

Interpretación diagnóstica de las anomalías congénitas en ensayos preclínicos.

Diagnostic interpretation of congenital anomalies in preclinical trials.

Alian Hernández González^a, Mara Dunia Quintana Utra^b

^a Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT) Ave 101 No. 6214 e/ 62 y 100. Loma de Tierra, Cotorro, La Habana Tel: (53) 7682 6181. fiv@cima-minag.cu

^b Universidad Agraria de la Habana (UNAH) Kilómetro 23 1/2 Autopista Nacional y Carretera a Tapaste. San José de Lajas, Mayabeque Tel: 47860286. mdutra@unah.edu.cu.

Recibido: 23 de octubre de 2019;

Aceptado: 6 de febrero de 2020;

RESUMEN

La presente revisión tiene como objetivo puntualizar aspectos generales sobre los mecanismos de producción de anomalías congénitas y los elementos a tener en cuenta para su detección e interpretación en ensayos preclínicos. Los defectos congénitos pueden ser provocados por cualquier agente que perturbe con suficiente intensidad alguno de los mecanismos del proceso de desarrollo embrionario fetal. Por tanto, su identificación cobra gran importancia en los ensayos preclínicos de potencial teratológico, que tienen como objetivo asegurar que un fármaco determinado puede ser usado durante la gestación sin consecuencias negativas. Lo anterior se logra a través de procedimientos estandarizados, como la tinción de fetos con rojo de alizarina para evaluar la morfología esquelética y la fijación fetal en solución de Bouin para evaluar la morfología visceral. Algunos de los defectos más comunes se encuentran en la pared abdominal (gastrosquisis, onfalocele) o en forma de variaciones esqueléticas (costillas supernumerarias, osificación pobre), por lo que deben interpretarse cuidadosamente para esclarecer si su aparición está relacionada con la administración de un fármaco.

Palabras clave: anomalías congénitas; ensayos preclínicos; rojo de alizarina; solución de Bouin.

ABSTRACT

The objective of this review was to specify overall aspects about the production mechanisms of congenital anomalies, as long as the elements to take into account for their detection and assessment in preclinical studies. Any agent that disturbs, with sufficient intensity, either of the mechanisms in the embryo-fetal development process, may cause congenital defects. Therefore, their identification has major importance in teratologic potential preclinical assays, which are performed to ensure that a particular drug can be used during pregnancy without negative consequences. This can be accomplished by means of standardized processes, such as fetal staining with alizarin red for the assessment of skeletal morphology, and fetal fixation in Bouin's solution to assess visceral morphology. Some of the most common defects are located on the abdominal wall (gastroschisis, omphalocele) or in the form of skeletal variations (supernumerary ribs, poor ossification), hence, they must be carefully interpreted in order to elucidate whether its presence is related to the administration of a drug.

Keywords: congenital anomalies, preclinical studies, alizarin red, Bouin's solution.

INTRODUCCIÓN

Las anomalías congénitas se definen como todas aquellas alteraciones estructurales presentes en el momento del nacimiento y originadas por un desvío del desarrollo embrionario normal. Su estudio sistemático recibe la denominación de teratología, término que inicialmente se refería solamente a las malformaciones anatómicas macroscópicas. Sin embargo, las definiciones actuales se han extendido para incluir anomalías del desarrollo más sutiles como el retraso del desarrollo intrauterino, alteraciones conductuales, muerte intrauterina y otras deficiencias funcionales (Lane y Aucker, 2009; Barrow, 2013).

La teratología ostenta un lugar histórico en el desarrollo de pruebas preclínicas normativas, desde que en 1950 la compañía alemana Chemie-Grünenthal lanzara la talidomida, un fármaco que desató una "epidemia de malformaciones congénitas", que afectaba principalmente las extremidades. Este hecho tuvo una enorme influencia sobre la formulación de la industria farmacéutica como la conocemos hoy, y desde entonces miles de sustancias teratogénicas han sido descubiertas (Barrow, 2013).

Como consecuencia, aparecieron multitud de regulaciones que exigían el desarrollo de pruebas que permitieran asegurar que un fármaco podía ser usado durante la gestación sin consecuencias negativas, para lo cual se establecieron los estudios de potencial teratogénico. Tales estudios requieren amplios conocimientos de teratología, sustentados sobre la base de la anatomía, la embriología y la anatomía patológica. El objetivo de esta revisión es puntualizar aspectos generales sobre los mecanismos de producción de anomalías congénitas y los elementos a tener en cuenta para su detección e interpretación en ensayos preclínicos.

Generalidades

Parte del éxito de la supervivencia de los embriones y fetos durante su desarrollo depende de que cuenten con la información genética adecuada y un ambiente óptimo, sin influencias lesivas. Ante alteraciones en el material genético o la presencia de agentes nocivos, es probable que ocurran alteraciones en el desarrollo o defectos congénitos. Algunos ocasionan la muerte embrionaria o fetal, mientras que otros no son diagnosticados sino hasta el nacimiento y muchos no se reconocen en los neonatos. Por ejemplo, solo la mitad de los casos de hidrocefalia y solo el 6 % de las estenosis de píloro se detectan al nacer (Rojas y Walker, 2012).

Las anomalías congénitas suelen desarrollarse en la etapa embrionaria (momento de mayor susceptibilidad, sobre todo durante la organogénesis) y por tanto se excluyen las malformaciones posteriores al nacimiento, provocadas por fuentes externas como traumatismos, así como los daños producidos por afecciones infecciosas que se establecen una vez que el órgano ya se ha formado. Por ejemplo, un animal puede nacer con hepatitis y su hígado presentar las lesiones características. Se hablará entonces de una enfermedad fetal o una lesión fetal (Barrow, 2002).

