



FACULTAD DE FARMACIA
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA

**DETERMINACION DEL EFECTO DE MISOPROSTOL *IN VITRO* SOBRE LA PROLIFERACION
DE CELULAS MESENQUIMALES DE PRIMORDIOS DE EXTREMIDADES DE RATA**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

ROSA PATRICIA DELGADO CASTRO

Director de Tesis: María Fernanda Cavieres, Ph.D.

Co-director de Tesis: Dra. Claudia Altamirano

2014

i. RESUMEN	3
ii. ABSTRACT	4
I. INTRODUCCION	5
Desarrollo embrionario.....	6
Osificación endocondral.....	7
Prostaglandinas y desarrollo óseo.....	9
Rol del receptor prostanoide EP3.....	13
Malformaciones congénitas	14
Misoprostol y malformaciones congénitas.....	16
Misoprostol y células mesenquimales	20
II. HIPOTESIS	21
III. OBJETIVOS	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Animales de experimentación.....	26
Recolección de primordios de extremidades.....	26
Suspensión celular	27
Siembra celular	28
Validación interna	28
Tratamiento de los cultivos	29
Viabilidad celular	29
Diferenciación celular	30
Proliferación celular	31
Análisis estadístico	32
V. RESULTADOS	33
Validación interna	34

Efecto de misoprostol sobre cultivos de micromasa	37
Efectos de L-798106 sobre cultivos de micromasa.....	42
VI. DISCUSION	47
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. REFERENCIAS	55
IX. ANEXOS	64

i. RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario ocurren dos procesos distintos de osificación según el tipo de hueso. Uno de estos procesos, la osificación endocondral permite el desarrollo de los huesos largos de las extremidades y procede mediante la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, los que luego proliferan, sufren hipertrofia y mineralización. El proceso es controlado, entre otros, por un conjunto de eicosanoides denominados prostaglandinas, cuyas acciones son mediadas por receptores acoplados a proteína G, dentro de los que se encuentra EP3. Misoprostol es un análogo sintético de prostaglandina E₁ que genera contracciones uterinas y dilatación cervical, por lo cual, en algunos países, tiene indicación médica para la interrupción del embarazo. Este medicamento es también teratogénico, pero se desconoce su mecanismo de acción. En un intento por dilucidarlo, en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso se determinó su efecto sobre cultivos de células mesenquimales de rata, observándose un aumento en la captación de rojo neutro por parte de las células expuestas a 20.000 pg/mL de misoprostol, lo que podría explicarse por un aumento en la viabilidad o en la proliferación celular. Siguiendo esta línea de investigación, en esta tesis se utilizó el ensayo de micromasa para determinar la proliferación, viabilidad y diferenciación de células mesenquimales cultivadas en concentraciones crecientes de misoprostol, evaluando además la participación del receptor EP3 en las respuestas inducidas por el medicamento, cultivando las células en presencia del antagonista L-798106. La evaluación se llevó a cabo utilizando tinción con rojo neutro, azul alciano y MTT, para evaluar viabilidad, diferenciación y proliferación, respectivamente. No se observó efectos de misoprostol sobre viabilidad o diferenciación, aunque sí se observó que el aumento en la captación de rojo neutro a una concentración de 20.000 pg/mL de misoprostol se debe a una mayor proliferación celular. Este efecto fue revertido por el uso del antagonista EP3. Sin embargo, este mecanismo no es relevante para explicar la teratogenicidad de la molécula, puesto que esta concentración se encuentra muy por encima de la concentración plasmática alcanzada por una mujer que ha ingerido misoprostol. Se concluye, por tanto, que el mecanismo teratogénico no estaría relacionado con el proceso de proliferación, viabilidad y diferenciación de células mesenquimales.

ii. ABSTRACT

According to type of bone, two different ossification processes occur during embryo development. Endochondral ossification is one of these processes and it allows the development of long bones of the limbs through the differentiation of mesenchymal cells into chondrocytes, which then proliferate and undergo hypertrophy and mineralization. This process is under control of a series of eicosanoids called prostaglandins, whose actions are mediated by G protein coupled receptors, including EP3. Misoprostol is a synthetic prostaglandin E₁ it induces uterine contractions and cervical dilation, and it is indicated in some countries for pregnancy interruption. This drug is also a teratogen, but its mechanism of action is unknown. Attempts to elucidate its mode of action at the Laboratory of Toxicology of the University of Valparaiso showed that 20.000 pg/mL misoprostol induced an increase in neutral red uptake on cultures of rat mesenchymal cells, an observation which could be explained by an increase in cell viability or proliferation. Following this line of research, here we use the micromass assay to determine proliferation, viability and differentiation of mesenchymal cells cultured in the presence of increasing concentrations of misoprostol. We also evaluate if the EP3 receptor is involved in these processes by culturing in the presence of the EP3 antagonist L-798106. Neutral red, alcian blue and MTT were used to evaluate viability, differentiation and proliferation, respectively. No misoprostol effects were seen on viability or differentiation, although the increase in neutral red uptake observed at 20,000 pg/mL misoprostol was determined to be due to an increase in cell proliferation, an effect that was reversed by the EP3 antagonist. However this mechanism is not relevant to explain the teratogenicity of the molecule, since this concentration is well above the plasma concentration reached in women who have taken misoprostol. In conclusion, the teratogenic mechanism of misoprostol may not be related to the process of proliferation, viability, and differentiation of mesenchymal cells.

Desarrollo Embrionario

El desarrollo embrionario de los vertebrados se inicia con la fecundación, proceso a través del cual los gametos masculino y femenino se fusionan originando el cigoto (fig. 1 A), el que posteriormente experimenta sucesivas divisiones mitóticas, aumentando rápidamente su número de células o blastómeros (fig. 1 B-E) (Moore, 2013). En el octavo día de desarrollo, el cigoto (ahora llamado blastocisto) sufre la segregación de sus células internas, dando origen a dos capas de células: hipoblasto y epiblasto, las que a su vez forman una estructura denominada disco germinativo bilaminar (fig. 1 F-G). En humanos, durante la tercera semana de gestación ocurre la gastrulación, durante la cual el disco embrionario bilaminar se convierte en un disco trilaminar constituido por tres capas germinativas: endodermo, mesodermo y ectodermo (fig. 1 H). Posteriormente, cada una de ellas dará origen a todos los tejidos y órganos del embrión (fig. 1-I-J) (Moore, 2013).

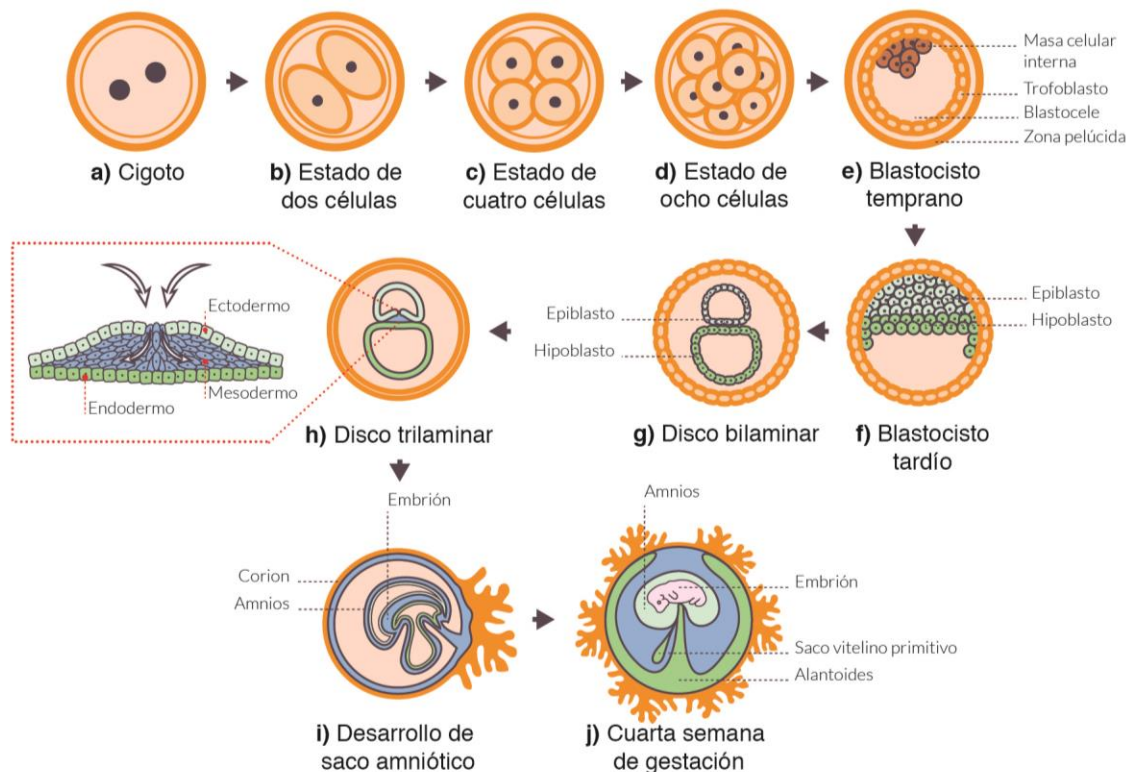


Figura 1. Desarrollo embrionario temprano en vertebrados (Ilustrado por Jaime Canet).

Alrededor de la cuarta semana, cuando el embrión está en estado de néurula, se pueden distinguir cuatro regiones en el mesodermo, que corresponden a cordamesodermo, mesodermo paraxial, mesodermo intermedio y lámina del mesodermo lateral (Gilbert, 2005). Específicamente, el mesodermo paraxial dará origen a las somitas, que corresponden a bloques de células mesodérmicas a ambos lados del tubo neural que producirán muchos de los tejidos conectivos del dorso. Por fuera de las somitas aparecen una serie de elevaciones a lo largo de la superficie dorsolateral del embrión; luego, cada somita se diferencia en tres partes, el esclerotoma -sus células forman las vértebras y costillas- el miotoma -sus células forman mioblastos- y el dermatoma -sus células forman fibroblastos- (Sadler, 2009; Moore, 2013).

Hacia el final de la cuarta semana las células del esclerotoma forman un tejido laxo denominado mesénquima (tejido conjuntivo embrionario) con capacidad para generar hueso. Dicha formación de tejido óseo puede proceder de dos mecanismos diferentes: la osificación endocondral, que da origen a huesos largos y la osificación intermembranosa, que da origen a huesos planos (Moore, 2013). Ambos tipos de osteogénesis incluyen la transformación del tejido mesenquimal preexistente en hueso (Gilbert, 2005).

Para los efectos de esta tesis nos centraremos en la osificación endocondral, ya que da origen a los huesos largos de las extremidades, las que son de interés en este estudio.

Osificación Endocondral

Los huesos largos tienen un cuerpo llamado diáfisis y dos extremos dilatados que reciben el nombre de epífisis -cuya superficie está cubierta de cartílago hialino- la porción que está entre la diáfisis y epífisis se denomina metáfisis (Ross, 2008). Su origen proviene de la osificación endocondral, proceso que depende de las células mesenquimales, las que bajo la influencia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) y distintas proteínas morfogénicas óseas (BMP), se condensan y proliferan en el sitio donde se encontrará el hueso.

Las células mesenquimales expresan inicialmente colágeno tipo II y luego se diferencian a condrocitos, los que producen matriz cartilaginosa y generan un molde de cartílago hialino con la forma del futuro hueso. Pronto, este molde experimenta crecimiento intersticial y por aposición, aumentando así su longitud y espesor. Luego, ocurre el primer signo de osificación, que consiste en la aparición de tejido óseo alrededor de la porción diafisiaria del hueso en desarrollo. Con esto, los condrocitos presentes en la región media del modelo cartilaginoso experimentan hipertrofia.

Conforme los condrocitos aumentan de tamaño, la matriz cartilaginosa que los rodea es resorbida por los osteoclastos, quienes eliminan el tejido óseo liberando minerales a la sangre y formando delgadas placas irregulares de cartílago entre las células hipertróficas. Además, los condrocitos comienzan a sintetizar fosfatasa alcalina (ALP) y, al mismo tiempo, la matriz cartilaginosa circundante se calcifica. La matriz calcificada impide la difusión de nutrientes y provoca de esta manera la muerte de los condrocitos. Por otro lado, su muerte permite el ingreso de vasos sanguíneos, los que traen células osteoprogenitoras que pronto se diferenciarán a osteoblastos y se unirán a la matriz cartilaginosa para depositar matriz ósea (fig. 2). Así, las primeras trabéculas óseas tienen un eje central de cartílago recubierto por hueso. En consecuencia, el hueso generado de esta manera se denomina hueso endocondral (Gilbert, 2005; Ross, 2008).

La combinación de tejido óseo con el cartílago calcificado subyacente forma estructuras denominadas espículas mixtas. Estas, persisten por un corto tiempo antes de que el componente cartilaginoso sea eliminado por completo. El componente óseo que perdura en la espícula continúa su crecimiento por aposición, aumenta de tamaño y se fortalece, o por el contrario sufre resorción a medida que se forman nuevas espículas.

De esta manera concluye la formación de hueso por el mecanismo de osificación endocondral, pero esto sólo es la etapa inicial, ya que luego continúa el crecimiento del hueso, proceso que se extenderá a lo largo de toda la vida intrauterina y seguirá durante la vida posnatal hasta que la persona se convierte en adulta (Ross, 2008). A modo de conclusión, podríamos decir que la formación y crecimiento de hueso por este mecanismo consiste en formaciones ordenadas de condrocitos en proliferación, hipertrofia y mineralización (Gilbert, 2005).

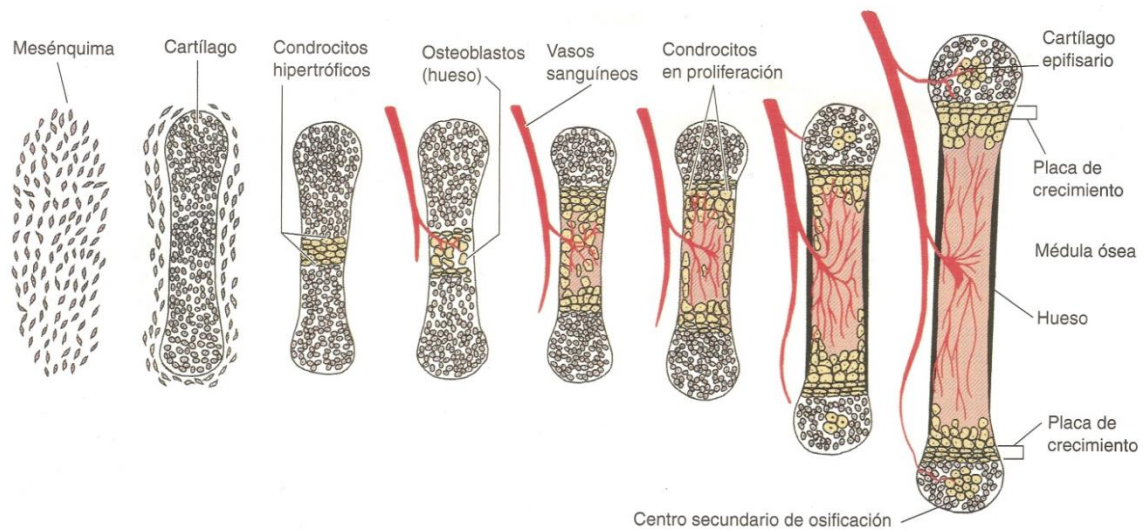


Figura 2. Proceso de osificación endocondral (Modificado de Gilbert, 2005).

Prostaglandinas y desarrollo óseo

La evidencia presentada en los párrafos posteriores indica que tanto en la formación ósea como en su resorción participan un conjunto de eicosanoides denominados prostaglandinas (PGs). Esto se debe en parte a que inducen la proliferación de células osteoblásticas y la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos.

Las PGs son un conjunto de mediadores lipídicos que se sintetizan a partir de ácidos grasos de 20 átomos de carbono denominados eicosanoides (Maier, 1980). Estructuralmente, corresponden a hidroxiacidos carboxílicos insaturados y se clasifican de acuerdo al estado de oxidación de su anillo ciclopentano en familias que van de la A hasta la I (fig. 3). Además, se dividen en series que van de la 1 a la 3 dependiendo de la cantidad de dobles enlaces que posean sus cadenas laterales (Bos et al., 2004).

