



FACULTAD DE FARMACIA
QUIMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS *IN VITRO* DE
MISOPROSTOL SOBRE EL DESARROLLO DE
EXTREMIDADES DE FETOS DE RATA EN ETAPA
DE ORGANOGÉNESIS TARDÍA**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Oscar Armando Madrid Fuenzalida

Directora de tesis: María Fernanda Cavieres F., Ph.D.

2014

i. RESUMEN	3
ii. ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN	5
Desarrollo embrionario	6
Prostaglandinas E: desarrollo y metabolismo óseo	11
Misoprostol como agente teratígeno	14
Evidencia epidemiológica de toxicidad por misoprostol	16
Evidencia experimental de embriotoxicidad por misoprostol	17
II. HIPÓTESIS	20
III. OBJETIVOS	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
V. RESULTADOS	33
Montaje del método experimental	34
Control interno	35
Fetos cultivados en presencia de misoprostol	40
Fetos cultivados en presencia de PGE ₂	44
Fetos cultivados en presencia de antagonista EP ₁ /EP ₂	47
VI. DISCUSIÓN	52
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. BIBLIOGRAFIA	64
IX. ANEXOS	73

i. RESUMEN

Las prostaglandinas (PGs) de la serie E juegan un papel importante en el metabolismo y desarrollo óseo. El análogo de prostaglandina E₁ (PGE₁), Misoprostol, registrado en Chile con indicación para prevención y tratamiento de úlceras pépticas inducidas por anti-inflamatorios no esteroideos. Se utiliza además para inducir abortos por su capacidad uterotónica. La exposición *in utero* a misoprostol luego de intentos fallidos de aborto, ha sido asociada con alteraciones articulares y esqueléticas por un mecanismo no dilucidado. Al poseer capacidad de actuar en los receptores prostanoideos expresados en tejido óseo, su administración durante la gestación, podría producir efectos que se manifestarían como malformaciones en las extremidades. Esta tesis tiene como objetivo evaluar el efecto de misoprostol sobre el desarrollo de las extremidades y contribuir a dilucidar su mecanismo de acción teratogénico. Se estableció un nuevo modelo de estudio, el cultivo de fetos de DG 13,5, y se evaluaron parámetros de funcionalidad, crecimiento y morfología en fetos cultivados en presencia de 200, 2.000 y 20.000 pg/mL de misoprostol, así como en presencia de PGE₂ y del antagonista de los receptores EP₁ y EP₂, AH6809. El medicamento, la PGE₂ y el antagonista indujeron similar toxicidad visualizada como generación de hendiduras anormales y disminución del desarrollo óseo en radios digitales de extremidades anteriores, sin alterar los parámetros de crecimiento y funcionalidad. En conclusión, misoprostol posee la capacidad de generar alteraciones visibles en el desarrollo de las extremidades, las que no serían mediadas por los receptores prostanoideos EP₁ o EP₂.

ii. ABSTRACT

Prostaglandins of the E-series play an important role on bone metabolism and development. Misoprostol is a prostaglandin E₁ analog and is registered in Chile for the prevention and treatment of non-steroidal anti-inflammatory peptic ulcers. Given its uterotonic activity it is also used to induce abortions. In utero exposure to misoprostol, after failed abortion attempts, has been associated to joint and skeletal defects, the mechanism of which is unknown. Since misoprostol can act on prostanoid receptors expressed during gestation, it could induce limb defects. In this thesis the effect of misoprostol on limb development was evaluated as an effort to elucidate its mechanism of action. A new model of study was established, the use of GD13,5 fetus culture in which to evaluate functionality, growth and morphology when fetuses were cultured either in the presence of misoprostol 200, 2.000 and 20.000 pg/mL or in the presence of PGE₂ or the EP₁ and EP₂ antagonist, AH6809. Misoprostol, PGE₂ and the antagonist induced similar toxicity, inducing abnormal clefts and decrease of bone development in anterior limb digital rays. However, they did not alter growth and functionality parameters. In conclusion, misoprostol induces overt manifestations of alterations of limb development, which may not be mediated by prostanoid receptors EP₁ or EP₂.

Desarrollo embrionario

En vertebrados, la gestación se inicia con la fecundación, proceso en el cual un espermatozoide y un ovocito II se fusionan formando el cigoto. A medida que avanza la gestación y tras sucesivas divisiones y diferenciaciones celulares y tisulares, y luego del establecimiento secuencial de la mórula, el blastocisto, los discos bilaminar y trilaminar se genera el embrión (Carlson, 2009).

En humanos, el desarrollo de las extremidades comienza al término de la cuarta semana de gestación, con la activación de un grupo de células mesenquimatosas del mesodermo lateral somático originada posiblemente por la expresión del factor de crecimiento fibroblástico 10 (FGF-10; Carlson, 2009). Al final del primer mes de gestación para las extremidades superiores, se ha establecido el primordio de la extremidad y este comienza a crear un relieve en la pared del tronco del embrión (figura 1) formando una yema compuesta por una masa de células mesodérmicas cubiertas por una capa de ectodermo, que forma además una capa engrosada a lo largo del eje anteroposterior de la extremidad, conocida como cresta ectodérmica apical (figura 2), la cual se sitúa al borde de las regiones que originarán manos y pies y que presentan una forma de aleta característica.

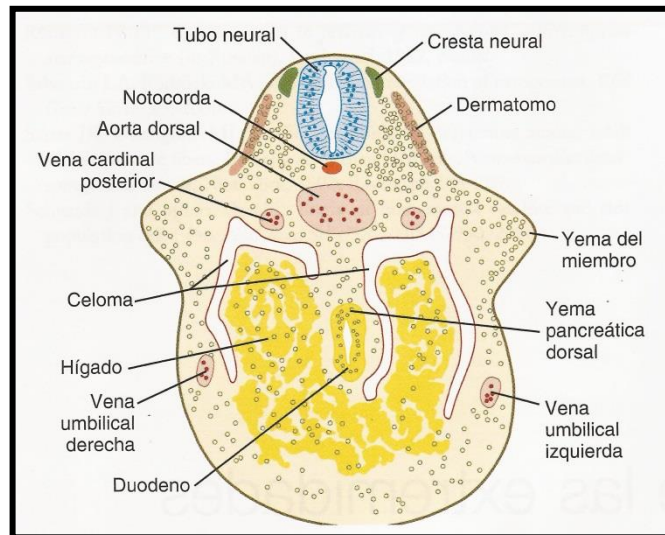


Figura 1: Corte transversal del tronco durante el desarrollo temprano de la yema del miembro que muestra su posición en relación al somita (dermatomo). La yema sobresale de la pared del miembro (modificado de Carlson, 2009).

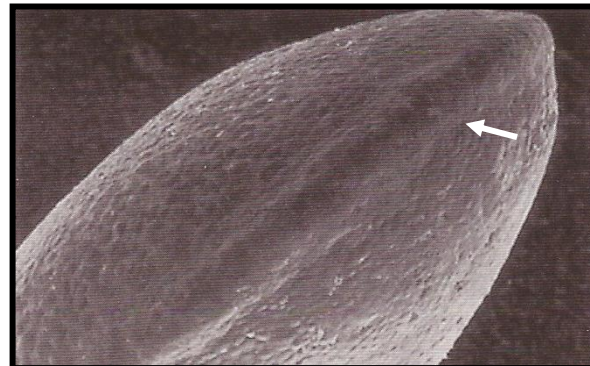


Figura 2: Microfotografía electrónica de barrido que muestra la yema de un miembro en un embrión humano, con la sobresaliente cresta ectodérmica apical (flecha blanca; modificado de Carlson, 2009).

En cuanto al mesodermo de la yema que dará origen a la extremidad, este está formado inicialmente solo por células del mesodermo de la placa lateral, las que darán origen al esqueleto, tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Posteriormente, migran células derivadas de las somitas para originar músculos,

mientras que las células de Schwann de los nervios y los melanocitos de la piel derivan de la cresta neural (figura 3).

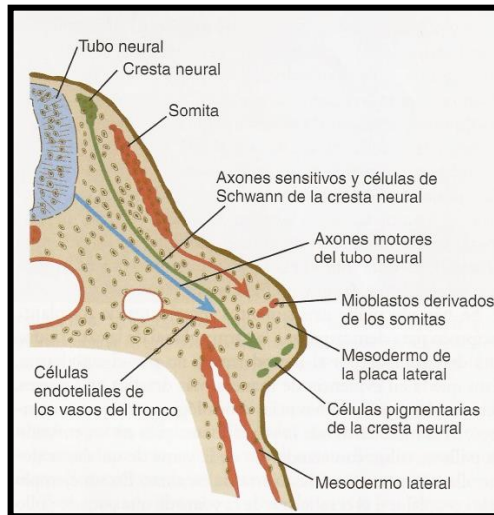


Figura 3: Diferentes tipos celulares que migran a la yema del miembro (modificado de Carlson, 2009).

Mientras se desarrolla la extremidad, comienzan a aparecer modelos precartilaginosos que delimitarán los rayos digitales y los espacios entre los mismos, así a medida que el miembro crece hacia afuera, la muerte celular programada o apoptosis esculpe los espacios interdigitales, aunque si bien no se conoce el mecanismo exacto que determina la muerte celular en ellos, se sabe que las proteínas morfogénicas óseas (BMP) 2, 4 y 7 jugarían un papel importante en la señalización de la misma. (Carlson 2009).

En cuanto a los procesos de formación del hueso, estos aparecen inicialmente como condensaciones de células mesenquimales que constituirán primero un modelo cartilaginoso y delimitarán la diferenciación celular. El hueso en

sí se desarrolla sobre dos tipos de tejido conjuntivo, el mesénquima y el cartílago, lo cual permite distinguir dos procesos de osificación: la osificación intramembranosa y osificación endocondral o intracartilaginosa. Este último proceso se refiere a la generación de huesos largos y cortos a partir de tejido conectivo cartilaginoso y ocurre a partir de la condensación del mesénquima que origina el modelo óseo, lugar donde las células se diferencian a condrocitos para formar cartílago hialino.

En un modelo de hueso largo, como el de las extremidades, el núcleo o centro de osificación se encuentra en la futura diáfisis del mismo (figura 4), aquí ocurren una serie de procesos que darán origen al futuro tejido óseo: comenzando por la hipertrofia de los condrocitos que acumulan glucógeno al interior del citoplasma y retención de agua, seguido por una mineralización de la matriz cartilaginosa que hace imposible la nutrición de los condrocitos provocando la muerte celular. Las células en necrosis liberan factores angiostáticos lo que provoca la penetración de vasos sanguíneos desde el periostio trayendo consigo células osteoprogenitoras que darán inicio a la síntesis de tejido óseo sobre la matriz condral mineralizada generando trabéculas mixtas de centro de matriz cartilaginosa carente de células y superficie de matriz ósea con células osteoprogenitoras.

Así mismo, en el pericondrio, células que se han diferenciado a osteoblastos comienzan a depositar sustancia osteoide que se calcifica y da origen al periostio. El proceso de osificación se extiende de forma divergente

desde ambos lados del centro de osificación hacia los extremos de este donde limita con las futuras epífisis.

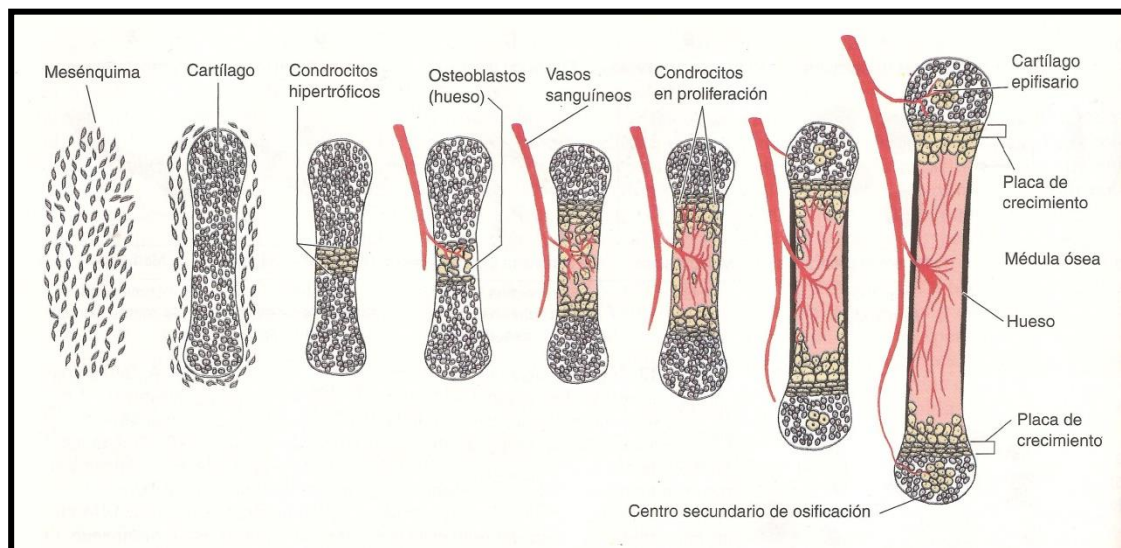


Figura 4. Proceso de osificación de un hueso largo (osificación endocondral, modificado de Gilbert, 2005).

Por otro lado como muestra la figura 4, en las epífisis se inician semanas o meses después los centros secundarios de osificación, que dan lugar al hueso esponjoso epifisario que conservará cartílago en la superficie, el que se transformará en el cartílago articular. El crecimiento en longitud del hueso, se genera por procesos de osificación en la metáfisis, localizada entre diáfisis y epífisis. En la zona de la metáfisis más cercana a la diáfisis ocurre hipertrofia de los condrocitos y calcificación de la matriz cartilaginosa, mientras que en la zona cercana a la epífisis ocurre proliferación continua de los condrocitos, generando así columnas o trabéculas que cuando se calcifican, los osteoblastos generan

nuevo tejido óseo lo que lleva al alargamiento del hueso (Eynard y cols., 2008). En los procesos del desarrollo y metabolismo óseo intervienen una serie de mediadores, dentro de los que se encuentran las prostaglandinas de la serie E.

Prostaglandinas E: desarrollo y metabolismo óseo.

