

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

47

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL POTENCIAL TERATOGENICO DEL MISOPROSTOL EN *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GERARDO FIGUEROA TORRES



DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSE ARMANDO MUÑOZ MOYA

2003



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

DEDICATORIA

A mi Madre: Martha Torres Pérez.

Por haberme brindado la incomparable alternativa de vivir,
por ser siempre mi punto de apoyo y sabia directriz
de mis pasos a lo largo de toda mi existencia.

A mi "Sol": Claudia Avalos Trujillo.

Quien como tal ha aportado la fuerza que ha sido capaz
de impulsar mas que a mi persona, a mi corazón,
para concluir este trabajo

A mi familia:

Por constituirse siempre en mi refugio y mi apoyo.

A los que se han ido:

Pero viven conmigo, compartiendo la satisfacción de un deber cumplido

G.F.T.

3

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Patricia Ramos Morales, Maestra en Ciencias Adriana Muñoz Hernández y Maestro en Ciencias José Armando Muñoz Moya:

Por su tesón, paciencia y comprensión; pero sobre todo por aceptar compartir su tiempo y conocimientos conmigo.

Sin su invaluable capacidad de compromiso y su siempre amable disposición para el diálogo, este trabajo no podría haberse concluido.

A toda la "familia" del Laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias:

Por su mas que generosa hospitalidad.

A Claudia Avalos Trujillo:

Por su asombrosa y dedicada habilidad de trazo plasmada en las figuras que, gracias a ella, realzan lo que aquí se ha escrito.

Mi misión es....

Celebrar la vida, alcanzando, creando, engendrando,
descubriendo en cada palmo de espacio un sitio placentero
y en cada instante lo sencillo de gozar mi mundo por entero.

Trascender con sentimientos, ideas, palabras y hechos
las fronteras tangibles de lo cierto,
rebasando los límites del tiempo,
perdurando mas allá en la esencia de lo etéreo.

A

INDICE

	Página
Resumen. _____	2
Introducción.	
Teratógenos. _____	3
El Misoprostol. _____	6
Las Prostaglandinas y su Papel en la Regulación Génica _	9
Bioensayos Empleados en la Detección de Actividad Teratogénica _____	16
Objetivos. _____	26
Hipótesis. _____	27
Materiales y Métodos.	
Compuestos Químicos Utilizados. _____	28
Manejo de Organismos. _____	29
Resultados. _____	32
Discusión. _____	45
Conclusiones. _____	52
Referencias. _____	53

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En el ambiente existe gran variedad de agentes y factores a los que los seres vivos están expuestos, mismos que podrían ocasionar entre otros, daño severo a las estructuras de un embrión en formación. A estos agentes capaces de alterar el desarrollo normal de cualquier embrión, induciendo malformaciones congénitas, se les conoce como teratógenos. El misoprostol, un análogo sintético de la prostaglandina PGE₁, principio activo de un medicamento comercial suministrado para el tratamiento y profilaxis de úlceras pépticas, también usado como inductor en la labor de parto y como abortivo eficaz, se encuentra bajo sospecha de ser teratogénico, pues se le ha asociado a ciertos defectos de nacimiento registrados en humanos. La polémica que ha suscitado su uso para provocar la expulsión del producto en el primer trimestre de embarazo radica en que, mientras unos lo consideran una alternativa viable e inofensiva para evitar abortos por métodos quirúrgicos agresivos; otros condenan su uso con base en la información que se ha obtenido de la relación del uso de este compuesto y la presencia de malformaciones congénitas en los productos que sí llegan a término, después de que a sus madres se les suministró misoprostol vía vaginal u oral en el primer trimestre del embarazo, con la intención de inducir el aborto.

Con el objeto de contribuir al conocimiento del potencial teratogénico del misoprostol, se probó su efecto en larvas de 72 ± 4 horas de la cepa silvestre Canton-S de *Drosophila melanogaster*. Diluciones progresivas del compuesto, a partir de la correspondiente a la dosis diaria recomendada para una mujer adulta (2.0 p.p.m.), fueron incorporadas en el alimento en el que crecieron las larvas, para recuperar el efecto mediante la observación de malformaciones en los imagos de *D. melanogaster*. Los resultados se compararon contra lotes testigo, consistentes en muestras de larvas desarrollándose en medio nutritivo adicionado con agua destilada, solvente en el que se diluyó el compuesto.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de malformaciones que comprometieron a la placa genital de machos y placas genital y anal de hembras en los lotes experimentales

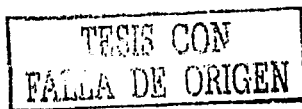
INTRODUCCIÓN.

Teratógenos.

El cosmos o ambiente en el que se desarrolla un nuevo ser puede ser dividido en microcosmos (útero materno), matrococosmos (organismo materno) y macrocosmos (ambiente exterior), este último puede influir en el desarrollo del producto favoreciendo la normogénesis o provocando el desarrollo embrionario anormal o teratogénesis. (Espinosa y Guizar, 1994).

Los mecanismos involucrados en el desarrollo anormal de un embrión, así como las malformaciones congénitas, sus manifestaciones e incidencia, son los principales objetos de estudio de la teratología, término que deriva de la palabra griega "teras", "teratos" que significa: monstruo (O'Rahilly y Müller, 1996). Hoy en día se prefiere el referirse a este campo de la ciencia como: toxicología del desarrollo, ya que, como lo han evidenciado estudios experimentales diversos, los efectos inducidos en el desarrollo embrionario por los teratógenos se manifiestan en muchas otras formas y no sólo como defectos monstruosos; por ejemplo: muerte prenatal, retraso del crecimiento, trastornos conductuales y funcionales, mutación de células germinales y otras alteraciones que se presentan en el estado adulto (Brown, 1997).

Los mecanismos de acción de los agentes teratogénicos son diversos y aún falta mucho por dilucidar acerca de ellos. Por ejemplo, algunos sólo actúan después de ser activados metabólicamente por sistemas de enzimas, como los dependientes de los citocromos (P450), la prostaglandina H sintetasa (COX) y lipo-oxigenasas (LOX) o por radicales libres que actúan como intermediarios. Esto puede causar teratogénesis, o aún muerte embrionaria por la interacción del teratógeno no solo con ADN, sino con otras macromoléculas celulares como proteínas y lípidos (Ferguson y Ford, 1997). Algunos otros mecanismos de acción de los teratógenos son: Interrupción del ciclo celular, inhibición de enzimas reparadoras del ADN, modulación de la expresión génica, deficiencias nutricionales, deficiencia o alteración en mecanismos de aporte de energía y cambios osmóticos (Ferguson y Ford, 1997).



Un teratógeno es, entonces, un agente físico, químico o biológico que puede inducir una o varias anomalías en el desarrollo embrionario de cualquier organismo (Brown, 1997), como consecuencia de alteraciones en la transcripción y la traducción de la información genética.

En general todos los animales atraviesan por tres etapas en su desarrollo, que corresponden a los estados de prediferenciación, embrión y feto, de éstos, es el embrión el más susceptible a los efectos de los teratógenos (Patnaik, 1999). Durante la etapa de prediferenciación, la acción de los teratógenos sigue la ley del "todo o nada" (Baraibar et al., 1981), es decir, estos agentes pueden no generar un efecto aparente o bien pueden afectar a un número importante de células, lo que podría derivar en la muerte del embrión (Patnaik, 1999; Baraibar et al., 1981). Para el caso de los mamíferos, en la etapa fetal, en la que ocurre el crecimiento del individuo y la maduración funcional, los teratógenos quizá no puedan causar defectos morfológicos, pero pueden inducir anomalías funcionales, como por ejemplo, deficiencias en el sistema nervioso central que no podrán ser detectadas al nacimiento sino tiempo después (Patnaik, 1999).

Durante la fase embrionaria las células experimentan una intensa diferenciación, movilización y organización; procesos que dan lugar a la organogénesis. Si un teratógeno actúa durante esta etapa en las células que darán origen a una estructura determinada, dicha estructura (órgano) no se formará o lo hará erróneamente (Patnaik, 1999; Baraibar et al., 1981).

En el contexto de la especie humana, durante la década de los 60's, la tragedia de la talidomida, tristemente el teratógeno más célebre, generó un nuevo y creciente interés por el estudio de sustancias y otros factores que podrían causar defectos de nacimiento en el producto. Desde entonces, una de las líneas en la investigación de la toxicología del desarrollo ha sido identificar posibles teratógenos: físicos, químicos y biológicos; así como determinar sus rangos de actividad, mecanismos de acción y su actividad en diferentes organismos, con miras a prevenir su efecto en humanos (Brown, 1997). Hasta ahora, los bioensayos con animales, son los medios más accesibles para entender los principios básicos de los mecanismos de la teratogénesis.



De acuerdo a Patnaik (1999), un protocolo enfocado a la identificación y evaluación de los efectos de un compuesto que se sospeche teratogénico debe incluir:

1. La selección del organismo de laboratorio idóneo para efectuar la prueba.
2. La administración del compuesto al menos en tres niveles de dosificación.
3. Grupos testigo en los que se simule la manipulación de los lotes experimentales.
4. Incorporación del compuesto en el alimento o por otra vía.
5. Administración de la sustancia cuando el embrión es más susceptible, especialmente durante la organogénesis.
6. Revisión de los organismos en busca de anomalías.

Los efectos son evaluados a través de la reabsorción (muerte del producto), toxicidad fetal (paso corporal reducido), malformaciones y anomalías. La existencia de diferencias significativas se establece con respecto a cuatro aspectos fundamentales:

1. El número de lotes con fetos malformados.
2. El incremento en el número de fetos malformados por lote.
3. El número de reabsorciones o muertes fetales.
4. La incidencia de malformaciones contra la dosis administrada.

La relación dosis-respuesta deberá indicar la teratogenicidad del compuesto (Patnaik, 1999).

Estudios como estos junto con otros de mecanismos de acción teratogénica y toxicológica pueden coadyuvar al establecimiento de medidas regulatorias que protejan al humano del contacto con teratógenos potenciales mediante la reducción de la incertidumbre al generar un pronóstico del posible efecto de estos compuestos, con base en lo obtenido en bioensayos con animales (Ferguson y Ford, 1997).

INTRODUCCIÓN.

El misoprostol

El misoprostol es un análogo sintético de la prostaglandina PGE₁ (Index Merck 1989) (Figura 1). Esta y otras prostaglandinas son derivadas de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos, presentes en fosfolípidos asociados a membranas celulares. Las prostaglandinas tienen una actividad biológica importante; entre sus acciones principales se encuentran: 1) inhibir la agregación de plaquetas, 2) provocar la relajación del músculo bronquial, 3) aumentar las contracciones uterinas, 4) disminuir la secreción gástrica, 5) aumentar o disminuir la actividad eléctrica en el sistema nervioso, 6) regular la secreción de algunas hormonas y 7) disminuir la movilización de grasa de los depósitos, entre muchas otras (Lehninger, 1982; Pérez et al., 1998; Wang y Stocco, 1999).

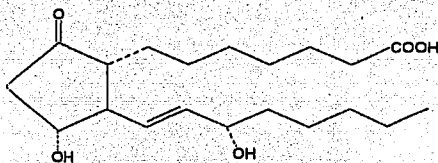


Figura 1. Estructura molecular de la prostaglandina PGE₁.

Al ser el misoprostol un análogo de la PGE₁, disminuye la secreción gástrica, por lo que se le utiliza para el tratamiento de la úlcera duodenal y para la profilaxis de las lesiones gastroduodenales inducidas por tratamientos con antiinflamatorios no esteroideos (aspirina) (NEJM correspondencia, 2001; NEJM editorial, 2001).

