

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"EFECTO DEL EXCESO DE ÁCIDO FÓLICO EN EL
DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO DE
EMBRIONES DE POLLO"**

TESIS

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

PRESENTA

ANDRÉS VILCHIS ÁLVAREZ

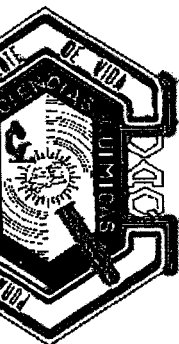
DIRIGIDA POR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H70194
No. Título _____
Clas. TS
619.5
V699e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL EXCESO DE ÁCIDO FÓLICO EN EL
DESARROLLO TEMPRANO DEL SISTEMA NERVIOSO DE
EMBRIONES DE POLLO”**

TESIS

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

PRESENTA

ANDRÉS VILCHIS ÁLVAREZ

DIRIGIDA POR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
DIRECTOR

QB SERGIO PACHECO HERNANDEZ
SINODAL

QB J. SUSANA FLORES ROBLES
SINODAL

Dra. LAURA C. BERUMEN SEGURA
SINODAL

RESUMEN

Existen reportes de que el ácido fólico administrado a mujeres en edad reproductiva incrementa el tamaño de los embriones de madres gestantes así como su sobrevivencia, por lo que en los últimos años se ha extendido el uso de productos adicionados con dicho compuesto. Sin embargo es poco conocido el efecto tóxico del ácido fólico en dosis acumuladas sobre los embriones, específicamente durante el inicio de la formación del sistema nervioso en el proceso conocido como neurulación. En este trabajo se utilizaron embriones desarrollados en huevos de aves libres de patógenos, incubados a 37°C durante 14 hrs, a los que se administraron dosis de 25X, 50X y 100X la recomendada a humanos, siendo X la dosis de ingesta diaria indicada a las mujeres embarazadas. Los embriones fueron disecados y estudiados 45.5 hrs más tarde. Los resultados indican un incremento en las anomalías con las dosis administradas siendo la de mayor frecuencia aplasia generalizada. Los resultados de estos estudios sugieren que en el ácido fólico, es importante la dosificación adecuada para evitar reacciones adversas. Al comparar las medias de los grupos control y blanco con la de los embriones tratados presentaron diferencia estadísticamente significativa. Es importante continuar los estudios en ésta línea para optimizar el uso de sustancias químicas y evitar la inducción de defectos del tubo neural por deficiencia o acumulación de ácido fólico.

INDICE GENERAL

	Página
Contenido	i
INDICE GENERAL	ii
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
II.1 Ácido fólico	2
II.2 Regulación de la expresión genética	4
II.3 Transcripción	8
II.4 Embriología del sistema nervioso (Neurulación)	16
III HIPÓTESIS	36
IV OBJETIVOS	37
General	37
Específicos	37
V MATERIALES Y METODOS	38
V.1 Materiales	38
V.2 Metodología	38
VI RESULTADOS	41
VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
VIII CONCLUSIONES	56
IX BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentraciones de ácido fólico utilizadas en el experimento	39

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de regulación genética	6
2	Promotores y activadores de la transcripción	11
3	Transcripción de DNA	15
4	Proceso de neurulación	26
5	Resultados del grupo control	41
6	Porcentajes de malformaciones del grupo control	42
7	Resultados del grupo tratado con 25X de ácido fólico	43
8	Porcentajes de malformaciones del grupo tratado con 25X de ácido fólico	44
9	Resultados del grupo tratado con 50X de ácido fólico	45
10	Porcentajes de malformaciones del grupo tratado con 50X de ácido fólico	46
11	Resultados del grupo tratado 100X de ácido fólico	47
12	Porcentajes de malformaciones del grupo tratado con 100X de ácido fólico	48
13	Descripción de un embrión normal	49
14	Descripción de una microcefalia	50

I INTRODUCCIÓN

El estudio de sustancias químicas que alteran la expresión de genes durante el inicio de la formación del sistema nervioso, es importante porque las deficiencias en el desarrollo del tubo neural son un problema que aqueja a un porcentaje importante de recién nacidos. Los defectos del tubo neural pueden ser causados al alterarse el desarrollo embrionario por factores genéticos, ambientales ó metabólicos. Entre las investigaciones que han aportado posibles soluciones a los defectos del tubo neural, están aquellas que proponen complementar la alimentación de las mujeres gestantes con una dosis de ácido fólico de 400 µg, con lo cual se ha reportado una disminución de hasta un 70-75% de los defectos del tubo neural. Sin embargo, la alta ingesta de ácido fólico y su relación con la inducción de embriotoxicidad no ha sido evaluada, por lo que en este trabajo se propone como objetivo. Para explorar el efecto de un exceso en la ingesta de ácido fólico, es necesario conocer las etapas del desarrollo embrionario así como los procesos que se efectúan durante el mismo. El modelo de embriones de pollo para el estudio de sustancias químicas durante la neurulación es importante para la especie humana ya que dicho proceso es similar en ambas especies.

II ANTECEDENTES

II.1 ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico, también conocido como folato, es una vitamina B, amarilla cristalina, soluble en agua, con bandas de absorción características en las regiones ultravioleta e infrarroja del espectro. Entre sus principales funciones están los trasposos de fragmentos de 1C, de los que destacan aquellos que forman C₂ y C₈ del núcleo purínico, la formación de metionina a partir de homocisteína y la formación de timina a partir de uracilo, así como la conversión de serina en glicina donde interviene el residuo hidroximetilo (Laguna, 1974). Los vegetales de hoja verde y la levadura son buenas fuentes de ácido fólico, así como algunos microorganismos que pueden suministrar al hombre y otras especies animales por síntesis intestinal. El contenido de ácido fólico en granos y vegetales de hoja verde varía desde 20-30 hasta 100 µg por 100 g (West y col., 1976).

Una de las coenzimas derivadas del ácido fólico es el tetrahidrofato (FH₄), que participa en las reacciones implicadas en la transferencia de grupos -CH₂OH, -CHO, y -CH=NH. La molécula de ácido tetrahidrofólico se considera compuesta de tres partes distintas y unidas covalentemente: 1) un grupo de pteridina sustituido y reducido; 2) ácido para-aminobenzoico; y 3) ácido glutámico. El ácido tetrahidrofólico representa la forma metabólicamente activa de una vitamina esencial para la mayoría de los mamíferos, incluyendo el hombre. En este caso, la vitamina precursora es el ácido fólico, que se convierte en estado tetrahidro a través de una especie dihidro por medio de dos hidrogenaciones sucesivas dependientes de NADPH, ambas catalizadas por la reductasa del ácido tetrahidrofólico. De las tres especies, sólo la forma tetrahidro tiene actividad como coenzima. La participación de FH₄ como agente de transferencia de compuestos de un carbono se debe a su capacidad para formar compuestos con enlace covalente simple en los átomos de nitrógeno en las posiciones 5 y 10 o compuestos tipo puente entre las posiciones 5 y 10. El suministro de fragmentos de un carbono para la biosíntesis de timina y purinas es el aspecto más importante de la función

biológica del FH_4 . Una indicación de su función puede verse en el efecto de muchas sulfas, que actúan como potentes inhibidores en la biosíntesis microbiana del ácido fólico. Presumiblemente, la base de la inhibición es competitiva, evitando la incorporación de la molécula de ácido para-aminobenzoico en el compuesto. El bloqueo es fatal para el organismo. El hombre no puede sintetizar ácido fólico y por lo tanto, debe tomarlo de otras fuentes. Sin embargo, las recomendaciones dietéticas diarias son bajas, puesto que la mayoría de los requerimientos del hombre se satisface mediante la síntesis realizada por las bacterias de la región intestinal (Bohinski, 1978).

El ácido fólico requiere mantenerse en forma reducida, necesaria para la formación de la coenzima, misma que es mantenida por el ácido ascórbico. Se ha propuesto que el ácido ascórbico protege a la reductasa de ácido fólico y que los antagonistas del ácido fólico como aminopterina y ametopterina, inhiben esa protección e inactivan la reductasa. Las diferentes formas de coenzima del ácido fólico participan en el metabolismo de elementos de un carbono –varias reacciones metabólicas específicas en las cuales son transferidas unidades de un carbono para la síntesis de diversas moléculas. Algunos ejemplos de éstas reacciones podemos mencionar: 1) interconversión serina-glicina, 2) síntesis de purina y pirimidina, 3) relaciones entre metionina y homocisteina (síntesis de metilo), 4) síntesis de histidina, 5) formación de formiminoglutamato y otras reacciones de un carbono (West y col., 1976).

II.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

La expresión genética se refiere a la conversión de las instrucciones genéticas del DNA en RNA utilizando genes de forma selectiva, para que, al activarlos o inhibirlos, produzca diferentes proteínas que pueden actuar como enzimas metabólicas cuyas funciones dependen de las fuentes de alimento disponibles. Existen cuatro etapas en las que se puede controlar la expresión genética, la primera es el control transcripcional; esta etapa es el lugar de control principal para dicha expresión; la segunda es la de control de procesamiento del RNA; la tercera es la de control de la traducción; y la cuarta es la de control de la actividad de la proteína.

En los organismos pluricelulares, los distintos tipos de células se producen porque durante el proceso de diferenciación celular expresan diferentes grupos de genes. En las células, la transcripción de los genes es activada o reprimida por proteínas reguladoras. Estas proteínas reguladoras actúan uniéndose a secuencias cortas de DNA denominadas secuencias reguladoras.

Las proteínas de regulación génica reconocen cortas secuencias específicas de DNA de doble hélice y de ese modo determinan cuáles de los miles de genes de una célula se han de transcribir. Se han identificado centenares de proteínas de regulación génica en una amplia variedad de organismos. Aunque cada una de estas proteínas tiene una serie de rasgos únicos, muchas se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros que reconocen al DNA mediante uno de entre un pequeño número de motivos estructurales. La secuencia de aminoácidos que se pliega en el dominio determina la secuencia de DNA que será reconocida (Alberts y col., 1999).

La regulación de la expresión genética en células eucariotas requiere la presencia de una serie de proteínas denominadas factores de transcripción, que han de ensamblarse al promotor antes de que la transcripción pueda iniciarse. Muchas

proteínas reguladoras eucariotas pueden actuar incluso cuando se encuentran unidas al DNA a miles de nucleótidos de distancia (Etienne, 2001).

El DNA situado a miles de nucleótidos de distancia de un promotor eucariota puede activar la transcripción desde el promotor. Estas secuencias incrementadoras o activadoras (enhancer), actúan como lugares de unión de proteínas reguladoras que incrementan o activan la transcripción. 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 o con la propia RNA polimerasa. El DNA participa como una cuerda, provocando que las proteínas unidas al incrementador, incluso a miles de nucleótidos de distancia, colisionen repetidamente con las proteínas unidas al promotor. Debido a que las proteínas reguladoras pueden controlar la transcripción incluso cuando se encuentran unidas al DNA lejos del promotor, las secuencias que controlan la expresión de un gen pueden estar dispersas sobre largas cadenas de DNA. Se utiliza el término región de control del gen para indicar las secuencias de DNA necesarias para iniciar la transcripción del gen, y las necesarias para regular la frecuencia con que tiene lugar esa iniciación.

Un promotor eucariota tiene sitios donde se ensamblan los factores generales de transcripción y la polimerasa, más todas las secuencias reguladoras a las que se unen las proteínas reguladoras para controlar la velocidad de ese proceso de ensamblaje sobre el promotor. La Figura 1 muestra el proceso completo de la regulación de la expresión genética, a partir de una doble cadena de DNA hasta la traducción y la formación de la proteína.

Las proteínas reguladoras varían de gen a gen y muchas de ellas reconocen su secuencia específica de unión utilizando uno de los motivos estructurales de unión a DNA. Estas proteínas permiten que cada gen pueda ser activado o desactivado específicamente.

La mayoría de las proteínas reguladoras que activan la transcripción de los genes tienen un diseño modular de al menos dos dominios. Uno de ellos contiene uno de los motivos estructurales capaces de reconocer una secuencia reguladora específica en el DNA. El otro dominio entra en contacto con la máquina de transcripción y acelera la frecuencia de inicio de transcripción (Alberts y col., 1999).

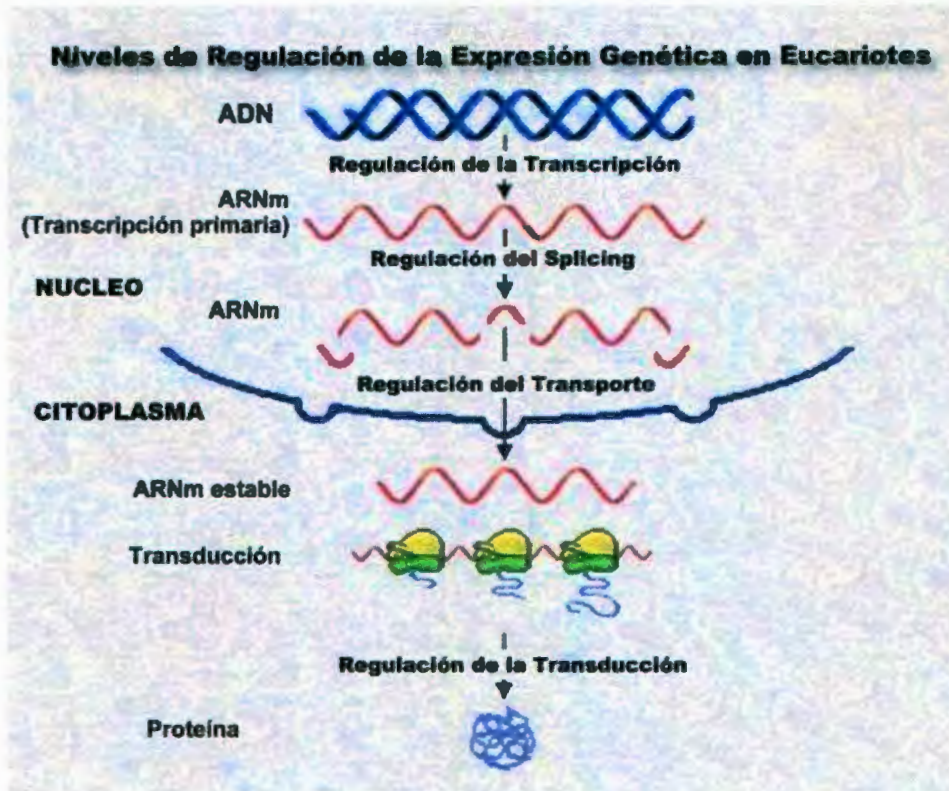


Figura 1. Se muestra el proceso de regulación de la expresión genética a partir de una doble cadena de DNA hasta la formación de la proteína.