Las prostaglandinas (PGs) corresponden a grupo de mediadores lipídicos producidos a partir de ácido araquidónico en diversos tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Aoyama y cols., 2005), sintetizadas y liberadas inmediatamente en respuesta a variados estímulos con el fin de mantener la homeostasis local. La prostaglandina E₂ (PGE₂), es la más producida en el humano y otras especies y presenta las acciones más versátiles, jugando papeles importantes en la inflamación, implantación embrionaria y vasodilatación. Se sabe que actúa a través de 4 receptores expresados diferencialmente en casi todos los tejidos: EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄ (Sugimoto y Narumiya, 2007) pertenecientes al tipo de receptor acoplado a proteína G. Además, que EP₁ estaría acoplado a una proteína G_q mediando un aumento del Ca⁺² intracelular, mientras que EP₂ y EP₄ estarían acoplados a una proteína G_s que mediaría una activación de adenilato ciclasa aumentando los niveles de AMPc, en contraste con EP₃ que mediante una proteína G_i inhibiría dicha enzima y por consiguiente provocaría una disminución del AMPc intracelular (figura 5; Bos y cols., 2004).

Inicialmente PGE₁ y PGE₂ fueron asociadas a una estimulación de la resorción ósea (Klein y Raisz, 1970). No obstante, investigaciones más recientes las asocian también con efectos anabólicos en hueso y cartílago. Se ha visto, que la señal inducida por PGE₂ a través del receptor EP₂ es capaz de inducir maduración y diferenciación de los condrocitos del cartílago articular (Aoyama y col., 2005), mientras que en la placa de crecimiento, nombre que se da al tejido cartilaginoso encargado de la osificación endocondral de los huesos largos, PGE₂ ejercería un efecto proliferativo mediado principalmente por EP₁ (Brochhausen y cols, 2006). Adicionalmente, otros estudios, como el desarrollado por Minamizaki y cols (2009) utilizando cultivos de células de calvaria demostraron que EP₂ y EP₄ mediarían efectos de PGE₂ en la formación de nuevos nódulos mineralizados en el hueso en formación.

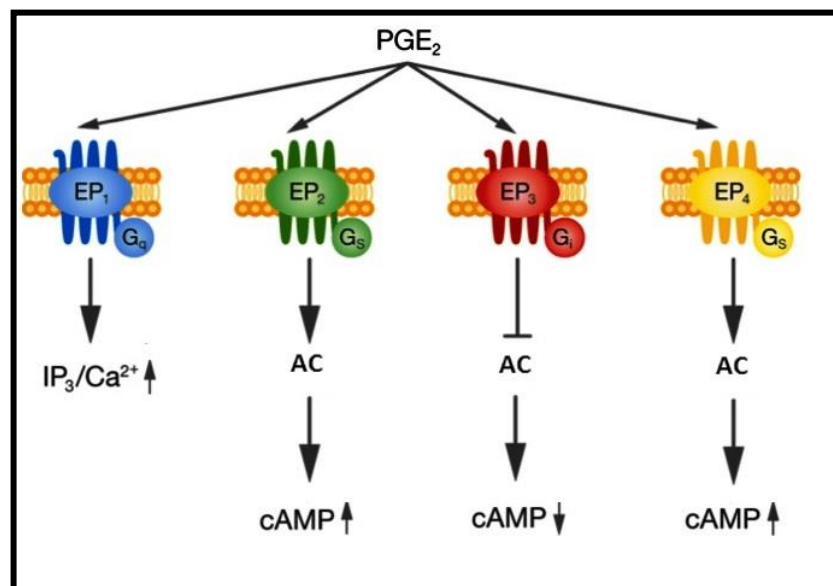


Figura 5: Receptores EP y sus vías de señalización (modificado de Konya y cols., 2013).

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de agonistas selectivos de los receptores EP. Cameron y cols (2009) observaron que la activación de EP₂ por CP-533536, un agonista selectivo de este receptor, mediante inyección en la médula ósea de la metafisis proximal de la tibia, generaba formación local de hueso. Por otro lado, la utilización de ONO-4819, un agonista selectivo para los receptores EP₄, demostró que éste jugaría un papel importante en la formación de hueso, aumentando el volumen del mismo por inducción de la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos sin mediar efectos significativos en osteoclastos (Ninomiya y cols, 2011).

Así mismo, la prostaglandina E₁ (PGE₁) actuaría sobre los mismos 4 tipos de receptores aunque con distinta afinidad y potencia (Ungrin y col., 2001). Su interacción en el receptor EP₂ aumenta la producción de AMPc en osteoblastos (Boskey y col., 1996). Además, estudios sugieren que en estas células se favorecería la producción de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial, por una activación de Rho-quinasa vía EP₂, lo que implicaría un aumento de la permeabilidad vascular y estimulación de la proliferación y migración de células endoteliales, las que proporcionarían la vasculatura necesaria para la remodelación ósea (Adachi y col., 2009). Adicionalmente, se sabe que las células mesenquimales producen PGE₁ y PGE₂ durante su diferenciación (Boskey y cols., 1996), lo que permitiría avalar la importancia de las prostaglandina E₁ y E₂ en el desarrollo esquelético normal y la mantención del metabolismo óseo. Por lo mismo, diversos análogos y agonistas de las vías de señalización de las

prostaglandinas de la serie E, como es el caso del misoprostol, podrían jugar un rol en el desarrollo de las extremidades y, de esta forma, estar implicado en la generación de defectos del desarrollo (DD).

Misoprostol como agente teratógeno.

Según la Real Academia Española un teratógeno es un agente que produce malformaciones en el embrión o feto (RAE, 2013). Este término se refiere únicamente a factores ambientales, los cuales englobarían una serie de agentes físicos, biológicos y químicos, dentro de los cuales estaría inmerso el medicamento misoprostol (Rojas y cols., 2012).

Misoprostol (15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl PGE₁) es un análogo sintético de la prostaglandina E₁ (figura 6). Ha sido registrado en Chile para prevención de úlceras pépticas producidas por anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) por su capacidad anti-secretora de ácido gástrico y efecto citoprotector de la mucosa gástrica (Watkinson y cols, 1988).

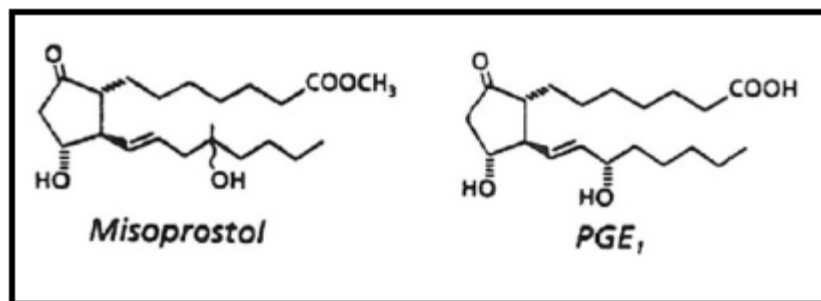


Figura 6: Estructura química de misoprostol y de la Prostaglandina E1 (Collins, 1990)

Debido a su interacción con los receptores EP₃ en el útero, misoprostol induce un aumento del calcio citosólico, con el consecuente incremento en la frecuencia e intensidad de contracciones en el músculo liso uterino (Bugalho y col., 1994), por esto es utilizado también como un inductor de parto, ampliándose su uso en obstetricia a la prevención y tratamiento de la hemorragia obstétrica y atención post-aborto (Corrêa y Mastrella, 2012). Por esta razón, es utilizado ampliamente con fines abortivos, sea legal o ilegalmente, contando con un margen de efectividad del 85 a 90% cuando se le utiliza como fármaco único (Faúndes y cols., 2007). En otras palabras, un 10 a 15% de las madres podría continuar su embarazo, en caso de un aborto fallido, con el consiguiente riesgo de la exposición intrauterina al misoprostol.

Ya que posee alta efectividad y ventajas comparativas con otros medicamentos, como son su precio, disponibilidad y estabilidad a temperatura ambiente, misoprostol es incluido por la Organización Mundial de la Salud en la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales para la interrupción temprana del embarazo (WHO, 2013). Sin embargo, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América, lo clasifica en la categoría X, contraindicado durante el embarazo, dado que la exposición a misoprostol durante el embarazo puede causar el desarrollo de defectos congénitos, entre los que destaca la artrogriposis, parálisis central de pares craneanos (síndrome de Moebius), defectos en las extremidades y anomalías cerebrales (Cavieres, 2011).

Evidencia epidemiológica de toxicidad por misoprostol

Existe una fuerte asociación epidemiológica entre exposición a misoprostol durante la gestación y el desarrollo de anomalías congénitas, las cuales se pueden resumir en tres tipos (Cavieres, 2011):

1.- Defectos de extremidades: Deformidades superiores e inferiores, las que incluyen con frecuencia el pie varo-equino y artrogriposis.

2.- Defectos del sistema nervioso: Principalmente Síndrome de Moebius, asociado o no al espectro autístico.

3.- Otros: anomalías viscerales y esqueléticas, defectos del tubo neural, labio y paladar fisurado.

Así es el caso de un estudio prospectivo de cohorte en Argentina en el que compararon los resultados en la gestación de 94 mujeres expuestas a misoprostol y 401 mujeres no expuestas durante el primer trimestre de embarazo. Del total de expuestas, 5 tuvieron hijos con malformaciones mayores en contraste de las no expuestas con solo 8 casos de malformaciones congénitas, lo que evidenció un riesgo relativo significativamente aumentado de malformaciones en niños expuesto *in utero* a misoprostol, a pesar de que algunas malformaciones no han sido consideradas como efectos característicos de esta droga (Barbero y cols., 2011).

En cuanto a nuestro país, Osorio y col (2007) documentaron un caso de síndrome de Moebius y artrogriposis asociado al uso de misoprostol en que la

madre refiere haber utilizado 3 comprimidos de misoprostol por vía vaginal a las 8 semanas de gestación. A los 13 días del nacimiento, la evaluación neurológica del lactante evidencia hipotonía axial con artrogriposis distal y de articulación temporo-maxilar, displejia facial periférica, parálisis VI par bilateral y parálisis IX-X.

Se piensa que misoprostol ejercería sus efectos teratogénicos mediante las intensas contracciones uterinas, que limitarían el flujo de sangre al embrión o feto en desarrollo, lo que a su vez provocaría una condición de hipoxia. Por otro lado, el efecto mecánico de las contracciones favorecería una flexión de los nervios craneales que sumado a la vulnerabilidad de los mismos, debido a la etapa de desarrollo en que se encuentran, colaboraría en la génesis del síndrome de Moebius. Además, los efectos disruptores vasculares estarían asociados a defectos en el desarrollo en las extremidades en crecimiento (Vargas y cols., 2000; Bos-Thompson y cols., 2008)

Evidencia experimental de embriotoxicidad de misoprostol

La evidencia experimental con modelos animales *in vivo* que demuestren los efectos teratogénicos y que diluciden el mecanismo por el cual ocurren las malformaciones causadas por misoprostol, aún es limitada.

Por esto, se hace necesaria la utilización de modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos que median la teratogenicidad de misoprostol. Con este fin, en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de

Valparaíso se han utilizado una serie de modelos para dilucidar el mecanismo de acción de la molécula. Campos y Cavieres (2011) demostraron que el ensayo de cultivo de embriones de rata postimplantación resultaba apropiado con este fin. Recientemente Tapia (2013) corroboró estos resultados, al evidenciar defectos en el desarrollo de embriones de 9,5 días de gestación cultivados por 48 horas en presencia de misoprostol. Estos defectos se caracterizaron por falta de fusión del tubo neural anterior y posterior, alteración de los arcos faríngeos, defectos en la rotación del embrión en porciones distal y proximal, alteración en los esbozos de extremidades anteriores y posteriores así como disminución en la viabilidad de los embriones. Las observaciones realizadas por Tapia (2013), las que incluyen la utilización de AH6809, antagonista de receptores EP₁ y EP₂, le permitieron plantear a esta autora, que los efectos generados podrían deberse a la unión de misoprostol a los receptores EP₃ presentes en la vasculatura del saco vitelino. Esto último, basado principalmente en la vasoconstricción observada en los embriones tratados con misoprostol y ausente al ser expuestos al antagonista EP₁ y EP₂.

En esta misma línea, se han utilizado fetos de mayor edad gestacional que permiten estudiar efectos ocasionados más tardíamente, como aquellos visibles en las extremidades. Por ejemplo, el uso de cultivos de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata mediante el ensayo de micromasa, permitió observar como misoprostol es capaz de aumentar la viabilidad y diferenciación de estas células a condrocitos cuando se cultivan en presencia de altas

concentraciones del fármaco. Este efecto fue revertido con la utilización de L-789106, antagonista de receptores EP3, cuando se ensayó conjuntamente a misoprostol (Rosa Delgado, comunicación personal).

Debido a estas observaciones recientes y a los datos recogidos de la literatura, es posible hipotetizar que misoprostol ejercería sus efectos tóxicos debido a su capacidad de interacción con los receptores de PG's lo que generaría los efectos en el desarrollo de las extremidades. Resulta necesaria, entonces, la generación y utilización de un nuevo modelo de estudio, el cultivo de fetos de día gestacional (DG) 13,5, el que además se plantea como una alternativa válida para estudiar teratogénesis, ya que como mencionan Cockroft (1973) y Fantel y cols, (2000) los fetos en esta etapa gestacional presentan un rápido crecimiento y desarrollo de sus extremidades y por consiguiente una alta susceptibilidad al desarrollo de alteraciones en ellas. Por lo demás, este método cumple con los principios del uso bioético de animales de experimentación ya que reduce el número de animales de experimentación.

Cabe mencionar, que para efectos de esta investigación, los fetos de DG 13,5 se correlacionan con un feto humano de 5 a 6 semanas de gestación (Kaufman, 1992) y que, como se mencionó anteriormente, presenta una susceptibilidad a los DD en las extremidades por lo que se pretende contribuir de esta manera a la elucidación del mecanismo de acción teratogénico del misoprostol.

II. HIPOTESIS

Dado que las prostaglandinas E_1 y E_2 participan en el desarrollo esquelético a través de receptores prostanoideos y dado que misoprostol actúa a través de estos mismos receptores, el cultivo de fetos de rata en presencia de este medicamento, podría inducir alteraciones en el desarrollo de las extremidades.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de misoprostol sobre el desarrollo de las extremidades en un modelo de feto de rata en organogénesis tardía.

Objetivos específicos

Caracterizar los efectos de misoprostol sobre el desarrollo esquelético de los fetos de 13,5 días de gestación mediante análisis morfológicos.

Comparar los efectos inducidos por misoprostol y aquellos inducidos por prostaglandinas E_2 en el desarrollo esquelético de fetos de rata.

Comparar los efectos inducidos por misoprostol y aquellos inducidos por un antagonista de receptores EP_1 y EP_2 en el desarrollo esquelético de los fetos de rata.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos que involucraron animales de experimentación en el transcurso de esta tesis se basaron en las normas del *Guide for the Care and use of Laboratory Animals* del *National Research Council* de Estados Unidos (2010) y además contaron con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias y certificación de bioseguridad por el Comité de Bioseguridad Institucional de la Universidad de Valparaíso (Ver Anexos)

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 8 semanas de edad y de 250 ± 30 g de peso de la colonia del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, mantenidas a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, con ciclos de luz/oscuridad (12/12) y acceso *ad libitum* a alimento (Lab Rat, Champion) y agua potable.