A los efectos interpretativos de la gravedad de una anomalía determinada, resulta importante determinar si esta constituye una variación o una malformación. Las malformaciones provocan casi unívocamente efectos adversos para la supervivencia y la salud, por ejemplo, la ectopia cardiaca; mientras que las variaciones se definen como un cambio que ocurre dentro del rango de normalidad de la población y es poco probable que causen afecciones, como en el caso de las costillas supernumerarias o la polidactilia (Hofmann *et al.*, 2016).

Mecanismos de acción teratogénicos

Los efectos adversos como resultado de la exposición a teratógenos incluyen muerte embrionaria o fetal, defectos estructurales, perturbaciones del crecimiento fetal y alteraciones funcionales. Morgan *et al.* (2016) y Haroun (2017) refieren que entre los teratógenos reconocidos se encuentran algunos virus (por ejemplo, los virus de la peste porcina clásica y la diarrea viral bovina), protozoos (*Toxoplasma spp.*), factores ambientales (altas temperaturas, radiación), químicos (mercurio, alcohol) y medicamentos terapéuticos (inhibidores del sistema renina-angiotensina, talidomida, isotretinoína, warfarina, ácido valproico, carbamazepina).

Un defecto congénito en particular puede ser causado por muchos factores diferentes (alteraciones genéticas, agentes ambientales, medicamentos, condición física de la madre) así como por diferentes mecanismos, mientras que un proceso patológico específico puede ofrecer diferentes resultados en dependencia de factores tales como la edad del embrión o feto al momento de la exposición, la dosis del teratógeno, la duración del periodo de exposición y la susceptibilidad genética (van Gelder *et al.*, 2010). Se estima que el 10 % de las anomalías son atribuibles a factores ambientales, el 25 % a factores genéticos y el 65 % a causas desconocidas, probablemente multifactoriales (Rojas y Walker, 2012).

Los mecanismos mediante los cuales esos factores pueden alterar el desarrollo normal de un embrión son los mismos que determinan la embriogénesis, solo que desviados por la intervención del agente teratogénico. Se describen básicamente cinco: inducción, diferenciación celular, muerte celular, crecimiento y motilidad celular (Noden y Lahunta, 1990). Van Gelder *et al.* (2010) actualizan y amplían estos mecanismos, definiendo los siguientes seis: antagonismo del ácido fólico, disrupción de las células de la cresta neural, disrupción endocrina, estrés oxidativo, disrupción vascular y teratogénesis de receptores específicos o mediados por enzimas.

El mecanismo de inducción puede fallar de dos maneras, por carencia o por exceso. Ante una ausencia de inducción el nuevo órgano no se forma y tiene lugar una agenesia, mientras que cuando esta es incompleta puede ocurrir que el órgano inducido solamente inicie su desarrollo, siendo así una estructura parcial y dando lugar a una disgenesia. Por ejemplo: normalmente, la notocorda ejerce un efecto inductor sobre el ectodermo suprayacente, causando su transformación en neuroectodermo. Si está ausente la acción inductora de la notocorda en el extremo cefálico del embrión, se producirá agenesia encefálica o anencefalia, una malformación letal caracterizada por la ausencia del cráneo y ambos hemisferios cerebrales. Por otro lado, si el órgano o estructura inductora ejerce su acción de manera exagerada o se presenta por duplicado, se produce una duplicación del órgano inducido (Vetpraxis, 2009; Marsa *et al.*, 2015).

Son frecuentes las anomalías provocadas por fallas en el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis). El fenómeno se observa comúnmente en conductos, cuya luz permanece obliterada durante la etapa embrionaria, debido a la multiplicación de sus células de revestimiento interno (Espinosa, 2014). Normalmente, ocurre la apoptosis de estas células y la luz del conducto reaparece, pero en su ausencia se produce una malformación denominada atresia. Por otro lado, si el proceso es incompleto el conducto presentará un estrechamiento denominado estenosis. Por ejemplo: la luz del tubo intestinal de los embriones presenta áreas cerradas por la proliferación celular, que se reabren conforme avanza la gestación. Si la reapertura no ocurre se genera una atresia intestinal, y si la apertura es incompleta, una estenosis intestinal (Díaz *et al.*, 2016).

Otra causa importante de malformaciones congénitas es el estrés oxidativo, el cual está involucrado en la patogenia de un amplio espectro de defectos, incluidas las malformaciones

esqueléticas, defectos en las extremidades, labio/paladar hendido y anomalías cardiovasculares. Este fenómeno consiste en un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los mecanismos de defensa antioxidantes celulares, y tiene como consecuencia la oxidación irreversible de ADN, proteínas y lípidos, que conduce a la inactivación de muchas enzimas y a la muerte celular (van Gelder *et al.*, 2010).

El embrión en desarrollo es especialmente susceptible a los altos niveles de ERO debido a sus débiles defensas antioxidantes, particularmente en los estadios tempranos de la organogénesis, a pesar que las enzimas placentarias tienen un rol en la protección contra el estrés oxidativo. Se conoce que existen varias drogas inductoras de estrés oxidativo como mecanismo teratogénico principal, entre ellas la talidomida, el ácido valproico y algunos suplementos de hierro, aunque también se ha demostrado en estudios con animales que la hipoxia seguida de reperfusión es alta productora de ERO y, en consecuencia, teratogénica (Foster *et al.*, 2008).