Las PGs se encuentran en una gran cantidad de tejidos y son sintetizadas en respuesta a diversos estímulos fisiológicos y fisiopatológicos para mantener la homeostasis local (Sugimoto y Narumiya, 2007). Desarrollan roles importantes en condiciones como inflamación, trombosis, parto, resorción ósea, generación de fiebre, secreción de bicarbonato en duodeno, asma alérgico, carcinogénesis de colon, entre otros (Ushikubi et al., 2000).

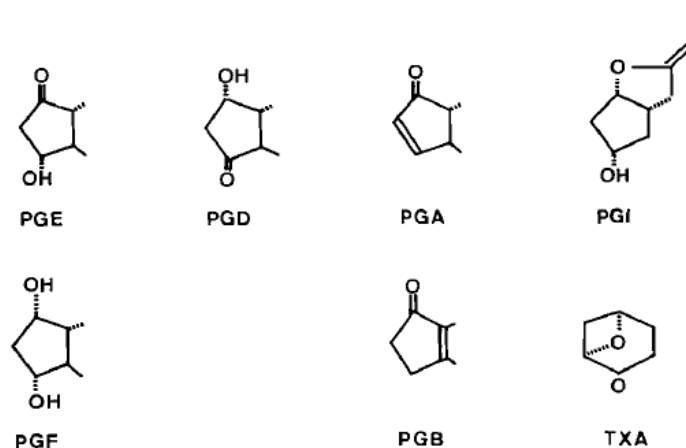


Figura 3. Nomenclatura asociada con el anillo ciclopentano para cada serie de prostaglandina (Modificado de Maier, 1980).

Sus acciones son mediadas por un grupo de receptores acoplados a proteína G de tipo Rodopsina (GPCRs) (Coleman et al., 1994; Narumiya et al., 1999) entre los cuales destacan DP, EP, FP e IP para PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 respectivamente (Ushikubi et al., 2000). De los receptores mencionados, nos centraremos en EP con sus subtipos EP1, EP2, EP3 y EP4, ya que son los que participan en la formación y resorción de hueso.

La señalización intracelular desencadenada por la unión de las PGs a estos receptores, difiere dependiendo del subtipo de receptor, por ejemplo, EP1 se acopla a proteína G_q y se asocia a la movilización de Ca^{+2} por acción de la fosfolipasa C (PLC) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Fujino et al., 2010). Por su parte, los receptores EP2 y EP4 se acoplan a proteína G_s y median la activación de adenilato ciclasa (AC), la formación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y la activación de la proteína quinasa A (PKA), mientras que el receptor EP3 inhibe a AC por vía G_i , (Sugimoto y Narumiya, 2007) (fig. 4).

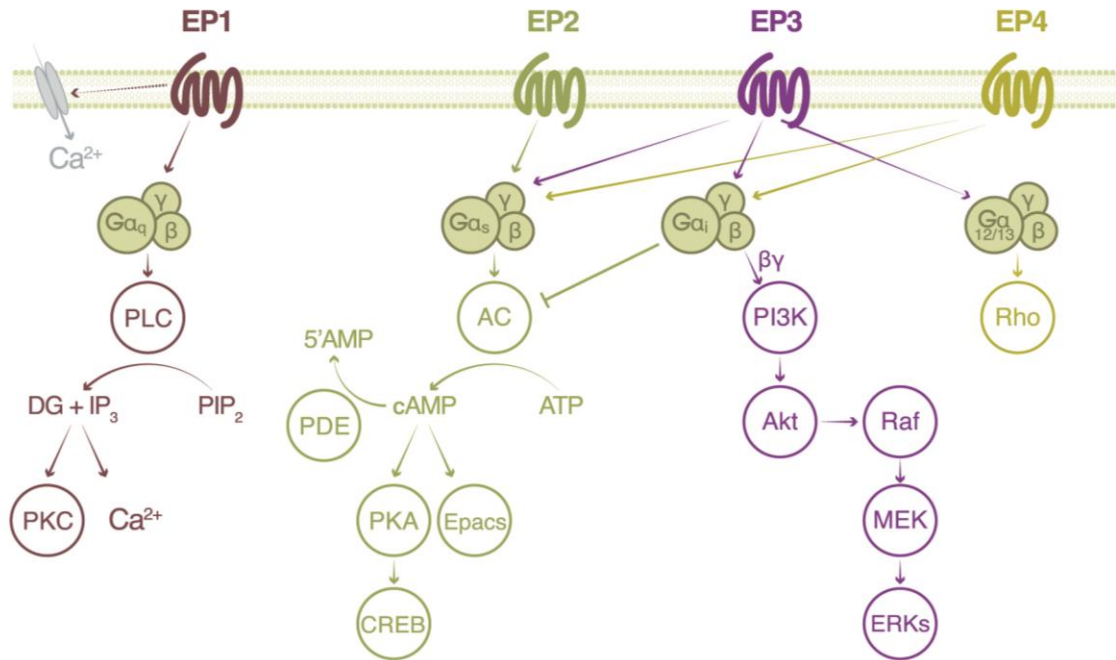


Figura 4. Propiedades de transducción de señal en receptores prostanoideos EP1, EP2, EP3 y EP4 (Modificado de Hirata y Narumiya, 2011 por Jaime Canet).

Existe evidencia que las PGs de la serie E juegan un papel importante en la resorción ósea. Klein y Raisz entregaron los primeros indicios en el año 1970 cuando observaron que PGE₁ y PGE₂ producían la salida de Ca⁺² y ⁴⁵Ca de hueso fetal generando importantes cambios morfológicos. En un estudio más reciente se demostró que la PGE₂ inducía la formación de osteoclastos a través del receptor EP4 (Sakuma et al., 2000), en adición a ello se vio que agonistas EP2 y EP4 estimulaban la resorción ósea y la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del factor de diferenciación de osteoclastos (Suzawa et al., 2000). Finalmente, en el año 2003 se observó en cultivos de huesos fetales de rata que Ono-AE1-329, agonista EP4, aumentaba la salida de ⁴⁵Ca (Raisz y Woodiel, 2003).

En contraposición a la evidencia que vincula las PGs con resorción ósea, se han realizado otros estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que apuntan a que estos eicosanoides también participan en la formación de hueso. Un ejemplo de ello es una investigación que se llevó a cabo en cultivos de huesos fetales de rata, en donde la adición de PGE₂ provocó un aumento en la síntesis de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) –indicando un incremento en la proliferación celular- y de proteínas colágenas y no colágenas típicas de hueso (Raisz y Chyun, 1984). Además, se asoció a

PGE₂ exógena con la estimulación de condrogénesis en cultivos de micromasa realizados con primordios de miembros de pollo (Gay y Kosher, 1984).

Por otro lado, los estudios *in vivo* muestran que ciertos agonistas de receptores EP estimulan la formación de hueso, el aumento de masa ósea y la reparación de fracturas en modelos animales luego de su administración local o sistémica. CP-533,536, un agonista de receptor prostanoide EP2, demostró aumentar la densidad de hueso y acelerar el proceso de reparación ósea en perros (Paralkar et al., 2003). Otra investigación que utilizó a ratones knockout para EP2, reveló que la ausencia del receptor resulta en huesos débiles en comparación con los huesos de animales no manipulados genéticamente y que EP2 tiene una mayor influencia en las propiedades biomecánicas del hueso (Akhter et al., 2001). Además, CP432 -agonista de receptor EP4- restableció la masa ósea y la fuerza en hueso compacto y esponjoso tras ser inyectado por 6 semanas a ratas de 12 meses de edad ovariectomizadas y osteopénicas (Ke et al., 2006). En adición a esto, estudios realizados con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que inhiben la síntesis de PGs, demuestran que estos medicamentos inducen un retraso en la reparación de fracturas (Pilbeam et al., 2008).

Asimismo, existe evidencia que respalda la síntesis de PGs en hueso. En el modelo de cultivo de micromasa, se observó que el inicio de la condrogénesis concordaba con un aumento en la producción de PGs -principalmente PGE₂- a partir del precursor [³H] ácido araquidónico (Gay y Kosher, 1985). Además, otros estudios *in vitro*, permiten argumentar que las células osteoblásticas son capaces de sintetizar PGE₂ en presencia de factor de crecimiento epidermal (Yokota et al., 1986) y que las células mesenquimales producen PGE₁ y PGE₂ junto con otros metabolitos araquidonatos durante su diferenciación (Boskey et al., 1996). También se ha visto que PGE₂ endógena afecta la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas por la estimulación de la síntesis de ADN (Igarashi et al., 1994).

Se ha señalado, además, que las PGs aumentan la actividad de fosfatasa alcalina -enzima que participa en la condrogénesis- de forma concentración dependiente en cultivos de células pre osteoblásticas MC3T3-E1 (Hakeda et al., 1985) y en el caso de PGE₂ el aumento de esta actividad ocurre vía receptor EP₄ (Alander y Raisz, 2006). Por otro lado, se demostró que PGE₁ y PGE₂ inducen la síntesis de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en osteoblastos, lo que ayuda a la angiogénesis y por consecuencia estimula la formación de hueso (Harada et al., 1994). En concordancia con esto, en un estudio reciente, se observó que el aumento de VEGF por PGE₁ se debe a la activación de Rho-quinasa vía receptor EP2 (Adachi et al., 2009).

Rol del receptor prostanoide EP3

Como vimos anteriormente, las PGs median sus efectos vía receptores EP. Dentro de ellos se encuentra EP3, receptor que se subdivide en al menos ocho isoformas generadas por variaciones en su extremo carboxilo terminal (Breyer et al., 2001). Cada una de ellas tiene la habilidad de acoplarse a proteínas G, incluyendo G_s , G_q y $G_{12/13}$ (Fujino et al., 2010). Estas isoformas pueden tener distintas funciones y contribuir a la diversidad de las acciones de PGE_2 (Bilson et al., 2004).

Un estudio realizado en 2006 demostró que tanto en la placa de crecimiento ósea, *in situ*, como en cultivos de condrocitos, *in vitro*, hay expresión de todos los receptores EP, incluyendo EP3 (Brochhausen et al., 2006). Además, en células mesenquimales de PE de ratones de DG 11,5, se halló mediante RT-PCR, que la expresión del receptor EP3 era relativamente más alta en comparación a EP1, EP2 y EP4 (Clark et al., 2005). Por otro lado, se sabe que en células de PE de pollo, PGE_2 media un efecto estimulador en la condrogénesis, el cual depende de la señalización de PKA (Biddulph et al., 1988), vía en la que EP3 también tiene participación (fig. 4).

Se sabe además, que los receptores EP3 y EP4 muestran una actividad constitutiva en adición a su actividad innata dependiente de la activación de vías de señalización (Fujino et al., 2010) y que las isoformas humanas EP3_{III} y EP3_{IV} se expresan tanto intracelularmente como en la superficie celular, lo que probablemente refleja la internalización del receptor como consecuencia de su actividad constitutiva (Bilson et al., 2004). Finalmente, se ha reportado en células mastocíticas de ratón (P-815), que la inducción del aumento en la actividad de AC por parte de un agonista selectivo de EP4 es potenciado por la adición simultánea de un agonista EP3 (Hatae, 2003).

En resumen, tenemos que el receptor EP3 se expresa en cultivos de condrocitos y en células mesenquimales de PE de ratón, además, algunas de las isoformas de EP3 comparten vías de señalización con los receptores EP2 y EP4, los cuales participan activamente en la formación y resorción ósea. En base a lo planteado y a la disponibilidad de un antagonista de receptor EP3 en el laboratorio, es que se decidió incluir este receptor en el diseño experimental de esta tesis.

Malformaciones congénitas

Como ya se ha expuesto, el desarrollo embrionario es un proceso biológico complejo, durante el cual, a pesar de la delicada sincronización de los eventos que se combinan para dar origen al nuevo organismo, pueden ocurrir algunos errores que generan malformaciones congénitas. Éstas, son anomalías presentes en el momento del nacimiento (Sadler, 2009) y pueden ser de índole funcional o estructural, como es el caso de las malformaciones generadas en el proceso de osificación -previamente descrito-.

Las principales malformaciones congénitas son causas importantes de mortalidad y morbilidad infantil, además de causar diversos grados de discapacidad y de ser una importante carga socioeconómica para las familias (Chaabane y Bérard, 2013). En cifras aproximadas, las malformaciones congénitas afectan a uno de cada 33 lactantes y causan 3,2 millones de discapacidades al año, se calcula además que cada año 270.000 recién nacidos fallecen durante los primeros 28 días de vida debido a estas anomalías congénitas (fig. 5).

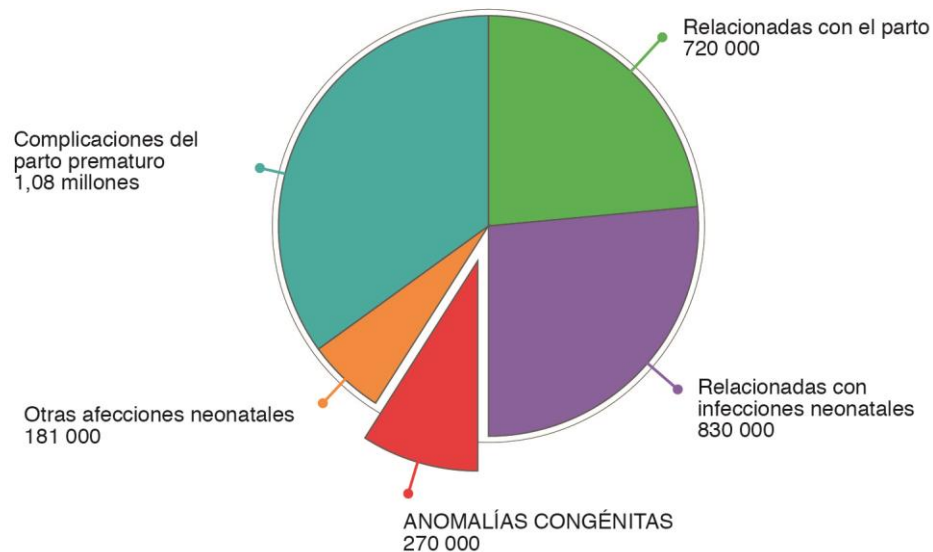


Figura 5. Causas de muerte neonatal en 193 países en 2010 (Fuente: Born too soon. The Global Action Report on Preterm Birth-OMS, 2012).

El panorama en Chile con respecto a las malformaciones no es muy alentador, ya que se ha registrado una tasa global de malformaciones congénitas por sobre el promedio latinoamericano, dicha tasa determinada en el periodo comprendido entre 1995 y 2008 fue de 3,1 % para nuestro país, mientras que el promedio para América Latina fue de 2,7% (Nazer y Cifuentes, 2011).

Las anomalías congénitas pueden tener un origen genético, infeccioso o ambiental, aunque en la mayoría de los casos resulta difícil identificar su causa (OMS, 2012). 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, 2011).

Dentro de los factores químicos que producen malformaciones congénitas se encuentran los medicamentos, los que son responsables del 2-5% de los defectos del desarrollo (Larrubia y Pérez, 2010). Aunque esta incidencia es baja, es importante destacar que entre un 44,2 y un 99,5% de las mujeres toman algún fármaco durante el embarazo (Pérez-Landeiro et al., 2002) y que el mayor riesgo de teratogénesis se produce entre la tercera y la undécima semanas de gestación -antes de que muchas mujeres hayan advertido que están embarazadas-.

La clasificación más utilizada del riesgo para el feto de los distintos medicamentos es la propuesta por la Food and Drug Administration (FDA), en donde las categorías A y B se admiten como seguras, C y D se deben reservar para situaciones en las que no exista una alternativa más segura, y los fármacos X deben evitarse siempre en las mujeres gestantes (tabla 1).

Tabla 1. Medicamentos pertenecientes a la categoría X según la clasificación de la FDA.