Los laboratorios "Searle" comercializan este medicamento con el nombre de Cytotec, el cual fue aprobado en el año de 1988 por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, para ser usado con los fines ya mencionados (NEJM, 2001). En la clasificación de la propia FDA, el producto está ubicado en la categoría "X", en la que se agrupan

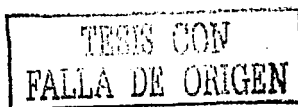
los medicamentos que son perjudiciales para organismos no natos. Esto debido a la actividad ya mencionada de las prostaglandinas y sus análogos sintéticos en el aumento de las contracciones uterinas. Consecuentemente, cualquier administración de misoprostol a una mujer embarazada debe ser bajo estricta responsabilidad del médico (de Pérez et al., 2001; Hajaj et al., 1998).

Poco tiempo después de su aparición en el mercado, se reportó la utilización del misoprostol como abortivo, administrándose durante los primeros tres meses de embarazo por vía oral o vaginal, solo o en combinación con otras sustancias, como el Methotrexato y la Mifepristona. Los resultados obtenidos señalan a estos métodos como alternativas seguras y exitosas para conseguir un aborto sin necesidad de cirugía (Hausknecht, 1995; Winnikoff et al., 1998; Velazco et al., 2000).

Por otro lado en varios estudios realizados principalmente en Brasil y en algunos otros países de Centro y Sudamérica donde el aborto es ilegal y en donde existe un uso extendido e irrestricto del misoprostol; aunque no se tienen evidencias de su efectividad como abortivo, se le asocia con la presencia de alteraciones congénitas como: Parálisis facial congénita o síndrome de Mobius, agenesia muscular en extremidades inferiores, sindactilia, hidrocefalia y ausencia de dedos o presencia de dedos más cortos en las extremidades (Hajaj et al., 1998; Pastuszak et al., 1998; Vargas et al., 2000).

Contrario a lo que podría suponerse, la polémica que este compuesto ha generado no gira en torno a si debe usarse como abortivo o no, sino sobre su uso para promover la maduración cervical como preludeo para inducir la labor de parto de acuerdo al Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) (NEJM, 2001; ACOG News Release, 2000).

Con respecto a su medicamento, los laboratorios Searle se limitan a recomendar que se evite la administración del misoprostol (Cytotec) a cualquier mujer embarazada, ya que su uso no está aprobado para la inducción de la labor de parto o para provocar abortos (NEJM, 2001).



Posteriormente, la US Food and Drug Administration (FDA) aprueba a la Mifepristona para la terminación del embarazo de menos de 49 días de gestación. Este tratamiento se complementa con 400 µg de misoprostol (NEJM, 2001; Winnikof, 1998).

De cualquier manera, no se dispone de evidencias confiables de la asociación del misoprostol con defectos congénitos, salvo en la información para el consumidor referente a reportes anecdóticos de anomalías congénitas en fetos de mujeres que recibieron misoprostol durante el embarazo (NEJM, 2001).

En México, la mayoría de las referencias existentes sobre el misoprostol provienen de tesis en medicina en las que se estudiaron los efectos profilácticos del compuesto (Vázquez E.M., 1988; Ramírez J.J., 1937), su acción como inductor de la labor de parto (Osorio M., 1988; Delgado G.R., 1998; Orihuela H.L., 1995) y su eficacia para promover la maduración cervical y el trabajo de parto (Flores I.X., 2000; Zavaleta R.D., 1995; Rueda M.A., 1994).

No se cuenta con reportes sobre teratogenicidad inducida por el misoprostol. Únicamente Kotsonis (1985) reporta resultados negativos en pruebas de mutagénesis, fetotoxicidad y teratogénesis para ratas tratadas con dosis orales por encima de los 10,000 µg por kilogramo de peso y para conejos tratados con dosis por arriba de los 1000 µg por kilogramo de peso (Kotsonis et al., 1985).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

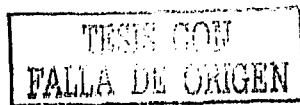
INTRODUCCIÓN.

Las prostaglandinas y su papel en la regulación génica.

Las prostaglandinas como metabolitos de los ácidos grasos esenciales son importantes mediadoras o reguladoras en diversos procesos bioquímicos humanos (Pérez et al., 1998; Wang y Stocco, 1999; Narumiya et al., 1999), actúan como hormonas locales o autocoides que modifican eventos biológicos cercanos a sus sitios de síntesis (Gurr y Harwood, 1991, Hernández et al., 1996). Entre otras funciones destaca la de intervenir como elementos importantes en procesos de traducción de señales y de regulación de la expresión génica de una gran cantidad de proteínas (Wang y Stocco, 1999). Han sido encontradas tanto en vertebrados como en invertebrados y se considera que cumplen funciones similares en ambos grupos (Stanley, 2000).

En *D. melanogaster* los estudios realizados para detectar la presencia de ácidos grasos sugirieron, en un principio, que tales compuestos no eran requeridos ni sintetizados por este organismo, pero investigaciones posteriores han evidenciado su presencia y la de sus metabolitos, aunque en cantidades muy pequeñas (Stanley, 2000). Se ha reportado que homogenizados de *Drosophila* pueden biosintetizar prostaglandinas y productos lipo-oxigenados, de modo que existe la idea de que *Drosophila*, y tal vez otros dípteros, son capaces de biosintetizar ácidos grasos poli-insaturados, aunque en niveles sumamente bajos, por lo que no habían podido ser detectados a través de los análisis ordinarios (Stanley, 2000).

La regulación génica promovida por las prostaglandinas puede efectuarse de dos maneras distintas que, sin embargo, contienen un elemento común: los receptores nucleares, mismos que constituyen un vínculo directo entre las prostaglandinas y la respuesta transcripcional (De Mendonca et al., 1999).



Las prostaglandinas pueden actuar tanto intracelularmente como extracelularmente uniéndose a un receptor nuclear.

En el primer caso, Aranda y Pascual (2001) han asociado a algunos receptores nucleares con ligandos específicos tales como ácidos grasos, prostaglandinas o derivados del colesterol, que pueden regular la expresión de genes cuando se unen al receptor.

O bien, las prostaglandinas pueden interactuar extracelularmente con receptores de la membrana celular asociados a proteínas "G" para poder mostrar su efecto en las rutas bioquímicas de regulación de la expresión génica (Stanley, 2000).

Estos receptores de superficie han sido identificados denotándose como: DP, EP, FP, IP y TP; los que exhiben afinidad por las prostaglandinas PGD, PGE, PGF, PGI y tromboxanos, respectivamente (Narumiya et al., 1999; Stanley, 2000).

De los anteriores, los receptores "EP" resultan particularmente importantes pues tienen afinidad para unirse a las PGE, a las que pertenece la PGE₂, y de la cual es análogo el misoprostol. Estos receptores se dividen en 4 subtipos dependiendo de la proteína "G" a la que se encuentren acoplados. Narumiya et al. (1999) han demostrado que el misoprostol presenta afinidad por cada uno de ellos.

Cuando la prostaglandina se acopla al receptor se forma un conjunto que puede influir en la traducción de señales y en la regulación de la expresión génica al inducir el incremento o disminución de sustancias conocidas como segundos mensajeros, por ejemplo el calcio (Ca²⁺) y el AMP cíclico (Narumiya et al., 1999) (Tabla 1).



Tabla I. Receptores de membrana que exhiben afinidad por el misoprostol y sus efectos en la producción de segundos mensajeros. (Modificada de Narumiya et al., 1999).

TIPO	SUBTIPO	PROTEINA "G"	SEGUNDO MENSAJERO
EP	EP1	No identificada	Ca ²⁺ Incremento
	EP2	Gs	AMPc Incremento
	EP3	Gi	AMPc Disminución y/o Incremento
	EP4	Gs	AMPc Incremento

Los segundos mensajeros, entonces, influyen en la acción de los receptores nucleares que regulan la transcripción mediante la unión a secuencias específicas de ADN, las que, en general, reciben el nombre de elementos de respuesta hormonal (HRE) y se encuentran formando parte de segmentos reguladores de los genes blanco. También pueden existir los llamados HRE negativos que al unirse el receptor correspondiente regulan la represión de la expresión de genes (Aranda y Pascual, 2001). Otra forma de modular la expresión génica por parte de los receptores nucleares no implica una unión con un HRE, sino que se realiza a través de interferencias negativas o positivas con la actividad de otros factores de transcripción, a este modo de acción se le llama comunicación cruzada transcripcional (Aranda y Pascual, 2001).

Un receptor nuclear presenta una arquitectura modular con diferentes regiones: una región terminal variable con un radical NH₂ (A/B), un dominio de asociación al ADN (DBD) o región "C"; una región de ligadura o vinculación (D) y una región "E" que contiene el dominio de unión con el ligando (LBD) (Aranda y Pascual, 2001) (Figura 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

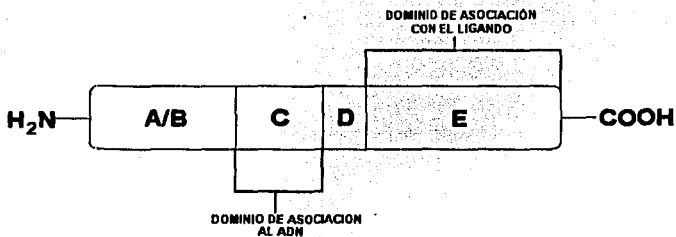


Figura 2. Representación esquemática de un receptor nuclear y sus dominios funcionales: La región amino - terminal A/B que contiene el dominio de activación independiente del ligando. La región C responsable del reconocimiento de secuencias específicas de ADN. La región D de enlace. Y la región E con el dominio de asociación al ligando.

La región A/B es también conocida como dominio modulador. La modificación que experimenta esta región con su fosforilación puede afectar significativamente la actividad transcripcional. La fosforilación puede efectuarse por quinasas ciclo - dependientes y resulta muy importante para la activación del receptor, independientemente de si existe unión con el ligando o no (Aranda y Pascual, 2001).

De cualquier manera, el requisito para que un receptor nuclear module una actividad transcripcional es: realizar la unión con su ligando específico, o bien, experimentar una activación mediante los productos de una ruta de transducción de señales.

Las quinasas ciclo dependientes (CDK), junto con otras proteínas como las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), caseína quinasa y quinasa "A", que afectan la actividad de los receptores nucleares a través de eventos de fosforilación, son activadas por señales extracelulares que se generan desde receptores de superficie (Aranda y Pascual, 2001).

Dentro de este esquema general existe un tipo de receptores nucleares que son de particular interés para los fines del presente trabajo: los receptores de activación de proliferación

de peroxisomas (PPAR por sus siglas en Inglés) (Devchand y Wahli, 1998; Aranda y Pascual, 2001).

Los PPAR han sido identificados como receptores específicos de algunos elcosanoides tales como: prostaglandinas, leucotrienos, ácidos grasos y algunos mas de sus derivados (Devchand y Wahli, 1998; De Mendonca et al., 1999; Aranda y Pascual, 2001). Se ha observado que algunas prostaglandinas se convierten en activadores efectivos a concentraciones micromolares (Devchand y Wahli, 1998)

Estos PPAR, en presencia de su ligando, se asocian a otro receptor nuclear formando un heterodímero. El receptor nuclear al que se asocian se conoce como RXR o receptor para el ácido 9 – cis retinoico (Devchand y Wahli, 1998). El RXR se asocia con frecuencia a muchos receptores y su función, al parecer, es la de incrementar la eficiencia en la unión al ADN y la actividad transcripcional (Aranda y Pascual, 2001).

La activación de los heterodímeros PPAR – RXR puede darse por la unión exclusiva del ligando de cualquiera de los dos, o bien, por la unión de ambos ligandos (Aranda y Pascual, 2001).

En los PPAR la región A/B es activada por la fosforilación mediante una MAPK y este evento puede promover la actividad transcripcional, o bien, regularla negativamente a través de reducir la habilidad del receptor para asociarse con su ligando. Incluso una fosforilación mediada por una MAPK en los receptores RXR puede alterar las acciones de los receptores que se asocian con él como heterodímeros (Aranda y Pascual, 2001).