En una de las clases de proteínas activadoras génicas, el dominio de activación presenta en su superficie un grupo de aminoácidos cargados negativamente. Estos activadores acídicos actúan acelerando el ensamblaje de los factores generales de transcripción en el promotor. El proceso de ensamblaje en el promotor podría tener más de una etapa limitante, y el nivel máximo de transcripción podría depender de varios activadores génicos unidos a la región anterior, de modo que cada uno de ellos aceleraría una etapa diferente. Para que una proteína reguladora pueda influir en la transcripción, su promotor diana ha de estar unida directa o indirectamente al DNA.

Las proteínas activadoras eucariotas catalizan la acción de la polimerasa contactando con la maquinaria de transcripción. Muchas proteínas reguladoras eucariotas actúan como proteínas represoras génicas impidiendo la transcripción. Además de las proteínas represoras que actúan sobre genes individuales, las células eucariotas pueden utilizar otros mecanismos para impedir la expresión en grandes regiones del cromosoma, este mecanismo se basa en la modificación de la cromatina. Existen cuatro maneras de actuar de las proteínas represoras eucariotas:.

- 1) Las proteínas activadoras y represoras compiten por la unión a la misma secuencia de DNA regulador.
- 2) Ambas proteínas pueden unir DNA, pero el represor forma un complejo con el dominio de activación, evitando que entre en contacto con la maquinaria de transcripción.
- 3) El represor interacciona con un nascente complejo de factores generales de transcripción, impidiendo que el proceso de ensamblaje continúe.
- 4) Otra manera puede ser por un mecanismo de control negativo: la inactivación de activadores génicos por heterodimerización.

Aunque algunas proteínas reguladoras de células eucariotas pueden actuar independientemente, la mayoría de ellas forman parte de un complejo formado por diferentes polipéptidos, cada uno de los cuales tiene una función distinta. Frecuentemente el complejo se ensambla únicamente en presencia de la secuencia de DNA adecuada.

Una proteína reguladora determinada puede participar en más de un tipo de complejo regulador. Una proteína puede actuar en un caso como parte de un complejo que activa la transcripción, y en otro caso en un complejo que la inhibe. El ensamblaje de pequeños complejos de proteínas reguladoras sobre el DNA es un segundo mecanismo de control combinatorio.

Se ha estimado que un cierto porcentaje de la capacidad de codificación de un genoma está dedicado a la síntesis de proteínas que actúan como reguladores de la transcripción génica. Esto es un reflejo de los complejos controles que regulan la expresión de genes en mamíferos.

Uno de los ejemplos mejor conocidos de región reguladora compleja en mamíferos es la del gen de β -globina humano, que se expresa exclusivamente en los eritrocitos y en un momento determinado de su desarrollo. La expresión del gen está controlada por un complejo de proteínas reguladoras, algunas de las cuales actúan como activadoras y otras como represoras (Alberts y col., 1999).

II.3 TRANSCRIPCIÓN

Un gen es una porción de DNA del cual se transcribe una cadena que dará lugar a numerosos mRNA a partir de los cuales se formarán varios millares de proteínas idénticas.

Para que se realice la síntesis de mRNA se necesitan algunos elementos en particular, como son los nucleótidos que deben contener las bases A, G, C, y U, los cuales deben estar activados, es decir, no deben estar como nucleósidos monofosfatos, sino como nucleósidos trifosfatos (ATP, GTP, CTP, UTP). Además se requiere también una enzima que permita unir los nucleótidos para formar el polímero mRNA, esta enzima es la RNA polimerasa. Como el mRNA es una copia complementaria y antiparalela de una cadena de DNA, es indispensable disponer de un DNA como modelo.

La transcripción se modula en una región de DNA conocida como promotor, que se encuentra situada justo antes del inicio de la región donde comienza la transcripción y que consta de aproximadamente 40 pares de nucleótidos. La unión de los nucleótidos entre sí se lleva a cabo mediante enlaces éster en el sentido 5' a 3'. En éste sentido es donde actúa la enzima RNA polimerasa que puede

representarse como un patín que se desliza sobre una cremallera. Las 2 hebras de DNA se van separando por ruptura de los enlaces de hidrógeno y es aquí donde se inicia la transcripción. Pero conforme la RNA polimerasa se va desplazando a lo largo de la cadena de DNA, el mRNA recién formado se va separando. Posteriormente los enlaces de hidrógeno entre las dos hebras de DNA se vuelven a formar detrás de la RNA polimerasa y las dos hebras de DNA adquieren de nuevo su forma helicoidal (Latchman, 1998).

Los factores generales de transcripción tienen que ensamblarse formando un complejo sobre el DNA en el lugar del promotor con el fin de poder reclutar a la RNA polimerasa en ese lugar. En la primera etapa TFIID se une específicamente a la secuencia TATA. A continuación TFIIB se une al complejo, seguido por la RNA polimerasa (Pol II) acompañada de TFIIF, a continuación TFIIIE y TFIIH se unen al complejo. En presencia de ATP, TFIIH fosforila Pol II, con lo que se activa su función y se inicia la transcripción.

La RNA polimerasa I y la RNA polimerasa III también requieren una serie de factores generales de transcripción y la unión de TPB (TATA Binding Protein) no depende de una secuencia TATA en el DNA. La región de control situada en la vecindad inmediata de la región de iniciación de la transcripción, con una longitud hacia delante de aproximadamente 100 pb, se denomina promotor proximal. En esta región promotora se encuentran, esencialmente, la TATA box, presente en casi todos los genes, así como la CCAAT box y la GC box, que se encuentran con menor frecuencia. La RNA polimerasa en las eucariotas, al contrario de las procariontes, parece incapaz de reconocer directamente al promotor. Es probable que se identifique un complejo multiproteico, formado al menos por 5 proteínas, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF (TF, factor transcripcional). Únicamente TFIID se fija sobre la TATA box. TFIIA estabiliza el complejo TFIID-DNA, TFIIB y TFIIIE servirían de unión con la RNA polimerasa y TFIIIF tendría una actividad helicasa que permite desnaturalizar la doble hélice del DNA en la región de iniciación de la

transcripción. Este grupo de factores generales de la transcripción, así como la RNA polimerasa, constituyen el complejo de iniciación (Alberts y col., 1999).

Antes de que la transcripción se ponga en marcha, se forma un complejo de iniciación. La proteína TFIID se fija desde el principio a la TATA box. La transcripción se iniciará en +1, el mRNA es sintetizado por copia complementaria de un segmento de cadena de DNA (cadena transcrita llamada cadena "sin sentido"). El mRNA tiene la misma polaridad y la misma secuencia de bases, con excepción de T que es reemplazada por U, y que la hebra codificante de DNA denominada "con sentido" (Etienne, 2001).

Diferentes polimerasas aseguran la transcripción de los diferentes mRNA.

- RNA polimerasa I: para los rRNA 18S, 5, 8S, 28S.
- RNA polimerasa II: para los pre-mRNA, snRNA U1, U2, U3, etc.
- RNA polimerasa III: para los rRNA 5S, tRNA y snRNAU6.
-

Estas RNA polimerasas se encuentran en el núcleo de la célula, pero en diferentes regiones dentro del núcleo (RNA polimerasa I en los nucleolos, RNA polimerasa II y III en el nucleoplasma) (Alberts y col., 1999). La Figura 2 muestra cómo la RNA polimerasa participa en el proceso de transcripción junto con los activadores o promotores.

La señal de fin del gen (y no de fin de la transcripción) es la secuencia leída sobre la cadena de DNA no transcrito el cual se llama "con sentido" AATAAA, secuencia llamada "señal de poliadenilación". El poli A es una sucesión de varios nucleótidos (nt) de adenina (aproximadamente 250 nt). Se cree que algunas de sus funciones son: ayudar al transporte del mRNA del núcleo hacia el citoplasma, proteger al mRNA en el curso de la traducción (la proporción de A en el poli A disminuye durante la transcripción).

La RNA polimerasa reconoce esta señal sobre el DNA, pero continúa transcribiéndose, sin embargo los transcritos son recortados posteriormente para terminar en la señal AAUAAA seguida de 10 a 15 nucleótidos. La ruptura la produce una enzima con actividad nucleasa, donde posteriormente actúa una poli A polimerasa que es la que realiza la adición de poli A sobre el extremo 3' recién formado, y para que esta reacción se lleve a cabo requiere ATP como sustrato y no necesita de molde (Etienne, 2001).

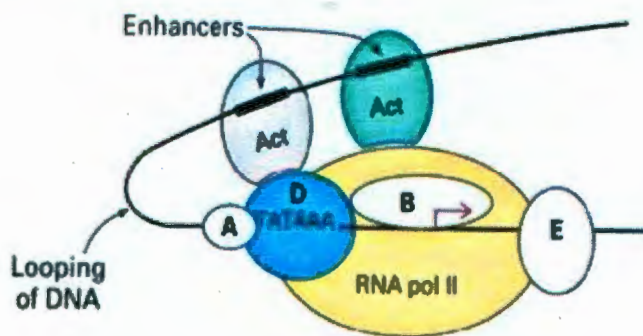


Figura 2. Se muestra la acción de los promotores y de los activadores así como la participación de la RNA polimerasa II en el proceso de transcripción.

La dirección de la RNA polimerasa a lo largo de un DNA es lo que determina la cadena que será copiada. El mRNA es idéntico a la segunda cadena de DNA "cadena de DNA con sentido", que es aquella que no es transcrita, en polaridad y en secuencia de bases (excepto las bases T del DNA que son reemplazadas por U en el mRNA y las desoxirribosas que son reemplazadas por ribosas).

La región 5' por delante de la región de inicio de la transcripción es una región de control de la transcripción muy compleja, formada por diversas secuencias de nucleótidos denominados cisreguladores que son la diana de los factores transreguladores. La fijación de estos factores provocará según el caso, una puesta en marcha, una activación (a veces, más raramente, una disminución) de la transcripción.

Aunque la transcripción consiste en producir RNA complementario de una hebra de DNA, no solo produce mRNA sino que produce también tRNA (RNA de transferencia) y rRNA (RNA ribosomal), los cuales son sintetizados a partir de la transcripción de un gen y que a diferencia del mRNA (el cual tiene una vida media muy corta porque está destinado a ser traducido), son estables y no son traducidos a proteínas en el ribosoma. En este caso la transcripción no es seguida de la traducción. En las modificaciones postranscripcionales de las eucariotas, ciertos rRNA y tRNA presentan intrones que son secuencias interpuestas, intercaladas o intrusos que interrumpen el gen y que no serán traducidos, por lo que son eliminados por mecanismos diferentes a la eliminación de los intrones del mRNA.

En las eucariotas un gen comprende:

- Exones que contienen la información (hereditaria) y que generalmente se expresan (siendo traducidos en proteínas).
- Intrones (o secuencias intercaladas) que están interpuestos en medio de la región que contiene la información. Serán transcritos pero no traducidos.

La integridad del gen, es decir, los exones e intrones del gen son transcritos para producir una molécula larga de RNA llamada transcrito primario o precursor del mRNA (pre-mRNA). Esta fase tiene lugar en el núcleo y entonces se producen las modificaciones.

En el curso de la fase de maduración (llamada processing, que significa tratamiento, transformación), el pre-mRNA experimentará cortes-empalmes (splicing) para producir finalmente mRNA. La escisión es el corte, la eliminación de los intrones; el empalme es la reunión de los segmentos restantes correspondientes a los exones y que serán soldados por los extremos. En suma, se trata de un "corte y pega". La escisión es una operación delicada que debe ser muy precisa y fiable: un error de un solo nucleótido a nivel del empalme cambiaría la pauta de lectura durante la traducción y daría lugar a una proteína "falsa". Los elementos que desempeñan un papel importante en la escisión-empalme del transcrito primario son:

- El enlace exón-intrón. Todos los intrones de un transcrito primario empiezan por GU (esta región 5' también se llama "región donadora del empalme") y terminan en AG (esta región 3' también es llamada "región receptora del empalme").
- La región de enlace del lazo. No lejos del extremo 3', a aproximadamente – 30 nucleótidos, se encuentra un AMP llamado "A del enlace".

El mecanismo de escisión empalme puede descomponerse en dos etapas. Se producirán dos reacciones llamadas reacciones de transesterificación. En la primera etapa se produce una escisión a 5' del intrón, entre el final del exón y el principio del intrón., en la segunda se produce una escisión a 3' del intrón, entre el final del intrón y el inicio del exón siguiente, situado posteriormente.

En las eucariotas existen los snRNA (small nuclear RNA, RNA pequeño nuclear) que desempeñan un papel importante en las escisiones empalmes y presentan las particularidades siguientes:

- Son pequeñas moléculas formadas por 100-300 nucleótidos aproximadamente.
- Están situadas en el núcleo de las células.
- Son ricas en uracilo.
- Actúan en forma de complejos con proteínas.