Grupo	Principio activo
Ácidos biliares	Quenodesoxicólico
Antiacneicos	Isotretinoína
Antineoplásicos	En principio, todos
Antiparasitarios	Quinina
Antipsoriásicos	Acitretina, etretinato, tazaroteno
Antídotos, deshabitación	Disulfiram
Antimigrañosos	Ergotamina y dihidroergotamina
Antiulcerosos	Misoprostol

Antivirales	Ribavirina
Hipnóticos y sedantes	Flurazepam, triazolam, quazepam
Hipolipemiantes	Estatinas
Hormonas sexuales	Anticonceptivos orales, estrógenos, andrógenos, progestágenos, estimulantes de la ovulación, antigonadotropinas, raloxifeno
Tóxicos o drogas de abuso	Cocaína, heroína
Vacunas	Parotiditis, sarampión, varicela
Vitaminas	Retinol a dosis altas, vitamina K en el embarazo a término

Misoprostol y malformaciones congénitas

Dentro de los medicamentos que representan un riesgo para el feto se encuentra misoprostol, el cual es un análogo sintético de la PGE₁ en el que el carbono 16 ha sido sustituido por un metiléter para mejorar su estabilidad (fig. 6) (Collins, 1990). Debido a esta analogía con el eicosanoide, misoprostol tiene propiedades anti-secretoras de ácido gástrico y capacidad protectora de la mucosa, por lo que es utilizado en la prevención de la úlcera péptica en pacientes tratados con AINEs (Watkinson et al., 1988).

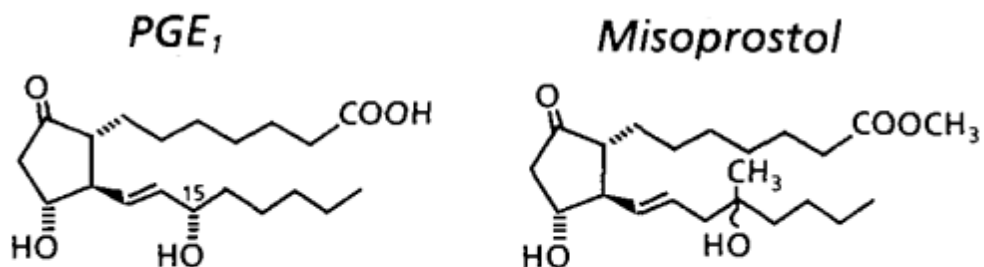


Figura 6. Estructura química de PGE₁ y de su análogo sintético misoprostol (Collins, 1990).

Misoprostol además posee actividad uterotónica, la cual es mediada por los receptores EP2 y EP3. Sus efectos principales incluyen maduración, dilatación y contracción uterina (Goldberg et al., 2001), por lo que en ginecología es utilizado para la inducción de trabajo de parto, maduración cervical luego de operaciones e interrupción temprana del embarazo. Estas indicaciones fueron aprobadas por la FDA en el año 2000 (Allen y O' Brien, 2009). Misoprostol se encuentra además, en la lista Modelo de Medicamentos Esenciales para la interrupción temprana

del embarazo de la Organización Mundial de la Salud (*disponible en <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>*).

Por otro lado, existen países donde el aborto no está permitido y en consecuencia se emplea misoprostol ilegalmente para la interrupción del embarazo (Coelho, 1993). La poca información y la falta de supervisión profesional, lleva en estos casos, a abortos fallidos, y como resultado el embarazo continúa. Aproximadamente el 15% de los abortos inducidos por misoprostol pueden fallar (Cavieres, 2011), por lo tanto el feto queda expuesto a la droga.

En base a una asociación epidemiológica entre exposición prenatal a misoprostol, ocurrencia de abortos y malformaciones congénitas, es que actualmente este medicamento se considera abortivo y teratógeno, clasificándose en la categoría X de la FDA (ver tabla 1). Además, se estima que el riesgo absoluto de defectos congénitos luego de exposición prenatal a esta prostaglandina sintética es un 1% (Allen y O' Brien, 2009).

Misoprostol se ha relacionado con diversas malformaciones congénitas como defectos de cráneo, extrofia vesical, artrogriposis, alteración de nervios craneales, malformaciones faciales, síndrome de Moebius, pie equinovaro, gastrosquisis, hidrocefalia, sindactilia, microcefalia, hipospadias, entre otras (Chiong y Cutiongco-de la Paz, 2009). En resumen, las malformaciones causadas por misoprostol podrían clasificarse en defectos de extremidades, del sistema nervioso y anomalías viscerales y esqueléticas (Cavieres, 2011). Para los efectos de este estudio, nos enfocaremos en los defectos de las extremidades, puntualmente en la artrogriposis múltiple congénita (AMC).

La AMC puede definirse como una displasia articular sistémica, caracterizada por rigidez articular en varias localizaciones, y que, con cierta frecuencia, se asocia a deformidades de manos, pies y otros defectos congénitos (fig.7) (Martínez et al., 2013). No es un diagnóstico específico, sino más bien un grupo heterogéneo de alteraciones del esqueleto que se manifiestan en el momento del nacimiento (Bonilla-Musoles et al., 2002).

La incidencia a nivel mundial corresponde a un caso cada 3.000 nacidos vivos (Almquist et al., 2008). Por otro lado, se ha estimado que en Chile la tasa de artrogriposis corresponde a 3,5% por cada 10.000 nacimientos -datos recolectados en el periodo entre 1995 y 2008 en el Hospital clínico de la Universidad de Chile- valor que excede a la tasa para América latina, que corresponde a un 2,6% (Nazer y Cifuentes, 2011).

La etiología aún no está clara, pero dentro de las posibles causas se incluyen alteraciones musculares, neurogénicas y/o del tejido conectivo, así como limitaciones mecánicas al movimiento debido a oligohidroamnios, malformaciones uterinas, miomas uterinos, etc. También se plantea que una vasculatura deficiente a nivel del cordón umbilical podría generar hipoxia y daño celular resultando en contracturas congénitas (Bamshad et al., 2009). Finalmente, se señalan como causas maternas las infecciones, traumas, diabetes mellitus y consumo de drogas como alcohol, cocaína, curare y misoprostol (Osorio et al., 2007; Kalampokas et al., 2012).



Figura 7. Infante con amioplasia. Amioplasia es una forma específica de artrogriposis que se caracteriza por una posición típica de las extremidades. (Modificado de Almquist et al., 2008).

Alrededor del mundo se han presentado numerosos casos de AMC luego de la exposición prenatal a misoprostol durante los tres primeros meses de gestación. Un ejemplo de ello es un reporte realizado en 1993 por Gonzales et al., en donde se analizan siete casos con exposición prenatal a misoprostol resultando seis de ellos con deficiencias en las extremidades. Cinco años después, este mismo autor reportó 42 infantes sobrevivientes a la exposición de misoprostol y nota que 10 de ellos tienen artrogriposis (Gonzalez et al., 1998).

En Brasil se realizó una evaluación clínica a 15 pacientes expuestos de forma prenatal al medicamento y se encontró que todos ellos tenían malformaciones congénitas, dentro de las que destacaron retardo en el crecimiento, huesos subdesarrollados y rigidez en distintas articulaciones. Además, cinco pacientes presentaron deformidades en extremidades superiores en adición a un pobre desarrollo de las extremidades inferiores, observaciones que apoyan la relación misoprostol-AMC (Coelho et al., 2000). Durante el mismo año Orioli et al., realizaron un estudio caso control

con un n = 53, en donde se desprendió que 10 pacientes expuestos a misoprostol durante la gestación presentaban artrogriposis. En concordancia a lo anterior, se reportó en Chile el nacimiento de un niño con AMC y síndrome de Moebius tras un aborto fallido en la octava semana de gestación (Osorio et al., 2007).

Se piensa que estas malformaciones se deben a una disrupción vascular secundaria a las contracciones uterinas causadas por el fármaco (Allen y O' Brien, 2009) o por un efecto vasoconstrictor sobre las arterias uterinas (Webster y Abela, 2007), lo que causaría hipoperfusión, hipoxia fetal y daño isquémico, resultando en una lesión de células endoteliales y lesiones tisulares (fig. 8).

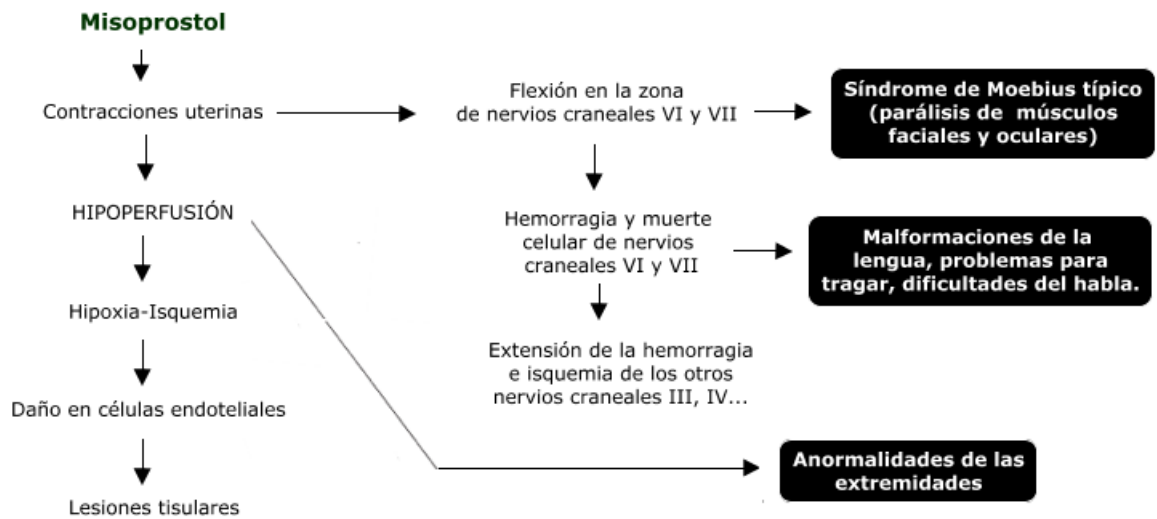


Figura 8. Mecanismo propuesto para teratogenicidad de misoprostol (modificado de Bos-Thompson et al., 2008).

Misoprostol y células mesenquimales

Prácticamente no existen estudios disponibles en la literatura que evalúen la toxicidad de misoprostol sobre la gestación y el mecanismo por el cual ocurren estos eventos. No obstante, en un intento por dilucidar el mecanismo teratógeno del fármaco sobre las extremidades, se llevó a cabo un estudio en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso, en donde se determinó el efecto de misoprostol sobre cultivos de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata (Flores, 2012). Dentro de los resultados, se encontró que misoprostol tiende a aumentar la captación de rojo neutro por parte de los lisosomas de las células expuestas en relación al control. Otra observación de la investigación fue que misoprostol induce levemente la diferenciación de las células mesenquimales a condrocitos, efecto que se ve reflejado en el aumento de la captación de azul alciano por parte de los glicosaminoglicanos (GAGs) de la matriz celular.

El aumento en la captación de rojo neutro indica una mayor actividad lisosomal, lo que podría explicarse por un aumento de la viabilidad de células mesenquimales, es decir que misoprostol causó la muerte en pocas de ellas, o podría deberse a una proliferación celular inducida por el medicamento, lo que explicaría también el mayor número de lisosomas y por consecuencia una mayor captación del colorante.

Por las observaciones señaladas en los párrafos anteriores y la evidencia entregada en la introducción, es que en esta tesis se estudió el efecto de misoprostol sobre la viabilidad, proliferación y diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, además de la posible participación del receptor prostanoide EP3 en estos procesos celulares. Todo esto con el fin de avanzar en el conocimiento del mecanismo teratógeno de misoprostol y dilucidar su participación en la ocurrencia de malformaciones en las extremidades.

II. HIPOTESIS

Misoprostol induce un aumento en la proliferación de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata *in vitro* vía activación del receptor prostanoide EP3.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de misoprostol *in vitro* sobre la proliferación, viabilidad y diferenciación de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata y evaluar la participación del receptor prostanoide EP3.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de misoprostol sobre la proliferación de células mesenquimales en cultivos *in vitro*, mediante la reducción de MTT y la definición de una cinética de crecimiento celular.
- Determinar el efecto de misoprostol sobre la viabilidad de células mesenquimales en cultivos *in vitro*, mediante la captación de rojo neutro.
- Determinar el efecto de misoprostol sobre la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos en cultivos *in vitro*, mediante la tinción de los GAGs con azul alciano.
- Evaluar el efecto de misoprostol sobre viabilidad y diferenciación de células mesenquimales en cultivos *in vitro* en presencia de L-798106, un antagonista selectivo de receptores EP3.

IV. MATERIALES Y METODOS

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 (NRC, 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). El procedimiento experimental se basó en el protocolo INVITTOX 122 (Brown, 2010) de la base de datos del *European Community Center for the Validation of Alternative Methods*, (ECVAM), sobre métodos alternativos a animales de experimentación y además se complementó con la determinación de proliferación celular.

La recolección de primordios de extremidades de rata se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso, mientras que la suspensión celular, cultivos y tratamientos posteriores se llevaron 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 a 12 semanas de edad y de 250 ± 30 g de peso. Los animales fueron provistos por la colonia de animales del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, los que fueron mantenidos en condiciones ambientales y de alimentación correspondientes a temperatura de 21 ± 2 °C, luz artificial con ciclo luz - oscuridad 12:12, comida convencional para animales de laboratorio (Lab Rat, Champion) y agua potable *ad libitum*.

Para el apareamiento se situó a la hembra y al macho en una misma jaula aproximadamente a las 18:00 H, y para confirmar la concepción se realizó a la mañana siguiente un frotis vaginal -alrededor de las 9 AM- en donde la detección de espermios indicó el día de gestación (DG) 0,5.

Recolección de primordios de extremidades

Las hembras utilizadas en este estudio fueron eutanizadas el DG 13,5 mediante inhalación de CO₂ seguida de dislocación cervical. Posteriormente se realizó una incisión en forma de v en la zona uterina y con la ayuda de una pinza se extrajo el útero, el que luego fue transferido a una placa Petri con solución salina de Hank's (CaCl₂, NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, glucosa, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄) a 4 °C y previamente esterilizada. En esta solución salina se procedió a extraer los embriones para posteriormente remover los primordios de extremidades (PE) superiores e

inferiores con un corte único. Finalmente, se depositaron todos los PE en un tubo cónico plástico de 15 mL con solución salina de Hank's a 4°C para conservar el tejido (fig. 9).



Figura 9. Extracción de primordios de extremidades. **(a)** Cesárea DG 13,5. **(b)** Cuerno uterino grávido. **(c)** Explantación uterina. **(d)** Embriones DG 13,5. **(e)** Primordios de extremidades. **(f)** Primordios de extremidades dispuestos en tubo cónico con solución de Hank's.

Suspensión celular

Para realizar la suspensión celular se removió el excedente de solución salina de Hank's del tubo cónico con una pipeta estéril de 5 mL, luego se adicionó tripsina, Sigma-Aldrich®, código T4549, al 0,5% en suero salino tamponado con fosfato libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} (CMF-PBS) -4 mL de enzima por cada 80 primordios-. Posteriormente se homogenizó con una pipeta estéril de 1 mL para que el tejido entrara en contacto con la tripsina y se incubó a 37°C por 20 minutos en una incubadora de atmósfera controlada (5% CO_2 y 85% de humedad).

Transcurridos los 20 minutos, y con el fin de detener la acción de la tripsina, se agregaron 2 mL de medio de cultivo (90% DEMEM F-12, Gibco[®], código 12400-024, 10% suero fetal bovino, Gibco[®], código 10437028 y 50 µg/mL de gentamicina, LaboratorioChile[®]). Posteriormente se centrifugó el tubo cónico a 1600 rpm durante 4 minutos, realizándose este procedimiento de lavado y centrifugado 3 veces. Tras la última centrifugación se aspiró todo el sobrenadante, dejando sólo el pellet de células y se agregó medio de cultivo en un volumen de 10 µL por PE extraído. Una vez hecho esto, se homogenizó el fluido con una micropipeta, se traspasó a una jeringa de 5 mL y finalmente se filtró a través de una malla de nylon con tamaño de poro de 10 µm. Este último paso aseguró una muestra que sólo contuviese células, las que se trasladaron posteriormente a un tubo eppendorf estéril de 2 mL.

Siembra celular

Se tomaron 10 µL de la suspensión celular anterior y se diluyeron en un orden de 20 veces adicionando 190 µL de DEMEM F-12, posteriormente se tiñeron 75 µL de esta dilución con 75 µL de azul tripán, Sigma-Aldrich[®], código 93595, al 0,2% en NaCl al 0,9% y se efectuó un recuento celular utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico invertido.

Luego del recuento, se ajustó la densidad de la suspensión celular a 8×10^5 células/mL, para luego sembrarla en una placa de 96 pocillos pre tratada con poliestireno, Falcon[®], N° 353072. En este paso se depositaron 50 µL de la suspensión en el centro de cada pocillo con cuidado de no generar burbujas.

