

Efectos de las bebidas alcohólicas en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus*

Alcoholic beverages effects in the development of the chick embryo (*Gallus gallus*)

Laura Gutiérrez C.¹, Pablo Espinosa Q.², Mayra Sáenz O.³ y Jorge M. Cárdenas P.⁴

Resumen

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas durante la gestación puede aumentar la probabilidad de efectos negativos en el desarrollo embrionario, con consecuencias como las descritas por el síndrome de alcoholismo fetal (SAF) y en algunos casos malformaciones anatómicas. Mediante una aproximación experimental, se estableció un patrón teratogénico de los licores sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario en el modelo vertebrado *Gallus gallus*. En la primera etapa, se tomaron huevos fecundados de gallina y se instilaron a través del saco aéreo en el día 0 con un volumen de 0.1 mL para cada uno de los licores evaluados. En la siguiente etapa, un segundo grupo de huevos fecundados fue tratado en el día 4 posincubación, usando la misma metodología. Para ambos grupos, los embriones de los huevos fueron extraídos el día 11 de incubación. A través del análisis descriptivo de los embriones se estableció que las malformaciones más frecuentes sobre el desarrollo embrionario tardío fueron la evisceración y la anoftalmia. A partir de la metodología y la

aproximación experimental evaluada, los resultados sugieren que las bebidas alcohólicas causan efectos teratogénicos sobre el desarrollo y que estos están relacionados con la concentración alcohólica de las bebidas, estableciendo una relación proporcional entre estas y las malformaciones más extremas.

Palabras clave: teratogénesis, alcohol, malformaciones, alcoholismo fetal, anoftalmia.

Abstract

Excessive abuse of liquors during pregnancy may rise the odds of side effects

¹ Estudiante de Biología de la Universidad Central. Correo: lgutierrezc3@ucentral.edu.co.

² Estudiante de Biología de la Universidad Central. Correo: pespinosaq@ucentral.edu.co.

³ Docente de Diseño Experimental de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas de la Universidad Central. Correo: msaenzo@ucentral.edu.co.

⁴ Docente de Biología del Desarrollo y Biología Molecular de la Universidad Central. Correo: jcardenasp4@ucentral.edu.co.

in the developing embryo, with dramatic consequences like the described by the fetal alcohol syndrome and evident anatomical malformations. The present study uses an experimental approach to test and establish the teratogenic patterns caused by different graded liquors in the early stages of the embryonic development of *Gallus gallus* a well-studied vertebrate model, the chicken. The experimental procedure was done as follows, in the first stage fertilized chicken eggs were instilled around the air sac on day 0 with 0.1 mL, for each graded liquors (24%, 34%, and 43%, alcohol percentage by volume). In a second stage, a group of eggs were treated on day 4 post-incubation, using the procedure

mentioned above. For both groups, the embryos were extracted from eggshells on day 11 of incubation. For these treatments, the most frequent malformations observed on the late embryonic development of the chick were evisceration and anophthalmia. Based on this methodology and experimental approach evaluated, the results suggest that liquors cause teratogenic effects in the developing embryo and that there is a relation between alcoholic volume percentage and the most extreme malformations observed.

Keywords: teratogenesis, alcohol, malformations, fetal alcoholism, anophthalmia.

1. Introducción

Las bebidas alcohólicas son clasificadas como depresores del sistema nervioso y su consumo establece alteraciones en la percepción de la realidad y en el estado sensitivo de la persona, proporcionando un estado de bienestar, desinhibición y tranquilidad transitorio. Así mismo, con frecuencia generan adicción. El alcohol, al igual que muchas otras sustancias adictivas, se considera tóxico cuando el consumo es excesivo. Es, por tanto, de particular interés analizar sus efectos sobre la salud, ya que las restricciones gubernamentales a este tipo de bebidas (Ley 30 de 1986) recaen en campañas de prevención y programas educativos. Un enfoque académico puede reforzar estas campañas mediante contribuciones fundamentadas en hallazgos experimentales que, sin lugar a dudas, aumentan la concientización por parte de la comunidad en general e incluso la universitaria.

