



FACULTAD DE FARMACIA
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MISOPROSTOL EN CULTIVO DE CELULAS
MESENQUIMALES DE PRIMORDIOS DE EXTREMIDADES DE RATA, MEDIANTE
EL ENSAYO DE MICROMASA**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

SILVANA ALEXIS FLORES MOLINA

Director de Tesis: María Fernanda Cavieres Fernández, Ph.D.
Co- Director de tesis: Dra. Claudia Altamirano

2012

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
○ Desarrollo embrionario del hueso.....	6
○ Malformaciones congénitas.....	12
○ Misoprostol como inductor de malformaciones congénitas.....	14
○ Prostaglandinas de la serie E y su rol en el metabolismo óseo.....	20
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	26
○ Objetivo general.....	27
○ Objetivos específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	35
○ Optimización del número de células.....	36
○ Control positivo y negativo.....	39
○ Efecto de misoprostol sobre células mesenquimales.....	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53

i.RESUMEN

Las prostaglandinas (PGs) de la serie E juegan un papel importante en el metabolismo y desarrollo óseo. Durante su diferenciación, las células mesenquimales producen PGE₁ y PGE₂, por lo que se cree que estos mediadores regulan la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, los que a su vez, regulan procesos de mineralización. Misoprostol es un análogo sintético de la PGE₁, utilizado en Chile para prevenir úlceras inducidas por analgésicos antiinflamatorios no esteroideos y, dada su actividad uterotónica, es utilizado también para la inducción de partos y abortos. Se estima que su uso abortivo falla en el 15% de los intentos, lo cual lleva a una exposición *in utero* a la droga y a la inducción de defectos congénitos, entre ellos defectos esqueléticos manifestados en un síndrome conocido como artrogriposis. Estudios *in vivo* con animales de experimentación no han sido exitosos en determinar su toxicidad sobre la gestación. No obstante, recientemente se determinó que el misoprostol ejerce un efecto embriotóxico sobre embriones cultivados en presencia del medicamento. En esta tesis se utilizó el ensayo *in vitro* de micromasa para avanzar en la dilucidación del mecanismo de acción a través del cual misoprostol podría ejercer su embriotoxicidad. Determinándose la viabilidad y diferenciación de células mesenquimales a condrocitos expuestos a misoprostol en concentraciones de 20 pg/mL, 200 pg/mL, 2.000 pg/mL y 20.000 pg/mL. Se observó una tendencia sin significancia estadística, de misoprostol a aumentar la viabilidad y diferenciación de células mesenquimales, lo cual indica que la diferenciación a condrocitos probablemente no sea un proceso afectado por el medicamento.

ii. ABSTRACT

Prostaglandins (PGs) of the E series play an important role on bone metabolism and development. Mesenchimal cells produce PGE₁ y PGE₂ during their differentiation for which these PGs are believed to regulate mesenchimal cell differentiation into chondrocytes. Misoprostol is a synthetic analog of PGE₁ and it is used in Chile for the prevention of non-steroidal antiinflammatory-induced gastric ulcers. Because of their uterotonic activity, it is also indicated for the labor and abortion induction. It is estimated that up to 15 % of abortions fail, leading to in utero exposure to the drug and to the induction of birth defects including an skeletal syndrome known as arthrogryposis. *In vivo* studies using experimental animals have not been successful in determining its developmental toxicity, although misoprostol has recently been proven to be embryotoxic to cultured embryos. In this thesis, the micromass assay was used to evaluate the mechanism that mediates the *in vitro* embryotoxicity of misoprostol, through the determination of viability and differentiation into chondrocytes of mesenchimal cells exposed to 20 pg/mL, 200 pg/mL, 2.000 pg/mL and 20.000 pg/mL misoprostol. Viability and differentiation showed a non-significant tendency to be increased, indicating that the differentiation of mesenchimal cells into chondrocytes is probably not a target of misoprostol.

I.INTRODUCCIÓN

Desarrollo embrionario del hueso

En humanos, durante la tercera semana de gestación, ocurre la gastrulación, un proceso que establece las tres capas germinales embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y que se inicia con la formación de una línea primitiva en la superficie del epiblasto. En este proceso, las células de la masa celular interna se organizan de tal forma que dan origen al disco germinativo trilaminar que determinará la formación de todos los tejidos y órganos del embrión (Sadler, 2009).

Específicamente, el mesodermo se organiza en una serie de segmentos que se ordenan desde la notocorda hacia la superficie lateral del embrión. La notocorda, corresponde a un cordón sólido de células, que pasa por debajo del tubo neural y sirve de base para el esqueleto axial. Las células de la capa germinal mesodérmica forman una lámina delgada de tejido laxo a cada lado de la línea media primitiva, las células cercanas a esta línea proliferan y forman una capa gruesa de tejido, más bien conocido como mesodermo paraxial (figura 1, Moore y Persaud, 2004).

El mesodermo paraxial es el segmento más cercano a la notocorda y se organiza en somitómeras, las cuales originan somitas ubicadas desde la región cefálica a caudal del embrión, y que originan al esqueleto axial. Cada somita generada a partir del mesodermo paraxial, lo hace como esferas de células mesodérmicas, las cuales experimentan epitelización y se disponen en una estructura en forma de anillo. Cuando pierden estas características, se vuelven mesenquimatosas y rodean al tubo neural y a la notocorda, que en conjunto forman el esclerótoma que se diferenciará en vértebras y costillas (figura2).

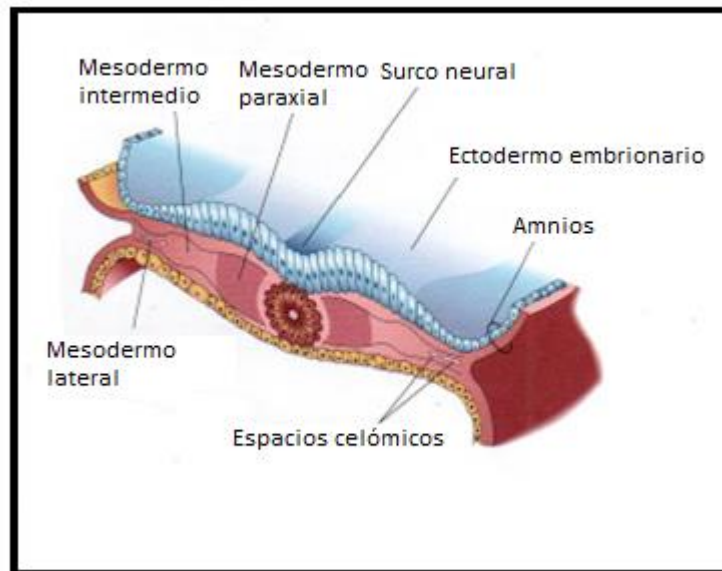


Figura 1. Disposición de la capa de células mesodérmicas (modificado de Moore y Persaud, 2004).

Las células de los márgenes dorsomedial y ventrolateral de la región superior de la somita forman los precursores de las células musculares, mientras que las situadas entre estos dos grupos constituyen el dermatoma. Por consiguiente, cada somita forma su propio esclerótoma (el cartílago del tendón y el componente óseo), su propio miótoma (proporciona el componente muscular) y su propio dermatoma que forma la dermis de la espalda (figura 2, Sadler, 2009).

Al final de la cuarta semana de gestación, las células del esclerótoma se vuelven polimorfas y forman un tejido laxo, mesenquimatoso o conjuntivo embrionario. Las células mesenquimatosas migran y se diferencian ya sea en fibroblastos, condroblastos u osteoblastos precursores de osificación (Sadler, 2009).

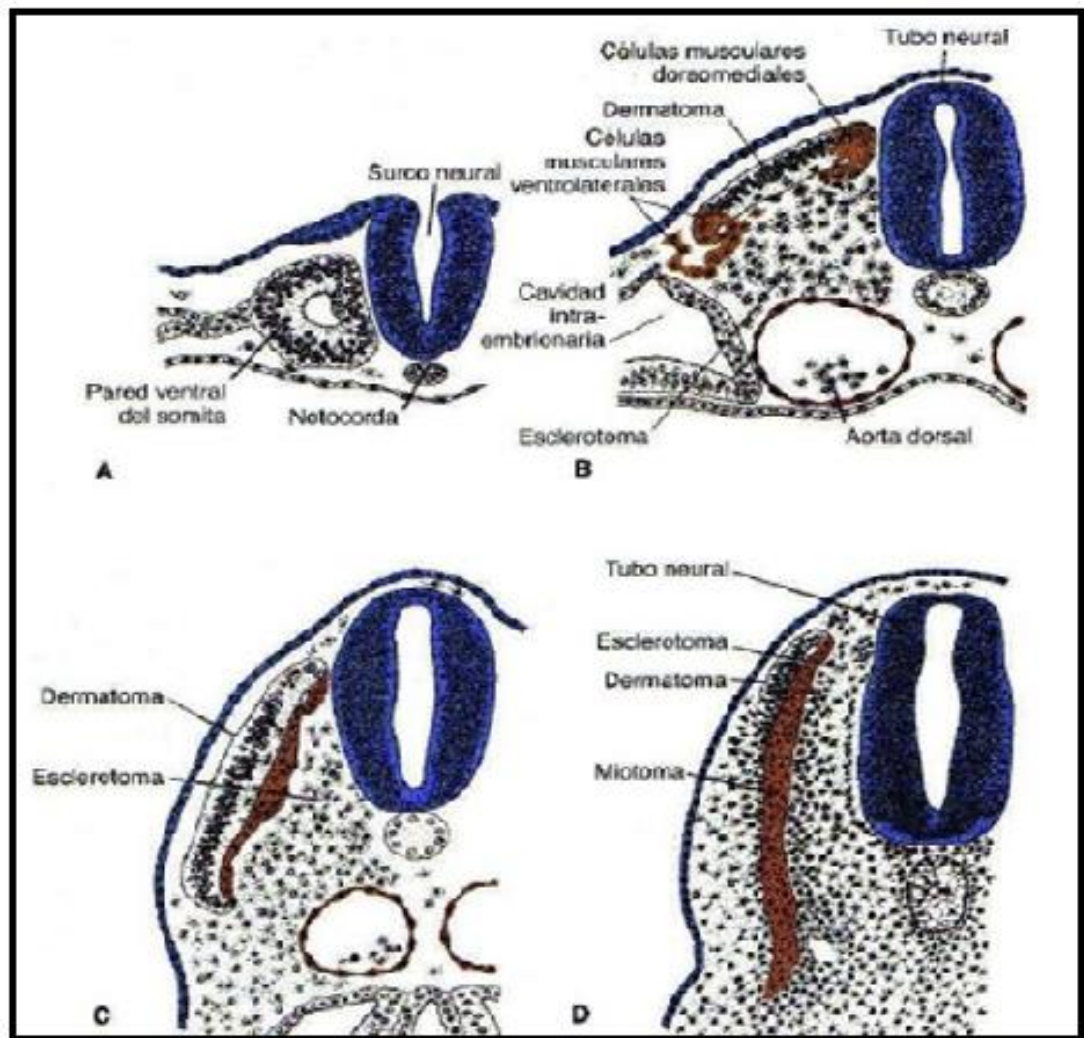


Figura 2. Fases en el desarrollo de una somita. A) Disposición de las somitas en la capa mesodérmica. B, C y D) Ordenamiento celular de las somitas que dan lugar a diferentes sectores conocidos como dermomiótoma y esclerótoma (modificado de Sadler, 2009).