Luego se incubó la placa por 3 horas a 37°C con el fin de mejorar la adhesión celular, después se agregó a cada pocillo 150 µL de los tratamientos correspondientes (diluidos en medio de cultivo), lográndose un volumen y densidad final de 200 µL y 2×10^5 células/mL respectivamente. Para finalizar el cultivo se incubó la placa a 37°C (5% CO₂ y 85% de humedad) por 5 días.

Validación Interna

Para asegurar que la técnica se efectuó de manera correcta se realizaron cultivos en presencia de dos compuestos de referencia disueltos en medio de cultivo como controles positivo y negativo. Como control positivo se utilizó una solución de 5-fluorouracilo (5-FU), Sigma-Aldrich[®], código F6627, en diluciones seriadas de 1.000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL y 125 ng/mL. Por otro lado, se utilizó como control negativo una solución de penicilina G sódica, Sigma-Aldrich[®], código P3032, a una concentración de 500 µg /mL.

Tratamiento de los cultivos

Los cultivos fueron tratados con misoprostol (código M6807) sólo y en adición de L-798106 (antagonista de receptor prostanoide EP3, código L4545), ambos reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich®. Las concentraciones a estudiar de misoprostol fueron 20 pg/mL, 200 pg/mL, 2.000 pg/mL y 20.000 pg/mL, elección que se basó en la concentración plasmática máxima (Cmax) alcanzada en una mujer luego de la administración oral de 400 µg de misoprostol (Cavieres, 2011). La concentración utilizada de L-798106 fue 1 µM (Bassil et al., 2008).

Se realizaron al menos tres experimentos independientes por cada tratamiento, cada uno por sextuplicado. En cada placa se incluyó un control que contuviese células y medio de cultivo, además, los tratamientos se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich®, código D2650, por lo que se incorporó un control de vehículo.

Transcurridos los 5 días de incubación con los respectivos tratamientos y compuestos de referencia, los cultivos se sometieron a la determinación de viabilidad celular y diferenciación celular. En el caso de misoprostol se evaluó además la proliferación celular.

Viabilidad celular

La estimación de viabilidad celular se logró mediante el ensayo de rojo neutro (RN), que se basa en la capacidad de las células viables para mantener gradientes de pH a través de la producción de ATP. A pH fisiológico, el RN -levemente catiónico- presenta una carga neta cercana a cero, lo que le permite atravesar membranas. Dentro de los lisosomas el pH es menor al del citoplasma, por lo tanto el RN se ioniza y permanece en el organelo (Repetto et al., 2008). La cantidad de RN captado por los lisosomas es proporcional a la viabilidad celular. El protocolo efectuado se detalla a continuación.

Transcurridos los 5 días de incubación con los respectivos tratamientos, se removió el medio de cultivo de las placas y se añadió a cada pocillo 100 µL de RN, Sigma-Aldrich®, código N4638 -previamente incubado a 37°C por 24 H- al 0,005% en medio de cultivo (fig.10 A). Luego, se incubó la placa a 37°C por 2,5 H, se removió el excedente de RN y se lavó cada pocillo con 150 µL de CMF-PBS. Una vez hecho esto, se observó cada placa en un microscopio óptico invertido y se tomó fotografías en el centro de cada pocillo para obtener imágenes de la captación de RN, para esto se utilizó una cámara marca micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp y el software Micrometrics® LE para Windows 7.

Posteriormente, se añadieron 150 μL /pocillo de alcohol ácido para eluir el rojo neutro captado (fig. 10 B) y se situó la placa en una plataforma rotatoria durante 1 hora para ayudar a la extracción del colorante. Finalmente, se leyó la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda (λ) de 562 nm y se determinó el porcentaje de viabilidad en relación al control.

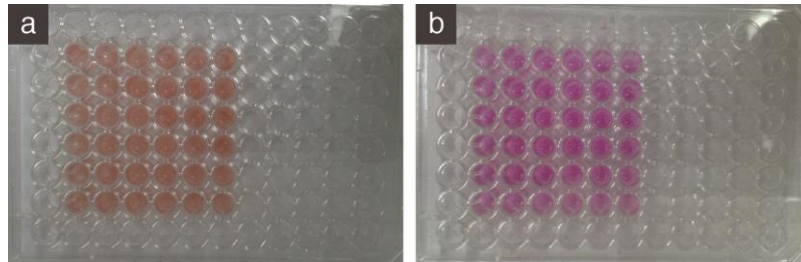


Figura 10. Imagen de cultivos de micromasa teñidos con rojo neutro. **(a)** Adición de rojo neutro al 0,005% en medio de cultivo. **(b)** Rojo neutro eluido por acción de alcohol ácido.

Diferenciación celular

La determinación de la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos se realizó a través de la tinción de los cultivos con azul alciano, colorante que a pH ácido indica la presencia de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados, los que son sintetizados por condrocitos, por lo que un aumento en la retención de azul alciano es proporcional a la cantidad de condrocitos (Hassell y Horigan, 1982). El protocolo utilizado se detalla a continuación.

Transcurridos los 5 días de incubación con los respectivos tratamientos, se removió el medio de cultivo de las placas y se añadió a cada pocillo 200 μL de azul alciano, Sigma-Aldrich®, código A9186, al 1% en HCl 0,1 N (fig. 11 A), el que fue filtrado previamente. Luego, se incubó la placa a 37°C por toda la noche para asegurar la tinción. A la mañana siguiente se removió el azul alciano sobrante y se agregó a cada pocillo 200 μL de CMF-PBS con el fin de lavar las células - este procedimiento se realizó tres veces-. Una vez hecho esto, se observó cada placa en un microscopio óptico invertido y se tomó fotografías en el centro de cada pocillo para obtener imágenes de la tinción de los GAGs, para esto se utilizó una cámara marca micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp y el software Micrometrics® LE para Windows 7.

Posteriormente se agregó 200 μL /pocillo de clorhidrato de guanidina 6M, Merck®, código 1042200100, para eluir el azul alciano retenido y se dejó en incubación a 37°C durante toda la noche (fig. 11 B). A la mañana siguiente se leyó la absorbancia a un λ de 630 nm en un lector de ELISA y finalmente se determinó el porcentaje de diferenciación en relación al control que contenía sólo células y medio de cultivo.

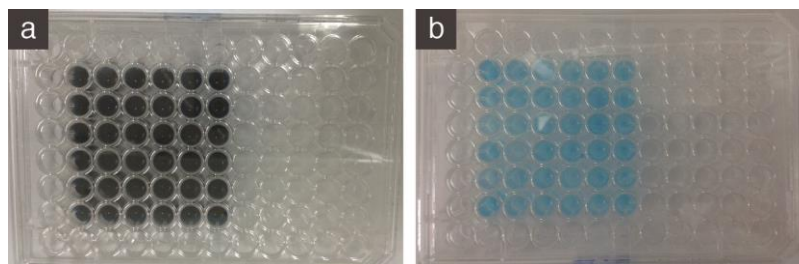


Figura 11. Imagen de cultivos de micromasa teñidos con azul alciano. **(a)** Adición de azul alciano al 1% en HCl 0,1 N. **(b)** Azul alciano eluido por acción de clorhidrato de guanidina 6 M.

Proliferación celular

Para determinar la proliferación celular se utilizó el protocolo de Vybrant[®] MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154), el cual se basa en la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células metabólicamente activas. Esta reducción del MTT se traduce en la generación de formazán púrpura, compuesto que es insoluble, pero que luego es solubilizado por la acción del dodecilsulfato sódico (SDS), permitiendo así su cuantificación por espectrofotometría. La cantidad de células activas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La determinación de proliferación celular se realizó en cada tratamiento a las 0, 72 y 120 horas de cultivo como se describe a continuación.

Transcurrido el periodo de incubación con los respectivos tratamientos se removió el medio de cultivo de las placas y se adicionó 100 μ L de medio fresco y 10 μ L de MTT 12 mM a cada pocillo (fig. 12 A), en este paso se incluyó además un control negativo con 10 μ L de MTT en medio solo (sin células) para finalmente incubar la placa a 37°C por 4 horas. Una vez cumplido el tiempo se observó cada placa en un microscopio óptico invertido y se tomó fotografías en el centro de cada pocillo para obtener imágenes del formazán producido, para esto se utilizó una cámara marca micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp y el software Micrometrics[®] LE para Windows 7. Posteriormente, se agregó 100 μ L de SDS a cada pocillo y se homogenizó con la punta de la micropipeta, luego se incubó nuevamente la placa por un periodo de 18 horas (fig. 12 B). Posterior a la incubación se homogenizó cada pocillo y se leyó la absorbancia a una λ de 562 nm.

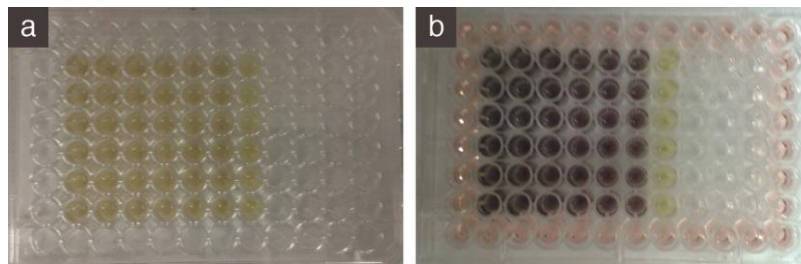


Figura 12. Imagen de cultivos de micromasa tratados con MTT. **(a)** Adición de MTT. **(b)** Reducción de MTT a sal de formazán insoluble luego de incubar 4 horas.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm S.D. (desviación estándar). Las diferencias de los tratamientos con respecto al control se determinaron mediante un análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$) seguido de un test de Dunnett. El tratamiento estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism, versión 5.0.

Validación Interna

Como se señaló anteriormente, la validación interna del cultivo de micromasa se realizó utilizando penicilina G (500 µg/mL) como control negativo, y 5-FU (125, 250, 500 y 1.000 ng/mL) como control positivo. Para ambos se determinó viabilidad y diferenciación celular mediante tinción con rojo neutro y azul alciano respectivamente.

Tanto para viabilidad como para diferenciación celular, penicilina G no difirió en más del 10% con respecto al control, obteniéndose un porcentaje de viabilidad de $91,6 \pm 2,2$ (promedio \pm error estándar) y un porcentaje de diferenciación de $96,1 \pm 0,7$. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura (Minta, 2003).

En cuanto a 5-FU, se observa una reducción concentración-dependiente de la viabilidad celular en comparación al control (fig. 13), lo que deja en evidencia la fuerte acción del antimetabolito. Además, en concordancia a lo descrito por Minta en 2003, podemos ver que al aumentar la concentración de 5-FU, la citotoxicidad se hace más evidente (fig. 14).

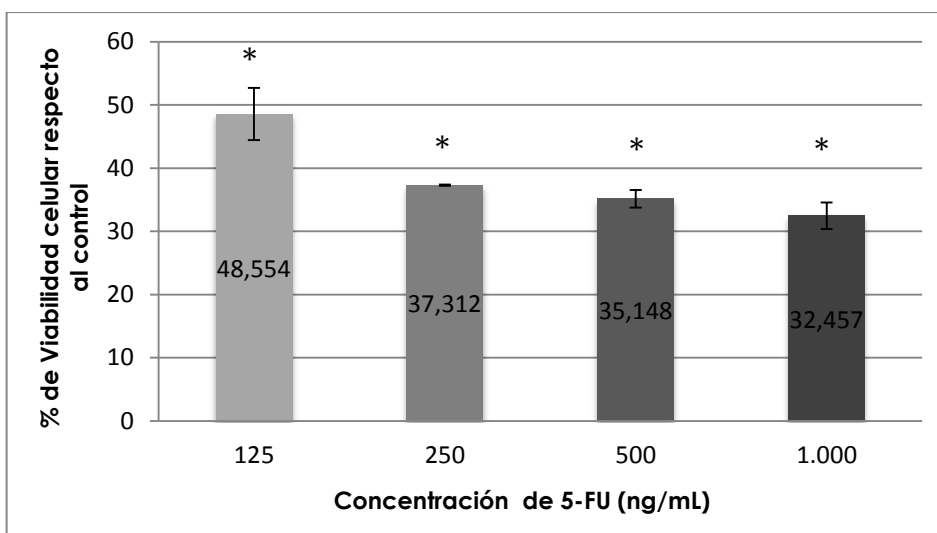


Figura 13. Viabilidad celular en presencia de control positivo. 125 ng/mL de 5-FU, 250 ng/mL de 5-FU, 500 ng/mL de 5-FU, 1.000 ng/mL de 5-FU. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor $p < 0,05$.

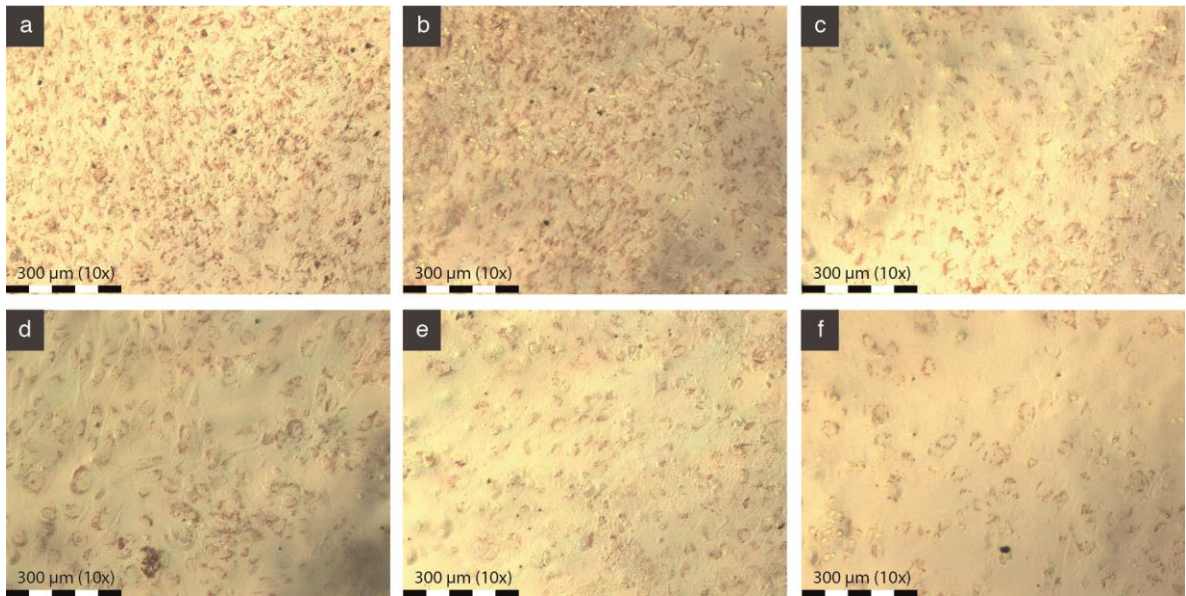


Figura 14. Captación de rojo neutro en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** penicilina G 500 µg/mL. **(c)** 5-FU 125 ng/mL. **(d)** 5-FU 250 ng/mL. **(e)** 5-FU 500 ng/mL. **(f)** 5-FU 1.000 ng/mL. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

En la figura 15 se observa que la diferenciación celular desciende a medida que aumenta la concentración de 5-FU, hecho que coincide con lo descrito por Minta en 2003. Además, las concentraciones de 250, 500 y 1.000 ng/mL de 5-FU indujeron una respuesta en los cultivos significativamente distinta al control.

Por otro lado, se observó que las células tienen una forma esférica u ovoide típica de condrocitos (Langille, 1994) (fig.16).