En muchas ocasiones, el componente genético resulta decisivo para la presentación de anomalías congénitas. La determinación de este factor como origen del trastorno es difícil de establecer, principalmente porque se presentan manifestaciones fenotípicas diversas, que en ocasiones aparentan no estar relacionadas. Pese a esto, multitud de estudios han permitido establecer que el mecanismo de acción puede ser por interacción de uno o varios genes, siempre acompañado de un efecto decisivo de las condiciones ambientales. Tal es el caso de los defectos del tubo neural (DTN), que constituyen un grupo común de anomalías del sistema nervioso central. Surgen cuando el tubo neural, precursor embrionario del cerebro y la médula espinal, fracasa en cerrarse durante la etapa de la neurulación. Los dos tipos más importantes de DTN son la espina bífida (cierre incompleto de la columna vertebral) y la anencefalia (ausencia total o parcial del cerebro) (van Gelder *et al.*, 2010; Rojas y Walker, 2012).

Defectos de la pared abdominal

Los defectos de la pared abdominal son algunas de las anomalías congénitas más comunes. Entre ellos, la gastrosquisis y el onfalocele son dos de los más frecuentes en neonatos. La primera se caracteriza por la protrusión de los órganos abdominales a través de un pequeño orificio, usualmente al lado derecho del ombligo (Fig. 1). Su frecuencia natural de presentación en biomodelos, evaluada por varios autores en conejos Nueva Zelanda Blanco y Japanese White, oscila entre 0,08 y 1,1 % (Rorije *et al.*, 2012; Kawamura *et al.*, 2012; Allais y Reynaud, 2013).

La etiología de la gastrosquisis está sujeta a debate. La idea más común apoya la patogénesis ocurrida en el útero como un accidente vascular, y a partir de aquí se plantean dos teorías: La primera sugiere una involución de la vena umbilical, causada por la necrosis de la pared abdominal al lado derecho del defecto. La segunda teoría propone una involución prematura de la arteria vitelina causada por la fragilidad de la pared abdominal, con la consecuente ruptura y evisceración del contenido. Ambas se sustentan en las observaciones de atresia intestinal asociada a gastrosquisis, que se vinculan a la etiología isquémica (Cáceres *et al.*, 2012).

Otros autores establecen que se origina por una debilidad abdominal, que produce una hernia al lado del cordón umbilical secundaria a un defecto muscular en la integración mesenquimatosa, o a una isquemia (Díaz *et al.*, 2016). Sin embargo, es probable que tanto esta como las variantes anteriormente mencionadas desemboquen en el mismo trastorno.

Anatómicamente, se encuentra el cordón umbilical a la izquierda del defecto de la pared abdominal (la gastrosquisis del lado izquierdo es muy rara), con una sección de piel sana entre

ambos. El músculo recto (situado por fuera del defecto) es normal y las asas intestinales herniadas no están recubiertas por peritoneo, sino que están engrosadas, adheridas sobre sí mismas y cubiertas por una espesa cáscara fibrosa, con zonas de infarto (Campos Lozada y Sánchez, 2004).

El onfalocele, por su parte, constituye cerca del 40 % de los defectos de la pared abdominal diagnosticados. Se caracteriza por un gran orificio localizado en la línea media, a través del cual sobresalen los órganos abdominales recubiertos por un saco membranoso, aunque excepcionalmente este puede romperse. Su diámetro puede variar, desde una pequeña hendidura hasta grandes defectos que afectan incluso la cara anterior del tórax y la pelvis (Christison-Lagay *et al.*, 2011).

Su incidencia oscila alrededor de 1 en 4 000, aunque se conoce que muchos fetos con esta malformación no llegan a término. Este defecto es atribuido a una falla en el retorno de las asas intestinales a la cavidad abdominal, después de la rotación y herniación fisiológica en el cordón umbilical. Se diferencia macroscópicamente de la hernia umbilical en que esta última presenta las asas intestinales recubiertas por piel, no una membrana transparente (Makris *et al.*, 2009; Cáceres *et al.*, 2012).

Pérdida embrionaria y fetal

Aunque no son malformaciones ni defectos orgánicos, la pérdida embrionaria y fetal son unos de los efectos más graves de los agentes teratogénicos.

La ocurrencia de mortalidad embrionaria suele acompañarse de reabsorción, que si ocurre de forma tardía deja evidencias morfológicas que pueden utilizarse como elemento diagnóstico. Se observarán puntos oscuros en la mucosa uterina, que se corresponden con los sitios de implantación. Cuando la reabsorción es tardía, sobre estos puntos pueden identificarse fácilmente los restos embrionarios de los placentarios; mientras que cuando la reabsorción es muy temprana dichos sitios solo serán visibles después de sumergir el útero en sulfato de sodio (Buschmann, 2013; Pérez, 2014).

La muerte fetal puede ser observada de diferentes maneras, de las cuales las más comunes son la momificación fetal, la maceración fetal y el aborto (Daniels y Marley, 2008). La momificación fetal se define como la retención de un feto muerto, mientras el útero conserva un estado aséptico. Este feto se va deshidratando progresivamente y se observará disminuido de tamaño, de aspecto seco y con un color marrón o negruzco que le da la piel un aspecto similar al cuero; además el útero envuelve firmemente al feto momificado (Voglemann *et al.*, 2008; Urbano, 2010). La maceración fetal se diferencia de la anterior en que el feto muerto atraviesa un proceso de putrefacción, debido a la entrada de bacterias en el útero. Por lo general la evidencia morfológica son los huesos del feto, aunque si se produce de manera temprana, los productos de la maceración pueden ser expulsados en forma de un escaso exudado purulento.