Estos heterodímeros PPAR – RXR son receptores nucleares presentes en vertebrados, pero el RXR tiene un homólogo entre los artrópodos y está presente en *Drosophila melanogaster*, a este homólogo se le conoce como receptor USP (Ultraespiráculo) (De Mendonca et al., 1999; Hall, 1999). Éste y otros receptores están involucrados en el proceso de regulación de los eventos post



- embrionarios mayores que ocurren en *Drosophila*, incluyendo el paso de larva a pupa, las mudas entre cada estadio larvario y la metamorfosis; a través de la hormona esteroidea ecdisona (Hall, 1999).

El USP es requerido como segundo factor que se asocia al receptor de ecdisona, EcR que induce la expresión de ciertos genes cuando se asocia a su ligando. A su vez el USP funciona como compañero heterodímero del receptor hormonal *Drosophila* 38 (DHR38) (Hall, 1999). Otro receptor que podría ser un factor regulador importante del desarrollo de la larva de tercer estadio, es el receptor hormonal *Drosophila* 78 (DHR78) que se manifiesta ampliamente a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Este receptor tiene un ligando aún no identificado (Hall, 1999).

Existe otra clase de receptores nucleares en *Drosophila* que parece no estar regulada por hormonas. A esta clase pertenecen receptores que no poseen dominios de unión para ligandos, o bien, receptores sin ligando específico identificado. Pero al igual que los receptores hormonales están biológicamente activos regulando la expresión génica en diversos tejidos y además han resultado implicados en una gran variedad de procesos que tienen que ver con el desarrollo de este insecto (Grizán et al., 2002; Adams et al., 2000).

En total se han identificado 21 receptores nucleares en *Drosophila* los cuales presentan diferencias con respecto a los encontrados en vertebrados, pero también existen semejanzas sorprendentes en cuanto a la estructura de los dominios para asociación al DNA y al ligando en receptores identificados, por un lado, en *D. melanogaster* y por otro, en humanos (Maglich et al., 2001). Esta semejanza en estructura hace suponer la presencia de mecanismos de acción y funciones similares. En un trabajo realizado por Grizán y colaboradores (2002), se demostró que receptores nucleares de *Drosophila melanogaster* reprimieron la expresión de genes relacionados con la producción de la proteína AP-1 en cultivos de células de mamífero, mediante la interacción de los receptores nucleares con señales en cascada provocadas por fosforilación con MAPKs (Grizán et al., 2002).

La investigación en el campo de la regulación génica indica que los mecanismos de control y regulación en la transducción de señales no consisten en ensamblajes de pasos lineales, sino más bien en partes de flexibles redes de comunicación. La respuesta de una célula a la activación de una cascada de señales puede ser modulada por otras señales y parámetros inherentes a la misma célula, tales como su estado de diferenciación, su actividad metabólica u otros aspectos que dependen del desarrollo de la célula (Gritzan et al., 2002).

La reciente publicación del genoma casi completo de *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) y los descubrimientos de las rutas bioquímicas fundamentales de este organismo, revelan que las intrincadas redes biosintéticas son consistentes entre individuos tan distintos como una mosca y un humano; esto reafirma a *Drosophila* en su lugar preponderante como modelo para estudiar efectos nocivos de alteraciones en los procesos de replicación, reparación, traducción y metabolismo de drogas y toxinas. Esto puede llevar al esclarecimiento de los mecanismos de acción de agentes como los teratógenos, que causan alteraciones en humanos. Si se encuentra un mecanismo general de acción, como todo parece indicarlo, la ciencia estará en posibilidades de plantear soluciones efectivas para padecimientos, anomalías, malformaciones etc, en beneficio de la humanidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Bioensayos empleados en la detección de actividad teratogénica

Los estudios que se realizan actualmente en el campo de la toxicología del desarrollo están orientados hacia la prevención de los daños que pueden sufrir los seres humanos durante el desarrollo embrionario por contacto con agentes ambientales, pero actualmente los datos disponibles para humanos son pocos y provienen del registro y documentación de casos de aborto y del examen de productos concebidos, lo cual es insuficiente para evidenciar la influencia de, por ejemplo, agentes teratogénicos ambientales (IPCS 1984). Ante la dificultad para implementar el diseño de estudios epidemiológicos que permitan identificar estos riesgos, se recurre al empleo de modelos de experimentación con animales.

Los experimentos con animales en toxicología del desarrollo pueden ser divididos en dos grandes clases: estudios para probar compuestos o agentes con potencial desconocido y estudios de segunda fase o ampliación sobre efectos de agentes cuyo potencial para causar malformaciones ya ha sido establecido (IPCS 1984).

Hasta ahora las especies más utilizadas han sido ratones, ratas, hamsters y conejos, debido a su alta fertilidad, fácil detección del comienzo de la gestación y su corta duración, la economía en el costo de su mantenimiento y su semejanza con el ser humano en lo que respecta a procesos de desarrollo y toxicocinética (IPCS 1984).

Sin embargo se enfrentan problemas cuando se intentan elaborar diseños experimentales para identificar y comprobar la acción de un compuesto químico que se sospecha teratogénico, por ejemplo: la detección de anomalías químicamente inducidas y su diferenciación con respecto a defectos esporádicos que se presentan de manera natural puede resultar difícil ya que el tamaño de muestra necesario para detectar cambios significativos puede ser tan grande, que lo hará inaplicable en ciertas especies de animales. La razón es que las malformaciones ocurren con una

frecuencia baja (0.1%) de manera natural y para detectar un incremento de al menos 2 órdenes de magnitud en una especie semejante al hombre, como ejemplo los primates, se necesitarían cuando menos 100 o más individuos por grupo o lote (IPCS 1984).

Otro problema lo constituye la determinación de las dosis o concentraciones que se administrarán, pues frecuentemente se debe enfrentar la carencia de datos. Lo usual es trabajar al menos con tres grupos experimentales y uno de control, en donde una dosis mínima no induzca un resultado significativo y la dosis más alta provoque signos mínimos de toxicidad materna (IPCS 1984).

Al elegir los periodos de dosificación, deberán tomarse en cuenta los objetivos que persiga el estudio. Se pueden usar periodos cortos de exposición para confirmar la acción de un agente de alto potencial que puede inducir un efecto específico en poco tiempo; o bien periodos largos para cubrir un mayor número de efectos potenciales para probar compuestos con acción no conocida. Además debe también considerarse el administrar las dosis durante las etapas críticas y sensitivas del desarrollo embrionario (IPCS 1984).

Para la elección de las vías de administración de los compuestos o agentes deberán considerarse aquellas que sean iguales a las rutas por las cuales podría llegar el compuesto al ser humano, aunque a veces esto represente menor control en la administración de dosis precisas o en la aplicación de estrés innecesario; factores que por sí mismos podrían inducir toxicidad embrionaria o fetal (IPCS 1984).

Posteriormente los animales deberán ser examinados para registrar el número de organismos vivos y el número de muertes embrionarias y fetales. En los fetos viables se identificarán sexo y malformaciones externas o internas en esqueleto y vísceras. Otros aspectos a observar pueden ser: peso y anomalías en fetos muertos, muerte embrionaria temprana o tardía y peso del feto al nacer (IPCS 1984).

Todos los datos obtenidos deben ser reportados y analizados estadísticamente de manera apropiada y los reportes de anomalías y malformaciones deben indicar claramente los fetos y camadas afectadas. Lo anterior permitirá llegar a tres tipos de resultados o respuestas: positiva, negativa o no concluyente. Cuando la respuesta es positiva o negativa se podrán comenzar los procesos de extrapolación. Pero cuando la respuesta es no concluyente deben diseñarse nuevos estudios para continuar con la investigación.

Los intentos por extrapolar los resultados de experimentación en animales a los seres humanos se encuentran con serias dificultades derivadas de los problemas mencionados anteriormente. Sin embargo, actualmente, en el campo de la toxicología del desarrollo no hay sustituto para los estudios de prueba con animales.

Para Lynch y colaboradores (1991), las pruebas teratológicas tradicionales con mamíferos consumen mucho tiempo y dinero y además requieren de la participación de personal especialmente entrenado. Mientras que existe una gran carencia de datos sobre la embriotoxicidad y fetotoxicidad de muchos compuestos con los que el ser humano tiene contacto. Por esto surge la necesidad de desarrollar sistemas de prueba más sencillos y confiables que ayuden al establecimiento de prioridades para los estudios "in vivo" en el campo de la toxicología del desarrollo.

En este contexto se propone a *Drosophila* como organismo que posee características que lo convierten en un modelo de prueba eficaz. Estos dípteros son capaces de absorber, circular, metabolizar y excretar compuestos químicos, además de que producen descendencia en gran número, en periodos de tiempo muy cortos (Ramos et al., 1993; Muñoz, 1997; Lynch et al., 1991)

Los resultados de estudios preliminares con *Drosophila* han mostrado que al tratar el huevo y las fases larvarias de este organismo con compuestos químicos diversos se han obtenido alteraciones específicas en las moscas adultas y que al someter a esta mosca a la exposición de

compuestos previamente identificados como tóxicos para el desarrollo de mamíferos, se observa una elevada inducción de anomalías morfológicas en los adultos (Lynch et al., 1991).

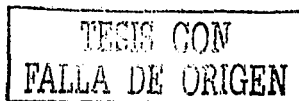
Lynch y sus colaboradores (1991) en su trabajo con *Drosophila* han aportado una amplia base de datos sobre malformaciones inducidas químicamente y hacen propuestas para formalizar los criterios en cuanto a la elaboración de bioensayos que involucren el uso de este organismo para la detección del potencial teratogénico de compuestos químicos. Específicamente proponen centrar el análisis en la identificación de cerdas tipo "bent" y alas tipo "notch", ya que son las malformaciones que se presentan con mayor frecuencia en estudios de toxicología del desarrollo con estos insectos.

Drosophila melanogaster

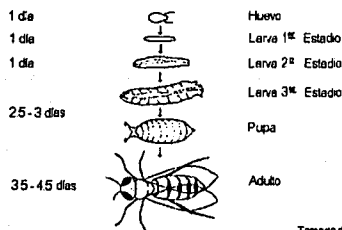
a).- Generalidades.

Drosophila melanogaster, conocida comúnmente como "mosca del vinagre", es un pequeño insecto díptero de unos 3 mm de longitud, originario del África central pero ahora cosmopolita, que se encuentra en todo tipo de clima, altitud y latitud; se localiza especialmente en las frutas suaves con indicios de fermentación y en general, en alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos et al., 1993). Perteneció al género *Drosophila*, que agrupa a los subgéneros: *Hirtodrosophila*, *Pholadoris*, *Dorsilopa*, *Phloridosa*, *Sophophora* y *Drosophila* (1942 Sturtevant). El subgénero *Sophophora* tiene siete grupos de especies, una de las cuales es *Drosophila melanogaster* (1830 Meigen) (Roberts, 1998).

Desde el punto de vista genético, muy probablemente, es la especie eucarionte más estudiada. A partir de que en 1909, el Dr. T. H. Morgan introdujo el empleo de esta mosca en la investigación genética, se le ha usado como modelo biológico en diversas disciplinas científicas (Ramos et al., 1993).



Drosophila melanogaster es un modelo in vivo que cumple con los requisitos mencionados. Su ciclo de vida tiene una duración de 10 a 12 días a 25°C, La secuencia de las diferentes etapas en el ciclo es: huevo, un día; larva de primer estadio, un día; de segundo, un día y de tercero, un día; pupa, 4.5 a 5 días (Figura 3) (Ramos et al., 1993). Existe una clara distinción entre cada una de las fases de su ciclo, se obtiene una progenie numerosa proveniente de una sola pareja y su mantenimiento requiere poco espacio y es de costo reducido (Ramos et al., 1993). Algunas otras características que se señalan como deseables en un sistema de prueba de esta naturaleza son: que sea capaz de detectar un amplio rango de eventos genéticos y que posea un potencial de biotransformación de las sustancias a probar (Muñoz, 1997). *Drosophila* es capaz de transformar metabólicamente a los compuestos de manera similar a la activación mediada por la fracción S9 del hígado de mamíferos, es decir, ambos sistemas poseen complejos enzimáticos semejantes (Muñoz, 1997; Ramos et al., 1993). Además existen diferentes protocolos que permiten evaluar la respuesta inducida durante las etapas de huevo y larva en estos organismos (Lynch et al., 1991).