Montaje del método experimental

Previo al desarrollo experimental fue necesario establecer las condiciones óptimas de cultivo para lograr una viabilidad adecuada. Con este objetivo, se ajustó, tanto la edad gestacional de los fetos en el momento de la recolección como el periodo de cultivo. Así mismo, se evaluaron dos moléculas como control positivo, es decir, moléculas que no ejercieran efectos sobre la viabilidad pero que evidenciaran defectos en el desarrollo de las extremidades. Así, se realizaron cultivos con fetos recolectados en los DG 13,0 y 13,5, los que se cultivaron por 8 y

24 horas en presencia de 5-fluoruracilo (5-FU; Sigma-Aldrich N° CAS 51-21-8) 1 mg/L o ketoconazol (Sigma-Aldrich N° CAS 65277-42-1) 200, 100 o 75 µg/mL.

Cultivo de fetos en organogénesis tardía

El cultivo de fetos fue adaptado de acuerdo a los procedimientos descritos por Cockroft (1973), Fantel y cols (2000) y Liu y cols (2007) para cultivo de fetos recolectados en el DG 13,5.

Para la obtención de fetos, se cruzaron ratas en una proporción de 3 a 4 hembras por macho, por un periodo de cruce desde las 17:00 horas del primer día a 09:00 horas del día siguiente. El DG 0,5 fue determinado por presencia de espermatozoides en el frotis vaginal realizado al término del periodo de cruce (figura 7)

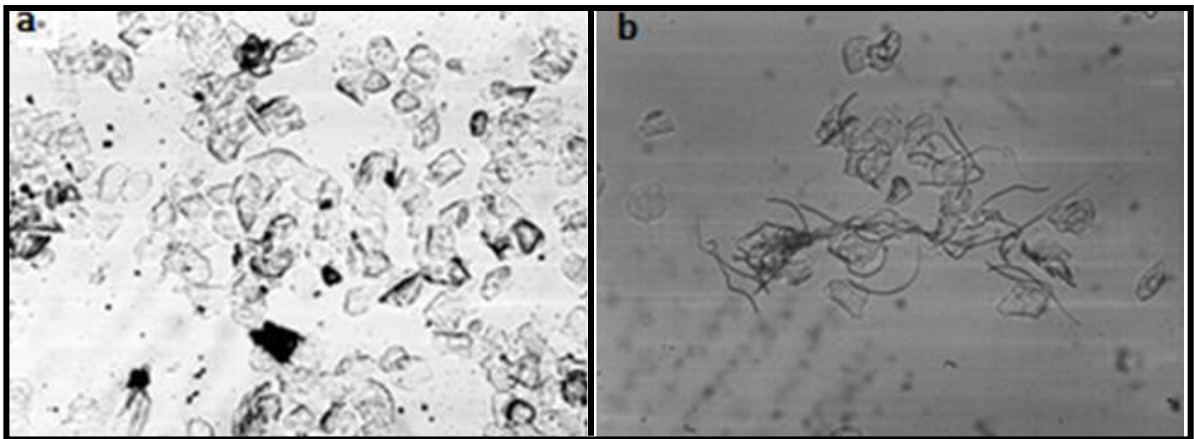


Figura 7: Citología vaginal de rata en etapa estro del ciclo estral **(a)** Rata no preñada, ausencia de espermatozoides en frotis vaginal **(b)** Presencia de espermatozoides en frotis vaginal, indicativo de coito y preñez de la rata (Fotografía microscopía óptica 10 X).

La hembra fue eutanizada en el DG 13,5 mediante dislocación cervical, previa anestesia con dióxido de carbono y sometida a cesárea para la recolección de fetos, los que fueron transferidos a una placa Petri con solución salina de Hank's (CaCl_2 , NaCl , KCl , MgSO_4 , NaHCO_3 , glucosa, Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) previamente esterilizada y a 37°C . En la solución salina, se procedió a la remoción de la decidua procurando dejar intacta la placenta para posteriormente realizar un corte en L en el saco vitelino, evitando dañar la circulación del mismo para no provocar un sangrado excesivo y alterar la viabilidad fetal. A través del corte en L se realizó la exteriorización del feto dejándolo totalmente expuesto al medio de cultivo (figura 8).

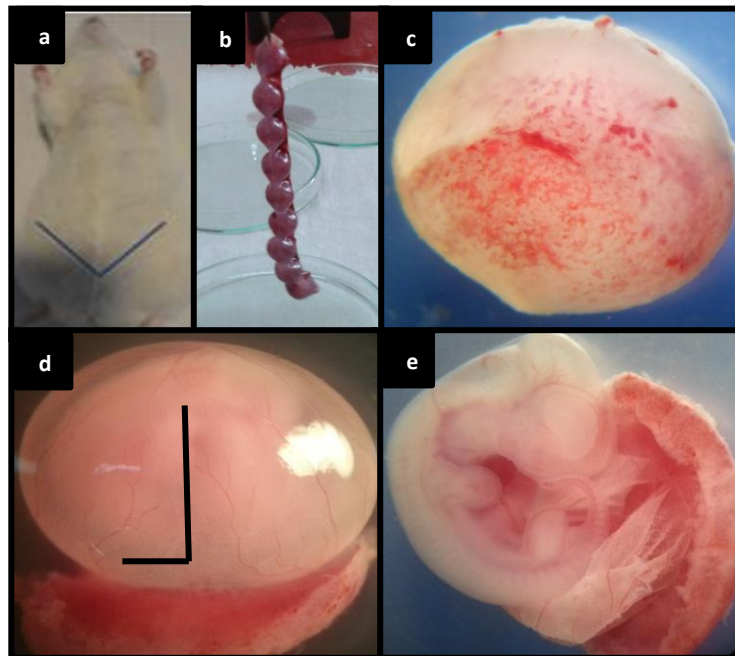


Figura 8: Extracción y exteriorización de fetos en DG 13,5 **(a)** cesárea DG 13,5. **(b)** cuerno uterino grávido. **(c)** feto explantado con decidua cubriendo saco vitelino y placenta. **(d)** feto explantado sin decidua sobre saco vitelino y placenta, mostrado zona de corte en L **(e)** feto exteriorizado con saco vitelino recogido listo para ser cultivado.

Una vez exteriorizados, los fetos fueron cultivados en tubos desechables de 50 mL con 15 mL medio de cultivo, compuesto por suero de rata desactivado, solución salina de Hank's y penicilina/estreptomicina en una concentración de 10.000 U/mL y 10 mg/mL respectivamente (Sigma-Aldrich N° CAS 8025-06-7). El volumen utilizado por cada uno de estos componentes en la preparación del medio de cultivo fue distinto para cada tratamiento (tabla 1). Los fetos se cultivaron a 37 °C por un periodo de 24 horas y puestos de manera inclinada en un agitador rotatorio a 60 rpm, para favorecer el intercambio de nutrientes y la oxigenación entre el feto y el medio de cultivo (New, 1967). Previo al cultivo, los fetos fueron pre-cultivados por 2 horas en las mismas condiciones con el fin de descartar aquellos que no serían viables por el periodo deseado.

Durante el periodo de cultivo, los fetos fueron oxigenados durante 1,5 minutos cada 4 horas con una mezcla gaseosa de 95 % O₂ y 5 % CO₂.

Preparación de suero de rata

La sangre fue recolectada a través de punción de la aorta abdominal de machos previamente anestesiados por inhalación de dióxido de carbono, a los cuales se les realizó un corte abdominal para la introducción de la jeringa. Una vez extraída fue depositada en tubos desechables de 15 mL y centrifugada inmediatamente a 3.500 rpm por 5 minutos a 4°C. El suero recolectado fue recentrifugado en las mismas condiciones y almacenado a -18°C. El día de su

utilización fue descongelado y sometido por 45 minutos a baño termostático a 56°C para desactivación del complemento.

Grupos experimentales

Los fetos, seis por tratamiento, fueron asignados al azar en uno de los siguientes grupos de estudios: control de medio, control negativo, control positivo, control de vehículo, misoprostol (Sigma-Aldrich N° CAS 59122-46-2) 200, 2.000 y 20.000 pg/mL. Se utilizaron concentraciones crecientes de misoprostol, siendo alrededor de 200 pg/mL la concentración plasmática de ácido misoprostico que se alcanza en una mujer a la que se ha administrado una dosis de 400 µg del medicamento vía vaginal (Zieman y col., 1997; Khan y col., 2004). Para evaluar la concentración-dependencia de la toxicidad se ensayaron dos concentraciones más altas. Debido a que el misoprostol es un compuesto liposoluble, se utilizó formamida desionizada (FDA; Sigma-Aldrich N° CAS 75-12-7) como vehículo en una concentración de 0,5% (Augustine-Rauch, 2004).

Para asegurar la calidad del estudio, se utilizó Penicilina G sódica (Sigma-Aldrich N° CAS 15140-163) a una concentración final de 1000 mg/L como control negativo y ketoconazol a una concentración final de 50 µg/mL como control positivo.

Adicionalmente se realizaron cultivos en presencia de PGE₂ a 70 pg/mL (Sigma-Aldrich N° CAS 363-24-6), siendo ésta última la concentración de PGE₂ que se encontraría en el feto humano (Weiner y Robillard, 1989), y de AH6809, un

antagonista EP₁/EP₂ (Sigma-Aldrich N° CAS 33458-93-4) a 0,1 µM (29.829 pg/mL), siendo ésta la mínima concentración reportada para que este antagonista bloquee las acciones de PGE₂ mediada por los receptores EP₁/EP₂ (Jones y cols., 2009). Tanto PGE₂ como AH6809 fueron disueltos en FDA.

Tabla 1. Formulación del medio de cultivo.

Componente	Volúmenes para el medio de cultivo, según tratamiento (mL)			
	Misoprostol	PGE ₂	ATG EP1/EP2	Misoprostol + ATG EP1/EP2
Suero de rata	2,000	2,000	2,000	2,000
Solución salina de Hank's	12,865	12,865	12,865	12,790
Penicilina/estreptomicina	0,060	0,060	0,060	0,060
Misoprostol	0,075	---	---	0,075
PGE ₂	---	0,075	---	---
AH6809	---	---	0,075	0,075
Volumen Total	15,000	15,000	15,000	15,000

Evaluación de Toxicidad.

Al finalizar las 24 horas de cultivo, los fetos fueron retirados del medio y evaluados individualmente en base a observaciones morfológicas que incluían viabilidad (frecuencia de latido cardíaco), longitud cráneo-nalga, longitud de la cabeza y longitud de las extremidades anteriores y posteriores (figura 9).

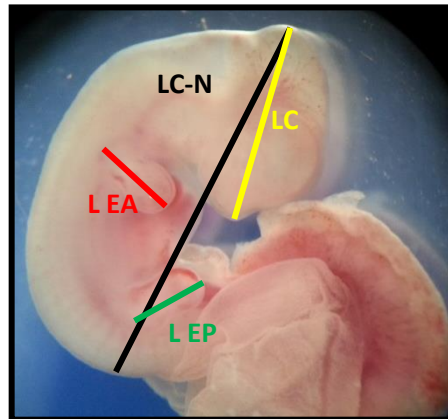


Figura 9: Descripción de parámetros de crecimiento: Longitud cráneo-nalga (LC-N), longitud de la cabeza (LC), longitud extremidad anterior (L EA) y longitud extremidad posterior (L EP)

Doble tinción azul alciano-rojo alizarina.

Con el propósito de observar la presencia y grado de desarrollo del modelo óseo, así como sus alteraciones, posterior a la evaluación de toxicidad, los fetos fueron sometidos a la doble tinción con azul alciano y rojo alizarina, tiñendo cartílago y tejido óseo, respectivamente. La tinción se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por McLeod (1980) y adaptado para la edad gestacional de los fetos. Los fetos se fijaron en etanol al 95% por 24 a 36 horas para luego ser teñidos con una mezcla azul alciano 0,3% en etanol al 70%, rojo alizarina 0,1% en etanol al 95%, ácido acético y etanol al 70% (1:1:1:17) por 3 días a 37°C. Una vez teñidos, los fetos fueron aclarados mediante pasos sucesivos por mezclas de glicerina/hidróxido de potasio al 1% en concentraciones crecientes de glicerina (20, 50, 80%) por un periodo de 24 horas en cada una, para finalmente ser

almacenados en glicerina/etanol 95% (1:1) hasta su posterior análisis cualitativo mediante una escala de Likert (tabla 2).

Tabla 2: Escala de Likert para la evaluación cualitativa del grado de desarrollo de los modelos óseos.

Escala	Significado
0	Ausencia de tinción en toda la extremidad
1	Presencia de tinción solo en esbozo de brazo o pierna
2	Presencia de tinción leve en al menos dos rayos digitales
3	Presencia de tinción marcada en al menos dos rayos digitales
4	Presencia de tinción leve en tres o más rayos digitales
5	Presencia de tinción marcada en tres o más rayos digitales

Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como promedio \pm desviación estándar (DS). Las diferencias de los tratamientos, con respecto al control fueron analizadas utilizando el análisis de varianza ANOVA de 1 vía, seguido por el test de Dunnett's. Donde un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Mientras que las diferencias entre los distintos tratamientos fueron analizadas utilizando el análisis de varianza ANOVA de 1 vía, seguido por el test de Tukey. Considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism 6.

La evaluación de toxicidad del misoprostol se llevó a cabo a través de observaciones macroscópicas, realizándose un análisis cualitativo y cuantitativo, mediante mediciones de parámetros de crecimiento y la observación de alteraciones morfológicas, cuyos resultados se presentan a continuación.

1.- Montaje del método experimental.

Las pruebas realizadas para el establecimiento del periodo de cultivo así como la determinación de un control positivo adecuado demostraron que los fetos de DG 13,5 cultivados por 8 y 24 horas en presencia de 5-FU se desarrollaron sin diferencias en relación al control (solo medio). Por otro lado, los fetos de DG 13 cultivados por 24 horas en presencia de 200 µg/ml de ketoconazol no tuvieron viabilidad, por lo que se intentó mejorar la viabilidad, por un lado, recolectando en el DG 13,5 y por otro, cultivando en presencia de concentraciones menores de ketoconazol (100, 75 y 50 µg/mL). De acuerdo a estas últimas observaciones, se decidió mantener la recolección en el DG 13,5, cultivando por 24 horas en presencia de 50 µg/mL, dado que en estas condiciones se mejoraba sustancialmente la viabilidad lo que permitió la observación de defectos en el desarrollo de las extremidades (tabla 3).