El aborto, definido como la expulsión del feto antes de que finalice el periodo de gestación (Cruz y Moreno, 2015), es un fenómeno observado con frecuencia cuando existe exposición a teratógenos que inducen malformaciones letales. Dado que puede tener lugar varios días después de la muerte del feto, el mismo presentará cierto grado de autólisis.

Estudios de teratogenicidad

Varios episodios, como el de la talidomida, demostraron con creces la necesidad de ensayar en animales de laboratorio todos los medicamentos antes de utilizarlos en seres humanos, sobre todo cuando los pacientes potenciales son mujeres embarazadas. De aquí surge la reglamentación de realizar estudios de detección de teratogenicidad en biomodelos, que avalen o descrediten la seguridad del fármaco (Barrow, 2002).

Deben usarse obligatoriamente dos especies, una roedora (preferiblemente la rata) y una no roedora (como el conejo). El conejo tiene diferente placenta y fisiología del embarazo que los roedores y, por poner un ejemplo, presenta reducción de extremidades ante la talidomida, al contrario que la rata (Wise, 2013).

Estos estudios tienen como objetivo identificar efectos letales o de otro tipo en el feto o la madre. El tratamiento de las madres se realiza al menos desde la implantación hasta el sacrificio un día antes del parto. Se cuentan los fetos, las reabsorciones y muertes fetales, el peso fetal (que es muy sensible) y se estudia detalladamente la morfología externa, visceral y esquelética. Se considera que las manifestaciones de teratogenia más relevantes en estos casos son la muerte embrionaria o fetal, las alteraciones del crecimiento y los defectos estructurales (de Miguel *et al.*, 2010).

Análisis de toxicidad sobre las madres y examen externo de la morfología fetal

En ocasiones la aparición de anomalías congénitas no es el resultado de la acción directa del teratógeno sobre los embriones o fetos, sino que tienen su origen en un efecto tóxico de este sobre la madre, lo cual influye adversamente sobre los organismos en desarrollo. Se ha encontrado relación entre este fenómeno y varios trastornos (paladar hendido, malformaciones en las costillas, peso fetal disminuido, incremento de la mortalidad fetal), por lo que resulta de gran importancia que en los estudios convencionales de teratología se realicen pruebas que permitan determinar su ocurrencia. La toxicidad materna se observará, por lo general, en forma de reducciones significativas en la ingesta y la ganancia de peso (indicador más común y significativo), aparición de efectos adversos sobre la salud u ocurrencia de mortalidad (Rogers *et al.*, 2005; Danielsson, 2013).

Por otro lado, la realización de un examen externo de la morfología fetal resulta de gran importancia, pues permite evaluar tres de las más importantes manifestaciones de teratogenicidad: la ocurrencia de muerte fetal, la presencia de malformaciones y las alteraciones del crecimiento. En esta etapa del estudio se tienen en cuenta, además de los hallazgos evidentemente significativos, otros que permiten determinar efectos teratogénicos más complejos. Por ejemplo, se considerará relevante la aparición de tamaños de camada pequeños acompañados de bajo peso fetal, cuando lo normal es que ambos factores sean inversamente proporcionales (Buschmann, 2013; Wise, 2013).

Evaluación de la morfología esquelética y visceral fetal

El examen de las anormalidades esqueléticas y viscerales en los fetos facilita la detección de cambios relacionados con la administración de compuestos químicos. Entre los diversos métodos de laboratorio a los que se recurre para este fin, se encuentran dos de amplia aceptación y uso: la transparentación de tejidos y posterior tinción con rojo de alizarina para el examen esquelético (también denominada diafanización) y el tratamiento con solución de Bouin para la observación visceral (Hofmann *et al.*, 2016).

La técnica de transparentación para evidenciar cartílago y esqueleto ha sido empleada desde los años 70. Esta consiste básicamente en la digestión de los músculos mediante tripsina u otros compuestos y la tinción del esqueleto usando rojo de alizarina sobre especímenes previamente fijados en formol (Cortés *et al.*, 2009). Dicha técnica puede emplearse para estudiar los huesos en diferentes etapas del desarrollo, en busca de anomalías, y es un requerimiento prácticamente obligatorio en estudios con ratas, ratones, conejos y cerdos miniatura (Reynaud y Jocteur-Monrozier, 2013).

La diafanización consta de las siguientes etapas: fijación inicial, impregnación, corrosión, transparentación y conservación final. La fijación tiene como objetivo frenar la descomposición de la muestra y evitar la retracción del tejido. La sustancia fijadora más usada es el formaldehído, aplicado mediante inyección intravascular, infiltración o inmersión. Luego de la impregnación con rojo de alizarina se realiza la corrosión de barrera superficial mediante una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 2 % en agua, con el objetivo de eliminar toda la epidermis. Este proceso provoca de forma gradual la transparentación de los tejidos blandos, de modo que queda visible solamente el esqueleto teñido de rojo. Finalmente, la muestra se conserva inmersa en glicerina (Rivera *et al.*, 2015).