Tomado de Wilkins A.S (1993)

Figura 3. Fases del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* y su duración (Tomado de Wilkins A.S. 1993)

b).- Biología del Desarrollo.

El desarrollo de *Drosophila* involucra un período de embriogénesis que es completado dentro del huevo, una secuencia de tres estados larvarios, propiamente de crecimiento y un estadio final de metamorfosis dentro de la pupa para producir el adulto o imago.

Después de la cópula, los espermatozoides quedan almacenados en la espermateca de la hembra. La fecundación ocurre cuando los espermatozoides penetran por el extremo anterior del óvulo a través de una abertura llamada micrópilo (Ramos et al., 1993). La primera fase de la embriogénesis consiste en una secuencia de divisiones celulares que convierten gradualmente al huevo fecundado en una monocapa sincicial y luego en una monocapa celular o blastodermo, esto ocurre aproximadamente 3.5 horas después de la fertilización y marca el punto de la activación genómica cigótica a gran escala. A esta etapa blastodérmica sigue una serie de movimientos celulares que constituyen el período de gastrulación. Eventos posteriores de morfogénesis y diferenciación dan origen al primer estadio de larva, la cual emerge del huevo de 22 a 24 horas después de la fecundación (Wilkins, 1993).

Las larvas son de color blanco y su cuerpo está formado por 12 segmentos no aparentes: un segmento de la cabeza, tres torácicos y ocho abdominales. La pared del cuerpo de la larva está formada por una cutícula externa y una epidermis celular interna (Figura 4) (Wilkins, 1993)

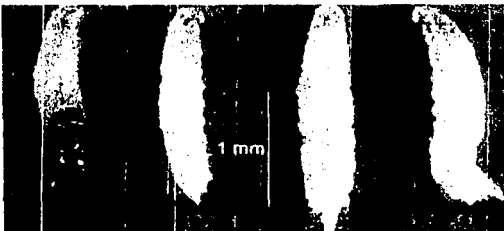


Figura 4 Diferentes estadios larvarios de *Drosophila melanogaster*

En la larva se presentan dos tipos celulares principales: las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de dividirse, aumentando solo su volumen; en algunas pueden presentarse cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las células imagales se distinguen de las larvarias, en que tienen un tamaño menor, son diploides, conservan su capacidad de división y están determinadas genéticamente, pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis (Ramos et al., 1993). Estas células imagales están arregladas en grupos en sitios específicos del cuerpo de la larva y presentan, a su vez, dos tipos de grupos celulares: los discos imagales y los nidos histoblásticos abdominales. Los discos imagales darán origen a todas las estructuras externas de cabeza y tórax, la placa genital y a la mayor parte de la musculatura del imago. Los nidos histoblásticos abdominales generarán la superficie externa de los segmentos abdominales. (excepto para el octavo segmento el cual es formado en parte por el disco genital) (Wilkins, 1993). La figura 5 muestra la disposición de los discos imagales en el cuerpo de la larva y las estructuras a las que da origen en el estado adulto.

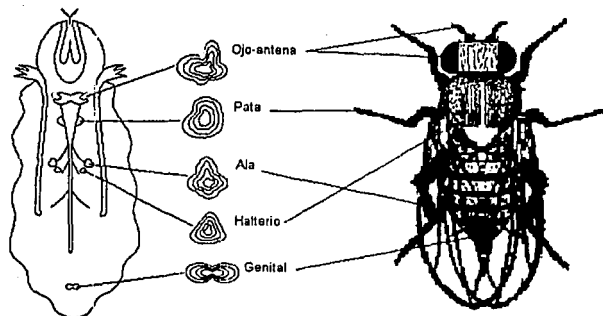


Figura 5. Disposición de los discos imagales en la larva y estructuras a las que dan origen en el imago.

Después de aproximadamente 120 horas a partir de la fecundación, ocurre la formación del pupario (Ashburner, 1989), que involucra un acortamiento del cuerpo de la larva y el endurecimiento y oscurecimiento de la última muda (Wilkins, 1993; Ramos et al., 1993). Entre cuatro y seis horas después de formado el pupario ocurre la apólis que consiste en la retracción de la epidermis desde la cutícula. Entre la formación del pupario y la apólis el insecto es una prepupa que se convierte en pupa después de la apólis (Figura 6) (Ashburner, 1989). Durante el período pupal la mayoría de las células larvarias sufren histólisis y el adulto toma forma gradualmente a medida que los discos imagales se diferencian. Esta secuencia de diferenciaciones y cambios morfológicos es desencadenada por una hormona esteroidea llamada ecdisona. El estado pupal toma de tres a cinco días y termina cuando emerge el imago o adulto (Wilkins, 1993; Ramos et al., 1993).

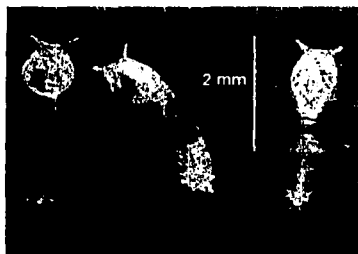


Figura 6. Pupas de *Drosophila melanogaster*

El imago emerge rompiendo el extremo anterior del pupario. En un principio el cuerpo de la mosca es alargado, despigmentado y con las alas totalmente plegadas. La expansión completa de las alas ocurre aproximadamente una hora después de la salida del adulto y la pigmentación completa ocurre después de dos o tres horas. El imago inicia su actividad sexual a las 6 - 8 horas después de haber emergido (Figura 7) (Ramos et al., 1993; Ashburner, 1989).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

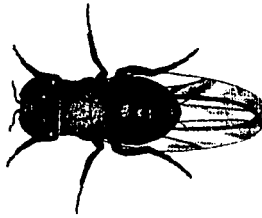


Figura 7. Esquema de un imago (hembra) de *Drosophila melanogaster*

c.- Dimorfismo Sexual.

Ya que el reconocimiento del sexo de estos organismos es indispensable para la realización del presente trabajo, cabe mencionar que para distinguir entre machos y hembras se consideraron características sexuales secundarias distintivas de cada uno de ellos. En el caso de *Drosophila*, el dimorfismo sexual es positivo hacia las hembras, que por lo general son de mayor tamaño. En los machos, el abdomen termina en tres segmentos fusionados muy pigmentados, mientras que en la hembra no se presenta esta fusión de segmentos y la coloración de éstos es uniforme. En las hembras la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda y en posición dorsoventral, en contraste con la del macho que es mas redondeada y tiene posición ventral (Figura 8). La placa genital de la hembra posee un ovopositor mientras que la del macho se conforma de varias piezas, generalmente de color oscuro. Otras estructuras que auxilian en la determinación de los sexos son los peines sexuales, presentes sólo en los machos, localizados en la región basal del tercio del primer par de patas. Estos peines constan de una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas de color negro (Figura 9) (Ramos et al., 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

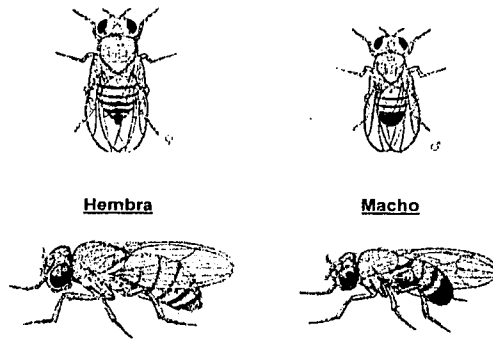


Figura 8. Dimorfismo Sexual en *Drosophila melanogaster*

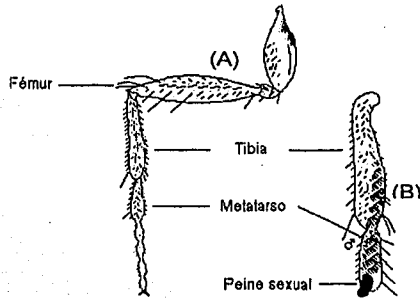


Figura 9. Comparación entre el primer par de patas de hembras (A) y machos (B) en *Drosophila melanogaster*

OBJETIVOS

□ **Objetivo General**

Determinar el potencial teratogénico del misoprostol, mediante su evaluación en un sistema de prueba in vivo utilizando como modelo a *Drosophila melanogaster*.

□ **Objetivo Especifico**

Evaluar la inducción de malformaciones en *Drosophila melanogaster* expuesta al Misoprostol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Al ser una análogo de la PGE₁, el Misoprostol interferirá con la regulación de la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila*, lo que se manifestará como un incremento en la frecuencia de malformaciones en las moscas tratadas con el compuesto.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Compuestos Químicos Utilizados.

El compuesto probado es el ácido metil ester 11,16-hidroxi-16-metil-9-oxoprost-13-en-1-oico, (misoprostol) (Index Merck CAS 59122-46-2) que es un análogo sintético de la prostaglandina PGE₁, que forma estereoisómeros aproximadamente en iguales proporciones. Su estructura química se muestra en la figura 10 (Index Merck, 1989). La dosis letal (LD₅₀) en ratas es de 40-62 mg/kg, en ratones es de 70-160 mg/kg; y Kotsonis (1985) reporta 81-100 mg/kg y 27-138 mg/kg vía oral, respectivamente.

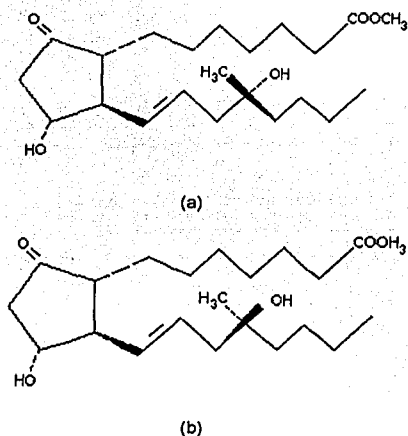


Figura 10. Estereoisómeros del misoprostol, (a) forma S, (b) forma R

En este trabajo se utilizó la presentación comercial elaborada por los laboratorios Searle, de nombre Cytotec, en presentación de 20 tabletas de 200 µg cada una.

Manejo de organismos.

a) Obtención de las larvas.

Tomando como base el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, se aplicó el siguiente diseño experimental:

Se colocaron hembras y machos de la cepa silvestre Canton-S para obtener larvas con edad sincronizada de 72 ± 4 horas, en frascos de un cuarto de litro de capacidad conteniendo medio nutritivo estandar (Ramos et al., 1993).

b) Preparación de las diluciones.

Para seleccionar la concentración a probar se tomó como referencia el doble de la dosis diaria recomendada para una mujer adulta de aproximadamente 1.60 m de estatura y 60 K de peso, la cual es de 800 μg , (Hajaj et al., 1998; Hausknecht, 1995 y Velazco et al 2000). se consideró elevarla al doble debido al rango máximo reportado en el trabajo de Hajaj y colaboradores (1998), asociado a presencia de malformaciones congénitas. Con esta concentración de 1600 μg se obtuvo la proporción en partes por millón,

Para obtener la concentración de 2 ppm, se maceró en un mortero una tableta de Cytotec de 200 μg a la cual se agregaron, agitando constantemente, 100 ml de agua destilada. Posteriormente se obtuvo una dilución a 0.5 ppm, tomando, con ayuda de una pipeta, 2.5 ml de la solución inicial de 2 ppm, aforándose a 10 ml con agua destilada. Las diluciones restantes de 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 y 0.000005 ppm, se prepararon usando pipetas para tomar 1 ml de la solución precedente, adicionándolo en cada caso, a 9 ml de agua destilada.

c) Tratamiento.

