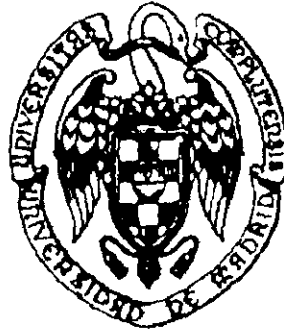


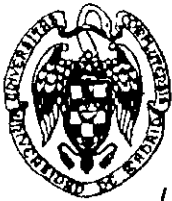
FACULTAD COMPLUTENSE DE MEDICINA
MADRID



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA
TERATOGENESIS DEL INTERFERON
ALFA-2BETA EN VERTEBRADOS

Por: *JOSE MANUEL COZAR OLMO*



Universidad Complutense
Facultad de Medicina
MADRID

CÁTEDRA DE ANATOMÍA
Prof. J. JIMÉNEZ COLLADO
CATEDRÁTICO

Dr. D. JUAN JIMENEZ COLLADO, CATEDRATICO NUMERARIO DE ANATOMIA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MADRID.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA TERATOGENESIS DEL INTERFERON ALFA-2B EN VERTEBRADOS", ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado D. José Manuel Cózar Olmo, utilizando para ello el material existente en la Cátedra 2ª de Anatomía e Instituto de Embriología de la Universidad Complutense, considerando quien suscribe, que dicho trabajo reúne las condiciones que por Norma y Ley son exigibles para la colación de Grado de Doctor.

Dado en Madrid, a quince de Enero de mil novecientos noventa y cuatro



Fdo. Prof. Juan Jiménez Collado

Departamento de Biología Experimental y
Ciencias de la Salud.
Sección de Ciencias Morfológicas
Universidad de Jaén

DR. D. RAFAEL J. BARRANCO ZAFRA, PROFESOR
TITULAR DE ANATOMIA HUMANA DEL DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL Y CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA TERATOGENESIS DEL INTERFERON ALFA-2B EN VERTEBRADOS" realizado por D. JOSE MANUEL COZAR OLMO, ha sido realizado bajo mi codirección, utilizando el material de los Departamentos de Ciencias Morfológicas de la Universidad Complutense de Madrid y de Jaén.

Dado en Jaen, a quince de Enero de mil novecientos noventa y cuatro



Fdo. Prof. Rafael J. Barranco Zafra.



Universidad Complutense
Facultad de Medicina
MADRID

DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS
MORFOLOGICAS II

Dr. D. JOSE RODRIGUEZ VAZQUEZ, PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA HUMANA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

HACE CONSTAR:

Que el trabajo de investigación realizado por el Licenciado D. José Manuel Cózar Olmo, titulado: " ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA TERATOGENESIS DEL INTERFERON ALFA-2B EN VERTEBRADOS", reúne los requisitos exigidos por Norma y Ley para la colación del Grado de Doctor.

Es un trabajo riguroso, con un planteamiento y metódica correcta. Los resultados correctamente discutidos y las conclusiones obtenidas hacen de él, una valiosa aportación al campo de la Embriología Experimental y Teratología.

Dado en Madrid, a quince de Enero de mil novecientos noventa y cuatro

Fdo: Prof. José Rodríguez Vázquez

DEDICATORIA

*A mis Padres,
gracias a los cuales todo fué posible.*

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación de una Tesis Doctoral es, por definición, una labor de equipo, en el que la pieza básica, el investigador neófito, debe ser dirigido por otros investigadores, expertos en la materia a estudio, quienes siguiendo el espíritu hipocrático, enseñan su arte y métodos al investigador iniciado para que éste obtenga, de por sí, sus propios resultados y conclusiones.

Esta labor de dirección y enseñanza, la recibí desinteresadamente de los Dres. D. Juan Jiménez Collado y D. Rafael Barranco Zafra, quienes con noble paciencia, me enseñaron el método de trabajo, me ayudaron a obtener e interpretar los resultados, me animaron a discutir los mismos, y me condujeron a obtener las conclusiones de esta investigación, hechos todos por los que hoy puedo presentar esta Tesis Doctoral. A ambos, GRACIAS.

Este trabajo de investigación, como un buen barco velero, ha navegado muy bien dirigido, sin embargo, no hubiera llegado a buen puerto, sin ese viento a favor que en todo momento impulsó sus velas, y que no fué otro sino la confianza y aliento que me dió mi esposa Mari Luz. Un historiador, conocedor de numerosas biografías, afirmó que tras cada gran empresa del hombre, hubo una gran mujer, y he de reconocer que estaba muy en lo cierto, pues, tras el esfuerzo y dedicación que día a día precisé para realizar este trabajo, en todo momento, estuvo Mari Luz Ortiz Enriquez.

Sentí y conocí la cotidiana dureza del trabajo investigador, y es por eso que debo agradecer la ayuda de aquéllos que, en su escaso tiempo disponible, decidieron ayudarme y colaborar en este interesante trabajo experimental, por tanto, mi gratitud a D. José Gutierrez, D. Miguel Gallego, y al Dr. Basilio Dueñas.

Igualmente quisiera agradecer la amable disposición y atención que en todo momento me dispensaron Anita y Montse, Secretarias de la Cátedra del Dr. Jiménez Collado, quienes supieron ayudarme en ese difícil mundo de la "burocracia administrativa", necesaria para que esta Tesis Doctoral pueda ser leída.

Por último, agradecer el apoyo anímico recibido de mis padres, hermanos, familiares, y amigos, necesario para crear esa "atmósfera" de estudio y dedicación a la investigación, que tan útil me ha sido.

INDICE

	Página
JUSTIFICACION	1
INTRODUCCION	6
Revisión histórica del interferón	7
Farmacología del Interferón alfa-2b	14
Teratogénesis Experimental	26
MATERIAL Y METODOS	39
RESULTADOS	49
DISCUSION	152
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFIA	182

JUSTIFICACION

Hoy día, el desarrollo espectacular de la Biología Molecular, Ingeniería Genética, e Inmunología Clínica, han condicionado la aparición de unos nuevos conocimientos y fármacos en la Terapéutica Médica Oncológica, que probablemente no sean más que el principio del tratamiento definitivo del Cáncer : La Immunoterapia.

En los últimos 40 años (1950-1990) de la historia de la quimioterapia contra el cáncer, se han evaluado en torno a los 500.000 productos químicos con eventual efecto antitumoral, de los cuales, tan sólo unos 40 fueron incorporados íntegramente a la terapéutica médica, y en los últimos años se ha estancado el progreso de la quimioterapia contra el cáncer.

Por el contrario, en la última década (1980-1990) hemos asistido al desarrollo de una nueva forma de tratar el cáncer: los Modificadores de la Respuesta Biológica, término introducido por OLDHAM en 1982, para denominar a todos los agentes con capacidad para alterar la respuesta biológica en la interacción Huésped - Tumor, con especial acción del sistema inmune del individuo.

Ante esta situación, los médicos, quienes en la práctica diaria tratamos y vivimos la angustia del paciente canceroso, debemos estar en la vanguardia de estos nuevos medicamentos para ofrecérselos y tratar de curar a nuestros pacientes, pero sin caer en la "presunción de inocencia" de todos los nuevos fármacos que en el mercado aparezcan, ya que algunos por la rapidez de su introducción en la Clínica Humana, adolecen de la investigación básica suficiente, sin conocerse bien todos los posibles efectos adversos que, al alterar el sistema inmune, pueden producir.

El espíritu del Juramento Hipocrático " Primum non nocere ", hace del Médico la persona idónea para contrastar los beneficios y los potenciales riesgos que estos nuevos medicamentos pueden conllevar para el paciente.

En la literatura mundial revisada acerca del interferón-alfa-2b, existen incontables estudios Clínicos de tratamiento en numerosos tipos de tumores, en algunos de los cuales ha resultado ser muy efectivo, como sucede en la Tricoleucemia.

La existencia de una revista internacional monográfica titulada " Journal of Interferon Research " publicada desde 1981 en Estados Unidos, da idea del enorme esfuerzo que investigadores de todo el mundo han realizado por depurar y estudiar las posibilidades terapéuticas de este fármaco.

Actualmente, en el Servicio de Urología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, del que soy miembro como Adjunto, estamos realizando un estudio para valorar los beneficios del tratamiento con interferón-alfa-2b en el Carcinoma Renal Metastásico.

Motivados por el uso en nuestro Hospital de este producto, profundizamos en su estudio, no sólo de sus cualidades y beneficios para tratar el cáncer, sino también de sus efectos adversos y toxicidad. Nos llamó poderosamente la atención la ausencia de información acerca de su uso en el embarazo humano, existiendo tan sólo y de forma anecdótica, tres cartas editoriales publicadas en el Journal American of Hematology por BAER, 1991, CRUMP, 1992, y PETIT, 1992, en la que informan de 3 casos de madres gestantes en tratamiento con interferon alfa por padecer una leucemia linfocítica crónica, las dos primeras, y por

una trombocitemia esencial la tercera, cuyos embarazos llegaron a término, siendo normales los recién nacidos.

En el Prospecto normalizado emitido por los laboratorios que comercializan el interferon alfa-2b (SHERING-PLOUGH, S.A.), se publica que: " el interferon-alfa puede ser usado en la mujer gestante siempre que los beneficios para ésta superen los riesgos que puede tener para el feto" , a lo que nosotros preguntamos: ¿ Qué tipo de riesgos? ¿ Son acaso malformaciones mayores o menores? ¿ Afectan a un periodo especial del embarazo? ¿ Afecta al desarrollo de algún órgano o tejido en concreto?

Revisada la Bibliografía, y los archivos de los laboratorios que lo comercializan, no encontramos respuesta a tales cuestiones.

Llegados a este punto, nos planteamos el problema de investigar, por nosotros mismos, los posibles efectos teratógenos que el interferon-alfa-2b puede ocasionar. Y pues que la experimentación embrionaria humana queda, por principios, fuera de nuestra intención, decidimos seguir un via paralela: la Embriología Experimental Comparada, en la que la extrapolación de resultados, estaria en dependencia de la específica estructuración placentaria-principal vía de aceptación en la equiparidad teratológica- si bien, no puede usarse como concepto definitorio, si al menos, nos sirve como indicativo potencial del factor de agresión y por tanto, de la capacidad lesional de formaciones en vias de desarrollo. En este sentido CAJAL afirmaba: "Es frecuente la imposibilidad de esclarecer la estructura y función de un órgano porque atacamos el problema por su lado más difícil, pretendiendo resolverlo en el hombre o vertebrados superiores, en los que muestra gran complejidad, y no por medio de embriones, donde alcanza su máxima

sencillez".

Por lo expuesto, y por el elevado número de sujetos de experimentación necesarios, elegimos el embrión de ave, por ser de entre los vertebrados, el que presenta una mayor asequibilidad, fiabilidad en sus resultados y una manipulación relativamente más simple.

Por último, y como final de justificación de esta Tesis Doctoral, fuera conveniente recordar las palabras de MIGUEL DE UNAMUNO, pues según él, no esperemos la llegada del genio que sirve de poco o no sirve nada, si no es núcleo en torno del cual se agrupan los cien hombres de mediano talento, pero honrados y tenaces; estos hombres pueden a menudo equivocarse, bien en los datos obtenidos por la observación y experimentación, bien en la interpretación de los mismos, entonces deben reconocerlo pero no abandonar, pues el que no intenta no yerra, pero tampoco acierta.

INTRODUCCION

REVISION HISTORICA DEL INTERFERON

El **interferón** es una sustancia existente en todos los organismos vivos, cuyo descubrimiento hace ahora 35 años, se produjo gracias a la capacidad de observación de dos investigadores: ISAACS y LINDENMANN, quienes en 1957, estudiando el fenómeno de la interferencia viral, encontraron una sustancia nueva, que interfería la replicación viral, cuyo estudio y desarrollo ha supuesto una nueva modalidad de tratamiento del Cáncer en Medicina.

ISAACS y LINDENMANN, 1957, investigaron durante años el fenómeno de la interferencia viral en **células de embrión de pollo**, exponiendo un cultivo de dichas células al virus INFLUENZA inactivado con calor; estos autores observaron que las células secretaban al medio de cultivo una **sustancia o factor** que interfería la replicación viral intracelular, a esta sustancia, hasta entonces desconocida, la denominaron **Interferón**.

La capacidad de esta sustancia de "interferir" la replicación viral intracelular, y por tanto, la infección viral en un organismo, despertó la imaginación de los científicos de la década de los 50, quienes la consideraron como el fármaco con mayor futuro en la terapéutica médica de cuantos se conocían.

A finales de la década de los 50 , e inicio de los 60, los investigadores se encontraron con la dificultad de obtener **interferón** humano en cantidad significativa de cualquier secreción o tejido corporal.

Esta inaccesibilidad al producto real en dosis suficiente, hizo que que se le atribuyeran, de forma especulativa, propiedades y cualidades terapéuticas "magníficas", con poco riesgo de ser comprobadas y por

tanto rebatidas.

CANTELL, 1961, descubrió que las suspensiones de leucocitos humanos estimulados, eran capaces de producir y secretar al medio unas cantidades de **interferón** 10 veces superiores a las conseguidas en suspensiones de otras células humanas de distinta estirpe.

CANTELL, 1961, desarrolló un método para la obtención y purificación de **interferón** humano. Este autor estimuló leucocitos humanos de sangre periférica con virus SENDAI, los cuales secretaban interferón al medio de cultivo, y posteriormente, mediante precipitación con ácido de tiocinato potásico, el interferón era parcialmente aislado y purificado.

El **interferón** obtenido por el método de CANTELL era puro en un 1%, precisaba mucho tiempo, y las cantidades obtenidas eran muy pequeñas, por lo que resultaba muy costoso.

A pesar de estas dificultades, la investigación básica y preclínica continuó durante la década de los 60, estudiando no sólo sus propiedades como fármaco anti-viral en las enfermedades infecciosas, sino descubriendo nuevas propiedades como agente antiproliferativo, y por tanto útil en el tratamiento contra el Cáncer.

GRESSER, 1970, observó que los cánceres inducidos por virus en ratas, podían ser prevenidos o retrasados en su evolución, cuando se le administraba **interferón** al animal.

Múltiples estudios con resultados similares en animales, condujeron a STRANDER, 1971, a realizar en Suecia el primer estudio clínico

en el hombre para evaluar el efecto antitumoral del interferón humano.

STRANDER, 1971, utilizó el **interferón** humano obtenido por el método de CANTELL, en pacientes diagnosticados de osteosarcoma avanzado; los resultados que comunicó mostraban que el **interferón**, aparentemente, aumentaba la supervivencia de aquellos pacientes a los que se le administró.

Durante la década de los 70, y sobre todo a partir de 1978 con el apoyo económico de la Sociedad Americana Contra el Cáncer, se realizaron numerosos ensayos preclínicos y clínicos para evaluar el uso terapéutico del **interferón** humano contra el Cáncer.

Sin embargo, los resultados eran de difícil interpretación, y no era posible establecer conclusiones definitivas acerca de las acciones del **interferón**, ya que los estudios no eran prospectivos y controlados, el número de pacientes era muy pequeño, y generalmente eran enfermos con muy mal pronóstico, muchos en fase terminal, en los habían fallado otras formas de tratamiento anti-tumoral.

Además, el **interferón** utilizado era obtenido por el método CANTELL, por lo que las dosis administradas eran pequeñas y el grado de pureza muy bajo, con lo que parecía improbable conseguir dosis eficaces para el tratamiento del Cáncer.

RUBINSTEIN y Cols, 1978, obtuvieron interferón leucocitario humano homogéneo, consiguiendo su purificación por un nuevo método, el proceso de cromatografía líquida de alta resolución.

RUBINSTEIN, 1979, logró aislar, purificar y analizar la estructura

proteica del **interferón alfa y gamma**, no obstante se encontró con un nuevo problema: la existencia de múltiples subtipos de **interferón alfa**, de estructura proteica similar pero no idéntica, y que presentaban distinta potencia en su actividad biológica antiviral. Distintas hipótesis trataron, sin éxito, de explicar estos hallazgos, que aumentaban la complejidad del ya denominado por STEWART en 1979, "**El Sistema Interferón**".

STEWART, 1979, en su libro " The Interferón System ", definió a los **interferones** como " una familia heterogénea de proteínas con actividad antiviral inespecífica, así como con actividades antiproliferativas e inmunorreguladoras, que se producen en el organismo como respuesta a una infección viral, o frente a inductores sintéticos o biológicos " .

STEWART, 1980, estableció también la nomenclatura de los distintos tipos de interferón existentes en la actualidad. Hizo una clasificación basada en la antigenicidad y secuencia de aminoácidos de cada interferón, que es válida hoy día, a saber: Interferón-alfa, Interferón-beta, e Interferón-gamma.

Llegados a este punto de la revisión histórica del **Interferón**, nos centraremos en el desarrollo de la investigación del **interferón-alfa**, por ser éste el producto objeto de nuestro estudio.

Desde su descubrimiento en 1957, el primer paso importante en la investigación del **interferón**, lo dieron NAGATA y Cols, 1980, y GOEDDEL y Cols, 1980, ambos grupos de investigadores descubrieron de forma simultánea e independiente, la familia de genes que codificaban el **interferón-alfa** leucocitario humano.

Este hallazgo permitió explicar la existencia de los distintos subtipos de **interferón-alfa** descritos por RUBINSTEIN, 1979, ya que según qué genes de esa familia genética se expresaran, se obtendrían distintas moléculas (subtipos) de interferón-alfa.

El conocimiento de los genes que codificaban el **interferón-alfa** leucocitario humano, junto con el desarrollo contemporáneo de la ingeniería genética y la tecnología DNA-recombinante, permitieron a GOEDDEL y Cols. llevar a cabo en 1980, un interesante experimento que revolucionaría la obtención, comercialización y aplicaciones clínicas del interferón-alfa.

GOEDDEL y Cols, 1980, insertaron un plásmido con los genes que codificaban el interferón-alfa leucocitario humano, en la bacteria *ESCHERICHIA COLI*, la cual sintetizó y produjo en grandes cantidades interferón-alfa de alto grado de pureza (superior al 99%).

GOEDDEL, 1980, demostró que este **interferón-alfa**, producido por la bacteria *E. COLI*, era biológicamente activo en el ser humano. A partir de este momento se pudo disponer del suficiente **interferón-alfa** puro, como para realizar estudios preclínicos y clínicos que valorasen la auténtica capacidad y potencia biológica de este producto.

El **interferón-alfa** natural se produce por la estimulación viral o bacteriana de los leucocitos, y es el que agrupa un mayor número de especies diferentes, HOROHOV, D.W., 1987. Hoy día, se conocen unos 30 subtipos diferentes de interferón-alfa, siendo el subtipo 2 el de mayor importancia biológica.

Las siglas "n1" y "2a, 2b" añadidas al **interferón-alfa** hacen

referencia al tipo de método utilizado para su obtención, así el **interferón-alfa-n1** se obtiene al estimular una línea celular linfoblastoide "in vitro", la cual produce una combinación de subtipos de **interferón-alfa** que luego se purifican por cromatografía (comercializado por Wellcome).

Cuando se obtiene utilizando la tecnología molecular recombinante, que permite la inserción de secuencias de DNA humano codificadoras del **interferón-alfa**, mediante un plásmido, en la bacteria *ESCHERICHIA COLI*, se denomina **interferón-alfa-2a** (comercializado por Roche) o **interferón-alfa-2b** (comercializado por Shering), siendo este último el utilizado por nosotros .

FARMACOLOGIA DEL INTERFERON ALFA-2b

El **interferón-alfa-2b** es una proteína compuesta por 165 aminoácidos, y con un peso molecular de 19.300 daltons, STREULI, M., 1980.

El gen que codifica este interferón-alfa-2b humano fue descrito por STREULI, NAGATA y WEISSMAN, en 1980, en el Instituto de Biología Molecular de Zurich, Suiza. Este gen fue aislado de leucocitos estimulados por virus, usando una técnica de transcripción reversa (RNA - DNA). Una vez obtenido el gen, se introduce en un plásmido, que se inyecta en una bacteria: *ESCHERICHIA COLI*. Posteriormente se cultivan las bacterias hasta que cada una de ellas forma un Clon, es decir, una colonia de células idénticas, las cuales producirán el **interferón** como si fuese una proteína de su propia constitución.

GREEN y KIRKWOOD, 1985, en una monografía sobre el interferón-alfa-2b, informaron acerca de los estudios farmacológicos realizados en animales, en los que se sugiere que el **interferón-alfa-2b** sería metabolizado o degradado principalmente en el riñón. El aclaramiento en sangre tras su administración intravenosa es rápido, y puesto que la excreción de **interferón** en orina es muy baja, la mayor parte del producto (90%) debe ser reabsorbido en los tubulos de la nefrona renal. Se ha postulado que el catabolismo del **interferón-alfa-2b** se produce en los lisosomas y en los cilios del borde en cepillo del epitelio tubular renal, GREEN, M., 1985.

FARMACOCINETICA

En 1987, RADWANSKI y Cols, estudiaron la farmacocinética del **interferón-alfa-2b**; realizaron un ensayo clínico randomizado en 12

voluntarios sanos en quienes se administró el **interferón-alfa-2b** a dosis de 10 millones U.I. por las 3 vías: intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.); los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1.- El **interferón-alfa-2b** fue absorbido por completo tanto por vía i.m. como por vía s.c., siendo su biodisponibilidad superior al 80%
- 2.- Las concentraciones plasmáticas máximas fueron de 188 U.I./ml. por vía i.v., 47.6 U.I./ml. por la vía i.m. a las 6 horas, y de 55.3 U.I./ml. por la vía s.c. a las 8 horas.
- 3.-El tiempo transcurrido desde la administración hasta alcanzar la concentración plasmática máxima fue de 0.5 horas para la vía i.v., 6.7 horas para la vía i.m., y de 7.8 horas para la vía s.c.
- 4.- El área bajo la curva de concentración plasmática / Tiempo, fue de 208 U.I./hora/ml. para la vía i.v., de 518.7 U.I./hora/ml. para la vía i.m., y de 627.7 U.I./hora/ml. para la vía s.c.
- 5.- El hecho de que la biodisponibilidad absoluta por vía i.m. o s.c. sea superior a la vía i.v., ha sido atribuido a la diferencia de captación tisular que se produce según la vía utilizada.
- 6.- La semivida de distribución tras la infusión i.v. es de 0.1 horas. No se aprecia acumulación de **interferón-alfa-2b** en ningún órgano en particular, si bien, la cavidad peritoneal puede actuar como reservorio, permitiendo el mantener niveles plasmáticos terapéuticos durante, al menos, 5 días.
- 7.- La semivida de eliminación es de 1.7 horas por vía i.v., de 2.2 horas

por vi i.m., y de 2.9 horas por via s.c.

MECANISMOS DE ACCION

HOUGLUM, J.E., en 1983, estudió el mecanismo de acción del **interferón-alfa**, atribuyéndole un efecto directo sobre el metabolismo celular, así como otros efectos indirectos a través de la estimulación del sistema inmune del individuo.

Para conseguir el efecto directo celular es preciso que la molécula de **interferón-alfa** se una a receptores específicos de la membrana celular. Esta unión provoca una serie de reacciones intracelulares, como es la activación de 2 enzimas: una Protein-Kinasa, y una Nucleótido-Polimerasa (llamada 2'5'A Polimerasa).

La enzima Protein-Kinasa activada, a su vez, inactiva el Factor de Iniciación de la cadena protéica, necesario para la síntesis protéica inducida por los virus para su multiplicación ; por este mecanismo el interferón-alfa inhibe la replicación viral intracelular, HOUGLUM, J.E., 1983.

Por otro lado, la enzima Nucleótido-Polimerasa (2'5'A Polimerasa) activada, a su vez activa una Endoribonucleasa que rompe y divide el RNA viral y el RNA mensajero de la propia célula. La transcripción y replicación de los virus RNA y DNA, es de esta forma inhibida, HOUGLUM, J.E., 1983.

La ruptura del RNA mensajero celular por la Endoribonucleasa activada, tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis de

proteínas necesarias para la propia célula, por lo que se afectará el ritmo de crecimiento y/o división celular.

BORDEN y BALL, en 1981 analizaron las propiedades y efectos biológicos del **interferón-alfa**, por los cuales desarrolla su actividad antitumoral, de un modo totalmente diferente a los demás agentes citotóxicos y quimioterápicos conocidos.

BORDEN y BALL, 1981, concluyeron que el **interferón-alfa** ejercía su acción antitumoral por uno o más de los siguientes mecanismos:

1.- **EFEECTO ANTIPROLIFERATIVO**, esto es, inhibición directa de la división de la célula tumoral.

El interferón-alfa inhibe la división tanto de las células normales como de las tumorales, actuando en todos los estadios del ciclo celular (G0, G1, G2, G3). Durante el periodo postmitótico (G1), el interferón-alfa inhibe o reduce la síntesis de RNA y otras proteínas esenciales para la síntesis de DNA, con lo que la célula queda en fase G0 o enlentece el ritmo del ciclo celular. Este efecto se inicia al unirse el interferón-alfa a los receptores de membrana celular, y es reversible si el interferón-alfa es retirado. Dicho efecto ha sido demostrado "in vitro" e "in vivo" por EVINGER y Cols., 1981, y TROTTA, 1985.

TROTTA, 1985, comprobó como el interferón- alfa-2b inhibía el crecimiento de líneas celulares de tumores sólidos humanos (cultivos de xenoinjertos de osteosarcoma, adenocarcinoma renal y carcinoma gástrico).

2.- INHIBICION DE LA EXPRESION DE ONCOGENES.

El Oncogen, existente en todas las células humanas, es una sección específica de DNA, que cuando se expresa adecuadamente, regula la proliferación celular durante el desarrollo y crecimiento normales, BISHOP, J.M., 1985.

La alteración en la expresión de los oncogenes, sobre todo por exceso, se cree, estaría implicada en la transformación neoplásica de la célula huésped, BISHOP, J.M., 1985.

CLEMENS, en 1985 estudió la relación existente entre el interferón-alfa y los oncogenes; este autor comunicó que el interferón muestra un efecto supresor de la expresión de los oncogenes, resultando de ello una inhibición de la proliferación celular.

Actualmente se investigan otras vías de actuación del interferón-alfa como inhibidor de la expresión de otros genes esenciales, como aquéllos que codifican las mitocondrias de la propia célula, SHAN y Cols, 1990.

3.- EFECTO IMMUNO-MODULADOR.

HERBERMAN y Cols, 1979, SILVA y Cols, 1980, HOUGLUM, 1983, PETERS y Cols, 1986, han demostrado en numerosos estudios que el **interferón-alfa** posee una fuerte actividad inductora de la capacidad citotóxica de las células asesinas o "Natural Killer". Simultáneamente el **interferón-alfa** incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos, aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, y estimula la síntesis de inmunoglobulinas de los linfocitos B.

Por otro lado, el **interferón-alfa** incrementa la expresión antigénica de la membrana de la célula tumoral, (antígenos HLA y antígenos tumorales de superficie) haciendo que el tumor sea mejor reconocido por el sistema de defensa inmunitario anteriormente citado, OLDHAM y SMALLEY, 1983.

4.- EFECTO SOBRE EL FENOTIPO CELULAR.

El **interferón-alfa** puede inducir la reversión del fenotipo maligno de la célula tumoral. Esto fué demostrado por HICKS, MORRIS y BURKE en 1981, y por TUREK y Cols. en 1982. Estos autores piensan que la reversión fenotípica de las células tumorales conseguida por el interferón "in vitro" puede estar asociada con el reestablecimiento parcial de los mecanismos de control del crecimiento desaparecidos en las células cancerosas.

En conclusión, el efecto antitumoral del interferón-alfa se debe a su acción citostática y citotóxica directa sobre la célula tumoral, combinada con un aumento de la actividad del sistema inmunitario, inducido por él, TROTTA, 1985.

ACTIVIDAD CLINICA E INDICACIONES

La actividad antiviral del **interferón-alfa**, hace de él un agente útil en el tratamiento de las infecciones virales, sin embargo, dado su alto coste económico, ha sido su actividad antitumoral e inmunomoduladora la que ha polarizado el uso clínico del **interferón-alfa**.

El **interferón-alfa** ha sido aceptado por la "Food and Drug Administration" (F.D.A.) de Norte-América para el tratamiento de la leucemia de células pilosas o Tricoleucemia, a dosis de 3 millones de U.I., administrados por vía intramuscular o subcutánea, diariamente durante 16 a 24 semanas, seguido de una dosis de mantenimiento tres veces por semana, QUESADA y Cols, 1984 y 1986.

En el resto de tumores sólidos, la dosis y régimen terapéutico óptimo del **interferón-alfa** no están definitivamente establecidos, habiéndose realizado diversos ensayos clínicos aleatorios y prospectivos para valorar la respuesta de los tumores en función de la dosis y frecuencia de administración, LEGHA, 1986, NEIDHART, 1986, QUESADA y Cols., 1985, KROWN, 1987.

En los tumores sólidos humanos, es válida la conclusión de CORTES-FUNES, 1990, quién afirma lo siguiente: "De los diferentes estudios publicados se puede deducir que la mayor tasa de respuestas con una toxicidad moderada se ha obtenido con la utilización de dosis intermedias de **interferón-alfa**: 18 - 20 millones de U.I./ metro cuadrado de superficie corporal del paciente", esto supondría una dosis aproximada de 36 - 40 millones de U.I. en un adulto de constitución fenotípica normal.

Basándonos en el índice de respuestas conseguidas tras el tratamiento con **interferón-alfa**, podemos establecer una clasificación de los tumores humanos en los que estaría indicado y en los que no, aunque los protocolos clínicos en estudio estén aún sin conclusiones definitivas respecto a la dosis, vía de administración, duración del tratamiento, criterios de respuesta clínica, etc.

Los Tumores en los que el interferón-alfa muestra una actividad clínica significativa, con un índice de respuestas superior al 30% son los siguientes:

- Tricoleucemia o Leucemia de células pilosas.
- Leucemia mielógena crónica.
- Linfoma no Hodgkin de bajo grado.
- Linfoma cutáneo de células T.
- Trombocitemia esencial.
- Sarcoma de Kaposi (asociado a SIDA).
- Tumor Carcinoide.
- Tumores vesicales superficiales (Terapia local).
- Micosis Fungoide.