La formación de hueso puede proceder por dos procesos distintos (Moore y Persaud, 2004; Stevens, 1999):

Osificación intermembranosa: Produce preferentemente huesos planos y también contribuye a la formación de las diáfisis corticales de los huesos largos. Tiene lugar dentro de una membrana de tejido conjuntivo. Las células mesenquimatosas que forman las membranas de tejido conjuntivo se transforman en células osteoprogenitoras y luego en osteoblastos que segregan matriz ósea y fibras de colágeno hasta que quedan rodeadas por completo. En este momento, los osteoblastos se transforman en osteocitos formando lagunas y canalículos entre ellos. Al cabo de unos días, en este tejido se depositan fosfato cálcico y sales minerales endureciendo la matriz ósea. Durante la calcificación de la matriz, aparecen las espículas óseas que se unen en una estructura en forma de malla, dando lugar al hueso esponjoso. La lámina central de hueso esponjoso, se recubre por placas de tejido óseo compacto. Una vez formado, el hueso plano crece de tamaño mediante la adición de más hueso por sus bordes.

Osificación intracartilaginosa o endocondral. Produce preferentemente huesos largos y corresponde al tipo de proceso parcialmente estudiado en esta tesis. En este tipo de osificación, la formación ósea cartilaginosa tiene lugar en modelos óseos preexistentes que se diferencian a cartílago hialino bajo la regulación de condrocitos (figura 3). El centro de osificación se conoce como diáfisis. Los condrocitos también regulan la calcificación del cartílago y producen factores de crecimiento (tabla 1) que estimulan la invasión de vasos sanguíneos y atraen condroclastos para resorber cartílago calcificado y dirigir la formación de osteoblastos desde el pericondrio. Como el cartílago calcificado se resorbe, los osteoclastos secretan matriz que se calcifica gradualmente reemplazando el cartílago por

hueso. En otras palabras, durante la osificación endocondral, los condrocitos, bajo la regulación de los factores mencionados en la tabla 1, completan un proceso de diferenciación que implica su proliferación, maduración, hipertrofia y diferenciación terminal (Clark y col., 2005). Estos procesos se pueden modelar *in vitro* y son regulados por los mismos mediadores señalados en la tabla 1 y figura 4.

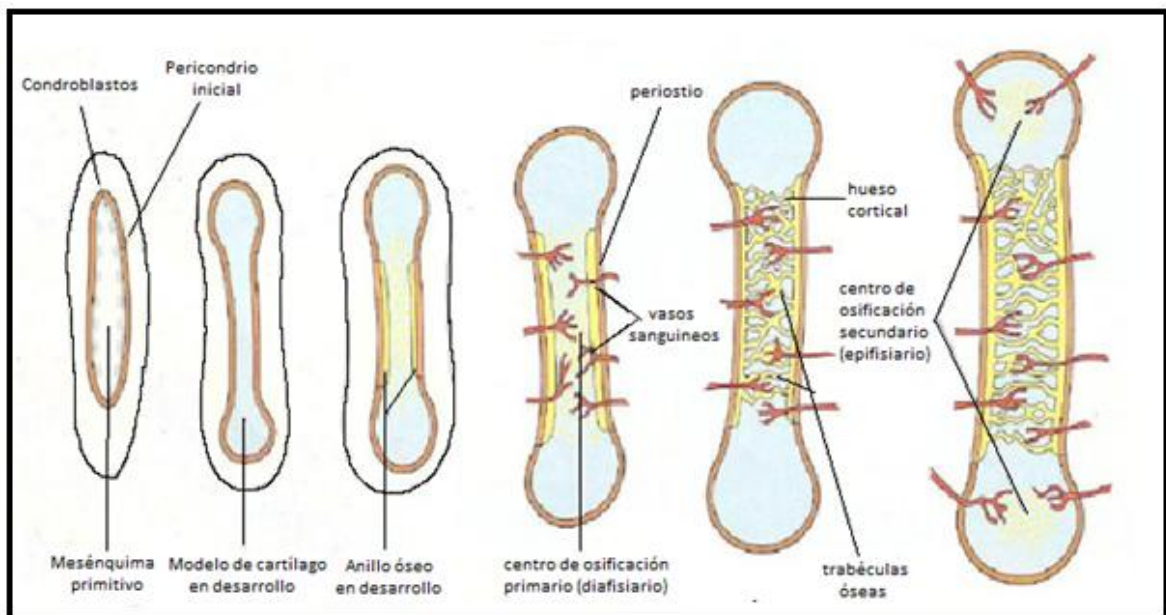


Figura 3. Desarrollo prenatal de un hueso largo (osificación endocondral, modificado de Stevens, 1999).

Tabla 1. Señales moleculares que controlan el proceso de osificación endocondral^a

Fases de osificación endocondral	Factores involucrados
Condrogénesis y proliferación	Colágeno tipo II (Col II); Factor de transcripción Sox 9; Factor de crecimiento transformante β (TGF β)
Maduración e hipertrofia	Indian hedgehog homolog (Ihh); Colágeno tipo X (col X); Proteína metaloproteínasa de la matriz-13 (MMP-13); Fosfatasa alcalina (AP); Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
Diferenciación terminal	Col X (++) ; VEGF (++) ; Osteocalcina (OC)

^a modificado de Zhang y col., 2004; Clark y col., 2005; Studer y col., 2012.

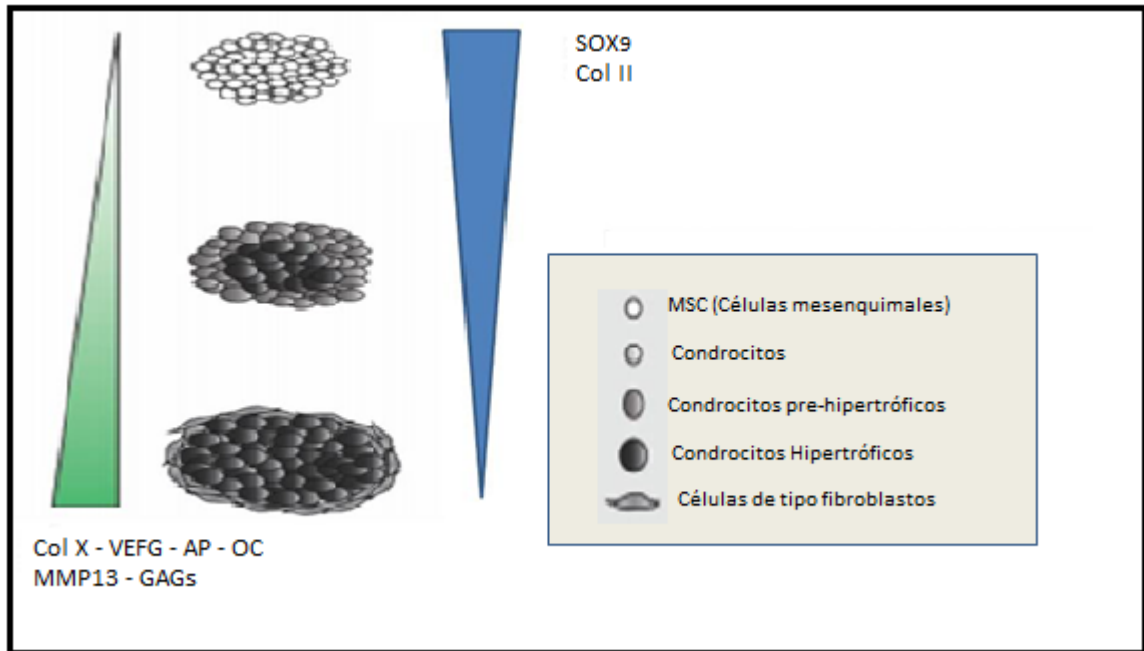


Figura 4. Condrogénesis *in vitro*. Proliferación de células mesenquimales, maduración - hipertrofia de condrocitos y diferenciación terminal (modificado de Studer y col., 2012).

El período embrionario se extiende entre la cuarta y octava semana de gestación. En este período, el disco embrionario trilaminar se transforma en un cuerpo cilíndrico a través de complejos plegamientos y numerosas diferenciaciones tisulares, en un proceso denominado histogénesis. Se producen también, la organogénesis o formación de los principales órganos y sistemas y la morfogénesis o adopción de la forma definitiva de ser humano (Hib, 1999). La organogénesis es la etapa de máxima susceptibilidad frente a los agentes ambientales que pueden originar malformaciones congénitas (Sadler, 2009), tal como se indica en la figura 5.

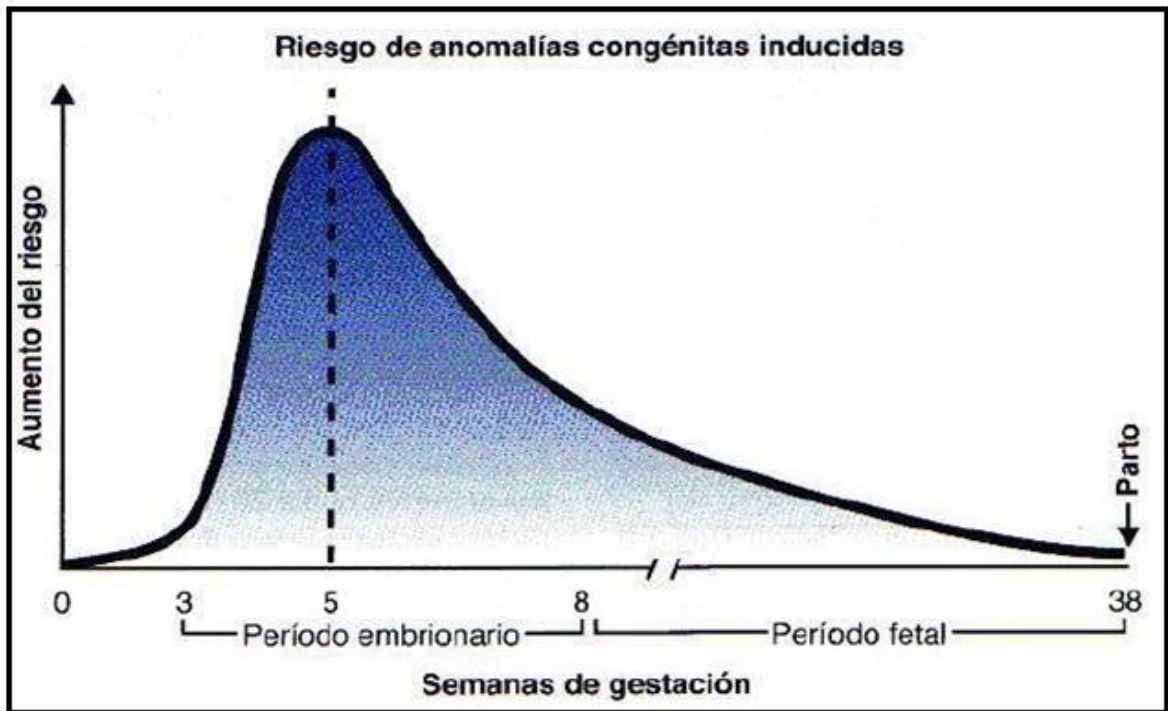


Figura 5. Riesgos de padecer una anomalía congénita inducida por un factor externo, según el tiempo de gestación. El periodo más sensible es el embrionario, que abarca de la tercera a octava semana (modificado de Sadler, 2009).

