

Estudio experimental de las alteraciones circulatorias, secundarias a la acción de diversos agentes teratógenos en los primeros estadios del desarrollo embrionario

L. Gonzalo Sanz

RESUMEN

Las alteraciones vasculares producidas por agentes teratógenos, como la hipoxia, la anemia, la reabsorción de focos necróticos, etc., presentan una serie de características comunes: fusión retrasada de las aortas dorsales, avance caudal lento de estas arterias y diámetro de la porción caudal de la aorta notablemente inferior al de los embriones control, etc. Estas alteraciones vasculares son responsables, a su vez, de trastornos en la diferenciación de las estructuras axiales de la región caudal tales como edema, desarrollo incompleto y retrasado de los somitos más caudales, trastornos éstos que, en momentos más avanzados del desarrollo, se traducen por ausencia de la cola o por una cola rudimentaria, y, a nivel lumbosacro, por alteraciones vertebrales: fusión de vértebras, hemivértebras, etc.

La acción teratógena de la hipoglicemia^{12, 13}, de la anemia^{3, 4, 8}, de la hipoxia^{1, 9} del carbónico^{2, 7} se atribuye, generalmente, a la acción directa de tales agentes sobre las células del embrión. Esta acción teratógena directa no excluye otras acciones teratógenas indirectas, producidas por las alteraciones primarias. Tal es el caso de las alteraciones circulatorias, que juegan un papel importante en la génesis de diversas malformaciones, como las experiencias que vamos a describir a continuación parecen demostrar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las experiencias se han efectuado en embriones de pollo, de la misma raza y sometidos a las mismas condiciones experimentales. Han sido de cuatro tipos: 1) revestimiento de la cáscara de los huevos en incubación con parafina; 2) sección de una rama de la vena onfalomesentérica; 3) producción de focos necróticos mediante diatermocoagulación; 4) introducción de laminillas de aluminio, medial o lateralmente respecto a las aortas dorsales.

1. *Revestimiento de la cáscara con parafina.*

El objeto de esta experiencia fue producir una anoxia recubriendo toda la cáscara con parafina (10 casos) o una hipoxia intensa, revistiendo los 2/3 de la mitad superior del huevo (yaciendo éste en posición horizontal) con parafina (10 casos), o una hipoxia menos intensa revistiendo sólo 1/2 de la mitad superior de la cáscara (10 casos).

El revestimiento con parafina se efectuó a las 32 horas de haber comenzado la incubación, y los embriones fueron fijados 30 horas después.

2. *Sección de una rama de la vena onfalomesentérica.*

El fin de esta experiencia fue provocar una anemia intensa durante unas tres o cuatro horas, tiempo que suele tardar el embrión en adquirir una volemia normal. La hemorragia la hemos prolongado hasta que el corazón, examinado con el microscopio, parecía latir en vacío. El número de embriones sometidos a este tipo de experiencia ha ascendido a 51. La hemorragia la provocamos a las 48 horas de comenzada la incubación y la fijación de los embriones se realizó entre las 60 horas y los 9 días de incubación.

3. *Producción de focos necróticos mediante diatermocoagulación.*

Esta experiencia se realizó en embriones de 48 horas de incubación, a nivel de los últimos somitos diferenciados. La fijación de los embriones se llevó a cabo a partir de las 24 horas siguientes a la diatermocoagulación, hasta 3 días después. El número de embriones comprendidos en este grupo fue 17.

4. *Colocación de laminillas de papel de aluminio.*

Las laminillas, de forma rectangular (0,6 x 0,3 mm.), fueron introducidas, en unos

casos, medialmente respecto de una de las aortas dorsales (3 casos) y, en otros, lateralmente (3 casos). La altura a la que fueron colocadas las laminillas fue inmediatamente caudal al último somito diferenciado. Para introducir las laminillas de aluminio, se efectuó una incisión con una aguja muy fina de wolframio, entre el mesodermo paraaxial y el mesodermo intermedio.

Antes de realizar estas operaciones se practicó una coloración vital del embrión con sulfato azul-nilo.