La eliminación de los intrones se efectúa en el núcleo. El transcrito primario (que lleva poli A) debe mantenerse alejado del ribosoma mientras contenga secuencias que no deben ser traducidas. El empalme de exones, después de la escisión de los intrones, afecta generalmente a los exones que pertenecen a un mismo transcrito primario (cis-splicing). Se cree que los intrones tienen otras funciones como la observada en algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que un intrón situado en un gen de rRNA codifica una endonucleasa que permite que el DNA de otras cepas sea cortado y reciba un intrón.

Existe una serie de secuencias de DNA generalmente constituidas por algunos nucleótidos dispersos a lo largo de la región situada a 5' del gen, llamadas elementos cisreguladores. Constituyen las secuencias distales del promotor. Los elementos cisreguladores también pueden encontrarse después de la región de iniciación. Sobre estas secuencias de DNA se fijan factores llamados transreguladores que frecuentemente son proteínas, pero existen otras sustancias no proteicas que también son factores transreguladores. Cuando un factor transregulador se fija sobre una secuencia cisreguladora de DNA, la tasa de transcripción, es decir, la cantidad de mRNA sintetizada se modifica bruscamente: aumenta en la mayoría de los casos (regulación positiva) pero también disminuye en otros (regulación negativa). Las células responden así a las señales (intra y extracelulares) "encendiendo" o "apagando" ciertos genes, así como modulando la importancia de la transcripción de los genes activos. Los enhancers (activadores) representan un caso particular de secuencias cisreguladoras activadoras. Uno de los ejemplos mejor conocidos en humanos de enhancers, son las inmunoglobulinas. La Figura 3 muestra en forma resumida el proceso completo de transcripción dentro de las células y la actividad de los participantes.

Las secuencias denominadas silencers (silenciadoras) tienen un efecto opuesto al de los enhancers. Estas secuencias son igualmente activas a distancia y sin polaridad con respecto al promotor. Se conocen menos las proteínas transreguladoras que actúan sobre estos elementos enhancers y silencers (Alberts y col., 1999).

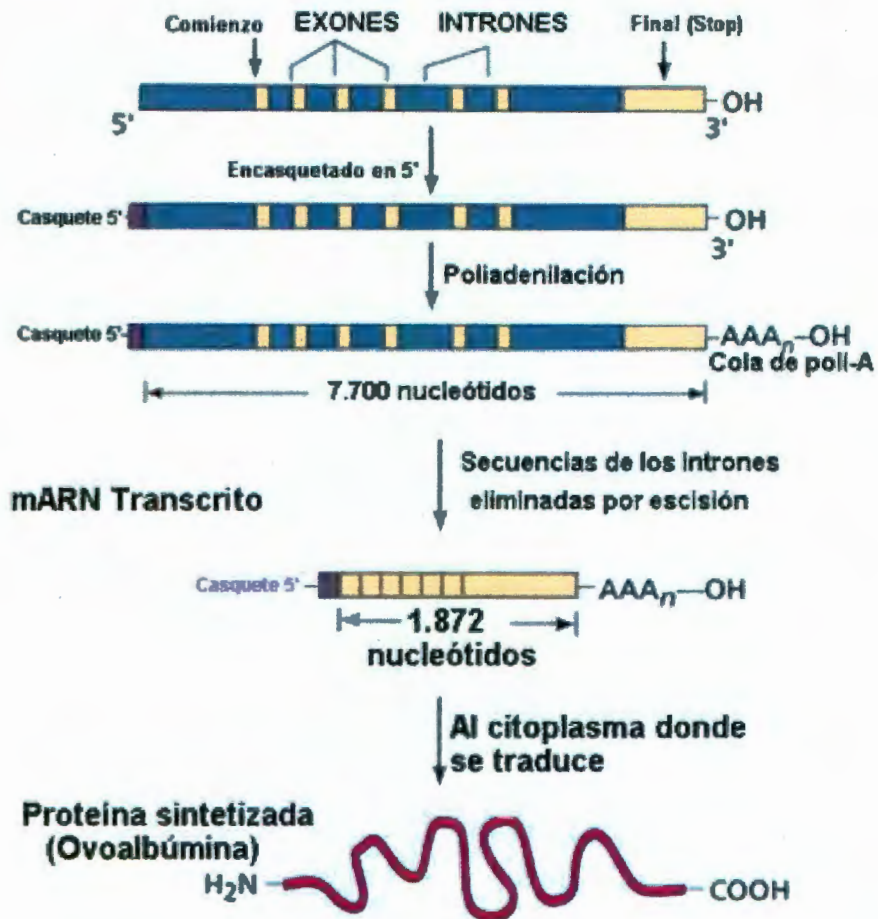


Figura 3. La transcripción del DNA es un mecanismo fundamental para el control celular y para la expresión de la información genética. Este mecanismo permite que la información del DNA llegue al resto de orgánulos celulares y salga del núcleo en el caso de los eucariotas. Para ello esa información debe copiarse en forma de RNA.

II.4 EMBRIOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO (NEURULACIÓN)

Las modificaciones en la expresión genética son importantes porque pueden alterar el desarrollo embrionario. El pollo ha sido el organismo favorito para estudios embriológicos porque es accesible todo el año y es de fácil manipulación. Además a una temperatura en particular, se puede predecir con precisión su desarrollo, lo que permite un gran número de embriones en el mismo estadio. Los embriones de pollo se pueden manipular quirúrgicamente y, en muchas formaciones de sus órganos son muy similares a los mamíferos, por lo que se usan frecuentemente como sustitutos de embriones humanos.

La fertilización del huevo de pollo ocurre en el oviducto, antes que se secreten la albúmina y el cascarón. Igual que los huevos de pez, las yemas de los huevos de aves disminuyen la escisión meroblástica discoidal. La escisión es una serie de divisiones mitóticas extremadamente rápidas en que el enorme volumen de citoplasma del cigoto es dividido dentro de numerosas células pequeñas. La escisión sólo ocurre en el blastodisco, un pequeño disco de citoplasma de 2-3 mm de diámetro como el polo animal de la célula huevo. El primer surco de la escisión aparece centralmente en el blastodisco, y las siguientes escisiones crean un blastodermo con una única membrana. Estas escisiones no se extienden hacia el citoplasma en la yema, y las células de escisión temprana son continuas con las bases de la yema y con otras. Después de esto, la escisión vertical y ecuatorial divide al blastodermo en un tejido grueso de cinco o seis membranas de células que se unen.

Entre el blastodermo y la yema hay un espacio llamado cavidad subgerminal. Este espacio se crea cuando las células absorben el fluido de la albúmina ("huevo blanco") y se secreta entre ellas mismas y la yema. En este estadio, el centro de las células profundas del blastodermo se derraman y mueren, dejando atrás un área pelúcida de células gruesas. Esta parte del blastodermo forma una gran parte del embrión actual. El área opaca está formada por el anillo periférico de células del blastodermo donde no se derraman las células profundas. Entre el área pelúcida y

el área opaca hay una delgada membrana de células llamada zona marginal (o cinturón marginal). Algunas de las células de la zona marginal llegan a ser muy importantes en la determinación del destino celular durante el desarrollo temprano del pollo.

En el reino animal existe una increíble variedad de embriones, que presentan 5 cambios al ser usados como modelos de embriogénesis:

1) Una vez fecundado el embrión se llevan a cabo una serie de divisiones mitóticas en que el enorme volumen de citoplasma del cigoto se divide en numerosas células pequeñas, estas células son llamadas blastómeros.

2) Los blastómeros sufren movimientos que cambian su posición relativa, lo que origina la gastrulación y se dice que el embrión está en el estado de gástrula. Como resultado de la gastrulación el embrión contiene tres capas germinales: el ectodermo, el endodermo y el mesodermo.

3) Una vez que se estabilizan las tres capas germinales, las células interactúan entre sí y se reorganizan para producir tejidos y órganos. Este proceso se llama organogénesis. Muchos órganos contienen células de más de una capa germinal y no es inusual que el exterior de un órgano provenga de una capa y el interior de otra. Sólo durante la organogénesis, ciertas células sufren una larga migración de su lugar de origen a su localización final. Estas células emigrantes incluyen a los precursores de células sanguíneas, células linfáticas, pigmentos celulares, y gametos.

4) En muchas especies una porción especializada de citoplasma del huevo da lugar a células que son precursores de los gametos (el espermatozoide y el huevo). Los gametos y sus células precursoras se llaman colectivamente células germinales, y juegan un papel aparte para la función de reproducción. Las células del cuerpo son llamadas células somáticas. Esta separación de células somáticas (las cuales dan

lugar al cuerpo del individuo) y células germinales (las que contribuyen a la formación de una nueva generación) frecuentemente es una de las primeras diferenciaciones que ocurren en el desarrollo animal. Las células germinales eventualmente migran hacia las gónadas, donde se diferencian en gametos. El desarrollo de gametos, llamado gametogénesis, no es usualmente completo hasta que el organismo se ha vuelto físicamente maduro. En la maduración, el gameto puede ser liberado y participar en la fertilización o iniciar un nuevo embrión. El organismo adulto eventualmente sufre senescencia y muere.

5) Cuando la gallina pone un huevo, el blastodermo contiene cerca de 20,000 células. En este tiempo, muchas de las células del área pelúcida permanecen en la superficie, formando el epiblasto, mientras otras células del área pelúcida tienen migración y delaminación individual hacia la cavidad subgerminal y forman las islas de poliiinvaginación (hipoblasto primario), un archipiélago de racimos desconectados que contienen de 5-20 células cada uno.

Poco después, una lamina de células del margen posterior del blastodermo (distinguida de otras regiones del margen por la hoz de Koller, un espesor local) migran anteriormente hasta unir las islas de poliiinvaginación, formando así el hipoblasto secundario. Las dos membranas del blastodermo (epiblasto e hipoblasto) se unen junto al margen del área opaca y el espacio entre membranas forma el blastocoel. Entonces, aún cuando el aspecto y la formación del blastodisco de aves difiere de los anfibios, peces, o blástula del equinodermo, permanece la relación espacial global.

La característica estructural de la gastrulación de aves, reptiles y mamíferos es la línea primitiva. Esta línea es visible primero como un engrosamiento del epiblasto y la región posterior del embrión justo anterior a la hoz de Koller. Este engrosamiento es causado por el ingreso de precursores endodérmicos hacia el epiblasto en el blastocele (o cavidad subgerminal) y por la migración de células de la región lateral del epiblasto posterior hacia el centro. Como estas células entran a la línea

mesenquimal. Se piensa que la ruptura de la lámina basal y la liberación de células en el nudo de Hensen y en la línea primitiva se logra por el factor de dispersión, una proteína de 190 kDa secretada por las células cuando entran en la línea. El factor de dispersión puede convertir láminas epiteliales en células mesenquimales de varias maneras.

Las primeras células en migrar a través del nudo de Hensen están destinadas a convertirse en el endodermo. Desde dentro del blastocele, estas células endodérmicas migran anteriormente y desplazan a las células del hipoblasto, causando que las células del hipoblasto sean confinadas a la porción anterior del área pelúcida. Esta región, la creiente germinal, no forma ninguna estructura embrionica, pero contiene los precursores de las células germinales, las cuales migran después a las gónadas a través de los vasos sanguíneos.

Las siguientes células que entran al blastocele a través del nudo de Hensen, también se mueven anteriormente, sino que permanecen entre el endodermo y el epiblasto desde la cabeza del mesénquima y el plato precordial del mesodermo. Estas células que ingresan tempranamente, se mueven anteriormente, empujando la región media anterior del epiblasto y comienzan el proceso de formación de la cabeza entonces, la cabeza del embrión de ave se forma en el nudo anterior (rostral) de Hensen.

Las siguientes células que migran a través del nudo de Hensen se vuelven células del cordamesodermo (notocorda). Estas células se extienden desde el presunto cerebro medio, donde encuentran el plato precordial. El cerebro posterior y el tronco se forman desde el cordamesodermo a nivel del nudo de Hensen y caudal a él.

Mientras tanto, las células continúan su migración internamente a través de la porción lateral de la línea primitiva. Entran al blastocele, estas células se separan en dos membranas. La membrana profunda une el hipoblasto a lo largo de la línea media y desplaza las células epiteliales de la orilla. Este movimiento de células

profundas da lugar a todos los órganos endodérmicos del embrión y muchas de las membranas extraembriónicas (el hipoblasto forma el resto). La segunda capa migratoria se extiende entre el endodermo y el epiblasto, formando una capa indefinida de células. Esta capa media de células genera la porción mesodérmica del embrión y membranas extraembriónicas. A las 22 horas de incubación, muchas de las presuntas células endodérmicas están en el interior del embrión, aunque las presuntas células mesodérmicas continúan su migración interna por un largo tiempo.

La gastrulación continúa y la línea primitiva inicia el regreso, moviéndose desde cerca del centro del área pelúcida del nudo de Hensen a una posición posterior mayor. Así se despiertan los ejes dorsales del embrión y la notocorda. Como el nudo se mueve posteriormente, la notocorda queda debajo, comenzando a nivel del futuro cerebro medio. Mientras la porción anterior de la notocorda se forma por el ingreso de células a través del nudo de Hensen, la notocorda posterior (después de la somita 17 en el pollo) se forma de la condensación del tejido mesodérmico que ha ingresado a través de la línea primitiva. Esta porción de la notocorda se extiende posteriormente para formar el tallo del embrión. Finalmente el nudo de Hensen regresa a su posición posterior mayor, formando la región anal. Al mismo tiempo, las presuntas células endodérmicas y mesodérmicas han entrado al embrión y el epiblasto se compone completamente de presuntas células ectodermales.

Los embriones de aves (y mamíferos) exhiben un gradiente diferente anterior a posterior de madurez de desarrollo como consecuencia de la secuencia por la cual se establecen la cabeza del mesodermo y la notocorda. Mientras las células de la porción anterior del embrión experimentan gastrulación, las células del final anterior inician la formación de órganos.