Tabla 3: Viabilidad fetal según condiciones de cultivo

Condiciones de cultivo	Viabilidad *
Recolección en DG13,5; Cultivo por 8 horas, en presencia de 5-FU 1 mg/L	NO
Recolección en DG13,5; Cultivo por 24 horas, en presencia de 5-FU 1 mg/L	NO
Recolección en DG13,0; cultivo por 24 horas, en presencia de ketoconazol 200 µg/mL	NO
Recolección en DG13,5; cultivo por 24 horas, en presencia de ketoconazol 100 µg/mL	NO
Recolección en DG13,5; cultivo por 24 horas, en presencia de ketoconazol 75 µg/mL	NO
Recolección en DG13,5; cultivo por 24 horas, en presencia de ketoconazol 50 µg/mL	SI

* Presencia de latidos cardiacos al término del cultivo

2.- Control de calidad interno

El control de calidad interno se realizó mediante cultivo con dos sustancias de prueba: penicilina G sódica a una concentración final de 1000 mg/L como control negativo y ketoconazol 50 µg/mL como control positivo. Tal como se esperaba, penicilina G sódica no alteró el desarrollo fetal a diferencia de ketoconazol que causó alteraciones evidentes en las extremidades en desarrollo, específicamente a nivel de la aleta que más tarde se convertiría en la pata anterior, evidenciándose un cambio brusco en la forma de la pata en relación al control, perdiéndose las invaginaciones propias del desarrollo de los dígitos además de una desaparición de los rayos digitales (figuras 10 y 11). Cabe destacar que los efectos observados se presentan mayormente en las patas anteriores que en las posteriores.

Es importante mencionar que la frecuencia cardíaca, fue el único parámetro alterado significativamente por ketoconazol en relación al control (figura 12), ya que causó hemorragias, edema abdominal y disminución de la viabilidad. En contraste, la penicilina G sódica no causó alteraciones en ninguno de los parámetros medidos ni generó hemorragias o edema en los fetos (tablas 4 y 5).

En cuanto a la tinción de los fetos con azul alciano y rojo alizarina, se observó una disminución significativa de la visualización de los rayos digitales en las extremidades anteriores de aquellos fetos expuestos a ketoconazol. En cambio, penicilina G no causó diferencias significativas en relación al control (tabla 5 y figura 13). La tinción de las extremidades posteriores se observó igual para los tres tratamientos controles (medio de cultivo, penicilina G y ketoconazol), mostrando sólo un cartílago incipiente (tabla 5 y figura 14).

Tabla 4: Parámetros de funcionalidad y crecimiento de fetos expuestos a penicilina G sódica y ketoconazol.

Tratamiento (n=6)	Frecuencia cardiaca (lat x min)	Longitud cráneo nalga (mm)	Longitud cabeza (mm)	Longitud extremidad anterior (mm)	Longitud extremidad posterior (mm)
Control	84 ± 32,4	10,6 ± 0,32	5,8 ± 0,12	2,2 ± 0,20	2,0 ± 0,12
PEN (1000 mg/mL)	90 ± 29,9	10,0 ± 0,54	5,5 ± 0,39	2,3 ± 0,19	1,9 ± 0,27
KETO (50 ug/mL)	31 ± 17,5 *	10,8 ± 0,57	5,7 ± 0,20	2,2 ± 0,16	2,0 ± 0,12

PEN: penicilina G. KETO: ketoconazol. lat x min: latidos. Datos se presentan como promedio ± (DS). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control $p < 0,05$ (ANOVA - Dunnett' s).

Tabla 5: Frecuencia de aparición de alteraciones en extremidades en fetos expuestos a PEN y KETO (n=6) y grado de tinción en de las extremidades.

Tratamiento	EA izquierda	EA derecha	EP izquierda	EP derecha	Tinción EA	Tinción EP
Control	0/6	0/6	0/6	0/6	2,67 ± 0,49	1,00 ± 0,00
Penicilina G	1/6	1/6	0/6	1/6	2,25 ± 0,45	1,00 ± 0,00
Ketoconazol	5/6	3/6	0/6	1/6	1,25 ± 0,45*	1,00 ± 0,00

EA: extremidad anterior. EP: extremidad posterior * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control $p < 0,05$ (ANOVA - Dunnett' s).

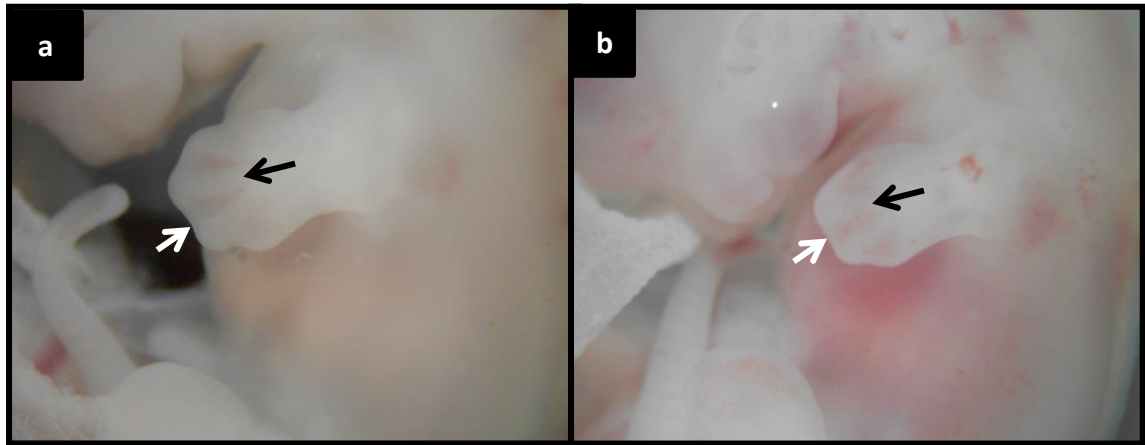


Figura 10: Evaluación de la extremidad anterior de fetos cultivados por 24 **(a)** feto control de medio. Invaginaciones normales (flecha blanca) entre radios digitales (flechas negras) **(b)** control negativo. Radios digitales conservados e invaginaciones normales.

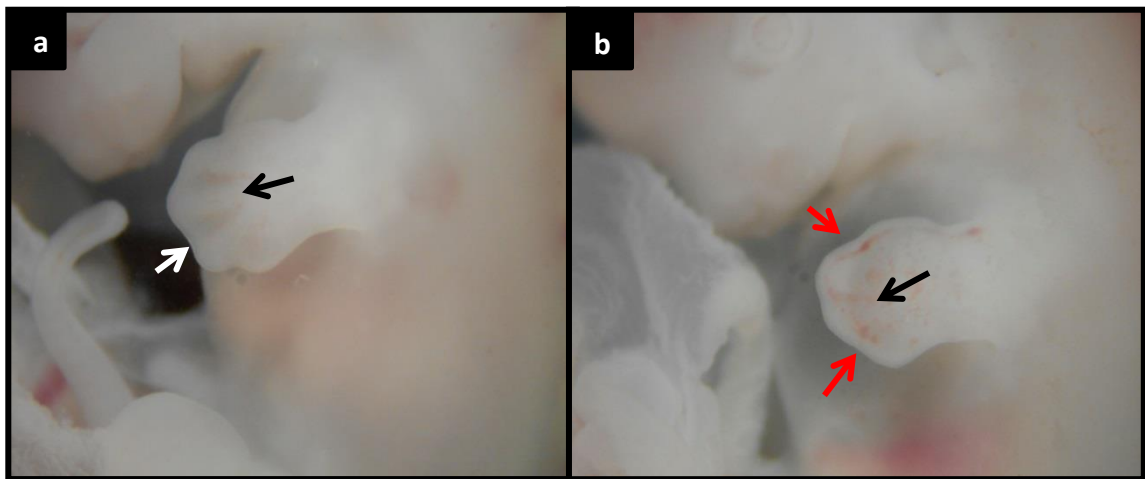


Figura 11: Evaluación de la extremidad anterior de fetos cultivados por 24 horas. **(a)** feto control de medio. Invaginaciones normales (flecha blanca) entre radios digitales (flecha negra). **(b)** control positivo. Invaginaciones anormales (flechas rojas) y ausencia de radios digitales (cabeza de flecha).

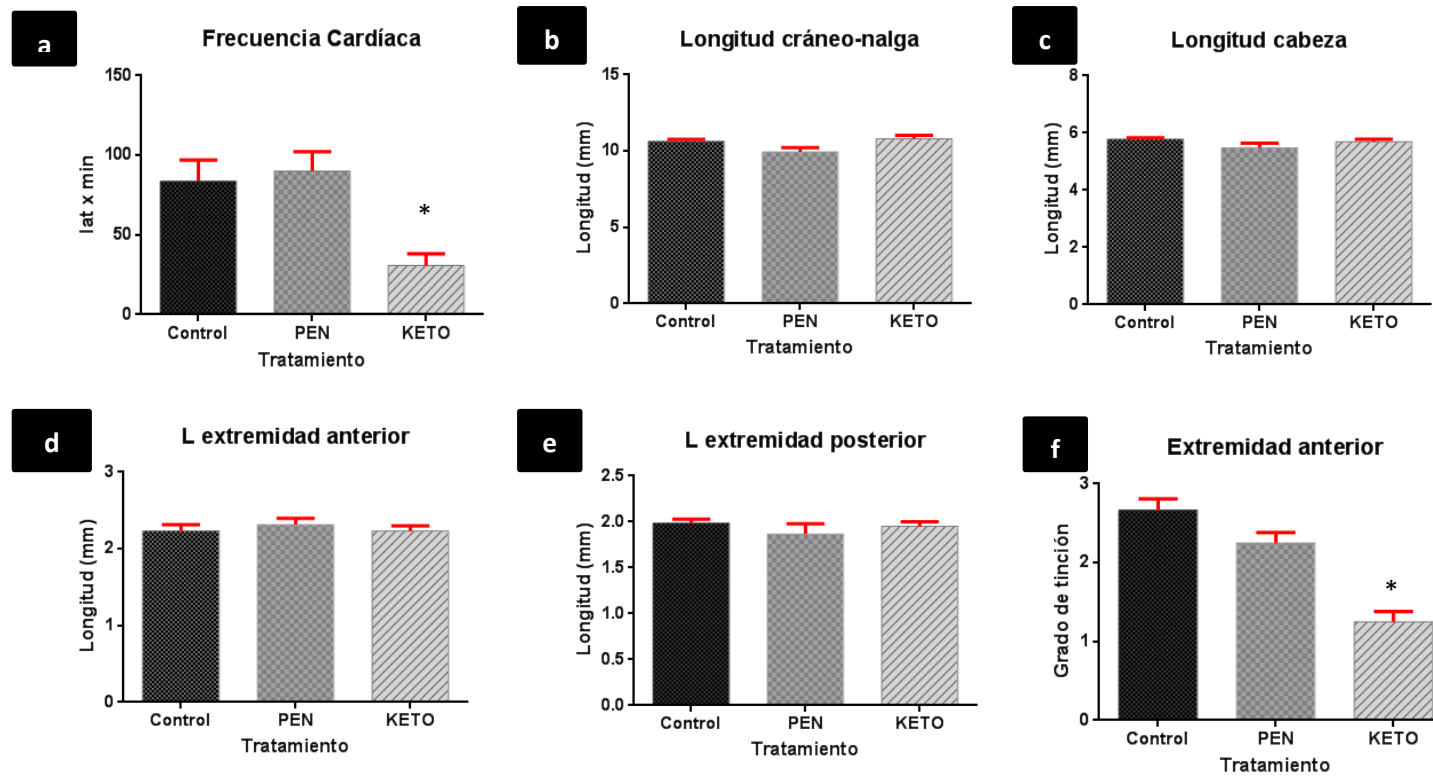


Figura 12: Parámetros de funcionalidad y crecimiento de fetos cultivados como control interno **(a)** Frecuencia cardíaca al término del cultivo **(b)** Longitud cráneo nalga **(c)** longitud cabeza **(d)** longitud extremidad anterior **(e)** longitud extremidad posterior **(f)** Grado de tinción del modelo óseo de EA. * Diferencia significativa con respecto al control, $p < 0,05$ (ANOVA-Dunnett's).

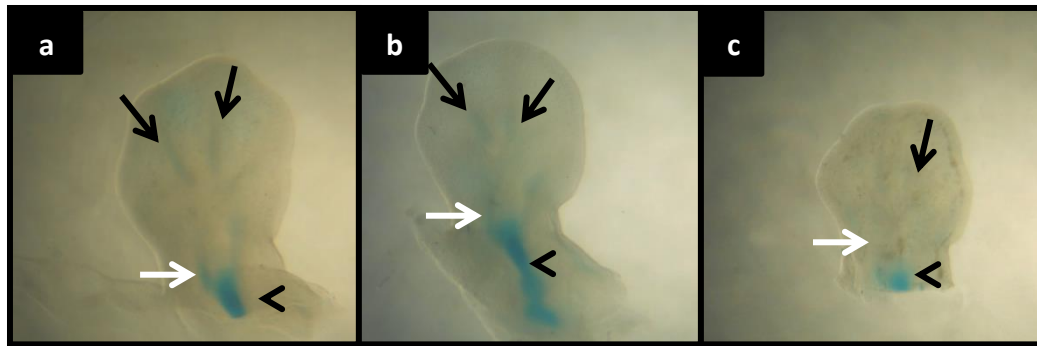


Figura 13: Extremidad anterior teñida con azul alciano de fetos cultivados por 24 horas. **(a)** control, nótese la presencia de rayos digitales (flecha negra) así como presencia de modelo cartilaginoso de radio y cubito (flecha blanca) y húmero (cabeza de flecha). **(b)** control negativo. **(c)** control positivo, nótese la disminución de la tinción en rayos digitales.

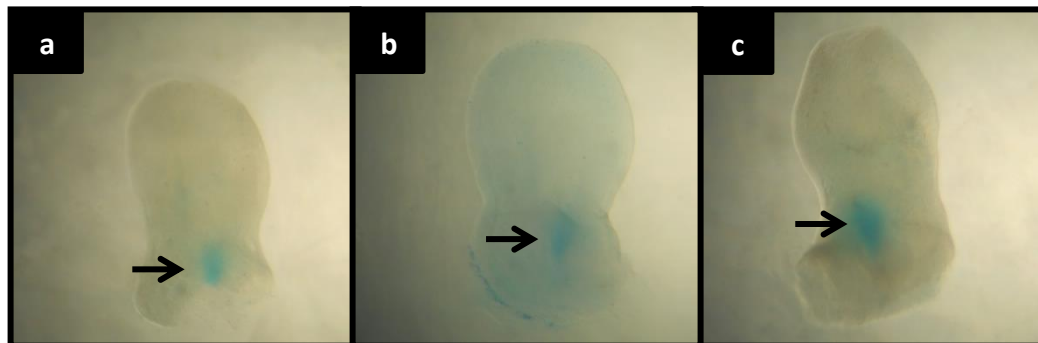


Figura 14: Extremidad posterior teñida con azul alciano de fetos cultivados por 24 horas **(a)** control **(b)** control negativo **(c)** control positivo. Nótese tinción únicamente en esbozo de pierna (flecha negra).