El **interferón-alfa** ha demostrado tener una actividad clínica menor, con una tasa de respuestas entre el 10% y el 30% en los siguientes tumores:

- Mieloma Múltiple.
- Leucemia linfocítica crónica.
- Melanoma.
- Carcinoma Renal.
- Carcinoma de Ovario.

Por último, existen otros tumores en los que se ha probado el tratamiento con **interferón-alfa** sin obtener una respuesta que justifique su indicación (Tasa de respuestas inferior al 10%), así sucedió en los cánceres de mama, colon, pulmón, y próstata.

EFFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD CLINICA.

La mayoría de los pacientes tratados con **interferón-alfa** experimentan, al inicio del mismo, uno o más de los siguientes signos y síntomas: escalofríos, fiebre, fatiga, mialgias y artralgias, cefalea, sudoración, lo cual recuerda el cuadro de un resfriado o gripe. Estos efectos secundarios agudos suelen aparecer de 2 a 4 horas después de la administración, y son completamente reversibles, si bien se pueden tratar de un modo efectivo con paracetamol, LINDER-CICCOLUNGHI, 1985, RADWANSKI y Cols, 1987, RAMS PLA y Cols, 1990.

Los efectos secundarios publicados con mayor frecuencia en los pacientes que reciben un tratamiento prolongado, han sido fatiga (un 80% de los pacientes), anorexia (un 65%), náuseas y vómitos (un 45%), diarrea (un 35%) y en un 18 % los enfermos sufrieron pérdida de peso.

Otros efectos secundarios menos frecuentes fueron los vértigos (en un 20% de los pacientes), mareos (un 12%), confusión (un 8%), y depresión (un 5%), aunque también se han publicado casos de aparición de parestesias y entumecimientos por neuropatía periférica, trastornos del sentido del gusto, impotencia transitoria, y alteraciones dermatológicas como rash, prurito o alopecia, .

Si bien no se han identificado efectos cardiotóxicos directos, si puede presentarse hipotensión arterial (en el 5% de los casos), taquicardia, y cianosis periférica (en un 1%), siendo estos efectos cardiovasculares más frecuentes en ancianos, JONES e ITRI, 1986, SPIEGEL, 1987, FAUCI y Cols, 1987.

SPIEGEL, 1987, comunicó que muchos de los efectos adversos

observados eran dosis-dependientes.

JONES e ITRI, en 1986 demostraron que la incidencia de los trastornos nerviosos centrales y periféricos, así como las alteraciones del aparato digestivo y cardiovascular, aumentaban de manera proporcional al volumen de la dosis de interferón-alfa administrada.

Las alteraciones analíticas que se han observado en los pacientes sometidos a tratamiento con **interferón-alfa**, han sido leucopenia, anemia, trombopenia, elevación de las transaminasas y de la bilirrubina, que regresaron a la normalidad rápidamente tras disminuir la dosis o retirar el interferón-alfa, JONES e ITRI, 1986.

Respecto al uso del **interferón-alfa** en el **embarazo**, no existe suficiente información en la literatura revisada, no obstante, dadas sus actividades antiproliferativas anteriormente descritas, debe considerarse la posibilidad de que dañe al embrión o al feto humano. En estudios realizados en primates de la especie *Macaca* (*Macacus Rhesus*) se ha comprobado que el **interferón-alfa** produjo un aborto al principio de la gestación e irregularidades transitorias en los ciclos menstruales, cuando se administraba a razón de 20 a 500 veces la dosis utilizada en el hombre, HOFFMAN, 1986.

BAER, 1991, en una carta editorial publicada en la revista "*American Journal of Hematology*", en Mayo de 1991, informó escuetamente acerca de una paciente embarazada diagnosticada de leucemia mieloide crónica, en tratamiento con **interferón-alfa**, que consiguió llevar a término su gestación, no detectándose malformaciones en el recién nacido.

CRUMP y Cols., 1992, comunicaron mediante otra carta editorial en la misma revista otro caso similar de tratamiento con **interferón-alfa** en gestante diagnosticada de leucemia mieloide crónica. El embarazo llegó a término sin señalar malformaciones en el neonato.

PETIT y Cols., 1992, informaron de otro caso de embarazo a término normal, en una paciente que estaba en tratamiento de una trombocitemia esencial con **interferón-alfa-2b**.

A pesar de estos casos clínicos, existe un vacío de investigación sobre los potenciales efectos que el **interferón-alfa** puede tener en organismos en desarrollo y crecimiento, como lo es el embrión humano, por lo que los Laboratorios que lo comercializan (Shering-Plough S.A., y Roche,S.A.), aconsejan en el prospecto normalizado del producto, evitar su uso en la mujer gestante, y profundizar en la investigación sobre sus posibles efectos teratógenos.

***TERATOGENESIS EXPERIMENTAL CON
AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS***

Es a finales de siglo XIX cuando la Embriología Experimental empieza a considerarse como una Ciencia propia, LAIN ENTRALGO, 1963. El progreso de las técnicas en este siglo, aportan nuevos métodos de estudio para la investigación. Es notable como el análisis causal de los fenómenos en el desarrollo, basados en la experimentación, dan lugar a un conocimiento más preciso de los hechos naturales.

La gran mayoría de los estudios realizados en el campo de la Embriología, han sido realizados interrumpiendo el desarrollo del embrión, con lo que esta interrupción sólo permite observar lo que ocurrió en ese momento. Pues bien, La Embriología Experimental abre nuevos horizontes, y nos va a permitir el poner en tela de juicio y de sana crítica, una serie de fenómenos que eran considerados como dogmáticos, y que no son tales. En este sentido, es la Teratogénesis Experimental, campo extremadamente interesante, donde deseamos completar y perfeccionar nuestros conocimientos actuales.

Los fundadores de la Teratología Experimental, SAINT-HILAIRE, 1820, DARESTE, 1855, GERLACH Y KOCH, 1884, establecieron dos principios básicos, completamente válidos en la teratogénesis experimental actual:

- 1.- Un mismo agente teratógeno puede producir diversas anomalías del desarrollo dependiendo del momento de su actuación.
- 2.- Las más profundas alteraciones de la organogénesis tienen lugar cuando el agente teratógeno actúa en el estadio en que se determinan los territorios prospectivos y campos morfogénéticos de los diferentes órganos, es decir, durante la topogénesis embrionaria y al comienzo del periodo organogénético que la sigue.

Sin embargo, los distintos resultados obtenidos en la teratogénesis experimental con el mismo agente, por ejemplo la talidomida, en embriones de ratas, PLIES y KETELS-HARKER, 1962, ratones, GIROUD y Cols. 1962, conejos, SELLER, 1962, CHRISTIE, 1962, y en el pollo, KEMPER, 1962, YANG, 1963, RUANO, 1964, a pesar de que estuvieran en un estadio similar del desarrollo, llevó a la deducción de que, además de los principios enunciados, debía existir un factor de especie.

Efectivamente, JIMENEZ COLLADO, en 1966, estableció los Factores de la Teratogénesis Experimental, que son aquellos que condicionan la respuesta ante un agente teratógeno que se administra a la totalidad del embrión, a saber:

- I.- El estadio o momento del desarrollo en que se añade o actúa el agente.
- II.- La sensibilidad específica de cada especie a este agente.

Con estas premisas y de acuerdo con JIMENEZ COLLADO, 1966, cuando afirma " La acción de los agentes teratógenos capaces de provocar o inducir anomalías más o menos específicas es difícil de estudiar, porque sólo pueden ser puestas en evidencia por la experimentación ", a continuación centraremos nuestra exposición en los trabajos experimentales más representativos llevados a cabo con agentes antiproliferativos, por ser éste el principal efecto biológico del fármaco objeto de nuestro estudio: el **interferón-alfa-2b**.

Tras una exhausta búsqueda bibliográfica, hemos encontrado pocos trabajos experimentales en animales, que estudien la capacidad

teratógena del interferón. HOFFMAN, 1986, administró altas dosis de interferón-alfa-2b a una primate de la especie *Macaca Rhesus*, al principio de la gestación, provocando una interrupción de la misma, sin que comunicara la existencia de malformaciones en el feto abortado.

KATO y Cols, 1990, estudiaron los efectos de otro tipo de interferón: el interferón-gamma-recombinante murino en ratas gestantes, administrando el producto entre los días 6-15 de la gestación. Con dosis muy altas (20 millones U./Kg./día), se produjeron abortos a los 13-17 días del embarazo. A dosis menores (4 millones U./Kg./día) los fetos no mostraron malformaciones externas, pero tuvieron un aumento significativo del peso del corazón, pulmón, hígado, riñones y bazo, por un aumento de la hematopoyesis extramedular, y con un descenso en sangre de las plaquetas y hematies (disminución del hematocrito y hemoglobina).

ROBERTS, 1991, estudió en el Departamento de Ciencias Animales y Bioquímica de la Universidad de Missouri, USA, el papel de los interferones en el embarazo de algunos animales como la oveja. Observó que el trofoblasto del embrión recién implantado produce grandes cantidades, sólo por unos días, de un interferón tipo 1, relacionado estructuralmente con la molécula del interferón-alfa, que podría tener una acción anti-lúteolítica, manteniendo la producción de progesterona por el cuerpo lúteo, lo que favorece la implantación del huevo fecundado. ROBERTS y Cols, 1992, han atribuido a este interferón endógeno de los animales mamíferos, un papel en el reconocimiento inmunitario del embarazo por parte de la madre.

Dada la ausencia de estudios de teratogénesis experimental en amplias series de animales con **interferon-alfa-2b**, y por ser éste un

agente ANTIPROLIFERATIVO CELULAR, revisaremos a continuación algunos de los trabajos más representativos de teratogenesis experimental realizados con otros fármacos Antiproliferativos.

ADAMNS, en 1949, analizó y estudió experimentalmente la capacidad teratógena del Tiouracilo y la Tiourea en diferentes estadíos del embrión de pollo. Sus resultados mostraron que ambos fármacos retrasaban la fecha de nacimiento, producían disminución del peso del embrión, y éstos presentaban un tiroides hipertrófico con alteración de los folículos tiroideos.

KINGSBURY, en 1955, realizó un experimento similar en embriones de pollo en diferentes estadíos, iniciando la administración de Tiourea a los 8-10 días de incubación, con dosis de 2 a 10 mgrs. En todos ellos se produjo un retraso del crecimiento de entre 3 a 10 días, y la mortalidad aumentó de forma proporcional a la dosis; entre los supervivientes observó malformaciones tales como hipertrofia del tiroides y de la cortical adrenal, disminución del peso del hígado y ovarios, así como un aumento del porcentaje de agua en todos los órganos del embrión.

BOLLAG, en 1953, administró un conocido y potente agente antitumoral alquilante, el Busulfán, a ratas gestantes, obteniendo en su descendencia un 90% de crías con malformaciones, entre las que destacó como más frecuentes la anencefalia, la espina bífida, microftalmias y anoftalmias.

Estos mismos resultados y tipo de malformaciones fueron producidas en ratas, utilizando el Clorambucil, cuyo mecanismo de acción teratógeno sería similar al del Busulfán, MURPHY, 1960.

La teratogénesis experimental de los agentes alquilantes en el embrión de pollo fue bien estudiada por BLATTNER y Cols, quienes en 1958, administraron Mostazas Nitrogenadas y Trietilenmelamina a embriones de pollo en estadios tempranos del desarrollo, encontrando que provocaban las siguientes anomalías: retraso o diferenciación anormal del encéfalo, retraso en el desarrollo de la vesícula óptica, del cristalino o de ambos, diferenciación anormal de los miembros, anomalías del esbozo auditivo, y un gran deterioro de la estructura de los somitos.

JURAND, 1959, inyectó la Trietilenmelamina a ratones durante el embarazo, provocando un gran número de abortos, y en las crías nacidas malformaciones oculares, del sistema nervioso y del esqueleto.

TUCHMANN-DUPLESIS y MERCIER-PAROT, 1960, inyectando otro agente antitumoral alquilante, la Trietilenmelamina, a ratas gestantes, observaron que era una sustancia más bien abortiva que teratógena, que producía un gran número de abortos, si bien en las crías supervivientes aparecían malformaciones del sistema nervioso, de los esbozos oculares y alteraciones del esqueleto, así como una acción inhibitoria sobre la línea germinal; raramente se observaron malformaciones viscerales y cardíacas.

MARVIN, 1962, provocó numerosas y variadas malformaciones en el embrión de pollo tras la inyección de distintos agentes alquilantes como la Trietilenmelamina, la Ciclofosfamida, el Sulfato de Actinoboline, la O-Fenilenediamina, y el Uniracil-D.

SALZBERGER, 1962, también demostró que las Mostazas Nitrogenadas eran causantes de malformaciones en el embrión de pollo.

En 1964, FERM consiguió producir malformaciones oculares en el embrión de hamster con Colchicina, Vimblastina y Vincristina, demostrando la actividad antimitótica de las tres sustancias.

TUCHMANN-DUPLESIS y MERCIER-PAROT, 1966, estudiaron la capacidad teratógena de otras sustancias alquilantes como el Natulán, el cual inyectado en ratas gestantes producía, a dosis pequeñas, un alto porcentaje de abortos y malformaciones oculares, y a dosis mayores provocaba numerosas malformaciones en los miembros de los embriones.

También analizaron el efecto de asociar distintos agentes teratógenos, físicos y químicos, así administraron Actinomicina-D a ratas gestantes, a la vez que las radiaron, produciendo graves malformaciones como anoftalmia, microftalmia, anencefalia, espina bífida, alteraciones cardiovasculares y esqueléticas.

BARBOSA AYUCAR, 1969, en su Tesis Doctoral estudió la acción de la Puromicina sobre el desarrollo del embrión de pollo de estadíos 8 al 14 de H.H.. Este autor intentó establecer las correlaciones entre la síntesis protéica, inhibida por este fármaco, y la morfogénesis de los diferentes esbozos embrionarios.

Los embriones inyectados con Puromicina, a dosis de 16 gammas, presentaron un retraso o bloqueo de su desarrollo, así como un conjunto de alteraciones que se localizaron en el extremo cefálico (sobre todo microcefalia, y mala diferenciación de las vesículas encefálicas) y somitos (disminución de su tamaño y número).

Las alteraciones de los derivados ectodérmicos encontradas por BARBOSA, 1969, variaron en función del estadio y esbozo embrionario: las lesiones de las vesículas encefálicas fueron muy intensas cuando la Puromicina se inyectó en los estadíos 8 y 9 de H.H., por el contrario,

en los tratados a partir del estadio 10 de H.H., las lesiones fueron mínimas; En cambio, el esbozo medular presentó las mayores alteraciones cuando los embriones fueron tratados a partir del estadio 10 de H.H.

Respecto a las alteraciones cordo-mesodérmicas del embrión, la notocorda fue la que mayor resistencia presentó a la acción de la Puromicina, y por tanto a la inhibición de la síntesis protéica, persistiendo incluso cuando el embrión se redujo a dos epitelios, el ecto y endodermo, rellenos de detritus celulares. No obstante, se observó que la notocorda en la mayoría de los casos perdía su posición axil, y se desplazaba del esbozo neural.

Los resultados obtenidos por BARBOSA, 1969, permiten deducir que los embriones de pollo en estadios 8 al 9 de H.H. son muy sensibles a los fármacos que inhiben la síntesis protéica, y a partir del estadio 10 de H.H. las alteraciones producidas se reducen en intensidad y extensión, indicando una modificación de la permeabilidad del ectodermo al fármaco en cuestión, fenómeno observado con otras sustancias en el embrión de pollo, WILT, 1965.

BARBOSA, 1969, estableció una escala de sensibilidad de los diferentes esbozos del embrión de pollo a la inhibición de la síntesis protéica, que en orden decreciente, sería: vesículas encefálicas, somitos, esbozo medular, y notocorda; los esbozos cardiacos no presentan modificaciones, continuando su desarrollo; el ectodermo del que derivan las placodas no requiere una síntesis protéica muy intensa para su constitución a partir del estadio 8 de H.H. en el caso de la placoda ótica, y del estadio 10 de H.H. en el caso de la placoda óptica, formándose ambas a pesar de estar inhibida la misma.

MORALES ESPERT, 1969, realizó un trabajo experimental sobre la patología fetal en animales provocada con distintos quimioterápicos

antitumorales. En el hámster dorado y en la rata winstar encontró profundas alteraciones en los embarazos tratados con estos agentes: La Etilhidrazida del ácido Podofilínico, un antimitótico, administrada a las ratas winstar desde el 6° al 16° día de la gestación, afecta severamente a su fertilidad, llegando a término sólo un 44% de los embarazos, mientras que el 25% abortan, y el 31% restante presentan crias muy escasas. En el hámster sólo el 10% de los embarazos llegan a término normal, el 20% de embriones presentan retraso del desarrollo y Microsomia, y el 70% abortaron.

Otro antimitótico, la 2-amino-D-Glucopodo-filotoxina, produjo resultados similares en la rata, y fué menos abortiva en el hámster, obteniéndose en éste un 60% de embarazos a término normales.

El Natulán es un derivado de la Metil-hidrazida, que impide la incorporación de Timidina al DNA, inhibiendo la síntesis del mismo, así como formando radicales -OH y peróxido de oxígeno que despolimerizan el DNA. Las ratas winstar tratadas con este agente del 6° al 16° días de gestación, presentaron un 60% de abortos, y sólo un 15% de embarazos a término; ninguno de los hámster dorados sirios tratados con este agente llegaron a finalizar el embarazo, MORALES ESPERT, 1969.

En este estudio llamó la atención el hecho de que las ratas que no abortaban, y sus crias llegaban a nacer, aunque fueran de pequeño tamaño, no presentaban ninguna malformación aparente, y que MORALES ESPERT intentó explicar así: " No debemos olvidar la distinta respuesta de las especies animales de experimentación ante el mismo quimioterápico, y así, mientras unas reaccionan siempre con interrupción de la gestación, otras, probablemente menos sensibles al mismo

tratamiento, prosiguen el embarazo, aunque el desarrollo de los fetos se encuentre más o menos alterado".

Otros autores han intentado explicar el mecanismo de acción por el cual un determinado citostático produce las malformaciones. Así, CLAVERT, 1970, estudió la producción de microftalmias en el embrión de conejo por la Ciclofosfamida, observando que los efectos dependen del momento de la organogénesis en que actúa el fármaco, así afirma: "Podemos concluir que la cúpula óptica pasa por dos periodos de sensibilidad (a la acción del agente), uno es el periodo del 6º al 8º días, es decir, durante la gastrulación y comienzo de la neurulación, el otro se sitúa alrededor del 11º - 12º día, es decir, durante la formación y cierre de la hendidura colobómica"

ROS TRENCHS y DOMENECH, en 1975 estudiaron experimentalmente la acción teratógena de la Ciclofosfamida (Genoxal) sobre el embrión de pollo, para lo que inyectaron dosis que oscilaban entre 0.03 a 10 mgrs. en 132 embriones de estadíos 2 al 19 de Hamilton-Hamburger. Sus resultados fueron que un 60.6% fallecieron y un 39.4% sobrevivieron, de los cuales el 100% estaban malformados. Entre las malformaciones presentadas destacaron las Microsomias y torsiones de tronco con un 63% y 55% respectivamente, en el sistema nervioso central encontraron una falta de cierre del canal neural con encefalosquisis en un 15%, y mielosquisis en un 7%; a nivel del tronco encontraron celosomia en el 23% de los casos, exocardias en un 30%, y atrofia total del tronco en un 9%, también destacó la alta frecuencia de microftalmias (53%), sobre todo bilaterales.

Respecto al mecanismo patogénico de estas numerosas malformaciones, ROS TRENCHS y DOMENECH, 1975, opinan que: " la

Ciclofosfamida, como agente alquilante, al producir alteraciones nucleares y cromosómicas provocando la desnaturalización y precipitación del DNA, dificulta y altera la evolución de los procesos morfogénicos, conduciendo a la aparición de las malformaciones obtenidas".

En 1975 WILSON y Cols, estudiaron los efectos antimitóticos de los alcaloides de la Vinca en el embrión de pollo, observaron que la Vimblastina, Vincristina, y la Dexacetilvinblastina, destruyen los microtúbulos que intervienen en la mitosis, produciendo un bloqueo de la división celular en metafase.

SIEBER, 1978, describió la actividad teratógena de 3 nuevos fármacos antitumorales : la Mainterina, el VP-16, y la VM-26, comparandolos con los efectos de la Vincristina y la Colchicina en embriones de ratones albinos.

ZIRVI y Cols, 1985, compararon la teratogenicidad de la Doxorubicina y la AD-32, sobre el embrión de pollo. En los embriones inyectados el día 1, la Doxorubicina provocó un 96% de embriones malformados, frente a un 38% para la AD-32, mientras que en los embriones inyectados en el día 2, la Doxorubicina provocó un 20% de sujetos malformados y la AD-32 un 40%. La anomalía más frecuente fue ocular, variando desde la microftalmia uni o bilateral, hasta la anoftalmia.

NOVOTNA y JELINEK, 1986, produjeron también anomalías oculares en embriones de pollo, inyectando 10 microgramos de Ciclofosfamida al tercer día de incubación.

NARBAITZ y MARINO, 1988, observaron la inducción experi-

mental de microftalmias en el embrión de pollo tras la inyección de una sola dosis de Cisplatino a los 5 días de incubación. Comprobaron que el Cisplatino lesionaba la zona ciliar a los 2-3 días después de la inyección, posteriormente se observaban también alteraciones retinianas. El mecanismo teratogénico de la microftalmia producida por el Cisplatino, según NARBAITZ y MARINO " sería debido a una reducción del ritmo de secreción de líquidos por el epitelio ciliar, y no por el escape o trasvase de humor vítreo; Los cambios y alteraciones de la retina serían secundarios a esta microftalmia".

Asimismo estos autores afirman que: " El índice de crecimiento de la capa neural es regulado intrínsecamente y no depende del tamaño total del ojo ni tampoco del índice de crecimiento de la capa pigmentada. Una interpretación similar probablemente explicaría el hipercrecimiento y repliegue de la capa neural observados en nuestros experimentos presentes. Los cambios retinales, por tanto, serían secundarios a la microftalmia y no serían causa de ese defecto ".

BELON, 1991, en su Tesis Doctoral realizó un estudio experimental para investigar la capacidad teratogena del Cis-Platino en embriones de pollo. Administró Cisplatino a distintas dosis sobre la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, y en distintos estadios del desarrollo, provocó malformaciones del polo cefálico en el 97% de los casos, siendo éstas las siguientes: anoftalmia bilateral (2%), anoftalmia unilateral (12%), microftalmia bilateral (16%), microftalmia unilateral (61%), encefalosquisis (63%), alteraciones telencefálicas (67%), anomalías de la bolsa de Ratke (51%) y alteraciones notocordales (42%).

DUEÑAS, 1992, en su Tesis Doctoral demostró experimentalmente en embriones de pollo que el Mitoxantrone, un nuevo agente antitumoral, produce una embrioletalidad significativa cuando se inyecta

en estadios precoces del desarrollo (10 y 14 de H.H.), siendo la muerte de los embriones menor y no significativa en los estadios 18 y 22 de H.H.

Además demostró que el Mitoxantrone posee una potente capacidad como inhibidor del desarrollo, provocando Microsomias en el 100% de los embriones estudiados.

En su trabajo, DUEÑAS, 1992, encontró que las malformaciones se presentaron con una mayor frecuencia en los estadios tempranos del desarrollo, esto es, los estadios 10 y 14 de H.H., con respecto a las producidas en los estadios más tardíos, 18 y 22 de H.H. Con respecto al tipo de anomalías provocadas observó que las más frecuentes fueron las alteraciones encefálicas y oculares (anoftalmia uni y bilateral, microftalmia uni y bilateral), torsiones de tronco, y agenesia de cola, existiendo una relación dosis/efecto significativa en el estadio 10 de Hamilton-Hamburger.

MATERIAL Y METODOS

A.- MATERIAL :

Han sido empleadas series de huevos de gallina raza " Legorn Blanca " empollados, remitidos desde la granja para su incubación.

Se realizó un estudio porcentual a fin de detectar el estadio en el que se encontraban, para lo cual se abrieron 1 de cada 10 huevos; Constantemente hemos observado la presencia de mancha blanca, y en ningún caso el inicio o diferenciación del blastodisco, correspondiendo por tanto, todos los huevos al estadio 0 de HAMBURGER-HAMILTON, o pre-incubator de RANVER.

En todas las series se han dejado el 20% de huevos de la misma recogida, para ser utilizados como testigos, los cuales dividimos en 2 grupos:

GRUPO A .-

La mitad de ellos fueron incubados según el proceder habitual del laboratorio, es decir, una vez realizada la extracción de 2 cc. de albúmina, y su posterior cierre con parafina, se mantuvieron en incubación a la misma temperatura y el mismo tiempo que los huevos experimentales.

GRUPO B.-

La otra mitad de huevos testigos, tras extraerles los 2 cc. de albúmina, se les administró únicamente agua destilada en la misma cantidad y en el mismo lugar en el que a los embriones experimentales se les colocó el interferón-alfa diluido en agua destilada.

Los embriones experimentales han sido divididos en 4 series, cada una de ellas con 100 huevos.

En todas las series se ha utilizado la misma técnica de trabajo, que ha sido la siguiente:

A las 24 horas de ser introducidos en la incubadora " Selecta", a una temperatura controlada de 37°C, y con un grado de humedad constante, fueron extraídos todos los huevos, y abiertos mínimamente por su polo agudo, extrayendoles con micropipeta 2 cc. de albúmina; a continuación se cerró el orificio con parafilm. Siguiendo el proceder de LUTZ, se les practicó en el culmen una apertura rectangular de 1 x 2 cms., para a través de ella visualizar el disco embrionario y poder establecer el estadio del desarrollo en que se encuentran.

Sobre los blastocistos observados, y una vez confrontado su estadio, se coloca con micropipeta la dosis de interferon-alfa-2b calculada de forma unitaria e independiente para cada una de las series y grupos de huevos escogidos para la fase experimental.

Aunque es materialmente imposible una exacta implantación sobre el área embrionaria en todos y cada uno de los huevos, en la práctica la colocación del producto fué en todos ellos similar, ya que se colocó la dosis tomando como centro el nudo de HENSEN y como eje la Línea primitiva.

El producto se diluyó en agua destilada hasta conseguir una dilución de 10 U.I de interferón-alfa-2b en cada mcl.

Ordenados los huevos experimentales según dosis del producto y

criterio cronológico, se establecen 4 series, cada una de ellas con 5 grupos, tal y como se detallan a continuación:

SERIE 1:

Comprende un total de 100 embriones inyectados a las 60 horas de incubación, cuando se encontraban en el estadio 10 de H.H., y que subdividimos en 5 grupos:

a) Grupo 1.- 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución (50 U.I.interferón-alfa-2b).

b) Grupo 2.- 20 embriones inyectados con 10 mcl de dilución. (100 U.I.interferón-alfa-2b).

c) Grupo 3.- 20 embriones inyectados con 15 mcl de dilución. (150 U.I.interferón-alfa-2b).

d) Grupo 4.- 20 embriones inyectados con 20 mcl de dilución. (200 U.I.interferón-alfa-2b).

e) Grupo 5.- 20 embriones Testigos: 10 embriones sin dosis y 10 inyectados con agua bidestilada.

SERIE 2:

Comprende un total de 100 embriones inyectados a las 72 horas de incubación, cuando se encontraban en el estadio 14 de H.H., y que subdividimos en 5 grupos:

- a) Grupo 1.- 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución (50 U.I.interferón-alfa-2b).

- b) Grupo 2.- 20 embriones inyectados con 10 mcl de dilución. (100 U.I.interferón-alfa-2b).

- c) Grupo 3.- 20 embriones inyectados con 15 mcl de dilución. (150 U.I.interferón-alfa-2b).

- d) Grupo 4.- 20 embriones inyectados con 20 mcl de dilución. (200 U.I.interferón-alfa-2b).

- e) Grupo 5.- 20 embriones Testigos: 10 embriones sin dosis y 10 inyectados con agua bidestilada.

SERIE 3:

Comprende un total de 100 embriones inyectados a las 90 horas de incubación, cuando se encontraban en el estadio 18 de H.H., y que subdividimos en 5 grupos:

- a) Grupo 1.- 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución (50 U.I.interferón-alfa-2b).
- b) Grupo 2.- 20 embriones inyectados con 10 mcl de dilución. (100 U.I.interferón-alfa-2b).
- c) Grupo 3.- 20 embriones inyectados con 15 mcl de dilución. (150 U.I.interferón-alfa-2b).
- d) Grupo 4.- 20 embriones inyectados con 20 mcl de dilución. (200 U.I.interferón-alfa-2b).
- e) Grupo 5.- 20 embriones Testigos: 10 embriones sin dosis y 10 inyectados con agua bidestilada.

SERIE 4:

Comprende un total de 100 embriones inyectados a las 105 horas de incubación, cuando se encontraban en el estadio 22 de H.H., y que subdividimos en 5 grupos:

- a) Grupo 1.- 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución (50 U.I.interferón-alfa-2b).
- b) Grupo 2.- 20 embriones inyectados con 10 mcl de dilución. (100 U.I.interferón-alfa-2b).
- c) Grupo 3.- 20 embriones inyectados con 15 mcl de dilución. (150 U.I.interferón-alfa-2b).
- d) Grupo 4.- 20 embriones inyectados con 20 mcl de dilución. (200 U.I.interferón-alfa-2b).
- e) Grupo 5.- 20 embriones Testigos: 10 embriones sin dosis y 10 inyectados con agua bidestilada.

La O.M.S. en su informe, 1967, sobre los principios aplicables a la investigación teratógena de los medicamentos, señala que la dosificación a administrar se debe fijar basándose en el peso corporal de los animales; nosotros, siguiendo estas directrices hemos extrapolado la dosis utilizada en adultos humanos, al embrión de ave según el peso de éste, de lo que resulta una dosis aproximada de 100 U.I. de **interferón-alfa-2b**.