Malformaciones congénitas

Las malformaciones o anomalías congénitas describen los trastornos estructurales, conductuales, funcionales y metabólicos presentes al momento de nacer. Pueden provocar una ausencia total o parcial de una estructura o alteraciones de su configuración normal, provocadas principalmente por factores ambientales y/o genéticos.

El término teratogénesis (del griego *teratos*, monstruo), se emplea para describir el origen de estas condiciones (Sadler, 2009). Se ha estimado que el 47% de las anomalías congénitas ocurre por causas desconocidas, 25% son genéticas, 25% son multifactoriales (es decir una combinación de factores genéticos y ambientales) y sólo el 3% son causadas

por agentes físicos, químicos o biológicos (Cavieres, 2004). La tabla 2 indica los principales agentes físicos, químicos o biológicos que pueden inducir anomalías congénitas en humanos.

<p><u>Factores físicos</u> Iodo radioactivo, Radioterapia, Rayos X.</p> <p><u>Factores biológicos</u> Citomegalovirus, Virus Herpes I y II, Sífilis, Virus de la Rubéola, Toxoplasmosis.</p> <p><u>Factores químicos</u> -Desequilibrios metabólicos Hiper e hipotiroidismo, Diabetes, Deficiencia de ácido fólico, Hipertermia, Fenilcetonuria, Enfermedad reumática. -Sustancias de abuso Anfetaminas, Cocaína, Etanol, LSD, Tolueno. -Fármacos Ácido valpróico, Aminopterina, Andrógenos, Busulfan, Captopril, Cumarinas, Ciclofosfamida, Dietilestilbestrol, Difenilhidantoína, Enalapril, Misoprostol, Etreinato, Ioduro, Isotretinoína, Litio, Metimazol, Penicilamina, Tetraciclinas, Talidomida, Trimetadona. -Contaminantes ambientales Bifenilospoliclorados (PCBs), Humo de cigarro, Mercurio orgánico, Plomo.</p>
--

Tabla 2. Factores físicos, químicos y biológicos con suficiente evidencia para ser clasificados como teratógenos humanos (modificado de Cavieres, 2004).

Las malformaciones congénitas han ido adquiriendo cada día más importancia, tanto desde el punto de vista de morbilidad como de mortalidad. Ocupan un lugar importante como causa de muerte en el período neonatal (Nazer y col., 2011), siendo la principal causa de mortalidad y representan en Chile aproximadamente el 32,2% de las muertes neonatales y 30,5% de las muertes en el primer año de vida (Aguila y col., 1999).

Misoprostol como agente inductor de malformaciones congénitas

Misoprostol (15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl PGE₁) es un análogo sintético de la PGE₁ (figura 6), en el cual el carbono 16 ha sido sustituido por un metiléter para mejorar su estabilidad (Collins, 1990). Aun cuando el misoprostol posee menor potencia que las PGE₁ y PGE₂ (Ungrin y col., 2001), este medicamento ha demostrado ser muy conveniente gracias a la estabilidad de su formulación en forma de comprimidos, la que se puede administrar por vía rectal, vaginal y sublingual (Chong y col., 2004).

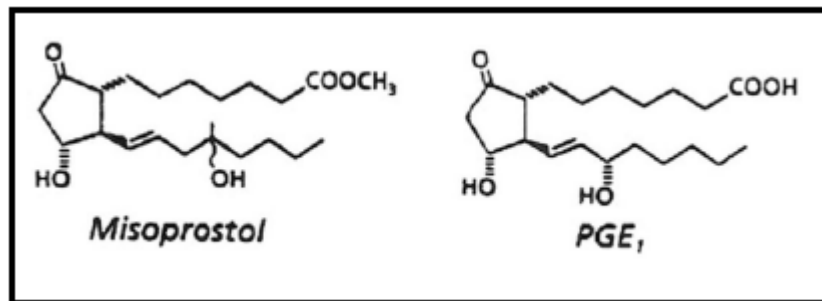


Figura 6. Estructura química de misoprostol y de la prostaglandina que ocurre de forma natural (Collins, 1990).

En Chile, es utilizado como citoprotector de la mucosa gástrica, para la prevención y el tratamiento de la úlcera inducida por analgésicos anti inflamatorios no esteroideos (Cavieres, 2011). En otros países su uso se ha ampliado al ámbito gineco-obstétrico por sus propiedades uterotónicas para lograr la maduración cervical e inducir el trabajo de parto al actuar directamente sobre receptores EP₂ y EP₃ (Méndez, 2005), facilitar la extracción de restos embrionarios y/o para la interrupción temprana del embarazo (Chong y col., 2004). El uso de misoprostol como agente abortivo se considera seguro, ya que raramente causa efectos adversos serios (Hemmerling, 2006). Sin embargo, es importante

destacar que aproximadamente el 15% de los abortos inducidos por misoprostol fallan. Esto desata preocupación ya que la exposición *in utero* al misoprostol se asocia a un incremento en el riesgo de malformaciones congénitas (Capilla, 2005).

Dada su actividad uterotónica, el misoprostol pertenece a la categoría X de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, es decir no debe utilizarse durante el embarazo por el riesgo de la inducción de aborto. Por otro lado, existe una fuerte asociación epidemiológica entre la exposición a misoprostol durante la gestación y el desarrollo de anomalías congénitas (tabla 3 y 4). Entre ellas destacan la artrogriposis, el síndrome de Moebius, la gastrosquisis y defectos de extremidades y anormalidades cerebrales, los cuales fueron descritos por primera vez en Brasil durante la década de 1980 (Cavieres, 2011).

Tabla 3. Anomalías en extremidades relacionadas a uso de misoprostol durante la gestación (modificado de Osorio y col., 2007)

Extremidades inferiores	
Tipo	%
Equinovaro	80,7
Mesomelia	15,8
Artrogriposis	14
Luxación de cadera	10,5
Bandas amnióticas	8,8
Sindactilia	8,8
Hipoplasia de uñas	7
Braquidactilia	1,8
Extremidades superiores	
Mesomelia	46,4
Sindactilia	21,4
Bandas amnióticas	17,9
Artrogriposis	17,9
Hipoplasia de uñas	14,3
Braquidactilia	7,1
Polidactilia	3,6

Tabla 4. Defectos congénitos descritos previamente por exposición prenatal a misoprostol ^a

Defectos	Collins y col, 1983.	Wood y col, 1987	Fonseca y col, 1991.	González y col, 1993	Genest y col, 1994	González y col, 1998	Total de 53 pacientes
Defectos extremidades terminales	1/1	0/1	0/1	6/7	1/1	5/42	13/53
Hidrocefalia	1/1	1/1	1/1	2/7	0/1	9/42	14/53
Pie equinovaro	1/1	0/1	0/1	1/7	0/1	22/42	24/53
Crecimiento intrauterino retardado	0/1	1/1	0/1	0/7	0/1	0/42	1/53
Parálisis del nervio craneal	0/1	0/1	0/1	4/7	0/1	21/42	25/53
Microcefalia	0/1	0/1	0/1	1/7	0/1	5/42	6/53
Sindactilia	0/1	0/1	0/1	1/7	0/1	8/42	9/53
Artrogriposis	0/1	0/1	0/1	0/7	0/1	10/42	10/53
Braquidactilia	0/1	0/1	0/1	0/7	0/1	3/42	3/53

^a Los trabajos citados aparecen en referencias en Orioli y col., 2000.

Dentro del espectro de defectos congénitos causados por misoprostol se encuentra la artrogriposis múltiple congénita (AMP), caracterizada por la presentación de múltiples contracturas congénitas que afectan a dos o más áreas diferentes del cuerpo (Bamshad y col., 2009). Como se puede observar en la figura 7, la AMP se caracteriza por rigideces articulares múltiples, producto de hipoplasia de la musculatura y se asocia a deformaciones de manos, pies y a otros defectos congénitos (Staheli y col., 2008). Una hipótesis plantea que la patología en el desarrollo es de causa vascular a nivel del cordón umbilical. Por otro lado se postula que se debe principalmente a causas miogénicas y neurogénicas (ver figura 8), las cuales se expresan principalmente como hipomotilidad o acinesia fetal durante el periodo de gestación (Bamshad y col., 2009).



Figura 7. Niño con artrogriposis. Se puede observar rotación interna del hombro izquierdo, extensión del codo flexiar y extensión de ambas extremidades inferiores (modificado de Peña y col., 1994).

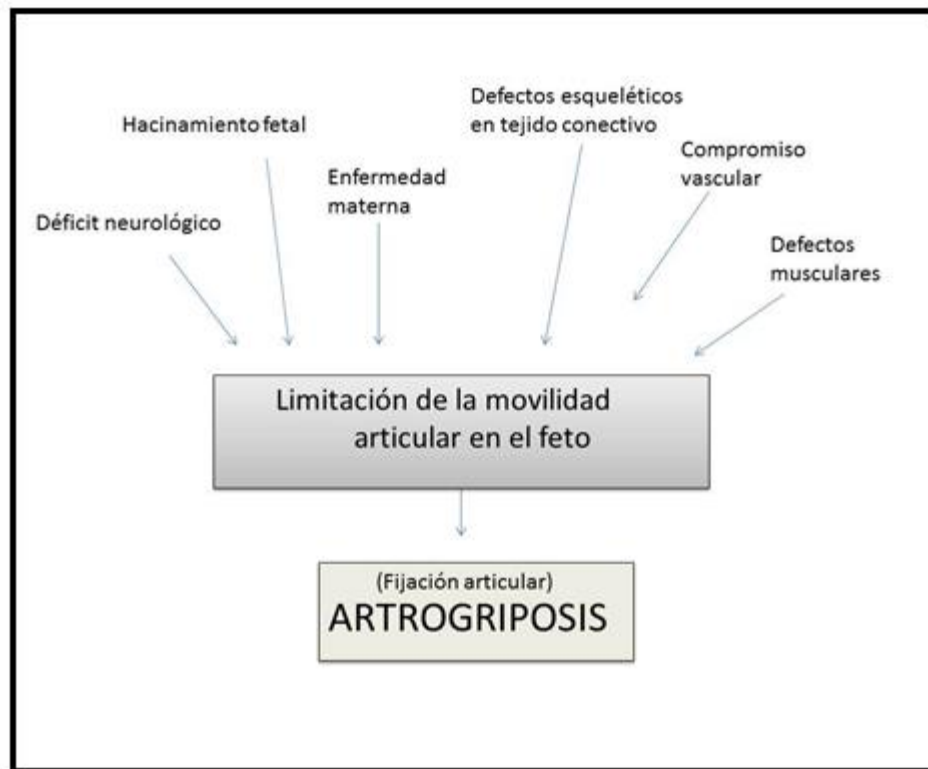


Figura 8: Problemas que pueden inducir contracturas articulares durante el período prenatal (modificado de Peña y col., 1994; Staheli y col., 2008).

Alrededor del mundo se han reportado numerosos casos sobre defectos inducidos tras la administración de misoprostol, principalmente durante el primer trimestre de embarazo. Por ejemplo en Brasil, nacieron niños con pie equino como parte de una artrogriposis y otros con artrogriposis en las piernas, tras intentos de aborto con misoprostol (González y col., 1998) y en Sudáfrica se reportó el nacimiento de una niña con un dígito extra en cada mano y ausencia de extremidad inferior (Hofmeyr y col., 1998). En Venezuela, tras una doble exposición durante el primer trimestre de gestación, nació un niño con síndrome de Moebius (Sánchez y col., 2003), así como en Chile se informó un caso de un niño con artrogriposis y síndrome de Moebius tras un aborto fallido en la octava semana de gestación (Osorio y col., 2007).