Embriones control.

Además de los embriones pertenecientes a las experiencias que acabamos de describir, hemos utilizado embriones control fijados entre las 24 horas y los 5 días.

Métodos histológicos.

La fijación de los embriones la hemos realizado en Bouin, excepto en los casos en que nos interesaba una coloración "in toto" del esqueleto, con verde de metilo. En estos casos, hemos empleado la fijación en formol al 1/10.

La mayor parte de los embriones, tras la inclusión en parafina, fueron seccionados seriadamente, a 7 μ , y teñidos por la hematoxilina-eosina. Otros, como hemos dicho antes, fueron coloreados "in toto" por el verde-metilo y diafanizados los tejidos blandos.

Por último, los embriones de la experiencia 1 (parafinización de la cáscara) se tiñeron "in toto" por la hematoxilina y se montaron así en portas.

RESULTADOS

Experiencia 1: Revestimiento de la cáscara con parafina. Los embriones correspondientes a los huevos cuya cáscara fue parafinizada en toda la extensión, al fijarlos 30 horas después, se comprobó que habían muerto.

En el grupo de huevos en los que se

parafinizaron los 2/3 de la mitad superior, murieron 3. En cambio, cuando sólo se parafinizó 1/2 de la mitad superior de la cáscara no murió ninguno. En todos los embriones recogidos vivos, se pudo observar una notable dilatación de los vasos extraembrionarios (figs. 1 y 2), así como un desarrollo más retrasado, en comparación con los controles. Estas alteraciones eran más manifiestas en los casos en que la superficie de cáscara parafinizada fue mayor.

El número de somitos era de 2 a 4, inferior al de los embriones control y el tamaño de los somitos formados durante el período de hipoxia era manifiestamente menor que el de los controles.

Por lo que respecta a las alteraciones vasculares, además de la vasodilatación ya anteriormente consignada, hemos podido observar un apreciable retraso en la fusión de las ramas arteriales que dan lugar a la arteria onfalomesentérica. En íntima relación con este retraso, está el hecho de que las conexiones entre los vasos intra y extraembrionarios eran más numerosas y persistían más tiempo que en los embriones testigo. Por otra parte, el calibre aórtico decrecía bruscamente por debajo de la altura correspondiente a la salida de la arteria onfalomesentérica, haciéndose su contorno irregular, para terminar en un plexo de amplios sinusoides. El mesodermo paraxial, a

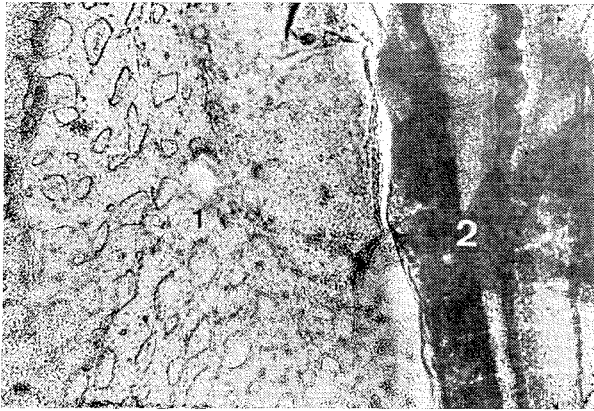


Fig. 1. Area vascular de un embrión de 62 horas, sometido durante las 30 últimas horas a una hipoxia. Los vasos están considerablemente dilatados (compárese con la figura siguiente que corresponde a un embrión sin hipoxia).

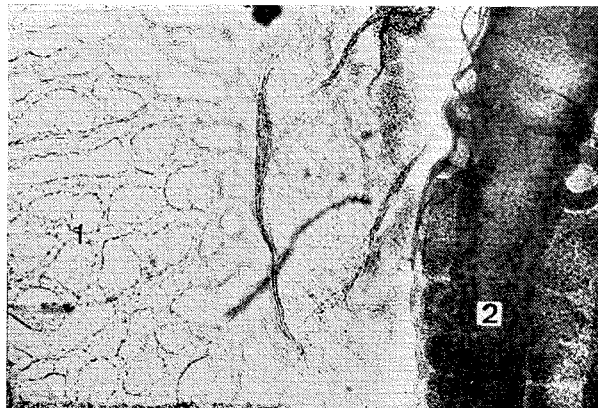


Fig. 2. Area vascular de un embrión control de 62 horas.

nivel de estos sinusoides, mostraba un aspecto edematoso. En algunos casos el edema era tan considerable que llegaba a formar extensas lagunas (figs. 3, 4 y 5).