3.- Fetos cultivados en presencia de misoprostol

Misoprostol fue ensayado en concentraciones crecientes de 200, 2.000 y 20.000 pg/mL. Dada su liposolubilidad, se utilizó FDA como vehículo, siendo ensayado como control en el mismo volumen que el agregado en los tratamientos

con misoprostol (0,5% del volumen de medio de cultivo). Tal como se esperaba, este vehículo no demostró inducir efectos en comparación al control. La tabla 6 resume el efecto de los distintos tratamientos con concentraciones crecientes de misoprostol sobre los parámetros de funcionalidad y crecimiento, los cuales no mostraron diferencias significativas en relación al control ni entre los distintos tratamientos.

Ahora bien, se observó un efecto concentración-dependiente en la inducción de alteraciones morfológicas de las extremidades en los fetos tratados con misoprostol (tabla 7), caracterizado por la generación de hendiduras anormales y pérdida importante de la forma en la futura pata anterior de los fetos. Destaca que en los controles se puede observar la presencia de rayos digitales aun sin la tinción con azul alciano y rojo alizarina, lo cual no ocurre en las patas de los fetos tratados (figura 15).

Tabla 6: Parámetros de crecimiento y funcionalidad de fetos expuestos a misoprostol y PGE₂.

Tratamiento	Frecuencia cardiaca (lat x min)	Longitud cráneo nalga (mm)	Longitud cabeza (mm)	Longitud extremidad anterior (mm)	Longitud extremidad posterior (mm)
Control	84 ± 32,4	10,6 ± 0,32	5,8 ± 0,12	2,2 ± 0,20	2,0 ± 0,12
FDA 0,5%	75 ± 37,1	10,3 ± 0,49	5,6 ± 0,22	2,3 ± 0,18	2,0 ± 0,18
MISO 200 pg/mL	100 ± 20,0	10,2 ± 0,70	5,5 ± 0,28	2,4 ± 0,22	2,0 ± 0,25
MISO 2000 pg/mL	58 ± 46,6	10,7 ± 0,46	5,9 ± 0,47	2,4 ± 0,18	2,0 ± 0,16
MISO 20000 pg/mL	76 ± 36,3	10,6 ± 0,53	5,6 ± 0,08	2,3 ± 0,08	2,0 ± 0,04
PGE2 70 pg/mL	73 ± 36,7	10,7 ± 0,46	5,7 ± 0,20	2,2 ± 0,16	2,1 ± 0,16

lat x min: latidos por minutos. MISO: Misoprostol. FDA: Formamida

Tabla 7: Frecuencia de aparición de alteraciones en las extremidades de fetos expuestos a MISO y PGE₂ (n=6) y grado de tinción del modelo óseo de EA y EP.

Tratamiento	EA izquierda	EA derecha	EP izquierda	EP izquierda	Tinción EA	Tinción EP
MISO 0 pg/mL	0/6	0/6	0/6	0/6	2,67 ± 0,49	1 ± 0,00
FDA 0,5%	1/6	0/6	0/6	0/6	2,25 ± 0,45	1 ± 0,00
MISO 200 pg/mL	4/6	1/6	0/6	0/6	2,25 ± 0,45 ‡	1 ± 0,00
MISO 2000 pg/mL	5/6	3/6	1/6	2/6	1,58 ± 0,51*‡	1 ± 0,00
MISO 20000 pg/mL	6/6	4/6	3/6	2/6	1,08 ± 0,29*	1 ± 0,00
PGE2 70 pg/mL	5/6	5/6	1/6	1/6	1,08 ± 0,29*	1 ± 0,00

EA: extremidad anterior. EP: extremidad posterior * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control p < 0,05 (ANOVA - Dunnett' s) ‡ Diferencia estadísticamente significativa con respecto a PGE₂ p < 0,05 (ANOVA - Tukey)

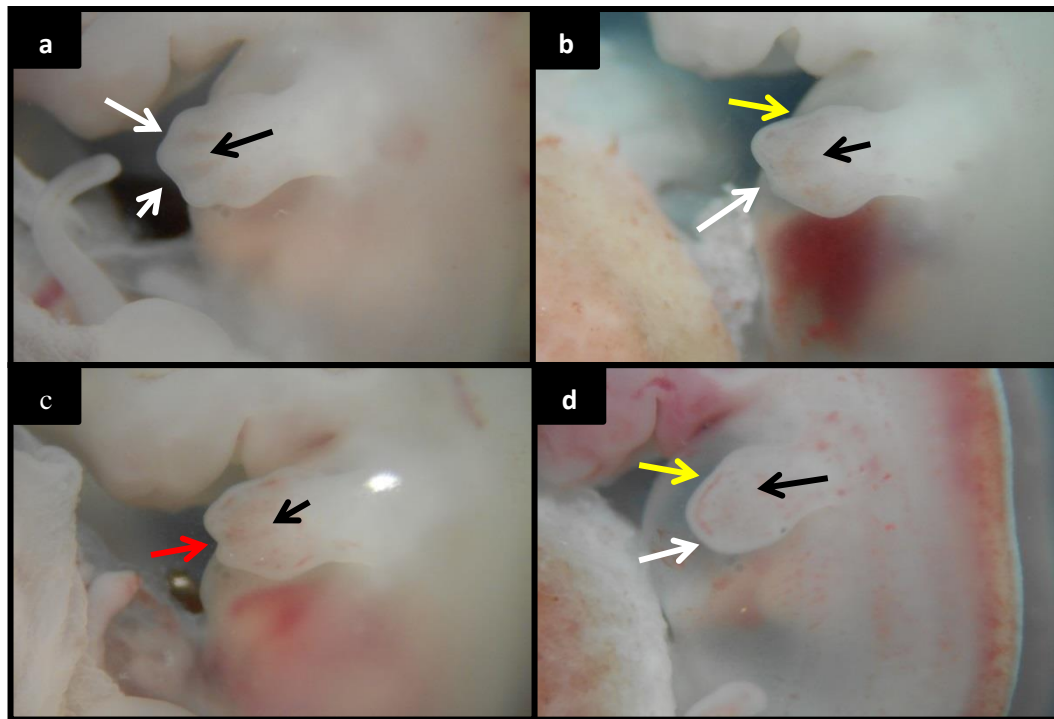


Figura 15: Evaluación de la extremidad anterior de fetos cultivados por 24 horas en presencia de control y misoprostol (a) control medio (b-d) misoprostol 200, 2.000 y 20.000 pg/mL respectivamente. Nótese la desaparición de las invaginaciones normales (flechas blancas) y de los rayos digitales (flechas negras) y la aparición de hendiduras anormales (flecha roja) o la pérdida de la forma normal de la futura mano (flecha amarilla).

La figura 16 muestra extremidades representativas de cada tratamiento. Se observa que la concentración de 200 pg/mL de misoprostol conservaba la tinción en los modelos cartilagosos en toda la extremidad aun cuando existe también pérdida de la forma. Sin embargo, al aumentar la concentración a 2.000 y 20.000 pg/mL se suma a la pérdida de la forma, una disminución evidente en la intensidad de tinción de los rayos digitales, hasta el punto de no observarse tinción en ellos al ser expuestos a la más alta concentración de misoprostol. Este efecto no fue observado en las extremidades posteriores, ya que estas sólo presentaron tinción en la futura pierna.

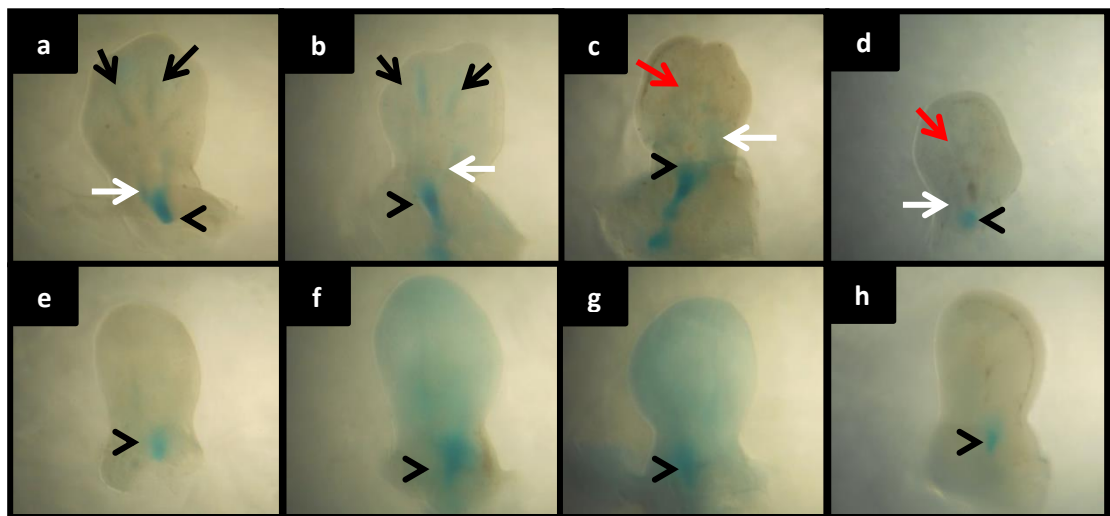


Figura 16: Extremidad anterior y posterior teñida con azul alciano de fetos cultivados por 24 horas. **(a,e)** Control, **(b,f)** Misoprostol 200 pg/mL. **(c,g)** Misoprostol 2.000 pg/mL **(d,h)** Misoprostol 20.000 pg/mL. Rayos digitales (flecha negra), radio y cubito (flechas blancas), húmero y fémur (cabezas de flecha), ausencia de radios digitales (flechas rojas).

4.- Fetos cultivados en presencia de PGE₂.

A manera de comparar los efectos inducidos por misoprostol con aquellos inducidos por PGE₂, se procedió a realizar cultivos en presencia de 70 pg/mL de la prostaglandina. No se observaron diferencias significativas con respecto al control en todos los parámetros evaluados (tabla 4 y figura 20). En cuanto a malformaciones en las extremidades, PGE₂ causó un efecto similar en frecuencia y forma al obtenido con las concentraciones de 2.000 y 20.000 pg/mL (tabla 5), provocando una pérdida importante tanto de las invaginaciones propias del desarrollo normal de la futura pata como de los rayos digitales (figura 17), lo cual fue corroborado por una evidente disminución de tinción en ambas patas aunque sin afectar la tinción correspondiente a las condensaciones cartilagosas que se convertirán en los huesos del brazo (figura 18). En cuanto a las extremidades posteriores, estas nuevamente mostraron sólo tinción de un cartílago incipiente en la pierna (figura 19).

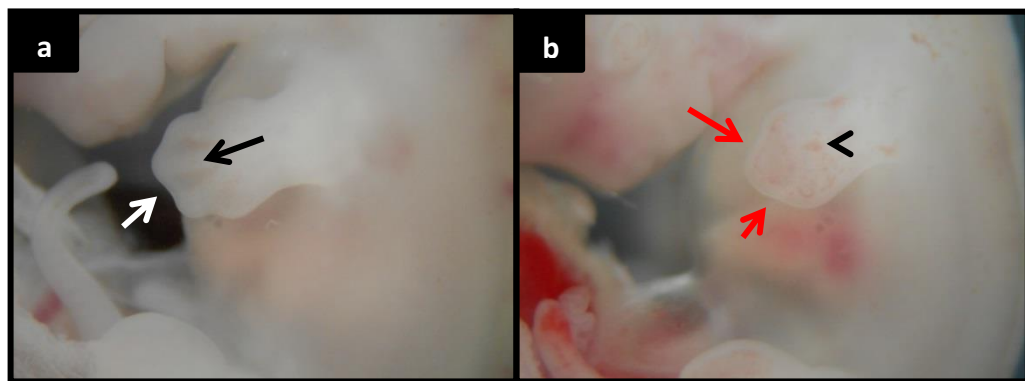


Figura 17: Evaluación de la extremidad de fetos cultivados por 24 horas **(a)** control de medio **(b)** PGE₂. Rayos digitales (flechas negras), ausencia de rayos digitales (cabeza de flecha), invaginaciones interdigitales normales (flechas blancas), alteración de la forma normal de la mano (flechas rojas).

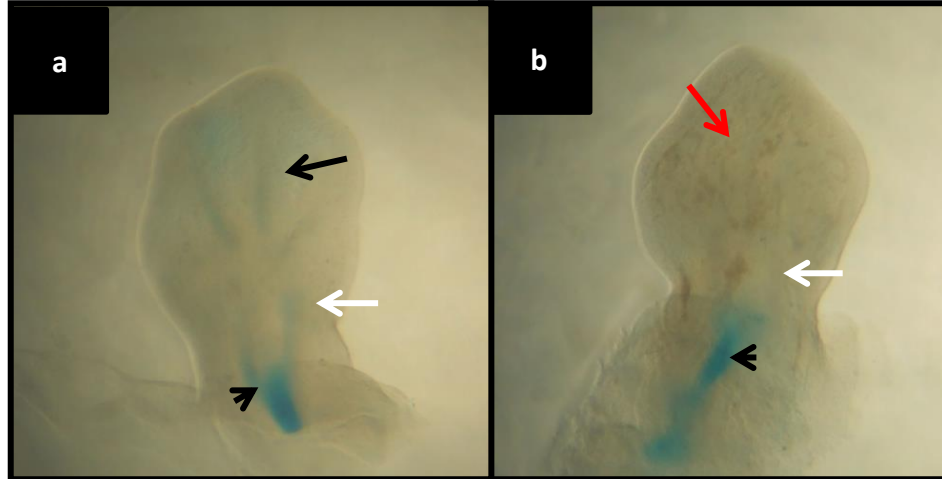


Figura 18: Extremidad anterior teñida con azul alciano de fetos cultivados por 24 horas **(a)** control **(b)** PGE₂ 70 pg/mL. Nótese la desaparición de los radios digitales (Flechas negras y rojas) y el cambio de forma de la futura mano.