El mecanismo que media estos efectos teratogénicos aún no ha sido dilucidado. Se postula que la droga generaría un efecto vasoconstrictor intenso a nivel uterino (Bos-Thompson y col., 2008, figura 9), lo que llevaría a una interrupción de la vasculatura fetal, resultando en isquemia transitoria fetal y alterando el desarrollo en etapas con alto requerimiento de oxígeno (Los y col., 1996). Una de las consecuencias de la hipoxia sería la alteración de los núcleos de los nervios craneales abducens (VI) y facial (VII), lo que explicaría la parálisis de los músculos faciales en el Síndrome de Moebius (Osorio y col., 2007). Sin embargo, la propuesta de hipoxia como mediador de las alteraciones esqueléticas no parece tan explícita dadas las distintas funciones biológicas de las prostaglandinas durante la gestación.

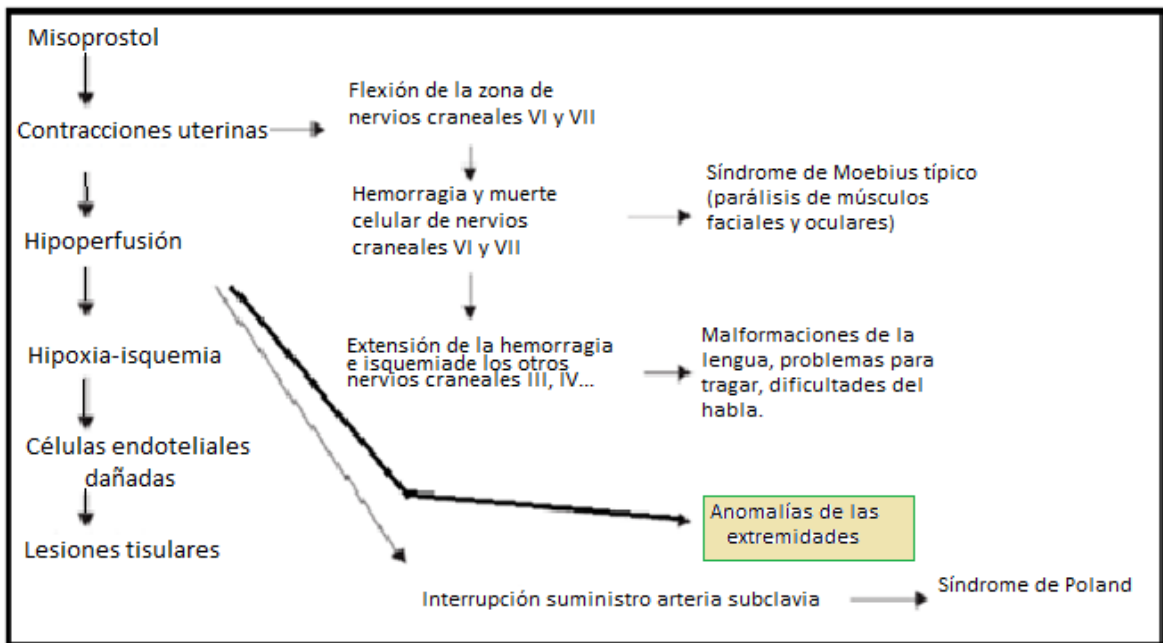


Figura 9. Mecanismo propuesto para teratogenicidad de misoprostol (modificado de Bos-Thompson y col., 2008).

Gruber y col., (2009) han informado que algunos de los efectos anabólicos importantes de misoprostol incluyen la estimulación de los osteoclastos durante la curación de fracturas y la estimulación de reposición de hueso en modelos animales ovariectomizados. En presencia de PGE₁ y su análogo, misoprostol, el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) es expresado y producido por células del anillo fibroso humano (anillo cartilaginoso que rodea al núcleo pulposo del disco intervertebral), tanto *in vivo* como *in vitro*. El EGF es un conocido péptido que actúa en la modulación de un número de respuestas celulares incluyendo embriogénesis, supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Es reconocido por su rol en la cicatrización de heridas y por ser un potente factor mitogénico para células cultivadas de origen ecto y mesodérmico.

Las prostaglandinas de la serie E y su rol en el metabolismo óseo

Las prostaglandinas (PG_s) son un grupo de mediadores lipídicos producidos a partir de ácido araquidónico en diversos tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Aoyama y col., 2005). En especial, las PG_s de la serie E juegan un papel importante en el desarrollo y el metabolismo óseo. A pesar de que PGE₁ y PGE₂ fueron descritas inicialmente como sustancias que estimulaban la resorción ósea (Klein y col., 1970), estudios recientes han demostrado que pueden también estimular la síntesis de ADN, aumentando la proliferación y diferenciación de estos tejidos, en forma dosis-dependiente y a través de una modulación de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) (Brochhausen y col., 2006).

Ambas PG_s actúan localmente sobre las células diana mediante la unión a receptores específicos de superficie celular acoplados a proteína G (Weinreb y col., 1999). Se conocen cuatro receptores diferentes (EP₁-EP₄), los que están vinculados a las distintas vías de transducción de señales (Brochhausen y col., 2006). El receptor EP₁ está acoplado a proteína G_q y aumenta la concentración de calcio intracelular; los receptores EP₂ y EP₄ actúan acoplados a proteína G_s y generan un aumento de concentración intracelular de AMP_c al activar a la adenilato ciclasa (AC); y el receptor EP₃ posee distintas vías de señalización, pero principalmente está asociado a proteína G_i llevando a una reducción en la actividad de AC (Clark y col., 2005) y consecuente disminución de los niveles de AMP_c (Adachi y col., 2009).

La señal producida por PGE_2 a través de su receptor EP_1 induce la maduración y diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento (figura 10), nombre que se da al tejido cartilaginoso encargado de la osificación endocondral de los huesos largos (Aoyama y col., 2005). Se ha señalado también, que en esta placa, la enzima ciclooxigenasa 2 (COX_2) es responsable de la liberación de PGE_2 (Brochhausen y col., 2006).

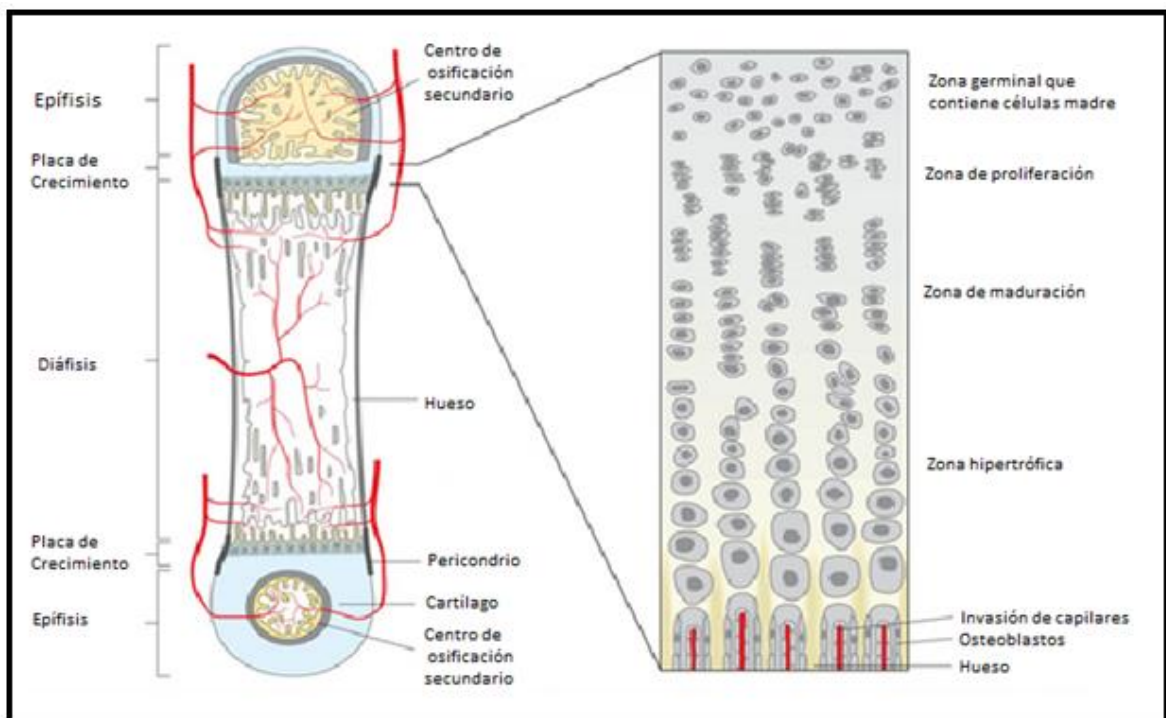


Figura 10. Organización y estructura real de la placa de crecimiento (modificado de Studer y col., 2012).

Se ha demostrado la expresión de EP_2 en los tejidos de huesos del feto y en el cartílago de la placa de crecimiento. Informes recientes indican que los agonistas EP_2 pueden estimular la formación ósea de forma dosis-dependiente (Aoyama y col., 2005). Además en células mesenquimales de extremidades, se expresan todos los receptores EP ,

pero se proponen EP₂ y EP₄ para la conducción de las células madre mesenquimales a la condrogénesis a través del aumento de AMP_c (Brochhausen y col., 2006). Así también, se ha informado que la PGE₂ tiene actividad anabólica *in vivo* ya que induce a los precursores de la médula ósea osteogénica a diferenciarse a osteoblastos, en un proceso mediado por EP₄. Estos efectos *in vivo* se han dilucidado en ratas, perros y humanos. Sin embargo, el mecanismo aún no se ha establecido, aunque se sabe que en la médula ósea de ratas una sola dosis de PGE₂ induce la expresión de genes de respuesta inmediata, lo que activa factores de transcripción que estimulan y/o diferencian a los precursores osteogénicos (Weinreb y col., 1999).

También existe evidencia que las PGs alteran el metabolismo del cartílago embrionario de pollo, ya que en altas concentraciones, reducen la biosíntesis de glucosaminoglicanos (GAG) sulfatados en condrocitos articulares (Malemud y col., 1977) y que PGE₁ y PGE₂ estimulan la síntesis de interleuquina 6 (IL₆), agente potente de resorción ósea en osteoblastos y uno de los moduladores centrales del metabolismo óseo vía EP₂ (Adachi y col., 2009).

En el caso de la PGE₁, se sabe que su interacción con el receptor EP₂ aumenta la producción de AMP_c en osteoblastos. Estudios sugieren que en estas células, la PGE₁ estimula la activación de Rho-quinasa vía EP₂, favoreciendo la síntesis de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEFG), lo que implica un aumento de permeabilidad capilar y la estimulación de la proliferación y migración de células endoteliales (Adachi y col., 2009), las cuales proporcionan la microvasculatura necesaria para la remodelación

ósea. Así, se reconoce que las actividades de osteoblastos, osteoclastos y células endoteliales capilares están estrechamente coordinadas para regular el metabolismo óseo. La inactivación de VEGF causa completa supresión de la invasión de los vasos sanguíneos concomitante a una formación deteriorada del hueso trabecular y a la expansión de la zona de condrocitos hipertróficos en placas de crecimiento tibial en ratones (Adachi y col., 2009).