Experiencia 2: Sección de una rama de la vena onfalomesentérica. Los embriones fijados 24 horas después de la hemorragia, presentaban un desarrollo inferior al de los controles, apreciable ya a simple vista.

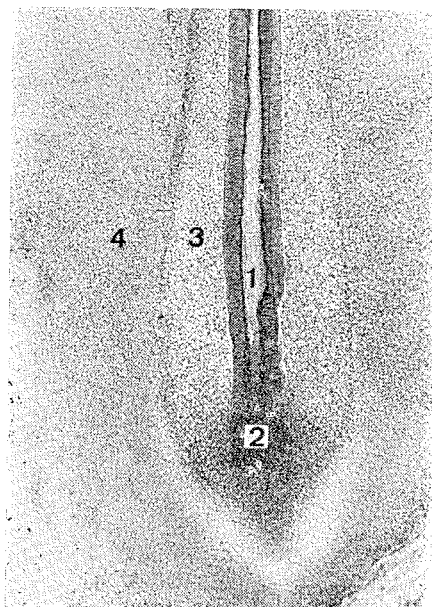


Fig. 3. Región caudal de un embrión control de 62 horas.

1) tubo neural, 2) yema caudal, 3) mesodermo paraxial, 4) área vasculosa.

Al examen microscópico se podía observar un par de somitos, generalmente comprendidos entre el 17 y el 22, de un tamaño claramente inferior al de los somitos vecinos (fig. 6). En algunas ocasiones existía a ese nivel un trastorno en la segmentación somítica (fig. 7). Esto se traduce, en estadios ulteriores, en fusiones vertebrales, hemivértebras, etc. (fig. 8). Además de los trastornos descritos hemos podido constatar, en todos los casos

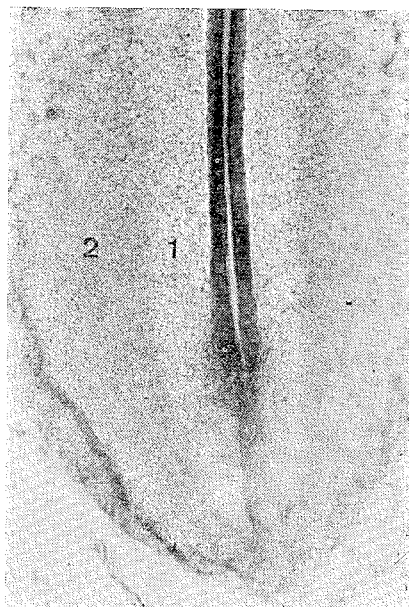


Fig. 4. Región caudal de un embrión de 62 horas, sometido a una hipoxia ligera. Véase el aspecto edematoso del mesodermo paraxial 1). 2) Área vasculosa.

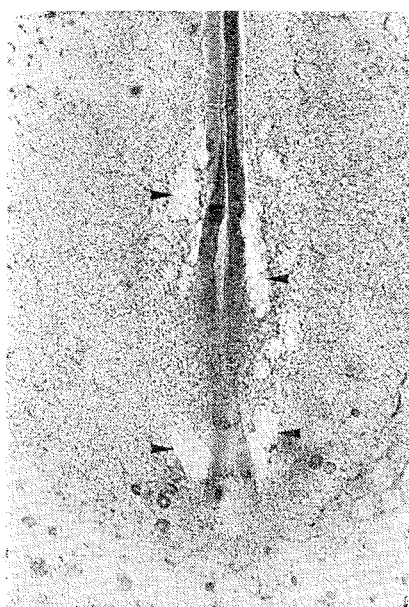


Fig. 5. Región caudal de un embrión de 62 horas, sometido a una hipoxia severa. Destacan las formaciones lacunares producidas por el edema en el mesodermo paraxial (flechas).

