



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE CONCENTRACIONES BAJAS DE
TALIDOMIDA EN LA FERTILIDAD DE MOSCAS
(*Drosophila melanogaster*) EXPUESTAS DURANTE EL
DESARROLLO LARVARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JOSÉ JESÚS HERACLIO HERRERA BAZÁN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



m. 344569

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Efecto de concentraciones bajas de talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario”

realizado por José Jesús Heraclio Herrera Bazán

con número de cuenta 09853380-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
 Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario Dr. Pablo Barrera Sánchez

Suplente Dr. Rafael Camacho Carranza

Suplente M.enC. Gerardo Rivas Lechuga

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M.enC. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

A mis padres

Agradezco a

Dra. Patricia Ramos Morales por su amistad, tiempo, paciencia y apoyo en los momentos difíciles.

A mis sinodales por sus valiosas opiniones.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética de la Fac. de Ciencias, UNAM, los que están y los que se han ido, por todos los momentos juntos.

A *Drosophila melanogaster* . . .

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) No. de Proyecto EN206803.

El material biológico utilizado fue donado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	9
I.1 TALIDOMIDA	9
I.1.1 Antecedentes históricos (ver Apéndice I)	9
I.1.2 Características fisicoquímicas.....	10
I.1.3 Farmacocinética.....	11
I.1.4 Farmacodinámica.....	12
I.1.5 Genotoxicidad.....	13
I.1.5.1 Toxicidad	13
I.1.5.2 Teratogénesis	13
I.1.5.3 Mutagénesis	15
I.1.5.4 Reprotoxicidad.....	16
I.1.6 Usos terapéuticos actuales.....	16
I.2 DROSOPHILA MELANOGASTER	17
I.2.1 Ubicación taxonómica.....	17
I.2.2 Antecedentes históricos	18
I.2.3 Características importantes como modelo biológico.....	20
I.2.4 Ciclo de vida.....	20
I.3 TOXICOLOGÍA GENÉTICA.....	22
I.3.1 Antecedentes históricos	23
I.3.2 Agentes genotóxicos.....	25
I.3.4 Sistemas de Prueba usados en Toxicología Genética	27
I.3.5 Prueba de esterilidad en <i>Drosophila melanogaster</i>	30
I.4 IMPORTANCIA DE LAS BAJAS DOSIS.....	31
I.4.1 Modelo Clásico Dosis-respuesta	31
I.4.2 Umbrales.....	35
I.4.3 Hormesis	37
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	42
II. 1 HIPÓTESIS.....	44
III. MATERIALES Y MÉTODOS (FIG. 9)	45
III.1 MANEJO DE LAS CEPAS.....	45
III.2 PREPARACIÓN DE CRUZA Y SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS.....	45
III. 3 TRATAMIENTO	47
III.4 COLECTA DE ADULTOS Y PREPARACIÓN DE CRUZAS	48
III.5 EVALUACIÓN.....	49

IV. RESULTADOS	53
IV.1 SOBREVIVENCIA DE ORGANISMOS TRATADOS (P).....	53
IV.2 FERTILIDAD DE ORGANISMOS TRATADOS (F1)	56
<i>IV.2.1 Cruza TxNT</i>	58
<i>IV.2.2 Cruza NTxT</i>	60
<i>IV.2.3 Cruza TxT</i>	61
<i>IV. 2.4 Comparación entre cruzas</i>	63
V. DISCUSIÓN	65
VI. CONCLUSIONES	76
APÉNDICE I. HISTORIA DE LA TALIDOMIDA	77
VII. REFERENCIAS	88