Por otro lado, se sabe también que las células mesenquimales producen PGE₁ y PGE₂ junto con otros metabolitos araquidonatos durante su diferenciación (Boskey y col., 1996), lo que junto a los otros antecedentes presentados en los párrafos anteriores, permite hipotetizar que dado que las PGs regulan la diferenciación de células mesenquimales en condrocitos y los procesos de mineralización, los análogos químicos de estas PGs, como el misoprostol, tendrían los mismos efectos sobre la diferenciación y la mineralización.

II. HIPÓTESIS

Existe evidencia que las prostaglandinas de la serie E participan en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales. Misoprostol es un análogo sintético de la PGE₁, por lo tanto promueve la diferenciación *in vitro* de células mesenquimales a condrocitos.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de misoprostol sobre la proliferación y diferenciación a condrocitos *in vitro* de células mesenquimales de primordios de extremidades en modelo de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de misoprostol sobre la viabilidad de células mesenquimales en cultivo *in vitro*, mediante la captación celular de rojo neutro.

Determinar el efecto de misoprostol sobre la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, mediante la tinción con azul alciano de los GAGs.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Los procedimientos que emplearon animales de experimentación, contaron con previa aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (anexo 1).

El procedimiento utilizado se basó en el protocolo INVITTOX n° 22 (método de Brown, 2010), que corresponde al test de micromasa para evaluar embriotoxicidad a través de la proliferación y diferenciación de células mesenquimales a condrocitos.

La recolección de primordios de extremidades se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Desarrollo de la Universidad de Valparaíso y el cultivo celular se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Células Animales de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Animales de experimentación

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

Apareamiento

Se cruzaron ratas adultas de entre 8 a 12 semanas de edad, 3 hembras por macho a las 18:00 horas. El día de gestación (DG) 0,5 fue determinado por presencia de espermatozoides en el frotis vaginal realizado la mañana siguiente a la cruce.

Recolección de embriones

La hembra fue eutanizada en el DG 13,5 mediante dislocación cervical, previa anestesia con éter etílico (Equilab, N° CAS 60-29-7) y sometida a cesárea para la recolección de embriones, los que fueron transferidos a una placa Petri con solución salina de Hank's (CaCl₂, NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, glucosa, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄) previamente esterilizada y a 4 °C. En la solución salina, se procedió a remover los primordios de extremidades (PE) superiores e inferiores con una tijera microquirúrgica, con un corte único lo más cercano a los flancos del embrión, los cuales fueron transportados al Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, en tubos desechables de 15 mL con solución salina de Hank's a 4°C para conservar el tejido.

Preparación de la suspensión celular

Se removió el excedente de solución salina de Hank's con una micropipeta de 1000µL. Luego se agregó la tripsina al 0,5 % en CMF (buffer salino sin calcio y magnesio, 4 mL por cada 80 primordios) y se homogenizó con una pipeta plástica desechable de 5 mL para que el tejido tomara contacto con la enzima, para posteriormente incubar durante 20 minutos a 37°C en incubador de atmósfera controlada (5% CO₂ y 95% de humedad). Para detener la acción de la tripsina, se agregaron 2 mL de medio de cultivo al tubo de 15mL (DMEM F-12 con 10 % de suero fetal bovino) y se llevó a centrifugación para precipitar el tejido, durante 4 minutos a 1600 rpm. Este procedimiento se repitió dos veces.

Luego, por cada primordio extraído se añadieron 10 µL de medio de cultivo, y se homogenizó para romper definitivamente el tejido y obtener una suspensión celular. La

suspensión obtenida, fue transferida a una jeringa de 5 mL. Se registró el volumen obtenido y luego se pasó por una malla de nylon de 10 μm . Este paso permitió asegurar la obtención de una muestra que contuviera sólo células, la cual fue recolectada en un tubo eppendorf estéril de 2 mL.

Sembrado de células mesenquimales

Se tomaron 10 μL de la suspensión obtenida anteriormente con una micropipeta y se hizo una dilución 20x con 190 μL de DMEM F-12 (Sigma, N° 6760) sin suero fetal bovino. Se homogenizó y se procedió a contar el número de células con un contador manual, mediante el uso de cámara de Neubauer y tinción con azul de tripán al 0,2% (75 μL de suspensión celular + 75 μL de colorante), bajo un microscopio óptico, para visualizar el conteo. En una primera fase, se procedió a sembrar distintas densidades de células con el fin de determinar densidad celular óptima, que para las condiciones experimentales, se ajustó a 2×10^5 células/mL por cada primordio.

Una vez ajustado el número de células, la suspensión obtenida fue sembrada en una placa de 96 pocillos (Falcon N° 353072) pretratada con poliestireno para facilitar la adhesión celular, asegurando la siembra en el centro del pocillo con un volumen constante para lograr que el número de células fuese lo más consistente posible. Posteriormente se incubó la placa durante 3 horas a 37°C, para asegurar la adhesión celular a la placa. Transcurrido el tiempo de espera, se agregó a cada pocillo 200 μL de medio de cultivo con las concentraciones de misoprostol a estudiar, según el orden de sembrado mostrado en la figura 11. Luego se llevó la placa con células adheridas a

incubación por 5 días a 37°C en incubador de atmósfera controlada (5% CO₂ y 95% de humedad). Los pocillos ubicados en la orilla de la placa, sólo contuvieron medio de cultivo y no fueron cuantificados por una posible evaporación de la muestra durante la incubación. El experimento se repitió por triplicado.

b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	CM	CV	C1	C2	C3	C4					b
b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 11. Orden de sembrado en la placa de 96 platos con suspensiones tratadas. PE control medio de cultivo (CM); PE control solvente (CV); PE con 20 pg/mL (C1); PE con 200pg/mL de misoprostol (C2); PE con 2.000 pg/mL de misoprostol (C3); PE con 20.000 pg/mL de misoprostol (C4). Sólo se sembró medio de cultivo en las orillas de la placa (b).

Controles positivos y negativos

Para asegurar la calidad del ensayo de micromasa, se cultivaron las células en presencia de dos sustancias químicas de referencia: como control negativo se utilizó una solución de penicilina-G sódica a una concentración de 500 µg /mL de medio, mientras que como control positivo se utilizó 5-fluorouracilo (5-FU) en diluciones seriadas de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 15,625 ng/mL. El orden de sembrado de cada dilución fue realizado según se muestra en la figura 12.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	CM	P	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CM	b
b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 12. Orden de sembrado en la placa de 96 platos con control positivo y negativo. Penicilina-G sódica 500 ug/mL (P); 5-fluorouracilo 1.000 ng/mL (C1), 500 ng/mL (C2), 250 ng/mL (C3), 125 ng/mL (C4), 62,5 ng/mL (C5), 31,25 ng/mL (C6), 15,625 ng/mL (C7); medio de cultivo control (CM). Sólo se sembró medio de cultivo en la las orillas de la placa (b).

Evaluación final

Medición del porcentaje de viabilidad:

Al término del cultivo, se procedió a remover el medio sobrante de las placas. Luego de esto, se añadieron 200 µL/pocillo de solución de rojo neutro al 0,005% en medio de cultivo a 37°C, previamente incubado por 24 horas. Una vez agregado a la placa se incubó durante 2 a 3 horas a 37°C.

Finalizado el tiempo de captación celular de rojo neutro por los lisosomas de las células viables, se removió el excedente, se lavó tres veces con suero fisiológico y se añadió 200 µL/pocillo de formol calcio, durante 1 minuto, con objeto de fijar las células. Después de este proceso, se removió el excedente y se añadió 200 µL/pocillo de alcohol ácido para eluir el rojo neutro captado por los lisosomas de las células. Se procedió a

colocar la placa durante 30 a 60 minutos en una placa rotatoria, para facilitar la elusión y finalmente se leyó la absorbancia de la solución en un lector de Elisa a 562 nm. Se registraron los resultados obtenidos. Posteriormente se determinó el porcentaje de viabilidad en relación al control (células mesenquimales sólo con medio de cultivo).

Medición del número de células diferenciadas:

Una vez leídas las absorbancias de los pocillos con elusión de rojo neutro, se procedió a remover el excedente de alcohol ácido con el colorante eluido y se lavó tres veces la placa con suero fisiológico. Posteriormente se agregó 200 μL /pocillo de azul alciano al 1% en HCl 0,1 N y se dejó reposar durante toda la noche en la incubadora con objeto de teñir los GAGs liberados a la matriz.

En la mañana siguiente se removió el exceso de azul alciano y nuevamente se lavó la placa tres veces con solución salina y luego se agregó 200 μL /pocillo de clorhidrato de guanidina 6M, con el fin de eluir el azul alciano que tiñe los glucosaminoglicanos (GAG) generados producto de la diferenciación de las células mesenquimales a condrocitos. Se dejó durante la noche la placa con el eluyente a 37 °C y a la mañana siguiente se leyó la absorbancia de los pocillos a 630 nm en un lector de Elisa, para luego hacer un registro de los resultados. Finalmente se determinó el porcentaje de diferenciación en relación al control.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 5.0.

Optimización del número de células

Las figuras 13, 14, 15, 16 y 17 obtenidas mediante una cámara digital comercial muestran imágenes representativas de distintos cultivos en los que se sembraron distintas densidades de células (2×10^7 /mL, 2×10^6 /mL, 2×10^5 /mL, 8×10^4 /mL y 2×10^4 /mL) para la optimización del número de células a sembrar. En el caso de los cultivos realizados con un número inicial de células alto (10^7) se observó la presencia de aglomerados celulares, en donde no se podía distinguir entre una célula y otra. Lo mismo ocurrió con el número inicial de células (10^6), pero en menor grado. Como se aprecia en la figura 15, al sembrar 2×10^5 células/mL, al finalizar el cultivo se puede identificar claramente una célula de otra, favoreciendo la formación de una monocapa, es decir es la densidad óptima para sembrar en cultivo de micromasa. Por el contrario, al sembrar pequeñas concentraciones celulares (10^4), la expansión no se concreta hacia el centro del pocillo, como se observa en la figura 16 y 17.

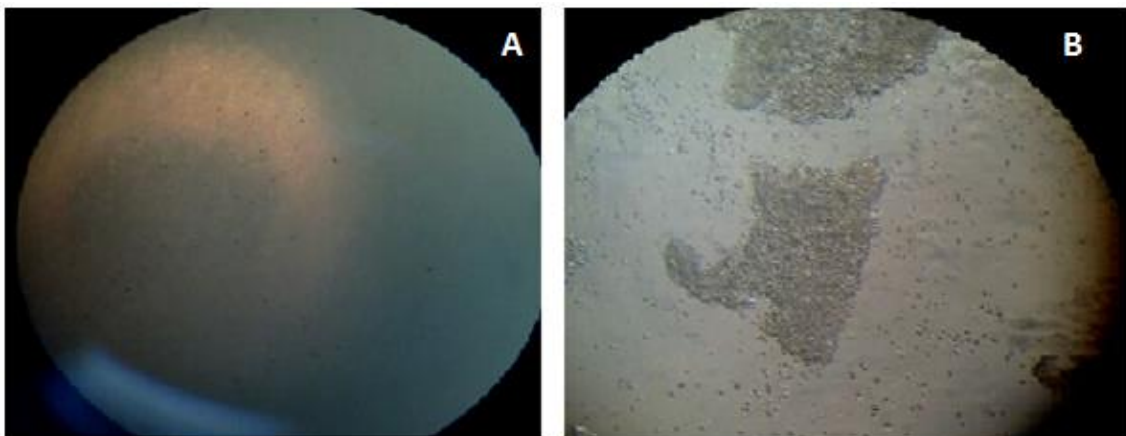


Figura 13. Siembra con densidad inicial 2×10^7 células/mL. Al cabo de 5 días se puede observar agregación celular. A) Se puede apreciar sólo una masa celular. B) Agregación en forma de racimos.