Quando las larvas alcanzaron el tercer estadio (72 ± 4 hrs.), se procedió de acuerdo a la técnica reportada por Nöthiger (1970) para separarlas del medio de cultivo por flotación mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%. Las larvas se hicieron pasar por un embudo de separación y se recolectaron sobre una malla fina de nylon. Con ayuda de una espátula se colocaron grupos de 100 a 150 larvas en tubos homeopáticos que contenían 0.6 g de medio instantáneo "Carolina" adicionado con 3.5 ml de las diferentes concentraciones del compuesto a probar. Para cada dilución, incluyendo el testigo negativo, se preparó un tubo y su repetición.

Las larvas se expusieron de manera subcrónica al compuesto adicionado al medio nutritivo del cual se alimentaron durante 48 horas aproximadamente, antes de comenzar la fase de pupa (120 hrs.). Los tubos se cubrieron con tapones de hule espuma y se almacenaron a temperatura de 25°C para esperar la eclosión de los imagos.

En fechas posteriores se realizaron dos repeticiones del experimento completo para comprobar la reproducibilidad de los resultados. Se obtuvo un tamaño de muestra de 2941 organismos adultos recobrados.

d) Registro de Resultados.

Una vez obtenidos los adultos se colocaron en un dispositivo eterizador impregnado con eter etílico, con el fin de sacrificarlos por exceso de anestesia. Posteriormente fueron fijados con una mezcla de tween 1% y alcohol etílico al 70% en solución acuosa en proporción de 1:10.

Los adultos fijados se revisaron con un microscopio estereoscópico Nikon a 40X. Se registró el número total de organismos recobrados, así como el sexo de éstos. Con esta información se obtuvo el índice de sobrevivencia (IS) y el índice sexual (ISX) para las series experimentales y testigo.

De manera paralela, para evaluar el potencial teratogénico del misoprostol, los organismos fueron analizados morfológicamente registrando el número y tipo de alteraciones presentes en: ojos, antenas, aparato bucal, cerdas, alas, extremidades y segmentos.

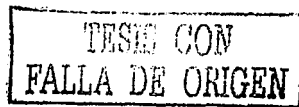
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS.

Durante el análisis de cada organismo se determinó que el tipo de malformación más frecuente y evidente, consistió en la alteración de las placas genital y anal de las hembras y en la placa genital de los machos. Debido a esto el conteo de organismos con alteraciones se centró en hembras que presentaron un pronunciado alargamiento del último segmento abdominal o placa genital, combinado con una apertura exagerada de la placa anal, incluso con engrosamiento evidente de las cerdas que rodean a esta estructura. Lo anterior en contraposición al patrón anatómico normal apreciable como un último segmento no alargado guardando proporción con el resto del cuerpo, una placa anal cerrada descansando sobre la región dorsal del segmento final abdominal con las cerdas circundantes largas y delgadas (Figura 11 a y b). Para el caso de los machos, fueron considerados como alterados aquellos que presentaron una visible elongación del último segmento abdominal (placa genital), y una curvatura del mismo segmento en dirección del eje antero - posterior del individuo; ya que en la condición normal se observa el último segmento no elongado y con la orientación de la placa genital hacia la región ventral del organismo (Figura 11 c y d).

Los índices de sobrevivencia y los índices sexuales fueron comparados con un análisis de varianza y una posterior comparación múltiple de medias por el método de Tukey (1953). Por su parte la frecuencia de organismos alterados en los controles y en los lotes experimentales, fue comparada usando las tablas para el mínimo número de eventos significativos en una muestra binomial de Kastenbaum y Bowman (1966), considerando el valor de $P \leq 0.05$ como indicador de significancia.

En la tabla II y gráfica 1 se muestran los datos obtenidos en los experimentos para los índices de sobrevivencia (IS). El valor de 1.0 o del 100% fue obtenido a partir del conteo de organismos recuperados en los lotes testigo. En las concentraciones probadas el compuesto no mostró ser tóxico para los organismos expuestos. Al efectuar un análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, las variaciones resultaron ser no significativas, es decir, pudieron ocurrir de manera aleatoria en los diferentes lotes experimentales.



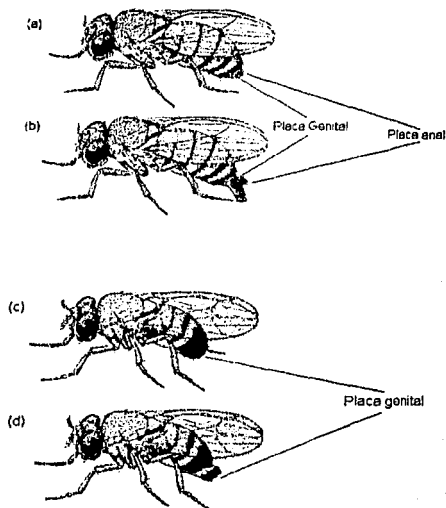


Figura 11. Esquemas de los criterios morfológicos utilizados para la distinción entre organismos normales y alterados. (a) hembra normal, (b) hembra alterada; (c) macho normal, (d) macho alterado

Con respecto a los índices sexuales (ISX) presentados en la tabla III y gráfica 2, se observa una mayor proporción de machos, excepto para la concentración de 0.05 ppm. Debido al hecho de que la condición normal en una población natural de *Drosophila melanogaster* es presentar un mayor número de hembras con respecto al de machos, se decidió efectuar también un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias (Prueba de Tukey) para tales datos a fin de determinar si las diferencias obtenidas pudiesen ser atribuidas a algún efecto del tratamiento aplicado. Sin embargo, los valores revelados por estos análisis indicaron que dichas variaciones pudieron darse al azar en estas poblaciones tratadas, ya que los valores de las pruebas no alcanzaron los niveles de significancia requeridos ($P \geq 0.05$).

Aún cuando las pruebas estadísticas no revelan resultados significativos, el cambio de la condición normal, consistente en un número menor de hembras, parecería sugerir que el compuesto tiende a afectar en mayor grado a éstas. La alteración de la proporción de sexos parece mostrar una tendencia similar a la de las curvas de sobrevivencia y malformaciones, en donde se alternan las fases de adaptación y respuesta, pudiéndose reconocer, quizá, concentraciones que representan umbrales para *Drosophila melanogaster* con respecto a la acción del fármaco.

Finalmente, en la tabla IV y gráfica 3 se encuentran los datos obtenidos al comparar el número de organismos alterados en los lotes testigo y en los experimentales, se aprecia una tendencia a incrementarse la frecuencia de alteraciones en las concentraciones de 0.000005 a 0.005 ppm, luego un máximo en 0.05 ppm, en donde el número de organismos alterados es casi el doble de los presentes en el lote testigo; para después mantenerse en un valor de 0.5 (50%) para las concentraciones más altas (0.5 y 2.0 ppm). En las figuras 12 y 13 se muestran hembras recobradas en el tratamiento con 0.005 ppm de misoprostol, donde se pueden observar las alteraciones presentes en placas anal y genital. Y en las figuras 14 y 15 se muestran diferentes machos recobrados en la concentración de 2.0 ppm de misoprostol en donde se puede apreciar la alteración del último segmento abdominal..

Para comparar la frecuencia de alteraciones entre testigo y experimentales, se aplicó la prueba estadística propuesta por Kastenbaum y Bowman (1966), la cual está diseñada para detectar un número mínimo de eventos significativos, considerando que la aparición de malformaciones en una población es un suceso poco frecuente (Tabla V).

Los resultados fueron reveladores, pues en todos los casos en los lotes experimentales se superó el número mínimo de organismos malformados que la prueba predice en comparación contra los organismos recuperados en los lotes testigo.

Si comparamos los resultados de las gráficas del índice de sobrevivencia y la frecuencia de alteraciones (gráfica 4), podemos observar que el comportamiento de la curva es muy similar en ambas. Existe una tendencia a recobrar mas organismos a medida que aumenta la concentración, a excepción de un punto de inflexión para la concentración de 0.005 ppm. Y en la curva de alteraciones, éstas tienden a presentarse con mayor frecuencia en las concentraciones mas bajas y luego hay un incremento significativo en la concentración de 0.05 ppm. Posteriormente en las concentraciones mas altas se muestra de nuevo la tendencia a recobrar cada vez mas organismos, mientras que la frecuencia de alteraciones tiende a mantenerse constante, como si se hubiese alcanzado una dosis que parece afectar cuando menos al 50% de los organismos recobrados.

Tal vez en el rango de concentración de 0.005 a 0.05 ppm pudiese existir un umbral en donde se muestra una respuesta sensible por parte de los organismos, tras la cual aparecería una fase de adaptación. Quizá la curva muestre estos cambios traducidos en crestas y valles cuando se amplie el rango de concentraciones consideradas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



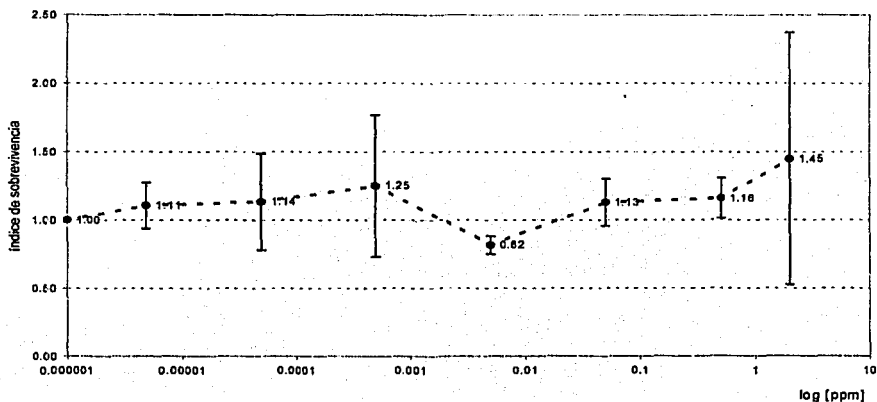
Tabla II.
Índice de Supervivencia (IS) obtenido para organismos de la cepa silvestre Canton-S en los tratamientos con misoprostol (Organismos recuperados por lote / Organismos recuperados en el testigo)



CONCENTRACIÓN [ppm]	PROMEDIO ± DESV. EST.
0	1.0 ± 0.00
0.000005	1.11 ± 0.17
0.00005	1.14 ± 0.35
0.0005	1.25 ± 0.52
0.005	0.82 ± 0.07
0.05	1.13 ± 0.17
0.5	1.16 ± 0.15
2.0	1.45 ± 0.92

Análisis de Varianza: $P = 0.936 > 0.05$. Los efectos marcados no son significativos.

Prueba de Tukey: $0.895 < P < 1.0$, como $P > 0.05$ entonces las diferencias marcadas no son significativas.



Gráfica 1. Índice de supervivencia (IS) obtenido en la línea Canton-s de *Drosophila melanogaster* tratada con misoprostol.