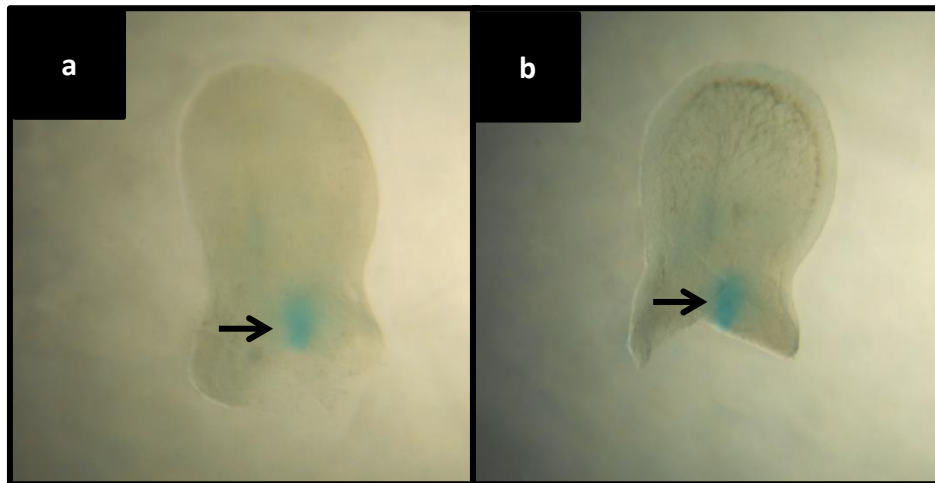


Figura 19: Extremidad posterior teñida con azul alciano de fetos cultivados por 24 horas **(a)** control **(b)** PGE₂ 70 pg/mL. Se observa tinción sólo en cartílago de la pierna (flecha negra).

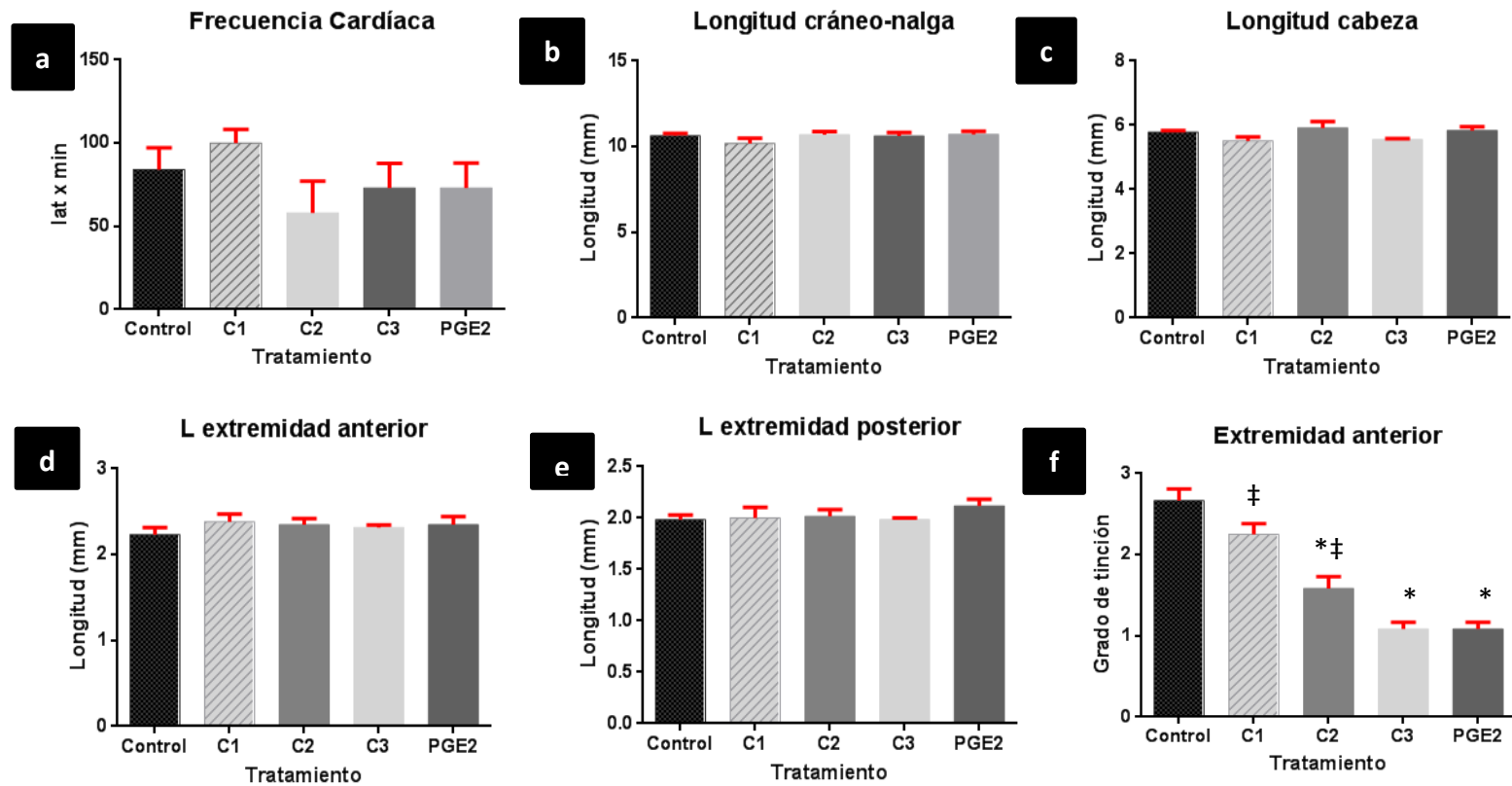


Figura 20: Parámetros de funcionalidad y crecimiento de fetos cultivados en presencia de misoprostol y PGE₂. **(a)** frecuencia cardíaca **(b)** Longitud cráneo-nalga **(c)** Longitud de la cabeza **(d)** Longitud de la extremidad anterior **(e)** Longitud de la extremidad posterior **(f)** Grado de tinción del modelo óseo de extremidad anterior. C1: 200 pg/mL, C2: 2.000 pg/mL C3: 20.000 pg/mL * Diferencia significativa con respecto al control $p < 0,05$ (ANOVA-Dunnett's). † Diferencia significativa con respecto a PGE₂ $p < 0,05$ (ANOVA-Tukey).

5.- Fetos cultivados en presencia de antagonista EP₁/EP₂

Para determinar el o los receptores EP involucrados en la respuesta fetotóxica a misoprostol se procedió a ensayar un antagonista de los receptores EP₁ y EP₂. Tanto los fetos expuestos al antagonista AH6809 como aquellos expuestos al antagonista más 200 pg/mL de misoprostol no mostraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento y funcionalidad con respecto al control, al igual que los tratamientos ensayados en primera instancia (tabla 8 y figura 23).

Sin embargo, se evidenció un aumento en la frecuencia de aparición de malformaciones en las extremidades anteriores, tanto en fetos expuestos a antagonista como en aquellos que tenían además misoprostol comparado con los fetos expuestos únicamente a misoprostol, mostrando en consecuencia, que el antagonista posee por sí mismo un efecto teratogénico capaz de alterar el normal desarrollo de las extremidades (tabla 9 y figura 21).

Tabla 8: Parámetros de funcionalidad y crecimiento de fetos cultivados por 24 horas en presencia de AH6809 y asociación AH6809-misoprostol

Tratamiento	Frecuencia cardiaca (lat x min)	Longitud cráneo-nalga (mm)	Longitud cabeza (mm)	Longitud extremidad anterior (mm)	Longitud extremidad posterior (mm)
Control	84 ± 32,4	10,6 ± 0,32	5,8 ± 0,12	2,2 ± 0,20	2,0 ± 0,12
MISO 200 pg/mL	100 ± 20,0	10,2 ± 0,70	5,5 ± 0,28	2,4 ± 0,22	2,0 ± 0,25
0,1 uM Ant EP1/EP2	99 ± 17,7	10,7 ± 0,28	6,1 ± 0,16	2,4 ± 0,17	2,1 ± 0,14
0,1 uM Ant EP1/EP2 + MISO 200 pg/mL	94 ± 6,2	10,6 ± 0,25	5,6 ± 0,23	2,5 ± 0,12	2,1 ± 0,18

MISO: misoprostol. Ant: antagonista. lat x min: latidos por minutos.

Tabla 9: Frecuencia de aparición de alteraciones en las extremidades de fetos expuestos a AH6809 y asociación AH6809-misoprostol (n=6) y grado de tinción del modelo óseo de EA y EP.

Tratamiento	EA izquierda	EA derecha	EP izquierda	EP izquierda	Tinción EA	Tinción EP
Control	0/6	0/6	0/6	0/6	2,67 ± 0,49	1 ± 0,00
MISO 200 pg/mL	4/6	1/6	0/6	0/6	2,25 ± 0,45	1 ± 0,00
0,1 uM Ant EP1/EP2	5/6	4/6	1/6	0/6	1,92 ± 0,67*	1 ± 0,00
0,1 uM Ant EP1/EP2 + MISO 200 pg/mL	6/6	5/6	1/6	3/6	1,75 ± 0,45*	1 ± 0,00

EA: extremidad anterior. EP: extremidad posterior. * Diferencia significativa con respecto al control $p < 0,05$ (ANOVA-Dunnett's).

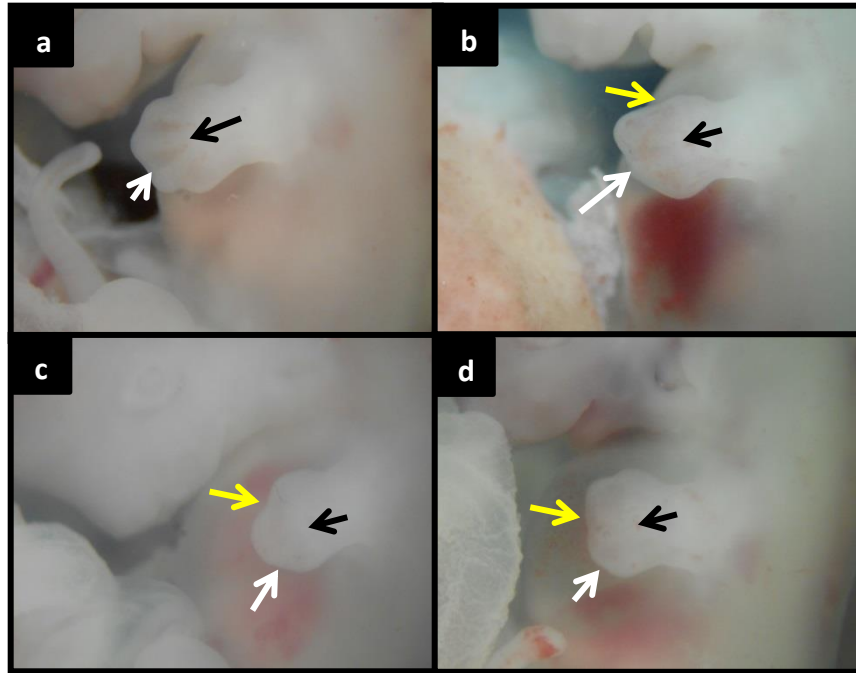


Figura 21: Evaluación de la extremidad anterior de fetos cultivados por 24 horas **(a)** Control **(b)** Misoprostol 200 pg/mL **(c)** AH6809 **(d)** AH6809 + Misoprostol 200 pg/mL. Nótese desaparición de invaginaciones normales (flechas blancas) y radios (flechas negras) y pérdida importante de la forma de la futura mano (flechas amarillas).

El tratamiento con antagonista alteró el desarrollo de las extremidades provocando pérdida importante de la forma y una disminución significativa de la tinción en relación al control, lo cual no se diferenció significativamente de los efectos inducidos por 200 pg/mL de misoprostol. Es importante destacar que la asociación de antagonista-misoprostol provocó una disminución de la extensión de la tinción del modelo cartilaginosa del brazo de las extremidades (figura 22).

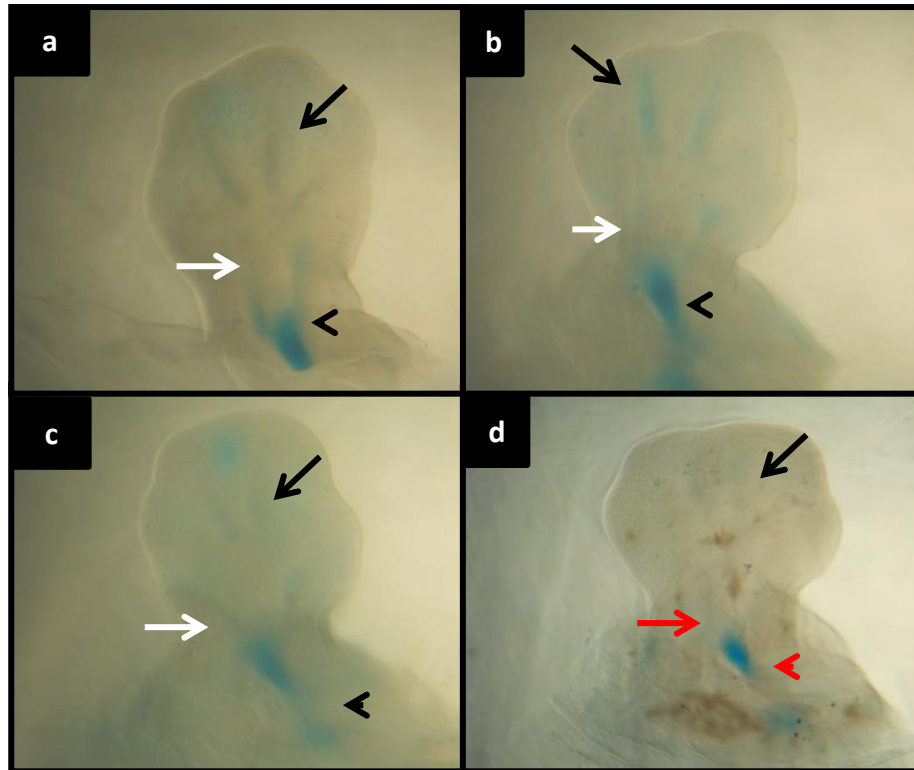


Figura 22: Extremidad anterior teñida de fetos cultivados por 24 horas **(a)** control **(b)** Misoprostol 200 pg/mL **(c)** AH6809 **(d)** AH6809 + Misoprostol 200 pg/mL. Se observa disminución del grado de tinción de los radios digitales (flechas negras) y del modelo cartilaginosa en brazo (flecha y cabeza de flecha roja).