Aun así, la experimentación con organismos vivos sigue siendo un tema complejo debido a los costos y las implicaciones éticas y legales (Guerrero et ál., 2013). Sin embargo, la publicación de numerosos estudios sobre los efectos del alcohol en la salud —como los realizados por Padilla, Gómez y Garrido (2015) y López y Filippetti (2014)— ha revelado sus importantes efectos teratogénicos, que mayormente se resumen en el síndrome alcohólico fetal (SAF). Estas contribuciones han sido posibles gracias al estudio y el análisis de sus efectos en otros modelos animales como monos, ratas, pollos, entre otros. Si bien estas investigaciones han confirmado el efecto teratogénico que posee el alcohol en el desarrollo de diferentes tipos de organismos, los mecanismos de acción por los cuales induce a malformaciones no son conocidos en su totalidad (Illanes et ál., 1995). Carpenter en 1849 identificó que las mujeres alcohólicas tienden

a presentar hijos con anomalías (Sulik, Johnston y Webb, 1981). Lemoine (1968) y Jones et ál. (1973) describieron que el síndrome alcohólico fetal se caracteriza por un conjunto de anomalías neurológicas y extraneurológicas. Posteriormente, Sandor (1968) y Sandor y Elías (1968) encontraron que el etanol produce malformaciones en la médula espinal y retraso general en el crecimiento y desarrollo del embrión de pollo. Por otra parte, Gilani et ál. (1986) establecieron un patrón de malformaciones en embriones de pollo provocados por etanol y pirazol⁵, que pueden ser: cuerpo reducido, evisceración, microftalmia, lesiones hemorrágicas y edemas, entre otras.

El presente estudio tiene como objetivo analizar y evaluar los efectos teratogénicos de distintas bebidas de contenido y graduación alcohólica, disponibles en el mercado para el consumo general, en los estadios tempranos del desarrollo de embriones de pollo. Este análisis se evaluó aproximadamente desde el día 4 posincubación, donde la organogénesis del hígado ha concluido y el órgano es funcional y puede metabolizar el alcohol (Gilani et ál., 1986).

2. Materiales y métodos

La fase experimental se basó en el método descrito por Illanes et ál. (1995), en huevos fecundados de gallina (*Gallus gallus*). Se incubaron a ~37.5 °C y se usó un diseño experimental que incluyó tres licores diferentes a distintas concentraciones en volumen de alcohol: aguardiente (marca Néctar, 24%), ron (marca Santafé, 34%) y *whisky* (marca Ballantines, 43%). Este fue introducido al embrión

por instilación en el saco aéreo de cada huevo. El procedimiento se realizó en dos etapas: en la primera, se instilaron 9 huevos en el día 0; en la segunda, se instilaron 9 huevos en el día 4 (~96 horas) de incubación, correspondiente al estadio 24 del desarrollo embrionario de pollo descrito por Hamburger y Hamilton (1992/1951). Para los tratamientos control, se usaron 6 huevos que no recibieron ninguna concentración alcohólica y que adelantaron su desarrollo embrionario de manera normal hasta el día de la extracción embrionaria.

En todos los casos enunciados anteriormente, la extracción y obtención de los embriones a partir de los huevos se llevó a cabo a los 11 días de incubación, correspondiente al estadio 37 (Hamburger y Hamilton, 1992/1951). El procedimiento de instilación de los distintos licores sobre el huevo consistió en la punción de la cáscara del huevo en la región del saco aéreo, por el que posteriormente se introdujo un volumen de 0.1 mL mediante una jeringa de insulina con aguja estéril. Finalmente, este orificio se selló con cinta adhesiva para no interrumpir el desarrollo normal. Los huevos fueron incubados usando dos lámparas con bombillos de 70 w con el saco aéreo apuntando hacia las lámparas para facilitar la instilación, así como la posterior extracción de los embriones. En el día 11 de incubación, se procedió a efectuar la extracción de los embriones, para lo cual se abrió una amplia ventana en la cáscara. En los embriones obtenidos se evaluaron el peso y las anomalías anatómicas y se tomó registro fotográfico para el análisis y la discusión. Se determinaron las anomalías del desarrollo embrionario por tipo y frecuencia de ocurrencia y se analizaron estadísticamente. Por último, los embriones más representativos se fijaron en formol a 16% para su conservación.