Figura 14. Siembra con densidad inicial 2×10^6 células/mL. Al cabo de 5 días se puede observar agregación celular, en menor grado que la concentración anterior. No se distingue una célula de otra.

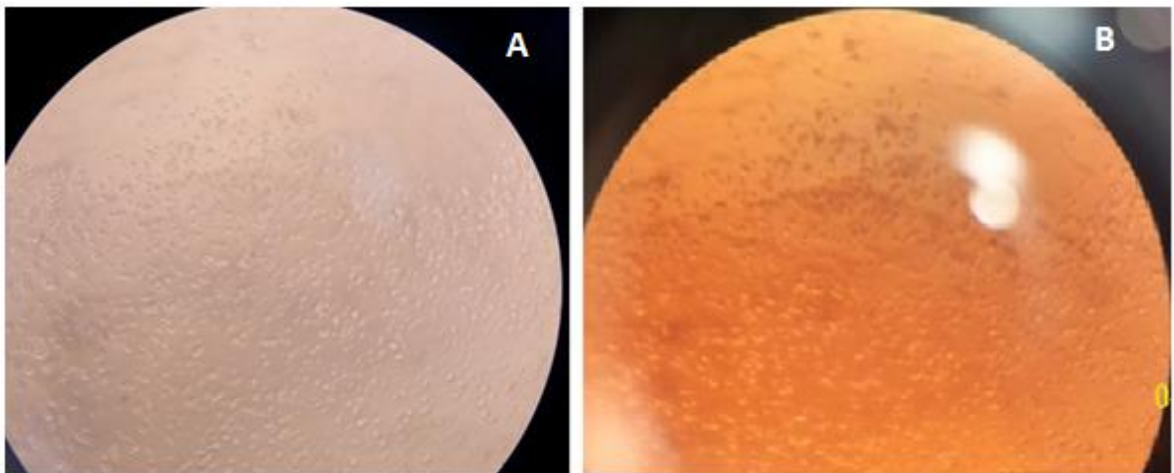


Figura 15. Siembra con densidad inicial 2×10^5 células/mL. Al cabo de 5 días se puede observar formación de monocapa celular. En A y B se logra distinguir entre una célula y otra.

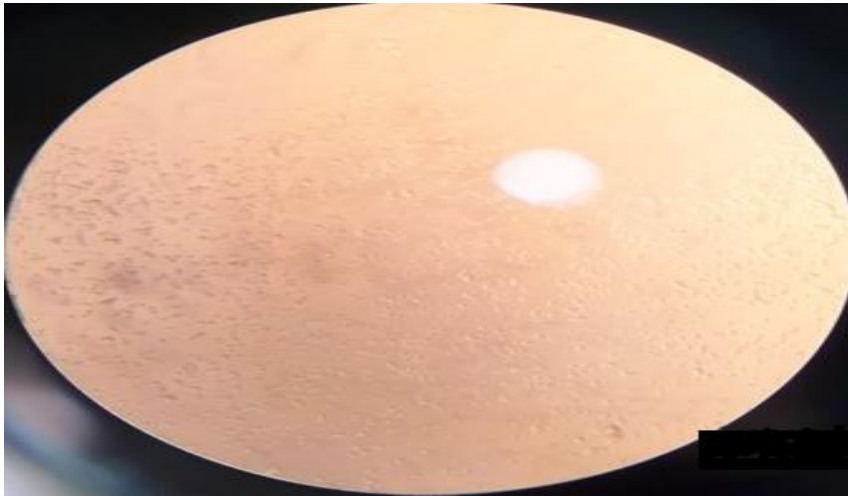


Figura 16. Siembra con densidad inicial 8×10^4 células/mL. Al cabo de 5 días se puede observar formación de monocapa celular, en menor grado que 2×10^5 .

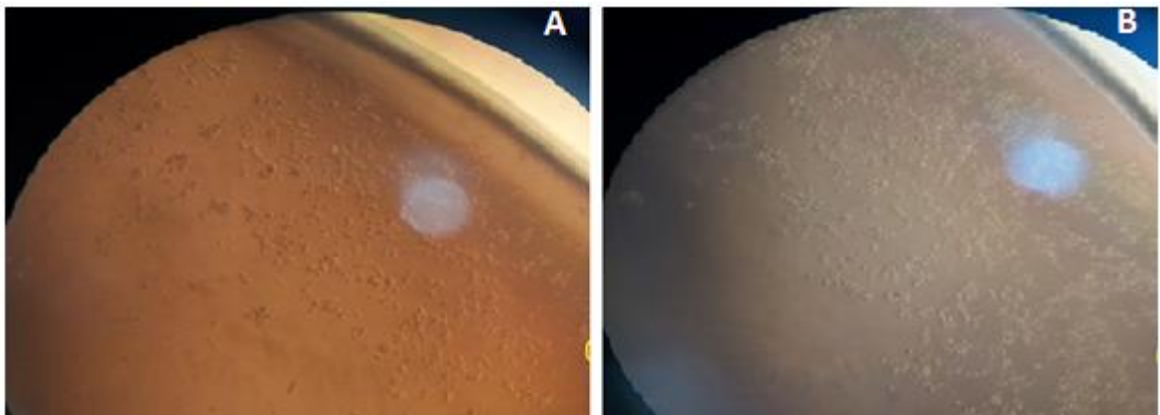


Figura 17. Siembra con densidad inicial 2×10^4 células/mL. Al cabo de 5 días se puede observar formación de monocapa celular. Como se observa en A y B las células no proliferan al centro del pocillo, sólo quedan adheridas en la periferia.

Control positivo y negativo

Control negativo:

Los cultivos realizados en presencia de penicilina-G como control negativo, no demostraron diferencias con los cultivos de células que contenían sólo medio, encontrándose un porcentaje de viabilidad de $93 \pm 8,2$ y un porcentaje de diferenciación de $103 \pm 10,3$ en relación a la viabilidad y diferenciación de células cultivadas sólo en presencia de suero, respectivamente. La literatura reporta que el control negativo no debe diferir de las células cultivadas en $\pm 10\%$ del control (Minta, 2003).

Control positivo:

En el caso de los ensayos en los que se utilizó 5-fluorouracilo como control positivo, tanto la viabilidad como la diferenciación de los condrocitos fue afectada por el antimetabolito (figura 18 y tablas 5 y 6). Es evidente la menor captación de rojo neutro en aquellas células cultivadas en presencia del 5-FU, lo cual se observó de manera concentración-dependiente (tabla 5, $p=0,0006$). Esta Disminución de la viabilidad, conlleva directamente a que la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, se vea afectada por concentraciones crecientes de 5-FU (tabla 6, $p= 0,0160$).

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con 5-fluorouracilo en relación a células cultivadas sólo en presencia de medio de cultivo.

Concentración (ng/mL)	0	15,625 C7	31,25 C6	62,5 C5	125 C4	250 C3	500 C2	1000 C1
Porcentaje (Media \pm error estándar)	100	97 \pm 13	96 \pm 13	89 \pm 14	86 \pm 20	46 \pm 13	21 \pm 5*	13 \pm 3**

* y **diferencias con el control estadísticamente significativas, ($p<0,05$).

Tabla 6. Porcentaje de diferenciación de células tratadas con 5-fluorouracilo en relación a células cultivadas sólo en presencia de medio de cultivo.

Concentración (ng/mL)	0	15,625 C7	31,25 C6	62,5 C5	125 C4	250 C3	500 C2	1000 C1
Porcentaje (Media ± error estándar)	100	97±7	93±7	92±6	89±5	84±1	75±6	62±2*

*diferencia con el control estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

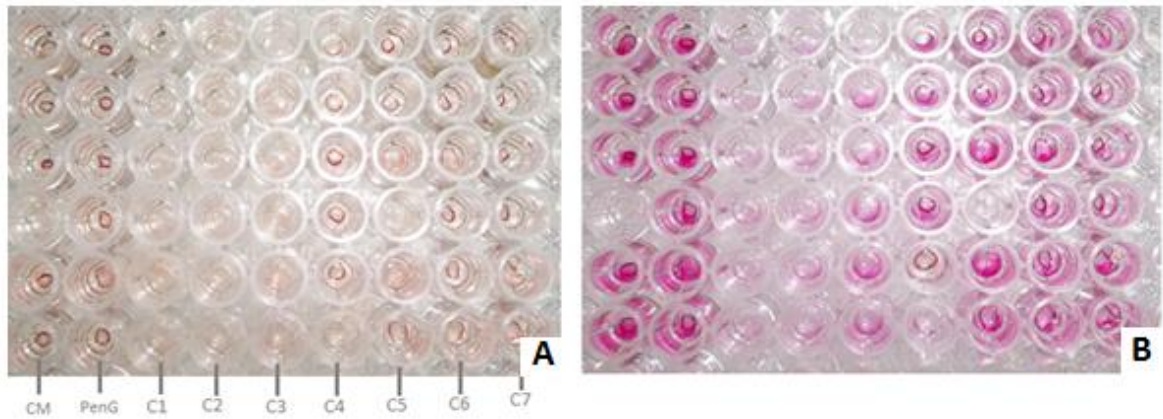


Figura 18. A) Se observa captación de rojo neutro por las células cultivadas de manera concentración-dependiente por el 5-fluorouracilo. B) Elución de rojo neutro con alcohol ácido.

Efecto de misoprostol sobre células mesenquimales

Los ensayos cultivados en presencia de misoprostol, tuvieron algún grado de efectos tanto sobre la viabilidad como sobre la diferenciación a condrocitos, pero sin significancia estadística (tablas 7 y 8). En la figura 19 se puede observar la captación de rojo neutro por las células viables. Claramente no se aprecia diferencias entre un tratamiento y otro.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con misoprostol en relación a células cultivadas sólo en presencia de medio de cultivo

Concentración (pg/mL)	0	20 C1	200 C2	2.000 C3	20.000 C4
Porcentaje (Media ± error estándar)	100±0	102±1	115±4	120±11	129±15

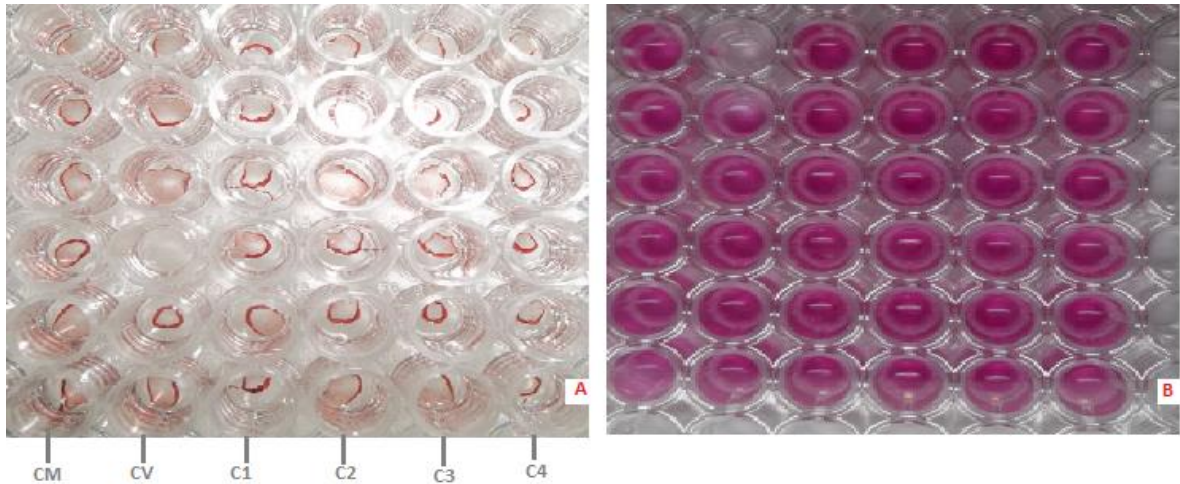


Figura 19. A) Se observa captación de rojo neutro por las células cultivadas en presencia de medio de cultivo, solvente, y concentraciones crecientes de misoprostol. B) Elución de rojo neutro con alcohol ácido.