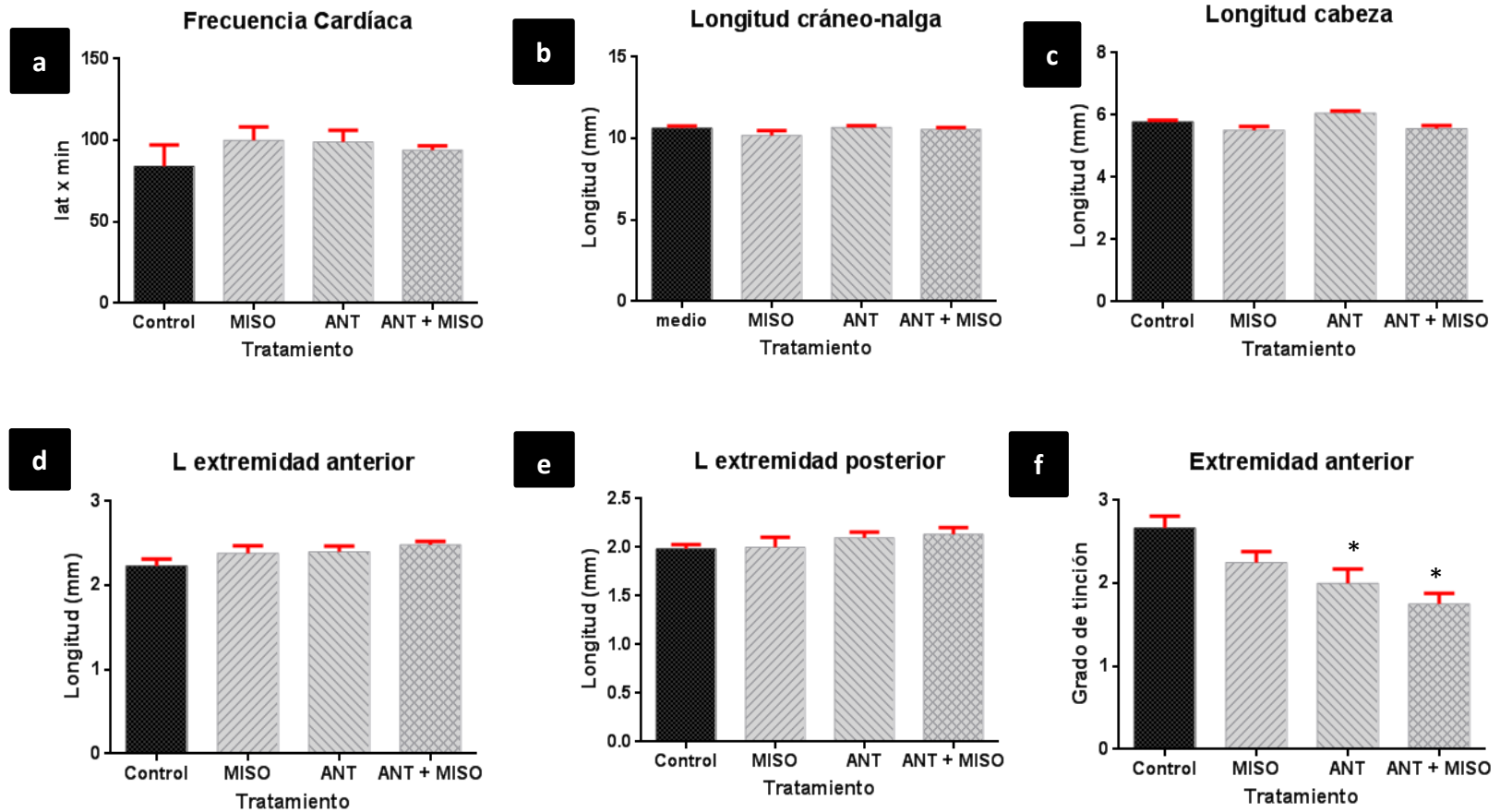


Figura 23: Parámetros de crecimiento y funcionalidad de fetos cultivados en presencia de antagonista y asociación antagonista-misoprostol **(a)** Frecuencia Cardíaca **(b)** Longitud cráneo-nalga **(c)** Longitud de la cabeza **(d)** Longitud extremidad anterior **(e)** Longitud extremidad posterior **(f)** Grado de tinción del modelo óseo de extremidad anterior. * Diferencia significativa con respecto al control $p < 0,05$ (ANOVA- Dunnet's).

El uso de misoprostol durante el primer trimestre de embarazo está asociado a la generación de una serie de defectos en los que se incluye el síndrome de Moebius, artrogriposis, sindactilia y braquidactilia (Chiong y cols., 2009). Sin embargo, la mutagenicidad y teratogenicidad así como su embrio y fetotoxicidad *in vivo* estudiadas durante el desarrollo del fármaco resultaron ser negativas (Kotsonis, 1985). Adicionalmente, estudios previos en el Laboratorio de Toxicología, en que se administró el misoprostol en dosis de hasta 10 mg/kg de peso vía oral a ratas en los DG 9 y 10 no indujeron teratogenicidad (datos no publicados).

Sin embargo, se ha señalado que la teratogenicidad en animales de experimentación es importante, aunque no esencial para probar los efectos tóxicos de los compuestos químicos durante la gestación (Shepard, 1994). Por lo mismo, el hecho de que el misoprostol no sea teratogénico en animales de experimentación aunque sí en humanos, podría llevar a suponer que los ensayos *in vivo* usualmente utilizados para estudiar embriotoxicidad no son adecuados para modelar el efecto del misoprostol en humanos, debido a las diferencias farmacodinámicas entre especies, lo que lleva a la generación de diferentes efectos entre una y otra (Steinetz y cols., 1976).

Es por esto, que en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, se han establecido modelos experimentales validados por la Comunidad Europea para el estudio de la teratogenicidad de sustancias químicas, como el Cultivo de Embriones Post

Implantación y el Ensayo de Micromasa, los que han resultado ser complementarios para la búsqueda del mecanismo de acción teratogénico de misoprostol. No obstante, tal como lo mencionan Barber y cols (1993), el uso de cultivos fetales podría generar información adicional para completar un estudio de toxicología del desarrollo como el que se está realizando con el misoprostol.

De esta forma, en esta tesis, se planteó el montaje y puesta en marcha de una nueva técnica de estudio capaz de modelar alguno de los efectos producidos por misoprostol en el desarrollo de las extremidades. Para esto, fue necesario llevar a cabo una serie de ensayos preliminares que permitieran establecer las condiciones adecuadas de cultivo.

Las primeras experiencias experimentales demostraron que cultivos por 8 horas en presencia de 5-FU, una sustancia de conocida capacidad teratogénica en ratas (Wilson y col., 1969) y ratones (Skalko y Jacobs, 1978) no fue capaz de generar alteraciones morfológicas visibles en las extremidades de los fetos, debido posiblemente al corto periodo de exposición. Se decidió entonces, ampliar el tiempo de cultivo a 24 horas, pero nuevamente no se logró modelar la teratogénesis en las extremidades. Al descartar el factor tiempo, en este caso se atribuyó la falta de teratogenicidad al mecanismo de acción del 5-FU, el cual compite con el uracilo por la timidilato sintetasa, llevando a una inhibición de la síntesis y reparación del ADN en el tejido embrionario, e impidiendo el crecimiento celular (Skalko y Jacobs, 1978).

En la búsqueda de un correcto control positivo se tomó la decisión de ensayar ketoconazol, un fármaco perteneciente a la familia de antifúngicos azólicos. Estos fungicidas han sido estudiados en modelo de organogénesis temprana y han demostrado su capacidad de generar malformaciones (Menegola y cols., 2006, 2013). Más recientemente, en un estudio *in vivo* en ratas, a las que se les administró ketoconazol el DG 13 se observó cómo este generaba efectos fetales visibles el DG 20, dentro de los que destaca defectos en el desarrollo de los dígitos (Dodo y cols., 2010).

En los fetos de DG 13 cultivados en presencia de ketoconazol 200 µg/ml, no se logró visualizar efectos nocivos en el desarrollo de las extremidad, lo que llevó a pensar que en esta edad gestacional, los fetos no serían susceptibles al efecto de ketoconazol, ya que los dígitos comienzan su diferenciación más tardíamente que el resto de la extremidad (Carlson, 2009).

Estas observaciones determinaron el regreso a la utilización de fetos de DG 13,5 como se planteó inicialmente. Las primeras pruebas de fetos de esta edad gestacional con 100 µg/mL de ketoconazol no resultaron ser adecuadas debido a la rápida muerte fetal, ocurrida generalmente entre las 12 y 20 horas de cultivo. La muerte fetal se atribuyó a la presencia de una zona extensa de hemorragia en la cabeza y columna vertebral, posiblemente debido a que ketoconazol sería capaz de inhibir la síntesis de tromboxanos y la agregación plaquetaria (Steinhilber y cols., 1990). Otro estudio ha revelado que además puede disminuir la angiogénesis al generar un descenso de los niveles de ácido epoxieicosatrienoico

(EET), un metabolito del ácido araquidónico producido por una epoxigenasa P450 inhibida por ketoconazol, ya que EET participaría en la vía de señalización de VEGF (Yang y cols., 2009).

Se requirió entonces disminuir la concentración de ketoconazol a 75 µg/mL y luego a 50 µg/mL hasta lograr una mejora sustancial en la viabilidad que permitiera la observación de alteraciones notorias en el desarrollo de las extremidades. En esta última concentración se observó un alto número de malformaciones en las extremidades así como ausencia de los rayos digitales y su condensación cartilaginosa, lo que es posible explicar, al menos en parte, por la inhibición que causaría ketoconazol de la angiogénesis en las extremidades, ya que en estas existe vasculatura altamente regulada y en constante dinamismo para facilitar la aparición y desarrollo de patrones cartilaginosos (Carlson, 2009). Otra de las hipótesis que explicarían la teratogenicidad del ketoconazol se basaría en su capacidad de inhibir, en mamíferos, enzimas del citocromo P450 involucradas en la síntesis de esteroides (Santana y Pereira, 2009), como colesterol y el metabolismo del ácido retinoico. Tanto la alteración de la síntesis de colesterol como una acumulación de ácido retinoico han sido asociados al desarrollo de malformaciones o a un retraso del desarrollo esquelético, especialmente de las extremidades (Quemeilo y cols., 2007; Schmidt y cols., 2009).

Por otro lado, los resultados obtenidos con penicilina G, utilizada como control negativo del estudio, no mostraron diferencias estadísticamente

significativas con respecto al control de medio. Esto concuerda con el hecho de que la penicilina no es considerada teratogénica en animales o humanos, siendo clasificadas por la FDA dentro de la categoría B de riesgo, en otras palabras, seguras durante el embarazo (Briggs y col, 2008).

Ahora bien, los efectos observados con misoprostol en las concentraciones de 200, 2.000 y 20.000 pg/mL, en cuanto a los parámetros de crecimiento, no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Estos efectos en un principio no concordarían con reportes clínicos como el realizado por Osorio y cols (2007) quienes indicarían restricción de crecimiento intrauterino observado a las semanas 32 y 36 de gestación en una mujer que refiere la utilización del medicamento en la semana 8. Así mismo, datos experimentales de una tesis anterior realizada en el Laboratorio de Toxicología, demostraron también la disminución significativa de parámetros de crecimiento en embriones de rata en organogénesis temprana (Tapia, 2013).

La discrepancia entre las observaciones observada en esta tesis y en la tesis de Tapia (2013) puede ser explicada por diferencias en los modelos utilizados. Por un lado, los fetos utilizados en esta tesis se encuentran en una etapa gestacional bastante más avanzada que los embriones utilizados por Tapia presentando, por lo mismo, una tasa de crecimiento menor que no permite la observación de una restricción en el crecimiento durante el periodo de cultivo de 24 horas. De hecho, en las observaciones realizadas durante el establecimiento del modelo, se pudo determinar que los fetos de DG 13 crecieron en promedio 1,6

mm de longitud cráneo-nalga en 24 horas de cultivo, mientras que los fetos de DG 13,5 solo alcanzaron a crecer 0,9 mm en igual periodo.

Por otro lado, los mecanismos que podrían explicar la restricción de crecimiento en una etapa gestacional temprana pudieran no aplicarse a los fetos utilizados en esta tesis. De esta forma, Tapia (2013) plantea que la restricción de crecimiento, observada en embriones de DG 9,5 cultivados en presencia de misoprostol, se debería a las alteraciones vasculares generadas en la circulación del saco vitelino. En cambio, en nuestro modelo, la exposición de la circulación capilar en la superficie fetal, debido a la exteriorización de los fetos de DG 13,5, facilitaría el intercambio gaseoso y de nutrientes con el medio de cultivo, supliendo las deficiencias ocurridas por una vasoconstricción en el saco vitelino y posibilitando un mejor crecimiento y desarrollo fetal (Cockroft, 1973).

En cuanto a la frecuencia de malformaciones en las extremidades a las diferentes concentraciones, esta mostró un aumento concentración-dependiente. Las alteraciones ocurrieron principalmente en las extremidades superiores, ya que estas comienzan su desarrollo antes que las posteriores. La pérdida de la forma, rayos digitales e invaginaciones propias del desarrollo de los dígitos, así como la aparición de hendiduras anormales en la futura pata anterior podría originar alteraciones dentro del espectro de malformaciones más frecuentemente reportadas para misoprostol, las que incluyen sindactilia, braquidactilia y una serie de otras manifestaciones agrupadas en los defectos transversales de la

extremidad terminal o TTLD (por sus siglas en inglés) con o sin síndrome de Moebius (González y cols., 1993; González y cols., 1998).

Efectos similares fueron observados en los cultivos con PGE₂, lo cual permite avalar la hipótesis de que misoprostol no sólo genera sus efectos por las intensas contracciones uterinas sino también por una interacción directa con los receptores de prostaglandina E presentes en los tejidos del feto en formación.

Aunque la evidencia científica indica que EP₂ y EP₄ mediarían un aumento de la síntesis de ADN y proteínas en el hueso, así como un aumento de la regeneración de cartílago articular luego de una injuria (Woodiel y cols., 1992; Yoshida y cols., 2002; Otsuka y cols., 2009), datos experimentales obtenidos mediante la técnica de micromasa, mostraron que misoprostol no tendría un efecto en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, salvo en concentraciones elevadas (Rosa Delgado, comunicación personal). Así, la disminución en el desarrollo del modelo cartilaginoso preferentemente en los rayos digitales, observada mediante la tinción con azul alciano y rojo alizarina, estaría mediada por mecanismos distintos a la proliferación y diferenciación.