⁵ Compuesto orgánico clasificado como alcaloide con efectos farmacológicos en el ser humano, raro en la naturaleza.

Tabla 1. Diseño experimental utilizado

Etapa	Control	Aguardiente	Ron	Whisky	Total
Día 0	6	3	3	3	15
Día 4	0	3	3	3	9
					24

Fuente: elaboración propia.

Nota: número de huevos empleados y tratamientos aplicados en cada etapa (día 0 y día 4). El número total de huevos empleados fue de 24 unidades, que se desglosaron en 6 huevos para cada etapa.

3. Resultados

Una vez instilados e incubados los huevos y extraídos los embriones, fue posible evidenciar que algunos embriones expresaron diferentes anomalías, así como variaciones en las tasas de supervivencia y anomalías morfológicas (figuras 1 y 2). Se observó una clara tendencia entre la frecuencia y ocurrencia de anomalías anatómicas con respecto a la concentración alcohólica, ya que los embriones sometidos a

las bebidas con concentración más baja de alcohol (aguardiente y ron) presentaron mayor cantidad de anomalías, a diferencia de la bebida de mayor concentración (*whisky*), que no presentó malformaciones claras. Al realizar la comparación de los resultados macroscópicos obtenidos en las dos etapas, no se encontraron diferencias una vez transcurridos los 11 días de incubación; es decir, los embriones provenientes de huevos tratados con la bebida alcohólica desde el día 0 presentaron los mismos resultados que aquellos tratados en el día 4 de incubación, ya que tuvieron el mismo tipo de malformaciones.

Las anomalías observadas en el desarrollo fueron evisceración de órganos torácicos y abdominales y anoftalmia unilateral del embrión (figuras 1 y 2). En los embriones expuestos a concentraciones alcohólicas de 34% y 43% se evidenció que la aparición de anomalías fue menor con respecto a los embriones tratados con concentración de alcohol de 24% (figura 3). Para el análisis del peso corporal de los embriones obtenidos se calculó el promedio (figura 4), evidenciando que los embriones tratados con aguardiente presentaban un promedio mayor con respecto al resto de tratamientos. Con estos datos se realizó una tabla Anova (tabla 2) ($p = 0,4606$).



Figura 1. Imagen macroscópica de dos embriones tratados con aguardiente (Néctar, 24 %) con presencia de malformaciones. A. Vista lateral del embrión con presencia de edema de arcos viscerales (e). B. Vista lateral del embrión con evisceración de corazón (c) y anoftalmia unilateral, enfocada en la evisceración. C. Vista lateral del embrión con evisceración y anoftalmia unilateral (a), enfocada en la anoftalmia.

Fuente: elaboración propia.



Figura 2. Imagen macroscópica de embrión tratado con ron (Santafé, 34%), con presencia de malformaciones. Vista lateral del embrión donde se observa presencia del corazón (c) y edema en arcos viscerales (e).
Fuente: elaboración propia.

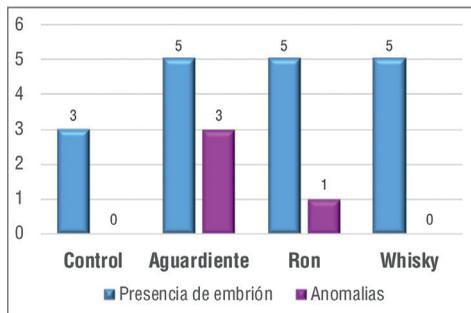


Figura 3. Presencia de embrión y cantidad de embriones con presencia de anomalías posexposición a las diferentes concentraciones de bebidas alcohólicas utilizadas.
Fuente: elaboración propia.