Hemos considerado oportuno establecer nuestra pauta de actuación independientemente del estadio del desarrollo embrionario, utilizando 2 dosis de menor o igual cuantía, esto es, 50 U.I. y 100 U.I., y otras 2 de mayor cuantía: 150 U.I. y 200 U.I. Dado que la dilución del fármaco conseguida con agua destilada fue de 10 U.I. / mcl., las cantidades a administrar serian de 5, 10, 15 y 20 mcl. respectivamente.

En todas las series, una vez administrado el producto a los embriones, o el agua bidestilada en los testigos, se cierra la ventana con parafilm, y se reintroducen los huevos en la estufa durante 72 horas, a partir de las cuales se interrumpe la incubación, se extraen los embriones y se introducen en formol neutro al 20%

De todos los embriones supervivientes y en todas las series se hace un estudio macroscópico, así como un control fotográfico, escogiéndose para su posterior estudio microscópico aquellos embriones que presenten un mayor grado de malformación.

En todas las series se han despreciado los embriones que aparecen muertos tras las 72 horas de incubación, aún cuando presentaran marcados signos de malformación, ya que en éstos es imposible realizar un estudio y seriación histológica.

De cada serie, y dado que existian malformaciones similares en los embriones supervivientes, hemos elegido el espécimen más característico.

B.- METODO :

Una vez alcanzado el estadio del desarrollo deseado en cada una de las series, hemos procedido a depositar sobre el embrión la dosis correspondiente del **interferón-alfa-2b** diluido.

El **interferón-alfa-2b** utilizado por nosotros ha sido el comercializado por los laboratorios farmacéuticos de Shering-Plough, S.A., con el nombre de INTRON A.

La administración de la dosis requerida según la serie y el grupo, se realizó con precisión mediante la micropipeta semiautomática de la marca BRADS, utilizando en cada una de las series unos capilares previamente esterilizados, proceso en el que se procuró invertir un tiempo no superior a 20 minutos por serie.

Tras administrar el **interferón-alfa-2b** al embrión, se procedió a cerrar la ventana del huevo mediante parafilm, reintroduciendo de nuevo a éste en la incubadora durante otras 72 horas más, al término de las cuales, hemos extraído los huevos bruscamente, para aislar el embrión vivo.

Aislado el embrión por micro-disección, se procedió a su estudio macroscópico cualitativo y cuantitativo, fotografiándolo con cámara incorporada al microscopio y fuente de luz fría, y posteriormente hallando los parámetros de su peso en miligramos (mgs.), su medida longitudinal en milímetros (mms.) y su volumen en centímetros cúbicos (cc.)

Finalizado este estudio, los embriones fueron introduciéndose suce-

sivamente en formol neutro al 20%, ordenados por serie y grupo.

Los embriones, una vez estuvieron fijados, y previa selección del espécimen más característico de cada grupo, fueron cortados, en cortes semifinos, y teñidos según la técnica de la Hematoxilina de Harris, para su ulterior estudio microscópico.

Igualmente se procedió con los embriones testigos de cada serie.

Los datos obtenidos de cada embrión fueron introducidos en un ordenador IBM PC compatible, e integrados en una base de datos, concretamente el programa DBASE III PLUS. El análisis estadístico de los resultados, se efectuó mediante el programa estadístico R-SIGMA, y el programa de cálculo LOTUS 123; y los gráficos mediante el programa HARVARD GRAFICS.

RESULTADOS

ESTADIO 10 H.H.
DOSIS 5 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,65	0,22	0,26	Microftalmia Unilateral
2	1,75	0,25	0,28	
3	1,40	0,18	0,18	
4	1,25	0,11	0,17	
5	1,60	0,25	0,25	Microftalmia Unilateral
6	1,20	0,12	0,17	
7	1,60	0,20	0,26	
8	1,45	0,19	0,20	
9	1,10	0,12	0,15	Microftalmia Unilateral
10	0,50	0,05	0,04	Síndrome Regresión Caudal
11	1,00	0,10	0,12	
12	1,40	0,20	0,18	
13	0,90	0,09	0,10	
14	0,80	0,06	0,08	Síndrome Regresión Caudal
15	1,30	0,13	0,15	
16	1,25	0,14	0,12	

ESTADIO 10 H.H.
DOSIS 10 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,60	0,20	0,24	Microftalmia Unilateral
2	1,70	0,23	0,25	
3	1,40	0,17	0,16	Microftalmia Unilateral
4	1,20	0,12	0,15	Torsión Truncal
5	1,55	0,23	0,25	
6	1,20	0,12	0,15	
7	1,45	0,19	0,20	Microftalmia Unilateral
8	1,00	0,09	0,08	
9	1,05	0,11	0,10	Síndrome Regresión Caudal
10	1,40	0,21	0,25	Anoftalmia Unilateral
11	1,00	0,10	0,09	
12	1,40	0,22	0,17	
13	0,85	0,08	0,09	Microftalmia Unilateral
14	0,60	0,06	0,04	Síndrome Regresión Caudal
15	1,10	0,12	0,10	
16	0,90	0,09	0,09	

ESTADIO 10 H.H.
DOSIS 15 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,20	0,10	0,09	Microftalmia Unilateral
2	1,35	0,11	0,10	Torsión Truncal
3	1,50	0,10	0,10	
4	1,55	0,24	0,22	
5	0,80	0,05	0,04	Microftalmia Unilateral
6	1,35	0,12	0,15	Microftalmia Unilateral
7	1,10	0,10	0,09	Síndrome Regresión Caudal
8	0,80	0,06	0,05	Síndrome Regresión Caudal
9	0,95	0,07	0,07	
10	1,35	0,12	0,10	Torsión Truncal
11	1,45	0,14	0,12	Microftalmia Unilateral
12	1,50	0,18	0,17	
13	1,45	0,12	0,09	Microftalmia Unilateral
14	1,10	0,10	0,10	Síndrome Regresión Caudal

ESTADIO 10 H.H.
DOSIS 20 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	0,80	0,08	0,07	Microftalmia bilateral
2	0,70	0,06	0,06	Síndrome Regresión Caudal
3	1,05	0,11	0,10	Microftalmia Unilateral
4	0,70	0,07	0,07	Torsión Truncal
5	0,90	0,09	0,08	
6	0,80	0,07	0,06	Torsión Truncal
7	0,70	0,06	0,05	Síndrome Regresión Caudal
8	1,00	0,09	0,08	
9	1,05	0,11	0,10	Microftalmia Unilateral
10	0,50	0,05	0,05	
11	1,00	0,07	0,06	Síndrome Regresión Caudal
12	0,68	0,06	0,06	Torsión Truncal
13	0,85	0,08	0,09	Microftalmia Unilateral
14	0,60	0,05	0,04	Síndrome Regresión Caudal

ESTADIO 10 H.H. TESTIGOS

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)
1	1,60	0,20	0,20
2	1,70	0,23	0,22
3	1,65	0,22	0,20
4	1,55	0,20	0,20
5	1,65	0,23	0,22
6	1,45	0,18	0,16
7	1,55	0,20	0,20
8	1,50	0,18	0,27
9	1,70	0,25	0,23
10	1,60	0,22	0,20
11	1,70	0,25	0,25
12	1,50	0,20	0,20
13	1,65	0,24	0,22
14	1,60	0,22	0,22
15	1,50	0,20	0,18
16	1,70	0,26	0,24
17	1,60	0,20	0,20
18	1,55	0,20	0,20

ESTADIO 14 H.H.
DOSIS 5 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,20	0,15	0,15	Microftalmia Unilateral
2	1,10	0,11	0,11	Síndrome Regresión Caudal
3	1,30	0,16	0,15	
4	1,45	0,20	0,16	Microftalmia Unilateral
5	1,10	0,14	0,14	
6	1,35	0,10	0,10	
7	1,10	0,14	0,14	
8	1,00	0,11	0,11	
9	1,35	0,19	0,18	
10	1,00	0,10	0,10	S.Regresión Caudal+Microft. Unil
11	1,45	0,25	0,20	Microftalmia Unilat.+Hemorragia
12	1,20	0,14	0,14	
13	1,20	0,16	0,16	
14	1,25	0,20	0,20	
15	1,30	0,20	0,19	
16	1,20	0,19	0,15	

ESTADIO 14 H.H.
DOSIS 10 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,10	0,14	0,14	Microftalmia Unilateral
2	1,00	0,10	0,11	Síndrome Regresión Caudal
3	1,30	0,20	0,18	
4	1,00	0,10	0,10	Torsión Truncal
5	1,15	0,19	0,18	Torsión Truncal + Hemorragia
6	1,10	0,15	0,15	Microftalmia Unilateral
7	0,90	0,07	0,07	Síndrome Regresión Caudal
8	0,80	0,08	0,08	Síndrome Regresión Caudal
9	1,15	0,18	0,17	
10	1,05	0,10	0,10	
11	1,30	0,20	0,20	
12	1,00	0,08	0,08	
13	1,10	0,18	0,16	
14	1,10	0,18	0,15	
15	0,80	0,07	0,07	Síndrome Regresión Caudal
16	1,00	0,15	0,12	

ESTADIO 14 H.H.
DOSIS 15 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,10	0,15	0,15	Microftalmia Unilateral
2	0,75	0,06	0,06	Síndrome Regresión Caudal
3	0,90	0,09	0,10	
4	0,90	0,08	0,09	Síndrome Regresión Caudal
5	0,90	0,09	0,10	Microftalmia Unilateral
6	1,00	0,12	0,15	
7	0,80	0,05	0,08	Síndrome Regresión Caudal
8	0,90	0,10	0,14	
9	0,90	0,09	0,10	Microftalmia Unilateral
10	0,90	0,08	0,09	Torsión Truncal
11	1,00	0,14	0,15	
12	1,10	0,15	0,15	
13	1,00	0,10	0,12	
14	0,70	0,07	0,07	Torsión Truncal
15	0,80	0,08	0,08	Microftalmia Unilateral

ESTADIO 14 H.H.
DOSIS 20 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	0,80	0,08	0,08	Síndrome Regresión Caudal
2	1,10	0,10	0,12	Anoftalmia Unilateral
3	0,70	0,05	0,05	S.Regresión Caudal + Exocardias
4	0,60	0,05	0,05	Síndrome Regresión Caudal
5	0,80	0,07	0,07	
6	1,00	0,10	0,10	Microftalmia Unilateral
7	1,00	0,12	0,15	Microftalmia Unilateral
8	0,80	0,07	0,06	
9	0,70	0,07	0,06	Microftalmia Unilateral
10	0,90	0,10	0,10	
11	1,00	0,10	0,11	Microftalmia Unilateral
12	0,60	0,05	0,05	Torsión T.uncal
13	0,80	0,08	0,08	
14	0,50	0,05	0,04	Microftalmia Unilateral
15	0,70	0,11	0,10	Torsión Truncal

ESTADIO 14 H.H.
TESTIGOS

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)
1	1,60	0,20	0,20
2	1,70	0,23	0,22
3	1,65	0,22	0,20
4	1,80	0,27	0,25
5	1,65	0,23	0,22
6	1,75	0,25	0,25
7	1,55	0,20	0,20
8	1,75	0,28	0,27
9	1,70	0,25	0,23
10	1,80	0,28	0,28
11	1,70	0,25	0,25
12	1,65	0,24	0,24
13	1,65	0,24	0,22
14	1,85	0,27	0,25
15	1,65	0,20	0,20
16	1,70	0,26	0,24
17	1,70	0,25	0,22
18	1,60	0,24	0,21
19	1,65	0,25	0,23

ESTADIO 18 H.H.
DOSIS 5 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,50	0,22	0,24	Microftalmia Unilateral
2	1,15	0,12	0,12	
3	1,45	0,22	0,22	
4	1,50	0,28	0,28	
5	1,00	0,12	0,12	Torsión Truncal
6	1,40	0,15	0,20	
7	1,50	0,27	0,22	
8	1,55	0,25	0,25	
9	1,45	0,25	0,25	
10	1,40	0,24	0,24	
11	1,15	0,15	0,12	Microftalmia Unilateral
12	1,00	0,12	0,12	
13	0,90	0,10	0,10	
14	1,30	0,22	0,20	
15	1,25	0,20	0,14	
16	1,70	0,30	0,25	
17	1,70	0,30	0,25	

ESTADIO 18 H.H.
DOSIS 10 microlitros

EMBRION	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,20	0,19	0,19	
2	1,10	0,25	0,22	
3	0,90	0,06	0,06	Microftalmia Unilateral
4	1,35	0,28	0,25	
5	1,30	0,28	0,25	
6	0,90	0,10	0,10	
7	0,80	0,10	0,10	
8	1,15	0,25	0,25	
9	1,25	0,20	0,20	
10	1,30	0,28	0,28	
11	0,90	0,07	0,08	Torsión Truncal
12	0,90	0,09	0,10	Microftalmia Unilateral
13	1,10	0,15	0,21	
14	1,20	0,20	0,20	
15	1,15	0,18	0,20	
16	1,35	0,30	0,25	Microftalmia Unilateral
17	1,10	0,22	0,22	

ESTADIO 18 H.H.
DOSIS 15 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,20	0,18	0,17	Torsión Truncal
2	1,05	0,16	0,17	Microftalmia Unilateral
3	1,05	0,14	0,20	
4	1,00	0,14	0,20	
5	1,00	0,14	0,18	
6	1,10	0,15	0,16	
7	0,95	0,12	0,14	Síndrome Regresión Caudal
8	1,10	0,25	0,20	
9	1,00	0,14	0,17	
10	1,00	0,14	0,15	
11	1,00	0,13	0,13	Microftalmia Unilateral
12	1,05	0,14	0,15	
13	1,05	0,20	0,20	
14	1,00	0,14	0,20	Microftalmia Unilateral
15	1,15	0,20	0,20	Síndrome Regresión Caudal
16	1,00	0,10	0,10	

ESTADIO 18 H.H.
DOSIS 20 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,00	0,13	0,14	Microftalmia Unilateral
2	0,90	0,13	0,15	Microftalmia Unilateral
3	1,00	0,14	0,15	
4	1,00	0,14	0,15	
5	0,80	0,12	0,12	Síndrome Regresión Caudal
6	1,06	0,14	0,13	Microftalmia Unilateral
7	1,20	0,25	0,25	
8	1,15	0,18	0,22	
9	1,00	0,14	0,15	Torsión Truncal
10	1,00	0,18	0,20	
11	0,70	0,09	0,10	Síndrome Regresión Caudal
12	0,80	0,08	0,10	
13	1,00	0,14	0,15	
14	0,95	0,09	0,10	
15	0,80	0,08	0,08	Torsión Truncal

ESTADIO 18 H.H.
TESTIGOS

<i>EMERIGN</i>	<i>LONGITUD(CM)</i>	<i>VOLUMEN(CC)</i>	<i>PESO(GR)</i>
1	1,90	0,30	0,30
2	1,70	0,23	0,22
3	1,65	0,22	0,20
4	1,90	0,30	0,30
5	1,65	0,23	0,22
6	1,85	0,28	0,28
7	1,90	0,32	0,30
8	1,95	0,35	0,35
9	1,70	0,25	0,23
10	1,90	0,30	0,30
11	1,70	0,25	0,25
12	1,95	0,35	0,35
13	1,90	0,30	0,30
14	1,60	0,22	0,22
15	1,85	0,25	0,25
16	1,70	0,26	0,24
17	1,80	0,28	0,27
18	1,70	0,25	0,25
19	1,65	0,23	0,25

ESTADIO 22 H.H.
DOSIS 5 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,80	0,25	0,30	Microftalmia Unilateral
2	1,40	0,22	0,20	Microftalmia Unilateral
3	1,50	0,25	0,25	
4	1,40	0,20	0,21	Síndrome Regresión Caudal
5	1,50	0,25	0,25	
6	1,50	0,25	0,25	
7	1,50	0,20	0,22	
8	1,45	0,22	0,23	
9	1,40	0,22	0,22	
10	1,55	0,25	0,24	
11	1,45	0,21	0,22	
12	1,60	0,25	0,25	
13	1,55	0,25	0,25	
14	1,60	0,25	0,26	
15	1,60	0,28	0,26	
16	1,40	0,25	0,25	
17	1,30	0,23	0,22	

ESTADIO 22 H.H.
DOSIS 10 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,40	0,22	0,20	
2	1,50	0,25	0,24	Microftalmia Unilateral
3	1,50	0,25	0,25	
4	1,45	0,25	0,22	Microftalmia Unilateral
5	1,30	0,20	0,21	
6	1,20	0,22	0,20	
7	1,30	0,25	0,22	
8	1,25	0,25	0,22	
9	1,20	0,20	0,20	
10	1,20	0,20	0,18	Síndrome Regresión Caudal
11	1,20	0,22	0,20	
12	1,50	0,25	0,23	
13	1,30	0,20	0,20	
14	1,30	0,24	0,20	
15	1,30	0,23	0,19	
16	1,40	0,25	0,22	
17	1,30	0,25	0,22	

ESTADIO 22 H.H.
DOSIS 15 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,20	0,25	0,20	
2	1,35	0,25	0,22	Microftalmia Unilateral
3	1,25	0,25	0,20	Microftalmia Unilateral
4	1,40	0,30	0,25	
5	1,20	0,20	0,16	
6	1,20	0,20	0,18	Síndrome Regresión Caudal
7	1,25	0,20	0,18	
8	1,15	0,18	0,15	
9	1,20	0,15	0,15	
10	1,20	0,13	0,14	
11	1,25	0,25	0,20	
12	1,30	0,25	0,20	
13	1,00	0,08	0,09	Síndrome Regresión Caudal
14	0,70	0,05	0,04	
15	1,00	0,08	0,08	
16	1,10	0,12	0,12	Microftalmia Unilateral

ESTADIO 22 H.H.
DOSIS 20 microlitros

EMBRIÓN	LONGITUD(CM)	VOLUMEN(CC)	PESO(GR)	MALFORMACIONES
1	1,15	0,22	0,18	
2	1,10	0,16	0,15	
3	1,05	0,16	0,15	Síndrome Regresión Caudal
4	1,15	0,20	0,18	
5	1,20	0,18	0,17	Torsión Truncal+Celosomia
6	1,15	0,20	0,18	
7	1,20	0,30	0,20	Microftalmia Unilateral
8	1,20	0,20	0,18	
9	1,16	0,20	0,17	Microftalmia Unilateral
10	1,22	0,25	0,22	
11	1,15	0,17	0,18	
12	1,15	0,18	0,18	
13	1,10	0,17	0,17	
14	1,20	0,17	0,18	
15	1,10	0,11	0,10	Síndrome Regresión Caudal
16	1,16	0,15	0,15	

ESTADIO 22 H.H.
TESTIGOS

<i>EMBRION</i>	<i>LONGITUD(CM)</i>	<i>VOLUMEN(CC)</i>	<i>PESO(GR)</i>
1	2,00	0,35	0,32
2	1,90	0,30	0,30
3	1,95	0,35	0,35
4	2,00	0,35	0,35
5	1,80	0,25	0,26
6	2,00	0,35	0,30
7	1,90	0,30	0,30
8	1,95	0,32	0,32
9	1,85	0,30	0,30
10	1,90	0,30	0,28
11	2,00	0,32	0,32
12	1,95	0,35	0,32
13	1,90	0,30	0,30
14	1,85	0,27	0,30
15	2,00	0,35	0,35
16	1,90	0,30	0,30
17	1,90	0,30	0,32
18	1,85	0,34	0,32
19	1,95	0,31	0,30

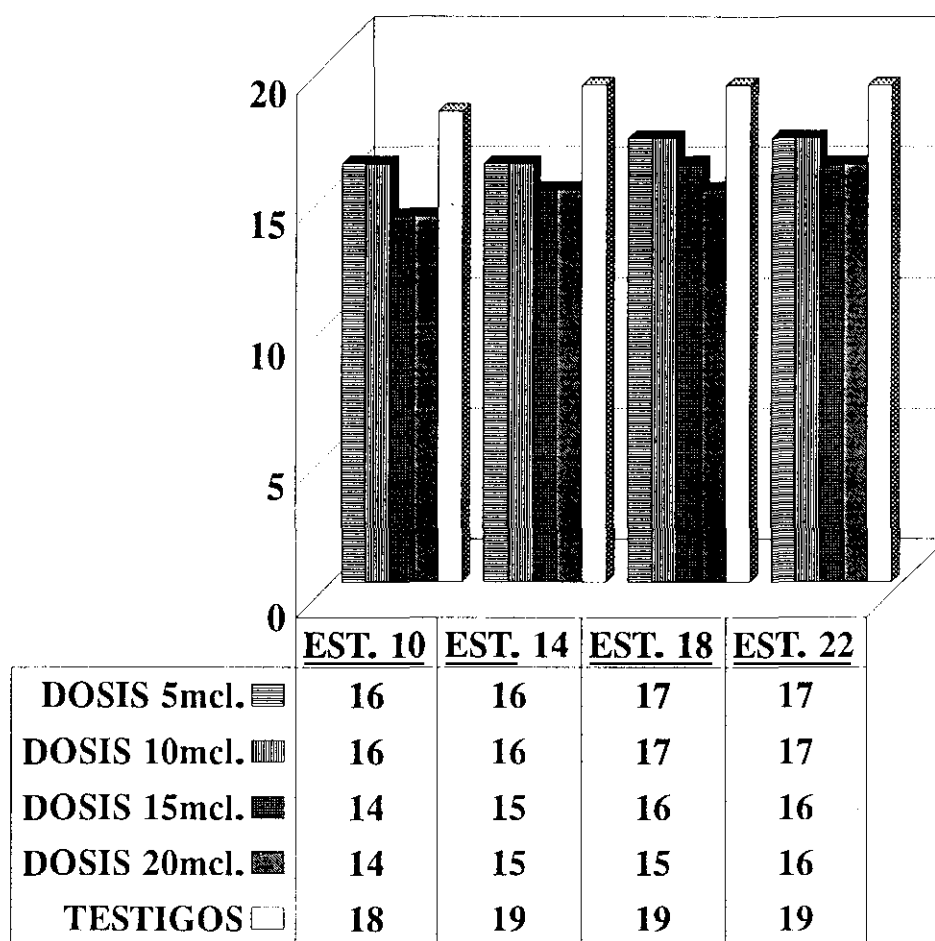
SUPERVIVENCIA DE LOS EMBRIONES

Aunque las Tablas de resultados encierran toda la información disponible, es necesario traducirla a un gráfico para realizar una síntesis visual.

El principio de la representación gráfica de variables o caracteres mediante diagramas de barras es la proporcionalidad de las áreas a las frecuencias absolutas, MARTIN, 1977.

Con los resultados obtenidos en nuestra investigación, y en aras de una mejor visión global de los mismos, hemos confeccionado un Gráfico de Supervivencia de los embriones experimentales y testigos, representados en un diagrama de barras que tienen una base idéntica y una altura proporcional a la frecuencia absoluta correspondiente, siendo sus áreas o superficies proporcionales a la frecuencia.

SUPERVIVENCIA POR ESTADIOS Y DOSIS



ANALISIS ESTADISTICO DESCRIPTIVO DE LOS DATOS OBTENIDOS

La estadística descriptiva es un método de descripción numérica de conjuntos numerosos, esto es, un método de descripción cuantitativa que utiliza al número como soporte objeto, así pues al lenguaje de las letras, la estadística descriptiva opone el lenguaje de los números.

Los conjuntos de datos objeto de nuestro estudio, anteriormente expuestos en tablas, están perfectamente definidos, de forma que en todo momento podemos saber si un dato o resultado pertenece o no a uno de los conjuntos.

En nuestro estudio hemos realizado un análisis descriptivo de los datos obtenidos mediante los siguientes programas de cálculo y estadística: LOTUS y R-SIGMA, agrupando los resultados por estadios del desarrollo embrionario (10, 14, 18 y 22 de Hamilton-Hamburger) en que fueron inyectados, y dosis de interferón-alfa-2b que se utilizaron (5, 10, 15, y 20 microlitros).

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE LONGITUD, VOLUMEN Y PESO OBTENIDOS EN LOS EMBRIONES EXPERIMENTALES.

De las variables cuantitativas, a saber, la longitud, el volumen y el peso de los embriones, se determinaron las medias, desviaciones típicas, valores máximos y mínimos, y varianzas de cada muestra.

Lo realmente importante de este tratamiento estadístico es conocer los verdaderos efectos que tienen las distintas dosis de interferón-alfa-2b

utilizadas sobre cada uno de los estadios del desarrollo del embrión de ave en que se emplearon, para así deducir objetivamente la capacidad teratógena de este fármaco.

Para comparar dichos efectos, y saber si la longitud, volumen y peso de los embriones varían según las diferentes dosis utilizadas del producto, se utiliza un método estadístico que es el análisis de la varianza de un factor o una vía, que consiste en una generalización de la prueba de la "t" de Student para datos independientes.

Así para cada una de las variables de peso, longitud y volumen, tendremos 4 grupos de observaciones dependiendo de la dosis utilizada (5, 10, 15 o 20 mcl.), y podremos obtener una media en cada uno de los grupos resultantes (definidos por la dosis empleada), y una media global independiente de la dosis utilizada en cada estadio.

La desviación de cada una de las observaciones respecto a esta media global será:

$$Y_{ij} - Y = (Y_{ij} - Y_i) + (Y_i - Y)$$

El primer término de la derecha es la desviación de una observación (Y_{ij}) respecto de su media de grupo (Y_i), y el segundo término es la desviación de la media del grupo respecto de la media general.

El concepto clave es que la variabilidad total de los datos es la suma de 2 variabilidades, a saber, la variabilidad de los datos dentro de cada muestra, y la variabilidad existente entre las distintas muestras.

Si denominamos por U_i al valor medio de una variable obtenida con la dosis de un tratamiento i (media poblacional), entonces la Hipótesis

a contrastar es:

Hipótesis nula:

$$H_0 = U_1 = U_2 = U_3 = U_4$$

contra la Hipótesis alternativa H_1 de que alguna de las anteriores igualdades no sea cierta. Así pues, el Análisis de la Varianza es una prueba Global que nos indica si todas las medias son iguales o no.

Si estas desviaciones son elevadas al cuadrado y realizamos el sumatorio de todas las observaciones, resultará la suma de cuadrados total, que puede ser dividida en 2 partes:

a) La suma de cuadrados de las desviaciones de cada lectura alrededor de la media de su grupo de dosis correspondiente.

b) La suma de cuadrados de las desviaciones de cada media de grupo alrededor de la media general.

Resumiendo, la suma de cuadrados total, es igual a la suma de cuadrados de las desviaciones dentro de cada grupo, más la suma de cuadrados de las desviaciones entre grupos.

Si la Hipótesis nula fuera cierta, las dos varianzas que se originan coincidirían, y de no ser cierta, ambas varianzas serían distintas.

Cuando existen grandes diferencias entre las medias de los grupos, es probable que la suma de cuadrados entre grupos sea mayor que la suma de cuadrados intragrupos. De otra forma, si todas las medias de grupos son casi iguales y aún existe una considerable variación intragrupos, es probable que suceda lo contrario, esto es, que la suma de cuadrados entre grupos sea menor que la suma de cuadrados intragrupos. Por tanto, los

tamaños relativos de las sumas de cuadrados entre grupos e intragrupos ofrecen la oportunidad de valorar la variación entre las medias de los grupos en comparación con la variación intragrupos.

En general, para r muestras y cualquier tamaño N_i de cada muestra (no necesariamente iguales), un estimador "entre muestras" de la varianza cuando la Hipótesis nula es cierta, sería (SE2):

$$S^2_E = \frac{N_i \cdot (X_i - \bar{X})^2}{r - 1}$$

La varianza "dentro de las muestras" para r grupos, cada uno de tamaño N_i sería:

$$S^2_D = \frac{\sum N_i \cdot (X_i - \bar{X})^2}{N - r}$$

El subíndice D se refiere a que es una estimación obtenida a partir de las varianzas estimadas de cada muestra, y de ahí que a esta fórmula se le denomine varianza dentro de muestras" (SD2).

En este punto es interesante hacer notar que SD2 es estimador de la varianza @ con independencia de que la hipótesis nula (H_0) sea verdadera o falsa, sin embargo SE2 es un estimador de la varianza @ solo cuando la H_0 es cierta, pues de esa hipótesis se partió. De todo ello se deduce que cuando la H_0 es falsa, entonces SE2 no solo no estima la varianza @, sino que tiende a dar valores más altos.

Así pues, un modo apropiado de contrastar la H_0 es comparar

ambas varianzas, cuando se acepte la igualdad de varianzas, se aceptara H_0 , y en caso contrario se aceptara la Hipótesis alternativa. Con ello el test consistiría en calcular la cantidad:

$$F_{exp.} = \frac{s_E^2}{s_D^2}$$

y compararla con la F_{α} buscada en las tablas de la F de Snedecor con $(r - 1)$ y $(n - r)$ grados de libertad.

Entonces:

* Si $F_{exp.} < F_{\alpha}(r - 1, n - r)$ ----> Las varianzas son iguales
 -----> se acepta la H_0 , y por tanto todas las medias de las muestras son iguales.

* Si $F_{exp.} > F_{\alpha}(r - 1, n - r)$ ----> Las varianzas son distintas-
 -----> se rechaza la H_0 , y por tanto alguna de las medias de las muestras es distinta de las demas con error α .