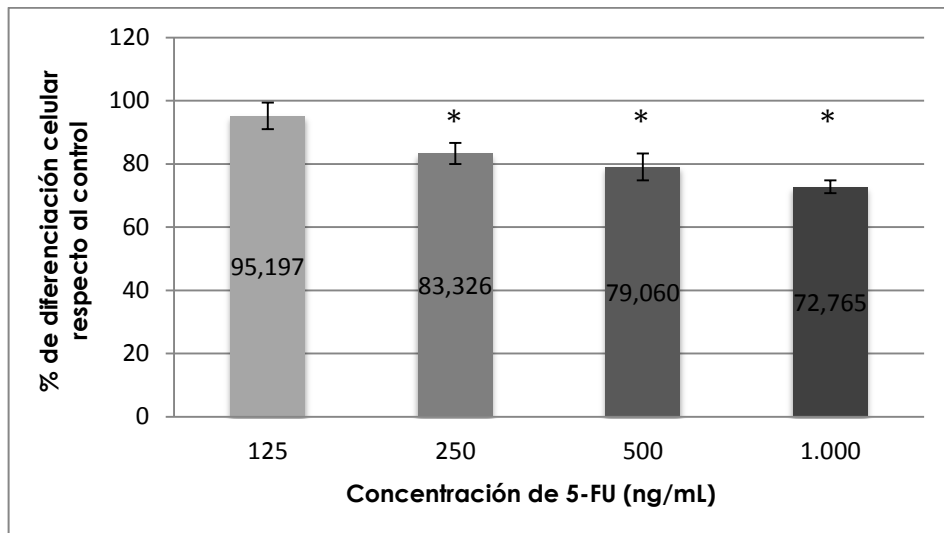


Figura 15. Diferenciación celular en presencia de control positivo. 125 ng/mL de 5-FU, 250 ng/mL de 5-FU, 500 ng/mL de 5-FU, 1.000 ng/mL de 5-FU. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor $p < 0,05$.

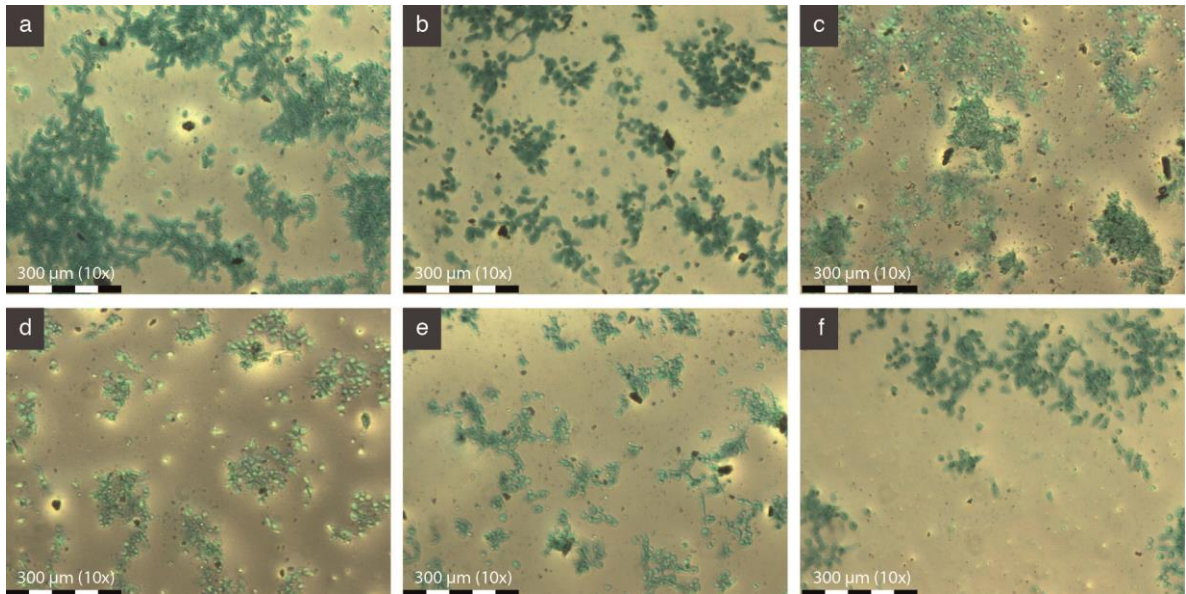


Figura 16. Tinción de GAGs con azul alciano en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** penicilina G 500 µg/mL. **(c)** 5-FU 125 ng/mL. **(d)** 5-FU 250 ng/mL. **(e)** 5-FU 500 ng/mL. **(f)** 5-FU 1.000 ng/mL. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

Efecto de misoprostol sobre cultivos de micromasa

En relación a viabilidad celular, los cultivos realizados en presencia de misoprostol mostraron leves diferencias con respecto al control. No obstante, la concentración más elevada aumentó la captación de rojo neutro en un $32 \pm 0,6\%$, siendo este un resultado estadísticamente significativo (fig.17). Los cultivos en presencia de DMSO como control de vehículo no manifestaron diferencias significativas en relación al control, ya que el porcentaje de captación de rojo neutro fue de $94 \pm 5,1$.

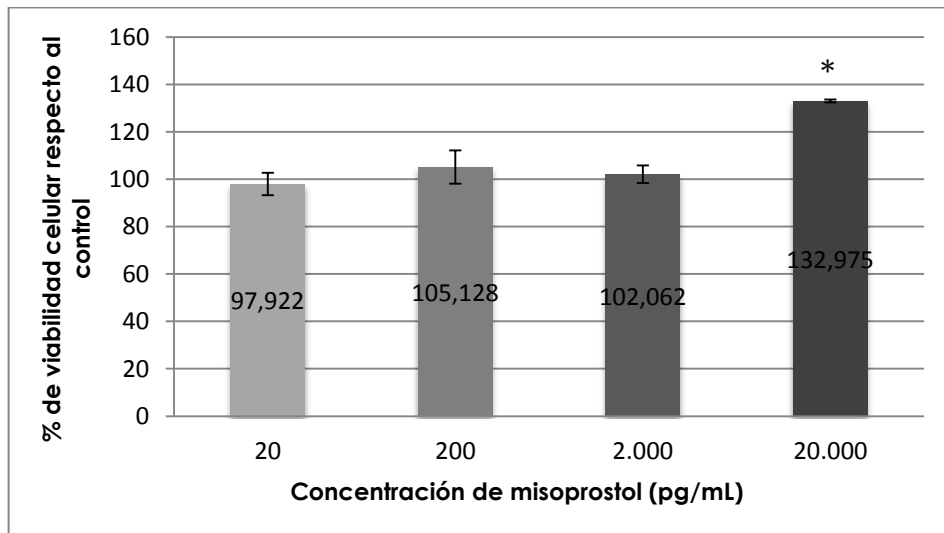


Figura 17. Viabilidad celular en presencia de misoprostol. 20 pg/mL de misoprostol, 200 pg/mL de misoprostol, 2.000 pg/mL de misoprostol, 20.000 pg/mL de misoprostol. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor $p < 0,05$.

La figura 18 muestra la captación de rojo neutro en células tratadas con misoprostol. En ella podemos observar que a 20.000 pg/mL (fig. 18 F) hay mayor retención del colorante por parte de las células en comparación al resto de las concentraciones utilizadas (fig. 18 A-E), lo que podría deberse a una mayor viabilidad celular o a una mayor proliferación.

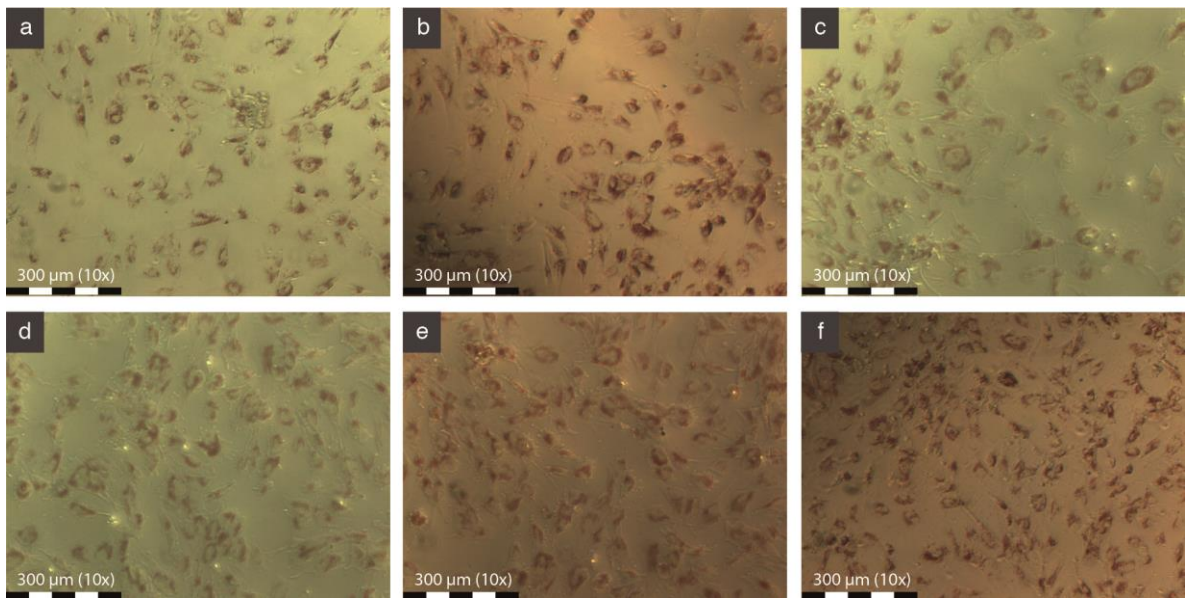


Figura 18. Captación de rojo neutro en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** DMSO 0,125% v/v. **(c)** misoprostol 20 pg/mL. **(d)** misoprostol 200 pg/mL. **(e)** misoprostol 2.000 pg/mL. **(f)** misoprostol 20.000 pg/mL. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

En cuanto a la tinción con azul alciano, el control de vehículo, DMSO, no manifestó diferencias importantes con respecto al control, ya que los cultivos expuestos presentaron un porcentaje de diferenciación celular de $96 \pm 5,1$.

Por otro lado, misoprostol no indujo cambios en la diferenciación de los células mesenquimales (fig. 19) en ninguna de las concentraciones estudiadas (20, 200, 2.000 y 20.000 pg/mL), lo que se puede observar gráficamente en la figura 20. Cabe destacar que ninguno de los valores de diferenciación celular en presencia de misoprostol resultó estadísticamente significativo.

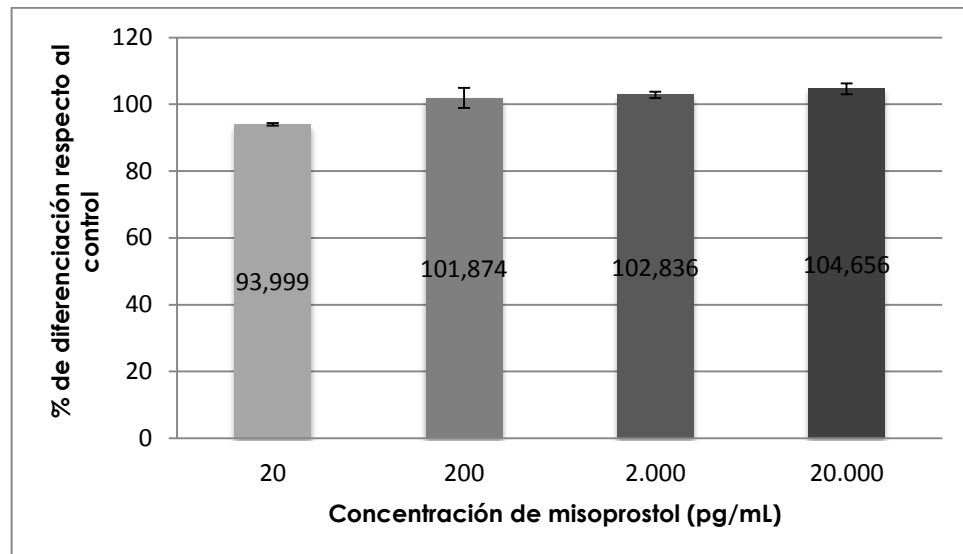


Figura 19. Diferenciación celular en presencia de misoprostol. 20 pg/mL de misoprostol, 200 pg/mL de misoprostol, 2.000 pg/mL de misoprostol, 20.000 pg/mL de misoprostol. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3.

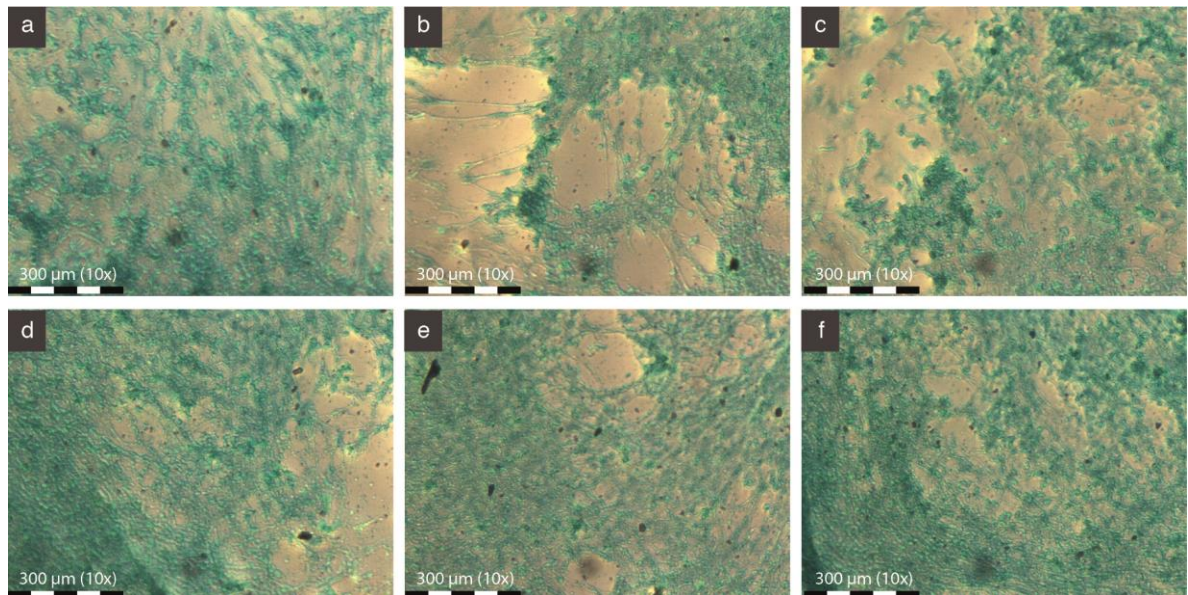


Figura 20. Tinción de GAGs con azul alciano en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** DMSO 0,125% v/v. **(c)** misoprostol 20 pg/mL. **(d)** misoprostol 200 pg/mL. **(e)** misoprostol 2.000 pg/mL. **(f)** misoprostol 20.000 pg/mL. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

Otra determinación realizada en los cultivos expuestos a misoprostol fue la proliferación celular, para lo cual se utilizó la técnica de MTT. Las mediciones se realizaron a las 0, 72 y 120 horas, con el fin de obtener una cinética de proliferación. Los resultados se muestran en las figuras 21-22.

Es importante mencionar que los pocillos que contenían el control negativo no presentaron cambios de coloración, lo que se refleja en las bajas absorbancias obtenidas con respecto al control sin tratamiento (datos no mostrados). Este hecho indica que no hay falla en la técnica ni interferencias por contaminación que alteren los resultados.

El control de vehículo, DMSO, no representó diferencias significativas con respecto al control para ninguno de los 3 tiempos de medición. Los porcentajes de proliferación celular fueron $99,5 \pm 1,8$, $100,8 \pm 1,7$ y $106,8 \pm 8$ para 0, 72 y 120 horas respectivamente.

Al analizar los datos de proliferación celular en presencia de misoprostol (fig. 21) podemos observar que en las concentraciones de 20, 200 y 2.000 pg/mL no hay diferencias respecto al control, ya que a las 0, 72 y 120 horas la proliferación celular no varió de forma relevante. Sin embargo, a la concentración de 20.000 pg/mL de misoprostol ocurre un abrupto aumento en la proliferación a las 120 horas (fig. 21 y 22) correspondiente a un $203,2 \pm 8,5\%$ de proliferación celular con respecto al control. Asimismo, este dato concuerda con el aumento de captación de rojo neutro que se genera a esta misma concentración de misoprostol.

Este aumento de proliferación celular se hace latente en la generación de cristales de formazán, ya que cuando las células proliferan se encuentran metabólicamente activas y reducen MTT en mayor magnitud. Esto se presenta gráficamente en la figura 22, donde se observa la proliferación celular a las 120 horas de cultivo. Al mirar la imagen captada de los cultivos tratados con misoprostol 20.000 pg/mL (fig. 22 F) nos daremos cuenta que la cantidad de formazán generado es mayor que en el resto de las situaciones (fig. 22 A-E).