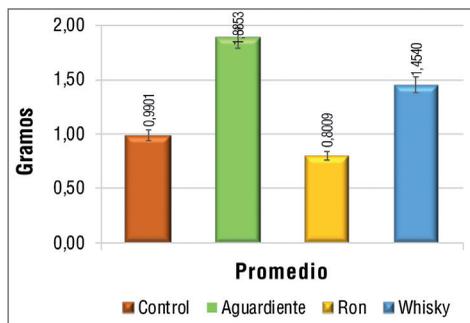
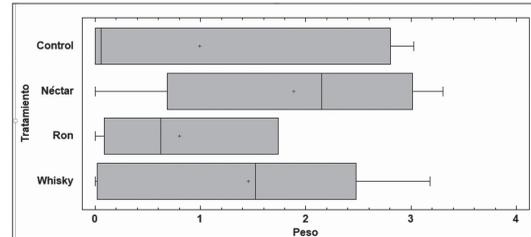


Figura 4. Peso promedio de embriones posexposición a diferentes concentraciones de bebida alcohólica.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 2. Anova del peso corporal con respecto a los tratamientos



Fuente: elaboración propia.

4. Discusión

Los resultados obtenidos en esta prueba coinciden con los hallazgos publicados por Illanes et ál. (1995), en los que los embriones que fueron tratados con la concentración más baja de alcohol presentaron mayor cantidad de malformaciones (por ejemplo, evisceración de órganos torácicos y abdominales, edema generalizado comprometiendo principalmente las extremidades pelvianas y porción inferior del tronco y anoftalmia unilateral y bilateral). Por otra parte, tampoco observaron que el patrón de malformaciones presentadas en los dos tratamientos (día 0 y día 4) demostrara diferencia alguna con respecto al momento en el cual fue instilada la sustancia. Esto también fue sustentado en los estudios realizados por Sándor y Elías (1968), Romanoff (1972), Gilani et ál. (1986) y Jones et ál. (1973), que hacen referencia a la concentración de etanol y su efecto teratogénico. Allí se menciona que este se encuentra relacionado con la reabsorción embrionaria y que las concentraciones más altas de alcohol influyeron en la cantidad de embriones con reabsorción.

Esto puede suponer que el promedio de peso obtenido en este estudio posiblemente está relacionado con esta característica, ya que los embriones sometidos a las concentraciones

más altas de bebidas alcohólicas presentaron un menor promedio de peso con respecto a los embriones sometidos a la concentración más baja; así mismo, puede estar influenciado por el tipo de camada a partir de la cual se obtuvieron los huevos, pues existe la posibilidad de que estos varíen su tamaño de acuerdo con la dieta previa y el tamaño que presentaba su parental (Rivas, 2013).

La evisceración presentada puede estar relacionada con la inhibición de los factores de la formación de los arcos viscerales en el estadio 24 de Hamburger y Hamilton (1951), y la anoftalmia, con los factores implicados en la formación del ojo, como Sonic hedgehog (SHH), que al ser alterado provoca malformaciones (Gilbert, 2009). Además, como lo mencionan Ahlgren et ál. (2002), los embriones tratados con etanol presentan un gran patrón de muerte celular o apoptosis, observándose esto en células de la cresta neural premigratorias y migratorias que pueden dar origen a distintas estructuras faciales, estructuras del oído, células del sistema nervioso, e incluso a estructuras en órganos vitales como el corazón. Debido a esto se generarán distintas malformaciones si se induce a la apoptosis de estas células por medio del alcohol; además, si las células del tubo neural no realizan la debida migración, este no podrá realizar los debidos cierres, causando así posibles malformaciones.