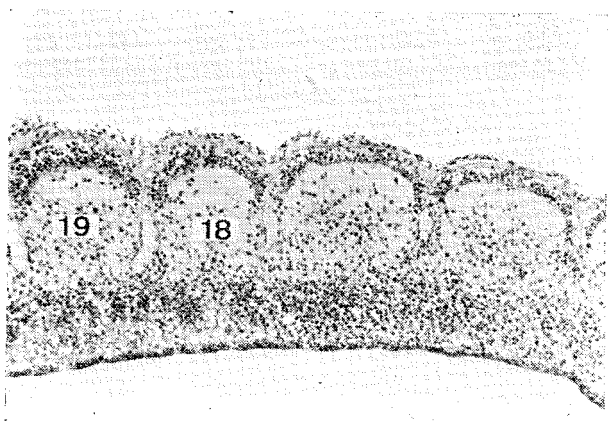


Fig. 6. Corte parasagital de un embrión de 3 días al cual, 24 horas antes, le fue practicada una sangría. Se puede observar cómo los segmentos 18 y 19 son más pequeños que los vecinos.

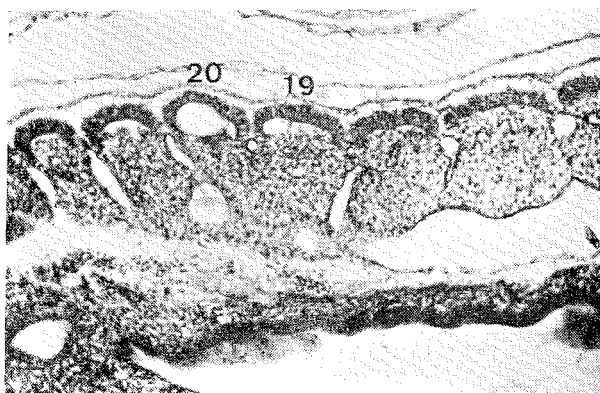


Fig. 7. Corte parasagital de un embrión de 3 días al cual 24 horas antes le fue practicada una sangría. Obsérvese cómo los esclerotomos de los somitos 19 y 20 se hallan fusionados.

de esta experiencia, diversos trastornos vasculares. En primer lugar, el calibre de la aorta en la que su porción caudal era claramente menor que el de los embriones normales de la misma edad. El avance caudal de la aorta era más lento y la fusión de las aortas dorsales se encontraba retrasada, respecto de los embriones control. En estrecha relación con estas alteraciones vasculares, hemos podido apreciar diversas alteraciones en las estructuras axiales: los somitos más caudales presentaban un enorme miocele (fig. 9), el mesodermo paraxial aparecía edematoso, con amplios sinusoides y, a nivel de la yema caudal, se apreciaban numerosas "células redondas"; altera-

ción que, por lo general, indica cambios irreversibles en tales células.

En los embriones fijados 48 horas después de la hemorragia, las alteraciones de carácter general eran menos manifiestas, en cambio, las alteraciones correspondientes al territorio caudal aparecían más marcadas. El calibre aórtico en la porción caudal continuaba siendo menor que el normal y el extremo caudal de la aorta no alcanzaba el límite posterior de la cola. A veces, el extremo caudal de la aorta se incurva y se dirige ventralmente. La porción terminal de la cola, que no ha sido alcanzada por la aorta, presenta una estructura indiferenciada. En la yema