Los estudios en los que se ha aplicado la tinción de fetos han resultado de gran utilidad para el análisis de anomalías esqueléticas causadas por agentes xenobióticos con actividad patógena. Además, esta técnica ha permitido la observación rápida y detallada del esqueleto sin necesidad de recurrir a tecnologías más costosas, como los rayos X. Asimismo, pueden resultar útiles para detectar patrones importantes en el establecimiento de relaciones filogenéticas, así como para estudios de anatomía comparada, ontogénica y evolutiva (Menegola *et al.*, 2001; Schneider, 2013)

Las alteraciones esqueléticas más frecuentes y significativas se encuentran en el cráneo, la columna vertebral, las costillas, el esternón y las extremidades. Además, cuando los fetos se someten a tinción con rojo de alizarina, las alteraciones en los huesos pueden ser vistas en la forma de tres eventos: deficiencias en la homogeneidad, reducción en la densidad y reducción del área teñida (Quallio *et al.*, 2010).

Es frecuente encontrar variaciones esqueléticas relacionadas con osificación retardada de huesos del cráneo (Fig. 2), hioides, vértebras y esternones, lo cual se considera asociado a la adaptación del sistema óseo para facilitar la expulsión. Esta interpretación se encuentra respaldada por el hecho de que dichas variaciones son corregidas después del nacimiento, aunque de forma lenta (Solecki *et al.*, 2013).

El análisis visceral de los fetos, por su parte, puede llevarse a cabo a través de diferentes métodos, entre ellos la microdissección, la micro-tomografía computarizada y el seccionamiento seriado posterior a la fijación en solución de Bouin. Este último, también denominado técnica modificada de Wilson, es uno de los más utilizados debido a su sencillez, eficiencia y bajo costo (Critchell, 2013; Leroy y Jocteur-Monrozier, 2013).

La solución de Bouin es un compuesto fijador utilizado en histología. Se compone de ácido pícrico, ácido acético y formaldehído en una solución acuosa. Su capacidad fijadora se basa en la acción del ácido pícrico, que provoca precipitación de moléculas, y del formaldehído, que forma entrecruzamientos entre las proteínas del tejido. El ácido acético en este fijador lisa los glóbulos rojos y disuelve pequeños depósitos de hierro y calcio en el tejido (Carson y Hladik, 2009).

Luego de procesar las muestras con la solución se procede a su seccionamiento serial para el examen de los tejidos blandos (Fig. 3). Critchell (2013) refiere que esta técnica ofrece como ventajas que no es destructiva (al contrario de otras como la microdissección visceral en fresco), la fijación es rápida y facilita el examen de estructuras internas complejas como la cabeza. No obstante, también presenta desventajas, puesto que consume mucho tiempo y depende de un elevado nivel de preparación por parte del personal.

Uno de los hallazgos más comunes cuando se aplica esta técnica es la ventriculomegalia fetal. Esta anomalía constituye una variación, y su prevalencia oscila entre 0,3 y 22 por cada 1 000 nacidos vivos (Aydin *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). Del mismo modo, resultan frecuentes malformaciones como la microftalmia, la palatosquisis y la hernia diafragmática (Critchell, 2013).

Interpretación de los resultados de los estudios

El modo en que se interpretan los resultados de estudios de este tipo puede variar en dependencia del producto que se evalúa, aunque existen puntos comunes. Por ejemplo, Gutiérrez *et al.* (2012) consideran que no existen efectos teratogénicos cuando ningún animal muere durante el tratamiento o manifiesta signos indicativos de toxicidad, no se modifica el consumo de alimentos ni la ganancia de peso corporal y no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los animales tratados respecto al número de cuerpos lúteos, sitios de implantación, reabsorciones y fetos vivos. Asimismo, el examen de los fetos no debe revelar una proporción de defectos superior a la de los grupos controles, tanto en el examen externo como en el visceral y esquelético (Barrow y Reynaud, 2013).

Un aspecto de gran importancia durante la interpretación es la clasificación de los hallazgos. Por ejemplo, las malformaciones se definen como cambios permanentes que en su gran mayoría afectan la salud o la calidad de vida futura, mientras que las variaciones tienden a desaparecer con el tiempo y suelen ser benignas (Hofmann *et al.*, 2016). Sin embargo, a veces resulta difícil establecer si un cambio es realmente permanente, dado que es infrecuente que se dé seguimiento al destino y evolución de las anomalías prenatales. Por otro lado, existen alteraciones que han sido confirmadas como permanentes (huesos parietales accesorios, separación de los huesos frontales), pero que igualmente pueden clasificarse como variaciones debido a la elevada incidencia espontánea que presentan y su carencia de efecto sobre el desarrollo postnatal (Cahoud *et al.*, 2015).

Varios autores han esclarecido este aspecto a través de una armonización de términos y definiciones. Se refiere, por ejemplo, que las alteraciones estructurales de la columna vertebral más comúnmente observadas (vértebras ausentes, supernumerarias o fusionadas) son permanentes y por consiguiente se consideran malformaciones, mientras que la mayoría de las alteraciones en la osificación (que son observadas con mucha frecuencia en estudios toxicológicos) se clasifican como variaciones dado que se espera tenga lugar una osificación postnatal (Makris *et al.*, 2009; Solecki *et al.*, 2015; Hofmann *et al.*, 2016).