La evisceración observada en la figura 1 permitió evidenciar que se presentaron fallas en los cierres del tubo neural de algunos embriones, por lo que se presentó evisceración del corazón o de los órganos abdominales; también se puede presentar anencefalia, entre otros. Por otra parte, este mismo autor menciona que el alcohol puede bloquear la señalización de SHH y, por ende, la pérdida de este, lo cual se evidenció en que algunos embriones solo desarrollaron un ojo. Esto ocurre debido

a que SHH juega un papel muy importante en la bilateralización del área facial y a que se evita una centralización de los genes que promueven la formación de los ojos, estimulando la ubicación correcta de estos. Por lo tanto, si hay fallas en SHH habrá complicaciones en la formación de los dos globos oculares y solo se generará uno de estos (Gilbert, 2009).

Como se observa en la figura 4, el tratamiento con aguardiente (24%) presentó un mayor promedio de peso con respecto al resto de tratamientos, pero según la tabla Anova (tabla 2), obtenida en el análisis estadístico con un $p=0,4606$, fue posible evidenciar que el número utilizado no fue suficiente, por lo tanto, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de peso obtenido entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel de confianza del 95%.

5. Conclusiones

Los efectos teratogénicos del etanol están en proporción a su concentración, representados en evisceración, anoftalmia, pérdida de peso, entre otros. Compuestos presentes en las bebidas alcohólicas pueden ser factores influyentes en las malformaciones, los cuales no se lograron analizar a profundidad en este trabajo, por lo que se necesitan más ensayos para este fin. Así mismo, se sugiere realizar el estudio con un mayor número de individuos para corroborar los resultados obtenidos.

Agradecimientos

Al Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Central por facilitar los insumos, materiales e instalaciones de los laboratorios necesarios para la ejecución del presente

trabajo. Al profesor Jorge Mario Cárdenas P. por el acompañamiento y guía durante el desarrollo del proyecto, a Alfonso Castiblanco por facilitarnos el acceso a los huevos fértiles.

Referencias

- Ahlgren, S. C., Thakur, V. y Bronner-Fraser, M. (2002). Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10476-10481.
- Gilani, S., Sachdev, R. y Persaud, T. (1986). Chick embryonic development following exposure to ethanol and pyrazole. *Anatomischer Anzeiger (Jena)*, 162, 79-82.
- Gilbert, S. F. y Epel, D. (2009). *Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Guerrero, A., Gómez, A., Miranda, E. y Olvera, J. (2013). *Efectos del consumo de alcohol en la mosca Drosophila como posible modelo toxicológico*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hamburger, V. y Hamilton, H. (1992/1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195, 231-272.
- Illanes, J., Blanquez, M. J., González, M. E. y Rojo, C. (1995). Inducción experimental a malformaciones por instilación de etanol en huevos embrionados de pollo (*Gallus gallus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 24(4), 217-221.
- Jones, K., Smith, D., Ulleland, C. y Streissguth, A. (1973). Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet*, 1, 1267-1271.
- Lemoine, D. (1968). Les enfants de parents alcooliques. Anomalies, observees de 127 cas. *Quest Medical*, 25, 477-482.
- López, M. y Filippetti, V. (2014). Consecuencias de la exposición prenatal al alcohol: desarrollo histórico de la investigación y la evolución de las recomendaciones. *Revista Colombia de Obstetricia y Ginecología*, 65(2), 162-173.
- Padilla, J., Gómez, F. y Garrido, A. (2015). Síndrome del feto alcohólico y trastornos del neurodesarrollo relacionados con el alcohol. *Anuario de Investigación en Adicciones*, 3(1).
- Rivas, D. (2013). Estudio del efecto de sustituir maíz (*Zea mais*) por harina de algarroba (*Prosopis pallida*) en diferentes porcentajes en la elaboración de balanceado para la alimentación de pollos broilers (tesis). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Romanoff, A. (1972). *Pathogenesis of the avian embryo*. Nueva York: Wiley Interscience.
- Sandor, A. y Elias, S. (1968). The influence of ethyl-alcohol on the development of the chick embryo. *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol*, 5, 51-76.
- Sandor, S. (1968). The influence of ethyl-alcohol on the developing chick embryo. *Rev. Roum. Embryol. Cytol. Ser. Embryol*, 5, 167-171.
- Sulik, K., Johnston, M. y Webb, M. (1981). Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science*, 214(4523), 936-938.