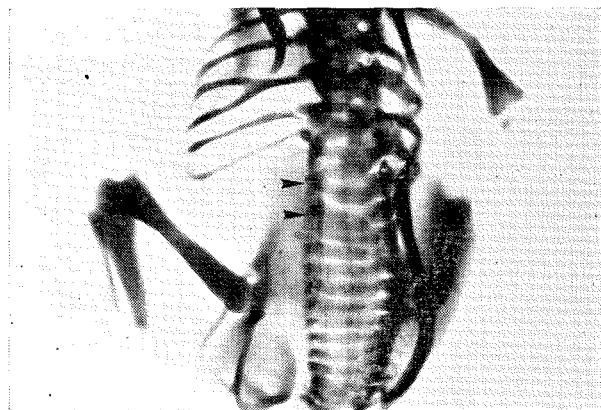


Fig. 8. Embrión de 9 días, diafanizado y con el esqueleto teñido por el verde de metilo. A las 48 horas de incubación sufrió una intensa sangría. A nivel de la región dorsosacral se pueden apreciar diversas malformaciones vertebrales (flechas).

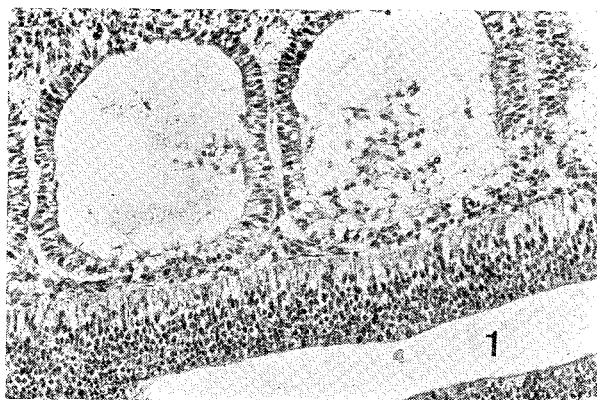


Fig. 9. Corte fronto-sagital de un embrión de 3 días. A las 48 horas sufrió una fuerte sangría. Se pueden observar los amplios miocelos que ocupan prácticamente toda la extensión de los somitos. 1: Médula.

caudal, el territorio donde se observaban “células redondas” aparece ahora como un foco necrótico (fig. 10). Los embriones fijados 2 ó 3 días después de la hemorragia mostraban una cola más corta que los embriones control y, en algunos casos, llegaba a faltar por completo o era un simple rudimento, constituido por tejido mesenquimatoso (fig. 11). Junto a estas alteraciones axiales, también se pueden apreciar en algunos casos cordentería, asociada a trastornos más o menos pronunciados de la última porción del intestino y de la cloaca.

Experiencia 3: Producción de focos necróticos mediante diatermocoagulación. En los casos en los que hemos practicado

una diatermocoagulación, además de los trastornos locales que aparecen a nivel del territorio destruido y de los de carácter general, debidos a la reabsorción del tejido coagulado, hemos podido observar que, de manera sistemática, aparecen notables alteraciones vasculares. En los embriones, con una destrucción de escaso volumen, sólo se aprecia un ligero aumento del diámetro de la aorta, que no suele ir acompañado de alteraciones en la porción caudal del embrión.

En embriones con foco más extenso de coagulación, a las 24 horas de la intervención, el diámetro de la aorta se encontraba considerablemente aumentado por encima de la lesión y presentaba anas-

Fig. 10. Corte parasagital de un embrión de 4 días; en la figura aparece su mitad caudal, 1: Tubo neural, 2: notocorda, 3: yema caudal en la que se aprecian abundantes células necrosadas.

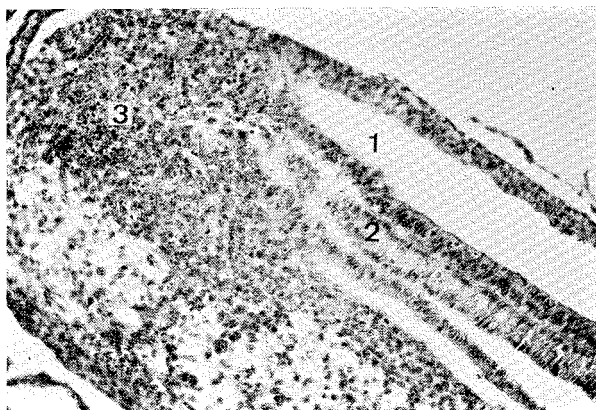


Fig. 11. Corte sagital de un embrión de 5 días, al cual a los dos días le fue practicada una sangría. La médula y la notocorda sólo avanzan hasta la altura de la cloaca (1). La cola (2), rudimentaria, sólo posee tejido mesenquimatoso.