Los precursores ectodérmicos proliferan mientras las presuntas células mesodérmicas y endodérmicas se mueven internamente, además las células ectodérmicas migran rodeando la yema del epibolo. El cierre de la yema por el

ectodermo (recordando de nuevo el epibolo del ectodermo anfibio) es una misión herculeana que para completarse, toma la mayor parte de 4 días. Se involucra la producción continua de nuevo material celular y la migración de las presuntas células ectodérmicas a lo largo de la parte inferior de la envoltura vitelina. Interesantemente, sólo las células del borde externo del área opaca atacan firmemente la envoltura vitelina. Estas células, inherentemente diferentes de otras células del blastodermo; se pueden extender enormemente (500 μm) por procesos citoplasmáticos hacia la envoltura vitelina. Se cree que esta elongación filopódica es el aparato locomotor de éstas células marginales, por el cual se presionan las otras células ectodermales alrededor de la yema. Si se experimenta una ruptura entre el contacto de las células marginales y la fibronectina (por la adición de un polipéptido similar a la fibronectina), se retracta la filopodia, y cesa la migración epidermal.

Como la gastrulación avícola traza un cierre, el ectodermo ha rodeado la yema, el endodermo reemplaza al hipoblasto, y el mesodermo se posiciona entre estas dos regiones. El tubo neural se forma a partir de dos procesos: En la neurulación primaria, las células rodean la placa neural directamente, las células de la placa neural proliferan, se invaginan y se oprimen fuera de la superficie y forman un tubo hueco. Durante la neurulación primaria, el ectodermo original se divide en tres juegos de células: 1) El tubo neural posicionado internamente, al cual puede formar el cerebro y la médula espinal, 2) la epidermis posicionado externamente de la piel y 3) las células de la cresta neural. Las células de la cresta neural se forman en la región que conecta el tubo neural y la epidermis, cuando migran a otra parte pueden generar las neuronas periféricas y la glia, los pigmentos celulares de la piel, y otros varios tipos de células.

El proceso de neurulación primaria aparece de manera similar en anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Poco después que se ha formado la placa neural, el borde se engrosa y se mueve ascendentemente para formar el pliegue neural, mientras que la formación del surco neural aparece en el centro del plato, dividiendo los futuros

lados izquierdo y derecho del embrión. El pliegue neural migra hacia la línea media del embrión, fusionándose eventualmente muy por debajo del ectodermo. Las células de la porción más dorsal del tubo neural llegan a ser las células de la cresta neural.

La neurulación ocurre un poco diferente en las distintas regiones las cuales se describen en la figura 4, en la que se presenta de manera resumida el proceso de neurulación. La cabeza, el tronco, y cada parte de esa región del tubo neural reflejan la relación inductiva del endodermo faríngeo, plato precordial, y notocorda, con el ectodermo. Las regiones de la cabeza y el tronco, sufren variantes de neurulación primaria, y este proceso puede dividirse en cuatro estadios de recubrimiento, espacial y temporalmente diferentes: 1) formación del plato, 2) moldeado de la placa neural, 3) doblamiento de la placa neural para formar el surco neural y 4) cierre del surco neural para formar el tubo neural.

El proceso de neurulación inicia cuando hay señales sobre el mesodermo dorsal subyacente de las células ectodérmicas, se alargan hacia las células de la placa neural columnar. Su manera de alargarse distingue las células del posible plato neural de las células pre-epidérmicas planas que los rodean. La placa neural es moldeada por los movimientos intrínsecos de las regiones epidérmica. El alargamiento de la placa neural a lo largo del eje anterior-posterior, se limita y subsecuentemente se dobla para formar un tubo (en lugar de una cápsula esférica). En anfibios y amnióticos, la placa neural se alarga y se estrecha por extensión convergente, intercalando varias capas de células hacia algunas capas. En adición, las divisiones de las células de la placa neural están en dirección preferencialmente rostral-caudal (pico-tallo; anterior posterior). Estos eventos pueden ocurrir incluso si se aísla el tejido involucrado, en el caso de la placa neural, estas células convergen y se extienden hasta formar un plato delgado, pero falla el enrollamiento hacia el tubo neural. Sin embargo, si se aísla la región del borde que contiene la presunta epidermis y el tejido de la placa neural, puede formar un pequeño pliegue neural en cultivo.

El doblamiento de la placa neural involucra la formación de regiones de bisagra donde los tejidos circundantes tienen contacto con el tubo neural.

En éstas regiones, las presuntas células epidérmicas se adhieren al borde lateral de la placa neural y se mueven hacia la línea media. En aves y mamíferos, las células de la línea media de la placa neural se llaman células de bisagra del punto medio (MHP). Ellas derivan de la porción de la placa neural anterior al nudo de Hensen y de la línea media anterior al nudo de Hensen. Las células MHP se fijan debajo de la notocorda y forman una bisagra, la cual forma un surco en la línea media dorsal. La notocorda induce a las células MHP a disminuir su altura y forman una cuña. Las células laterales a MHP no sufren ningún cambio. Poco después, otras dos regiones de bisagra forman surcos cerca de la conexión de la placa neural con el resto del ectodermo. Estas regiones se llaman puntos de bisagra dorsolateral (DLHPs), y ellas se fijan a la superficie del ectodermo de los pliegues neurales, estas células también aumentan su altura y forman cuñas.

En los DLHPs (puntos de bisagra dorsolateral) los microtúbulos y los microfilamentos están involucrados en estos cambios. La colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, inhibe la elongación de éstas células, mientras que la citocalasina B, un inhibidor de la formación de microfilamentos, previene la constricción apical de éstas células, de éste modo se inhibe la formación de la cuña. Después de la formación inicial del surco de la placa neural, el plato se curva alrededor de las regiones de bisagra. Cada acción de las bisagras es un pivote que dirige la rotación de las células a su alrededor.

Entretanto, también trabajan fuerzas extrínsecas. La superficie del ectodermo del embrión de pollo empuja hacia la línea media del embrión, provyendo otra fuerza para el doblamiento de la placa neural. Este movimiento de la presunta epidermis y la fijación de la placa neural al mesodermo subyacente también pueden ser importante para asegurar que el tubo neural se invagine hacia el embrión y no

hacia el exterior. Si se aíslan pequeñas piezas de la placa neural del resto del embrión (incluyendo el mesodermo) tiende a enrollarse al revés. La presión de la presunta epidermis hacia el centro y el surco del tubo neural genera los pliegues neurales.

El cierre del tubo neural y el apareamiento de los pliegues neurales se producen junto a la línea media dorsal. Los pliegues se adhieren a cada uno, y las células de los dos pliegues se unen. En algunas especies, las células de éstas uniones forman las células de la cresta neural. En aves, las células de la cresta neural no migran de la región dorsal hasta después de que el tubo neural se ha cerrado en su sitio. En mamíferos, sin embargo, las células de la cresta neural craneal (las cuales forman la cara y estructuras del cuello) migran mientras los pliegues neurales se elevan.

El cierre del tubo neural no ocurre simultáneamente a través del ectodermo. Se observa mejor en algunos vertebrados (tales como aves y mamíferos) cuyo eje corporal es elongado previo a la neurulación. La neurulación en la región cefálica (cabeza) está completamente avanzada, mientras que la región caudal (tallo) del embrión todavía sufre gastrulación. La regionalización del tubo neural también ocurre como resultado de cambios en el moldeo del tubo. En el fin cefálico (donde se forma el cerebro), la pared es ancha y gruesa. Aquí, una serie de protuberancias y constricciones definen varios compartimentos del cerebro. Caudal a la región de la cabeza, sin embargo, los restos del tubo neural como un simple tubo que se perfila hacia el tallo. Las dos aperturas finales del tubo neural se llaman neuroporo anterior y neuroporo posterior (Gerhart, 1997).

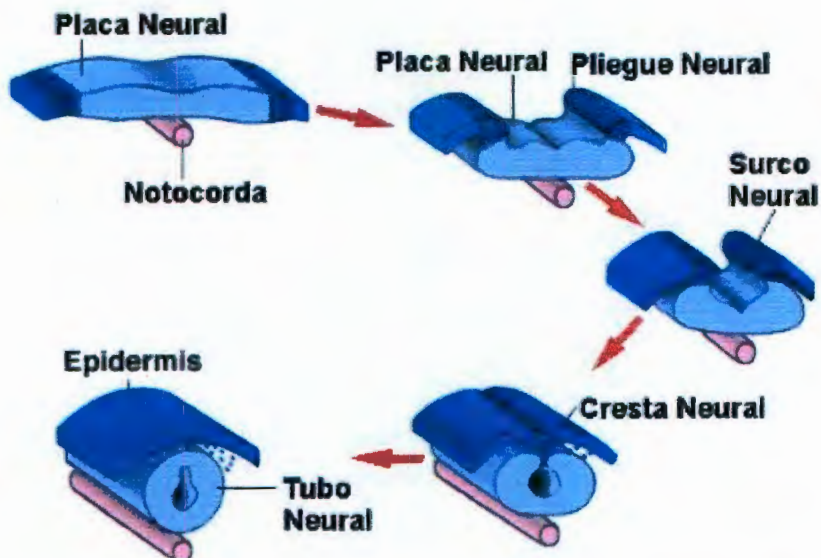


Figura 4. Proceso de neurulación. Observe cómo la migración de las células de la cresta neural ocurre mientras se fusionan los pliegues neurales (Castillo, 1999).

Diferente a la neurulación en el pollo, el cierre del tubo neural en mamíferos se inicia en varios lugares a lo largo del eje anterior-posterior. Cuando algunas partes del tubo neural fallan al cerrarse se producen diferentes defectos del tubo neural. Fallas en el cierre de la región posterior del tubo neural humano en el día 27 (o la subsecuente ruptura del neuroporo posterior poco después) resultan en una condición llamada espina bífida, la severidad depende de cómo se exponen los restos de la médula espinal. Fallas en el cierre de la región anterior del tubo neural resulta en una condición letal, la anencefalia. Aquí, el cerebro frontal permanece en contacto con el fluido amniótico y subsecuentemente se degenera. Cesa el desarrollo del cerebro frontal fetal, y falla la formación de la bóveda del cráneo. La falla del cierre completo del tubo neural sobre el eje completo del cuerpo se llama craniorachischisis. Colectivamente, los defectos del tubo neural no son raros en humanos, los podemos observar en 1 de cada 500 nacimientos. Los defectos del

cierre del tubo neural pueden ser detectados frecuentemente durante la gestación por varias pruebas físicas y químicas.

El cierre del tubo neural humano requiere una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. Ciertos genes, tales como *Pax3*, *sonic hedgehog*, y *openbrain*, son esenciales para la formación del tubo neural de los mamíferos, pero factores de la dieta, como colesterol y ácido fólico, también parecen ser críticos. Se ha estimado que el 50% de los defectos del tubo neural se pueden prevenir si las mujeres embarazadas toman un suplemento de ácido fólico y vitamina B₁₂; el Servicio de Salud Pública de USA recomienda que todas las mujeres en edad reproductiva tomen 0.4 mg de folato diario para reducir el riesgo de defectos del tubo neural durante el embarazo.

El tubo neural forma eventualmente un cilindro cerrado que se separa de la superficie del ectodermo. Esta separación es mediada por la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular. A pesar de que las células que forman el tubo neural expresan originalmente la E-caderina, se detiene la producción de ésta proteína cuando se forma el tubo neural, y en cambio sintetiza N-caderina y N-CAM. Como resultado, la superficie del ectodermo y el tejido del tubo neural no logran adherirse a cada uno. Si la superficie del ectodermo se hace experimentalmente por la expresión de N-caderina (por inyección de RNAm de N-caderina en una de dos células de embrión de *Xenopus*) la separación del tubo neural de la presunta epidermis se impide dramáticamente.

En aves, la porción anterior del tubo neural, se construye por neurulación primaria, mientras el tubo neural caudal a los 27 pares de somitas, se hace por neurulación secundaria, pero el tallo del tubo neural es derivado de la neurulación secundaria. En ratones (y probablemente también en humanos), la neurulación secundaria inicia alrededor del nivel de la somita 35. En la neurulación secundaria, el tubo neural se eleva desde una médula sólida de células que se sumergen hacia el

embrión y subsecuentemente se hunden (cavidades) para formar un tubo hueco. La neurulación en peces es exclusivamente secundaria.

La neurulación secundaria involucra la fabricación de un cordón medular y su subsecuente depresión hacia el tubo neural. El conocimiento de los mecanismos de la neurulación secundaria puede ser importante en medicina, dada la prevalencia de malformaciones en la medula espinal posterior humana.

En ranas y pollos la neurulación secundaria se ve usualmente en el tubo neural lumbar (abdominal) y las vértebras del tallo. En ambos casos, lo podemos ver como una continuación de la gastrulación. En las ranas, en lugar de involucionar hacia el embrión, las células del labio del blastoporo dorsal mantiene un crecimiento ventral. La región de crecimiento y el extremo del labio se llama bisagra cordoneural, y contiene los precursores de la porción más posterior de la placa neural y la porción posterior de la notocorda. El crecimiento de esta región convierte la gástrula aproximadamente esférica de 1.2 mm de diámetro, en un renacuajo lineal de unos 9 mm de longitud. El extremo del tallo es el descendiente directo del labio del blastoporo dorsal, y las células que revisten el blastoporo forman el canal neurentérico. La parte proximal del canal neurentérico se fusiona con el ano, mientras que la porción distal forma el canal endodermal (Scott, 2000).