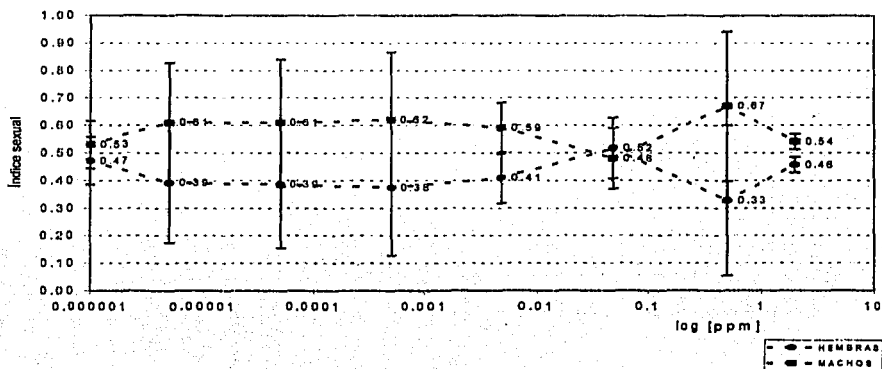


Tabla III.
Índice Sexual (ISX) obtenido para organismos de la cepa silvestre
Canton-S en los tratamientos con misoprostol
(Total de organismos por sexo / Total de organismos por lote)



CONCENTRACIÓN [ppm]	PROMEDIO ± DESV. EST.		
	HEMBRAS	MACHOS	DESV. EST.
0	0.47	0.53	± 0.09
0.000005	0.39	0.61	± 0.22
0.00005	0.39	0.61	± 0.23
0.0005	0.38	0.62	± 0.25
0.005	0.38	0.62	± 0.09
0.05	0.52	0.48	± 0.11
0.5	0.33	0.67	± 0.27
2.0	0.46	0.54	± 0.03

Análisis de Varianza: $P = 0.799 > 0.05$. Los efectos marcados no son significativos.
Prueba de Tukey: $0.799 < P < 1.0$, como $P > 0.05$ entonces las diferencias marcadas no son significativas



Gráfica 2. Índice sexual (ISX) obtenido en la línea Canton-s de *Drosophila melanogaster* tratada con misoprostol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

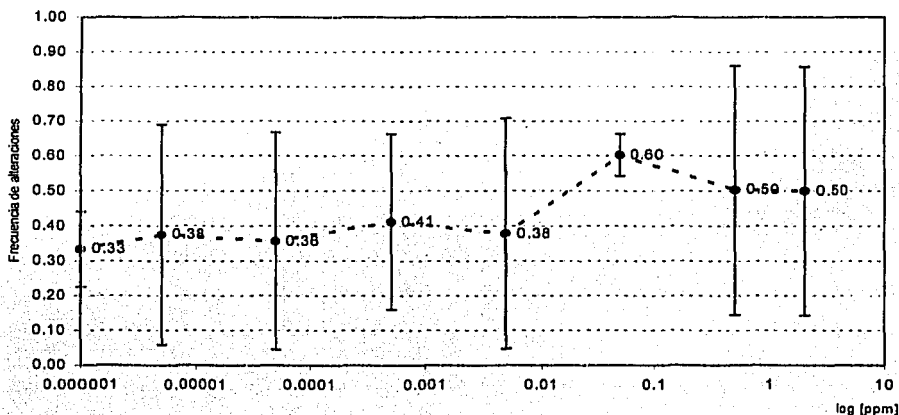


Tabla IV.
Frecuencia de Alteraciones obtenida para organismos de la
cepa silvestre Canton-S en los tratamientos con misoprostol
(Total de organismos alterados / Total de organismos recuperados por lote)



CONCENTRACIÓN [ppm]	PROMEDIO ± DESV. EST.
0	0.33 ± 0.11
0.000005	0.38 ± 0.32
0.00005	0.36 ± 0.31
0.0005	0.41 ± 0.25
0.005	0.38 ± 0.33
0.05	0.60 ± 0.06
0.5	0.50 ± 0.36
2.0	0.50 ± 0.36

En todos los casos, en los lotes experimentales el número de organismos alterados rebasó el propuesto como el mínimo de sucesos significativos para un valor de probabilidad $P = 0.05$ en las Tablas de Kastenbaum y Bowman.



Gráfica 3. Frecuencia de alteraciones (FA) inducidas con misoprostol en las líneas Canton-s de *Drosophila melanogaster*.

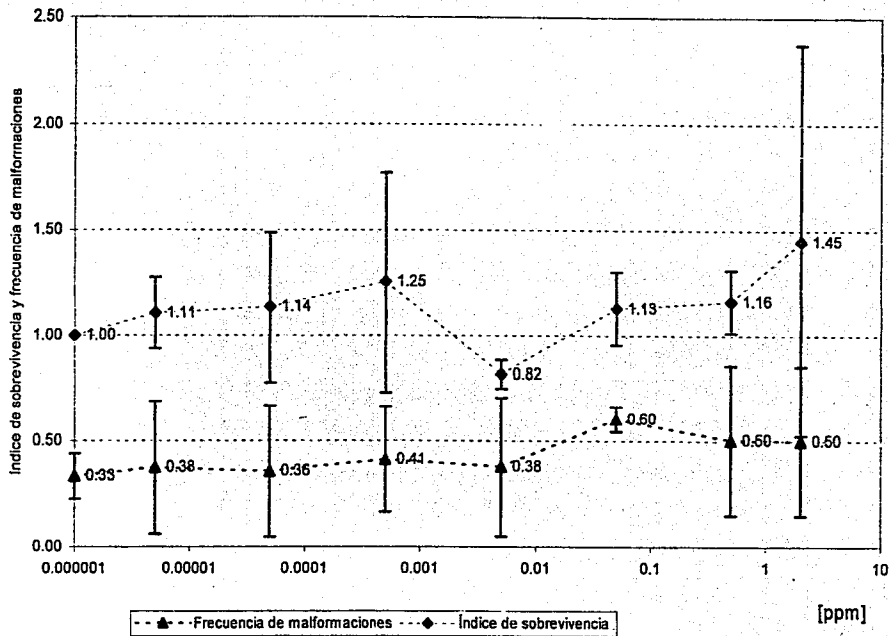
TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA V
Total de Organismos analizados y alterados por lote

CONCENTRACIÓN (p.p.m.)	NUMERO TOTAL DE ORGANISMOS ANALIZADOS POR LOTE			PLACAS GENITAL, Y ANAL (HEMBRAS)	FRECUENCIA	PLACA GENITAL (MACHOS)	FRECUENCIA	TOTAL	FRECUENCIA
	HEMBRAS	MACHOS	TOTAL						
0	194	194	388	103	0.26	34	0.09	137	0.33
0.000005	180	197	377	122	0.32	69	0.18	191	0.38
0.00005	194	195	389	122	0.31	63	0.16	185	0.36
0.0005	234	246	480	141	0.29	98	0.20	239	0.41
0.005	160	195	355	106	0.30	77	0.22	183	0.38
0.05	192	177	369	135	0.36	86	0.23	221	0.60
0.5	168	160	328	135	0.41	67	0.20	202	0.50
2.0	169	191	360	130	0.36	71	0.20	201	0.50

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 4. Comparación entre el Índice de sobrevivencia y la frecuencia de malformaciones obtenidos en la línea Canton-S de *Drosophila melanogaster* tratadas con misoprostol.



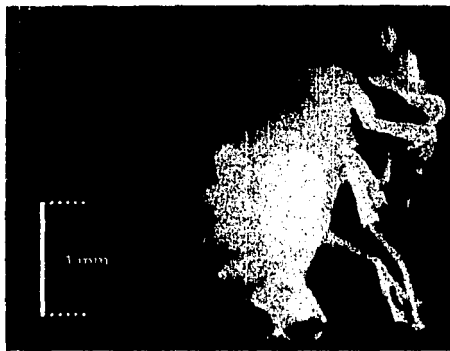
(A)



(B)

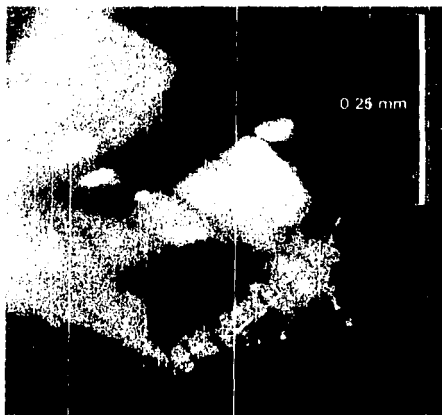


(C)

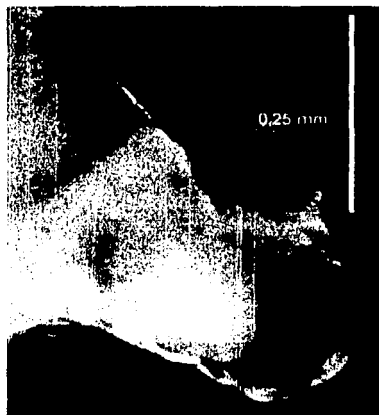


(D)

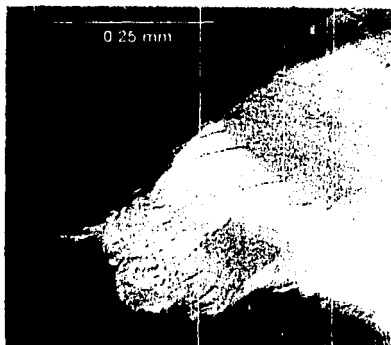
Figura 12. Aspecto de las placas genital y anal en (A) y (C) hembras no expuestas, (B) hembra expuesta al misoprostol (0.005 ppm) y (D) hembra expuesta al misoprostol (2.0 ppm)



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 13. (A) y (B) Detalle de la región final abdominal de hembras con placas anales y genitales normales y alteradas, respectivamente, recuperadas en el tratamiento con 2.0 ppm de misoprostol. (C) y (D) Acercamientos de la región final abdominal de hembras con placas anales y genitales normales y alteradas, respectivamente, recuperadas en el tratamiento con 0.005 ppm de misoprostol.



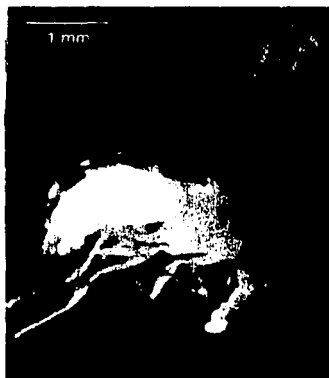
(A)



(B)

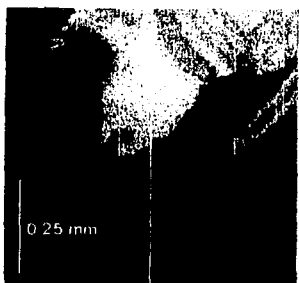


(C)

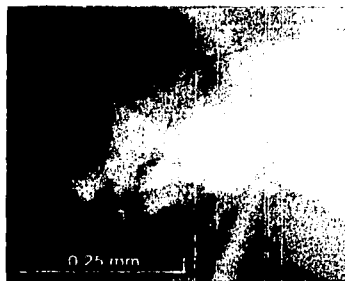


(D)

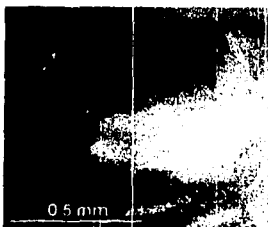
Figura 14. Aspectos de las placas genitales en (A) y (C) machos no expuestos y (B) y (D) machos expuestos al misoprostol (2.0 ppm).



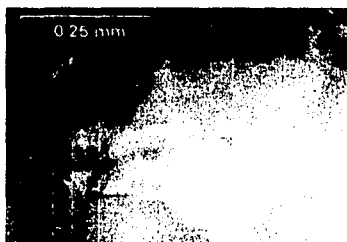
(A)



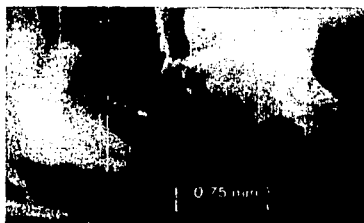
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 15. (A) y (C) Detalle de la región final abdominal de machos con placas anales y genitales normales. (B) y (D) Acercamientos de la región final abdominal de machos que presentan placas anales y genitales alteradas. (E) Acercamientos de regiones finales abdominales de machos con placa anal y genital normales (izquierda) y placas alteradas (derecha). Todos recuperados en el tratamiento de 2.0 ppm de misoprostol.

DISCUSIÓN

Las ventajas que se obtienen al trabajar con *Drosophila* como modelo para pruebas teratógenicas son muy amplias, y a medida que se avanza en la implementación de nuevos diseños experimentales, se avanza también en el conocimiento de la multitud de factores que deben ser controlados para que los estudios logren alcanzar los objetivos planteados.