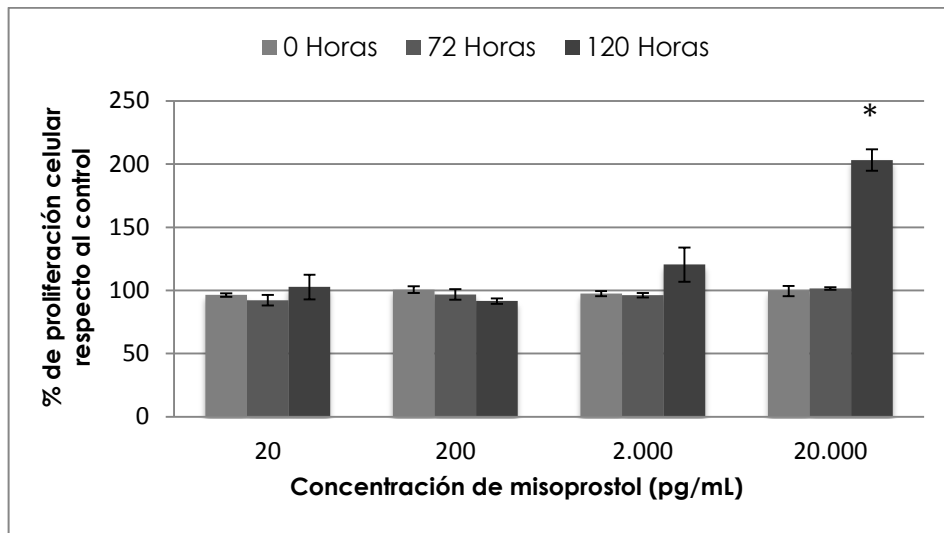


Figura 21. Proliferaci3n celular en presencia de misoprostol a las 0, 72 y 120 horas. 20 pg/mL de misoprostol, 200 pg/mL de misoprostol, 2.000 pg/mL de misoprostol, 20.000 pg/mL de misoprostol. Los resultados se presentan como promedio \pm error est3ndar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor $p < 0,05$.

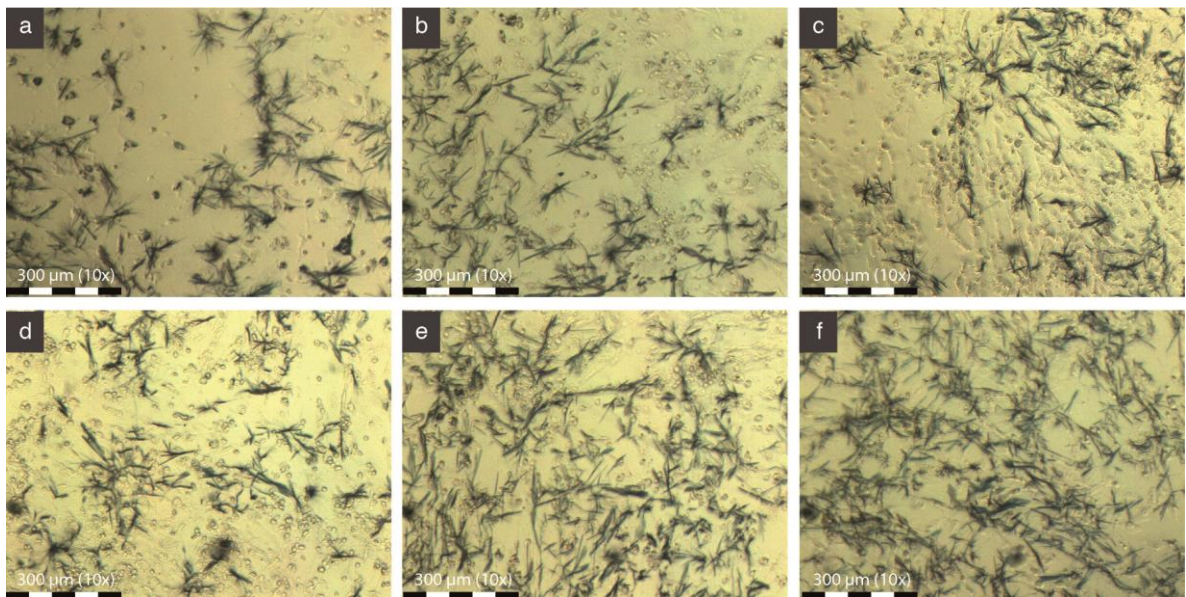


Figura 22. Proliferaci3n celular determinada con MTT a las 120 horas en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** DMSO 0,125% v/v. **(c)** misoprostol 20 pg/mL. **(d)** misoprostol 200 pg/mL. **(e)** misoprostol 2.000 pg/mL. **(f)** misoprostol 20.000 pg/mL. Fotografía en microscopía 3,2 Mp.

Efecto de L-798106 sobre cultivos de micromasa

Las determinaciones realizadas para este ensayo fueron viabilidad y diferenciación celular mediante captación de rojo neutro y tinción con azul alciano respectivamente.

El control de vehículo, DMSO, no presentó diferencias significativas con respecto al control, ya que el porcentaje de captación de rojo neutro fue $97,8 \pm 1,4$. En cuanto a los resultados de captación de RN para misoprostol + L-798106, estos indican que no hay efectos relevantes para ninguna de las concentraciones estudiadas (fig. 23). Pese a que los datos fluctuaron entre un 2% y un 8% con respecto al control, esto no representó una diferencia estadísticamente significativa. En la figura 24 se muestran células tratadas con misoprostol + L-798106 y teñidas con rojo neutro, en las que se observa que la captación de RN fue similar para todas las concentraciones estudiadas.

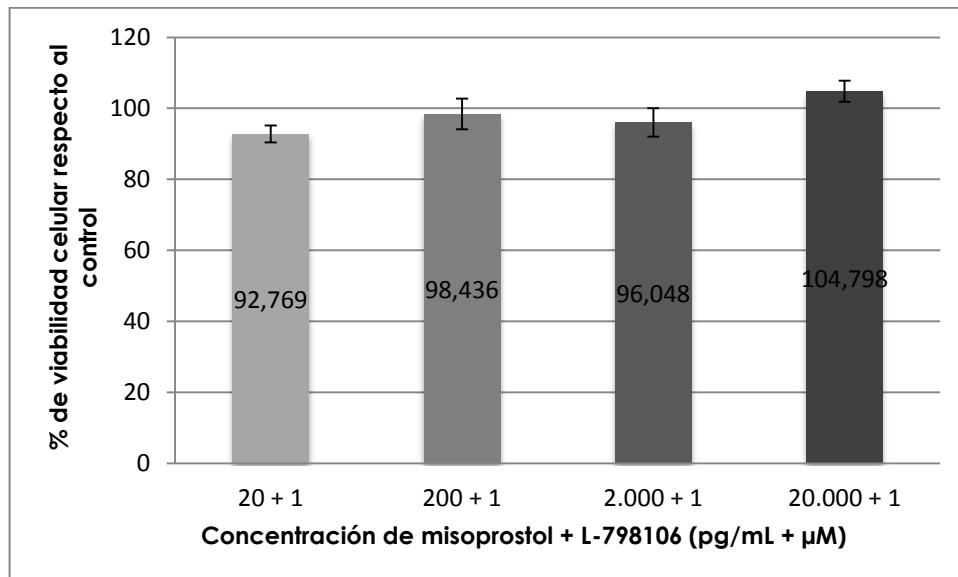


Figura 23. Viabilidad celular en presencia de misoprostol y L-798106. 20 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 200 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 2.000 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 20.000 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3.

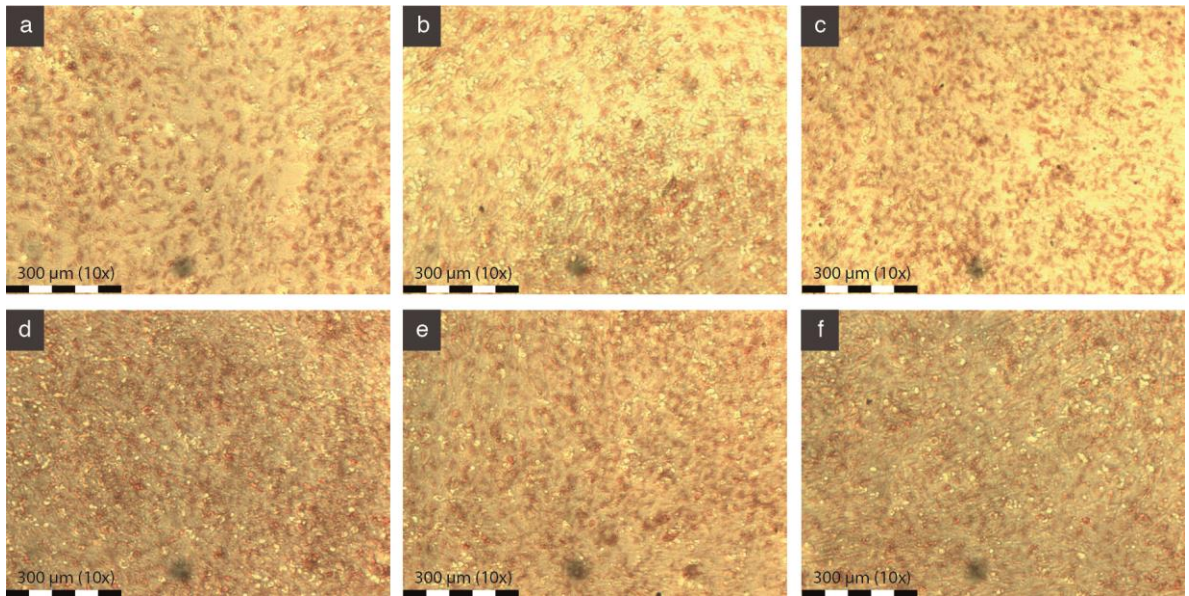


Figura 24. Captación de rojo neutro en cultivos de micromasa. **(a)** cultivo sin tratamiento. **(b)** DMSO 0,25% v/v. **(c)** misoprostol 20 pg/mL + L-798106 1 μ M. **(d)** misoprostol 200 pg/mL + L-798106 1 μ M. **(e)** misoprostol 2000 pg/mL+ L-798106 1 μ M. **(f)** misoprostol 20000 pg/mL+ L-798106 1 μ M. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

Al comparar la captación de RN de las células tratadas con misoprostol con la captación de RN de aquellas tratadas con misoprostol + L-798106, se observa que en los cultivos expuestos a 20, 200 y 2.000 pg/mL de misoprostol no varían los resultados cuando están en conjunto con el antagonista. No obstante, a 20.000 pg/mL, el aumento en la captación de RN inducida por misoprostol se revierte en presencia de L-798106 (figura 25).

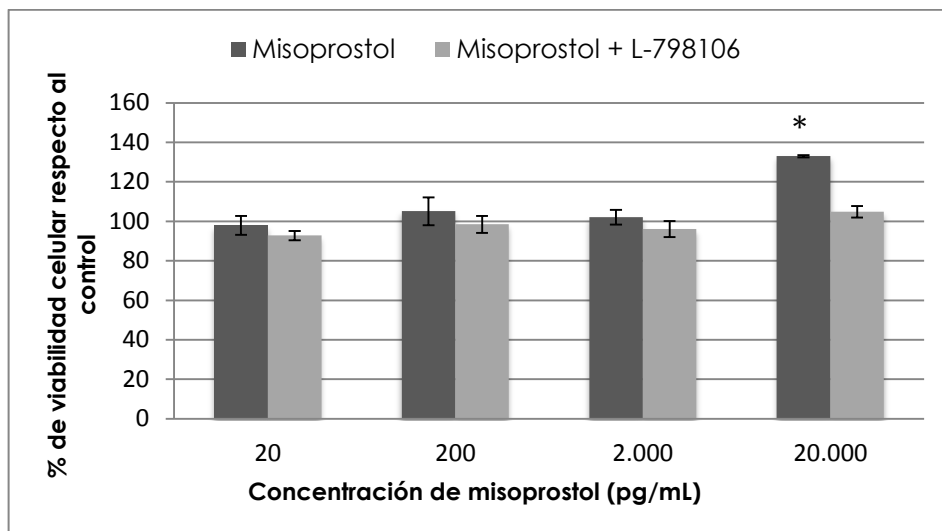


Figura 25. Viabilidad celular en presencia de misoprostol sólo y con L-798106 1 μ M. 20 pg/mL de misoprostol, 200 pg/mL de misoprostol, 2.000 pg/mL de misoprostol, 20.000 pg/mL de misoprostol. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor $p < 0,05$.

En cuanto a la tinción de GAGs, el control de vehículo, DMSO, no presentó diferencias significativas con respecto al control, ya que el porcentaje de diferenciación celular fue $97,2 \pm 5$.

Por otro lado, los cultivos tratados con misoprostol y L-798106 mostraron una disminución de la diferenciación celular (fig. 26), hecho que se observa en todas las concentraciones estudiadas (20, 200, 2.000 y 20.000 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μ M). Además, se destaca que todos los valores resultaron estadísticamente significativos luego de ser sometidos al análisis de varianza. La figura 27 muestra de manera gráfica lo expuesto anteriormente.

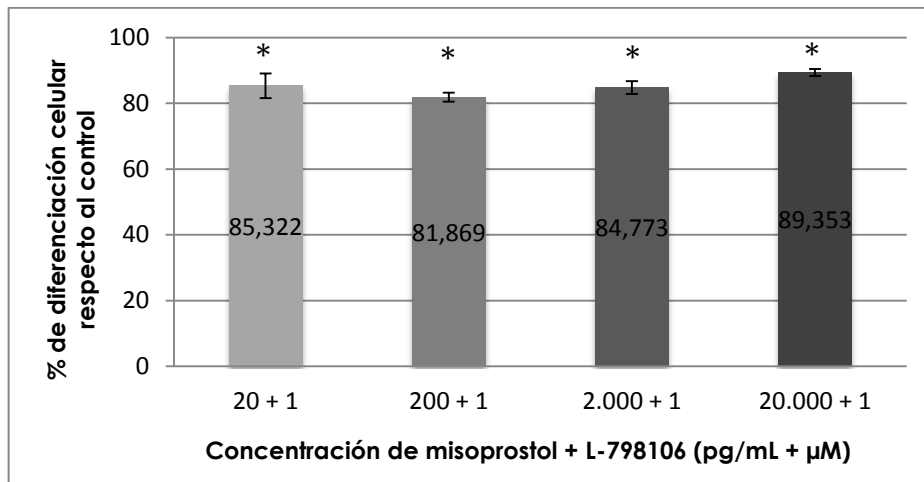


Figura 26. Diferenciación celular en presencia de misoprostol y L-798106. 20 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 200 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 2.000 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM, 20.000 pg/mL de misoprostol + L-798106 1 μM. Los resultados se presentan como promedio ± error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor p < 0,05.

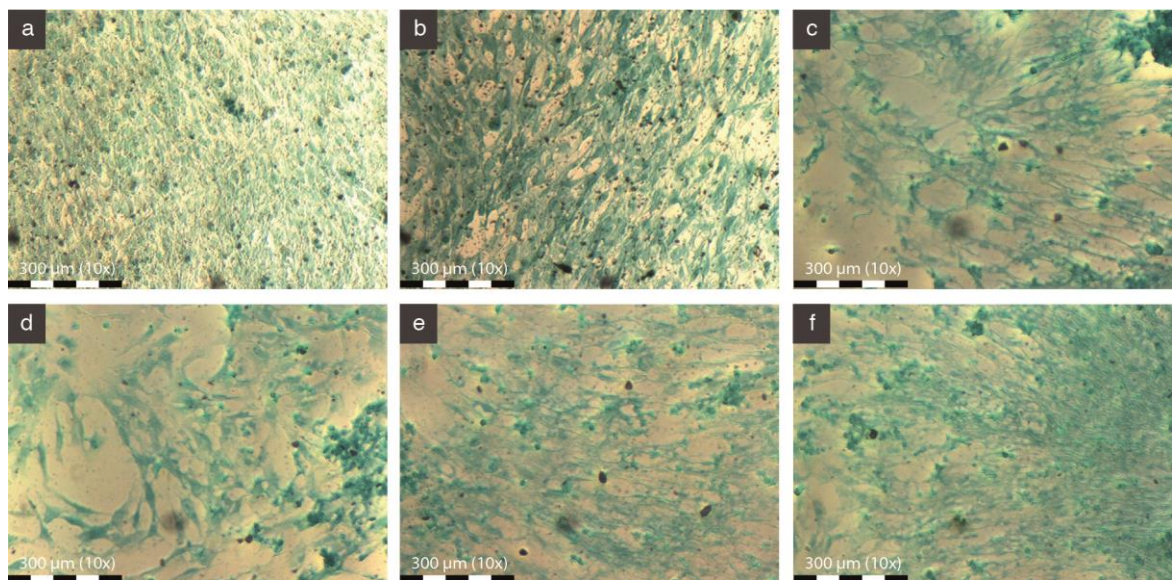


Figura 27. Tinción de GAGs con azul alciano en cultivos de micromasa. **(a)** Cultivo sin tratamiento. **(b)** DMSO 0,25% v/v. **(c)** misoprostol 20 pg/mL + L-798106 1 μM. **(d)** misoprostol 200 pg/mL + L-798106 1 μM. **(e)** misoprostol 2.000 pg/mL + L-798106 1 μM. **(f)** misoprostol 20.000 pg/mL + L-798106 1 μM. Fotografía en microscopía óptica (10x), cámara micro imaging modelo CMOS 3,2 Mp.