Igualmente, ha sido demostrado que las costillas supernumerarias completas son estructuras permanentes y en consecuencia se consideran malformaciones, mientras que las rudimentarias tienden a la desaparición postnatal, y por tanto se clasifican como variaciones (Foulon *et al.*, 2000). Respecto a las variaciones viscerales, probablemente la más común sea la ventriculomegalia fetal, cuya significación varía desde nula y completamente reversible, hasta grave con implicaciones de hidrocefalia (Kaiser Permanente, 2009; Aydin *et al.*, 2013).

La identificación de la gravedad de las anomalías y la determinación de su significación mediante métodos estadísticos son de suma importancia en los ensayos de teratogénesis, pero no son los únicos elementos que deben tenerse en cuenta para formular un diagnóstico. Por ejemplo, la presentación de malformaciones adquiere mayor relevancia cuando se observa en fetos de varias camadas dentro de los grupos tratados. Esta consideración se adopta para evitar interpretaciones influenciadas por el “efecto camada”, que consiste en la tendencia de los fetos de una camada determinada a exhibir un fenotipo y sensibilidad semejantes entre sí, dado que son genéticamente similares y están expuestos a las mismas condiciones ambientales en el útero materno (Mylchreest y Harris, 2013). Por tanto, hallazgos similares en una única camada pueden ser considerados preocupaciones menores.

Asimismo, debe considerarse que ciertas anomalías, como las variaciones esqueléticas pueden alcanzar frecuencias muy elevadas en algunas poblaciones, sin que ello signifique que su aparición está sujeta a la acción de un teratógeno. Un ejemplo de esto lo constituye la osificación incompleta, que como se mencionó anteriormente es un hallazgo bastante común. Quallio *et al.* (2010) refieren que este defecto solo es relevante cuando se presenta en los huesos de la extremidad posterior (tarsos, metatarsos y falanges), o en las vértebras sacras, ya que no existe relación entre estos y la expulsión del feto. Solecki *et al.* (2001) añaden que la presencia de solamente un hueso pobremente calcificado en el esqueleto es insuficiente, y puede conducir a errores de interpretación cuando se quiere relacionar el fenómeno con la administración de una sustancia determinada.



Figura 1. Gastrosquisis en un feto de conejo. Cortesía del laboratorio de toxipatología del CIGB.

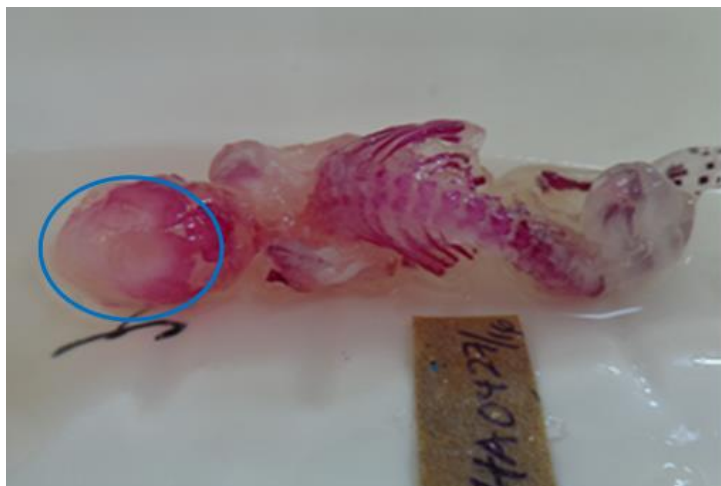


Figura 2. Feto de conejo teñido con rojo de alizarina, con pobre osificación de los huesos del cráneo. Cortesía del laboratorio de toxipatología, CIGB.

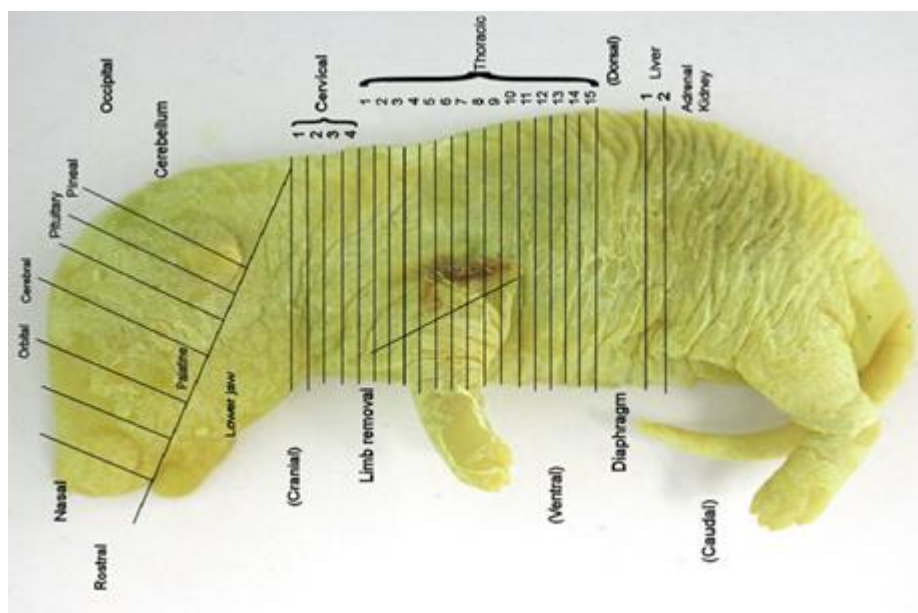


Figura 3. Esquema para el seccionamiento serial de un feto de rata fijado en Bouin. Fuente: Critchell (2013).