tomosis, con las venas cardinales. En la porción caudal, sin embargo, el diámetro aórtico decrecía de manera rápida continuándose la aorta con una red de amplios capilares. Asimismo, la fusión de las aortas dorsales no se hallaba tan avanzada como en los embriones control. En conexión con estas alteraciones vasculares, aparecían importantes cambios en las estructuras axiales de la región caudal: somitos con amplios mioceles, mesodermo paraxial edematoso y surcado por capilares dilatados, etc. En la yema caudal aparecían, como en la experiencia anterior, células en fase de degeneración. La evolución de estas alteraciones de la región caudal fue similar a la des-

crita en los casos de hemorragia experimental.

Experiencia 4: Colocación de laminillas de papel de aluminio. Como hicimos notar en el apartado de "material y métodos", las laminillas de aluminio las introdujimos entre el mesodermo paraxial y el mesodermo intermedio. Según la oblicuidad que dimos a la laminilla conseguimos que, en unos casos quedara medial y en otros lateral respecto a la aorta dorsal correspondiente. Los resultados obtenidos han sido muy distintos en uno y otro caso. Cuando la laminilla quedó medialmente situada en relación con la aorta dorsal, por tanto, cuando esta arteria conservó sus relaciones normales

con el mesodermo paraxial, no aparecieron alteraciones apreciables en la diferenciación y desarrollo de los somitos. En cambio, en los casos en los que la laminilla quedó situada lateralmente y, por ello, la aorta dorsal se hallaba separada por la laminilla del mesodermo paraxial, aparecieron considerables alteraciones en los somitos diferenciados a ese nivel. Estos se diferenciaron con retraso, eran rudimentarios y presentaban un aspecto edematoso y amplios mioceles.

DISCUSIÓN

Los resultados que acabamos de describir, muestran que tanto en la hipoxia como en la anemia o en la reabsorción de focos necróticos hay, además de las alteraciones específicas de estos agentes teratógenos, una serie de alteraciones comunes a todos ellos. Tales alteraciones son principalmente vasculares: fusión retrasada de las aortas dorsales, avance caudal lento de estas arterias y diámetro de la aorta, en su porción caudal, manifestamente inferior al que presentan los embriones control.

Estas alteraciones vasculares son las que originan, a su vez, otras alteraciones en la diferenciación de las estructuras axiales de la región caudal. Una comprobación de ello la tenemos en la experiencia en la que, mediante una laminilla de papel de aluminio, hemos alterado las relaciones normales de la aorta dorsal y del mesodermo paraxial, o lo que es lo mismo, la vascularización de un territorio del mesodermo paraxial. En ese territorio han aparecido trastornos en la diferenciación de los somitos, similares a los presentados en los casos de hipoxia, anemia o reabsorción de focos necróticos.

Dichos trastornos en los primeros estadios se manifiestan por un estado edematoso del mesodermo paraxial y de la yema caudal, por la aparición de amplios sinusoides en dicho mesodermo y,

a veces, de verdaderas lagunas labradas por el edema.

En ninguno de nuestros casos, sin embargo, hemos encontrado focos hemorrágicos que, según Grabowski⁵, serían la causa de las malformaciones que aparecen en los casos de hipoxia.