Numerosos estudios han demostrado que el ácido fólico suministrado durante el periodo de gestación en animales y humanos reduce el número de nacimientos con defectos del tubo neural (NTDs), algunos autores manifiestan que hasta en 75%, la cantidad requerida sólo se puede obtener complementando la dieta con ácido fólico externo, lo que puede producir un aumento en su consumo en la población entera. El folato es una vitamina hidrosoluble con un potencial de toxicidad bajo. Sin embargo, las posibles consecuencias de altas dosis de suplemento de ácido fólico a largo plazo son desconocidas, sobre todo aquellas relacionadas al ciclo de la metionina, donde el folato participa como un sustrato (Chanarin, 1994) (Achon y col., 2000) (Flemming y Coop, 1998).

El exceso de más de 1 mg de Folato diario puede tener efectos adversos en pacientes con deficiencia no tratada de cobalamina, normalmente anemia perniciosa no diagnosticada (PA). En tales pacientes, la anemia se mejora con un retorno de hematopoyesis normoblástica, pero en casi la mitad de los pacientes la neuropatía progresa o se desarrolla por primera vez. La dosis más baja de folato que demostró ser eficaz en la prevención de NTDs fue de 0.36 mg diarios. Esta cantidad, adicionada a una dieta que ya proporciona aproximadamente 0.2 mg de folato, dará una entrada media de 0.56 mg diarios. Pero para evitar exceder significativamente esta cantidad, no se debe adicionar folato a preparaciones multivitamínicas o se debe vigilar de cerca la preparación para determinar si se producen efectos adversos como resultado de la fortificación del folato en la comida (Chanarin, 1994).

Los recién nacidos de mamíferos tienen una alta demanda de folato, todavía obtienen la nutrición adecuada del folato solamente de la leche materna a pesar de su bajo contenido de folato. El folato de la leche está completamente limitado por un exceso de proteína enlazadora de folato (FBP), incitando la especulación que FBP puede afectar la biodisponibilidad del suministro limitado de folato. Investigaciones previas han mostrado que el FBP limitado por el ácido fólico es gradualmente más absorbido y por consiguiente reduce el pico de la concentración plasmática del folato y previene la pérdida por la orina. Los folatos naturales son derivados reducidos de ácido fólico, con leche que contiene predominantemente 5-metiltetrahidrofolato, se están llevando a cabo pocas investigaciones para determinar el papel de FBP en la biodisponibilidad de folatos reducidos. La adición de alimentos ricos en FBP a comidas ricas en folatos pudiera reforzar la biodisponibilidad de folato natural, pero el resultado de semejante combinación dependería de interacciones con otros componentes de la dieta (Jones y col., 2003).

Se ha asumido que el catabolismo del folato es el resultado de la degradación oxidativa no enzimática de cofactores lábiles de folato. Las proporciones aumentadas del catabolismo del folato y la deficiencia simultánea del folato ocurren en varios estados fisiológicos, incluso el embarazo, el cáncer y cuando se usan drogas anticonvulsivas. Estos estudios han introducido la posibilidad que el catabolismo del folato puede ser un proceso celular regulado que influye en las concentraciones de folato intracelular. Estudios recientes han demostrado que el hierro almacenado por la proteína ferritina pueden catabolizar el folato *in vitro* e *in vivo* y aumentar las cadenas pesadas de ferritina, la síntesis disminuye las concentraciones de folato intracelular independiente de los niveles de folato exógeno en modelos de cultivos celulares. Los niveles de ferritina se elevan en la mayoría de los estados fisiológicos asociados con el aumento en el catabolismo del folato. Por consiguiente, el catabolismo del folato emerge como un componente importante en la regulación de las concentraciones de folato intracelular y el estado del folato en el cuerpo entero (Suh y col., 2001).

El suplemento de folato periconcepcional tiene un efecto protector significativo para los embriones durante su desarrollo temprano, produciendo una reducción significativa en defectos de desarrollo de la cara, el tubo neural, y la región del cono-truncal del corazón (Ramírez-Espitia y col., 2003). Estos resultados han sido apoyados por experimentos con modelos de animales. Una teoría común sostiene que en estas tres regiones anatómicas el desarrollo normal de cada región depende de un juego de células multi-potenciales que se originan en la región medio-dorsal del epitelio neural. Sin embargo, la razón para la sensible dependencia de estas células particulares al ácido fólico para un desarrollo normal no es obvia, y no hay ningún acuerdo general sobre la base biológica del rescate dramático con suplemento periconcepcional de folato. Hay dos hipótesis principales para el impacto de insuficiencia del folato en desarrollo; cada una de estas hipótesis tiene un componente del micronutriente y un componente genético. En la primera hipótesis el efecto de folato bajo es directo y limita la disponibilidad de ácido fólico en las células dentro del propio embrión; comprometiendo así la

función normal y limitando la proliferación. El segundo efecto hipotético es indirecto; la disminución de folato rompe el metabolismo de la metionina; la homocisteína aumenta en el suero materno; la homocisteína induce el desarrollo anormal inhibiendo la función de los receptores de N-metilo-D-aspartato (NMDA) en el epitelio neural. Aquí hay tres familias generales de genes cuyos niveles de expresión pueden necesitar ser consideradas en el contexto de estas dos hipótesis relacionadas: genes del folato-receptor; genes que regulan el metabolismo de la metionina-homocisteína; genes del receptor a NMDA (Rosenquist y Finnell, 2001).

Las malformaciones que pueden presentarse pueden deberse a interacciones del ácido fólico o de sus derivados con factores de crecimiento implicados en el metabolismo embrionario (Brennan y cols., 1981). De manera tradicional, si hay un aumento en algún elemento o nutriente en el organismo, se pueden producir alteraciones en el metabolismo del individuo, pero en este caso estamos tratando con embriones, que son mucho más sensibles a los cambios en el ambiente en el que se desarrollan de manera normal. Un factor importante que puede influir en la producción de malformaciones en los embriones es la excesiva incorporación de timidina en la biosíntesis de pirimidina, reacción en la que participa el ácido fólico (Flemming y Coop, 1998). Además de participar en ésta reacción, el ácido fólico interviene en la acetilación y metilación en la formación del sistema nervioso central, razón por la cual podemos pensar que si hay exceso de ácido fólico, puede haber también un incremento en éstos procesos y alterar así el desarrollo normal del embrión (Mattson, 2003)

Los pediatras necesitan estar conscientes de las amplias implicaciones de la entrada suficiente de ácido fólico materno para el bienestar del embrión y feto. Hay bastante evidencia ahora que el suplemento periconcepcional adecuado de ácido fólico materno durante los periodo críticos de formación de órganos se asocia con reducción en la ocurrencia y recurrencia de defectos del tubo neural, defectos congénitos del corazón (particularmente el defectos del cono truncal del corazón),

anomalías obstructivas del tracto urinario, deficiencias de miembros, hendiduras orofaciales y estenosis pilórica hipertrófica congénita (McNulty y col., 1993).

La entrada inadecuada de ácido fólico materno se asocia con pretermino deliberado, retraso en el crecimiento intrauterino, mientras el suplemento materno de ácido fólico se asocia a una reducción en preterminos deliberados y con retraso de crecimiento intrauterino. Recientemente la ingesta adecuada de ácido fólico en adultos ha sido asociada con una reducción en enfermedades cardiovasculares y algunos cánceres. Se ha identificado que una mutación común en el gen 5,10 metilenetetrahidrofolato reductasa produce una variante termolábil de 5,10 metilenetetrahidrofolato reductasa con actividad reducida de la enzima. La mutación común es un factor de riesgo para los defectos del tubo neural y enfermedades cardiovasculares en el adulto. El ácido fólico actúa aumentando la actividad de la variante de metilenetetrahidrofolato reductasa que por eso reduce los niveles de homocisteína en el plasma. Sin embargo el polimorfismo no explica todo los efectos protectores del ácido fólico. La prevención primaria de defectos del nacimiento por un adecuado suplemento de ácido fólico es una oportunidad de salud pública mayor y tiene amplias implicaciones reduciendo mortalidad y morbilidad debido a defectos de nacimiento y varias enfermedades en el adulto. Si continua así podría también frenar los costos de salud pública relacionados a esos desordenes (Hall y Solehdin, 1998).

El ácido fólico reducido actúa como un importante donador de metilo en muchas reacciones incluso en la síntesis de timidina. La timidina no se acumula en las células por lo que podría esperarse que se exijan cantidades significativas de folato reducido para apoyar el aumento exponencial en la síntesis de ADN que ocurre durante desarrollo temprano del embrión. La reducción del folato es catalizada por la enzima dehidrofolato reductasa que se inhibe selectivamente por el metotrexato una droga anticancerígena.

Los efectos de metotrexato eran aparentemente debidos principalmente a la inanición de timidina, un exceso de timidina en medios de cultivo revierten la inhibición del metotrexato. Los medios de cultivo suplementados con ácido fólico no tuvieron efecto benéfico en proporción a los cigotos producidos *in-vitro*, la fertilización se desarrolló hasta la fase del blastocisto. Por lo tanto el desarrollo temprano del embrión tiene un requerimiento absoluto de folato reducido para la síntesis de timidina que se obtiene completamente de fuentes endógenas (O'Neill, 1998).

Varios folatos interactúan con receptores excitatorios de ácido kainico en el cerebro de mamíferos y parece tener actividad agonista a esos receptores. Puesto que el ácido kainico es una potente neurotoxina es posible que los folatos compartan esta toxicidad y que altos niveles de folatos resulten en daño neuronal. Los niveles de metiltetrahidrofolato son marcadamente elevados en la deficiencia de vitamina B₁₂, una enfermedad asociada con daño neuronal. Se propone que esta destrucción ocurre como resultado de una acción neurotóxica del metiltetrahidrofolato. La inyección de ácido kainico dentro de los ganglios basales en animales experimentales produce una ruta de daño similar a la encontrada en pacientes agonizantes de la enfermedad de Corea de Huntington. Es posible que el defecto fundamental de esta enfermedad resida en la ruta del metabolismo del folato tal como un exceso neurotóxico de folatos acumulados en el sistema nervioso central. Un proceso semejante a la enfermedad es detenido por fármacos antifolatos (Brennan y col., 1981).

Los derivados del ácido fólico participan de manera importante en la metilación y acetilación de compuestos orgánicos, la metilación del ADN es un importante mecanismo epigenético del control transcripcional. La metilación del ADN juega un papel esencial manteniendo la función celular, y los cambios en los modelos de metilación pueden contribuir al desarrollo de cáncer. Una metilación aberrante de ADN (hipometilación global acompañado por una hipermetilación específica regional) frecuentemente se encuentra en las células del tumor. La hipometilación

global puede resultar en inestabilidad de los cromosomas, y la hipermetilación ha sido asociada con la inactividad de genes supresores de tumores. Otra ruta metabólica en la que participa el ácido fólico y sus derivados es la regulación de la homocisteína, la cual a niveles elevados provoca daño celular y apoptosis (Wang y col., 2004).

Factores dietéticos que están involucrados en el metabolismo de un-carbono forzan la interacción de nutrientes y metilación de ADN porque ellos influyen en el suministro de grupos metilo, y por consiguiente las rutas bioquímicas de procesos del metilación. Estos nutrientes incluyen el folato, vitamina B₁₂, vitamina B₆, metionina, y colina. Sin embargo, mirando los nutrientes individuales pueden ser demasiado simplistas. La deficiencia de metilos en la dieta (el folato, colina, y metionina) en combinación causan disminución del tejido S-adenosilmetionina, la hipometilación global, esteatosis hepáticos, cirrosis, y finalmente tumorigenesis en los roedores en la ausencia de tratamiento carcinógeno. Otros componentes dietéticos como la vitamina B₁₂, alcohol, y selenio puede modificar la respuesta al folato dietético inadecuado (Davis y Uthus, 2004).

Los defectos del tubo neural están asociados con factores bioquímicos involucrados en la conversión de homocisteína a metionina en la deficiencia del folato y la mutación 677T en el gen que regula la N(5),N(10)-metilene-tetrahidrofolato reductasa. La deficiencia de esta enzima desfavorece el genotipo materno creando un factor severo de riesgo de deficiencias fenotípicas en el tubo neural en la población (Martínez de Villareal y col., 2001).

El ácido fólico, participa en la síntesis de metionina, la metionina es un aminoácido esencial que también participa en el desarrollo y cierre del tubo neural, por lo que una alteración en éste ciclo también puede producir malformaciones en los embriones (Shaw, 1997).

El suplemento de ácido fólico (FA) reduce los defectos del tubo neural (NTDs) hasta por 70%. Sin embargo, la causa de la mayoría de NTDs no puede atribuirse a la deficiencia del folato, a las mutaciones de genes que codifican las rutas enzimáticas del folato, y los receptores del folato (FRs) que regulan la entrada celular del folato. Se expresan FRs en los oocitos, las células epiteliales de órganos reproductivos, y tejidos embrionarios y extraembrionarios. El antisuero a FRs administrado a ratas preñadas causa daño embrionario. La embrioletalidad con pequeñas dosis de antisuero es evitable por la administración de ácido fólico, mientras la dosis mayor causa daño al embrión por inmunidad mediada por lisis celular, la cual puede prevenirse por la dexametasona (da Costa y col., 2003).

III HIPÓTESIS

Un exceso de ácido fólico induce cambios fenotípicos durante la neurulación de embriones de pollo.

IV OBJETIVOS

GENERAL

- Explorar los cambios fenotípicos en los embriones de pollo por la administración de un exceso de ácido fólico.

ESPECIFICOS

- Observar el efecto del exceso de ácido fólico durante la neurulación en un estadio determinado.
- Conocer el intervalo de tiempo de incubación donde se observen los mejores resultados con la menor dosis
- Aplicar distintas concentraciones de ácido fólico y realizar una gráfica dosis-respuesta
- Medir y comparar las diferentes anomalías presentes en los grupos tratados contra el grupo control.
- Realizar un análisis estadístico de los resultados.

V MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 MATERIALES

- Huevo fértil ALPES II
- Estuche de disección
- Solución de ácido fólico
- Agua destilada
- Micropipetas
- Incubadora a 37°C
- Cinta Scotch
- Estereoscopio

V.2 METODOLOGÍA

Preparación de la muestra.

Métodos Biológicos

- a) Tratamiento de los embriones
- b) Observación de los embriones

Método estadístico

Se empleó el análisis de varianza mediante el programa JMP versión 4 y se realizó la comparación de dos medias por el estadístico *t* de Student.

Tratamiento de los embriones

- 1.- Los huevos fértiles ALPES II se colocaron en la incubadora, previamente encendida y temperaturizada a 37 °C, con una humedad relativa entre 60 y 70%.
- 2.- En el estadio 3.5 (según la tabla de Hamburger-Hamilton, 1951) se llevó a cabo la inoculación del agente experimental (ácido fólico).

Preparación del ácido fólico:

Se disolvieron 2 pastillas de ácido fólico (8 mg) en la cantidad suficiente de agua destilada para tener una concentración que permite manejar volúmenes aceptables de acuerdo a la concentración requerida.

Los embriones fueron inoculados con las concentraciones del Cuadro 1 mediante una aguja realizando un pequeño orificio en el cascarón que posteriormente fue cubierto con cinta scotch, y se les etiquetó individualmente.

Cuadro 1. Concentraciones de ácido fólico utilizadas

	Cantidad de ácido fólico (mg)	μ l de solución (en H ₂ O)	Veces la dosis recomendada
Grupo control	0	0	0
Blanco	0	600 (sólo H ₂ O)	0
Tratamiento 1	$6 * 10^{-2}$	150	25
Tratamiento 2	$12 * 10^{-2}$	300	50
Tratamiento 3	$24 * 10^{-2}$	600	100

3.- Posteriormente los embriones se regresaron a la incubadora

4.- Los embriones fueron obtenidos del huevo de la siguiente manera:

Se sacaron aproximadamente 5 ml de clara de huevo, esto es, para evitar que al momento de cortar el cascarón, no se dañe la yema y evitar así la pérdida del embrión.

Se cortó el cascarón cerca de los bordes (por encima) de la cinta scotch.

Se observó la yema y se exploró hasta encontrar el embrión.

Se sujetó el embrión de una de sus orillas con unas pinzas de disección y se procedió a cortar con unas microtijeras alrededor de él.

Observación de los embriones

Una vez obtenido el embrión, se colocó en solución salina fisiológica al 8.9% y se observaron sus características en el estereoscopio.

Las características fenotípicas que se observaron se compararon contra los controles y las medidas reportadas fueron:

- Longitud cráneo-caudal
- Longitud y ancho de la porción craneal
- Apertura del tubo neural
- Número de somitas
- Deficiencias o malformaciones presentes en los grupos tratados

VI RESULTADOS

Grupo Control: En este grupo se estudiaron embriones sin inocular con la idea de explorar el número de malformaciones espontáneas y así poder conocer el efecto del ácido fólico en los embriones tratados. Se analizaron un total de 139 embriones de pollo obteniéndose una media de 12.00 ± 1.08 ee embriones normales, para los anormales (ANORM) se obtuvo un promedio de 1.77 ± 0.40 ee, en las resorcciones (RES) se observó 0.11 ± 0.11 ee y el promedio para embriones anormales + resorcciones (ANORMRES) fue de 1.88 ± 0.42 ee. Siendo ee la desviación del error.

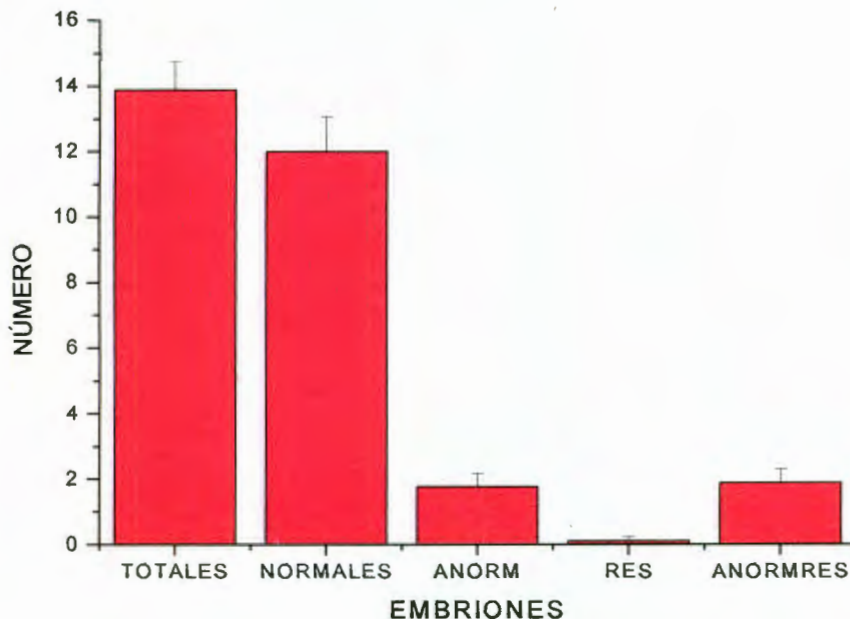


Figura 5. Grafica de los resultados obtenidos del grupo control. Este grupo no recibió ningún tratamiento y fue sometido a las condiciones óptimas de incubación para un desarrollo normal. La altura de las barras corresponde al promedio de productos descritos en el eje de las abscisas. Se grafican los embriones totales, los normales, los anormales, las resorcciones y la suma de resorcciones y embriones anormales.

Grupo control. Este diagrama representa las malformaciones ocurridas de manera espontánea en los embriones, ya que este grupo no recibió ningún tratamiento. El 83.4% corresponde a embriones normales, el 5% corresponde a microcefalias (MC), el 5% corresponde a anencefalias (AE), el 2.2% corresponde a deficiencias en la formación de vesículas cerebrales (DFV), el 1.4% representa las aplasias (AP), el 1.4% corresponde a resorciones (RS) y el 1.4% corresponde a los embriones con tubo neural cerrado (TNC).

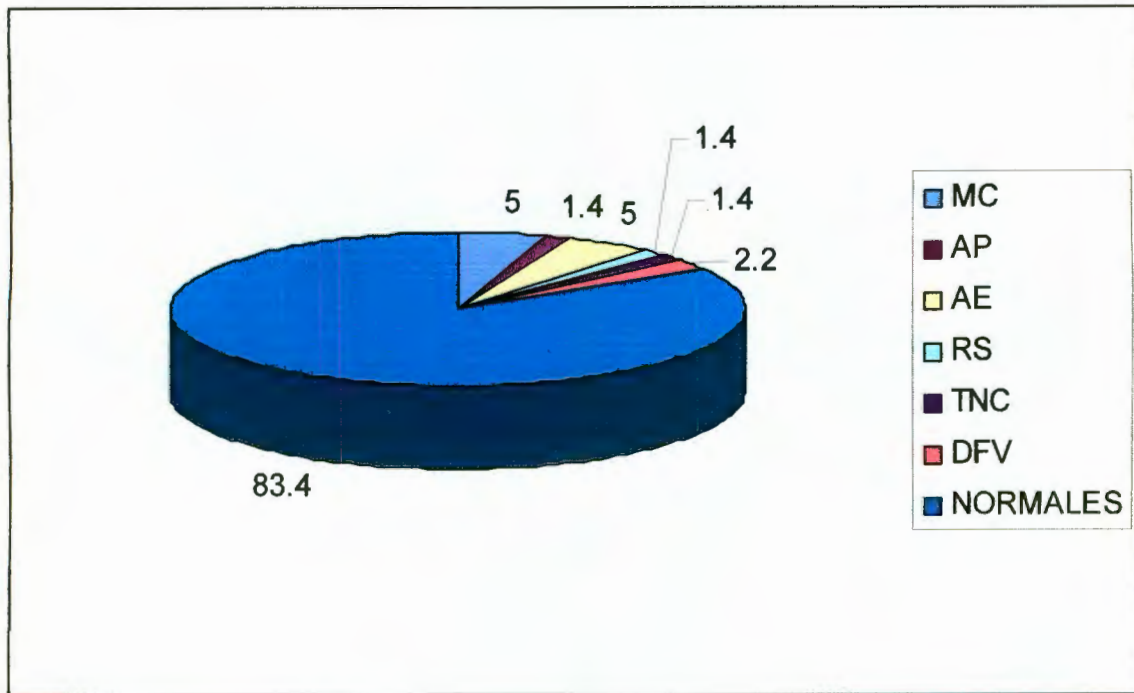


Figura 6. Esta grafica es la representación en porcentaje de las malformaciones obtenidas durante el experimento. Nótese que la principal malformación obtenida fue la microcefalia.

Grupo tratado con 25X de ácido fólico. Este grupo fue tratado con una solución de ácido fólico equivalente a 25 veces el valor recomendado para las mujeres gestantes. La media obtenida fue de 3.5 anomalías y un ee de 0.6455 comparado con el grupo control. En este experimento se observaron 108 embriones de pollo de los cuales se obtuvo para los embriones normales una media de 9.75 ± 0.85 ee, para los embriones anormales la media obtenida fue de 3.50 ± 0.64 ee, para las resorpciones la media fue de 0.75 ± 0.25 ee, el promedio de embriones anormales + resorpciones fue de 4.25 ± 0.85 ee. La diferencia es significativa en relación a embriones anormales y resorpciones comparados con el grupo control.

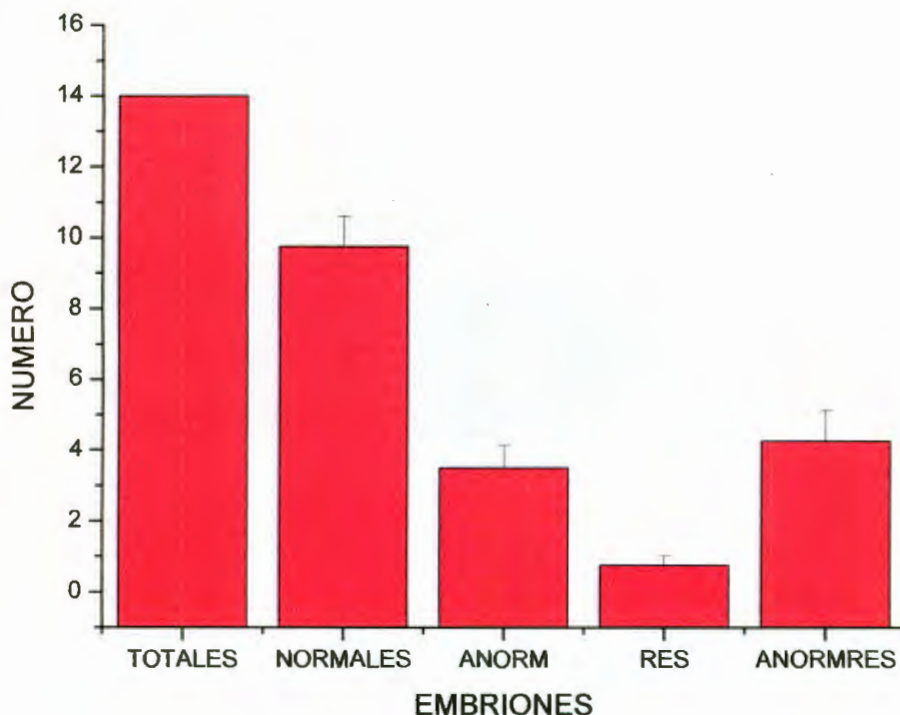


Figura 7. Gráfica de los resultados obtenidos del grupo ácido fólico 25X. A este grupo se le aplicó una dosis equivalente a 25 veces la recomendada para mujeres gestantes. En el eje de las abscisas se indican los productos estudiados y en el eje de las ordenadas el promedio de los mismos.

Grupo tratado con 50X de ácido fólico. Este diagrama representa en forma porcentual las malformaciones presentes en el grupo tratado con 50X de ácido fólico. El 65% corresponde a embriones normales, el 11.4% corresponde a las microcefalias, el 9.8% representa a las aplasias generalizadas, el 5.7% representa a las anencefalias, el 4.9% corresponde a deficiencias en la formación de vesículas cerebrales y el 3.2% corresponde a resorpciones.