RESUMEN

La talidomida es un fármaco conocido por su potencial teratogénico en tejidos en diferenciación, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está determinado. Aunque existen reportes sobre su actividad mutagénica en *Salmonella* y médula ósea de ratón, la inducción de alteraciones en la estructura secundaria de DNA y la unión del residuo glutaramido de la talidomida al DNA de ratas embrionarias, su potencial mutagénico ha sido muy discutido. En 2001, Ashby, *et al* obtuvieron resultados negativos para mutagénesis en línea somática bajo diferentes formas de exposición y bioensayos con concentraciones cercanas a las máximas solubles. Trabajos anteriores de nuestro grupo han mostrado que concentraciones altas pueden enmascarar la respuesta genotóxica de ciertas sustancias. Calabrese y Baldwin (2003) han detectado que para algunos compuestos, sus efectos a altas y bajas concentraciones pueden ser inversos probablemente porque su actividad sobre las enzimas y los inhibidores metabólicos pueden resultar en una respuesta estimulante de ciertos procesos biológicos. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo acerca del efecto de bajas concentraciones de la talidomida en *Drosophila melanogaster* indican actividad mutagénica en línea somática. Hasta ahora, poco se sabe sobre los efectos de la talidomida en la línea germinal, en la que la fertilidad puede ser un buen indicador del efecto sobre estas células. El objetivo del presente trabajo es determinar si la exposición a bajas concentraciones de talidomida durante el desarrollo larvario afecta la fertilidad de organismos adultos de *Drosophila melanogaster*. Para ello, larvas de 72 ± 4 hrs de la cepa silvestre Canto-S fueron tratadas subcrónicamente con diluciones sucesivas de talidomida (0-625) en medio instantáneo. En cada concentración se recobraron hembras vírgenes y se cruzaron con machos tratados y no tratados en tres esquemas de cruce (TxNT; NTxT; TxT). Se utilizó agua destilada como diluyente y control negativo y se corrió paralelamente un testigo de cruce con organismos no tratados (NTxNT). Se recobró la primera generación filial y se determinó la fertilidad para cada concentración de cada sistema de cruce. Para realizar comparaciones entre cruces, se utilizó el índice de fertilidad corregido al índice de

fertilidad del control negativo de agua destilada de cada cruza, como variable transformada. La evaluación estadística consistió tanto en medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión como la varianza. Los resultados muestran curvas de fertilidad diferentes entre los distintos sistemas de cruza pero siempre con una mayor fertilidad en las concentraciones más bajas y una fertilidad similar al control en la más alta probada. Al parecer la fertilidad se encuentra afectada tanto por un efecto materno como por daño a material genético no ligado al sexo. La fertilidad de los organismos tratados y los no tratados es diferente, evidenciando un efecto de la talidomida sobre la línea germinal en bajas concentraciones.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Talidomida

I.1.1 Antecedentes históricos (ver Apéndice I)

La talidomida es una droga bien conocida por los efectos teratogénicos asociados predominantemente en las extremidades (limbos). La talidomida fue sintetizada originalmente como sedante en 1954 por una farmacéutica suiza y posteriormente la farmacéutica alemana Chemie Grünenthal retomó el desarrollo del compuesto. En un inicio la talidomida parecía no tener efectos secundarios asociados, su sobredosis causaba sueño prolongado pero no la muerte y la dosis letal 50 no pudo ser establecida en ratón. A partir de 1956 la talidomida fue comercializada en la República Federal de Alemania bajo el nombre de Contergan, rápidamente fue comercializada en otras ciudades del Reino Unido y en países como en Australia, Nueva Zelanda, Francia, Canadá y Brasil, entre muchos otros.

Después de numerosos estudios, en Alemania la talidomida fue asociada con el aumento de la tasa de focomelia (acortamiento de las extremidades) si era consumida en las primeras etapas de embarazo, por lo que fue retirada del mercado alemán en 1961, sin embargo, el uso de la talidomida en otros países tardó más tiempo. Tan sólo en Alemania se sabe que algunas tiendas aún vendían talidomida seis meses después de la alerta, en Italia y Japón nueve meses después y en los Estados Unidos, sólo se recuperaron alrededor de 2 toneladas de las cinco que la farmacéutica Wm. S. Merrell había distribuido como muestras médicas.