CONCLUSIONES

Los mecanismos generales para la producción de anomalías congénitas constituyen desviaciones del desarrollo embrionfetal normal, siendo algunos de los más comunes los excesos o defectos de inducción, los fallos en el proceso de apoptosis y la ocurrencia de disrupciones vasculares. Para detectar la ocurrencia de anomalías congénitas en ensayos preclínicos, se requiere una observación detallada de los fenómenos y la habilidad de discernir entre los hallazgos que son significativos –y por tanto relacionados con la administración del producto evaluado– y los que constituyen variaciones comunes para el biomodelo utilizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allais, L. y Reynaud, L. (2013). Teratology studies in the rabbit. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 12. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 143-154. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Aydin, Ö., Tarhan, N., Arinkan, S. A., Tosun, Ö., Çakmak, Y., Turgut, A., Dayicioglu, V. (2013). Evaluation of fetal ventriculomegaly. *Journal of Clinical and Experimental Investigations (JCEI)*, 4 (2), 141-147. DOI: 10.5799/ahinjs.01.2013.02.0254.
- Barrow, P. (2002). Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. *Toxicol.*, (185), 205-212.
- Barrow, P. (2013). *Teratogenicity Testing. Methods and protocols*. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. VII. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Barrow, P. C. y Reynaud, L. (2013). Reporting of teratology studies. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 23. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 215-220. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Buschmann, J. (2013). The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 4. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 44-50. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Cáceres, F., Ramírez, J., Herrera, P. (2012). Defectos congénitos de la pared abdominal. *Revista ecuatoriana de pediatría*, 13 (2): 27-31.
- Cahoud, I., Talsness, C. E., Walter, A., Grote, K. (2015). Postnatal investigation of prenatally induced effects on the vertebral column of rats reduces the uncertainty of classification of anomalies. *Reprod. Toxicol*, 58, 15-23.
- Campos-Lozada, V. y Sánchez, G. (2004). *Onfalocele y gastrosquisis. Más que una diferencia clínica*. Acta médica Grupo Ángeles. Hospital Ángeles, Clínica Londres.
- Carson, F. y Hladik, C. (2009). *Histotecnología: Un texto autoinstruccional*. 3ra ed. Hong Kong: Sociedad Americana de patología clínica. ISBN 978-0-89189-581-7.
- Christison-Lagay, E., Kelleher, C., Langer, J. (2011). Neonatal abdominal wall defects. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, (16), 164-172.
- Cortés, N., Pérez, J., Hoyos, J. (2009). Procedimiento de transparentación para evidenciar cartilago y esqueleto en murciélagos y roedores adultos. *International Journal of Morphology*, 27 (4), 1163-1167. ISSN 0717-9502.
- Critchell, K. (2013). Fetal soft tissue examination by serial sectioning. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 19. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 233-241. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Cruz, C. y Moreno, B. (2013). *Patología del útero en gestación*. Recuperado de <http://cardenti8.blogspot.com/2013/03/patologia-del-útero-en-gestacion-mvz.html>.

- Daniels, M. y Marley, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.018.
- Danielsson, B. R. (2013). Maternal Toxicity. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 24. Francia: Humana Press, Sprenger Science + Bussines Media. pp. 311. ISBN 978-1-62703-130-1.
- De Miguel, M., Gracia, C., Martín, L., Escribano, M. (2012). *Guía de desarrollos preclínicos*. Genoma España. pp. 19-50.
- Díaz, C., Copado, Y., Muñoz, G., Muñoz, H. (2016). Malformaciones de la pared abdominal. *Rev. Med. Clin. Condes*, 27 (4), 499-508.
- Espinosa, M. B. (2014). Apoptosis, muerte celular fisiológica. Reseña histórica y actualidad. *Revista de Educación en Biología*, 16 (2), 153-158.
- Ferreira, C., Rocha, I., Silva, J., Sousa, A. O., Godinho, C., Azevedo, M., ...Valente, F. (2014). Mild to moderate fetal ventriculomegaly: obstetric and postnatal outcome. Portugal. *Acta Obstet Ginecol Port*, 8 (3), 246-251.
- Foster, W., Myllynen, P., Winn, L. M., Ornoy, A., Miller, R. K. (2008). Reactive oxygen species, diabetes and toxicity in the placenta: a workshop report. *Placenta*, 29, 105-107.
- Foulon, O., Jaussely, C., Repetto, M., Urtizberea, M., Blacker, A. M. (2000). Postnatal evolution of supernumerary ribs in rats after a single administration of sodium salicylate. *Journal Appl. Toxicol*, 20, 205-209.
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Mas, R., García, H., Bucarano, I., Goicochea, E. (2012). Teratogénesis del D – 004 en conejos. *Rev Cub Toxicol*, 1(2) [en línea].
- Haroun, H. S. W. (2017). Teratogenicity and teratogenic factors. *MOJ Anat & Physiol.*, 3 (1). DOI: 10.15406/mojap.2017.03.00082.
- Hofmann, T., Buesen, R., Schneider, S., van Ravenzwaay, B. (2016). Postnatal fate of prenatal-induced fetal alterations in laboratory animals. *Reproductive Toxicology*, 61, 177-185.
- Kaiser Permanente. (2009). *Prenatal ultrasound findings: mild ventriculomegaly*. The Permanente Medical Group Inc., Regional Genetics Department. Recuperado de <http://genetics.kaiserpermanente.org>.
- Kawamura, Y., Matsumoto, K., Sato, K. (2012). Stability of the reproductive variables and fetal malformations from control animals treated with thalidomide in Kbl: JW rabbits over two decades. The Japanese teratology society. *Congenital anomalies*, 52, 191-202.
- Lane, L. y Aucker, R. S. (2009). *Farmacología en Enfermería*. 2da ed. España: Elsevier. pp. 25. ISBN 848-1-7444-84.
- Leroy, M. y Jocteur-Monrozier, A. (2013). Fetal soft tissue examinations by microdissection. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*.