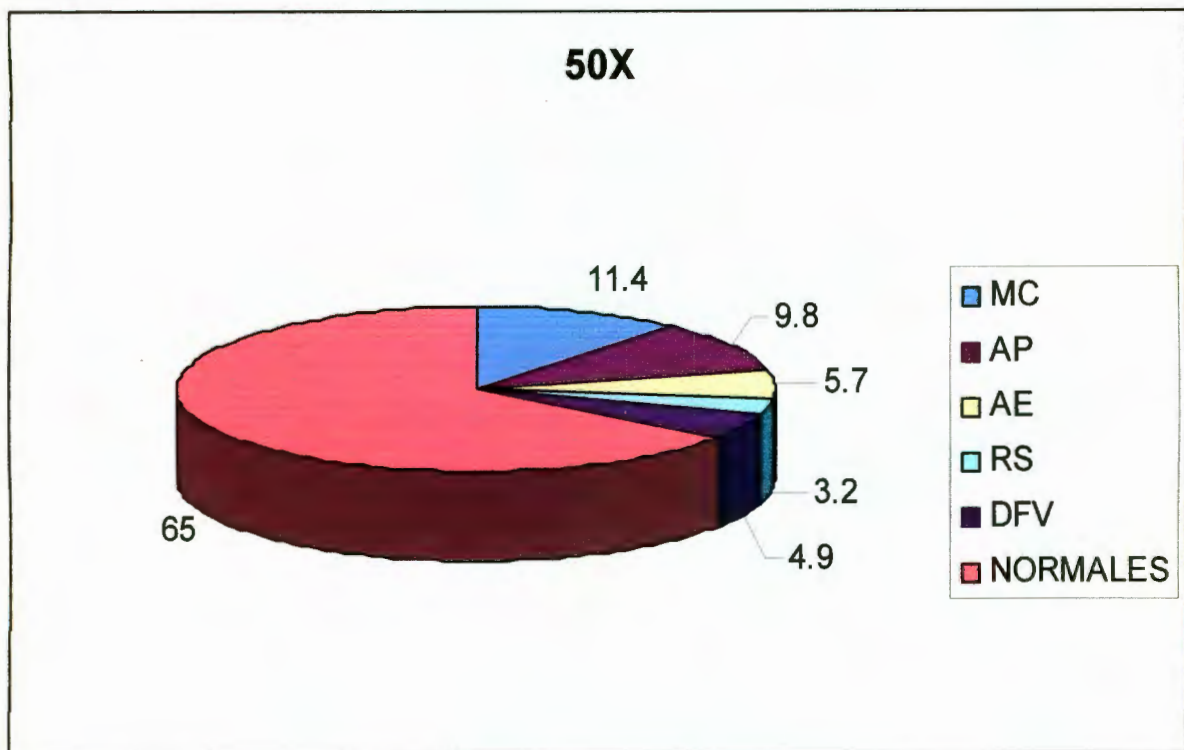


Figura 10. Representación gráfica en forma porcentual de las malformaciones observadas durante el tratamiento con 50X de ácido fólico. Podemos observar que de forma que va aumentando la dosis, también va aumentando el porcentaje de malformaciones.

Grupo tratado con 100X de ácido fólico. Este grupo fue tratado con una cantidad equivalente a 100 veces la dosis requerida por las mujeres gestantes. En este experimento se observaron 93 embriones de pollo, obteniendo una media de embriones normales de 8.25 ± 0.63 ee, para los embriones anormales se obtuvo una media de 4.75 ± 0.75 ee, no se observaron resorciones en éste experimento, por lo que la media de anormales + resorciones es de 4.75 ± 0.75 ee. Se encuentra una diferencia significativa al comparar los resultados obtenidos en éste experimento con los resultados del grupo control.

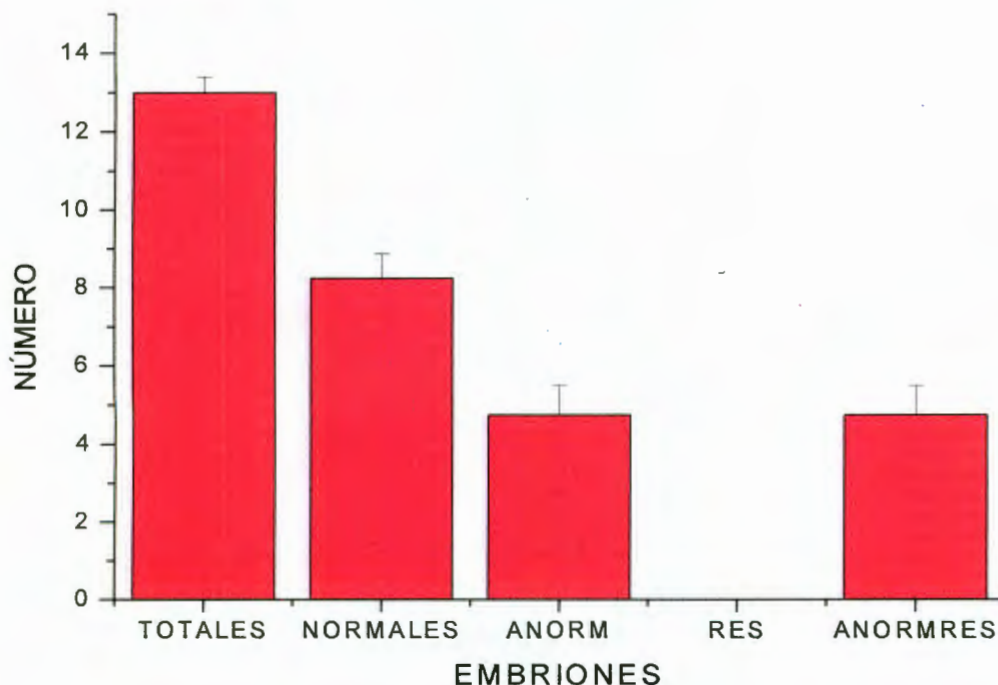


Figura 11. Grafica de los resultados obtenidos del grupo ácido fólico 100X. Este grupo fue tratado con una dosis equivalente a 100 veces el valor recomendado para las mujeres gestantes. Se encuentra una diferencia significativa al comparar los resultados obtenidos en éste experimento con los resultados del grupo control.

Grupo tratado con 100X de ácido fólico. Este diagrama esquematiza en forma porcentual las malformaciones presentes en el tratamiento de 100X de ácido fólico. El 72.1% representa a los embriones normales, el 8.6% corresponde a las microcefalias, el 7.5% representa las deficiencias en la formación de vesículas cerebrales, el 7.6% corresponde a las anencefalias, el 3.2% corresponde a las aplasias y el 1% corresponde a los embriones que presentaron el tubo neural cerrado.

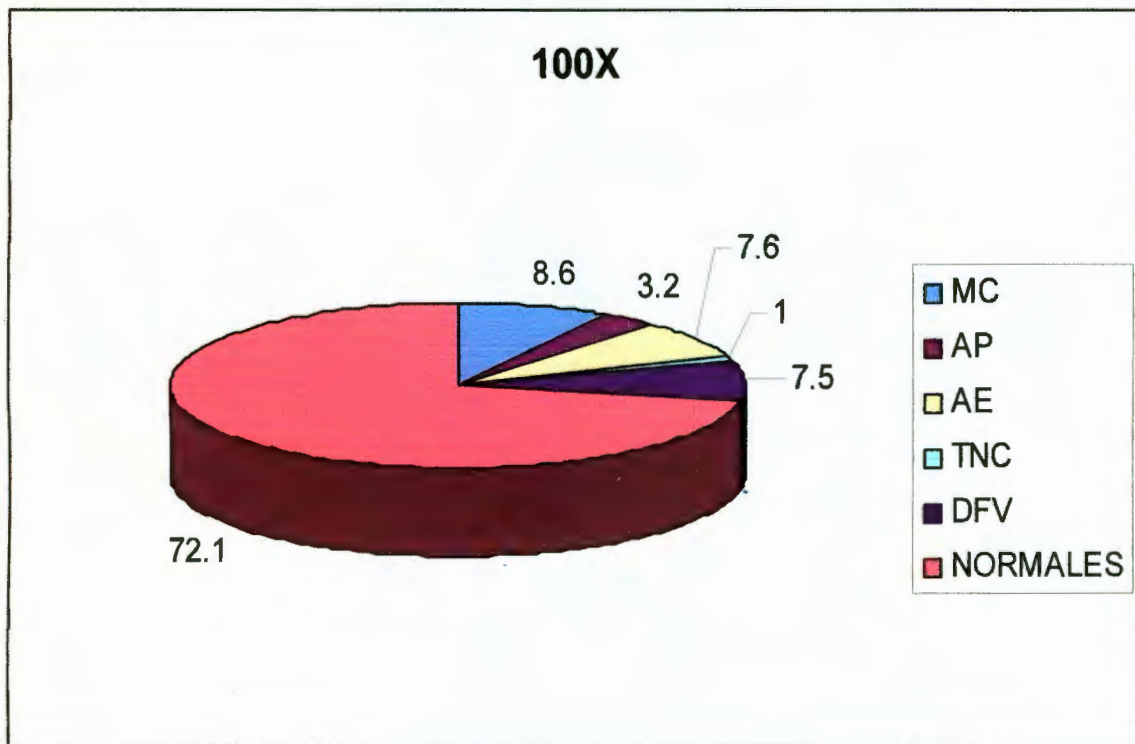


Figura 12. Representación porcentual de las malformaciones obtenidas durante el tratamiento de 100X. Continúa predominando la microcefalia, y aumentando el número de malformaciones obtenidas.

DESCRIPCIÓN DE UN EMBRIÓN DE POLLO EN ESTADIO 13

En este estadio los embriones presentan características muy definidas, tienen de 15 a 20 pares de somitas, los cuales al madurar van a dar lugar a diferentes órganos, la cabeza está ligeramente curva a la izquierda, se alarga el telencéfalo, el canal atrio ventricular está indicado por constricción, el pliegue de la cabeza cubre el cerebro frontal, el cerebro medio y la parte anterior del cerebro posterior, también están presentes de manera muy clara los primordios ópticos y óticos, los cuales darán lugar a los ojos y oídos respectivamente, en éste momento el tubo neural se encuentra cerrado, la cabeza del pollo comienza a tomar forma. La Figura 13 muestra una fotografía de un embrión en este estadio. (Hamburguer-Hamilton, 1951).

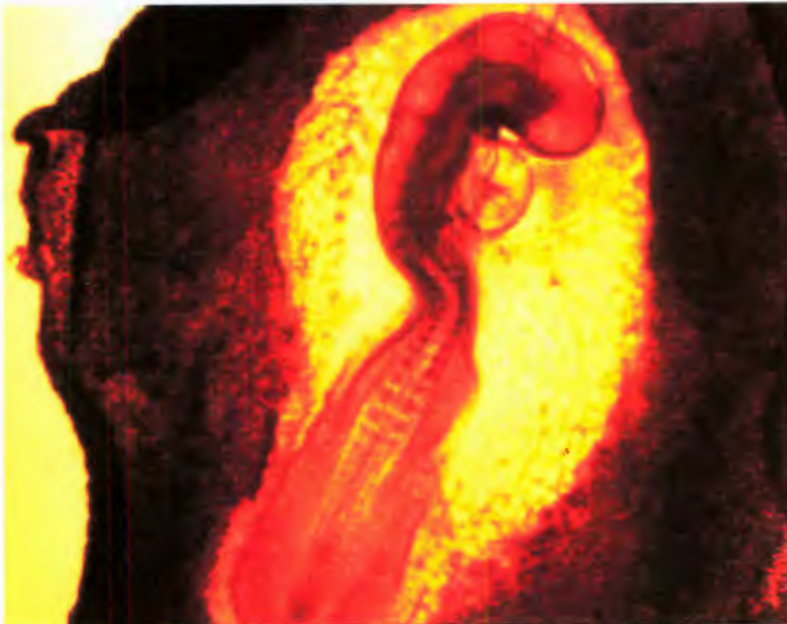


Figura 13. Embrión normal. En la Figura se muestra un embrión normal en que se observan claramente su estructura, es decir, se observan los somitas, los primordios ópticos, óticos y cardiacos así como el cierre del tubo neural, la inclinación o encorvamiento de la cabeza y el saco vitelino en el que se encuentra.

DESCRIPCIÓN DE UNA MICROCEFALIA

El cierre del tubo neural humano requiere una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. Ciertos genes, tales como *Pax3*, *sonic hedgehog*, y *openbrain*, son esenciales para la formación del tubo neural de los mamíferos (Gerhart, 1997). Sin embargo, cuando alguno de éstos genes o algún otro factor falla, se pueden presentar malformaciones en los embriones, una de esas malformaciones es la microcefalia; en ésta malformación el embrión presenta un número normal de pares de somitas, los primordios se observan ya formados, pero lo que difiere de un embrión normal es el tamaño de la cabeza pues es más pequeña de la de un embrión normal. La Figura 14 muestra una fotografía de una microcefalia.

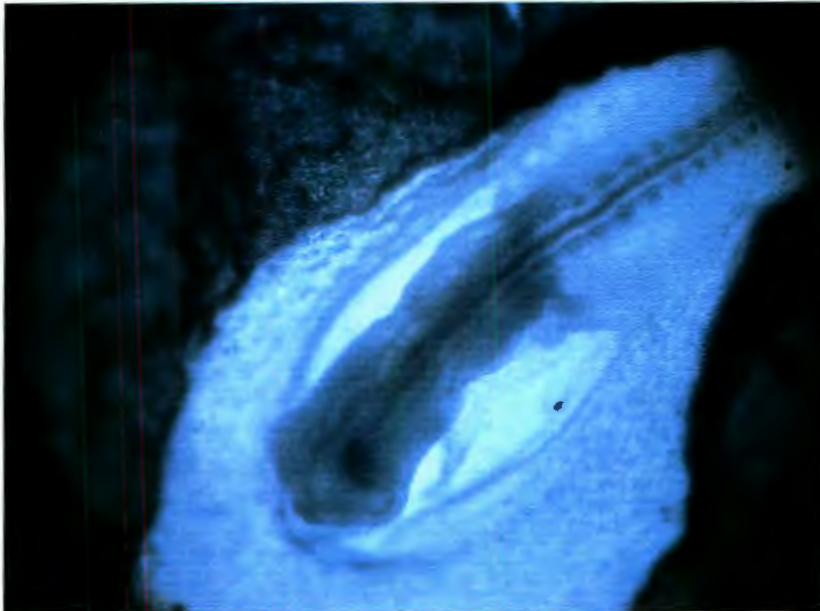


Figura 14. Embrión con microcefalia. La Figura muestra un embrión con microcefalia. Se observan claramente los somitas, que se presentan normales, se alcanzan a distinguir los primordios, tanto óticos como ópticos, así como el cierre del tubo neural, sin embargo, el ancho y el tamaño de la cabeza es mucho menor que la observada en un embrión normal.

VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El exceso de ácido fólico tuvo importantes efectos sobre los embriones de pollo, los cuales al presentar una neurulación parecida a la de los mamíferos, puede ser un indicio de que éstos también pueden presentar malformaciones debidas a éste factor. Hasta la fecha no existen reportes de embriones de pollo tratados con ácido fólico en exceso, debido a que el mayor enfoque es hacia su deficiencia.