Para México existen pocos reportes de su venta y de casos de deformaciones límbicas asociados, sin embargo, la publicación LIFE del 17 de septiembre de 1962 reportó la venta de talidomida en México hasta esa fecha. Hoy en día la talidomida se vende en México de manera controlada bajo el nombre de Talizer por la compañía Serral en un envase de 50 tabletas de 100 mg que también la elabora para el sector salud.

Es imposible determinar el impacto real de la talidomida, pues no se conoce la cantidad exacta de compuesto que impactó a las poblaciones. Tan sólo en Alemania en 1960 Grünenthal manufacturó 14.6 toneladas de talidomida. Tampoco se conoce el número exacto de infantes focomélicos nacidos en el mundo por talidomida y no se sabe si la talidomida indujo abortos tempranos que no fueron asociados en ese tiempo con el uso de la talidomida. Se estima que alrededor de 10,000 a 12,000 niños fueron afectados en todo el mundo y de ellos sólo 5,000 sobrevivieron a la infancia.

La talidomida es una mezcla racémica de enantiómeros con actividades diferenciales. El descubrimiento de esta actividad diferencial produjo que la evaluación de nuevos fármacos involucrara diseños para evidenciar la actividad diferencial de los enantiómeros de un fármaco quiral. Además, permitió la creación de nuevas áreas de investigación importantes en el diseño de fármacos, como la síntesis enantioselectiva de compuestos y la investigación en reacciones catalizadas quiralmemente. En 2001, William S. Knowles, Ryoji Noyori y K. Barry Sharpless recibieron el Premio Nobel de Química por sus trabajos sobre quiralidad.

1.1.2 Características fisicoquímicas¹

La talidomida es un sólido blanco con peso molecular de 258.23g/mol, de baja solubilidad en agua (50-1000² µg/ml (193-3872 µM) a 22°C y pH=7) y etanol, y un punto de ebullición entre 269 y 271°C. La talidomida C₁₃H₁₀N₂O₄ consiste en una estructura lipofílica muy susceptible a hidrólisis, compuesta por dos anillos con un carbón asimétrico en el anillo glutaramido. La talidomida es una mezcla racémica de enantiómeros S(-) y R(+) con actividades diferenciales que bajo condiciones fisiológicas son rápidamente interconvertidos³. Otros nombres químicos de la talidomida son: [2-(2,6-dioxo-piperidine-3-yl)-iso-indole-1,3-dione], [(+/-)-N-(2,6-Dioxo-3-piperidinyl)phthalimide] y [α-(N-phtalimido)glutarimido] (fig. 1).

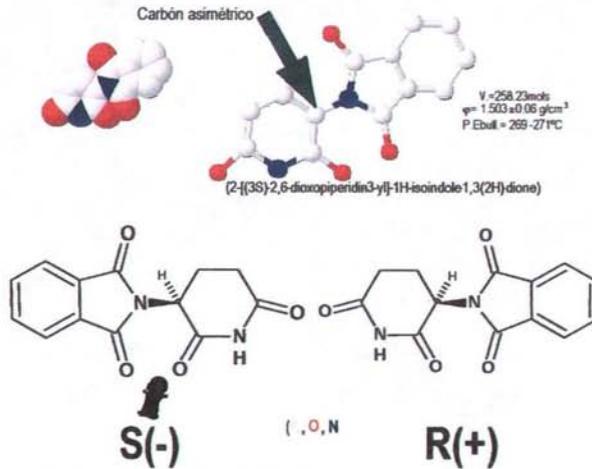


Fig. 1. Molécula de Talidomida

I.1.3 Farmacocinética⁴

Debido a su pobre solubilidad en agua la biodisponibilidad real de la talidomida es desconocida, sin embargo, en el ser humano la biodisponibilidad de la talidomida es dependiente de la ingesta paralela de alimentos y de la dosis. Se ha visto que con una dosis baja (100mg) la absorción gastrointestinal es lenta y su concentración sanguínea máxima cercana a $1 \mu\text{g/ml}$ se alcanza entre las dos y las cuatro horas posteriores. La biodisponibilidad media por aplicación oral es 40% mayor a la de aplicación rectal. No se ha determinado si la talidomida se une a proteínas plasmáticas.