Con el fin de tener un panorama más claro del efecto del antagonista EP3 sobre los cultivos de micromasa, se comparó los resultados de diferenciación celular obtenidos en presencia de misoprostol solo, con los obtenidos en presencia de misoprostol + L-798106. Al hacer esto, se vio que en la totalidad de los tratamientos disminuyó la tinción de los GAGs cuando el antagonista EP3 estaba presente, dicha disminución fluctuó entre el 5% y 20% menos con respecto a los cultivos que sólo contenían misoprostol (figura 28).

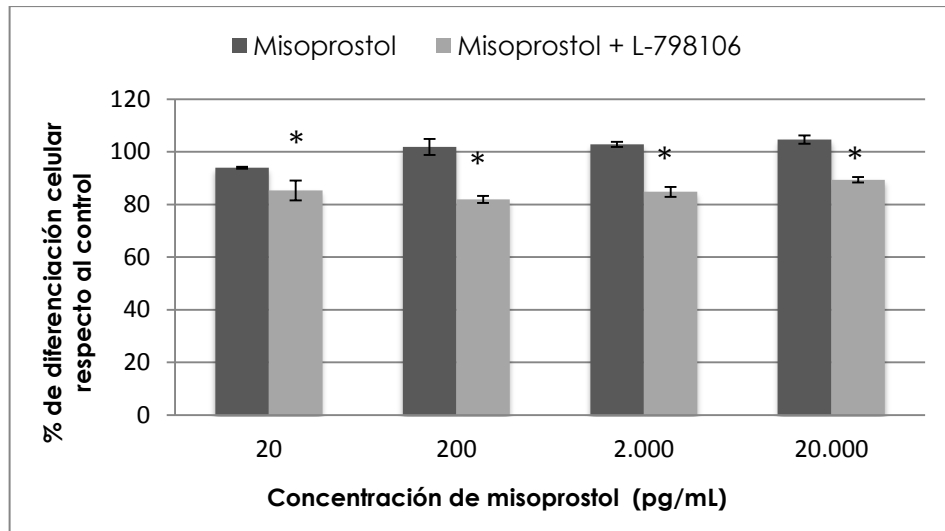


Figura 28. Diferenciación celular en presencia de misoprostol solo y con L-798106 1 μ M. 20 pg/mL de misoprostol, 200 pg/mL de misoprostol, 2.000 pg/mL de misoprostol, 20.000 pg/mL de misoprostol. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar del promedio; n=3; * diferencia significativa respecto al control; valor p < 0,05.

Misoprostol es un derivado de PGE₁ que además de proteger la mucosa gástrica, posee acción abortiva mediada por un aumento en la frecuencia e intensidad de las contracciones uterinas (Faundes, 2005). Aunque este medicamento no se ha demostrado mutagénico, fetotóxico o teratígeno en animales de experimentación a dosis más altas que las utilizadas en humanos (Kotsonis et al., 1985), existen diversos reportes de casos que asocian una exposición prenatal a misoprostol con la manifestación de malformaciones congénitas (Fonseca et al., 1991; Gonzalez et al., 1993; Hofmeyr et al., 1998; Genest et al., 1999) hecho que se ha corroborado con investigaciones de tipo casos y controles (Pastuszak et al., 1998; Schüler et al., 1999; Orioli y Castilla 2000; Vargas et al., 2000). Gracias a esta evidencia es que misoprostol se ha encasillado en la categoría X de la clasificación de drogas con riesgo abortivo y teratígeno de la FDA. Entre las malformaciones producidas por la droga se incluyen defectos de osificación de cráneo, hidrocefalia, porencefalia, síndrome de Moebius, defectos de reducción de miembros, sindactilia, y artrogriposis (González, 1998 ; Orioli y Castilla , 2000; Osorio et al., 2007; Cavieres, 2011; Vauzelle et al., 2013). Si bien, estos defectos están descritos en la literatura, aún se desconoce el mecanismo que media su teratogénesis, lo que se debe en parte a la falta de modelos para su estudio. La hipótesis que se maneja actualmente es que los efectos teratogénicos del misoprostol se producirían por una disrupción vascular (Holmes, 2002; Bos-Thompson et al., 2008).

En la búsqueda de modelos para estudiar la teratogénesis *in vivo* de misoprostol, se realizaron pruebas en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso para estudiar el efecto del medicamento en dosis de hasta 10 mg/kg de peso, vía oral, administradas a ratas en DG 9 y 10. Sin embargo, no se observaron efectos teratogénicos (datos no publicados). En contraposición a lo señalado anteriormente, en el año 2011 se llevó a cabo en este mismo Laboratorio un estudio *in vitro* en el cual se evaluó la embriotoxicidad de misoprostol utilizando el ensayo de cultivo de embriones postimplantación, observándose que esta PG sintética inducía un efecto embriotóxico de manera dosis dependiente (200, 2.000 y 20.000 pg/mL) reflejado en la disminución de viabilidad de los embriones, de su función y morfometría (Campos y Cavieres, 2011). Esto sugiere que misoprostol posee un efecto embriotóxico independiente de la hipoxia causada por las contracciones uterinas.

Siguiendo esta línea de investigación, en el año 2012 se utilizó el ensayo de micromasa para estudiar el mecanismo que desencadena defectos congénitos en extremidades a través de la determinación de viabilidad y diferenciación de células mesenquimáticas. Las conclusiones desprendidas de este estudio fueron que misoprostol induciría la viabilidad de las células mesenquimales y promovería levemente su diferenciación a condrocitos (Flores, 2012). A pesar de que los efectos no fueron estadísticamente significativos, surgió la inquietud de evaluar si este

aumento en la viabilidad fue por una mayor actividad lisosomal, o por un aumento en la proliferación celular inducida por misoprostol. De esta forma, en esta tesis se buscó evaluar el efecto de misoprostol sobre la proliferación celular en el modelo de micromasa. La metodología utilizada se basó en el protocolo INVITTOX N° 122 descrito por Brown en 2010, protocolo que fue evaluado en el estudio de validación de embriotoxicidad de la ECVAM (1996-2000).

Los cultivos primarios de células de PE de origen mamífero, reproducen la histogénesis de cartílago, el cual es un paso fundamental en la morfogénesis del esqueleto. En este proceso de desarrollo se incluyen varias funciones como proliferación celular, diferenciación, comunicación célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular (MEC), por lo que interferencias con el desarrollo de estas funciones básicas puede proporcionar puntos finales teratogénicos (Brown, 2010). Por lo tanto, este simple sistema de cultivos de micromasa parece ser un buen modelo con el que estudiar el potencial teratogénico de compuestos químicos, hecho que se ha demostrado desde los inicios de este ensayo, en donde se determinó que la exactitud global del sistema fue de un 89%, la tasa de falsos negativos fue sólo de un 14,8% y no se detectaron falsos positivos (Guntakatta et al., 1984). Esto también se ha comprobado en investigaciones posteriores en las que se han evaluado diferentes compuestos a través de este método obteniendo resultados concluyentes (Bacon et al., 1990; Minta, 2003; Minta et al., 2005).

Otra ventaja del ensayo de micromasa, es que al ser un ensayo *in vitro* disminuye el uso de animales, ayudando así a mitigar los conflictos éticos que supone el empleo de éstos en investigación. Por lo tanto, este modelo acoge la norma de las tres erres (Russel y Burch, 1959), la que consiste en el reemplazo de animales de experimentación en la evaluación de toxicidad, en su reducción y en la ejecución de un refinamiento del diseño de estudio para disminuir el estrés producido. Finalmente, en comparación con un estudio *in vivo*, el test de micromasa requiere menos tiempo para su realización, lo que además se traduce en menores costos (Guntakatta et al., 1984).

No obstante, al ser un ensayo *in vitro*, este modelo de cultivos de micromasa posee algunas debilidades, como por ejemplo la ausencia de procesos farmacocinéticos, ya que al ser un sistema “cerrado” no está presente la interacción con la placenta (Brown, 1987). Además, los resultados de los ensayos que utilizan cultivos celulares primarios pueden verse afectados por variables como las diferencias entre los animales (Bacon et al., 1990).

Con el fin de otorgar validez a los resultados obtenidos se realizaron controles de calidad internos correspondientes a penicilina G (control negativo) y 5-FU (control positivo). En el caso de los cultivos sometidos por 5 días al control negativo, éstos no difirieron significativamente de los

cultivos que sólo contenían medio, ya que como se señaló en los resultados, los porcentajes de viabilidad y diferenciación celular no difirieron en más del 10%, lo que concuerda con lo descrito por Minta en el año 2003. Este hecho era de esperarse, puesto que una de las características de penicilina G es su ausencia de toxicidad en los cultivos de células de mamíferos (Eagle, 1954; Smith et al., 1983) .

Contrariamente, en el caso de 5-FU la viabilidad celular disminuyó de forma concentración-dependiente, observándose además un efecto citotóxico a las concentraciones más elevadas (fig.14). Esta citotoxicidad se debe a dos mecanismos de acción, la inhibición de la timidilato sintetasa -que participa en la síntesis y reparación del ADN- y la incorporación al ARN (Flórez, 2003). Por otro lado, las células cultivadas por 5 días en presencia del control positivo disminuyeron su diferenciación a condrocitos a medida que aumentó la concentración, lo que se manifestó en una disminución de la absorbancia. Cabe destacar que los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con estudios previos (Minta, 2003; Flores, 2012) por lo que podríamos decir que el ensayo de micromasa cuenta con una buena reproducibilidad.

Los resultados de esta tesis coinciden con lo informado por Flores (2012), quien determinó que la captación de rojo neutro por parte de las células mesenquimales tratadas con misoprostol a una concentración de 20.000 pg/mL era de $129 \pm 15\%$ en relación al control, resultado que en nuestro caso fue $132 \pm 0,6\%$. Este aumento significativo en la captación de RN sólo se observó a la concentración más alta, lo cual se podría explicar por la teoría de la ocupación de Clark, que establece que el efecto farmacológico es proporcional al nivel de estímulo generado (Flórez, 2003), es decir que la respuesta estará en función de la fracción de receptores ocupada por el fármaco, lo que a su vez depende del número total de receptores y de la concentración del fármaco. En nuestro caso, al aumentar la concentración de misoprostol un mayor número de receptores son ocupados y por ende se genera una respuesta mayor. Es importante mencionar que misoprostol posee menor afinidad por el receptor EP3 –involucrado en el proceso de formación ósea- que PGE₁ y PGE₂ (Narumiya et al., 1999) por lo tanto, cuando misoprostol se encuentra en menor concentración con respecto a estos eicosanoides endógenos la probabilidad de unión con el receptor es menor, pero cuando la concentración de misoprostol se eleva por sobre la concentración de las PGs endógenas esta probabilidad de unión aumenta.

Por otro lado, se observó un aumento abrupto de la proliferación celular a la concentración más elevada de misoprostol (20.000 pg/mL), lo que coincide con el aumento de captación de rojo neutro a esta misma concentración. Esto podría explicarse mediante un agonismo de misoprostol sobre los receptores prostanoideos, ya que se sabe que este medicamento actúa sobre los mismos

receptores que PGE₂ (Narumiya et al., 1999), y además se sabe que PGE₂ afecta a la proliferación celular de condrocitos por estimulación de la síntesis de ADN (Brochhausen et al., 2006). Esto nos lleva a hipotetizar que al haber una mayor ocupación de receptores prostanoideos por la alta concentración de misoprostol, éste actuaría agonizándolos, desencadenando así un aumento en la proliferación celular.

En cuanto a misoprostol y diferenciación celular no se observaron diferencias importantes en relación al control en ninguna de las concentraciones estudiadas, lo que concuerda con lo descrito previamente por Boskey en 1996, quien observó que una concentración de 2.500 ng/mL de misoprostol no afectaba la diferenciación de células mesenquimales de PE de pollo a condrocitos. Esto nos muestra que viabilidad y diferenciación son procesos totalmente independientes, ya que el aumento de uno no necesariamente implica el aumento del otro.

En cuanto al antagonista del receptor EP3, éste revirtió el aumento de captación de RN producido por misoprostol a la concentración más elevada, los datos obtenidos muestran que al cultivar las células en presencia de 20.000 pg/mL de misoprostol más 1 mM de L-798106, la captación de rojo neutro disminuye en un $28 \pm 5\%$ con respecto a los cultivos tratados sólo con misoprostol. Esto podría significar que el receptor EP3 también participa en la mantención del normal funcionamiento de la célula, ya que sabemos que EP3 se expresa en cultivos de condrocitos (Brochhausen et al., 2006), y que además, algunas de las isoformas de EP3 comparten vías de señalización con los receptores EP2 y EP4 (ver fig. 4), los que participan activamente en el proceso de formación ósea (Biddulph et al., 1988).

Por otro lado, el antagonista L-798106 disminuyó la diferenciación celular en aproximadamente un 20% en los tratamientos estudiados (ver fig. 28). Como se mostró en los resultados, misoprostol no ejerció un efecto adicional en la tinción de los GAGs con respecto al control, pero al agregar el antagonista y bloquear el receptor EP3, la diferenciación celular basal disminuye, lo que podría deberse al impedimento de la acción de las PGs endógenas presentes en los cultivos, interfiriendo así en el proceso normal de diferenciación. Por lo tanto, podríamos decir que el receptor prostanoide EP3 es responsable de aproximadamente un 20% de la diferenciación de las células mesenquimales de PE de rata a condrocitos.

En conclusión, en el modelo estudiado, misoprostol no provoca cambios importantes en viabilidad ni en diferenciación de células mesenquimáticas provenientes de primordios de extremidades de rata. Los efectos observados a 20.000 pg/mL, no serían representativos de una situación real, puesto que es una concentración demasiado alta en comparación a las concentraciones farmacológicas alcanzadas en una mujer a la que se ha administrado el

medicamento. Por ejemplo, una dosis de 400 µg de misoprostol vía vaginal produce una concentración plasmática de ácido misoprostico (metabolito activo de misoprostol) de alrededor de 200 pg/mL (Zieman et al., 1997; Khan et al., 2004). Por lo tanto, no podemos explicar el mecanismo de embriotoxicidad de misoprostol por esta observación.

Gracias a los resultados obtenidos en esta tesis, se infiere que el mecanismo teratógeno de misoprostol sobre extremidades no estaría relacionado con los procesos de proliferación, viabilidad y diferenciación de células mesenquimales, por lo que es interesante utilizar otros ensayos para dilucidar esta interrogante. Actualmente en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso, se está llevando a cabo un ensayo *in vitro* utilizando la técnica de cultivo de fetos post implantación en DG 13,5, en el cual se ha observado que los embriones cultivados en presencia de 200, 2.000 y 20.000 pg/mL de misoprostol presentan disminución del desarrollo del modelo cartilaginoso de los rayos digitales anteriores, además de alteración de la forma y generación de hendiduras anormales en la pata fetal (Oscar Madrid, comunicación personal). Estas observaciones se complementan con las de esta tesis y sugieren que los defectos esqueléticos inducidos por misoprostol serían mediados por mecanismos distintos a los estudiados en el ensayo de micromasa.