Los grados de libertad de la F_{α} han sido $(r - 1)$ y $(n - r)$ pues ellos son los denominadores de SE^2 y SD^2

TIPOS DE VARIABILIDAD A ESTUDIAR:

I.- **La variabilidad total de los datos:** se mide por la cantidad de la suma de cuadrados total, siendo el numerador de la varianza de todos los datos, como si fuera una sola muestra, por tanto, sus grados de libertad son $N - 1$ (siendo N el número total de embriones en cada estadío, independientemente de la dosis de interferón-alfa-2b utilizada).

$$S.C.Total = \sum_{ij} (X_{ij} - \bar{X})^2 = \sum_{ij} X_{ij}^2 - \frac{X^2}{N}$$

II.- **La variabilidad entre las muestras:** se mide por la cantidad de la suma de cuadrados entre grupos. Su cálculo se realiza en base al número de muestras (r), siendo sus grados de libertad $r - 1$.

$$S.C.Entre = \sum_{i=1}^r N_i (X_i - \bar{X})^2 = \sum_{i=1}^r \frac{X_i^2}{N_i} - \frac{X^2}{N}$$

III.- **La variabilidad dentro de las muestras:** se mide por la cantidad de la suma de cuadrados dentro de las muestras, y se obtiene también, si conocemos las 2 anteriores, por la diferencia entre la total (SCT) y la entre las muestras (SCE). Sus grados de libertad se obtienen por diferencia entre $N - r$.

$$S.C.Dentro = S.C.Total - S.C. Entre$$

Las sumas de cuadrados anteriores son variabilidades brutas totales. Para conseguir variabilidad promedio es necesario dividir cada suma de cuadrados por sus grados de libertad, obteniéndose así las medias cuadradas, las cuales son la Varianza "entre" muestras, y la Varianza "dentro" de cada muestra.

Como la varianza "dentro" es una mezcla de las varianzas de todas las muestras, ésta será una estimación de la varianza con independencia de que la Hipótesis nula sea cierta o no.

Si la Hipótesis nula es cierta, la variabilidad "entre" sólo dependerá del azar, y así, estimará también a la varianza.

El Test de Análisis de la varianza consiste en comparar ambas varianzas ("entre" y "dentro") por el procedimiento clásico de la F de Snedecor. La cantidad experimental es el cociente de las dos varianzas, la cantidad teórica es una F de las tablas de Snedecor, y los grados de libertad son los de las 2 varianzas divididas.

Si la razón de las 2 varianzas no es significativa o, incluso, si lo es ligeramente, tiene poco sentido examinar las diferencias entre pares de medias.

Si por el contrario, la F es significativa, contamos con una evidencia razonable de que existen diferencias reales entre las medias, y que son lo suficientemente grandes como para mostrarse por encima de la variación del azar. En este caso, conviene examinar las diferencias entre los grupos al objeto de estudiar a qué se debe la significación encontrada.

Para estudiar y comparar estas medias hemos seleccionado como método estadístico LA PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (asistidos por el programa estadístico R-SIGMA).

En este método se comienza ordenando las r medias de los grupos en orden ascendente y se compara en primer lugar las dos medias extremas de entre las r, luego las 2 medias extremas de entre cada uno de los dos grupos de r -1 medias consecutivas, y así sucesivamente con grupos de r -2, r -3, r -4, ... y 2 medias consecutivas. La principal ventaja de este método es que en cada paso el número de medias comparadas va disminuyendo, el valor de K también y consecuentemente el de la "t" de Student, siendo más probable y fácil encontrar una significación.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones teóricas expuestas,

hemos realizado un tratamiento estadístico asistido por ordenador y con los programas específicos reseñados, cuyos paso intermedios omitimos por la austeridad del espacio disponible y lo innecesario del seguimiento de las fórmulas matemáticas y sus desarrollos, para el lector, por lo que pasamos directamente a exponer los resultados útiles obtenidos en los embriones supervivientes de nuestro trabajo de investigación.

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.2219	0.1402	0.03505	1	1.45	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.12449			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.2594	0.33824	0.08456	0.5	1.75	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.073456			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.3529	0.24461	0.059327	0.9	1.7	17	
Diferencia máx. teórica:			0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.10194				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.5	0.11456	0.027786	1.3	1.8	17	
Diferencia máx. teórica:			0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.14706				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.15063	0.063505	0.015876	0.05	0.25	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.12894					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.15875	0.04334	0.010835	0.1	0.25	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.11967					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.20647	0.067356	0.016336	0.1	0.3	17	
Diferencia máx. teórica:				0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.15204			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1	
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.20647	0.067356	0.016336	0.1	0.3	17	
Diferencia máx. teórica:				0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.15204			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=22

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.16938	0.069038	0.01726	0.04	0.28	16
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:			0.12634			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.14875	0.032838	0.0082095	0.1	0.2	16
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:			0.13101			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.19529	0.06084	0.014756	0.1	0.28	17
Diferencia máx. teórica:			0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:			0.18618			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS5		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.24176	0.025059	0.0060776	0.2	0.3	17
Diferencia máx. teórica:			0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:			0.17457			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66	A:DOSIS10	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.2125	0.30523	0.076308	0.6	1.7	16
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.081276				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66	A:DOSIS10	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.0531	0.1443	0.036075	0.8	1.3	16
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.126				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.1147	0.17657	0.042824	0.8	1.35	17
Diferencia máx. teórica:		0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.18212				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.3294	0.10906	0.02645	1.2	1.5	17
Diferencia máx. teórica:		0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.25336				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.14625	0.059203	0.014801	0.06	0.23	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.23376			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=10

J LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.13563	0.049121	0.01228	0.07	0.2	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.20335			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=14

J LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.13563	0.049121	0.01228	0.07	0.2	16
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.20335				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=18

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.23118	0.021179	0.0051365	0.2	0.25	17
Diferencia máx. teórica:		0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.18705				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.15063	0.070187	0.017547	0.04	0.25	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.20213			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR.PESO/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.12875	0.043031	0.010758	0.07	0.2	16	
Diferencia máx. teórica:				0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.12297			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR PESO/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

Resultados

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.18588	0.069826	0.016935	0.06	0.28	17	
Diferencia máx. teórica:		0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.18476					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR PESO/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 66		A:DOSIS10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.21176	0.018109	0.0043921	0.18	0.25	17	
Diferencia máx. teórica:		0.286 (p < 0.1)		0.318 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.21263					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR PESO/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.2464	0.2583	0.069033	0.8	1.55	14	
Diferencia máx. teórica:			0.314 (p < 0.1)		0.349 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.11994				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	0.91	0.1168	0.030158	0.7	1.1	15	
Diferencia máx. teórica:			0.304 (p < 0.1)		0.338 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.20078				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.0438	0.065511	0.016378	0.95	1.2	16	
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.24788				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR- LONGITUD/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.1719	0.1653	0.041324	0.7	1.4	16	
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.13486				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.115	0.048635	0.012998	0.05	0.24	14
Diferencia máx. teórica:			0.314 (p < 0.1)	0.349 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.24477			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR-VOLUMEN/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.096667	0.030861	0.0079682	0.05	0.15	15
Diferencia máx. teórica:			0.304 (p < 0.1)	0.338 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.19033			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.15438	0.036691	0.0091728	0.1	0.25	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.27739					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS15		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.185	0.07303	0.018257	0.05	0.3	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.12422					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR VOLUMEN/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS15	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA

BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL

PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.10643	0.047167	0.012606	0.04	0.22	14

Diferencia máx. teórica: 0.314 (p < 0.1) 0.349 (p < 0.05)

Diferencia máxima observada: 0.26849

NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

NOR PESO/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS15	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA

BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL

PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.10867	0.032042	0.0082731	0.06	0.15	15

Diferencia máx. teórica: 0.304 (p < 0.1) 0.338 (p < 0.05)

Diferencia máxima observada: 0.2066

NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

NOR PESO/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS15	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.10867	0.032042	0.0082731	0.06	0.15	15
Diferencia máx. teórica:			0.304 (p < 0.1)	0.338 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.2066			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO-18

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS15	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.16	0.055857	0.013964	0.04	0.25	16
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)	0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.11196			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO-22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	0.80929	0.17336	0.046332	0.5	1.05	14
Diferencia máx. teórica:		0.314 (p < 0.1)		0.349 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.16436				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	0.8	0.17321	0.044721	0.5	1.1	15
Diferencia máx. teórica:		0.304 (p < 0.1)		0.338 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.16667				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	0.9725	0.14526	0.036315	0.7	1.2	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.17492					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.1525	0.046547	0.011637	1.05	1.22	16	
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.1235					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.075	0.019513	0.0052152	0.05	0.11	14
Diferencia máx. teórica:				0.314 (p < 0.1)	0.349 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.17254		
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.08	0.023905	0.0061721	0.05	0.12	15
Diferencia máx. teórica:				0.304 (p < 0.1)	0.338 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.16193		
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.1425	0.051704	0.012926	0.08	0.25	16	
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.26928				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							
NOR. VOLUMEN/ESTADIO=18				3 LONGITUD N			

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
VOLUMEN	0.18875	0.04334	0.010835	0.11	0.3	16	
Diferencia máx. teórica:			0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.2101				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							
NOR VOLUMEN/ESTADIO=22				3 LONGITUD N			

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.069286	0.01859	0.0049685	0.04	0.1	14
Diferencia máx. teórica:		0.314 (p < 0.1)		0.349 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.19128				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61		A:DOSIS20		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.081333	0.031366	0.0080986	0.04	0.15	15
Diferencia máx. teórica:		0.304 (p < 0.1)		0.338 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.15179				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS20	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.1525	0.052345	0.013086	0.08	0.25	16
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.26905				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 61	A:DOSIS20	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.17125	0.026045	0.0065112	0.1	0.22	16
Diferencia máx. teórica:		0.295 (p < 0.1)		0.327 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.24345				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.5972	0.079469	0.018731	1.45	1.7	18	
Diferencia máx. teórica:		0.279 (p < 0.1)		0.309 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.11271					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
LONGITUD	1.6895	0.075607	0.017345	1.55	1.85	19	
Diferencia máx. teórica:		0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)			
Diferencia máxima observada:		0.18148					
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR LONGITUD/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.7868	0.11884	0.027264	1.6	1.95	19
Diferencia máx. teórica:			0.271 (p < 0.1)	0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.24122			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND	Base 1	
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
LONGITUD	1.9237	0.060938	0.01398	1.8	2	19
Diferencia máx. teórica:			0.271 (p < 0.1)	0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.17755			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR LONGITUD/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.21556	0.023818	0.0056141	0.18	0.26	18
Diferencia máx. teórica:			0.279 (p < 0.1)	0.309 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.24315			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.24263	0.024909	0.0057146	0.2	0.28	19
Diferencia máx. teórica:			0.271 (p < 0.1)	0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:			0.12053			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.27211	0.041174	0.009446	0.22	0.35	19
Diferencia máx. teórica:		0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.17801				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
VOLUMEN	0.31632	0.029667	0.006806	0.25	0.35	19
Diferencia máx. teórica:		0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.18251				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR VOLUMEN/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSIS0		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.21167	0.025495	0.0060093	0.16	0.27	18
Diferencia máx. teórica:		0.279 (p < 0.1)		0.309 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.23194				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=10

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSIS0		COND		Base 1
ESTADISTICA BASICA						
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL						
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV						
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO
PESO	0.23053	0.023915	0.0054865	0.2	0.28	19
Diferencia máx. teórica:		0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)		
Diferencia máxima observada:		0.14377				
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS						

NOR PESO/ESTADIO=14

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.26737	0.043313	0.0099367	0.2	0.35	19	
Diferencia máx. teórica:				0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.1821			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR PESO/ESTADIO=18

3 LONGITUD N

SIGMA Ficha: 75		A:DOSISO		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
BONDAD DE AJUSTE A UNA NORMAL							
PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV							
VARIABLE	MEDIA	DESV. TIP.	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO	TAMAÑO	
PESO	0.31105	0.023069	0.0052923	0.26	0.35	19	
Diferencia máx. teórica:				0.271 (p < 0.1)		0.301 (p < 0.05)	
Diferencia máxima observada:				0.21039			
NO SE DETECTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS							

NOR PESO/ESTADIO=22

3 LONGITUD N

Resultados

SIGMA Ficha: 78	A:ESTAD10	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	1.5972	0.079469	18	1.45	1.7	
MUESTRA 2	1.2594	0.33824	16	0.5	1.75	
MUESTRA 3	1.2125	0.30523	16	0.6	1.7	
MUESTRA 4	1.2464	0.2583	14	0.8	1.55	
MUESTRA 5	0.80929	0.17336	14	0.5	1.05	

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78	A:ESTAD10	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR					
FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	1.2278	4	20.011	3.729E-11	p < 0.001
ERROR	0.061356	73			
TOTAL	0.12195	77			

Media global = 1.2446

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78	A:ESTAD10	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.061356, gl = 73)						
VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.78794	12.6242	5	p < 0.01	4.7962
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.38472	6.3928	4	p < 0.01	4.5783
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.35079	5.6204	3	p < 0.01	4.2627
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.33785	5.6139	2	p < 0.01	3.747
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.45009	7.0218	4	p < 0.01	4.5783
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.046875	0.75696	3	NO	3.3913
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.012946	0.20198	2	NO	2.8235
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.43714	6.6033	3	p < 0.01	4.2627
MUESTRA 4	MUESTRA 3	0.033929	0.52932	2	NO	2.8235
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.40321	6.2905	2	p < 0.01	3.747

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78		A: ESTAD10		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF	
MUESTRA 1	0.21556	0.023818	18	0.18	0.26		
MUESTRA 2	0.15063	0.063505	16	0.05	0.25		
MUESTRA 3	0.14625	0.059203	16	0.06	0.23		
MUESTRA 4	0.115	0.048635	14	0.05	0.24		
MUESTRA 5	0.075	0.019513	14	0.05	0.11		

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78		A: ESTAD10		COND		Base 1	
ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR							
FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.		
FACTOR	0.042833	4	19.7383	4.820E-11	p < 0.001		
ERROR	0.00217	73					
TOTAL	0.0042824	77					

Media global = 0.14474

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78		A: ESTAD10		COND		Base 1	
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.00217, q1 = 73)							
VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.	
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.14056	11.9744	5	p < 0.01	4.7962	
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.10056	8.5667	4	p < 0.01	4.5783	
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.069306	6.1236	3	p < 0.01	4.2627	
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.064931	5.737	2	p < 0.01	3.747	
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.075625	6.2735	4	p < 0.01	4.5783	
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.035625	2.9553	3	NO	3.3913	
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.004375	0.37567	2	NO	2.8235	
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.07125	5.9106	3	p < 0.01	4.2627	
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.03125	2.5924	2	NO	2.8235	
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.04	3.2128	2	p < 0.05	2.8235	

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 78 A:ESTAD10 COND Base 1

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSP
MUESTRA 1	0.21167	0.025495	18	0.16	0.27	
MUESTRA 2	0.16938	0.069038	16	0.04	0.28	
MUESTRA 3	0.15063	0.070187	16	0.04	0.25	
MUESTRA 4	0.10643	0.047167	14	0.04	0.22	
MUESTRA 5	0.069286	0.01859	14	0.04	0.1	

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78 A:ESTAD10 COND Base 1

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	0.047754	4	18.3619	1.774E-10	p < 0.001
ERROR	0.0026007	73			
TOTAL	0.0049463	77			

Media global = 0.14603

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 78 A:ESTAD10 COND Base 1

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0026007, gl = 73)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.14238	11.0802	5	p < 0.01	4.7962
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.10524	8.1897	4	p < 0.01	4.5783
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.061042	4.9267	3	p < 0.01	4.2627
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.042292	3.4133	2	p < 0.05	2.8235
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.10009	7.5844	4	p < 0.01	4.5783
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.062946	4.7698	3	p < 0.01	4.2627
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.01875	1.4707	2	NO	2.8235
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.081339	6.1636	3	p < 0.01	4.2627
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.044196	3.349	2	p < 0.05	2.8235
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.037143	2.7252	2	NO	2.8235

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 81		A: ESTAD14		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF	
MUESTRA 1	1.6895	0.075607	19	1.55	1.85		
MUESTRA 2	1.2219	0.1402	16	1	1.45		
MUESTRA 3	1.0531	0.1443	16	0.8	1.3		
MUESTRA 4	0.91	0.1168	15	0.7	1.1		
MUESTRA 5	0.8	0.17321	15	0.5	1.1		

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81		A: ESTAD14		COND		Base 1	
ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR							
FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	P	PR	NIVEL SIG.		
FACTOR	2.1129	4	121.5516	0	p < 0.001		
ERROR	0.017383	76					
TOTAL	0.12216	80					

Media global = 1.1623

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81		A: ESTAD14		COND		Base 1	
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.017383, q1 = 76)							
VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Nív. Sig.	Q TEOR.	
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.88947	27.6231	5	p < 0.01	4.7907	
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.77947	24.207	4	p < 0.01	4.5733	
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.63635	20.1166	3	p < 0.01	4.2587	
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.4676	14.782	2	p < 0.01	3.744	
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.42188	12.5912	4	p < 0.01	4.5733	
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.31188	9.3081	3	p < 0.01	4.2587	
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.16875	5.1197	2	p < 0.01	3.744	
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.25313	7.5547	3	p < 0.01	4.2587	
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.14313	4.2717	2	p < 0.01	3.744	
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.11	3.2313	2	p < 0.05	2.822	

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81	A:ESTAD14	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA						
NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	0.24263	0.024909	19	0.2	0.28	
MUESTRA 2	0.15875	0.04334	16	0.1	0.25	
MUESTRA 3	0.13563	0.049121	16	0.07	0.2	
MUESTRA 4	0.096667	0.030861	15	0.05	0.15	
MUESTRA 5	0.08	0.023905	15	0.05	0.12	

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81	A:ESTAD14	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR						
FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.	
FACTOR	0.070832	4	55.5717	0	p < 0.001	
ERROR	0.0012746	76				
TOTAL	0.0047525	80				

Media global = 0.14778

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81	A:ESTAD14	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0012746, gl = 76)						
VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.16263	18.6515	5	p < 0.01	4.7907
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.14596	16.7401	4	p < 0.01	4.5733
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.10701	12.4922	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.083882	9.7925	2	p < 0.01	3.744
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.07875	8.6796	4	p < 0.01	4.5733
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.062083	6.8427	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.023125	2.5909	2	NO	2.822
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.055625	6.1309	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.038958	4.2939	2	p < 0.01	3.744
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.016667	1.808	2	NO	2.822

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 81 A:ESTAD14 COND Base 1

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSP
MUESTRA 1	0.23053	0.023915	19	0.2	0.28	
MUESTRA 2	0.14875	0.032838	16	0.1	0.2	
MUESTRA 3	0.12875	0.043031	16	0.07	0.2	
MUESTRA 4	0.10867	0.032042	15	0.06	0.15	
MUESTRA 5	0.081333	0.031166	15	0.04	0.15	

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81 A:ESTAD14 COND Base 1

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

PUNTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	0.055991	4	51.6476	0	p < 0.001
ERROR	0.0010841	76			
TOTAL	0.0038294	80			

Media global = 0.14407

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 81 A:ESTAD14 COND Base 1

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0010841, gl = 76)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.14919	18.5529	5	p < 0.01	4.7907
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.12186	15.1539	4	p < 0.01	4.5733
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.10178	12.8834	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.081776	10.3517	2	p < 0.01	3.744
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.067417	8.057	4	p < 0.01	4.5733
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.040083	4.7904	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.02	2.4297	2	NO	2.822
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.047417	5.6668	3	p < 0.01	4.2587
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.020083	2.4002	2	NO	2.822
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.027333	3.2152	2	p < 0.05	2.822

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

ESTADÍSTICA BÁSICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	1.7868	0.11884	19	1.6	1.95	
MUESTRA 2	1.3529	0.24461	17	0.9	1.7	
MUESTRA 3	1.1147	0.17657	17	0.8	1.35	
MUESTRA 4	1.0438	0.065511	16	0.95	1.2	
MUESTRA 5	0.9725	0.14526	16	0.7	1.2	

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

ANÁLISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	1.9592	4	74.9492	0	p < 0.001
ERROR	0.026141	80			
TOTAL	0.11819	84			

Media global = 1.2725

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.026141, q1 = 80)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.81434	20.9926	5	p < 0.01	4.7833
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.74309	19.1558	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.67214	17.6102	3	p < 0.01	4.2513
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.4339	11.3683	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.38044	9.5537	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.30919	7.7644	3	p < 0.01	4.2513
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.23824	6.0754	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.14221	3.5711	3	p < 0.05	3.3867
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.070956	1.7819	2	NO	2.82
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.07125	1.7627	2	NO	2.82

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85		A:ESTAD18		COND		Base 1	
ESTADISTICA BASICA							
NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF	
MUESTRA 1	0.27211	0.041174	19	0.22	0.35		
MUESTRA 2	0.20647	0.067356	17	0.1	0.3		
MUESTRA 3	0.18824	0.080563	17	0.06	0.3		
MUESTRA 4	0.15438	0.036691	16	0.1	0.25		
MUESTRA 5	0.1425	0.051704	16	0.08	0.25		

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85		A:ESTAD18		COND		Base 1	
ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR							
FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.		
FACTOR	0.046611	4	13.9531	1.116E-08	p < 0.001		
ERROR	0.0013406	80					
TOTAL	0.0054011	84					

Media global = 0.19565

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85		A:ESTAD18		COND		Base 1	
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0033406, q1 = 80)							
VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.	
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.12961	9.3461	5	p < 0.01	4.7833	
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.11773	8.4898	4	p < 0.01	4.5667	
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.08387	6.147	3	p < 0.01	4.2533	
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.065635	4.8105	2	p < 0.01	3.74	
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.063971	4.4938	4	p < 0.05	3.7367	
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.052096	3.6596	3	p < 0.05	3.3867	
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.018235	1.3009	2	NO	2.82	
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.045735	3.2128	3	NO	3.3867	
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.03386	2.3786	2	NO	2.82	
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.011875	0.82183	2	NO	2.82	

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	0.26737	0.043313	19	0.2	0.35	
MUESTRA 2	0.19529	0.06084	17	0.1	0.28	
MUESTRA 3	0.18588	0.069826	17	0.06	0.28	
MUESTRA 4	0.17	0.030332	16	0.1	0.2	
MUESTRA 5	0.1525	0.052345	16	0.08	0.25	

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	0.034893	4	12.3569	7.146E-08	p < 0.001
ERROR	0.0028238	80			
TOTAL	0.0043509	84			

Media global = 0.19671

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD18 COND Base 1

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0028238, gl = 80)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.11487	9.0095	5	p < 0.01	4.7833
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.097366	7.6369	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.081486	6.4958	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.072074	5.7455	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.042794	3.2697	4	NO	3.7367
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.025294	1.9326	3	NO	3.3867
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.0094118	0.73026	2	NO	2.82
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.033382	2.5506	3	NO	3.3867
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.015882	1.2135	2	NO	2.82
MUESTRA 4	MUESTRA 5	0.0175	1.3173	2	NO	2.82

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	NINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	1.9237	0.060938	19	1.8	2	
MUESTRA 2	1.5	0.11456	17	1.3	1.8	
MUESTRA 3	1.3294	0.10906	17	1.2	1.5	
MUESTRA 4	1.1719	0.1653	16	0.7	1.4	
MUESTRA 5	1.1525	0.046547	16	1.05	1.22	

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	1.7958	4	157.9635	0	p < 0.001
ERROR	0.011368	80			
TOTAL	0.096342	84			

Media global = 1.4334

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	1.7958	4	157.9635	0	p < 0.001
ERROR	0.011368	80			
TOTAL	0.096342	84			

Media global = 1.4334

AN1 LONGITUD/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85	A:ESTAD22	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	0.31632	0.029667	19	0.25	0.35	
MUESTRA 2	0.23706	0.022013	17	0.2	0.28	
MUESTRA 3	0.23118	0.021179	17	0.2	0.25	
MUESTRA 4	0.185	0.07303	16	0.05	0.3	
MUESTRA 5	0.18875	0.04334	16	0.11	0.3	

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85	A:ESTAD22	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

ANALISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	0.050043	4	28.8127	0	p < 0.001
ERROR	0.0017368	80			
TOTAL	0.0040371	84			

Media global = 0.23471

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85	A:ESTAD22	COND	Base 1
-----------------	-----------	------	--------

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (VR = 0.0017368, gl = 80)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.13132	13.1328	5	p < 0.01	4.7833
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.12757	12.7577	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.085139	8.654	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.079257	8.0561	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.052059	5.0718	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.048309	4.7064	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.0058824	0.58196	2	NO	2.82
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.046176	4.4987	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.042426	4.1333	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 5	MUESTRA 4	0.00375	0.35993	2	NO	2.82

AN1 VOLUMEN/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

Resultados

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

ESTADÍSTICA BÁSICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO	TRANSF
MUESTRA 1	0.31105	0.023069	19	0.26	0.35	
MUESTRA 2	0.24176	0.025059	17	0.2	0.3	
MUESTRA 3	0.21176	0.018109	17	0.18	0.25	
MUESTRA 4	0.16	0.055857	16	0.04	0.25	
MUESTRA 5	0.17125	0.026045	16	0.1	0.22	

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

ANÁLISIS DE LA VARIANZA 1 FACTOR

FUENTE VAR	VARIANZA	G.L.	F	PR	NIVEL SIG.
FACTOR	0.065446	4	63.9679		0 p < 0.001
ERROR	0.0010231	80			
TOTAL	0.0040908	84			

Media global = 0.22259

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

SIGMA Ficha: 85 A:ESTAD22 COND Base 1

PRUEBA DE NEWMAN-KEOLS (VR = 0.0010231, gl = 80)

VARIABLE1	VARIABLE2	DIFERENCIA	Q EXPER.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
MUESTRA 1	MUESTRA 4	0.15105	19.6828	5	p < 0.01	4.7833
MUESTRA 1	MUESTRA 5	0.1398	18.2169	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 1	MUESTRA 3	0.099288	13.1493	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 1	MUESTRA 2	0.069288	9.1762	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 2	MUESTRA 4	0.081765	10.3788	4	p < 0.01	4.5667
MUESTRA 2	MUESTRA 5	0.070515	8.9508	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 2	MUESTRA 3	0.03	3.8671	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 3	MUESTRA 4	0.051765	6.5708	3	p < 0.01	4.2533
MUESTRA 3	MUESTRA 5	0.040515	5.1428	2	p < 0.01	3.74
MUESTRA 5	MUESTRA 4	0.01125	1.4069	2	NO	2.82

AN1 PESO/DOSIS=0/DOSIS=5/DOSIS=10/DOSIS=15/DOSIS=20

A.- RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE LONGITUD DE LOS EMBRIONES EXPERIMENTALES.

1.-En el estadío 10 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5, 10 y 15 mcl. respecto a los tratados con 20 mcl.

2.-En el estadío 14 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 10, 15 y 20 mcl., y entre los tratados con 10 mcl. respecto a los que recibieron 15 y 20 mcl.

3.-En el estadío 18 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 10, 15 y 20 mcl.

4.-En el estadío 22 de H.H.: El análisis la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 10, 15 y 20 mcl, y existen también diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratados con 10 mcl. y los tratados con 15 y 20 mcl.

B.- RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE VOLUMEN DE LOS EMBRIONES EXPERIMENTALES.

1.-En el estadío 10 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 y 10 mcl. respecto a los tratados con 20 mcl.

2.-En el estadío 14 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 y 10 mcl. respecto a los tratados con 15 y 20 mcl.

3.-En el estadío 18 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), y diferencia con menor nivel de significación ($P < 0.05$) entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 15 y 20 mcl.

4.-En el estadío 22 de H.H.: El análisis la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 y 10 mcl. respecto a los tratados con 15 y 20 mcl.

C.- RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS DE PESO DE LOS EMBRIONES EXPERIMENTALES.

1.-En el estadío 10 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y los inyectados con el producto a dosis de 10, 15 o 20 mcl., así como entre los inyectados con dosis de 5 y 10 mcl. respecto a los tratados con 20 mcl.

2.-En el estadío 14 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 15 y 20 mcl., y entre los inyectados con 10 mcl. respecto a los de 20 mcl.

3.-En el estadío 18 de H.H.: El análisis de la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto a dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl. No hubo diferencias significativas entre los embriones inyectados con distintas dosis del producto.

4.-En el estadío 22 de H.H.: El análisis la varianza denota diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los embriones testigos y todos los inyectados con el producto (dosis de 5, 10, 15 o 20 mcl.), así como entre los inyectados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con 10, 15 y 20 mcl., y entre los inyectados con 10 mcl. respecto a los que recibieron 15 y 20 mcl.

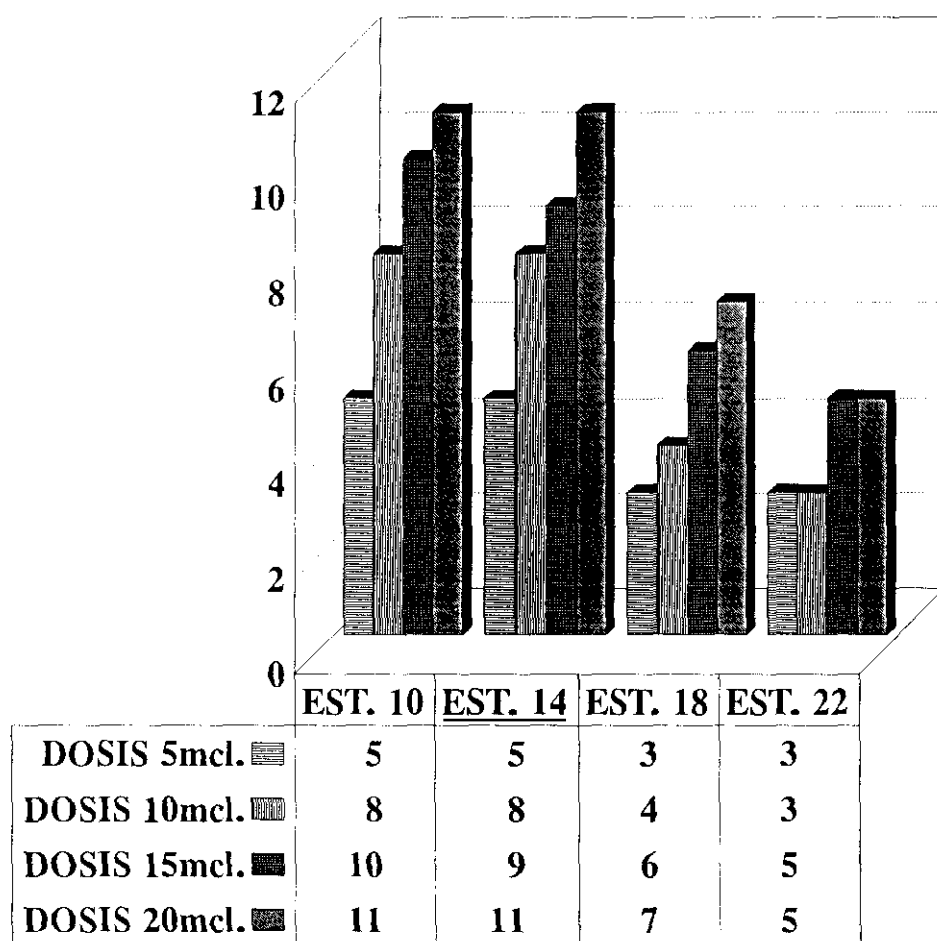
ESTUDIO DE LAS MALFORMACIONES

En nuestro trabajo de investigación hemos comprobado la producción, por parte del agente en estudio, el **interferón-alfa-2b**, una serie de alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario, tal y como se refleja en el cuadro general de resultados anteriormente expuestos.