Tabla 8. Porcentaje de diferenciación de células tratadas con misoprostol en relación a células cultivadas sólo en presencia de medio de cultivo.

Concentración (pg/mL)	0	20 C1	200 C2	2.000 C3	20.000 C4
Porcentaje (Media ± error estándar)	100±0	103±1	110±3	106±3	109±6

Misoprostol es un fármaco reconocido por inducir abortos y malformaciones congénitas cuando hay exposición *in utero* a la droga. Existen pocos estudios en la literatura que reporten efectos *in vivo* sobre la toxicidad en animales de experimentación. Por ejemplo, la fetotoxicidad y la teratogenicidad en ratas a dosis orales de hasta 10.000 µg/Kg o en conejos en dosis de hasta 1.000 µg/Kg fueron negativos, aunque se observaron resorciones en un conejo y en una rata (Kotsonis, 1985). En otro estudio tampoco se encontró evidencia de embriotoxicidad a 20 mg/Kg cuando el medicamento se administró a ratonas preñadas en el DG 10 (Paumgarten y col., 1995 y Petrere y col., 1984). Tampoco encontraron efectos teratogénicos cuando administraron misoprostol por vía intravaginal en dosis de 12,5 y 250 µg/Kg a conejos.

Por otro lado, Marks y col., (1987), evaluaron la teratogenicidad de alprostadil (PGE₁) en ratas a las que administraron dosis de 2 y 6 mg/Kg por vía subcutánea e intravenosa y observaron en los fetos hidrocefalia, anoftalmia y microftalmia. Por último Naeem y col., (2011), administraron 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 y 0,1 µg/g de misoprostol a ratonas vía oral en los días 8, 10 y 12 de gestación. Se observó efecto teratogénico de misoprostol sobre los fetos de manera dosis-dependiente.

Contradictoriamente, intentos por establecer un modelo *in vivo* en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso no fueron exitosos, no observándose ningún tipo de defectos en embriones de rata a cuyas madres se administró hasta 10 mg/kg de peso vía oral en los días de gestación 9 y 10 no indujeron teratogenicidad (observaciones personales, datos no publicados). Esta falta de actividad teratogénica en animales de

experimentación es llamativa y se opone marcadamente a la situación observada en humanos, pudiendo deberse a que los modelos utilizados no sean los adecuados. De hecho, Steinetz y col., (1976) establecieron que la rata es menos sensible que los humanos a los efectos abortivos de las prostaglandinas.

En la búsqueda de modelos de estudio para la teratogenicidad del misoprostol, en este laboratorio, se montó un modelo *in vitro* y se observó que el medicamento efectivamente induce toxicidad cuando se cultivan embriones de rata en presencia del medicamento. Los defectos observados incluyeron alteraciones en la viabilidad y funcionalidad embrionaria (pobre desarrollo vascular y sobrevivencia, entre otros) y morfometría (alteraciones en barras braquiales, corazón, porciones cefálicas del tubo neural, entre otros) siendo indicativos de la capacidad del medicamento de inducir no sólo retraso del desarrollo sino que una alteración de este. En otras palabras, estos resultados permiten proponer, que además del mecanismo indirecto de inducción de hipoxia embrionaria, el misoprostol puede también actuar directamente sobre el embrión para ejercer su toxicidad (Campos y Cavieres, 2011).

Continuando en esa línea, en esta tesis se utilizó un ensayo *in vitro* de embriotoxicidad para contribuir al estudio del mecanismo de acción del misoprostol, considerando que los ensayos *in vitro* permiten elucidar mecanismos de desarrollo embrionario normal y anormal y que por otro lado facilitan el screening de sustancias con potencial teratogénico (Harris, 1997). Estos modelos tienen ventaja en la capacidad de controlar las condiciones ambientales y la exposición directa a los tóxicos de manera que

los efectos específicos sobre el crecimiento celular, la diferenciación y la morfología se pueden evaluar directamente en las células que han conservado un grado de pluripotencia (Harris, 1997).

El ensayo de micromasa empleado en esta tesis es una técnica relativamente simple, requiere poco tiempo y utiliza menos animales que en estudios de teratogenicidad *in vivo*, es decir sigue la “regla de las tres erres”, la cual consiste en permitir el **Reemplazo** de animales de experimentación en la evaluación de toxicidad, facilitar la **Reducción** del número de animales empleados e incorporar un **Refinamiento** del diseño de estudio para disminuir el estrés sobre el animal (Zúñiga y col., 2001). La técnica permite reproducir la histogénesis del cartílago y es sensitiva para teratógenos que perturban el proceso normal de diferenciación (Minta y col., 2007).

Tal como es el caso de cualquier actividad experimental, siempre debe tenerse presente la realización de un control de calidad interno, para asegurar el resultado del experimento a través del monitoreo de equipos, reactivos y operador, permitiendo detectar objetivamente alteraciones o tendencias en los resultados. Para esta tesis se utilizaron controles (-) y (+) de penicilina (500µg/mL) y 5-fluorouracilo (1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL, 15,625 ng/mL), respectivamente. Los resultados observados son concluyentes, dado que las células cultivadas durante cinco días expuestas al control (+) demostraron una reducción concentración-dependiente tanto en la viabilidad como en la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos (figura 18, tabla 5 y 6). Esto se debe a que 5-fluorouracilo es

un compuesto altamente embriotóxico y citotóxico, ya que es un potente antimetabolito que inhibe la síntesis de ADN y por ende impide el crecimiento celular. Estos efectos son más visibles a 1000 ng/mL, 500 ng/mL y 250 ng/mL y concordantes con un estudio realizado por Minta, 2003.

Por el contrario, con respecto al control (-) se observó una proliferación y diferenciación completamente normal, es decir porcentajes que no demostraron una variación mayor al 10 % en relación al control. Esto se debe a que la penicilina no es una sustancia citotóxica para células eucarióticas.

Con respecto a la hipótesis, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación en relación al efecto de misoprostol sobre células mesenquimales de primordios de extremidades de rata, permiten dilucidar que el medicamento tiende marginalmente a aumentar la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales a condrocitos como se puede observar en la tabla 7 y 8. Sin embargo este efecto no es estadísticamente significativo ($p < 0,05$), por tanto no se podría relacionar esta acción de la droga con el mecanismo de acción que genera la artrogriposis.

Lo anterior, podría deberse a que misoprostol posee menor potencia que PGE_1 y PGE_2 (Boskey y col., 1996; Ungrin y col., 2001; Aoyama y col., 2005) sobre la proliferación y diferenciación en cultivo de micromasa. Los datos obtenidos en esta tesis concuerdan con un estudio realizado por Boskey y col., (1996), en donde concentraciones aún mayores de misoprostol no afectaron la diferenciación de células mesenquimales de pollo (figura 20).

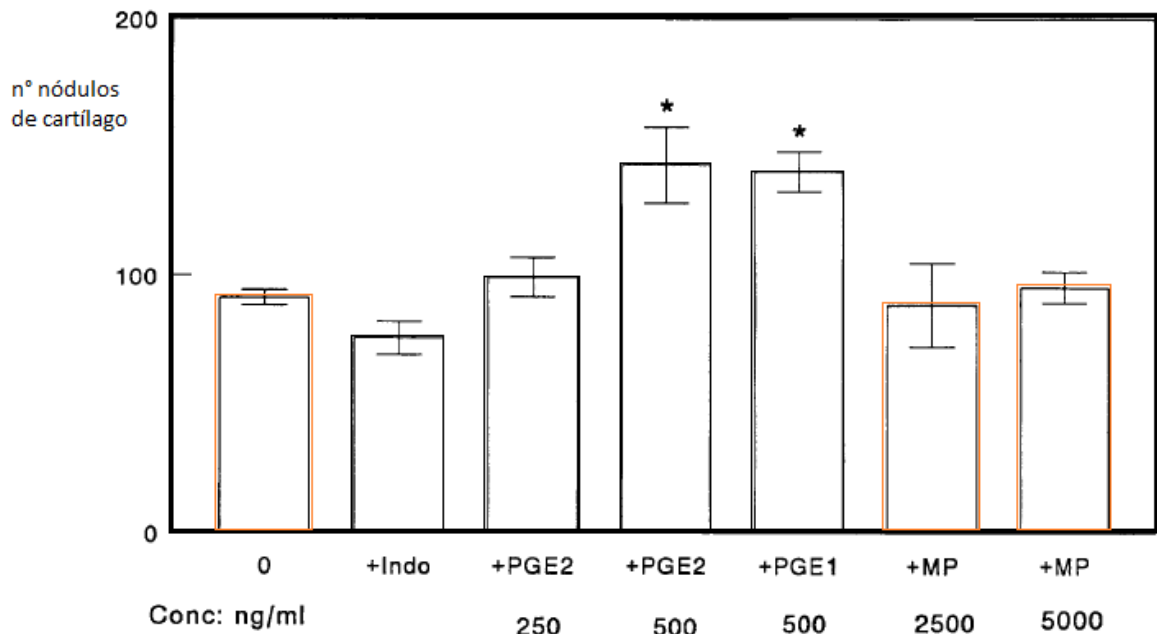


Figura 20. PGE₁ y PGE₂ favorecen la diferenciación, visualizada mediante el número de nódulos positivos de azul alciano. Nótese que misoprostol no posee efecto y sus valores se acercan a lo observado en el control (modificado de Boskey y col., 1996).

Los procesos de proliferación y diferenciación están directamente relacionados con el aumento de AMP_c que generan las PGs y sus análogos al inducir a la enzima adenilato ciclasa (Boskey y col., 1996). Misoprostol actúa sobre dos receptores (EP₂ y EP₃) que poseen efecto antagónico en la modulación de la actividad de la enzima mencionada (Méndez, 2005). Por un lado EP₂ está acoplado a proteína G_s generando un aumento de AMP_c, mientras que EP₃ está acoplado a proteínas G_i que induce una inhibición de la enzima y por tanto disminución de los niveles de AMP_c. Este efecto antagónico justifica el menor grado de acción sobre los cultivos de células mesenquimales de extremidades aisladas de pollo en un estudio realizado por Boskey y col, (1996) y en esta tesis.