La literatura asocia al receptor EP₄ y en menor proporción EP₂ a un aumento de la síntesis de BMP-2 en células mesenquimales, proteína que estaría involucrada en el metabolismo óseo (Arikawa y cols., 2004). Si bien, BMP-2 está asociada a la formación de hueso mediante una inducción de la diferenciación a osteoblastos, también poseería efectos inductores en osteoclastos participando en

la remodelación ósea (Jensen y cols., 2010). Por otro lado, estudios más recientes evidencian que BMP-2, a altas concentraciones, sería capaz de reducir la diferenciación e inducir apoptosis en células del periostio (Kim y cols., 2013). Y se ha descrito que las BMP, tendrían funciones duales dependiendo de la edad de las células blanco, por ejemplo, en la extremidad temprana, pueden generar apoptosis de las células mesenquimales cuando aún no se han formado condensaciones cartilaginosas, o más tarde llevar a la generación de cartílago (Gilbert, 2005). Además, otros datos apuntarían a que PGE₂ no solo generaría aumento de la condrogénesis, sino que podría inhibir la diferenciación a condrocitos y producir un retraso en la maduración de los mismos (Li y cols., 2005; Clark y cols., 2009).

Ahora bien, al analizar los efectos producidos por un antagonismo EP₁/EP₂ destaca la importancia de la señalización de PGE₂ endógena, ocasionando alteraciones evidentes, sin una disminución significativa del desarrollo cartilaginoso en la extremidad en relación a misoprostol, pero sí al control, haciendo evidente que la falta de estimulación EP₂ produciría un retraso en la maduración del modelo óseo. Además, Miyamoto y cols (2003) evidenciaron mediante la utilización de agonistas selectivos, que la estimulación simultánea de EP₂ y EP₄ es esencial en la diferenciación de células mesenquimáticas a condrocitos.

Finalmente, estas observaciones llevan a proponer que el posible mecanismo teratogénico de misoprostol, al menos en las extremidades, ocurriría por una activación excesiva de EP₄ con aumento en la expresión de BMP-2 que

podría llevar a un incremento de la apoptosis en los tejidos de la futura pata causando la generación de hendiduras anormales y pérdida de la forma, además de una disminución en el desarrollo cartilaginoso.

Esto también podría hacerse extensivo como una posible explicación a otra de las alteraciones asociadas al uso de misoprostol, la artrogriposis, debido a que las articulaciones se formarían mediante la separación de un modelo cartilaginoso mediado por muerte celular programada en la cual las BMP estarían involucradas, aunque en este caso la sobre-producción de BMP causaría la generación de columnas sólidas y rígidas de cartílago, llevando a la formación de articulaciones rígidas (Carlson, 2009).

VII. CONCLUSIONES

1. La exposición a 200, 2.000 y 20.000 pg/mL de misoprostol causó la disminución del desarrollo del modelo cartilaginoso de los rayos digitales, alteración de la forma y generación de hendiduras anormales en las extremidades anteriores, sin alterar los parámetros de crecimiento ni viabilidad.
2. La exposición a 70 pg/mL de PGE₂ causó efectos similares a los obtenidos por misoprostol en las concentraciones más altas.
3. Los efectos observados en las extremidades no serían mediados por activación de receptores EP₁ ni EP₂.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Adachi S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Minamitani C y col. 2009. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E1-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal in osteoblast-like C3T3-E1 cells. *Prostaglandin Other Lipid Mediat.* 90: 1-6.

Aoyama T, Liang B, Okamoto K, Matsusaki T, Nishijo K y Ishibe T. 2005. PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 20: 377-389.

Arikawa T, Omura K y Morita I. 2004. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 200: 400-406.

Augustine-Rauch K, Zhang C y Panzica-Kely J. 2010. In Vitro Developmental Toxicology Assays: A Review of the State of the Science of Rodent and Zebrafish Whole Embryo Culture and Embryonic Stem Cell Assays. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 90: 87–98.

Barber CV, Carda MB y Fantel GC. 1993. A new technique for culturing rat embryos in vitro between gestation day 14 and 15. *Toxicol in Vitro* 7: 695-700.

Barbero P, Liascovich R, Valdez R y Moresco A. 2011. Efecto teratogénico del misoprostol: un estudio prospectivo en Argentina. *Arch Argent Pediatr.* 109: 226-231.

Bos C, Richel D, Ritsema T, Peppelenbosch M y Versteeg H. 2004. Prostanoid and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1187-1205

Bos-Thompson MA, Hillaire-Buy D, Roux C, Faillie JL y Amram D. 2008. Möbius syndrome in a neonate after mifepristone and misoprostol elective abortion failure. *Ann Pharmacother.* 42: 888-892.

Boskey A, Stiner D, Doty S y Binderman I. 1996. The effect of misoprostol and prostanoids on cAMP production and calcification in a differentiating chick limb-bud culture system. *Am J Therap.* 3: 179-188.

Briggs G, Freeman R y Yaffe S. 2008. *Drugs in pregnancy and lactation*. 8^o ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.

Brochhausen C, Neuland P, Kirkpatrick CJ, Nüsing R y Klaus G. 2006. Cyclooxygenases and prostaglandin E2 receptors in growth plate chondrocytes in vitro and in situ--prostaglandin E2 dependent proliferation of growth plate chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 8: R78

Bugalho A, Bique C, Machungo F y Faúndes A. 1994. Induction of labor with intravaginal misoprostol in intrauterine fetal death. *Am J Obstet Gynecol.* 171: 538-541.

Cameron K, Lefker B, Ke H, Li M, Zawistoski M, Tjoa C, Wright A, DeNinno S, Paralkar V, Owen T, Yu L y Thompson D. 2009. Discovery of CP-533536: an EP2 receptor selective prostaglandin E2 (PGE2) agonist that induces local bone formation. *Bioorg Med Chem Lett.* 19: 2075-2078

Campos C y Cavieres MF. 2011. Evaluación de la embriotoxicidad de misoprostol utilizando el ensayo cultivo de embriones postimplantación. *Rev Med Chile* 139: 613-617.

Carlson B. 2009. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 4^a ed. Editorial Mosby, Madrid

Cavieres MF. 2011. Toxicidad sobre la gestación del misoprostol. Revisión de la literatura. *Rev Med Chile* 139: 516-523.

Chiong M y Cutiongeo-de la Paz E. 2009. Misoprostol teratogenicity in six Filipino children: a case series. *Acta Med Philipp.* 43: 52-56.

Clark C, Li TF, Kim KO, Drissi H, Zuscik M, Zhang X y O'Keefe R. 2009. Prostaglandin E2 inhibits BMP signaling and delays chondrocyte maturation. *J Orthop Res.* 27: 785–792

Cockroft D. 1973. Development in culture of rat fetuses explanted at 12,5 and 13,5 days of gestation. *Embryol. exp. Morph.* 29:473-483.

Collins P. 1990. Misoprostol, development, and clinical applications. *Med Res Rev.* 10: 149-172.

Corrêa MC y Mastrella M. 2012. Abortion and misoprostol: health practices and scientific controversy. *Cien Saude Colet.* 17: 1777-1784.

Dodo T, Uchida K, Hirose T, Fukuta T, Kojima C, Shiraishi I, Kato E, Horiba T, Mineshima H y cols. 2010. Increases in discontinuous rib cartilage and fused carpal bone in rat fetuses exposed to the teratogens, busulfan, acetazolamide, vitamin A, and ketoconazole. *Hum Exp Toxicol.* 29: 439-450.

Eynard A, Valentich M y Rovasio R. 2008. *Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares.* 4^a ed. Editorial Panamericana, Buenos Aires.

Fantel A, Betcher R y Beckman D. 2000. Rat embryo cultures for in vitro teratology. EN: Maines M, Costa L, Hodgson E, Reed D, Sipes I (Ed). *Jhon Wiley & sons.* New York. *Current Protocols in Toxicology* 13.2.1-13.2.12.

Faúndes A, Fiala C, Tang OS y Velasco A. 2007. Misoprostol for the termination of pregnancy up to 12 completed weeks of pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* 99: S172-S177.

Gilbert S. 2005. *Biología del desarrollo.* 7^a ed. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.

Gonzalez CH, Vargas FR, Perez AB, Kim CA, Brunoni D, Marques-Dias MJ, Leone CR, Correa Neto J, Llerena Júnior JC y de Almeida JC. 1993. Limb deficiency with or without Möbius sequence in seven Brazilian children associated with misoprostol use in the first trimester of pregnancy. *Am J Med Genet.* 47: 59-64.

Gonzalez CH, Marques-Dias MJ, Kim CA, Sugayama SM, Da Paz JA, Huson SM y Holmes LB. 1998. Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet.* 351: 1624-1627

Jensen E, Pham L, Billington C Jr, Espe K, Carlson A, Westendorf J, Petryk A, Gopalakrishnan R, Mansky K. 2010. Bone morphogenic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *J Cell Biochem.* 109: 672–682.

Jones R, Giembycz M y Woodward D. 2009. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *BJP.* 158: 104–145.

Kaufman M. 1992. The atlas of mouse development. 3^a ed. Editorial Academic Press, San Diego.

Khan RU, El-Rafaey H, Sharma S, Sooranna D y Stafford M. 2004. Oral, rectal, and vaginal pharmacokinetics of misoprostol. *Obstet Gynecol* 103: 866-70.

Kim HK, Oxendine I, Kamiya N. 2013. High-concentration of BMP2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells. *Bone* 54: 141-150.

Klein D y Raisz L. 1970. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86: 1436-1440.

Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. 2013. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther.* 138: 485-502.

Kotsonis F, Dodd D, Regnier B y Kohn F. 1985. Preclinical toxicology profile of misoprostol. *Dig Dis Sci.* 30: 142S-146S.

Li TF, Zuscik M, Ionescu A, Zhang X, Rosier R, Schwarz E, Drissi H y O'Keefe R. 2005. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp Cell Res.* 300: 159-169.

Liu JN, Hing M y Stan K. 2007. Oxidative stress status and development of late organogenesis stage rat whole embryos culture from gestational days 13.5 to 14.5. *Toxicol In Vitro* 21: 53-62.

McLeod MJ. 1980. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* 22: 299-301.

Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F y Giavini E. 2006. Dymorphogenic effects of some fungicides derived from the imidazole on rat embryos cultured in vitro. *Reprod Toxicol.* 21: 74-82

Menegola E, Di Renzo F, Metruccio F, Moretto A y Giavini E. 2013. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. *Arch Toxicol.* 87: 1987-1997

Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, Aubin J y Maeda N. 2009. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone* 44: 1177-1185.

Miyamoto M, Ito H, Mukai S, Kobayashi T, Yamamoto H, Kobayashi M, Maruyama T, Akiyama H, Nakamura T. 2003. Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 644-652.

Moore KL y Persaud TVN. 2004. *Embriología clínica del desarrollo del ser humano*. 7a ed. Editorial Elsevier, Madrid.

National Academy of Science. 1996. *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington DC.

New D. 1967. Development of explanted rat embryos in circulating medium. *J Embryol Exp Morph.* 17: 513-525

Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Koide M, Yamaguchi K, Oida H, Arai Y, Sahara N, Nakamura H y Ozawa H. 2011. Prostaglandin E2 receptor EP4-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. *Eur J Pharmacol.* 650: 396-402.

Osorio A, Rodríguez JG, Pizarro O, Paredes A y Aguilera S. 2007. Embriopatías asociadas al uso de misoprostol. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 351: 346-51.

Otsuka S, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Nasu A, Fukiage K, Kohno Y, Maruyama T, Kanaji T y cols. 2009. PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 17:529-538

Quemelo PR, Lourenço CM y Peres LC. 2009. Teratogenic effect of retinoic acid in swiss mice. *Acta Cir Bras.* 22: 451-456.

RAE. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. <http://lema.rae.es/drae/?val=teratogeno> [visitada el 13 de Diciembre de 2013]

Rojas M y Walker L. 2012. Malformaciones congénitas: aspectos generales y genéticos. *Int. J. Morphol.* 30: 1256-1265.

Santana V y Pereira G. 2009. Prednisone reduces ketoconazole-induced skeletal defects in rat fetuses. *Arch Toxicol.* 83: 863-871.

Schmidt K, Hughes C, Chudek JA, Goodyear SR, Aspden RM, Talbot R, Gundersen TE, Blomhoff R, Henderson C, Wolf CR y Tickle C. 2009. Cholesterol metabolism: the main pathway acting downstream of cytochrome P450 oxidoreductase in skeletal development of the limb. *Mol Cell Biol.* 29: 2716-2729.

Shepard TH. 1994. Proof of human teratogenicity. *Teratology.* 50: 97-8

Skalko R y Jacobs D. 1978. The effects of 5-fluorouracil on [3H]-nucleoside incorporation into the DNA of mouse embryos and maternal tissues. *Exp Mol Pathol.* 29: 303-315.

Steinetz BG, Butler MC, Sawyer WK, O'Byrne EM y Giannina T. 1976. Post-implantation termination of pregnancy in rats. *Contraception* 14: 487-505.

Steinhilber D, Jaschonek K, Knospe J, Morof O y Roth HJ. 1990. Effects of novel antifungal azole derivatives on the 5-lipoxygenase and cyclooxygenase pathway. *Arzneimittelforschung* 40: 1260-1263.

Sugimoto Y, Narumiya S. 2007. Prostaglandin E Receptors. *J Biol Chem.* 282: 11613-11617.

Tapia A. 2013. Caracterización de la embriotoxicidad de misoprostol utilizando el ensayo de cultivo de embriones post-implantación. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso.

Ungrin M, Carriere M-C, Denis D, Lamontagne S, Sawyer N, Stocco R y cols. 2001. Key structural features of prostaglandin E2 and prostanoid analogs involved in binding and activation of the human EP1 prostanoid receptor. *Mol Pharmacol* 59: 1446-1456.

Vargas FR, Schuler-Faccini L, Brunoni D, Kim C, Veloni VF, Sugayama SM y cols. 2000. Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am J Med Genet.* 95: 302-6.

Watkinson G, Hopkins A y Akbar FA. 1988. The therapeutic efficacy of misoprostol in peptic ulcer disease. *Postgrad Med J.* 64: 60-77.

Weiner C y Robillard J. 1989. Effect of acute intravascular volume expansion on human fetal prostaglandin concentrations. *Am J Obstet Gynecol.* 161: 1494-1497.

WHO. World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines, <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html> [visitada el 20 de Noviembre de 2013]

Wilson J, Jordan R.L y Schumacher H. 1969. Potentiation of the teratogenic effects of 5-fluorouracil by natural pyrimidines. II. Biological aspects. *Teratology*. 2: 91-98.

Woodiel F, Fall P y Raisz L. 1996. Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. *J Bone Miner Res*. 11: 1249-1255.

Yang S, Wei S, Pozzi A y Capdevila JH. 2009. The arachidonic acid epoxygenase is a component of the signaling mechanisms responsible for VEGF-stimulated angiogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 489: 82-91.

Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M y cols. 2002. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4580-4585

Zieman M, Fong S, Benowitz N, Bankster D y Darney PD. 1997. Absorption kinetics of misoprostol with oral or vaginal administration. *Obstet Gynecol* 90: 88-92.

