías encontradas se tienen: la anencefalia, la microcefalia, la aplasia generalizada.
- ❖ Los cambios severos por efecto de los estrógenos inducen la resorción de los embriones.
- ❖ Los efectos de los estrógenos aumentan en los embriones conforme se aumenta la dosificación del compuesto.

9. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Dennis, G., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., And Walter, P. 2000. El control de la expresión génica. *Biología de la Célula*. Ed. Omega S. A. Barcelona: 431-32 y 449-455.

Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, AK., Brandt I., Brunstrom B. 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci Total Environ.*: Vol. 3:57-66.

Beyer BK, Juchau MR. 1988. Contrasting effects of estradiol-17 beta and 17 alpha-ethinyl estradiol-17 beta on cultured whole embryos. *J Steroid Biochem*: Vol. 6: 629-34.

Block, K., Kardana, A., Igarashi P., Taylor H. 2000. In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing müllerian system. *FASEB*: Vol. 14: 1101-1108.

Darnell J., Lodish H., Baltimore D. 1990. *Biología Celular y Molecular*. Ed omega, S. A. Barcelona: 314.

De Mayo, F.J., Zhao, B., Takamoto, N., Tsai, SY. 2002. Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone. *Annals of the New York Academy Of Sciences*: Vol. 955: 48-59.

Flórez, J., Amado, JA. 1997. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Flórez J. Farmacología Humana*. Ed. Masson, S.A. Barcelona España: 866 – 871.

Fujii-Hanamoto, H. Nakano, M., He, W., Seiki, K. 1999 Effect of estrogen and nicotine on perinatal mouse brain development. *Med Sci Res*: Vol. 6: 367-73.

Glaze, GM. 1984. Diethylstilbestrol exposure in utero: review of literature. *J Am Osteopath Assoc*: Vol. 6:435-8.

Griffiths, F AJ., Gelbart, M W., Miller, H.J., Lewontin, C R., 2000. Regulación de la Transcripción. *Genética Moderna*. Ed. McGraw – Hill. Interamericana, Madrid: 448-454.

Hamburger, U., Hamilton, H., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. morphol.*: Vol. 88: 49-92.

Hayashi, N. Hasegawa, K., Komine, A., Tanaka, Y., McLachian, JA, Barrett, JC., Tsutsui, T. 1996. Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Mol Carcinog*: Vol. 3:149-56.

Hemminki, E. Gissler, M., Toukoma, H. 1999. Exposure to female hormone drugs during pregnancy: effect on malformations and cancer. *Br J Cancer*.: Vol. 7:1092-7.

Hendrickx, AG., Korte, R., Leuschner, F., Neumann, BW,.,Pahalada, S., Poggel, A., Binkerd, PE., Gunzel, P. 1987. Embryotoxicity of sex steroidal hormone combinations in nonhuman primates Norethisterone acetate + ethinylestradiol and progesterone + estradiol benzoate (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Papio cynocephalus*). *Teratology*.: Vol. 1: 119-27.

Kasan, PN., Andrews J. 1980. Oral contraception and congenital abnormalities. *Br J Obstes Gynaecol*.: Vol. 7: 545-551.

Kolia, P. 1997. Receptores de Estrógenos: Funciones antagónicas. Science: Vol. 5: 277.

Langman J. 1981. Embriología Médica. 3ª edición Ed Interamericana, México.: 134-138.

Mendenhall, W., Wackerly, D. y Scheaffer, R. 1994. Estadística matemática con aplicaciones. Grupo editorial Libreoamericana, México 2ª Ed. 399-440.

McLachlan, JA., Bold, RR., Burow, ME., Li, SF. 2001. From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters. APMIS.: Vol. 4:263-72.

Montgomery, DC., Runger GC. 1996. Probabilidad y Estadística Aplicada a la ingeniería, Ed. MacGraw-Hill, México, DF.: 370-371.

Moore, k.L. 1985. Embriología básica, 2ª edición, Ed. MacGraw-Hill Interamericana, México.: 24-49, 237-259.

Ni, N., Yager JD. 1994. The co-mitogenic effects of various estrogens for TGF-alpha-induced DNA synthesis in cultured female rat hepatocytes. Cancer Lett.: Vol. 2:133-40.

Nishimura N, Fukazawa Y, Uchiyama H, Iguchi T. 1997. Effects of estrogenic hormones on early development of *Xenopus laevis*. J Exp Zool.: Vol. 4: 221-33.

Nolte, J. 1998. "En El sistema Nervioso Central". Publicaciones Mosby/doyma libros. España. 5 – 7.

Salder, TW. 1990 Embriología Medica langman. Ed. Medica Panamericana. 6ª e. Pag. 353.

Safiq, A.K., Rebeca, B. B. and William, J. H. 1998. A case of vaginal adenocarcinoma after uterine exposure to diethylstilbestrol. Schweiz. Med Wochenschr.: Vol. 115, 1555-1561.

Seiki, K., Sakebe, k., He, W., Fujii-Hanamoto, H., Nakano, M. 1997 Effect of estrogen on mouse brain development in the perinatal period. Med Sci Res.: Vol. 11: 771-4.

Taisen, I., Hajime, W., Yoshinao, K. 2001. Developmental Effects of Estrogenic Agents on Mice, Fish, and Frogs: A Mini-Review. Hormones and Behavior.: Vol. 40: 248-251.

Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. Environ Sci Technol.: Vol. 6:1142-9.

Toran-Allerand CD. 1996. Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors?. J Steroid Biochem Mol Biol.: Vol. 56: 169-78.

Truex, CR. 1963 Desarrollo del sistema nervioso. "En Neuroanatomía Humana", 4^{ta} edición. Ed., El atenzo, México: 11-14.

Yager, JD., Zurlo. J., Ni, N. 1991. Sex hormones and tumor promotion in liver. Proc Soc Exp Biol Med.: Vol. 2: 667-74.

Walpole, RE., Myers, Rh. 1992. Probabilidad y Estadística. "En Prueba de hipótesis", Ed. McGraw – Hill, estado de México,: Vol. 347-349.

Weber, LP., Hill, RL Jr., Janz, DM. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat Toxicol.*: Vol. 4:431-46.

William, S., Branham, S L., Dial, CL., Moland, B S., Hass, RM., Blair, HF., Leming, S., Weida, T., Roger, G., Perkins and Daniel MS. 2002. Phytoestrogens and Mycoestrogens Bind to the Rat Uterine Estrogen Receptor. *J. Nutr.*: Vol.132: 658-664.