Por otro lado estos mismos autores demuestran en su análisis que las PGs de la serie E pueden estimular la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, pero

que no tienen efecto en la mineralización, y en un cultivo de 5 días sólo se puede determinar proliferación y diferenciación inicial. Si se quisiera hacer un estudio más detallado acerca del efecto de las PGs sobre el desarrollo óseo se debería concretar un cultivo de 21 días (Zhang y col., 2004), en donde se visualizaría el proceso completo: diferenciación inicial (1-5 días), producción de matriz (5-11 días), hipertrofia de los condrocitos (a partir del día 9 de cultivo), diferenciación terminal y calcificación de la matriz (15 - 21 días de cultivo).

Por otro lado un estudio realizado por Brochhausen y col., (2006), determinó que la proliferación de condrocitos en la placa de crecimiento está dominada por el receptor EP₁, mientras que el receptor EP₂ posee un rol más significativo a nivel de los condrocitos articulares. Es por esto que quizás misoprostol no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el cultivo, ya que éste reproduce lo que ocurre en la placa de crecimiento. Siguiendo esta misma línea Aoyama y col., (2005), mediante un análisis RT-PCR dieron a conocer que el principal receptor expresado en los condrocitos articulares humanos es el EP₂.

El leve efecto de misoprostol observado sobre la diferenciación a condrocitos, puede ser que al generar un aumento en la proliferación de células mesenquimales, exista por consecuencia una tendencia a aumentar la densidad de GAGs liberados por la matriz.

Los resultados obtenidos en relación a la tinción con azul alciano, son concordantes con lo establecido por Clark y col., (2005), que establece que en los cultivos de micromasa a corto plazo, hay pocos efectos sobre la condrogénesis, proceso que se visualiza mejor

después de 14 días de cultivo. Estos autores, junto a O'keefe y col., (1992), demostraron que las prostaglandinas estimulan la proliferación de los condrocitos del cartílago de crecimiento y la incorporación de sulfato, pero disminuyen considerablemente la maduración y calcificación de la matriz, al inhibir col X, AP, OC y MMP13 en la placa de crecimiento, es decir procesos que tampoco se podrían haber visualizado en este estudio.

Los resultados obtenidos sobre la proliferación y diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, no aportan a la dilucidación del mecanismo de acción por el cual el misoprostol genera embriotoxicidad directa. Se necesitan otros estudios para explicar el mecanismo que genera afecciones en las extremidades de infantes expuestos *in utero* al medicamento. Ante esta situación se puede postular una nueva hipótesis, relacionada al efecto de misoprostol sobre las articulaciones en niños con artrogriposis, debido a que las causas de esta malformación congénita son variadas (figura 8). La patología se caracteriza porque las articulaciones quedan sin movimiento, producto de fibrosis musculares en las distintas partes del cuerpo, engrosamiento de las cápsulas articulares y acortamiento de los ligamentos.

Recientemente, Park y col., (2012), determinaron que citoquinas inflamatorias inducen fibrosis y calcificación de células del ligamento amarillo humano, principalmente IL₆. Por otro lado, Adachi y col., (2009), señalan que la PGE₁ induce la síntesis de este agente proinflamatorio (IL₆) al activar a Rho-quinasa vía EP₂. Considerando que EP₂ ha sido identificado como un receptor dominante en condrocitos articulares humanos (Aoyama y col., 2005; Brochhausen y col., 2006) se podría hipotetizar que la inducción de

artrogriposis por misoprostol pudiera deberse a un mecanismo inflamatorio en el que intervienen mediadores de la inflamación.

VII. Conclusiones

El misoprostol induce la viabilidad de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata en cultivo *in vitro*, pero el efecto no es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

El misoprostol induce muy levemente la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, pero el efecto no es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

No se puede explicar el efecto de misoprostol sobre la osificación endocondral a través de un efecto sobre la diferenciación de células mesenquimáticas a condrocitos.

VIII. Bibliografía

Adachi S, Tokuda H, Matsushima R, Kato K, Natsume H, Minamitane C. 2009. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E₁- stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC 3T3-E₁ cells. *Prostaglandin Other Lipid Mediat.* 90:1-6.

Aguila A, Nazer J. 1999. Las anomalías congénitas como causa de muerte en el primer año de vida en Chile. *Rev Hosp Clín U Chile.* 10(3): 244-7.

Aoyama T, Liang B, Okamoto K, Matsusaki T, Nishijo K, Ishibe T. 2005. PGE₂ signal through EP₂ promotes the growth of articular chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 20:377-89.

Bamshad M, Van Heest A, Pleasure D. 2009. Arthrogyposis: A review and update. *J Bone Joint Surg Am.* 4:40-6

Boskey A, Stiner D, Doty S, 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.

Bos-Thompson MA, Hillaire-Buys D, Roux C, Faillie JL, Amram D. 2008. Möbius Syndrome in a Neonate After Mifepristone and Misoprostol Elective Abortion Failure. *The Annals of Pharmacotherapy.* 42:888-92.

Brochhausen C, Neuland P, Klaus J. 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.* 8:1278.

Brown N. 2010. The micromass test-Method of Brown. *Protocolo Invitox nº 122. ECVAM DBALM.*

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

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

Cavieres MF. 2004. Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos. Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. *Rev Med Chile.* 132: 873-879.

Capilla MC. 2005. Eficacia y seguridad de misoprostol en obstetricia. *Farm Hosp.* 29(3): 177-184.

Chong YS, Su LL, Arulkumaran S. 2004. Misoprostol: a quarter century of use, abuse, and creative misuse. *Obstet Gynecol Surv.* 59:128-40.

Clark C, Schwars E, Zhang X, Ziran N, Drissi H, O'Keefe R, Zuscik M. 2005. Differential regulation of EP receptor isoforms during chondrogenesis and chondrocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 764-766.

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

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Brown N, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. 2002. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern Lab Anim.* 30(2): 151-76.

González CH, Marques-Dias MJ, Kim CA, Sugayama SMM, Da-Paz JA, Huson SM. 1998. Congenital abnormalities in brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet.* 351: 1624-7

Gruber H, Hoelscher G, Loeffler B, Chow Y, Ingram J, Halligan W, Hanley E. 2009. Prostaglandin E₁ and misoprostol increase epidermal growth factor production in 3D-cultured human annulus cells. *Spine J.* 9:760-766.

Harris C. 1997. In vitro methods for the study of mechanisms of developmental toxicity. En: Hood RD, ed. *Handbook of developmental toxicology.* pp 465-510.

Hemmerling A. 2006. The safety of misoprostol. *Intern J Gynecol Obstet.* 94:S149-50.

Hib J. 1999. *Embriología médica.* 7ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de Chile Ltda, Santiago de Chile.

Hofmeyr GJ, Milos O, Nikodem NC, de-Jager M. 1998. Limb reduction anomaly after failed misoprostol abortion. *SAMJ.* 88: 566-7.

Klein DC, Raisz LG. 1970. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology.* 86:1436–1440.

Kotsonis FN, Dodd DC, Regnier B, Kohn FE. 1985. Preclinical toxicology profile of misoprostol. *Dig Dis Sci* 1985; 30(Suppl): 142S-146S.

Los FJ, Brandenburg H, Niermeijer MF. 1996. Vascular disruptive syndromes after exposure to misoprostol or chorionic villus sampling. *The Lancet.* 353: 843-4.

Malemud C, Sokoloff L. 1977. The effect of prostaglandins on cultured lapine articular chondrocytes. *Prostaglandins* 13:845-860.

Marks TA, Morris DF, Weeks JR. 1987. Developmental toxicity of alprostadil in rats after subcutaneous administration or intravenous infusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 341-357.

Méndez D. 2005. Misoprostol: la prostaglandina más usada y aceptada en obstetricia. *Medisan.* 9 (2).

Minta M. 2003. Identification of teratogens in cell culture. II Laboratory values of rat embryo midbrain studied by micromass test with penicillin G and 5-fluorouracil. Bull Vet Inst Pulawy. 47: 533-540.

Minta M, Wilk I, Zmudzki J. 2005. Cadmium and selenium: effect on proliferation and differentiation in hamster embryo cell culture. Bull Vet Inst Pulawy. 49: 329-335.

Minta M, Wilk I. 2007. Effects of malachite Green and its major metabolite, leucomalachite Green, in micromass cultures of rat embryonic cells. Bull Vet Inst Pulawy. 51: 695-700.

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

Naeem K, Ahmad N. 2011. Embryotoxicity of orally administered misoprostol to pregnant mice. Pakistan J Zool. 43(3):511-521.

Nazer J, Cifuentes H. 2011. Malformaciones congénitas en Chile y Latino América: Una visión epidemiológica del ECLAMC del período 1995-2008. Rev Med Chile. 139:72-78.

O'Keefe R, Crabb I, Puzas J, Rosier R. 1992. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. J Bone Min Res. 4:397-404.

Orioli I, Castilla E. 2000. Epidemiological assessment of misoprostol teratogenicity. Br J Obstet Gynaecol. 107:519-523.

Osorio A, Rodríguez JG, Pizarro O, Paredes A, Aguilera S. 2007. Embriopatías asociadas al uso de misoprostol. Rev Chil Obstet Ginecol. 72:346-351.

Park J, Lee B, Kang Y, Kim T, Yoon J, Kim H, Kwon U, Lee K, Lee H, Moon S. 2012. Inflammatory Cytokines Induce Fibrosis and Ossification of Human Ligamentum Flavum Cells. J Spinal Disord Tech. En prensa.

Paumgarten FJR, Souza CAM, Carvalho RR, Chahoud I. 1995. Embryotoxic effects of misoprostol in the mouse. Braz J Med Biol Res. 28:355-61 (resumen).

Peña DA, Báez A, de Castro D, Baldonado CA, Balbuena A. 1994. Artrogriposis múltiple congénita: reporte de un caso. Rev Med Dom. 55(1): 58-60

Petrere J, Haumphrey RR, Sakowski R, Fitzgerald J. 1984. Teratology study with the synthetic prostaglandin ONO-802 given intravaginally to rabbits. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 4(2): 225-231. (Resumen).

Sadler TW. 2009. Langman: Embriología médica. 11ª ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Barcelona.

Sánchez O, Guerra D. 2003. Síndrome de Möebius: fetopatía por misoprostol. Reporte de un paciente. *Invest Clin.* 44: 147-53.

Staheli LT, Hall JG, Jaffe KM, Paholke DO. (eds). *Arthroriposis. A text Atlas.* Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

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

Stevens A. 1999. *Histología Humana.* 2º ed. Editorial Harcourt Brace de España S.A., Madrid.

Studer D, Millan C, Ozturk E, Maniura-Wever K, Zenobi-Wong M. 2012. Molecular and biophysical mechanism regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cells Mater* 24: 118-135.

Ungrin M, Carriere MC, Denis D, Lamontagne S, Sawyer N, Stocco R, Tremblay N, Metters K, Abramovitz M. 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.

Weinreb M, Grosskopf A, Shir N. 1999. The anabolic effect of PGE₂ in rat bone marrow cultures is mediated via the EP₄ receptor subtype. *Am J Physiol.* 276:E376-83.

Zhang X, Ziran N, Goater J, Schwarz E, Puzas J, Rosier R, Zuscik M, Drissi H, O'keefe R. 2004. Primary murine limb bud mesenchymal cells in long-term culture complete chondrocyte differentiation: TGF-β delays hypertrophy and PGE₂ inhibits terminal differentiation.

Zuñiga JM, TU JA, Milocco S, Piñeiro R. 2001. *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal.* Mc Graw Hill. Interamericana de España Madrid