Para una visión global de las malformaciones obtenidas, hemos agrupado los embriones afectados por alguna malformación, según el estadio en que se inyectó el **interferón alfa-2b**, y la dosis utilizada. Los resultados que tuvimos los reflejamos en un diagrama de barras, siendo el valor del eje Y el número de embriones que presentaron una o más de las anomalías que después describiremos.

En el estudio de estos resultados no hemos incluido aquellos embriones experimentales que transcurridas 48 horas de la administración del fármaco, se encontraban muertos, aunque se apreciaran en ellos algún tipo de anormogénesis. Por tanto los datos expuestos en la gráfica reflejan sólo y exclusivamente el estudio de las malformaciones ocurridas en los embriones experimentales supervivientes.

MALFORMACIONES POR ESTADIOS Y DOSIS



Como se puede apreciar en el gráfico de malformaciones expuesto, el mayor número de éstas se produjeron en los estadíos 10 y 14 de H.H., disminuyendo considerablemente su frecuencia de presentación en los estadíos 18 y 22 de H.H.

Respecto a las dosis utilizadas dentro de cada estadío, se puede objetivar un incremento del número de malformaciones al aumentar la dosis. Este aumento fue estadísticamente significativo ($P < 0.01$) en el estadío 10 y 14 de H.H., en los que para la dosis 5 mcl. se produjeron 5 embriones con alguna malformación de los 16 y 14 supervivientes respectivamente, esto es, un 31% de embriones malformados en el estadío 10 H.H., y un 35% en el estadío 14 H.H., mientras que al elevar la dosis hasta 20 mcl. se produjeron 11 embriones malformados en ambos estadíos, lo que supone un 68% en el estadío 10 H.H., y un 78% en el estadío 14 H.H.

A continuación realizaremos un estudio individualizado de las malformaciones obtenidas.

Obviamente reflejar en la iconografía de esta Tesis la totalidad de los embriones, por nosotros estudiados, supondría adjuntar un volumen de fotografías tal que sería tedioso para el lector por lo innecesario y repetitivo de tal iconografía. Por tanto hemos considerado oportuno realizar una selección de aquellos embriones cuyas malformaciones resultan representativas de las encontradas en el conjunto de las distintas dosis y estadíos que han constituido nuestro trabajo de investigación.

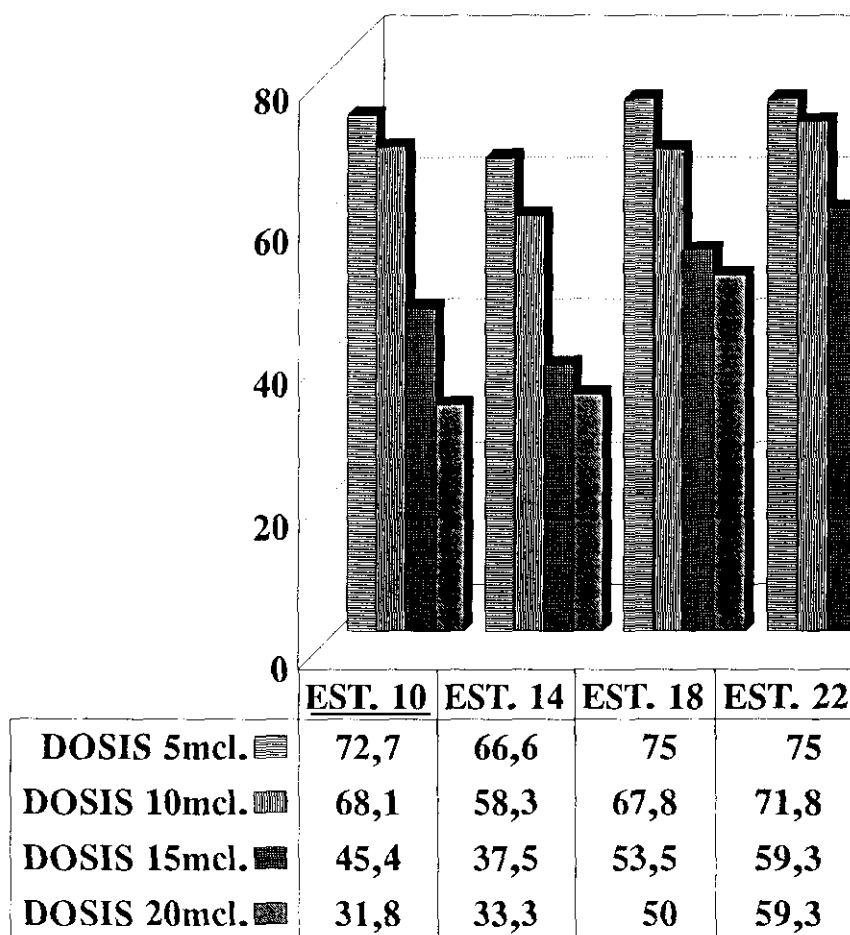
Las anomalías más frecuentemente encontradas por nosotros han sido malformaciones del esbozo ocular: Microftalmias uni o bilaterales, anomalías a nivel truncal: Torsiones Atípicas del Tronco, y malforma-

ciones del polo caudal del embrión consistentes en la ausencia o disminución del volumen y longitud del mismo, lo que hemos dado en llamar como Síndrome de Regresión Caudal.

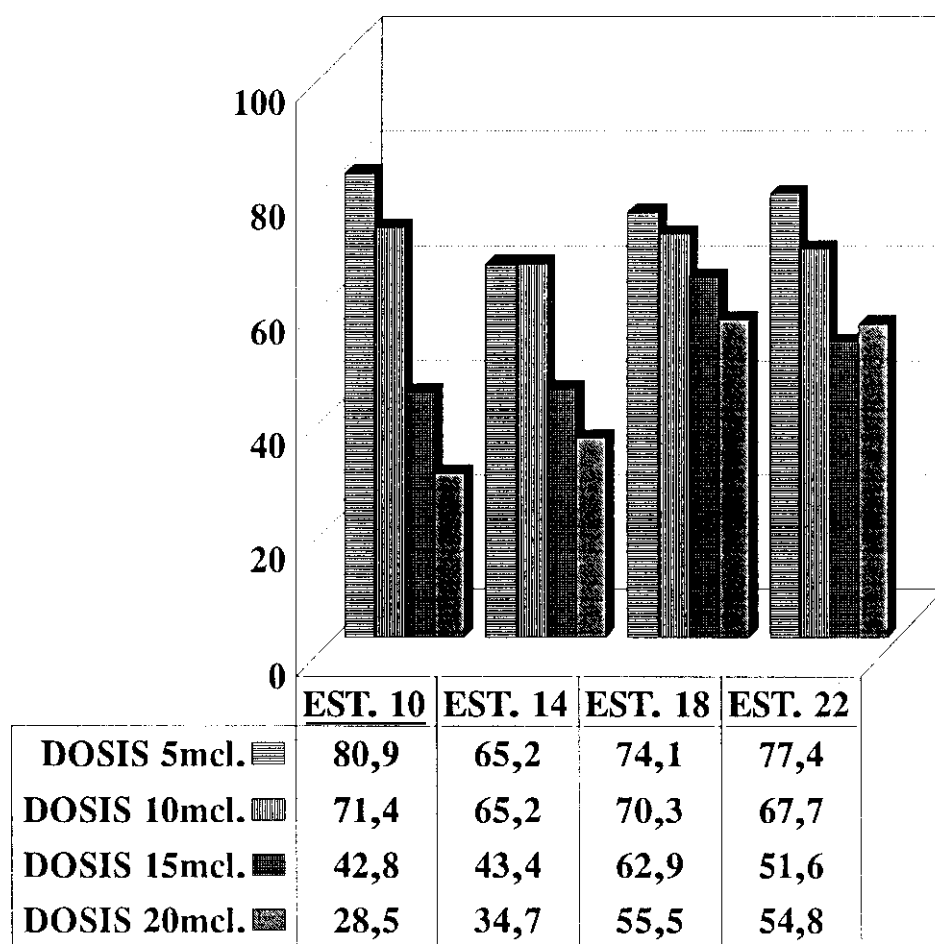
Por estadíos, han sido más frecuentes en el estadio 10 y 14 de H.H., y por dosis, al elevar ésta de 5-10 mcl. a 15-20 mcl. aumentaron significativamente en número.

Hemos de hacer constar que la malformación que apareció en la práctica totalidad de los embriones experimentales supervivientes fue la Microsomia, entendiendo por ésta la disminución en el volumen y peso del embrión superviviente en comparación a los de su mismo estadio de desarrollo. Esta malformación queda claramente puesta de manifiesto en las tablas y gráficos en los que hemos comparado las medidas de volumen y peso de los embriones tratados con interferón-alfa-2b, con respecto a las medidas de volumen y peso de los embriones testigos, y que a continuación mostramos, por lo que en este apartado no incluimos iconografía comparada.

VOLUMEN PORCENTUAL RESPECTO A LOS TESTIGOS (=100%)



PESO PORCENTUAL RESPECTO A LOS TESTIGOS(=100%)



LONGITUD PORCENTUAL RESPECTO A LOS TESTIGOS(=100%)

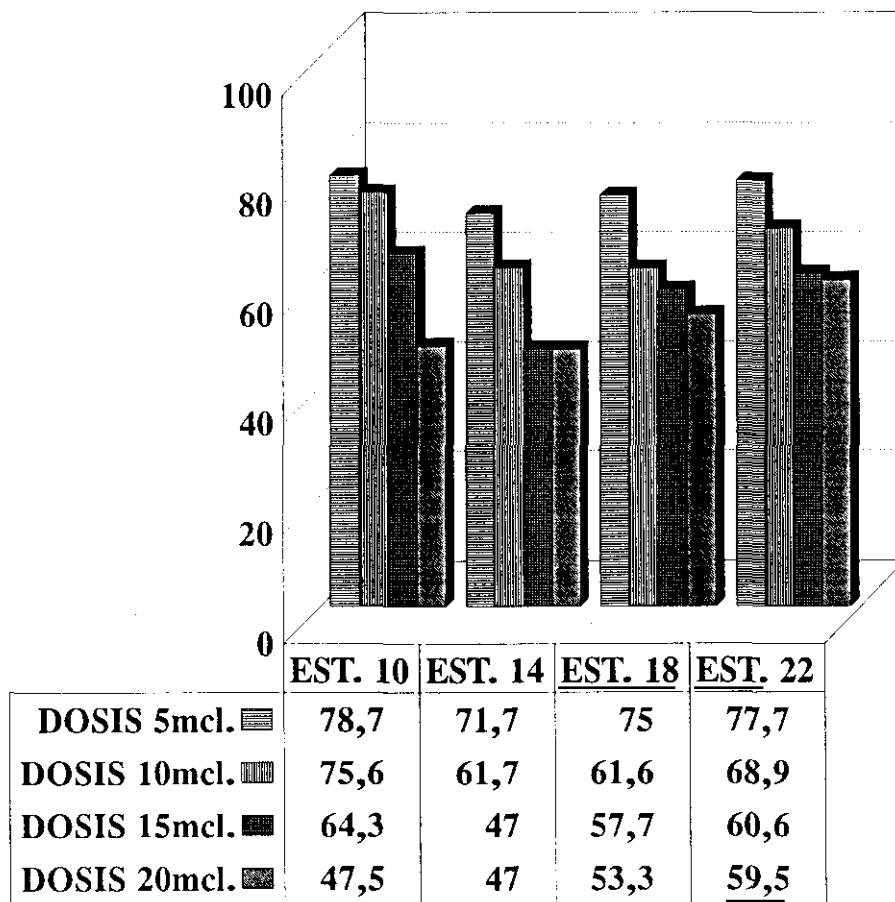


Figura 1 y 1a

Embrión al que se le administraron 15 mcl. de interferón-alfa-2b cuando se encontraba en el estadio 10 de H.H. de desarrollo.

En la fig.1 observamos el lado derecho de este embrión en el que se aprecia la fuerte inflexión que presenta a nivel del tronco: "Torsión Truncal", anomalía ésta que se presentó con una mayor frecuencia en los embriones tratados por nosotros con **interferon-alfa-2b** en el estadio 10 de H.H. y que como pudimos comprobar, su aparición fue disminuyendo en los embriones tratados en estadios mas avanzados.

En la fig.1a que corresponde al lado izquierdo de este specimen comprobamos nuevamente la fuerte inflexión truncal.

Resultados



Figura 1



Figura 1.a

Figuras 1b y 1c:

El estudio histológico muestra una serie de detalles característicos y comunes en estos embriones:

*La notocorda presenta marcados signos de hiperplasia, con clara y evidente desorganización de la trama fibrilar y aparición de amplios espacios, ocupados en gran parte, por filtrado plasmático y células necróticas.

*Los cuerpos vertebrales, a nivel de la atípica notocorda, aparecen fusionados, formando un bloque; por el contrario, los arcos vertebrales se sitúan aislada e independientemente a la formación corporal, observándose la presencia metamérica y alternante de las formaciones ganglionares.

*Conjuntamente y en la porción distal del cuerpo embrionario, pero excluido de la cavidad celómica, se localizan formaciones mesonefríticas, típicas en su configuración y morfología, pero con un voluminoso y dilatado conducto de Wolff.

Resultados

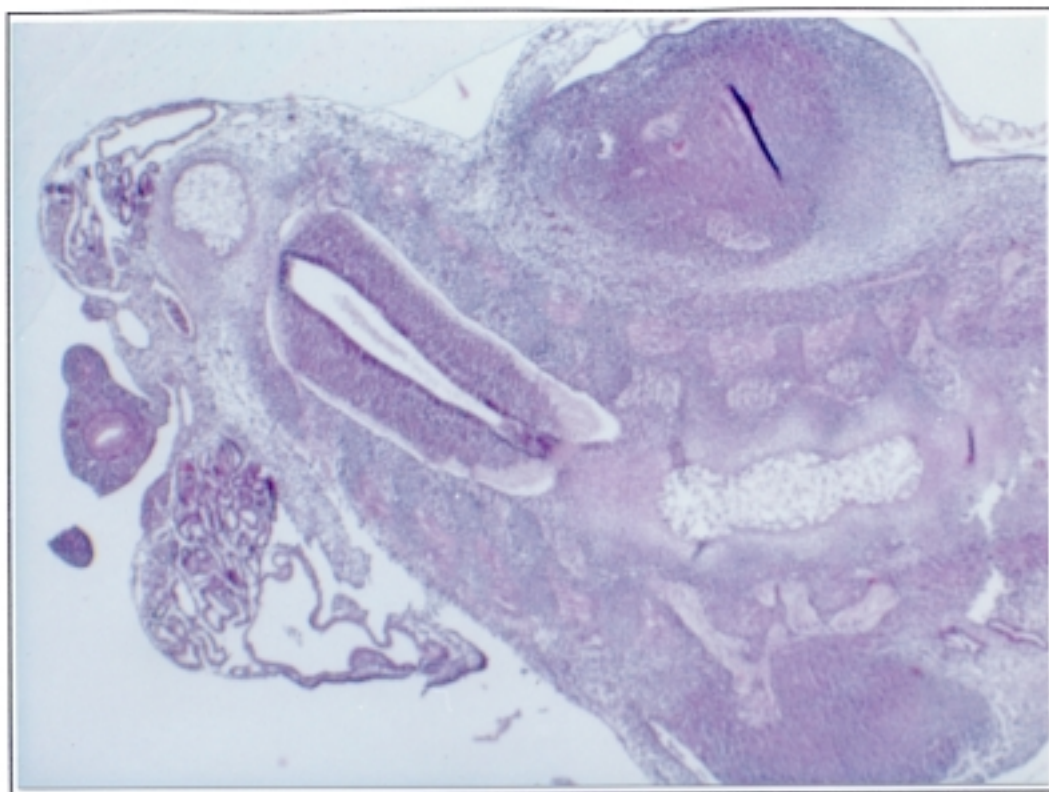


Figura 1.b

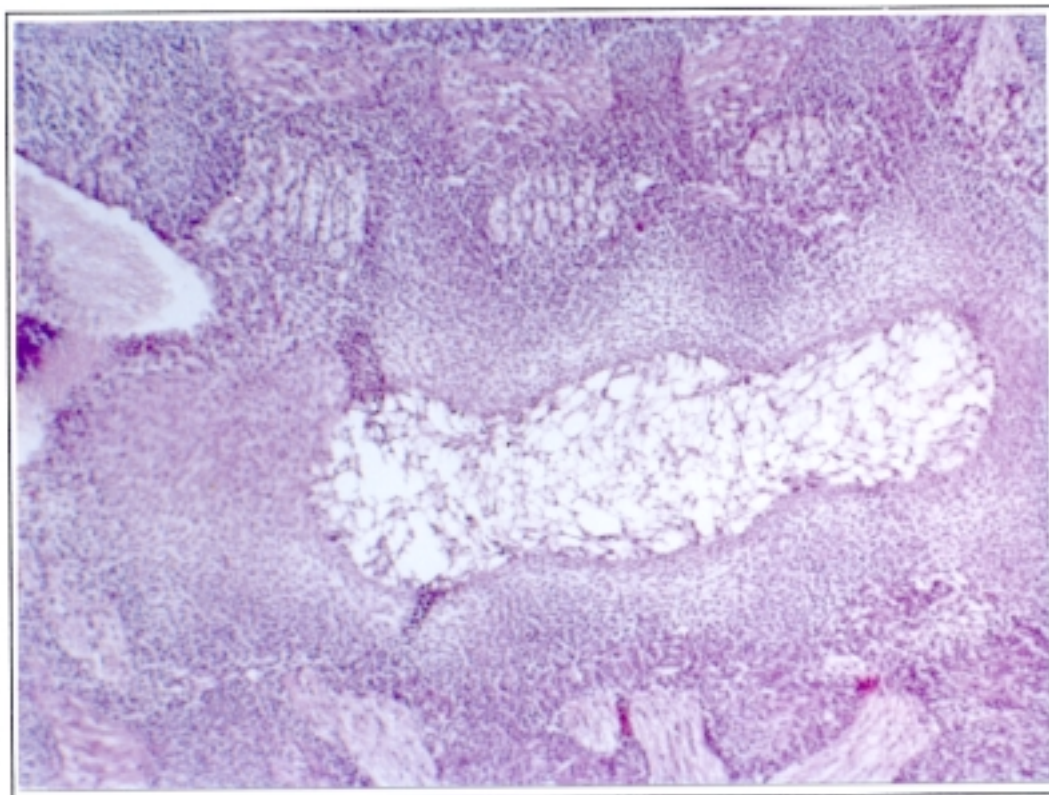


Figura 1.c

Figuras 2 y 2a

Corresponden ambas figuras a un embrión al que se le administraron 20 mcl. de interferón-alfa-2b cuando se encontraba en el estadio 10 de H.H.

En la fig.2 comprobamos una casi normalidad en el lado derecho de este embrión, si bien, aunque no llega a apreciarse una torsión del tronco si que comprobamos una rectificación a nivel torácico manteniendo una curvatura normal tanto en la región cervical como en la caudal.

La fig.2a corresponde a una visión del lado izquierdo de este mismo embrión en la que podemos destacar la existencia de una microftalmia unilateral.



Figura 2



Figura 2.a

Figuras 2b y 2c:

El menor desarrollo del ojo izquierdo a su vez caracterizan tres hechos:

*Si bien, tanto la lámina neural,-retina-, como la pigmentaria, -tapetum-, presentan una clara diferenciación, el ectomesénquima periorcular no adquiere el grado de maduración que a estos estadios corresponde.

*Los ojos microftálmicos presentan con gran frecuencia retinas septae debidos a la persistencia de la arteria hialoidea o restos fibrosos de ésta, que determinan pliegues retinales.

*Escasamente en el ectomesénquima que rellena el segmento fronto-orbitario del II arco, se localizan las condensaciones blastemáticas que corresponden a esbozos de la musculatura extrínseca, característica ésta que es típica en las microftalmias.

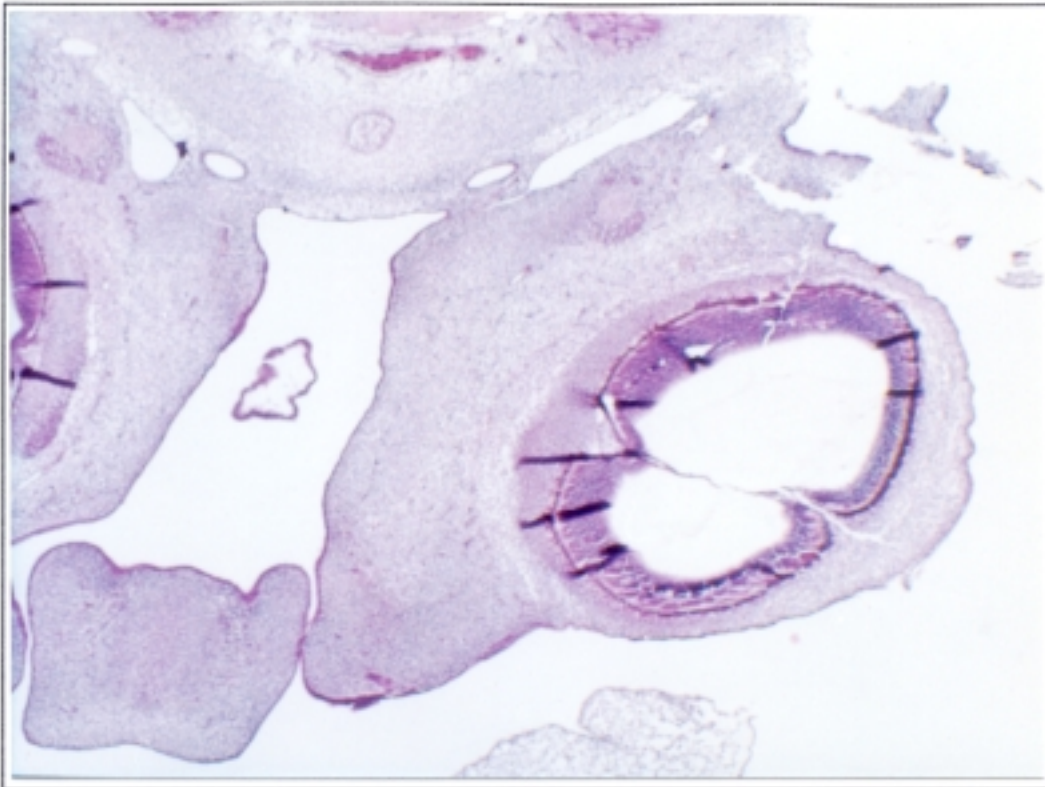


Figura 2.b

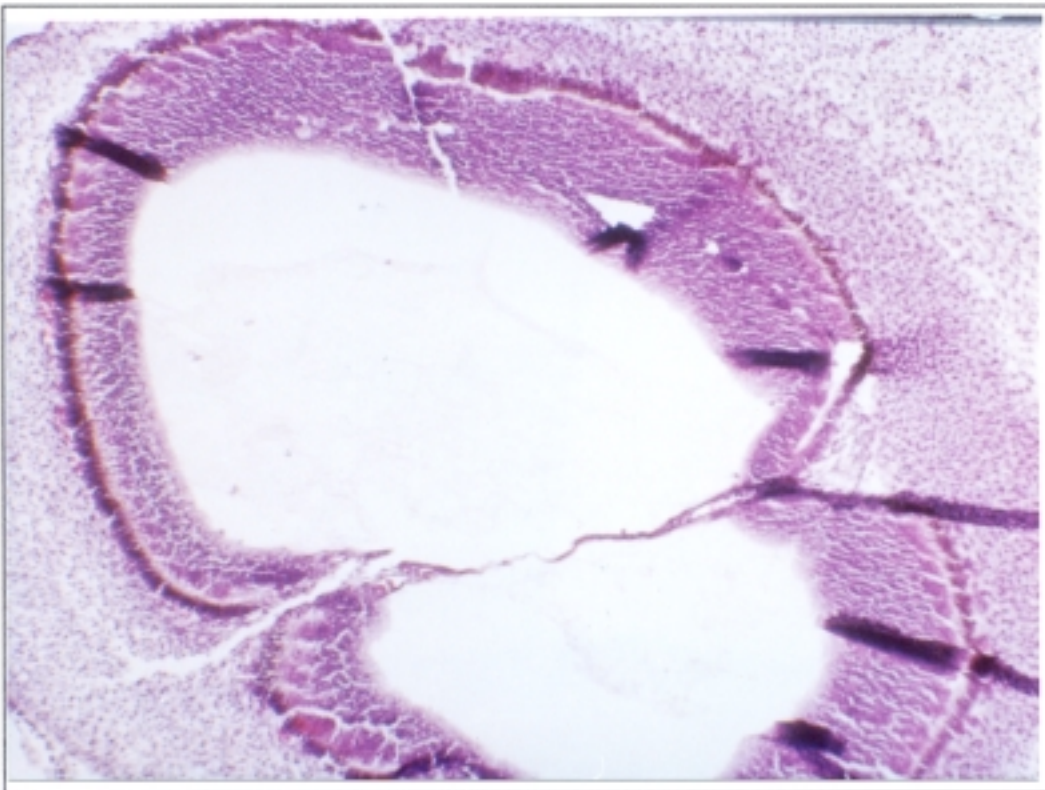


Figura 2.c

Figuras 3 y 3a

Corresponden ambas figuras a un embrión al que se le administraron 5 mcl. de interferón-alfa-2b cuando se encontraba en el estadio 14 de H.H. de desarrollo.

Este embrión posee la práctica totalidad de las anomalías por nosotros descritas en nuestro trabajo de investigación, entre ellas, una marcada hipervascularización con pseudohemorragía tal y como se evidencia en la fig.3, lado derecho. En esta misma figura apreciamos una discreta microftalmia unilateral.

En la fig. 3a, lado izquierdo, objetivamos otra anomalía aparecida con una elevada frecuencia en los embriones tratados en estadios tempranos: la Torsión Truncal.

Conjuntamente comprobamos un menor crecimiento de la porción caudal, fase inicial del Síndrome de Regresión Caudal.



Figura 3



Figura 3.a

Figuras 3b, 3c y 3d:

El estudio histológico nos muestra:

*Hiperplasia notocordal con fusión, a distintos niveles, de cuerpos vertebrales.

*Completa ausencia de la porción distal del cuerpo embrionario, caudal a un plano de sección que discorra por los esbozos de los miembros inferiores, que a su vez, presentan un menor desarrollo y diferenciación que los torácicos.

*El mesonefros, sobre todo del lado izquierdo, presenta una marcada mesonefrosis, con gruesos glomus vasculares que en parte obliteran la luz, así como una gran dilatación del conducto de Wolff, hecho este característico en estos embriones, ya que gran parte de la cavidad celómica, se encuentra ocupada por la dilatación sacular wolfriana que termina en fondo de saco ciego.

*La porción truncal del cuerpo embrionario si bien presenta tipicidad en el S.N., va acompañada de hiperplasia notocordal, hecho este que condiciona que la comisura ventral medular sea atípica, incluso en ciertos especímenes, hay duplicidad en la luz del tubo neural.

Por el contrario, y a nivel cefálico, no observamos alteración en los derivados mesenquimatosos.