Se han estimado más de 100 metabolitos de talidomida derivados de hidrólisis espontánea no enzimática que pueden ser encontrados en el plasma⁵, estos metabolitos son especie-específica, lo que podría explicar parcialmente las acciones especie-específica de la talidomida. Parman (1999) sugiere que la hidrólisis de la talidomida genera radicales libres que causan daño oxidativo en macromoléculas celulares embrionarias⁶. Hasta ahora, no se ha encontrado metabolismo de la talidomida por citocromos

humanos P450, sin embargo, estudios recientes sugieren que la talidomida es bioactivada por la enzima prostaglandina-H₂ sintetasa (PHS)⁷.

En el hombre, 40% de la talidomida administrada oralmente es excretada por vía renal como productos de hidrólisis y sólo cerca del 1% de la talidomida es excretada sin metabolizar en la orina. La vida media (T_{1/2}) de la talidomida varía entre 3.0 y 14.6 hrs, aunque se ha reportado una vida media significativamente mayor en tratamientos crónicos en pacientes con cáncer de próstata.

I.1.4 Farmacodinámica⁸

El mecanismo de acción de la talidomida no está totalmente estudiado pero se ha relacionado con modulación inmune, cambios en los niveles de citocina y la inducción de antiangiogénesis.

Los efectos inmunomodulatorios de la talidomida han sido muy discutidos e incluyen la disminución de células T CD4-positivas circulantes y la estimulación de células T CD8-positivas produciendo una disminución de la relación CD4/CD8. Además, la talidomida parece producir un cambio en la respuesta de células T Th1 a Th2, i.e., un cambio de una respuesta inmune altamente citotóxica dominada por células T y disparada principalmente por Interferon- γ a una respuesta inmune mediada por anticuerpos e inducida principalmente por interleucina-4. La talidomida también modifica varios receptores de integrinas y otros receptores membranales en leucocitos incluyendo el receptor CD44 y la molécula de adhesión intracelular 1(ICAM-1) además de inhibir la quimiotaxis en neutrófilos.

El efecto más conocido de la talidomida es probablemente la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se han sugerido varios mecanismos de inhibición de TNF- α incluyendo la degradación acelerada del RNAm de TNF- α o por la unión a la glicoproteína ácida alfa1 que se sabe

presenta actividad anti-TNF- α . Por otra parte, la talidomida parece bloquear la actividad del factor crítico de transcripción involucrado en la respuesta inmune y el crecimiento celular NF- κ B, que es capaz de traslocarse al núcleo y regular muchos genes incluyendo el de TNF- α . La talidomida también inhibe la producción de IL-6 e IL-12 de monocitos, probablemente por el bloqueo de NF- κ B.

Por otra parte, en 1994 se describió una fuerte actividad antiangiogénica en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; Vascular, Endotelial Growth Factor) y por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF; basic Fibroblast Growth Factor)⁹.

I.1.5 Genotoxicidad

I.1.5.1 Toxicidad¹⁰

La LD₅₀ (dosis letal que produce la muerte del 50% de los organismos expuestos) de la talidomida administrada de manera oral en rata es 113 mg/kg mientras que su LD₅₀ por aplicación sobre piel es de 1550 mg/kg. En ratón, la LD₅₀ por administración oral es 2000 mg/kg, mientras que la dosis letal más baja publicada (Ldlo) por aplicación intraperitoneal es de LDLO 800 mg/kg.

I.1.5.2 Teratogénesis

No se han encontrado efectos teratogénicos en ratas, ratones, gatos y hámsteres¹¹, sin embargo, los efectos teratogénicos de la talidomida han podido ser inducidos en conejas preñadas con dosis de 100-300mg/kg/d¹², macacos y pollos¹³, pero no parece existir relación entre la cantidad de talidomida ingerida y la severidad de la malformación.