VII. CONCLUSIONES

1. El aumento en la captación de rojo neutro por parte de células mesenquimales provenientes de PE de rata en DG 13,5 provocado por 20.000 pg/mL de misoprostol se debe a un aumento en la proliferación de estas células.
2. Utilizando el modelo de cultivos de micromasa, misoprostol no ejerce cambios significativos en la diferenciación de células mesenquimales provenientes de PE de rata en DG 13,5 a condrocitos.
3. El incremento en la captación de rojo neutro por parte de las células mesenquimales que se produce por misoprostol a 20.000 pg/mL se ve revertido por el antagonista de receptor EP3, L-789106 en concentración 1 μ M.
4. La diferenciación de células mesenquimales de PE de rata en DG 13,5 a condrocitos se ve disminuida por la presencia del antagonista EP3, L-789106 en concentración 1 μ M.

VIII. REFERENCIAS

- Adachi S., Tokuda H., Matsushima-Nishiwaki R., Kato K., Natsume H., Minamitani C., Kozaw O. (2009). Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E(1)-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 90 (1-2), 1–6.
- Akhter M. P., Cullen D. M., Gong G. & Recker R. R. (2001). Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. *Bone.* 29 (2), 121–5.
- Alander C. B. & Raisz L. G. (2006). Effects of selective prostaglandins E2 receptor agonists on cultured calvarial murine osteoblastic cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 81 (3-4), 178–83.
- Allen R. & O' Brien B. (2009). Uses of Misoprostol in Obstetrics and Gynecology. *Rev Obstet Gynecol.* 2 (3), 159–168.
- Almquist E., Bach A., Chaplin D., Graubert C., Hall J., Hill D., Staheli L. E. (2008). Arthrogyposis, a Text Atlas. (Staheli L. E., Hall J. G., Jaffe K. M. & Pahlke D. O., Eds.) (pp. 2–4). New York: Press syndicate of the university of Cambridge.
- Arévalo J A, Páez D, Rodríguez V. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova - Publicación científica.* 5, 177-184.
- Bacon W. J., Duffy P. & Jones K. (1990). Studies on variability of the micromass teratogen test. *Toxicol in vitro.* 4 (4-5), 577–81.
- Bamshad M., Van Heest A. E. & Pleasure D. (2009). Arthrogyposis: a review and update. *J Bone Joint Surg Am.* 91 (4), 40–6.
- Bassil K., Borman R., Jarvie E. M., Mc Arthur-Wilson R. J., Thangiah R., Sung E. Z., Sanger G. J. (2008). Activation of prostaglandin EP receptors by lubiprostone in rat and human stomach and colon. *Br J Pharmacol.* 154 (1), 126–35.
- Biddulph D. M., Sawyer L. M. & Dozier M. M. (1988). Chondrogenesis in chick limb mesenchyme in vitro derived from distal limb bud tips: changes in cyclic AMP and in prostaglandin responsiveness. *J Cell Physiol.* 136 (1), 81–7.
- Bilson H., Mitchell D. L. & Ashby B. (2004). Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns. *FEBS Lett.* 572 (1-3), 271–5.

- Bonilla-Musoles F., Machado L., Bailao L. A., Blanes J., Rizzi M. C. & Raga F. (2002). Arthrogryposis multiplex congenita (multiple congenital contractures): a review. *Prog Obstet Ginecol.* 45 (4), 150–156.
- Bos C. L., Richel D. J., Ritsema T., Peppelenbosch M. P. & Versteeg H. H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 36 (7), 1187–205.
- Bos-Thompson M.-A., Hillaire-Buys D., Roux C., Faillie J.-L. & Amram D. (2008). Möbius syndrome in a neonate after mifepristone and misoprostol elective abortion failure. *Ann Pharmacother.* 42 (6), 888–92.
- 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.
- Breyer R. M., Bagdassarian C. K., Scott A. & Breyer M. D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41, 661–90.
- Brochhausen C., Neuland P., Kirkpatrick C. J., Nüsing R. M. & 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 (3), R78.
- Brown N. A. (1987). Teratogenicity testing in vitro: status of validation studies. *Arch Toxicol.* 114S, 105–114.
- Brown N. A. (2010). The micromass test-method of Brown. Protocolo Invitox nº 122. *ECVAM DBALM.*
- Campos C. & Cavieres M. F. (2011). Evaluación de la embriotoxicidad de misoprostol utilizando el ensayo cultivo de embriones postimplantación. *Rev Med Chile.* 139 (1), 613–617.
- Cavieres M. F. (2011). Toxicidad del misoprostol sobre la gestación. Revisión de la literatura. *Rev Med Chile.* 139, 516–523.
- Chaabane S. & Bérard A. (2013). Epidemiology of major congenital malformations with specific focus on teratogens. *Curr Drug Saf.* 8 (2), 128–40.

- Chiong M. A. & Cutiongco-de la Paz M. (2009). Misoprostol teratogenicity in six filipino children : a case series. *Acta Med Philipp.* 43 (1), 52–56.
- Clark C., Schwarz E. M., Zhang X., Ziran N. M., Drissi H., O’Keefe R. J. & Zuscik M. J. (2005). Differential regulation of EP receptor isoforms during chondrogenesis and chondrocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 328 (3), 764–76.
- Coelho K. E., Sarmiento M. F., Veiga C. M., Speck-Martins C. E., Safatle H. P., Castro C. V. & Niikawa N. (2000). Misoprostol embryotoxicity: clinical evaluation of fifteen patients with arthrogyriposis. *Am J Med Genet.* 95 (4), 297–301.
- Coleman R., Smith W. L. & Narumiya S. (1994). International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 46 (2), 205–29.
- Collins P. W. (1990). Misoprostol: discovery development and clinical applications. *Med Res Rev.* 10 (2), 149–172.
- Eagle H. (1954). The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. III. The binding of penicillin by mammalian cells in tissue culture. *J Exp Med.* 100 (1), 117–124.
- Faundes A, editor. (2005). *Uso de misoprostol en obstetricia y ginecología.* Santa Cruz: Federación Latinoamericana de Sociedades de Obstetricia y Ginecología (FLASOG).
- Flores S. (2012). Determinación del efecto de misoprostol en cultivo de células mesenquimales de primordios de extremidades de rata mediante ensayo de micromasa. *Tesis para optar al título de químico farmacéutico.* Valparaíso, Chile.
- Flórez J., Armijo J. A. & Mediavilla A. (2003). *Farmacología humana.* Barcelona: Masson.
- Fonseca W., Alencar A., Bastos F. & Luna H. (1991). Misoprostol and malformations. *The Lancet.* 338, 56.
- Freshney R. I. (2005). *Culture of animal cells, a manual of basic technique.* 5th Ed. Hoboken N.J. John Wiley & Sons.
- Fujino H., Murayama T. & Regan J. W. (2010). Assessment of constitutive activity in E-type prostanoid receptors. *Meth Enzymol.* 484, 95–107.

Gay S. W. & Kosher R. (1984). Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor cells of the chick limb bud: effect of prostaglandins. *J Exp Zool.* 232 (2), 317–26.

Gay S. W. & Kosher R. (1985). Prostaglandin synthesis during the course of limb cartilage differentiation in vitro. *J Embryol Exp Morphol.* 89, 367–82.

Genest D. R., Di Salvo D., Rosenblatt M.J, Holmes L.B. (1999). Terminal transverse limb defects with tethering and omphalocele in a 17 week fetus following first trimester misoprostol exposure. *Clin Dismorphol.* 8 (1), 53-8.

Gilbert Scott F.(2005). *Biología del Desarrollo*. Buenos Aires-Madrid: 7a ed. Editorial Médica Panamericana.

Goldberg A. B., Greenberg M. B. & Darney P. D. (2001). Misoprostol and Pregnancy. *N Engl J Med.* 344, 38-47.

Gonzalez C. H., Marques-Dias M. J., Kim C., Sugayama S. M., Da Paz J., Huson S. M. & Holmes L. B. (1998). Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet.* 351 (9116), 1624–7.

Gonzalez, C. H., Vargas, F. R., Perez, A. B., Kim C. A., Brunoni D., Marques-Dias M. J., de Almeida J. C. (1993). Limb deficiency with or without Möbius sequence in seven Brazilian children associated with misoprostol use in the first trimester of pregnancy. *Am Journal Med Genet.* 47 (1), 59–64.

Guntakatta M., Matthews E. J. & Rundell J. O. (1984). Development of a mouse embryo limb bud cell culture system for the estimation of chemical teratogenic potential. *Teratog Carcinog Mutagen.* 4 (4), 349–64.

Hakeda Y., Nakatani Y., Hiramatsu M., Kurihara N., Tsunoi M. & Ikeda E. (1985). Inductive effects of prostaglandins clone on alkaline phosphatase in osteoblastic. *J Biochem.* 97 (1), 97–104.

Harada, S., Nagy, J. a, Sullivan, K. a, Thomas, K. a, Endo, N., Rodan, G. a, & Rodan, S. B. (1994). Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest.* 93 (6), 2490–6.

- Hassell J. R. & Horigan E. (1982). Chondrogenesis: a model developmental system for measuring teratogenic potential of compounds. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2 (3-4), 325–31.
- Hatae N. (2003). Cooperation of two subtypes of PGE 2 receptor , Gi coupled EP3 and Gs coupled EP2 or EP4 subtype. *Yakugaku Zasshi.* 123 (10), 837–843.
- Hirata T. & Narumiya S. (2011). Prostanoid receptors. *Chem Rev.* 111 (10), 6209–30.
- Hofmeyr G. J., Milos D., Nikodem V. C. & De Jager M. (1998). Limb reduction anomaly after failed misoprostol abortion. *SAMJ.* 88 (5), 5–6.
- Holmes L. B. (2002). Teratogen-induced limb defects. *Am J Med Genet.* 112 (3), 297–303.
- Igarashi K., Hirafuji M., Adachi H., Shinoda H., Mitani H. (1994). Role of endogenous PGE in osteoblastic functions of a clonal osteoblast-like cell, MC3T3-E1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 50, 169–172.
- Kalampokas, E., Kalampokas, T., Sofoudis, C., Deligeoroglou, E., & Botsis, D. (2012). Diagnosing arthrogyrosis multiplex congenita: a review. *Obstet Gynecol.* 264, 9-18.
- Khan R.U., Refaey H., Sharma S., Sooranna D., Stafford M. (2004). Oral, rectal, and vaginal pharmacokinetics of misoprostol. *Obstet Gynecol.* 103, 866-70.
- Ke H. Z., Crawford D. T., Qi H., Simmons H. A., Owen T. A., Paralkar V. M. (2006). A nonprostanoid EP4 receptor selective prostaglandin E2 agonist restores bone mass and strength in aged ovariectomized Rats. *J Bone Min Res.* 21 (4), 565-575.
- Klein D. C. & Raisz L. G. (1970). Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology.* 86, 1436-1440.
- Kotsonis F. N., Dodd D. C., Regnier B. & Kohn F. E. (1985). Preclinical toxicology profile of misoprostol. *Digest Dis Sci.* 30 (11), 142S–146S.
- Langille, R. M. (1994). Chondrogenic differentiation in cultures of embryonic rat mesenchyme. *Microsc Res Techniq.* 28 (6), 455–69.
- Larrubia O. & Pérez J. (2010). Fármacos y embarazo. *Terapéutica.* 0 (1762), 66-71.

- Maier R. (1980). Biochemistry of prostaglandins. *Pharm Weekblad*. 2 (1), 642–647.
- Martínez I., Reyes K., Martínez Y. & Montes de Oca G. (2013). Diagnóstico prenatal de artrogriposis múltiple congénita. *Rev Cubana Ped*. 85 (1), 137–144.
- 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. *B Vet I Pulawy*. 47 (2), 533–540.
- Minta M., Wilk I. & Zmudzki J. (2005). Inhibition of cell differentiation by quinolones in micromass cultures of rat embryonic limb bud and midbrain cells. *Toxicol in vitro*. 19 (7), 915–9.
- Moore K. L., Persaud T. V., Torchia M. G. (2013). Embriología clínica. España. Madrid: 9a ed. Editorial Elsevier.
- Narumiya S., Sugimoto Y. & Ushikubi F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 79 (4), 1193–226.
- National Academy of Sciences. (2010). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington DC.
- Nazer H J. & Cifuentes O. L. (2011). Congenital malformations in Latin America in the period 1995-2008. *Rev Med Chile*. 139 (1), 72–8.
- Organización Mundial de la Salud. (2012). Notas descriptivas: *Anomalías Congénitas*. Nota descriptiva N° 317. Consulta: 10 Octubre 2013, <<http://www.who.int> >
- Orioli I. M. & Castilla E. E. (2000). Epidemiological assessment of misoprostol teratogenicity. *BJOG*. 107 (4), 519–23.
- Osorio A., Rodríguez J., Pizarro O., Paredes A., Aguilera S. (2007). Embriopatías asociadas al uso de misoprostol. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 72 (5), 346–351.
- Paralkar V. M., Borovecki F., Ke H. Z., Cameron K. O., Lefker B., Grasser W., Thompson D. D. (2003). An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (11), 6736–40.

- Pastuszek A., Schüler L., Speck-Martins C., Cohelo K., Cordello S., Vargas S., Koren G. (1998). Use of misoprostol during pregnancy and Möbius' syndrome in infants. *N Engl J Med.* 338 (26), 1881–1885.
- Pérez-Landeiro A., Allende-Bandrés M. A., Fernández M. J. & Palomo P. (2002). Teratogénesis : clasificaciones. *Farm Hosp.* 26 (3), 171–177.
- Pilbeam C. C., Choudhary S., Blackwell K. & Raisz L. G. (2008). Prostaglandins and bone metabolism. *Principles of Bone Biology* (3rd ed., pp. 1235–1271). Elsevier Inc.
- Raisz L. G. & Chyun Y. S. (1984). Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins.* 27 (1), 97–103.
- Raisz, L. G., & Woodiel, F. N. (2003). Effects of selective prostaglandin EP2 and EP4 receptor agonists on bone resorption and formation in fetal rat organ cultures. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71 (3-4), 287–292.
- Repetto G., del Peso A. & Zurita J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols.* 3 (7), 1125–31.
- Ross M. H. & Wojciech P. (2008). Histología. Buenos Aires: 5a ed. Editorial Médica Panamericana.
- Russell W.M.S. & Burch R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London.
- Sadler T. W. (2009). Langman: Embriología médica. España. Barcelona: 11a ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins.
- Sakuma Y., Tanaka K., Suda M., Yasoda A., Natsui K., Tanaka I., Nakao K. (2000). Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res.* 15 (2), 218–27.
- Schüler L., Pastuszek A., Sanseverino M., Orioli I. M., Brunoni D., Ashton-Prolla P., Koren G. (1999). Pregnancy outcome after exposure to misoprostol in Brazil: a prospective controlled study. *Reprod Toxicol.* 13 (2), 147–151.

- Smith M. K., Kimmel G. L., Kochhar D. M., Shepard T.H., Spielberg S.P. (1983). A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratog Carcinog Mutagen.* 3 (6), 461-80.
- Sugimoto Y. & Narumiya S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 282 (16), 11613–7.
- Suzawa T., Miyaura C., Inada M., Maruyama T., Sugimoto Y., Ushikubi F., Suda T. (2000). The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology.* 141 (4), 1554–9.
- Ushikubi F., Sugimoto Y., Ichikawa A. & Narumiya S. (2000). Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoids receptors. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 279–285.
- Vargas F. R., Schuler-Faccini L., Brunoni D., Kim C., Meloni V. F., Sugayama S. M., Addis A. (2000). Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Amer J Med Gen.* 95 (4), 302–6.
- Vauzelle C., Beghin D., Cournot M.-P. & Elefant E. (2013). Birth defects after exposure to misoprostol in the first trimester of pregnancy: prospective follow-up study. *Reprod Toxicol.* 36, 98–103.
- Watkinson G., Hopkins A. & Akbar F.A. (1988). The therapeutic efficacy of misoprostol in peptic ulcer disease. *Postgrad Med J.* 64, 60-77.
- Webster W. S. & Abela D. (2007). The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res. Part C.* 81 (3), 215–28.
- Yokota K., Kusaka M., Ohshima T., Yamamoto S., Kurihara N., Yoshino T. & Kumegawa M. (1986). Stimulation of prostaglandin E2 synthesis in cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1) by epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 261 (33), 15410–5.
- Yoshida K., Oida H., Kobayashi T., Maruyama T., Tanaka M. (2012). Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (7), 4580-5.
- Zieman M., Fong S., Benowitz N., Bankster D., Darney P.D. (1997). Absorption kinetics of misoprostol with oral or vaginal administration. *Obstet Gynecol.* 90, 88-92.