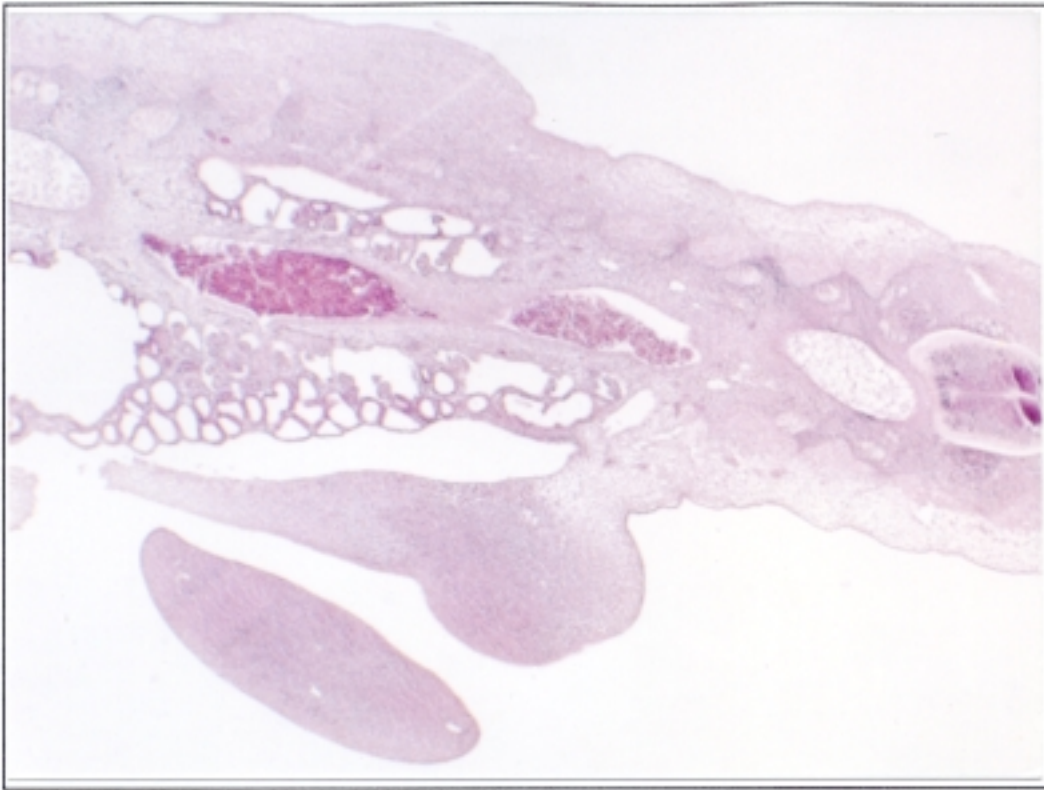


Figura 3.b

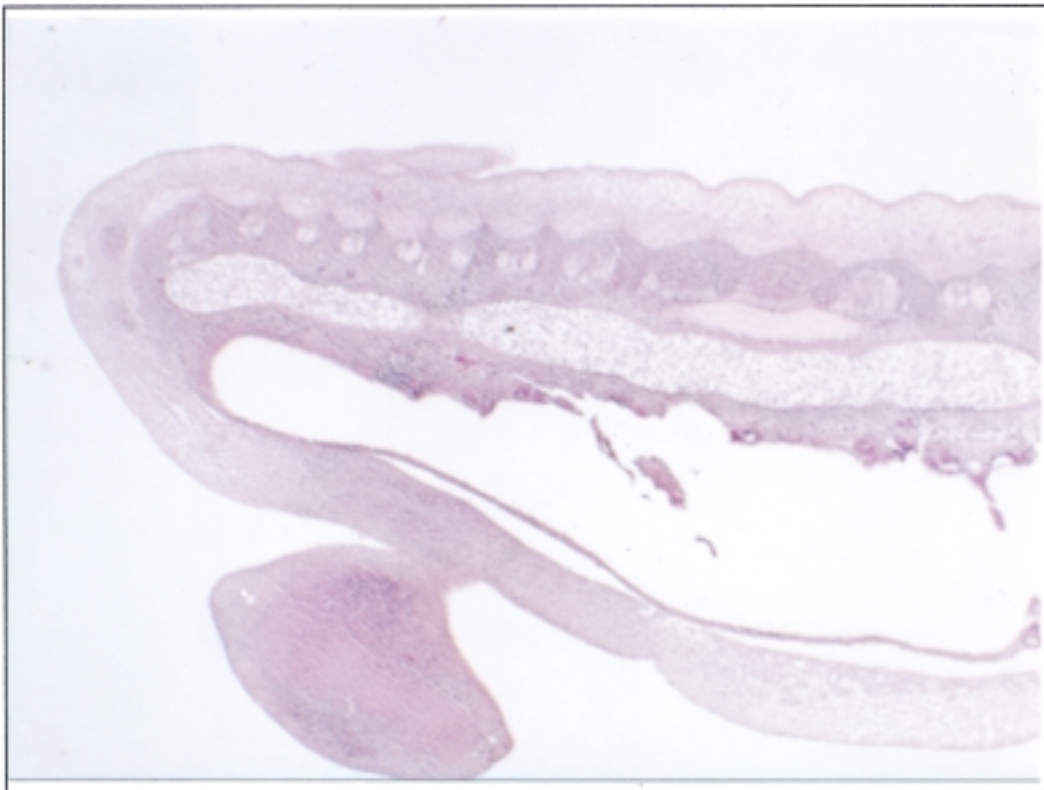


Figura 3.c

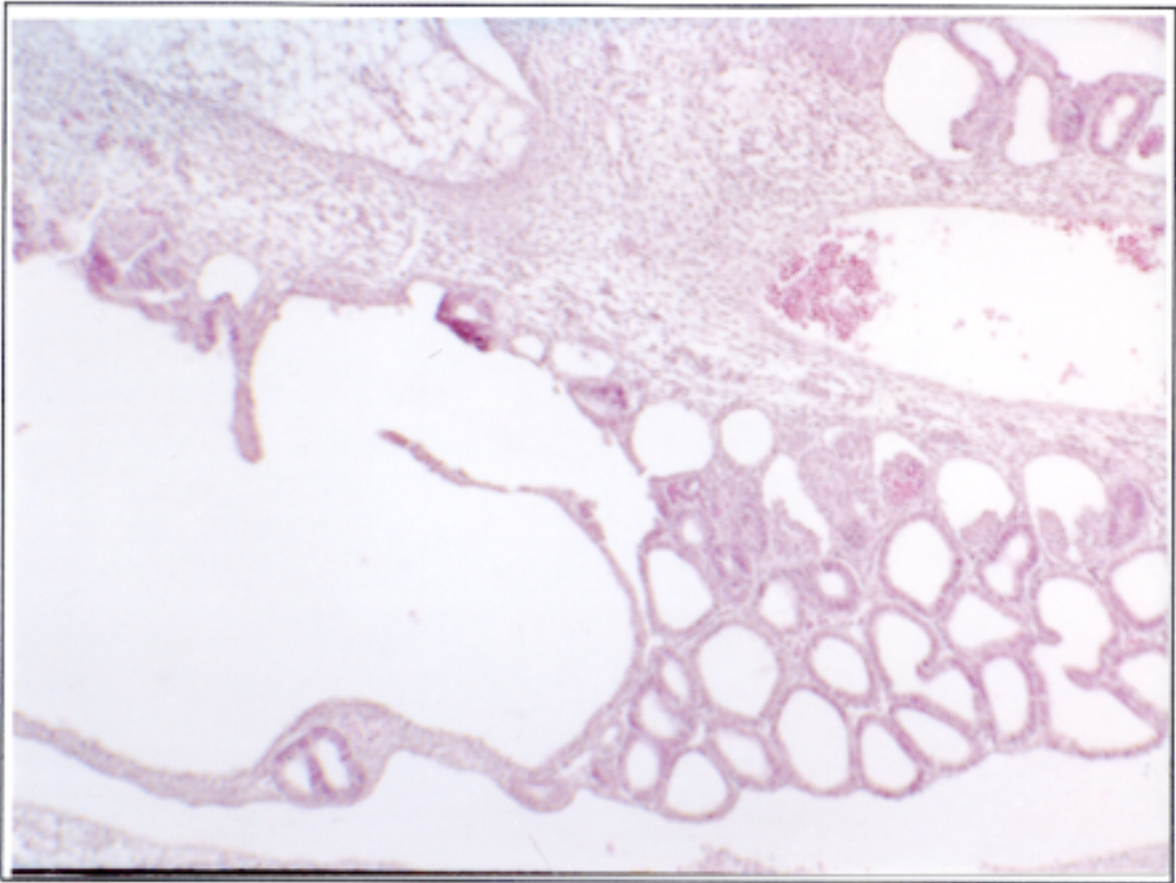


Figura 3.d

Figuras 4 y 4a

Ambas figuras corresponden a un embrión al que se le administraron 20 mcl. de interferón-alfa-2b en el estadio 14 de H.H.

La fig. 4 muestra el lado izquierdo del embrión en el que se objetiva una lesión artificiosa a nivel de la cola, producto de incorrecta manipulación instrumental.

Es clara la presencia de alteración en el desarrollo del polo caudal del embrión: Síndrome de Regresión Caudal, anomalía ésta que en el caso de este embrión, se presentó con una gran intensidad, pues como podemos apreciar tanto en la fig. 4 como en la fig. 4a que corresponden a los lados izquierdo y derecho, se inicia a partir de la región truncal con defectos en el desarrollo de los miembros superiores e inferiores.

Conjuntamente comprobamos la presencia de un exocardia con completa ausencia de pared antero-lateral de la cavidad celómica a este nivel.

Llama la atención la práctica normalidad y por tanto, ausencia de anomalías en el polo cefálico.

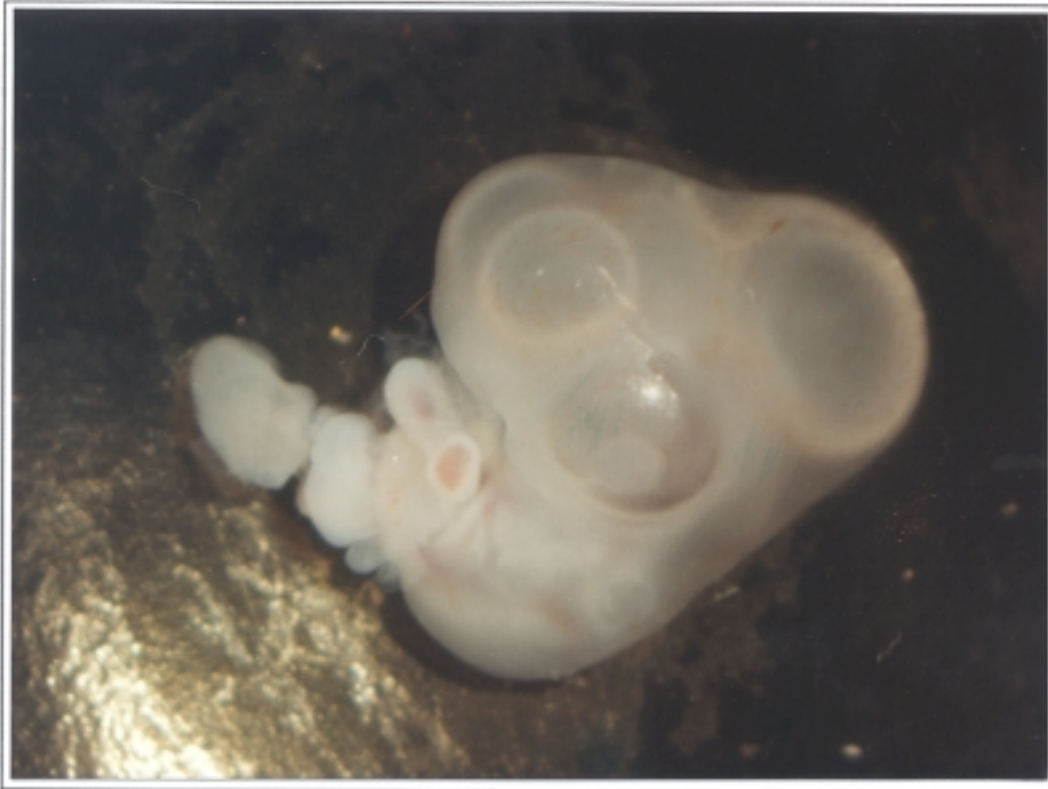


Figura 4



Figura 4.a

Figuras 5 y 5a

Corresponden ambas figuras a los lados izquierdo y derecho de un embrión al que se le administraron 10 mcl. de interferón-alfa-2b en el estadio 18 de H.H.

Observamos en la visión macroscópica y por defecto de la técnica, una leve lesión a nivel caudal.

En la fig.5 es evidente sobre todo cuando se comparan las dos proyecciones, la existencia de microftalmia unilateral, que afecta al lado izquierdo; por contra, es clara la práctica normalidad del esbozo óptico del lado derecho, fig. 5a.

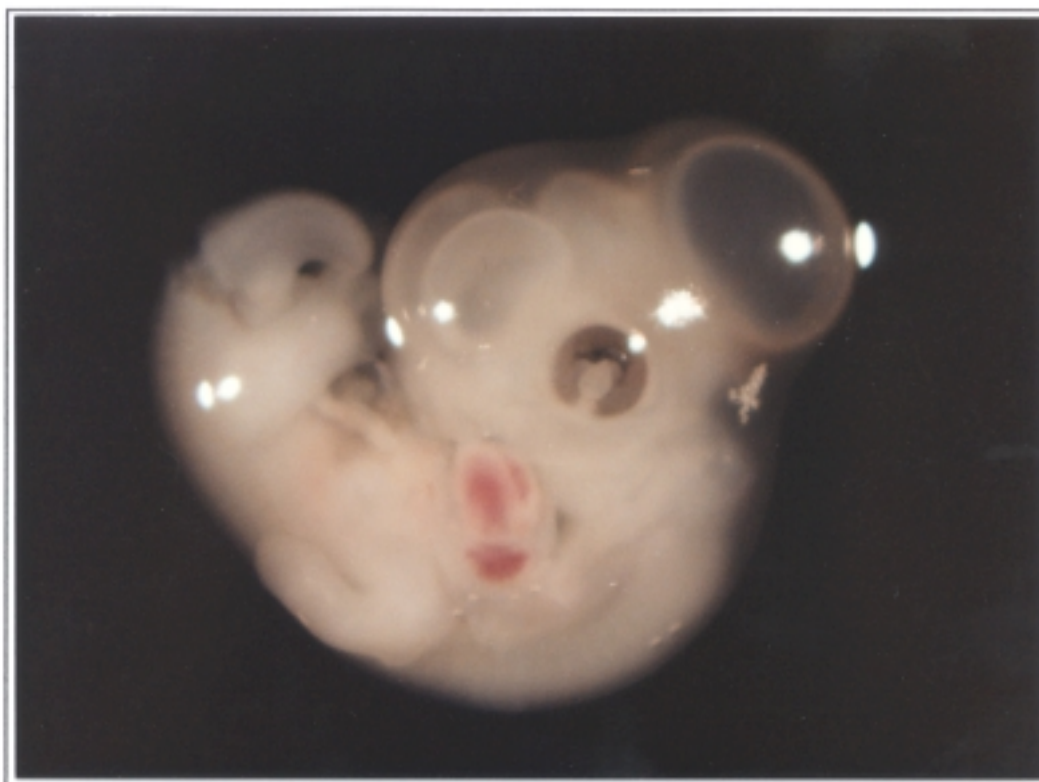


Figura 5



Figura 5.a

Figuras 5b, 5c y 5d:

El estudio histológico muestra en este embrión típicos caracteres en relación a la anomalía ocular:

*En la microfotografía panorámica se aprecia como la sección es prácticamente frontal, disponiéndose ambas vesículas telencefálicas de modo simétrico al diencéfalo impar y medio.

*Las formaciones ópticas presentan una evidente asimetría; mientras la derecha es completamente normal tanto en su morfología como estructuración, observándose incluso la configuración de cámara anterior y esbozo de córnea, la formación izquierda es claramente microftalmia.

*Del suelo diencefálico, en su porción derecha, se desprende y configura el nervio óptico con trayectoria e inclusión retiniana completamente típica.

Por el contrario, no se aprecia en el lado izquierdo a lo largo de toda la seriación histológica, esbozo fascicular; en este caso, junto con la microftalmia se ha producido una degeneración secundaria fascicular que ha condicionado ausencia de nervio óptico.

*Al igual que en especímenes anteriores con similar o parecida malformación, el ectomesénquima periocular, presenta un marcado grado de inmadurez y desorganización, no observándose esbozos blastemáticos pseudomusculares típicos de la musculatura extrínseca, -si evidentes en el lado derecho-, así como del círculo arterial periocular, cristalino y cámara anterior.

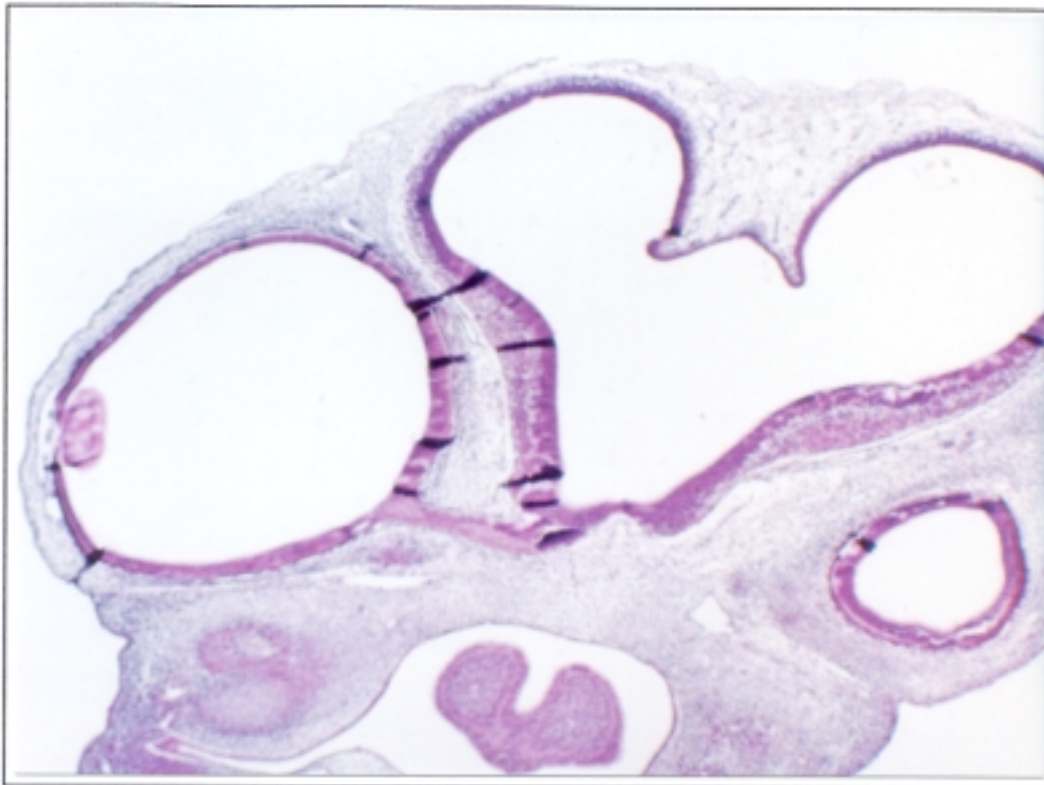


Figura 5.b

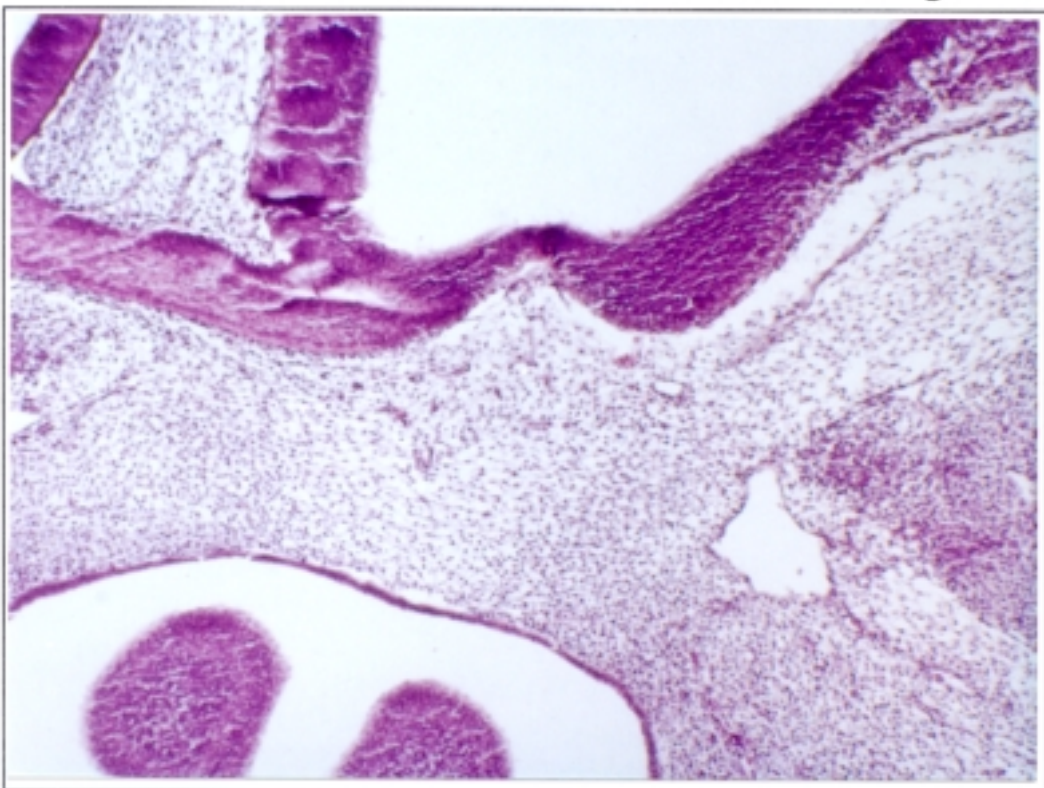


Figura 5.c

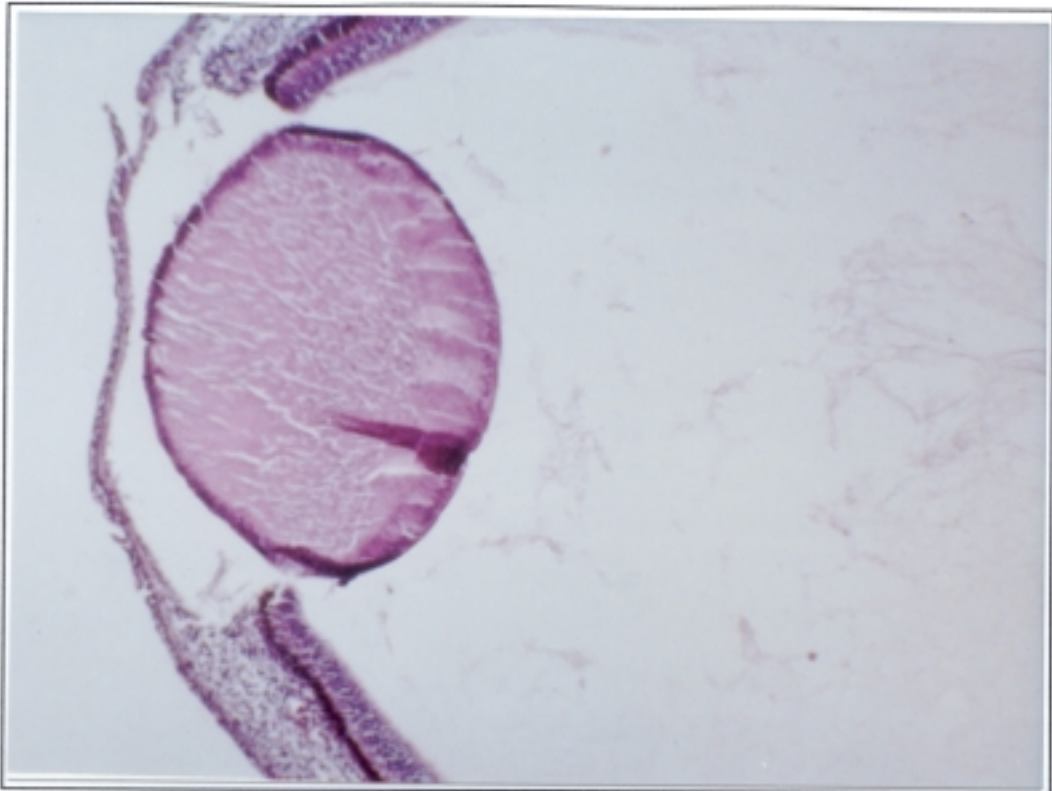


Figura 5.d

Figuras 6 y 6a

Corresponden ambas figuras a un embrión al que se le administraron 10 mcl. de interferón-alfa-2b en el estadio 22 de H.H.

Se manifiesta la anomalía más frecuente por nosotros obtenida: microftalmia unilateral izquierda, anomalía que no ha afectado al lado derecho, en el que las estructuras oculares han seguido un desarrollo normal, fig. 6a.

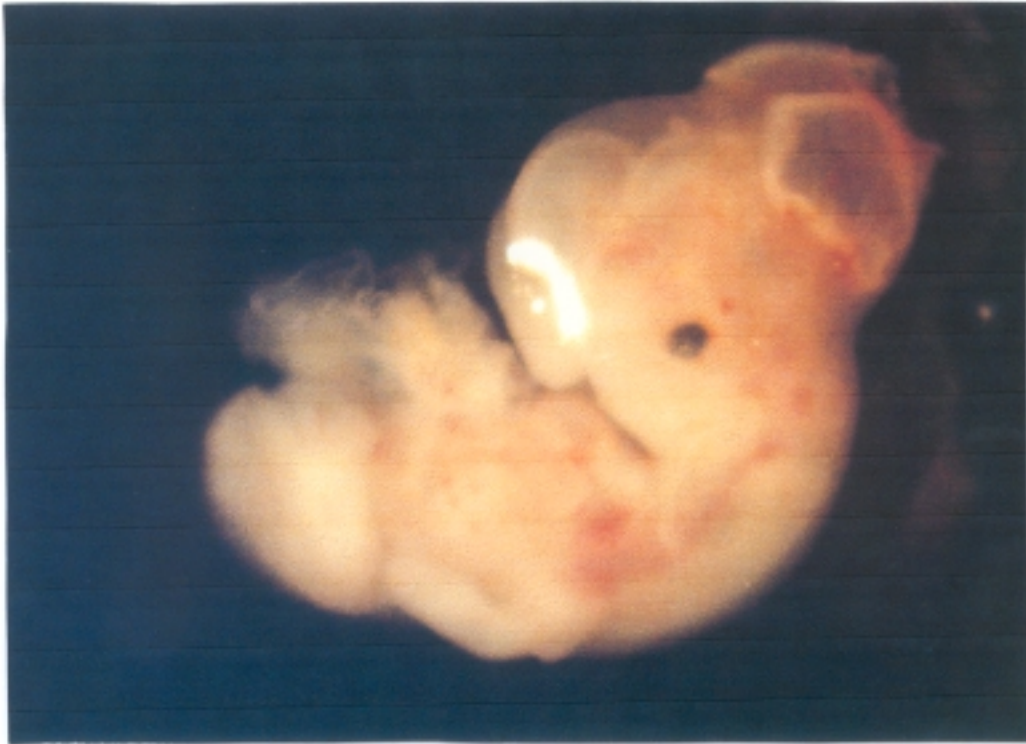


Figura 6



Figura 6.a

Figuras 7 y 7a

Corresponden a un embrión al que se administraron 20 mcl. de interferón-alfa-2b el estadio 22 de H.H.

La fig.7 muestra en el lado izquierdo una gran Torsión a nivel Truncal.

Asi mismo, fig.7a, es evidente la existencia de una celosomia por defecto en el cierre de la pared ventral del tronco.

Resultados



Figura 7

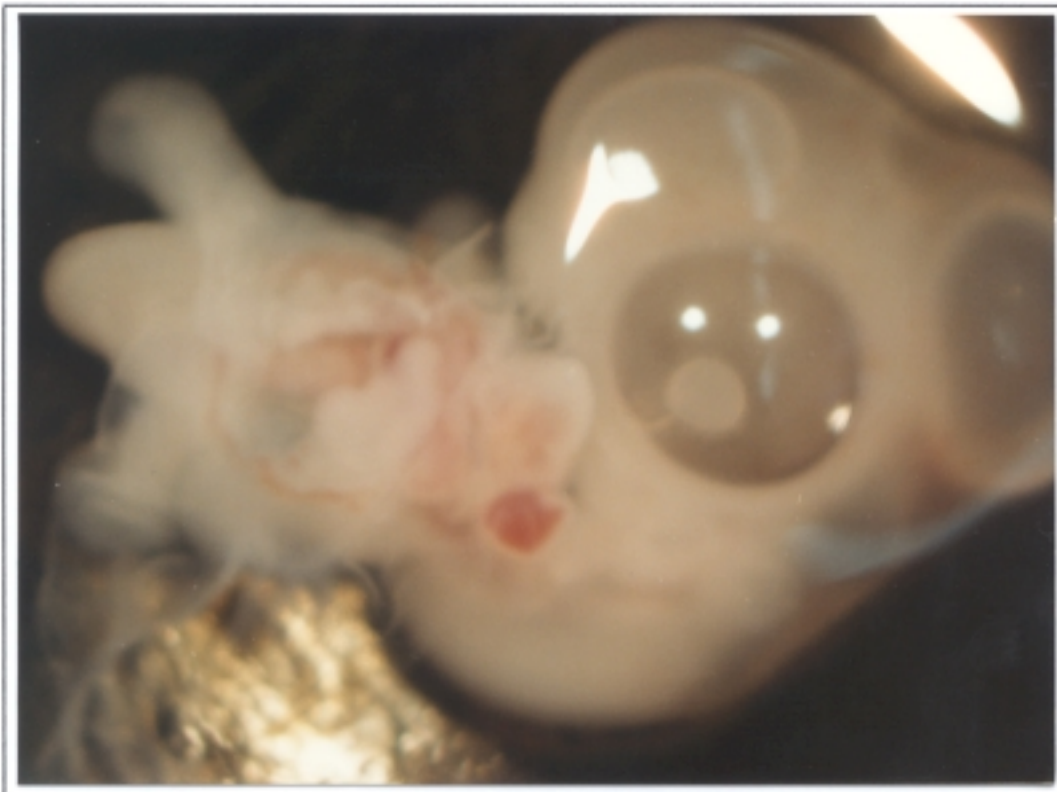


Figura 7.a

Figuras 8 y 8a

Las imágenes pertenecen a un embrión al que se le administraron 15 mcl. de interferón-alfa-2b en el estadio 22 de H.H.

Observamos un discreto retraso en el desarrollo, Microsomía, detectable al compararlos con los embriones testigos de cada serie.

La Fig.8a pone de manifiesto la existencia de una discreta microftalmia unilateral.



Figura 8



Figura 8.a

RESULTADOS FINALES

I.- En todos los embriones tratados con interferón-alfa-2b se produjo una disminución significativa del volumen y peso (Microsomia) con respecto a los embriones testigos de su mismo estadio del desarrollo, y ocurrió en todos los estadios: 10, 14, 18 y 22 de H.H.

II.- Respecto a la dosis-dependencia del efecto del interferon-alfa-2b en los distintos estadios para producir Microsomias, observamos que:

a) En el estadio 10 de H.H. fue significativa ($P < 0.01$) la disminución del volumen y peso obtenidas con las dosis 5 y 10 mcl. con respecto a la dosis de 20 mcl.

b) En el estadio 14 de H.H. existió diferencia significativas ($P < 0.01$) en la disminución del volumen y peso obtenidas con las dosis de 5 y 10 mcl. con respecto a la dosis de 15 y 20 mcl.

c) En el estadio 18 de H.H. sólo hubo diferencias ligeramente significativas ($P < 0.05$) en la disminución del volumen de los embriones tratados con 5 mcl. con respecto de los tratados con 15 y 20 mcl. No hubo diferencias significativas del peso del embrión para las distintas dosis administradas.

d) En el estadio 22 de H.H. observamos diferencias significativas ($P < 0.01$) para el volumen y el peso de los embriones tratados con 5 y 10 mcl. con respecto a los tratados con 15 y 20 mcl.