En el grupo control se encontró que el 16.54% de los embriones presentaron algún tipo de malformación. Es posible que éstas sean debidas a alguna mutación, la cual es un cambio en la secuencia de DNA de un gen, que puede presentarse espontáneamente en la naturaleza por diversas causas como pueden ser: la generación de nuevos alelos en los genes, lo que puede provocar un cambio en la estructura aminoacídica de la proteína, otro tipo común de mutación es la adición o deleción de un solo par de nucleótidos, esto provoca que al momento de traducir la información genética, un nucleótido sea desplazado por otro en un aminoácido, ambos factores de mutación pueden provocar una expresión de alguna función o de alguna proteína no deseada, causando algún cambio fenotípico en el individuo (Griffiths y col, 1999). Otra posibilidad puede asociarse a la alteración de factores necesarios para el desarrollo completo del embrión como los ambientales en los que se desarrolla el producto (por ejemplo temperatura, grado de humedad y tiempo de incubación). Finalmente se considera que los cambios espontáneos podrían ser debidos a deficiencia de algunas enzimas o proteínas reguladoras, por ejemplo la mRNA polimerasa o el factor transcripcional TF también pueden ser causas de mutación (Alberts y col., 1999).

Cerca del 2% de infantes humanos nacen con una anomalía observable, éstas anomalías pueden incluir ausencia de miembros, ausencia o exceso de dedos, paladar hendido, ojos que carecen de partes, corazones que carecen de válvulas, algunos defectos de nacimiento son producidos por genes mutantes o cromosomas, y algunos son producidos por factores ambientales que impiden su

desarrollo (Scott, 2000). Para evitar posibles errores los embriones del grupo control fue sometido a las mismas condiciones y se observaron en el mismo estadio que los grupos tratados, es decir, fueron incubados a una temperatura constante de 37°C con una humedad relativa 56-60%, pero a éste grupo no se le suministró ningún tratamiento.

En los grupos tratados con ácido fólico se encontraron diferentes y diversas anomalías, cuyos resultados arrojan una diferencia significativa al compararlos con el grupo control. Una de las posibles causas de estas malformaciones es la alteración de los niveles de ácido fólico en ciclos donde el folato actúa como sustrato, por ejemplo el ciclo de la metionina. (Chanarin, 1994) (Achon y col., 2000). Ya que existe la hipótesis de que la disminución de folato rompe el metabolismo de la metionina; la homocisteína aumenta en el suero materno; la homocisteína induce el desarrollo anormal inhibiendo la función de los receptores de N-metilo-D-aspartato (NMDA) en el epitelio neural. (Rosenquist y Finnell, 2001). Los defectos del tubo neural están asociados con factores bioquímicos involucrados en la conversión de homocisteína a metionina en la deficiencia del folato y la mutación 677T en el gen que regula la N(5),N(10)-metileno-tetrahidrofolato reductasa y la deficiencia de esta enzima desfavorece el genotipo materno creando un factor severo de riesgo de deficiencias fenotípicas en el tubo neural en la población (Martínez de Villareal, 2001). El ácido fólico participa en la síntesis de metionina, la cual es un aminoácido esencial que también participa en el desarrollo y cierre del tubo neural, por lo que una alteración en éste ciclo también puede producir malformaciones en los embriones (Shaw, 1997).

Otra posibilidad que explique las anomalías puede estar asociada a que el folato está limitado por un exceso de proteína enlazadora de folato (FBP), incitando la especulación que FBP puede afectar la biodisponibilidad del suministro limitado de folato, esto indica que también si hay una deficiencia en la FBP puede haber una acumulación excesiva de folatos que no son degradados ni utilizados en el metabolismo, induciendo así malformaciones en el embrión. Los folatos naturales

son derivados reducidos de ácido fólico, que contiene predominantemente 5-metiltetrahidrofolato, se están llevando a cabo pocas investigaciones para determinar el papel de FBP en la biodisponibilidad de folatos reducidos (Jones y col., 2003).

El folato puede sufrir catabolismo como resultado de la degradación oxidativa no enzimática de cofactores lábiles de folato. El catabolismo del folato y su deficiencia ocurren en varios estados fisiológicos; el embarazo, el cáncer y cuando se usan drogas anticonvulsivas, esto provoca que al aumentar la exigencia de ácido fólico en el organismo, se emplean las cantidades necesarias para la satisfacción de esa exigencia, pero el exceso de ácido fólico puede ocasionar que haya inhibición por exceso en los receptores celulares provocando un bloqueo de estos receptores, por ello se ha establecido la posibilidad de que el catabolismo del folato puede ser un proceso celular regulado que influye en las concentraciones de folato intracelular, también se ha demostrado que el hierro almacenado por la proteína ferritina puede catabolizar el folato, por lo que aquí puede haber otro factor más que podría causar las malformaciones con una dosis excesiva de ácido fólico (Suh y col., 2001).

La reducción del folato es catalizada por la enzima dehidrofolato reductasa, y el ácido fólico reducido actúa como un importante donador de metilo en muchas reacciones incluso en la síntesis de timidina; ésta no se acumula en las células, por lo que podría esperarse que se exijan cantidades significativas de folato reducido para apoyar el aumento exponencial en la síntesis de ADN que ocurre durante desarrollo temprano del embrión, o bien se podría propiciar un aumento excesivo en la producción de ADN debida al aumento de metilaciones dentro del organismo y produciendo productos o compuestos no deseados. (O'Neill, 1998). El folato participa en las síntesis de purinas por lo que su aumento puede ocasionar trastornos al momento de la formación de las bases timina y metionina, reacciones en las que participa traspasando fragmentos de 1C, entre los que destacan los que forman C₂ y C₈ del núcleo purínico (Laguna, 1974).

La metilación del ADN participa manteniendo la función celular, y los cambios en los modelos de metilación pueden contribuir al desarrollo de cáncer. Los derivados del ácido fólico participan de manera importante en la metilación y acetilación de compuestos orgánicos, la metilación es un factor epigenético de control transcripcional y juega un papel esencial en las funciones celulares, por lo que los cambios en las rutas de metilación pueden contribuir a malformaciones o en adultos al desarrollo del cáncer desarrollando una metilación aberrante de ADN (hipometilación global acompañado por una hipermetilación específica regional) que frecuentemente se encuentra en las células del tumor. La hipometilación global puede resultar en inestabilidad de los cromosomas, y la hipermetilación ha sido asociado con la inactividad de genes supresores de tumores. (Davis y Uthus, 2004).

El ácido fólico puede participar en el aumento de la actividad de la variante de metileno tetrahidrofolato reductasa que disminuye los niveles de homocisteína en el plasma y se ha identificado una mutación común en el gen 5,10 de metileno tetrahidrofolato reductasa que produce una variante termolábil del 5,10 metileno tetrahidrofolato reductasa con actividad reducida de la enzima, la mutación común es un factor de riesgo para los defectos del tubo neural y enfermedades cardiovasculares en el adulto. (Hall y Solehdin, 1998).

Las interacciones del ácido fólico o de sus derivados con factores de crecimiento implicados en el metabolismo embrionario pueden inducir las malformaciones presentes en este grupo (Brennan y cols., 1981). De manera tradicional, si hay un aumento en algún elemento o nutriente en el organismo, se pueden producir alteraciones en el metabolismo del individuo, pero en este caso estamos tratando con embriones, que son mucho más sensibles a los cambios en el ambiente en el que se desarrollan de manera normal. El ácido fólico participa en la incorporación de timidina en la biosíntesis de pirimidina por lo que el exceso en ésta reacción es un factor importante que puede influir en la producción de malformaciones en los embriones (Flemming y Coop, 1998) además de participar en ésta reacción, el

ácido fólico interviene en la acetilación y metilación en la formación del sistema nervioso central, razón por la cual podemos pensar que si hay exceso de ácido fólico, puede haber también un incremento en éstos procesos y alterar así el desarrollo normal del embrión (Mattson, 2003).

El alto rango de mortalidad debida a los defectos del tubo neural esta relacionado con una alta frecuencia de anencefalias, en México, la influencia de algunos factores asociados a deficiencias en el tubo neural, tales como polimorfismos genéticos, deficiencia de ácido fólico, obesidad maternal, exposición ocupacional a pesticidas y pobreza, todos estos factores están íntimamente relacionados con las malformaciones del nacimiento. (Ramírez-Espitia, 2003).

Otra ruta metabólica en la cual participa el ácido fólico y sus derivados es la regulación de la homocisteína, la cual a niveles elevados provoca daño celular y apoptosis lo que podría ser una referencia para explicar la presencia de resorciones en los resultados observados durante el experimento (Wang y cols., 2004).

VIII CONCLUSIONES

- La acumulación excesiva de ácido fólico durante la gestación causa malformaciones en el tubo neural y resorciones durante la neurulación.
- Las condiciones de incubación son determinantes para un buen desarrollo embrionario.
- El modelo de embriones de pollo representa un método confiable para el estudio del efecto tóxico del ácido fólico durante la neurulación.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Achon, M.,** Alonso-Aperte, E. Reyes, L. Ubeda, N. Varela-Moreiras, G. **2000.** High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *British Journal of Nutrition*: Vol. 2:177-183.
- Alberts, B.,** Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. **1999.** Introducción a la Biología Celular. 1ª. ed Omega. España.
- Bohinski, R. 1978.** Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano, México: 530-533.
- Brennan, M.,** van der Westhuyzen, J., Kramer, S., Metz, J. **1981.** Neurotoxicity of folates: implications for vitamin B12 deficiency and Huntington's chorea. *Medical Hypotheses*: Vol 7: 919-929.
- Castillo, L. 1999.** http://fcmjtrigo.sld.cu/materiales/histoembriologia/embriologia1/mcd_essn.doc.
- Chanarin, I. 1994.** Adverse effects of increased dietary folate. Relation to measures to reduce the incidence of neural tube defects. *Clinical Investigation Medical*: Vol. 3:244-252.
- da Costa, M.,** Sequeira, J., Rothenberg, S., Weedon, J. **2003.** Antibodies to folate receptors impair embryogenesis and fetal development in the rat. *Birth Defects Research A Clinical Molecular Teratology*: Vol. 10: 837-847.
- Davis, C.,** Uthus, E. **2004.** DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Experimental Biology and Medicine*: Vol. 10: 988-995 .
- Etienne, J. 2001.** Manual Bioquímica Genética y Biología Molecular. 1ª. ed. Masson, España: 61-93.
- Flemming, A.,** Coop, A. **1998.** Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science*: Vol. 280: 2107-2109.
- Gerhart, J.,** Kirschner, M. **1997.** Cells, embryos and evolution. 1ª. ed. Blackwell Science, USA: 133-141.
- Griffiths, A.,** Gelbart, W., Miller, J., Lewontin, R. **1999.** Genética Moderna 1ª ed. Mc Graw Hill, España: 70-71.
- Hall, J.,** Solehdin, F. **1998.** Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *European Journal Pediatrics*: Vol. 6: 445-450.

- Hamburguer, U., Hamilton, H., 1951.** A series of normal stagea in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*: Vol. 88: 49-92.
- Jones, M., Treloar, T., Nixon, P. 2003.** Dietary interactions influence the effects of bovine folate-binding protein on the bioavailability of tetrahydrofolates in rats. *Journal of Nutrition.*: Vol. 2: 489-495.
- Laguna, J. 1974.** *Bioquímica*. 2^a. ed. La Prensa Médica Mexicana, México: 572-577.
- Latchman, D. 1998.** *Eukariotic transcription factors* 3^a. ed. Academic Press, USA: 5-18.
- Martínez de Villarreal, L., Delgado-Enciso, I., Valdez-Leal, R., Ortiz-Lopez, R., Rojas-Martínez, A., Limon-Benavides, C., Sanchez-Pena, M., Ancer-Rodriguez, J., Barrera-Saldana, H., Villarreal-Perez, J. 2001.** Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Archives Medical Research*: Vol. 4: 277-282.
- Mattson, M. 2003.** Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Revision*: Vol. 3: 329-342.
- McNulty, H., McPartlin, J., Weir, D., Scott, J. 1993.** Folate catabolism is increased during pregnancy in rats. *Journal of Nutrition.*: Vol. 6: 1089-1093.
- Mendenhall, W. 1987.** *Introducción a la probabilidad y la estadística*. 5^a. Ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México: 290-307, 441-464.
- O'Neill, C. 1998.** Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Human reproduction*: Vol. 5:1312-1316.
- Ramírez-Espitia, J., Benavides, F., Lacasana-Navarro, M., Martínez, J., García, A., Benach, J. 2003.** Mortality from neural tube defects in Mexico, 1980-1997. *Salud Pública Mexicana*: Vol. 5: 356-364.
- Rosenquist, T., Finnell, R. 2001.** Genes, folate and homocysteine in embryonic development. *Proccedings Nutrition Society*: Vol. 1: 53-61.
- Scott, F. 2000.** *Developmental biology*. 6^a. ed. Sinaver Associates Inc. Publishers, USA: 25-26, 345-354, 379-389.

Shaw, G., Velie, E., Schaffer, D. 1997. Is dietary intake of methionine associated with a reduction in risk for neural tube defect-affected pregnancies?. *Teratology*: Vol. 5: 295-299.

Suh, J., Herbig, A., Stover, P. 2001. New perspectives on folate catabolism. *Annual Review of Nutrition*.: Vol. 21: 255-282.

Wang, Y., Zhou, Q., Wang, S., Zhang, J. 2004. Homocysteine-induced apoptosis of endothelial cell and its antagonism by folic acid--the roles of caspase3, c-IAP1 and c-IAP2. *Wei Sheng Yan Jiu*: Vol. 3: 310-313.

West, E., Todd, W., Mason, H., Van Bruggen, J. 1976. *Bioquímica Médica*. 4^a. ed. Interamericana, México: 620-631.