Los somitos se diferencian, en el territorio con deficiente nutrición, de manera lenta y presentan un miocele que ocupa casi por entero toda la extensión del somito. En un período más avanzado del desarrollo, se ve que el número de somitos diferenciados en el territorio afecto por los trastornos circulatorios es menor que en condiciones normales y, en ocasiones, se detiene la diferenciación en un estadio muy temprano. Por otra parte, a nivel de la yema caudal aparece un foco necrótico más o menos amplio. La consecuencia final de todas estas alteraciones es la formación de una cola rudimentaria que, a veces, llega a faltar por completo. En ocasiones, también la porción final del sacro está afectada. En este caso las vértebras sacras presentan diversas malformaciones y es frecuente que aparezca una cordentería asociada a diversas alteraciones de las vísceras pélvicas. Experimentalmente, destruyendo por diatermocoagulación la yema caudal de embriones de 48 horas, hemos obtenido alteraciones superponibles a las que acabamos de describir. En estos casos hemos seguido el desarrollo hasta una fase más avanzada, observando la supresión de la cola y de una porción más o menos amplia del sacro, presentándose en algunos casos verdaderas formas sirenoides. Junto a las malformaciones pélvicas aparecen también alteración de las vísceras de esta región: atresia ani, desembocadura anormal del mesonefros en la cloaca, etc. Todas estas malformaciones coinciden con las que se presentan espontáneamente en clínica, en las que al lado de los trastornos del esqueleto axial —agenesia más o menos amplia del sacro—, se

presentan también alteraciones de las vísceras pélvicas, siendo la más frecuente el ano imperforado^{11, 15}.

Sobre la génesis de estas malformaciones del tercio posterior del embrión humano es muy poco lo que se sabe¹⁰, pero casi todos los autores tienden a admitir que se producen en el momento de la organogénesis de esa región¹⁴.

Esta coincidencia entre las malformaciones de la clínica y las que hemos obtenido experimentalmente con la anemia, la hipoxia y la reabsorción de focos necróticos, nos hace pensar que la patogénesis es la misma, y que el factor vascular juega un papel importante. Naturalmente, éste no es el primer agente causal, pero sí un importante eslabón en la cadena patogenética.

SUMMARY

Experimental study of the embryogenic alterations dues to a vascular factor

The vascular factor, after the action of teratogenic agents such as anaemia, hypoxia, absorption of necrotic tissue, etc., plays an important role in the appearance of certain malformations. Three types of alterations can normally be observed:

1. General alterations, such as delayed development, hyperchromophily of all tissues, and, in the more advanced cases, the appearance of "round cells".
2. Topical: the development of one or more deficient somites.

3. Regional: generally in the caudal region: oedema, and the formation of a short tail caused by the interruption of the differentiation of the caudal somites.

In all cases, changes in the aortas could be observed, namely, a reduction in their diameter, and a delay in both the fusion and the caudal development of the aortas. As a consequence of these vascular alterations, the irrigation of the caudal area became abnormal and was thus responsible for the mentioned malformations.

BIBLIOGRAFÍA

1. BÜCHNER, F. M. *Beitr. path. Anat.*, 115: 616, 1955.
2. GALLERA, J. *Acta anat. (Basel)*, 11: 549, 1951.
3. GONZALO-SANZ, L. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 126: 355, 1968.
4. GONZALO-SANZ, L. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 129: 102, 1969.
5. GRABOWSKI, C. T. y J. A. PAAR. *Am. J. Anat.*, 103: 313, 1958.
6. GRABOWSKI, C. T., E. N. G. TSAI y H. R. TOBEN. *Teratology*, 2: 67, 1969.
7. GROTE, W. *Z. Morph. u. Anthropol.*, 56: 165, 1965.
8. GROTE, W. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 128: 66, 1969.
9. MURAKAMI, U. y Y. KAMEYAMA. *J. Embryol. exp. Morph.*, 11: 107, 1963.
10. PICCINI, L. y F. BRESCHI. *Ergeb. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 36: 83, 1962.
11. SCOTT, J. E. S. y O. SWENSON. *Ann. Surg.*, 150: 477, 1959.
12. SMITHBERG, M. y M. N. RUNNER. *Amer. J. Anat.*, 113: 479, 1963.
13. THEILER, K. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 126: 31, 1967.
14. TÖNDURY, G. *Arch. J. Klaus Stift.*, 19: 225, 1944.
15. TÖNDURY, G. *Entwicklungsgeschichte und Fehlbildungen der Wirbelsäule*. Hippk. Verlag. Stuttgart, 1958.