III.- Continuando con el estudio y análisis de otras malformaciones obtenidas en nuestro trabajo de investigación, comprobamos que por su

frecuencia fundamentalmente fueron tres, a saber: Microftalmia (mayoritariamente unilateral, sin predominio de lado), Torsión Truncal y Síndrome de Regresión Caudal.

De forma inequívoca comprobamos como el mayor número de malformaciones ocurridas en los embriones experimentales supervivientes sucedió en los estadíos 10 y 14 de H.H. con un total de 34 y 33 malformaciones obtenidas respectivamente. Con respecto a la dosis, en ambos estadíos hubo una clara dosis-dependencia de forma que en la dosis de 5 mcl. se produjeron 5 malformaciones en cada uno de estos estadíos mientras que al aumentar la dosis a 20 mcl. se produjeron 11 malformaciones en cada uno de ellos.

El número de malformaciones obtenidas en los estadíos 18 y 22 de H.H. fué significativamente inferior con un total de 20 y 16 malformaciones respectivamente. El aumento de la dosis provocó un aumento de las malformaciones en el estadío 18, pasando de 3 a la dosis de 5 mcl. a 7 obtenidas con una dosis de 20 mcl. En el estadío 22 no hubo aumento significativo del número de malformaciones al aumentar la dosis.

IV.- No existió relación entre el tipo de malformación y el estadío de desarrollo o la dosis administrada, siendo la Microftalmia unilateral, sin predominio de lado, la anomalía más frecuentemente por nosotros encontrada en todos los estadíos y para todas las dosis.

DISCUSSION

Al analizar los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación la primera cuestión que se nos planteó fué la de si las anomalías por nosotros observadas en los distintos estadíos del desarrollo de los embriones tratados con **interferón-alfa-2b** se debían a una acción teratógena de esta sustancia o por el contrario eran producidas simplemente por las maniobras de la inyección y manipulación del huevo durante su incubación.

Así haciendo una revisión amplia acerca de la teratogénesis experimental en el embrión de pollo, comprobamos como ya en 1939 HOLMDAKL, advertía que las alteraciones del extremo caudal en el embrión de pollo podían ser espontáneas dado el particular desarrollo de esta zona.

En 1950 ANCEL describió distintas malformaciones en el embrión de pollo, a saber, urenteria con y sin hidronefrosis, o duplicaciones del tubo neural, provocadas por la apertura de la cáscara del huevo y el depósito de una gota de agua destilada sobre el embrión, así obtuvo malformaciones hasta en un 18,4% de los embriones por él estudiados.

Es claro pues, que para establecer una relación causa-efecto entre el agente teratógeno, en nuestro caso, el **interferón-alfa-2b**, y las

malformaciones de los embriones tratados es necesaria la producción de un porcentaje significativo de anomalías que sea ostensiblemente superior al que de forma espontánea, y tras la aplicación de las técnicas de manipulación propias del laboratorio, por nosotros empleadas, se produzcan.

Como reflejamos en el capítulo de introducción, no hemos encontrado artículos o publicaciones de investigadores interesados en el efecto que la sustancia objeto de nuestro estudio, el interferon-alfa-2b, ejerce en el desarrollo del embrión de ave, por ello carecemos de datos con los que cotejar los resultados obtenidos.

De manera general dos tendencias engloban el efecto de las sustancias citostáticas en el desarrollo embrionario, para unos como KELLER y cols., 1.983, producirían embriotoxicidad al considerar que "sólo condicionan muerte, ya que alteran en su práctica totalidad los mecanismos vitales", mientras que otros, KOPF-MAIER y cols., 1.985, interpretan que su acción altera iniciales mecanismos morfogénicos que condicionan e incluso destruyen el patrón de desarrollo, aunque no el vital, esto es, son teratógenos.

En nuestro trabajo el interferon-alfa-2b no ha mostrado ser un agente con efecto de letalidad embrionaria, ya que no ha producido la muerte de un número significativo de embriones, y si teratogenicidad, puesto que ha sido muy frecuente y casi general encontrar un tamaño muy reducido en los embriones supervivientes, esto es Microsomias, además de otras malformaciones a nivel ocular y truncal.

Además coincidiendo con JONHSON, 1984, el cociente entre toxicidad en el animal adulto y la toxicidad del desarrollo (A/D) resulta ser mayor que la unidad, lo que significa que el embrión se daña a unos niveles inferiores a los que resultan tóxicos para el adulto, nosotros consideramos poder confirmar este extremo, dado que el porcentaje de embriones malformados ha disminuido progresivamente para las mismas dosis al aumentar el estadio de aplicación.

Se puede comprobar que dentro de un mismo grupo de embriones, igual dosis, igual estadio, y en las mismas condiciones de incubación, ha sido muy frecuente la producción de distintos tipos de efectos teratógenos, así prácticamente todos los grupos de embriones tratados con **interferón-alfa-2b** tenían; a) embriones vivos aparentemente normales, si bien con una sensible disminución de su tamaño (volumen y peso), b) un mínimo

porcentaje de embriones muertos, a veces en distinto grado de degeneración, y c) embriones con diferentes tipos de malformaciones.

El porqué de esta heterogeneidad de efectos podría explicarse en función de la fase-específica en que el **interferón-alfa-2b** actuaría, esto es, su acción teratógena dependería del número de células embrionarias que entran en una fase sensible a su acción en el momento del desarrollo en que se inyecta el producto.

Estamos de acuerdo con TUCHMANN-DUPLESSIS, 1984, cuando afirma que si esto ocurre al comienzo de la ola de multiplicación de un estadio de organogénesis, es fácil imaginar cómo una pequeña diferencia temporal en el momento de la ola en los embriones de un mismo estadio puede modificar los efectos citostáticos del agente.

Asimismo, hemos de tener en cuenta que el ritmo de replicación del DNA no es constante en las diferentes etapas del desarrollo; así, según NRUBERT y cols., 1.980, el ritmo de réplica del DNA en el embrión aumenta mil veces sobre el mecanismo genético durante los dos o tres primeros días del comienzo de la organogénesis, para mantenerse hasta el estadio de diferenciación organogénica y decrecer únicamente a partir

de la fase de crecimiento. En nuestra investigación hemos comprobado cómo el interferon-alfa-2b ha provocado la mayor tasa de embriotoxicidad en los estadíos 10 y 14 de H.H., para disminuir en los estadíos 18 y 22 de H.H.

Igualmente, se comprueba tras el estudio del porcentaje de embriones malformados, que en el estadío 10 y 14 de H.H., se presentaron anomalías en el 42,5% y 41,2% de los embriones tratados respectivamente, disminuyendo de forma significativa en los estadíos 18 y 22 de H.H., donde el porcentaje de anomalías total fue del 25% y 20% respectivamente.

No obstante, el análisis global del efecto del interferon-alfa-2b en el embrión de ave, no se puede considerar tan puntual en el tiempo ni tan específico de la sustancia, habida cuenta de que las malformaciones observadas se localizan y son dependientes a estructuras con diferente patrón organogénico: Inflexión del tronco o Torsión Truncal, Síndrome de Regresión Caudal en su forma más leve como fué la ausencia de cola, o más intensa como fué la agenesia a partir de la región truncal media, Microftalmia unilateral y bilateral, y menos frecuentemente Anoftalmia.

Uno de los mecanismos causales de la acción teratogénica del interferon-alfa-2b, puede ser el bloqueo del metabolismo protéico y síntesis del RNA, lo que alteraría o modificaría el patrón de aquellas áreas morfogénicas con un mayor índice de crecimiento y diferenciación, presentando en este sentido una aparente selectividad al "critical time" organogénico.

En definitiva, hemos de estar de acuerdo con autores como UNDERWOOD y cols., 1.970 o TUCHMANN-DUPLESSIS, 1.984, cuando afirman que cualquiera que sea el mecanismo general que produce el efecto nocivo sobre el producto de la concepción, la acción teratogénica resulta en un deterioro de los procesos normales de desarrollo y la respuesta final depende principalmente de la susceptibilidad del animal, que es muy variable. Algunas especies son muy resistentes a un factor y sensibles a otro, igual ocurre con las razas de la misma especie, incluso dentro de una misma camada se producen estas diferencias, y así unos embriones son normales, otros están muertos y otros presentan malformaciones. Esto puede ser explicado, al menos parcialmente, sobre la base de diferencias genéticas y según el momento en que el factor actúa mediante un particular tipo de interacción.

Las malformaciones por nosotros observadas podemos considerarlas anormogénesis por defecto, las cuales vienen a ser catalogadas clásicamente como dependientes de dos tipos de mecanismos a saber, la detención en el crecimiento y la destrucción de estructuras ya formadas.

El exacto conocimiento y dependencia de una u otra posibilidad en un número determinado de casos ofrece gran dificultad, no obstante, en la mayoría de las malformaciones la hipótesis señalada como detención del crecimiento, parece ser que, para determinadas sustancias, tiene una mayor validez, lo que erróneamente podría considerarla como causa mediata e incluso directa de malformaciones.

Sin embargo, tal criterio, como indica BELON, J., 1.990, no es cierto y no puede ser aceptado plenamente ya que el proceso de "afectación única y primaria" condiciona necesariamente bloqueos en los mecanismos de diferenciación, crecimiento e interacciones morfológicas, a la vez que alteraciones, siempre condicionantes, en el metabolismo tisular y enzimático de estructuras celulares en fases de determinación.

Por tanto, esta primera hipótesis, independientemente del mecanis-

mo íntimo de su producción, coincide plenamente con la alteración del desarrollo que mayor incidencia ha tenido, con diferencia, en los embriones por nosotros tratados con interferon-alfa-2b, y nos referimos a la aparición prácticamente generalizada de Microsomias, es decir, la detención global del desarrollo del embrión, en ocasiones, concretamente en los estadios 10 y 14 de H.H., asociada a otras malformaciones, y en otros casos, como sucede en los estadios 18 y 22 de H.H., como alteración en un gran porcentaje de forma exclusiva.

Otros investigadores obtuvieron Microsomias al estudiar el efecto de las drogas citostáticas en el desarrollo embrionario, RUANO GIL, 1.964, en sus trabajos con la Talidomida en embrión de pollo, obtiene un tipo de malformación general y no específica, que es la Microsomnia y que aparecía indistintamente tanto en embriones intervenidos en estadios precoces como en embriones inyectados más tardíos. Cree, por lo tanto, que el agente teratógeno puede actuar selectivamente en cierta región inhibiendo la inducción del desarrollo de ciertos órganos según el estadio y también, de forma general, inhibiendo el desarrollo global del embrión y produciendo como consecuencia un retraso del crecimiento.

ROSTRENCHS y DOMENECH RATTO, 1.975, en su trabajo con Genoxal en el embrión de pollo, obtienen gran número de Microsomias y torsión patológica del tronco con la mencionada droga, dado que la Ciclofosfamida (Genoxal) dentro del grupo de las sustancias citostáticas, actúa como un agente alquilante, consideraron este efecto como el resultado del bloqueo generalizado de las cadenas de DNA, con lo cual produciría alteraciones nucleares y cromosómicas, provocando la desnaturalización y precipitación del DNA.

KONHG SUN, C., 1.976, en su estudio de Tesis Doctoral del efecto de la Daunomicina sobre el embrión de pollo, obtuvo en 8 casos una detención global del crecimiento del embrión (microsomía), dos inyectados en el estadio 5 de H.H., 4 en el estadio 10 de H.H. y otros 2 en el estadio 12 de H.H., explicando su aparición como el resultado de la unión de la Daunomicina a las cadenas de DNA, con la consecuente inhibición de la síntesis de RNA.

Hemos de hacer constar que en ninguno de estos trabajos se realizó la medición de volumen y peso sistemática de los embriones estudiados, o al menos no se refleja en las publicaciones. En nuestro trabajo de investigación, sistemáticamente, como se muestra en el capítulo de

resultados, hemos medido, pesado, y obtenido el volumen de todos los especímenes supervivientes, y así hemos podido comprobar la disminución del peso y del volumen de los embriones tratados con **interferón-alfa-2b** con respecto a los embriones testigo.

El estudio de las tablas de porcentaje de volumen y peso de los embriones tratados con respecto a los testigos, nos demuestra esta pérdida por estadíos y dosis.

En el estudio y análisis de la malformación que hemos dado en denominar *Microsomia*, entendiéndolo por tal la disminución del peso y volumen del embrión con respecto al testigo sometido a las mismas condiciones, técnicas de laboratorio y tiempo de incubación, varios hechos nos llaman poderosamente la atención:

1) En el estadío 10 de H.H. la *microsomía* resulta ser altamente dosis-dependiente, obsérvese que con la dosis de 5 mcl. el volumen medio es del 75% respecto de los testigos y el peso del 80% , mientras que para la dosis de 20 mcl. el porcentaje desciende vertiginosamente y se sitúa en el 35% para el volumen y el 32% para el peso (ambos porcentajes respecto de los testigos).

2) En el estadio 14 de H.H. existe una significativa dosis-dependencia, comprobándose una disminución del volumen y peso al aumentar la dosis: en la dosis de 5 mcl. el peso fue del 66% respecto de los testigos y el volumen del 70%, mientras que en la dosis mayor de 20 mcl. el peso fue del 34% y el volumen del 33% respecto de los testigos.

Si comparamos estos resultados de peso y volumen con los obtenidos para las mismas dosis en el estadio 10 de H.H., podremos observar como en todas las dosis (5,10,15 y 20 mcl.) la disminución del peso y volumen de los embriones tratados fué mayor en el estadio 14 de H.H. que en el estadio 10 de H.H., lo que nos sugiere que la Microsomia, como malformación, fué más intensa en el estadio 14 de H.H. del desarrollo que en ningún otro estadio por nosotros estudiado, lo que sugiere que durante este estadio el embrión es más susceptible a la acción del **interferón-alfa-2b**, por lo que el estadio 14 de H.H. sería el "critical time" para esta sustancia.

3) En los estadios 18 y 22 de H.H. la disminución del porcentaje de volumen y peso con respecto a los testigos, al aumentar la dosis no fué tan intensa, indicando una menor dosis-dependencia en este estadio para el **interferón-alfa-2b**.

Así, en el estadio 18 de H.H. para la dosis de 5 mcl. el peso fue del 77% respecto del peso de los testigos y el volumen del 75% igualmente, mientras que para la dosis de 20 mcl. el peso y el volumen fueron del 58% y 50% respectivamente. En el estadio 22 de H.H. para la dosis de 5 mcl. el peso y el volumen fueron del 77% y 75% respecto de los testigos, mientras que para la dosis de 20 mcl. fue del 54% y 59% respectivamente para el peso y el volumen.

Para nosotros la explicación a estos hechos no tiene una respuesta fácil, no obstante, hemos de recordar que la acción del **interferón-alfa-2b** radica en la inhibición de la síntesis protéica celular a través de diversos mecanismos expuestos en la introducción, por lo que creemos que la alteración en la relación estadio/dosis y efecto, solo podría deberse a la diferente susceptibilidad del embrión a la acción de este agente, que como hemos demostrado es máxima durante el estadio 14 de H.H., estadio en el que se están iniciando importantes estructuras (existen 22 somitos, la vesícula óptica primaria comienza a invaginarse, la placoda óptica está formada, la bolsa de Rathke puede identificarse, se distinguen los arcos viscerales 1 y 2, el asa ventricular del corazón es ventral al canal atrioventricular, la curvatura cervical es amplia y se produce la rotación del tronco apareciendo una suave curvatura en el mismo).

Otra hipótesis que creemos buena para explicar estos acontecimientos del desarrollo del embrión sería la que postula la rotura por parte del agente utilizado, de una compleja cadena de sistemas protéico-enzimáticos que mediante un continuo proceso de aposición y regeneración de las estructuras morfogénicas lesionadas o dañadas, sustituyen éstas por otras nuevas sin que se produjese una discontinuidad. La alteración por parte del **interferón-alfa-2b** de estos mecanismos de síntesis o regeneración de estructuras desvitalizadas, se traduciría en una multiplicación del efecto lesivo provocado en el embrión y por tanto en una evidente detención del crecimiento del embrión, tal y como hemos observado en nuestro trabajo de investigación.

Seguidamente procederemos a considerar las diversas malformaciones más frecuentes por nosotros obtenidas, de forma individualizada, a saber, la Microftalmia uni o bilateral, la Torsión Truncal y por último el Síndrome de Regresión Caudal.

La Microftalmia unilateral o bilateral y la Anoftalmia unilateral o bilateral son malformaciones que clásicamente se han descrito como integrantes de un complejo de malformaciones del polo cefálico del embrión de pollo, siendo múltiples los autores que las describen,

habiéndolas provocado con diferentes agentes teratógenos. Así MURILLO, 1970, obtuvo intensas Microftalmias bilaterales en embriones de pollo a los cuales había extirpado la mitad de la capa calcárea del huevo antes de la incubación (produjo anomalías del sistema nervioso, de la médula espinal y de los órganos de los sentidos). Asimismo se produjeron Microftalmias mediante anoxia en los trabajos publicados por ORTS LLORCA, o mediante la inyección de sustancias alquilantes como las producidas por el Genoxal (Ciclofosfamida) según publicaron BLATNER y cols. en 1960, y ROS y DOMENECH en 1975, las provocadas con el Busulfán según demostró BOLLAG en 1953, o con el Clorambucil, MURPHY, 1960. El mecanismo patogénico propuesto en todos ellos es el mismo, a saber, detención de la invaginación de la vesícula óptica, formación defectuosa de la cúpula óptica, y al no establecer contacto la retina con el tapetum, se provocaría una detención de la diferenciación y crecimiento retiniano.

COULOMBRE, 1955 y 1956, consiguió producir experimentalmente Microftalmias en el embrión de pollo mediante la introducción de un tubo hueco muy fino en el ojo de dicho embrión durante los días 5 y 6 del desarrollo; sin embargo, comprobó que la Microftalmia no ocurría si sustituía el tubo hueco por un tubo sólido; esto permitió concluir al

autor que la salida de líquido del humor vítreo a través del tubo hueco provocaba una disminución de la presión interna ocular, evitando la expansión y el crecimiento del ojo. Estos hallazgos permitieron a COULOMBRE emitir la hipótesis de que la Microftalmia espontánea asociado con Coloboma podría deberse a la pérdida de líquido del humor vítreo a través del Coloboma.

La Microftalmia ha sido también descrita como una de las malformaciones producida por los fármacos citostáticos tales como los derivados de la Vinca, el Cisplatino, BELON, 1991, y el Mitoxantrone, DUEÑAS, 1992; en estas experiencias la Microftalmia no estuvo asociada con Coloboma, sino que los cambios degenerativos de la capa interna del epitelio ciliar aparecieron en una fase muy temprana, al segundo o tercer día de administrarse la droga, lo que coincidió con el momento en que se detectó una disminución del crecimiento ocular. De acuerdo con BELON, 1990, estos hallazgos sugerirían que la Microftalmia era provocada por una reducción en el ritmo de secreción de líquido por el epitelio ciliar y no por el trasvase o escape de dicho líquido del vítreo tal como postulaba COULOMBRE.

De acuerdo con BELON, 1991, la formación óptica es un complejo

de estructuras tisulares de origen y material diferente, en parte derivada del sistema nervioso como evaginación específica de la pared diencefálica, otra parte derivada de la placoda ectodérmica y el resto procedería del ectomesénquima cefálico, por tanto el posible factor causal del proceso inductor anómalo de esta malformación, es la alteración del mesodermo precordial, formación celular que rige el proceso morfogénico del sistema nervioso, la notocorda, y el proceso ocular. Así pues la Microftalmia o Anoftalmias provocadas mediante este mecanismo no aparecerían aisladas e independientes, sino incluidas dentro de un complejo malformativo del sistema nervioso del embrión, BELON, 1991.

En nuestro trabajo de investigación hemos obtenido Microftalmias unilaterales y bilaterales en casi todos los estadíos y dosis de **interferón-alfa-2b** por nosotros utilizados, no acompañándose dichas malformaciones ni de Coloboma ni de otras anomalias del sistema nervioso central, ni macroscópicas ni microscópicas, por lo que creemos que el mecanismo de su producción o bien puede ser distinto al de una alteración del mesodermo precordial o bien afectar a éste levemente de forma que no se afecte la capacidad intrínseca que tiene para regir el proceso morfogénico del sistema nervioso y la notocorda y sí aquella parte que

rige el proceso morfogénético ocular.

Como ya se expuso en la introducción, el **interferón-alfa-2b** provoca sus efectos mediante una inhibición directa de la célula en división reduciendo la síntesis de RNA y otras proteínas esenciales para la síntesis del DNA con lo que la célula queda en fase G0 y se enlentece el ritmo del ciclo celular. Este efecto se inicia al unirse el **interferón-alfa-2b** a los receptores de membrana celular, así EVINGER y cols., 1981, y TROTTA, 1985, demostraron este efecto celular tanto "in vivo" como "in vitro", y podría ser el mecanismo productor de la Microftalmia bien al actuar sobre las células del mesodermo precordial con lo que se inhibiría o retrasaría el proceso de la morfogénesis ocular regido por aquél, o bien el **interferón-alfa-2b** actuando directamente sobre las células del epitelio ciliar alteraría el sistema enzimático de la anhidrasa carbónica, esencial para la secreción de líquido por dicho epitelio.

ROGERS y HURLEY demostraron que la inducción de una deficiencia de zinc en los fetos de ratas provocaba Microftalmia al alterar la enzima anhidrasa carbónica del epitelio ciliar, la cual se compone de un núcleo protéico y zinc, y la falta de esta enzima impediría la secreción de agua e iones por el epitelio ciliar, causa última de una disminución de

la presión intraocular y ausencia de expansión del ojo.

En nuestra experiencia, y dada la ausencia de otras malformaciones del polo cefálico que acompañen a las Microftalmias por nosotros obtenidas, nos inclinamos por la teoría de que el **interferón-alfa-2b** actúe localmente en la vesícula óptica en desarrollo, uniéndose a los receptores de membrana de las células del epitelio ciliar provocando una inmediata y directa inhibición de la síntesis de RNA y de proteínas esenciales para el desarrollo celular, esto es, provocaría, además de un enlentecimiento de la división celular y degeneración del epitelio ciliar, una alteración de los sistemas enzimáticos proteínicos de dicho epitelio, y posiblemente entre ellos, la enzima anhidrasa carbónica, de lo que resultaría una disminución de la secreción de líquido intraocular, factor determinante principal de la presión intraocular, la cual al descender, evitaría la expansión y crecimiento que normalmente produce en el ojo.

Muy importante sería también el aumento de la red vascular, que produce el **interferón-alfa-2b**, en el lado de la Microftalmia, lo que alteraría el equilibrio de Flujo/Filtración que normalmente ocurre en el esbozo ocular, lo que se sumaría al efecto de disminuir la presión intraocular, y cuyo resultado último sería una detención del crecimiento

ocular.

Mediante esta hipótesis del mecanismo de acción del interferon-alfa-2b a nivel ocular, sólo en parte podríamos estar de acuerdo con los hallazgos de BELON, 1991, que " parecen sugerir que la Microftalmia resultó de una reducción en el ritmo de secreción de líquidos por el epitelio ciliar y no por el trasvase o escape de líquido del vítreo ".

A nivel del tronco las malformaciones por nosotros observadas han consistido fundamentalmente en la inflexión mas o menos intensa del tronco, el cual presentaba torsiones respecto a su eje longitudinal y transversal, anomalía que de forma genérica hemos denominado Torsión Truncal, así como el Síndrome de Regresión Caudal tanto en su forma más leve consistente en la agenesia de cola, o más intensa en la que existía una ausencia de las estructuras del polo caudal del embrión; por último y más raramente hemos observado a nivel truncal una falta del cierre de las paredes del mismo produciéndose una Celosomia en el estadio 22 de H.H. a la dosis de 20 mcl., y un Exocardias en el estadio 14 de H.H. a la dosis, igualmente más alta, de **interferón-alfa-2b**.

ROS y DOMENECH, 1975, publicaron sus resultados tras la administración de Ciclofosfamida a 132 embriones de pollo, obteniendo

en 52 de ellos (un 39,4%) perturbaciones de tipo teratógeno de los cuales 29 (un 55,7% del total de embriones malformados) presentaron Torsión Truncal, 5 embriones presentaron un Tronco Atrófico, 12 (23%) presentaron Celosomia y 16 (30%) Exocardias. Estos autores atribuyeron estas malformaciones a la Ciclofosfamida, la cual, como agente alquilante produciría alteraciones nucleares y cromosómicas que provocarían la desnaturalización del DNA alterando la normal evolución de los procesos morfogenéticos, conduciendo al establecimiento de estas anomalías. ROS y DOMENECH, 1975, afirmaron que "nosotros observamos, en la mayoría de nuestros embriones, Exocardias y Torsiones, datos que no han sido observados o destacados por los autores mencionados", estos autores no eran sino aquéllos que previamente habían investigado el efecto teratógeno de las sustancias alquilantes en el embrión de pollo como BLATTNER, WILLIAMSON, SIMONSEN y ROBERTSON en 1960, MURPHY en 1960 y TUCHMANN-DUPLESIS y MERCIER-PAROT en 1967.

Más recientemente DUEÑAS, 1992, en su Tesis Doctoral demostró como el Mitoxantrone, un agente citostático, inyectado en estadíos tempranos del desarrollo esto es, en los estadíos 10 y 14 de H.H. producía un alto porcentaje de Torsiones de Tronco de dichos embriones,

no guardando su aparición una relación significativa con la dosis de Mitoxantrone administrada. Según afirma DUEÑAS, 1992, siendo el mecanismo íntimo de la normodiferenciación notocordal un aumento selectivo del DNA, resulta evidente que el Mitoxantrone ha alterado o modificado el gradiente morfogénico de la notocorda provocando la existencia de inflexiones o irregularidades, que a su vez, inciden en el patrón y disposición del escleromesénquima a partir del que se origina y da lugar a las formaciones vertebrales.

Hace tiempo que los embriólogos se preguntaron por la causas que condicionaban la normal morfogénesis de la porción tronco-caudal del tubo neural, habiendo demostrado la Embriología Experimental que éstas son de carácter extrínseco. Es decir, que la normal conformación del tubo neural se debe a la influencia de las estructuras vecinas: notocorda y somitos principalmente. En la actualidad es admitido por todos los autores que los somitos, situados a ambos lados del tubo neural estimulan el crecimiento de sus paredes, en tanto que, la notocorda, situada ventralmente con relación al tubo neural inhibe el crecimiento de las mismas, aceptándose, por tanto, que del equilibrio entre la acción negativa notocordal y la acción positiva de los somitos sobre el crecimiento de las paredes del primitivo tubo neural, depende la típica estructuración que dará lugar a la médula espinal.

Así pues, agentes teratógenos que modifiquen el equilibrio entre fuerzas inductoras y fuerzas inhibitoras del crecimiento de la notocorda, los somitos y el tubo neural, darán lugar a malformaciones más o menos aparentes, consistentes en una alteración de la íntima estructuración citoarquitectónica del tronco del embrión.

La *Torsión Truncal* por nosotros observada con **interferón-alfa-2b** podría ser resultado de una alteración de los normales mecanismos de regulación de crecimiento a nivel truncal, bien sea lesionando la normodiferenciación de la notocorda, o afectando por una inhibición directa o enlentecimiento de la división celular (detención de la síntesis de proteínas, pasando a la fase G0 del ciclo celular) el mesénquima de los somitos.

Por último, y con respecto al Síndrome de Regresión Caudal observado en todos los estadios del desarrollo por nosotros estudiados tras la administración de **interferón-alfa-2b**, sin que existiese una relación con la dosis administrada, estamos totalmente de acuerdo con JIMENEZ COLLADO, J., 1969, cuando incluye a este tipo de malformación en el grupo cuyo mecanismo teratogénico es el de la destrucción de estructuras ya formadas. Así pues, JIMENEZ COLLADO, J, 1969, defiende la importancia del incremento anormal y atípico de procesos

destructivos o degenerativos de órganos normalmente desarrollados, ya que observa un aumento en el proceso de muerte celular que a su vez condiciona y da origen a desestructuración de áreas normal y previamente establecidas.

Concluimos en que sea cual fuere el mecanismo teratogénico productor de este tipo de malformación del polo caudal del embrión, es obvio que el **interferón-alfa-2b** interviene inhibiendo el desarrollo de la notocorda, aunque no podemos atribuirle exclusivamente a esta sustancia todos los efectos sin antes descartar la intervención de otros agentes secundarios como el nutritivo, oxigenación, manipulación, etc., factores todos que pueden agravar lesiones primitivas más o menos leves producidas por el fármaco y a continuación provocar la degeneración de aquellas estructuras ya formadas en la región caudal del embrión de ave.

Por lo que respecta al mecanismo íntimo inductor de las anomalías, creemos con otros autores, que el camino aberrante seguido por los diversos órganos y estructuras en desarrollo puede deberse a cambios bioquímicos en los diversos principios inmediatos o sistemas enzimáticos. Desviaciones en el metabolismo protéico han sido descritas por múltiples autores que han hallado cambios cuantitativos y cualitativos en

los espectros protéicos electroforéticos, así PAOLETTI y cols., 1962, encontró en el plasma de ratas tratadas con Azul Tripán una nueva fracción alfa-globulina y además cambios cuantitativos en los modelos protéicos.

BECK, LLOYD y GRIFFITHS, 1967, defendieron esta teoría teratogénica apoyada en una inhibición de los enzimas lisosómicos intracelulares por el Azul Tripan lo cual alteraría el normal desarrollo celular eutrófico.

BARBOSA AYUCAR, 1969, estudió en embriones de pollo comprendidos entre los estadíos 8 al 14 de H.H. la influencia de la síntesis protéica sobre la morfogénesis, mediante la administración a estos embriones de Puromicina, un potente inhibidor de la síntesis protéica cuyo mecanismo de acción es perfectamente conocido desde los estudios realizados por YARMOLINSKY y cols., 1959, y MORRIS y cols., 1961.