Uno de los factores prioritarios a controlar en cualquier protocolo que involucre el uso de *Drosophila* es el de evitar someterla a estrés innecesario, pues esto podría, por sí mismo, tener efectos adversos sobre el desarrollo del organismo (IPCS 1984).

En el presente trabajo las medidas que se tomaron para evitar la influencia del estrés consistieron en colocar en cada vial un número aproximado de larvas (entre 100 y 150) y no un número exacto, pues esto implicaría el conteo de ellas con manipulación directa. También se consideró la exposición de los organismos a concentraciones bajas del compuesto, no solo para simular una situación de exposición semejante en un embrión humano en desarrollo, sino para impedir la introducción de mayor estrés.

Aún con estas precauciones no se puede eliminar totalmente el efecto de la manipulación, ya que el método de separación de larvas utilizado en este experimento (Nóthiger 1970) implica un cambio brusco de ambiente, cuando las larvas de tercer estadio son separadas del medio nutritivo en el que han crecido, por medio del uso de una solución concentrada de sacarosa. El método es muy eficaz, sin embargo, podría resultar un evento estresante para las larvas.

Muy probablemente las larvas respondieron a este evento desfavorable aumentando la producción de ciertas moléculas que participan en la regulación de la respuesta celular ante el estado de alerta (Páez 1998). Estas moléculas reciben el nombre de proteínas de estrés térmico o proteínas anti - estrés y su función principal es la de proteger a las células del efecto dañino del estrés permitiéndoles su recuperación y permanencia (Páez 1998).

Sin embargo, el estrés provocado por el manejo de las larvas no explica porqué la tasa de sobrevivencia en los lotes experimentales fue mayor que la del lote testigo. Como se ha mencionado, la técnica de separación de las larvas pudo generar un cierto grado de estrés en ellas que las hizo responder con la síntesis de proteínas anti - estrés. En *Drosophila* estas proteínas están implicadas en al menos dos funciones: una de ellas durante el desarrollo y/o la diferenciación y la segunda en el restablecimiento de la función celular después de un periodo de estrés (Páez 1998). Debido a que el manejo de las larvas asignadas a la serie testigo y a las experimentales fue el mismo, ésta se puede descartar como una explicación probable.

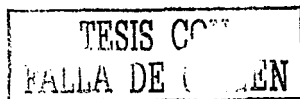
En los lotes experimentales, probablemente, el contacto con el compuesto implicó un estímulo suficiente para inducir la expresión de proteínas anti-estrés, como ocurre durante la exposición a metales pesados, alcoholes y otros venenos metabólicos (Páez 1998).

Puede suponerse que si las proteínas anti - estrés cumplen funciones importantes durante el desarrollo y la diferenciación celular, en los lotes experimentales en donde hubo un incremento en su producción, lógicamente se presentó una condición favorable de presencia y disponibilidad de estas moléculas para que los procesos bioquímicos durante el desarrollo se verificaran de manera óptima en un mayor número de organismos, situación que modificó su capacidad para sobrevivir.

Por otro lado, la prueba estadística de Kastenbaum y Bowman revela un incremento en la frecuencia de malformaciones en las placas genital y anal de hembras y en la placa genital de machos que recibieron el tratamiento con misoprostol en sus diferentes concentraciones, sin embargo, durante el examen de los organismos adultos no se apreciaron otras malformaciones, ni siquiera las que Lynch y colaboradores (1991) proponen como las más consistentes y que aparecen constantemente en este tipo de pruebas: las cerdas humerales tipo "bent" y las alas tipo "notch".

La posible explicación podría basarse, también, en los efectos de las proteínas anti - estrés durante las primeras fases de la diferenciación celular de los discos imagales, que tiene lugar justo después de la formación de la pupa, cuando se activan los genes específicos de las estructuras del adulto (Riddiford 1993).

La morfogénesis de la región terminal de la hembra comienza aproximadamente 6 horas después de la formación del pupario involucrando una serie de complejos procesos celulares, que finalmente completan el desarrollo de la región terminal a las 52 horas después de la formación del pupario (Jürgens y Hartenstein 1993). En el caso de los machos, la morfogénesis de la región terminal comienza dentro de las primeras 10 horas después de haberse formado el pupario y se completa 31 horas después de la formación del pupario (Jürgens y Hartenstein 1993). En ambos casos, la morfogénesis de la región final abdominal se completa en las últimas horas de la fase de pupa, cuando, muy probablemente, existe un patrón diferencial de disponibilidad de receptores de superficie de las membranas de las células que están en proceso de diferenciación. Quizá las células involucradas en la formación de las regiones finales abdominales en ambos sexos posean una mayor disponibilidad de receptores apropiados para la unión con el misoprostol, por lo que resultan afectadas.



Una observación que puede apoyar esta propuesta consiste en que se ha asociado a una hormona anti-estrés conocida como HSP90 con receptores de hormonas esteroides, mismas que se sabe pueden activar o reprimir la expresión de ciertos genes directamente por la unión al receptor que interactúa, a su vez, con el ADN (Riddiford 1993, Jürgens y Hartenstein 1993). Por ejemplo, para la progesterona se demostró que en ausencia de la hormona, el receptor correspondiente se asocia con varias proteínas celulares, entre ellas la HSP90, que lo mantienen inactivo. Cuando se une a la progesterona el receptor se libera de la HSP90 y cambia a una forma capaz de unirse al ADN (Páez 1998).

El misoprostol al ser un análogo de una hormona esteroide: la PGE_1 , podría exhibir un comportamiento parecido al de la progesterona. Al producirse grandes cantidades de proteínas anti-estrés, éstas anularían la acción de los receptores que podrían asociarse con el misoprostol, el cual al irse acumulando en los tejidos de la larva, superaría la tasa de síntesis de las proteínas uniéndose a los receptores que hasta ese momento influirían en las actividades de la regulación de la transcripción de genes.

Si tomamos en cuenta la información sobre el papel de las prostaglandinas en la regulación génica (ver introducción) y sabiendo que los receptores nucleares son elementos esenciales para que se activen los mecanismos de regulación inducidos por la asociación de estas moléculas, podríamos, incluso, formarnos una idea del mecanismo de acción del misoprostol que está provocando las alteraciones observadas en las regiones terminales de hembras y machos.

Si el compuesto está actuando extracelularmente, es muy probable que se esté uniendo a receptores de membrana del tipo EP, que se asocian a su vez a proteínas "G" de distintos tipos (Narumiya et al., 1999). Al unirse al receptor se generaría una cascada de señales que inducirían el incremento o disminución de sustancias que actúan como segundos mensajeros, por ejemplo, el AMP cíclico (Narumiya et al., 1999). Los segundos mensajeros activarían a proteínas como las MAPK's

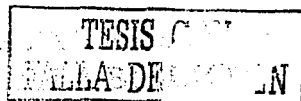
(Mitogen Activated Protein Kinase) que a su vez activarían la región A/B de receptores nucleares mediante su fosforilación, promoviendo así la actividad transcripcional (Aranda y Pascual, 2001).

La anterior explicación resulta plausible pues se ha comprobado la existencia de este mecanismo en los receptores nucleares de activación de proliferación de peroxisomas (PPAR) y sus heterodímeros, los receptores para el ácido 9 - cis retinoico (RXR) (Devchand y Wahli, 1998). Además los receptores RXR tienen un homólogo en *Drosophila*, el receptor llamado Ultraespiráculo (USP) (De Mendonca et al., 1999; Hall 1999), el cual, junto con otros receptores, está involucrado en el proceso de regulación de eventos post - embrionarios que incluyen, el paso de larva a pupa, las mudas entre cada estadio larvario y la metamorfosis (Hall, 1999).

Si el misoprostol actúa directamente en el interior celular, bastaría su asociación con su receptor nuclear específico para activar el proceso de regulación de la transcripción (Aranda y Pascual, 2001; Riddiford, 1993; Jürgens y Hartenstein 1993).

Utilizando los elementos revisados hasta aquí, que están involucrados en las posibles causas de la modificación de la tasa de sobrevivencia y de las alteraciones presentes en los organismos, podemos ahora plantear una posible explicación para el hecho observado, en todos los lotes, de un mayor número de hembras afectadas con respecto al de machos.

Dos factores conjugados podrían originar este resultado. Por un lado la disponibilidad diferencial de los receptores de superficie y el número de células presentes en los discos genitales maduros de hembras y machos como parte del dimorfismo sexual. En los discos genitales de la hembra existen aproximadamente 6500 células y en los del macho aproximadamente 9000 células (Jürgens y Hartenstein 1993). Hemos sugerido que las células involucradas en la formación de las dos regiones finales abdominales (hembras y machos) podrían presentar una distribución y presencia de receptores apropiada para la acción del misoprostol, por lo que resultan afectadas; pero en el caso de un número menor de células, en la hembra, podría observarse un efecto mayor que en el caso de los

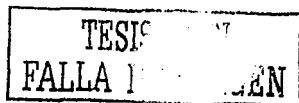


machos, que, por el contrario, presentan mas células, en donde podría observarse un efecto menor, por causa de las células que no hubiesen sido afectadas. También podría sugerirse que habrá una menor capacidad de división en las células de las hembras y por lo tanto, una menor capacidad de reparación o de sustitución de células dañadas por el compuesto.

Finalmente, la similitud entre las curvas de sobrevivencia y de frecuencia de malformaciones, sugiere la corroboración del efecto protector celular inducido por las proteínas anti - estrés. En el intervalo de concentraciones que va de 0.000005 a 0.0005 p.p.m., aumentan tanto la tasa de sobrevivencia como la frecuencia de alteraciones. El efecto protector estaría permitiendo que mas organismos alcancen la fase adulta y por lo tanto un mayor número de organismos son susceptibles de sufrir alteraciones e incluso completar su desarrollo a pesar del daño sufrido por cierto número de células.

Cuando la concentración del compuesto alcanza 0.005 p.p.m. en ambas curvas se muestra una disminución sensible en la tasa de sobrevivencia, aparejada también con una disminución de la frecuencia de alteraciones aunque de magnitud menor. Esto lo que podría indicar es que cercano a este valor de concentración se encuentra un umbral crítico en cuanto a la respuesta que puede tener el organismo en contra de los efectos adversos que este compuesto pueda causar.

Para las concentraciones mayores, de 0.05 a 2.0 p.p.m., nuevamente se observa el incremento en la tasa de sobrevivencia y también en la frecuencia de alteraciones, aunque esta última parece tender a estabilizarse para las dos concentraciones mayores (0.5 y 2.0 p.p.m.). Se puede pensar que una vez superada la concentración crítica umbral, el organismo presenta una subsecuente fase de adaptación ante la exposición a nuevas concentraciones gradualmente mayores. Tal vez el efecto protector anti - estrés sea eficiente de nuevo y tenga la misma influencia sobre los organismos, modificando su capacidad para sobrevivir y permitiéndoles alcanzar la edad adulta aún cuando presenten malformaciones evidentes.



Los panoramas interesantes que se abren para estudios posteriores pueden ser: el ampliar el rango de concentraciones mas allá de 2.0 p.p.m. para apreciar si la tendencia de la frecuencia de alteraciones realmente se estabiliza o si se sigue incrementando, al igual que el índice de sobrevivencia; o el ampliar el rango de concentraciones entre 0.0005 y 0.05 para apreciar con detalle el comportamiento de ambas curvas en este intervalo, en donde se aprecia un posible umbral de respuesta y diseñar experimentos que determinen si los organismos obtenidos con malformaciones de las placas genitales son fértiles o no, para estimar si la malformación también involucra a órganos internos de los aparatos reproductores de estos organismos.