Capítulo 20. Francia: Humana Press, Sprenger Science + Bussines Media. pp. 250-253. ISBN 978-1-62703-130-1.

- Makris, S. L., Solomon, H. M., Clark, R., Shiota, K., Barbellion, S., Buschmann, J., ... Wise, D. (2009). Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 2). *Reproductive Toxicology*, 28, 371-434.
- Marsa, S. M., Della Vedona, M. C., Olivera, M., Siewert, S. E. (2015). Anencefalia asociada a trisomía 18 con elevada Alfa-1- fetoproteína en líquido amniótico. Un caso reportado en San Luis, Argentina. *BAG, Journal of basic and applied genetics*, 2 (1). ISSN 1852-6233.
- Menegola, E., Broccia, M., Giavini, E. (2001). Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology*, 64 (3), 125-133.
- Morgan, F., Quevedo, E., Báez, J., López, G., Gutiérrez, G., Morgan, F. V. (2016). Teratología y farmacoterapia durante el embarazo y la lactancia. *Rev. Med. UAS*, 6 (1), 22-43.
- Mylchreest, E. y Harris, S. B. (2013). Historical control data in reproductive and developmental toxicity studies. En: Barrow, P. C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 22. Francia. Humana Press, Sprenger Science + Bussines Media. pp. 275-293. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Noden, D. y Lahunta, A. (1990). *Embriología de los animales domésticos*. España: Editorial Acribia. pp 319-339.
- Pérez, L. G. (2014). Consumo materno de alcohol: impacto en el desarrollo embriotrofoblástico temprano y en la gestación a término. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires, Argentina, Biblioteca digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. h 335.
- Quallio, N. F., Bombonato, A. P., Livia, A., Golin, M., Ribeiro, R., Roma, F. J., Dalsenter, P. R. (2010). Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 85-91.
- Reynaud, L. y Jocteur-Monrozier, A. (2013). Skeletal examination by alizarin staining. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 16. Francia: Humana Press, Sprenger Science + Bussines Media. pp. 201-213. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Rivera, G. A., García, A., Moreno, F. A. (2015). Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo. *Revista Colombiana Salud Libre*, 10 (2), 109-115.
- Rogers, J. M., Chemoff, N., Keen, C. L., Daston, G. P. (2005). Evaluation and interpretation of maternal toxicity in segment II studies: Issues, some answers, and data needs. Elsevier. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 367-374.
- Rojas, M. y Walker, L. (2012). Malformaciones congénitas: aspectos generales y genéticos. *Int. J. Morphol*, 30 (4), 1256-1265.

- Rorije, E., van Hienen, F. J., Dang, Z. C., Hakkert, B. H., Vermeire, T., Piersma, A. H. (2012). Relative parameter sensitivity in prenatal toxicity studies with substances classified as developmental toxicants. *Reproductive Toxicology*, 34, 284-290.
- Schneider, S. (2013). Skeletal examination by double staining of ossified bone and cartilaginous tissue. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 17. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 215-220. ISBN 978-1-62703-130-1.
- Solecki, R., Barbellion, S., Bergmann, B., Bürgin, H., Buschmann, J., Clark, R., ...Chahoud, I. (2013). Harmonization of description and classification of fetal observations: Achievements and problems still unresolved. Report to the seventh Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin. *Reproductive Toxicology*, 35, 48-55.
- Solecki, R., Bürgin, H., Buschmann, J. (2001). Harmonization of rat fetal skeletal terminology and classification. Report to the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin. *Reproductive Toxicology*, (1), 713-721.
- Solecki, R., Rauch, M., Gall, A., Buschmann, J., Clark, R., Fuchs, A., ...Chahoud I. (2015). Continuing harmonization of terminology and innovations for methodologies in developmental toxicology. Report of the eighth Berlin Workshop on Developmental Toxicity. *Reproductive Toxicology*, 57, 140-146.
- Urbano, M. A. (2010). *Momificación y maceración fetal*. Universidad Antonio Nariño, Facultad de Medicina Veterinaria. Recuperado de http://www.actiweb.es/patologiavet/momificacion_y_maceracion_fetal.html.
- Van Gelder, M., van Rooji, I., Miller, R. K., Zielhuis, G. A., Jong-van den Berg, L. T., Roeleveld, N. (2010). Teratogenic mechanisms of drugs. *Human Reproduction Update*, 16 (4), 378-394.
- Vetpraxis (2009). *Introducción a la teratología: el estudio de las malformaciones congénitas en medicina veterinaria*. Recuperado de www.vetpraxis.net/2009/07/17/teratologia-veterinaria.
- Vogelmann, R. A., Sánchez, J. E., Sartori, M. F. (2008). Muerte fetal intrauterina. UNNE, Argentina. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, (188), 10-14.
- Wise, L. D. (2013). The ICH S5 (R2) guideline for the testing of medicinal agents. En: Barrow P C. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Capítulo 1. Francia: Humana Press, Springer Science + Bussines Media. pp. 7-9. ISBN 978-1-62703-130-1.