BARBOSA, 1969, comprobó la existencia un gradiente de sensibilidad de los diferentes esbozos embrionarios a la inhibición de la síntesis protéica provocada por la Puromicina, que era, en orden decreciente, la siguiente: vesículas encefálicas, somitos, esbozo medular y notocorda.

Dentro de los estadios de desarrollo en que se realiza la organogénesis, la acción directa sobre los órganos y estructuras en crecimiento sería fatal para su futura realización, ya que las alteraciones afectan a los materiales protéicos que se están movilizandoo para la construcción del armazón de los diversos órganos. Las células embrionarias sintetizan proteínas específicas y estructurales, necesarias para el mantenimiento de la integridad de los esbozos formados, así como para la diferenciación de los mismos.

La acción directa del teratógeno utilizado en nuestro trabajo de investigación, el **interferón-alfa-2b**, sobre los principios protéicos estructurales o específicos como los sistemas enzimáticos, traería como consecuencia inmediata la conformación anormal de un determinado órgano o estructura en desarrollo.

El presente estudio de investigación ha consistido en un análisis morfológico de los tipos de malformaciones producidas por el **interferón-alfa-2b**, así como un esfuerzo por intentar comprender los mecanismos íntimos que pueden estar implicados en los procesos que conducen a tales anomalías, dejando este trabajo como base de partida para ulteriores estudios bioquímicos y ultraestructurales que arrojen luz

sobre sucesos intracelulares que inicialmente ocurren y de los que nosotros hemos tenido constancia por los resultados que morfológicamente produjeron en el embrión de ave.

CONCLUSIONES

1º) El INTERFERON-ALFA-2B en nuestro estudio de investigación, base de Tesis Doctoral en embriones de ave, se ha mostrado como agente teratógeno capaz de producir embriotoxicidad y malformaciones, con especial incidencia cuando es inyectado en los estadíos tempranos 10 y 14 de H.H.

Por el contrario, no produjo aumento de la mortalidad en los embriones tratados.

2º) El INTERFERON-ALFA-2B ha presentado la siguiente teratogenicidad según las dosis:

* A dosis de 5 mcl.(50 U.I.): produjo Microsomia en el 100% de los embriones tratados, malformaciones del polo cefálico - Microftalmia -, Torsión Truncal y Síndrome de Regresión Caudal en el 31.2% en los estadíos 10 y 14 de H.H., mientras que en los estadíos 18 y 22 de H.H. sólo se produjeron 3 en cada uno de ellos el 17.6% de éstas.

* A dosis de 10 mcl. (100 U.I.): causó Microsomia en el 100% de los embriones tratados, y 50% de embriones malformados,-polo cefálico y derivados mesodérmicos-, en los estadíos 10 y 14 de H.H., mientras que en el estadío 18 H.H. se produjo el 23.5%, y en el estadío 22 H.H. el 17.6% de éstas.

* A dosis de 15 mcl.(150 U.I.): produjo Microsomia en el 100% de los embriones tratados, y 71.4% de embriones malformados en el estadío 10 H.H., el 60% en el estadío 14 de H.H., en el estadío 18 de H.H. el 37.5%, y en el estadío 22 de

H.H. el 31.2%, todas ellas caracterizados por alteraciones del esbozo ocular, Síndrome de Regresión Caudal y atipias vértebro-raquídeas: bloques vertebrales e hipermorfosis notocordal.

* A dosis de 20 mcl.(200 U.I.): Observamos Microsomia en el 100% de los embriones tratados. Los inyectados en el estadio 10 de H.H. presentaban el 78.5% de malformaciones; similar porcentaje, 73.3% se encontró en los tratados en el estadio 14 de H.H.; mientras que aquéllos que lo fueron en los estadios 18 y 22 de H.H. presentaron el 46.6% y 31.2% respectivamente.

3º) Del estudio estadístico de los resultados por nosotros obtenidos, podemos considerar que la teratogenicidad del INTERFERON-ALFA-2B en el embrión de ave no es típicamente dosis-dependiente, ya que diferentes dosis condicionan y producen similar tipo de malformación. Por tanto, consideramos que el interferón-alfa-2b actúa selectiva y específicamente sobre mecanismos diferenciadores típicos y selectivos en los estadios 10 a 18 de H.H., fases morfogenéticas en las que los procesos diferenciadores e inductores de la formación óptica presentan una mayor actividad. Conjuntamente, y al observar con un alto índice de frecuencia malformaciones del sistema notocorda-vertebral, que en estos estadios condicionan la regulación del complejo axial, consideramos que la capacidad e índice teratogénico del interferón-alfa-2b puede estar en directa dependencia del estadio y fase del desarrollo en el que se inyectó, esto es entraria en el grupo de sustancias órgano o crono-dependientes.

BIBLIOGRAFIA

ADAMNS, A.E. (1949).- The effects on antithyroid drugs on chick embryos. *Anat. Rec.*, 104: 421-444.

ANCEL, P.(1950).- La chimiotheratogenese chez les vertebrés. vol. 1, Doin et Cie. Paris.

ANCEL, P. (1955).- Malformations déterminés par des injections de substances chimiques localisées a la tête d'embryons de poulet. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 3: 335.

ANGEL, O. y LALLEMAND, S. (1942).- Sur l'arret du développement du bourgeon caudal obtenu experimentalement chez l'embryon de poulet. *Arch. Phys. Biol.*,15(Supl): 43

ARACENA, M. (1986).- Embriopatia por agentes antineoplásicos. *Rev. Med. Chile*, 114:864-866.

BAER, M.R. (1991).- Normal full-term pregnancy in a patient with chronic myelogenous leukemia treated with alpha-interferon. *Am. J. Hematol.*, 37 (1) : 66.

BARBER, A.N. y GEER, J.C. (1964).- Studies on the teratogenic properties of trypan blue and its components in mice. *J.Embryol. Exp. Morph.*, 12: 1-14.

BARBOSA AYUCAR, E. (1969).- Acción de la puromicina sobre el desarrollo embriológico del embrión de pollo. *Anal. Desarrol.*, vol. 15 (35): 21-26.

BECK, F. y LLOYD, J.B. (1966).- The teratogenic effects of azo dyes.

In advances in teratology, Acad. Press London and New York, 1: 131-193

BELON CARRION, J. (1991).- Analisis experimental de los efectos teratógenos del Cis-platino en vertebrados. Tesis Doctoral. Madrid.

BENITO-ARRANZ, S.; SIMON, C. y GARCIA, F. (1961).- Los núcleos marginales en le embrión de pollo. Anal. Desarrol., vol. 9 (17): 17-32

BISHOP, J.M. (1.985).- Viruses, genes, and cancer. II. Retroviruses and cancer genes. Cancer, 55: 2.329-2.333.

BLATTNER, R.J.; WILLIAMSON, A.P.; SIMONSEN, L. et al.(1958).- Teratogenic changes in early chick embryos following administration of antitumor agent. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97: 560.

BOLLAG, W. (1953).- Esperientia, 9:268. Citado por Tuchmann-Duplessis, 1968.

BORDEN, E.C. y BALL, L.A. (1.981).- Interferons: Biochemical, cell growth inhibitory, and immunological effects. Prog. Hematol., 12: 299-339.

BRITT, L.G. y HERMANN, H. (1959).- Protein accumulation in early chick embryos grown under different conditions of explantation. J. Embryol. Exp. Morphol., 7: 66.

CANTELL, K. (1.979) .- Why is interferon not in clinical use today? In

Gresser I (ed.): Interferon, New York Academic Press, vol. 1: 2-7.

CHRISTIE, G.A. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet II:249.

CLAVERT, A. (1970).- Etudes des malformations oculaires déterminées chez l`embryon de Lapin par le cyclophosphamide. Arch.Anat.Histol.Embr.,53: 209-271.

CLEMENS, M. (1.985).- Interferons and oncogenes. Nature, 313: 531-532.

CORTES-FUNES, H. ; DIAZ, M. y COSTAS, P. (1990).- Interferon: Una opción en el tratamiento de tumores sólidos. Drugs of Today, 26 (Supl.4): 1-8 .

COULOMBRE, A.J. (1955).- Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. Am. J. Anat., 96: 153-189.

COULOMBRE, A.J. (1956).- The role of intraocular pressure in the development of the chick eye.I.Control of the eye size. J. Exp. Zool., 133: 211-223.

CUEVAS, P.; SCHOWING, J. y VENTOSA, J. (1979).- Primeros resultados del efecto neuroteratógeno del pentobarbital en el embrión de pollo. Morf. Normal y Patol., vol.3: 279-282

DARESTE, M.C. (1855).- Ann. Sci. Nat. 4-Serie. pp.119.

DE CASTRO ROMERO, J.M. (1969).- Ontogenia de las proteínas

cristalinianas. Su estudio inmunológico en el embrión de pollo. *Anal. Desarrol.*, vol.15 (35): 3-20.

DUEÑAS RODRIGUEZ, B. (1992).-Estudio del efecto del Mitoxantrone en el desarrollo del embrión de ave. Tesis Doctoral. Granada.

EHMANN, B.(1963).- *Teratogenics effects of thalidomide. Lancet*, I:772.

EVINGER, M.; MAEDA, S.; PESTKA, S. (1.981).- Recombinant human leukocyte interferon produced in bacteria has antiproliferative activity. *J. Biol. Chem.* 256: 2.113-2.114 .

FAUCI, A.S.; ROSEMBERG, S.A.; SHERWIN, S.A. et al. (1.987).- Immunomodulators. *Ann.Intern.Med.*,106: 421-433.

FELISATI, D. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, II:724.

FERM, V.H. (1964).- Effects of transplacental mitotic inhibitors on the fetal hamster eye. *Anat. Rec.*, 148: 129-133.

FRASSER, R.C. (1954).- Studies on the hypoblast of the young chick embryo. *J.exp. Zool.*, 126: 349-399.

GALLERA, J. (1951).-Influence de l'atmosphère artificielement modifiée sur le developement embryonnaire du poulet. *Acta Anat.*, 11: 549.

GENIS-GALVEZ, J.M.; CASTRO ROMERO, J.M. y BATTANER, E. (1967).- Lactic deshidrogenase isozymes: Changes during lens

differentiation in the chick embryo. *Nature*, 213:5073.

GERLACH y KOCH (1884).- *Biologische Centralblatt*, II: 271.

GILLMAN, J.; GILBERT, L.; GILLMAN, T. et al. (1948).- A preliminary report on hydrocephalus spina bifida and other congenital anomalies in the rat produced by trypan blue. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 13:47-90.

GIROUD, A.; TUCHMANN-DUPLESSIS, H. y MERCIER-PAROT, I. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, II:298.

GOEDEL, D.V.; YELVERTON, E.; ULLRICH, A. et al. (1980).- Human leukocyte interferon produced by *E. Coli* is biologically active. *Nature*, 287: 411-416.

GOEDEL, D.V.; LEUNG, D.W.; DULL, T.J. et al. (1981).- The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNA. *Nature*, 290: 20-26.

GOLDSMITH, E.D.; GORDON, A.S. y CHARIPER, H.A. (1945).- An analysis of the effects of continued thiourea treatment in pregnancy on the development of the offspring in the rat. *Am. J. Obs. and Gyn.*, 49: 197-206.

GONZALO SANA, L.M. (1970).- Influencia del sistema nervioso vegetativo en el desarrollo del tracto intestinal. Estudio experimental en embriones de pollo. *Anal. Desarro.*, vol 15 (36): 187-206.

GREEN, M. y KIRKWOOD, J.M. (1985).- *Intron A Clinical Monograph*,

Schering Corporation, U.S.A.

GRESSER, I. y BOURALI, C. (1.970).- Antitumor effects of interferon preparations in mice. *J. Nat. Cancer Institute*, 45: 365-374.

HAMBURGER, V. (1934).- The effect of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 68: 449-494.

HAMBURGER, V. (1939).- The development and innervation of transplanted limb primordia of chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 80: 347-389.

HAMBURGER, V. (1959).- Motor and sensory hyperplasia following limb-bud transplantation in chick embryos. *Physiol. Zool.*, 12: 268-284.

HAMBURGER, V., y HAMILTON, H.L. (1951).- A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.

HAMILTON, H.L. (1965).- *Lillie's Development of the Chick. An Introduction to Embriology.* Holt Reinehart and Winston (eds.). New York.

HEILPORN-POLH, V.(1964).-Effects de l'actinomycine D sur la morphogénèse et le métabolisme des acides nucléiques chez l'embryon de poulet. *J. Embryol. exp. Morph.*, 12: 439-446.

HERBERMAN, R.B.; ORTALDO, J.R.; BONNARD, G.D. (1.979).- Augmentation by interpheron of human natural and antibody dependent

cell mediated cytotoxicity. *Nature*, 277: 221-223.

HICKS, H.J.; MORRIS, A.G.; BURKE, D.C. (1.981).- Partial reversion of the transformed phenotype of murine sarcoma virus-transformed cells in the presence of interferon: A possible mechanism for the anti-tumour effect of interferon. *J. Ceel Sci.*, 41: 225-236.

HOFFMAN, F.(1986).- Data on file. La Roche and Co. Limited Company. Basle, Switzerland.

HOLMDAHL, D.E. (1939).- Die formalen verhältnisse während der entwicklung der rumpfschwanzknospe beim. *Hum. Anat.Anz. Erganzmgsheft*, 88: 127-137.

HOROHOV, D.W. y SIEGEL, J.P. (1.987).- Progress and Promise of lymphokines. *Drugs*, 33: 290-295.

HOUGLUM, J.E. (1.983).- Interferon: Mechanism of action and clinical value. *Clin. Pharm.*, 2: 20-28.

HUGHES, A.M. (1944).- Cretinism in rats induced by thiouracil. *Endocrinology*, 34: 69-76.

ISAACS, A. y LINDENMANN, J. (1.957).- Virus Interference.I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.)*, 147: 258-267.

JIMENEZ COLLADO, J. (1.966).- Anomalies septales provoquées par le tripan chez des embryons de Rats. *Arch. Anat. Histol. et Embryol.*, 49: 425-440.

JIMENEZ COLLADO, J. (1969).- Extirpation of neural fold in avian embryos. Arch.Anat.Microscop.Exp.Vol.32:84-98.

JIMENEZ COLLADO, J. y PUCHADES ORTS, A. (1970).- Injertos heterotópicos de mesodermo segmentado del pato (Anas) al pollo (gallus domesticus). Anal. Desarrol. , vol. 15 (36): 207-218.

JONES, G.J.; ITRI, L.M. (1.986).- Safety and tolerance of recombinant interferon alfa-2a in cancer patients. Cancer, 57: 1.709-1.715 .

JURAND, A.,(1959).- J. Embryol. exp. Morph., 7: 256. Citado por Tuchmann-Duplessis, 1968.

KALLEN, B. (1960).- Experimental neoplastic formation in embryonic chick brains.J. Embryo Exp. Morphol.,8: 20-23

KEMPER, F. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet, III:836

KINGSBURY, J.W. et al. (1955).- Effects of thiourea on the adrenal glands of chick embryos. Endocrinology, 56: 299-304.

KOHLER, H.G.; FISCHER, A.M. y DUNN, P.M. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet I:326.

KOHLER, E. (1979).- Grow kinetics of mammals embryos during organogenesis. In: Metabolics pathways in mammals embryos during organogenesis and its modifications by drugs. Frei Universitat Berlin : 17-27.

KROWN, S.E. (1987).- Interferon treatment of renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer*, 59: 647-651.

LAPORTE SALAS, J. (1964).- Fármacos y malformaciones congénitas. *Anales de Medicina*, vol. 3 (1): 71-73

LASH, J.W. (1964).- Normal embryology and teratogenesis. *Amer. J. Obst. and Gynec.*, 90: 2-7.

LEGHA, S.S. (1986).- Interferons in the treatment of malignant melanoma. *Cancer*, 57: 1675-1677.

LENZ, W. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, I:45.

LEROUX, (1950).- *Les annales d' Oto-laring.*, pp.195 (Citado por Reyes Pugnaire).

LINDER-CICCOLUNGI, S.N. (1985).- Improving the acceptability and tolerability of interferon. Therapy in cancer patients. Paper 3rd European conference on clinical oncology and cancer nursing. Stockholm. 6:16-20

MAISEL, H. (1961).- Appearance of chick lens proteins during lens development. *Anat.Record*, 138: 251.

MARTINEZ, P.; PUERTA, J.; SOBRADO, J. y JIMENEZ COLLADO, J. (1979).- Estudio de la capacidad teratógena del residuo sólido del Azul de Tripán. Resultados preliminares. *Anal. Desarrol.*, vol. 23 (55): 131-

136.

MARVIN, A., RICH, J., et al. (1962).- The effects of some purine analogs on the growth of the E.Ep.1 and Chick Embryo fibroblast cell. *Cancer Research*, 22:1-3.

McBRIDE, W.G.(1961).- Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, II: 1.358.

MESSIER, P.E.(1969).- Effects of Mercaptoethanol on the fine structure of the neural plate cells of the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 21:309.

MORALES ESPERT, A. (1969).- Estudio experimental de la patologia fetal consecutiva al tratamiento con quimioterapicos antitumorales. *Anal. Desarrol.*, vol.15 (35): 79-124.

MORRIS, V.B.; SHOREY, C.D. (1968).- An electron microscope study of types of receptor in the chick retina. *J. Comp. Neurol.*, vol. 129: 313-339.

MURILLO-FERROL, N.L. y CLIMENT PERIS, S. (1968).- Influencia de la notocorda sobre la morfogénesis del tubo neural. Analisis experimental en el embrion de pollo. *Anal. Desarrol.*, vol 14 (33): 159-168.

MURILLO FERROL, N.L. (1970).- Influencia de la extirpación parcial de la capa calcárea del huevo de las aves sobre el desarrollo del embrión. *Anal. Desarrol.*, vol.15 (36): 219-228.

NAGATA, S.; MANTEI, N.; WEISSMANN, C. (1.980).- The structure

of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-alfa. *Nature*, 287: 401-408.

NARBAITZ, R. y MARINO, I. (1988).- Experimental induction of microphthalmia in the Chick Embryo with a single dose of Cisplatin. *Teratology*, 37: 127-134.

NEEDHAM, J. (1959).- *A history of Embryology*. Cambridge University Press.

NEIDHART, J.A. (1986).- Interferon therapy for the treatment of renal cancer. *Cancer*, 57(Supl.):1696-1699.

NESON, O.E. (1953).- *Comparative Embryology of the Vertebrates*. Blakiston Company, Inc.

NOVOTNA, B. y JELINEK, r. (1986).- Comparación de los efectos mutagénicos y embriotóxicos de la ciclofosfamida en el embrión de pollo. *Environments Mutagenesis*, 8: 241-252.

NRUBERT, D.; BARRACH, H.J.; MERKER, H.J. (1980).- Drug-induced damage to the embryo or fetus. In: *Drug-induced pathology*. Grundman, E. (ed.), New York, pp.241-331.

OJEDA, J.L.; GOMEZ, P.; BARBOSA, E. y LOPEZ, F.(1968).- Incorporación de la Uridina-H³ en el cordo-mesodermo del embrión de pollo. Un estudio autorradiográfico. *Anal. Desarrol.*, vol. 14 (33): 169-176.

OJEDA, J.L.; BOSQUE, P.G. y ALONSO, A. (1968).- Anormogénesis oculares en el embrión de pollo, producidas por el pentotal sódico. Arch. Soc. Oftal. Hispamer., 28:374-382.

OJEDA, J.L.; BOSQUE, P.G. y BARBOSA, E. (1970).- Malformaciones del extremo caudal en embriones de pollo tratados con pentotal. Anal. Desarrol., vol.15 (36): 241-246.

ORTS LLORCA, F.; GENIS GALVEZ, J. y RUANO-GIL (1959).- Malformations encephaliques et microphthalmie gauche après section des vaisseaux vitelines gauches chez l'embryon de poulet. Acta Nat., 38: 1-34.

ORTS LLORCA, F. (1961).- Malformaciones congénitas. Factores determinantes más importantes de la anormogénesis. Discurso en la Academia de Cirugia.

ORTS-LLORCA, F. (1963).- Influence de l'entoblaste dans la morphogenèse et la diferenciación tardive du coeur du poulet. Acta Anat., 52: 202-214.

OLDHAM, R.K. y SMALLEY, R.V. (1983).- Immunotherapy: the old and the new. J. Biol. Response Mod., 2: 1-8.

PETERS, M.; AMBRUS, J.L.; ZHELEZNYAK, A. et al. (1986).- Effects of interferon alpha on immunoglobulin synthesis by human B cells. J. Immunol., 137: 3.153-3.157 .

PLIES, G. y KETELS-HARKER, H. (1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet, I:1.128.

POVEDA SIERRA, J.J. (1970).- Malformaciones congénitas provocadas experimentalmente por el azul tripán en el embrión de pollo. *Anal. Desarrol.*, vol.15 (36): 247-262.

PUCHADES-ORTS, A. (1968).- Diferenciación de las estructuras en los injertos de miembro (auto y homoinjertos). Analisis experimental en el embrión de pollo. *Anal. Desarrol.*, vol. 14 (33): 113-134.

QUESADA, J.R.; REUBEN, J.; MANNING, J.D. et al. (1984).- Alpha interferon for induction of remission in hairy cell leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 310: 15-18.

QUESADA, J.R.; RIOS, A.; SWANSON, D.A. et al. (1985).- Antitumor activity of recombinant derived interferon alpha in metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, 3: 1086-1092.

QUESADA, J.R.; GUTTERMAN, J.U. y HERRSH, E.M. (1986).- Treatment of hairy cell leukemia with alpha interferons. *Cancer*, 57: 1.678-1680.

RADWANSKI, E.; PERENTESIS, G.; JACOBS, S. et al. (1987).- Pharmacokinetics of interferon alfa-2b in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, 27: 432-435.

RAMS PLA, N.; AGUAS, M. y TORRES, M. (1990).- Interferones: Revisión Bibliográfica. *Farmacia Clinica*, 7 (5): 434-445.

REICHARD, P. (1959).- The biosynthesis of deoxyribonucleic acid by the chick embryo. I. Utilization of cytidine C-14.

J. Biol. Chem., 234: 1244-1248.

REYES PUGNAIRE, S. (1961).- Análisis experimental de la capacidad teratógena de la estreptomicina en el embrión de pollo. Anal. Desarrol., vol. 9 (17): 57-66

ROMANOFF, A.L. (1956).- The effect of injected thiourea on the development of some organs of the chick embryo. Endocrinology, 59: 611-619.

ROMANOFF, A.L.(1960).- The avian embryo, Structural and Functional Development. The MacMillan Company, New York.

ROS TRENCHIS, C. y DOMENECH, G. (1975).- Acción de la ciclofosfamida (genoxal) sobre el embrión de pollo. Acta Obst. y Ginec. Hispanolusitana, vol.23: 49-60.

ROSETY, M. (1979).- Comportamiento histoquímico de los carbohidratos en la retina del pollo, Gallus Domesticus, L., durante su desarrollo embriológico. Anal. Desarrol., vol.23 (55): 109-122.

ROSETY, M. (1979).- Estudio histoquímico de carbohidratos en el cristalino y cuerpo vítreo del embrión de pollo, Gallus Domesticus, L., durante su desarrollo. Anal. Desarrol., vol. 23 (55): 123-130.

RUANO GIL, D. y JIMENEZ COLLADO, J. (1964).- Acción de la Talidomida sobre los embriones de pollo cultivados "in vitro" Sesión

Científica de la Facultad de Medicina.

RUANO GIL, D. (1964).- Acción de la talidomida sobre el embrión de pollo. Anal. Desarrol., vol.12 (26): 17-32.

RUBINSTEIN, M.; RUBINSTEIN, S.; FAMILLETTI, P.C. ET AL. (1.978).- Human leukocyte interferon purified to homogeneity. Science, 202: 1.289-1.290.

RUBINSTEIN, M.; RUBINSTEIN, S.; FAMILLETTI, P.C. ET AL. (1.979).- Human leukocyte interferon: Production, purification to homogeneity and initial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76: 640-644.

RUBINSTEIN, M.; LEVY, W.P.; MOSCHERA, J.A. et al. (1.981).- Human leukocyte interferon: Isolation and characterization of several molecular forms. Arch.Biochem.Biophys., 210: 307-318.

RUBINSTEIN, M. (1.987).- Multiple interferon subtypes: The phenomenon and its relevance. J. of Interferon Research, 7: 545-551.

SAINT-HILAIRE, G., (1820).- J. Compém. Sci. Medic., VII, pp.271.

SEKELLIK, M.J. (1990).- Development of the interferon sistem.I. In Chicken cells development in ovo continues on time in vitro. In vitro cell Dev. Biol., 26 (10): 997-1003

SELLER, M.J.(1962).- Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet, I:294.

- SEN, G.C. (1984).- Biochemical pathways in interferon-action. *Pharmacol. ther.*, 24: 235-257
- SHAN, B. (1990).- Interferon selectively inhibits the expression of mitochondrial genes: a novel pathway for interferon-mediated responses. *EMBO. J.*, 9 (13): 4.307-4.314
- SIEBER, S.M. ET AL. (1978).- Efectos teratogénicos y citogenéticos de algunos agentes antitumorales derivados de vegetales, vincristina, colchicina, mantansina, Vp-16, en ratones. *Teratology*, 18: 31-48.
- SILVA, A.; BONAVIDA, B.; TARGAN, S. (1.980).- Mode of action of interpheron mediated modulation of natural killer cytotoxic activity: recruiment of pre-NK cells and enhaced kinetics oflysis. *J. Immunol.* 125: 479-484
- SMITH, (1963).- Citado por Poveda Sierra.
- SPIEGEL, R.J. (1.987).- Clinical Overview of Alpha Interferon. *Cancer*, 59: 626-630.
- STAPLES, R.E. y WILSON, J.G. (1979).- Definition of teratogenesis and teratogen. In: *Environmental toxicology branch. National Institute of environmental healths sciences. North Carolina: Research Triangle Park, Chapter 4 :25-26*
- STEPHAN, F. y SUTTER, B. (1961).- Reaction of the Chick embryo to trypan blue. *J.Embryol. Exp. Morph.*, 9:410-420
- STEWART, W.E. (1.979).- *The Interferon System. Springer-Verlag,*

New York Inc.

STEWART, W.E.; BLALOCK, J.E.; BURKE, D.C. et al. (1.980).- Interferon Nomenclature. *Nature*, 286:110-115.

TROTTA, P.P. (1.985).- Summary of pre-clinical data. in Kisner, D.L., Smyth, J.F. (eds.): *Interferon alpha-2: Pre-Clinical and Clinical evaluation*. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, pp. 14-27.

TROWN, P.W.; WILLS, R.J.; KAMM, J. (1.986).- The preclinical development of Roferon A. *Cancer*, 57: 1.648-1.656 .

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. y MERCIER-PAROT, L. (1959).- A propos de malformations produites por le bleu trypan. *Biolog. Med.*, 43: 238-251.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. y MERCIER-PAROT, L. (1960).- Actinomicin D. Ciba Foundation. Symposium on Congenital Malformations. pag.115, Churchill. London.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. y MERCIER-PAROT, L. (1966).- Reactions provoquées chez l`embryon par deux antimétabolites chimiquement voisins. *Bull. Scheitz. Akad. Med. Wiss*, 22:153.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (1968).- Dangers des médicaments aministrés a la femme enceinte. Etude Exper. Première partie, Introduction. *Bull.Fed.Soc.Gynecol.Obst.*, 20 (1 bis): 9-68.

TUREK, L.P.; BRYNE, J.C.; LOWY, D.R. et al. (1.982).- Interferon induces morphologic reversion with elimination of extrachromosomal

viral genomes in bovine papilloma-virus-transformed mouse cells. *Microbiology*, 79: 7.914 - 7.918 .

UNDERWOOD, T.; ITURRIAN, W.B.; CADWALLANDER, D.E. (1970).- Some aspects of chemical teratogenesis. *Am. J. Hospital Pharm.*, 27: 115-122.

VAN DOORENMAALEN, W.J. (1958).- Histo-serological demonstration of the localization of lens-antigens in the embryonic Chick-lens. *Acta Morph. Neerl Scand.*, 2:1-12.

WADDINGTON, C.H. y CARTER, T.C. (1953).- A note on abnormalities induced in mouse embryos by trypan blue. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1: 167-180.

WATTERSON, R.L.; GOODHEART, C.R.; LINDBERG, G. (1955).- The influence of adjacent structures upon the shape of the neural Tube and Neural Plate of Chick Embryos. *Anat. Record*, 122: 539-559.

WILSON, L. et al. (1975).- The mechanism of action of vinblastine. Binding of acetil-H-vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry*, 14: 5586

WILSON, J.G. (1973).- Mechanism of Teratogenesis. *Am. J. Anatomy* , 136 (2): 129-132.

WILT, F.H. (1965).- Regulation of the iniciacion of chick embryo hemoglobin synthesis. *J. Mol. Bio.*, 12:331.

WINSTON, J. (1953).- Problemas clinicos relativos a la neurotoxicidad de los compuestos del grupo estreptomycinico. A.M.A. Arch. Otorrinol., 58: 55-61.

WOLFF, E. (1936).- Les bases de la teratogenése experimentale des vertebrés amniotes d'apres les résultats des méthodes directes. Arch. Anat. Hist. et Embryol., 22: 1-382.

YANG, T.J.; YANG, T.S. y LIANG, H.M.(1963).- Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet, I:552.

YEW, D.Y. (1976).- The developmental histochemistry of the chicken visual cells. Acta Anat. , vol 96: 561-567.

YOUNG, A.S. (1990).- The history of interferon and its use in animal therapy. East Afr. Med. J., 67(7): 31-63.

ZARETZY, S. (1910).- Versuche uber vitale farbung des embryos. Virschovs Arch. J. Path. u Phys., 201: 24-45.

ZIRVI, K.A. (1985).- Los efectos embriotóxicos de la Doxorrubicina y de la AD-32. Teratology, 31: 247-257.

ZWILLING, G. (1945).- Production of tail abnormalities in chick embryos by transecting the body during the latter part of the second day of incubation. J. Exp. Zool., 98: 237-247.