CONCLUSIONES

1. El misoprostol no afecta de manera significativa el índice de sobrevivencia de las moscas expuestas.
2. El misoprostol no modifica la proporción de sexos de las moscas expuestas.
3. El misoprostol exhibe actividad teratogénica significativa en *Drosophila melanogaster*.
4. La actividad teratogénica del misoprostol compromete la diferenciación de las placas genital y anal en hembras y genital en machos.
5. La malformación en la diferenciación de las placas genital y anal podría ser un criterio aplicable en la identificación de posibles teratógenos.
6. La variación en el índice de sobrevivencia recobrado en los diferentes niveles de tratamiento es un estimador confiable de la variación en la frecuencia de malformaciones.
7. El modelo "in vivo" de *Drosophila* es útil en el estudio de la inducción de alteraciones durante el desarrollo.

REFERENCIAS

- ACOG News Release. (2000). "ACOG Writes FDA on Safety of Misoprostol". Carta enviada por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos a la Food and Drug Administration, fechada el 26 de Octubre del 2000.
- Adams M.D., et al. (2000). "The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*". *Science* Vol. 287. 2185 – 2195.
- Aranda A. and A. Pascual. (2001). "Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression". *Physiological Reviews* Vol. 81 No. 3:1269 – 1304.
- Ashburner M. (1989). "**Drosophila a Laboratory Handbook**" Cold. Spring. Laboratory Press. New York. USA. 1331 pp.
- Baraibar R., J. Kravel y V. Molina. (1981) "Efectos de la Agresión Farmacológica Sobre el Feto y su Ecosistema". En "**Biología y Ecología Fetal**". (J.M. Carrera. ed.) Salvat. Barcelona, España. pp. 567-597.
- Blanco Castellanos N. (2000). "**Manejo del Misoprostol en Dosis Única (200 microgrs) Intracervical en Embarazos No Viables y/o Complicados**". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 16 pp.
- Brown N.A. (1997) "Chemical Teratogens: Hazard, Tools and Clues". en: "**Embrios, Genes and Birth Defects**". (P. Thorogood. ed.) Wiley and sons. England. pp. 69-88.
- Delgado Gutiérrez G. R. (1998). "**Eficacia del Misoprostol Via Vaginal vs Intracervical en la Inducción del Trabajo de Parto, en Embarazos de 20 Semanas o mas Complicados con Muerte Intrauterina, Inmaduros o No Viables en el INPER**". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 33 pp.
- De Mendonca R.L., H. Escrivá, J.M. Vanacker, D. Bouton, S. Delannoy, R. Pierce and V. Laudet. (1999). "Nuclear Hormone Receptors and Evolution". *Amer.Zool.* 39:704 – 713.
- De Pérez Carreño E., Y. Rodríguez y G. Arzola. (2001) "**Embriofetopatías por Abuso de Drogas que Producen Dependencia**". XXXVI Congreso Nacional de Pediatría "Dra. Rita Urbina de Villegas". Septiembre 2001. Venezuela.
- Devchand R.D. and M. Wahli (1998). "PPARα: Tempting Fate With Fat". en "**Hormones and Signaling**" Vol. 1. Academic Press. USA. Pag. 235 – 256.
- Espinosa de Luna G. y J. Guizar-Vázquez. (1994). "Horizontes Embrionarios y Teratogénesis" en "**Genética Clínica**". (J.J Guizar-Vázquez ed.) El Manual Moderno. México, D.F. pp. 125-135.
- Ferguson L.R. and J.H. Ford. (1997) "Overlap Between Mutagens and Teratogens". *Mutation Research.* 396:1-8.
- Flores Miranda I.X. (2000). "**Eficacia del Misoprostol Intravaginal vs. Dinoprostona Intracervical para la Madurez Cervical e Inducción del Trabajo de Parto**". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 34 pp.
- Gritzan U., C. Weiss, J. Brennecke, and D. Rohmann. (2002). "Transrepression of AP-1 by nuclear Receptors in *Drosophila*". *Mechanisms of Development* 115: 91-100.

- Gurr M.I. and J.L. Harwood.- (1991). "Lipid Biochemistry An Introduction" Chapman and Hall, Great Britain. Pag 99 – 116.
- Hall B.L. (1999). "Nuclear Receptors and the Hormonal Regulation of *Drosophila* Metamorphosis". *Amer. Zool.* 39:714 – 721.
- Hajaj C., M.J. Marques-Dias, C.A. Kim, S. Sugayama, J. Da Paz, S.M. Huson and L.B. Holmes. (1998). "Congenital Abnormalities in Brazilian Children Associated with Misoprostol Misuse in First Trimester of Pregnancy". *The Lancet.* Vol. 351:162427 No. 9116 30/Mayo/1998.
- Hausknecht R.V. (1995) "Methotrexate and Misoprostol to Terminate Early Pregnancy". *NEJM.* Vol. 333. No. 9. 537-540.
- Hernández A. D., J.A. González, S. Prieto y M. Torres. (1996). "Carboprost metil. Parte I. Sus Acciones Farmacológicas". *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.* 22(2). 1 – 5.
- I.P.C.S. International Programme on Chemical Safety. (1984). **Principles for Evaluating Health Risks to Progeny Associated with Exposure to Chemicals During Pregnancy.** World Health Organization. Finland. Pag. 15 – 51.
- Jürgens G and V. Hartenstein. (1993). "The Terminal Regions of the Body Pattern" en: "The Development of *Drosophila melanogaster*" Vol. II. (Bate M. y A. Martínez Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pag. 687 – 746.
- Kastenbaum M.A. and K.O. Bowman. (1966). **The Minimum Significant Number of Successes In a Binomial Sample.** Oak Ridge National Laboratory. USA. 47 pp.
- Kotsonis. F.N., F.C. Dood, B. Regnier and F.E. Kohn. (1985). "Preclinical Toxicology Profile of Misoprostol". *Dig.Dis.Sci.* (11 Suppl.), 142 – 146.
- Lehninger A.L. (1982). "Bioquímica". Omega, Barcelona, España. 1117 pp.
- Lynch D.W., R.L. Schuler, R.D. Hood, and D.G. Davis. (1991). "Evaluation of *Drosophila* for Screening Developmental Toxicants: Test Results With Eighteen Chemicals and Presentation of a New *Drosophila* Bioassay". *Terat. Carc. Mut.* 11:147 – 173 (1991).
- Maglich J.M., A. Sluder, X. Guan, Y. Shi, D.D. Mckee, K. Carrick, K. Kamdar, T.M. Willson and J.T. Moore. (2001). "Comparison of Complete Nuclear Receptor Sets from the Human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Genomes". *Genome Biology* 2001, 2(8):research 0029.1 – 0029.7.
- Muñoz Hernández A. (1997). "Comparación del Potencial Aneuploidógeno de Compuestos Citostáticos en Células de las Aías de *Drosophila melanogaster*". Tesis Maestría en Ciencias. Biología. UNAM. Fac. de Ciencias. Pags. 5-9, 22-28.
- Narumiya S., Y. Sugimoto, F. Usukubi. (1999). "Prostanoid receptors: Structures, Properties and Functions". *Physiological Reviews* Vol. 79: 4. 1193 - 1226
- O'Rahilly R. y F. Muller. (1996). "Human Embriology and Teratology". Wiley-Liss Inc. U.S.A. 468 pp.
- Orihuela Moyá H. L. (1995). "Comparación entre Misoprostol un Metil Análogo de la Prostaglandina E1 Contra Oxitocina en la Inductoconducción de Trabajo de Parto, en Productos a Término". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 16 pp.

- Osorio Caballero M. (1998). "Inducción de Trabajo de Parto en Pacientes con Embarazo Mayor a 41 sdg. Con Misoprostol Vía Vaginal". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 66 pp.
- Páez Serna Y. (1998). "Interacción entre la temperatura y la genotoxicidad de algunos xenobióticos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*". Tesis Maestría en Ciencias. Biología Celular. UNAM. Fac. de Ciencias. 122 pp.
- Pastuszek A., L. Schuler, C. Speck-Martins, K. Coelho, S. Cordello, F. Vargas, D. Brunoni, I. Schwarz, M. Larrandaburu, H. Safatte, V. Meloni, G. Koren and J. Neto. (1998). "Use of Misoprostol During Pregnancy and Mobius' Syndrome in Infants". *NEJM Vol. 338* No. 26 1881 – 1885.
- Patnaik P. (1999) "A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances". Wiley and Sons – E.U.A. pp. 45-48.
- Pérez R. A. O., L. Cartaya, V. Valencia, V. Sanjurjo y T. Iliástigui. (1998). "Biosíntesis de los Productos del Ácido Araquidónico y su Repercusión sobre la Inflamación". *Rev. Cubana Estomatol.* 35(2): 46 – 51.
- Ramírez A. J.J. (1987). "Estudio Doble Ciego del Efecto Profiláctico del Misoprostol en las Lesiones de la Mucosa Gástrica Inducidas por la Administración de Ácido Acetil – Salicílico". Tesis especialidad (Medicina del Enfermo en Estado Crítico). UNAM. Fac. de Medicina. 168 pp.
- Ramos Morales. P. Et al. (1993). "Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*". McGraw Hill Serie Schaum. México. 131 pp.
- Riddiford Lynn M. (1993). "Hormones and *Drosophila* Development" en: "The Development of *Drosophila melanogaster*" Vol. II (Bate M. y A. Martinez Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pag. 899 – 939.
- Roberts P.B. (1998). "*Drosophila* a Practical Approach". 2a. ed. Oxford Univ. Press. Gran Bretaña. 389 pp.
- Rueda García M.A. (1994). "Misoprostol como inductor de Madurez Cervical y Trabajo de Parto en Embarazos Patológicos No viables". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 26 pp.
- Stanley D.W. (2000). "Eicosanoids In Invertebrate Signal Transduction Systems". Princeton Univ. Press. U.S.A. 277 pp.
- The New England Journal Of Medicine. (2001). "Manufacturer's Warning Regarding Unapproved Uses of Misoprostol". Carta enviada por Michael A. Friedman. Laboratorios Searle. Enero 4/2001. Vol. 344. No. 1.
- The New England Journal of Medicine. (2001). "Use of Misoprostol in Pregnancy". Nota editorial por Hale R.W. y S. Zinberg. Enero 14/2001. Vol. 344. No. 1.
- Vargas F.R., L. Schuler, D. Brunoni, C. Kim, V. Meloni, S. Sugayama, L. Albano, J.C. Llerena, J.C. Almeida, A. Duarte, D.P. Cavalcanti, E. Goloni-Bertollo, A. Conte, G. Koren and A. Addis. (2000). "Prenatal Exposure to Misoprostol and Vascular Disruption Defects: A Case – Control Study". *Am. J. Med. Genet.* 95 (4). 302 – 306.

- Vázquez E.M. (1988). "**Estudio Doble Ciego del Efecto Profiláctico del Misoprostol en Lesiones de la Mucosa Gástrica, Inducidos por la Administración Oral del Ácido Acetil – Salicílico**". Tesis especialidad (Gastroenterología). Fac. de Medicina. UNAM. 41 pp.
- Velazco A., L.Varela, R. Tanda, C. Sánchez, S. Barambio, S. Chami, F. Valero, S. Aragón, J. Mari y J.L. Carbonell. (2000) "Misoprostol for Abortion up to 9 Weeks Gestation in Adolescents". *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care.* 5 (4). 227 – 233.
- Wang X. and D.M. Stocco. (1999). "Cyclic AMP and Arachidonic Acid: A Tale of Two Pathways". *Molecular and Cellular Endocrinology* 158: 7 – 12.
- Wilkins A. S. (1993). "**Genetic Analysis of Animal Development**". 2a. ed. Wiley – Liss EUA. Pag. 83 – 160.
- Winnikof B., Ch. Ellertson, B. Elul, and I. Sivin. (1988) "Acceptability and Feasibility of Early Pregnancy Termination by Mifepristone – Misoprostol". *NEJM jul/ago. Vol. 7:* 360 – 366.
- Zavaleta García R.D. (1995). "**Uso del Misoprostol por Vía Intracervical para la Maduración Cervical en Embarazos de Término**". Tesis especialidad (Ginecología y Obstetricia). UNAM. Fac. de Medicina 28 pp.