En el hombre, se sabe que la talidomida induce focomelia con distintos grados de severidad dependiendo de la susceptibilidad de los individuos y siempre que sea tomada en el periodo de organogénesis embrionaria, entre los días 21 y 40 de gestación. En algunos casos una sola dosis de 100 mg parecía ser suficiente para causar focomelia severa, mientras en otros casos la misma dosis podía producir sólo anomalía media o no presentar ningún efecto en el producto, sin embargo, casi 100% de mujeres expuestas a la talidomida durante este periodo de gestación tuvieron bebés con defectos¹⁴.

La talidomida produce malformaciones predominantemente en los miembros, sin embargo, casi cualquier órgano puede ser afectado. El embrión humano presenta las primeras señales microscópicas de futuros brazos a los diez días de gestación mientras que a los 42 días son visibles a simple vista (aunque el embrión es apenas de una pulgada de largo), el desarrollo de brazos ligeramente más temprano que el de piernas podría explicar la mayor frecuencia de focomelia con brazos afectados que de piernas¹⁵ pues en las etapas iniciales del embarazo, las mujeres desconocen su estado y por tanto el consumo de sustancias y fármacos no es controlado.

Un segundo gran grupo de órganos afectados son los oídos, ojos, nervios faciales, músculos oculares y glándulas lagrimales. Newmann (1992)¹⁶ reportó que los órganos internos más comúnmente afectados son el corazón, riñones y los tractos urinario, digestivo y genital. El porcentaje de mortalidad temprana de bebés afectados es alrededor de 40% y se debe principalmente a malformaciones internas severas¹⁷. Por otra parte, es posible que aquellos infantes cuyas madres consumieron talidomida y no presentaron malformaciones al nacimiento, presenten problemas de salud significativos en la edad adulta por malformaciones sutiles en órganos internos no detectadas al nacimiento¹⁸, además no se conoce el número de abortos tempranos que la talidomida pudo inducir pues pudieron ocurrir antes de que la mujer se enterara que estaba embarazada.

De manera general, la teratogenicidad de la talidomida puede resultar en focomelia, malformación de cráneo, microftalmia, anoftalmia, deformidades o ausencia del pabellón auditivo y atresia de canales externos con baja posición de orejas, nariz ancha, paladar hendido, malformaciones en sistema respiratorio, anomalías cardiovasculares, malformaciones de tracto gastrointestinal, ausencia de ducto biliar, tracto urinario y anomalías en riñón¹⁹.

Jason *et al.*²⁰ han sugerido que el estrés oxidativo de la hidrólisis de la talidomida contribuye a su potencial teratogénico, sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la talidomida induce efectos teratogénicos aun no se encuentra resuelto.

I.1.5.3 Mutagénesis

Los efectos mutagénicos de la talidomida han sido muy discutidos. M.K. Jensen *et al* (1965), C.E. Benda *et al* (1963), G. Giacomello *et al* (1964), J.D. Amirkhanian (1970) y C. Roux *et al.* (1971) indican evidencia de mutagenicidad de la talidomida²¹. Mackenzie (1983) reportó que la talidomida es mutagénica en *Salmonella* y médula ósea de ratón. Huang y McBride (1990)²² han reportado que la talidomida puede inducir alteración *in vivo* en la estructura secundaria de ADN de embriones de ratas y que el anillo glutaramido de la talidomida es capaz de unirse al ADN de embriones de ratas²³. Asimismo, existen algunos reportes de hijos de padres focomélicos por talidomida que presentan malformaciones sugiriendo un efecto transgeneracional²⁴.

En contra parte, Read²⁵ señaló que si la talidomida tenía efectos mutagénicos no tenían por que ser afectados predominantemente los limbos. Ashby *et al* (1997)²⁶ corrió una batería de pruebas de 32 bioensayos con talidomida obteniendo resultados negativos. Anteriormente existían siete publicaciones que negaban la inducción de mutaciones por talidomida. Con base en esta batería de pruebas se han

publicado diversos artículos que rechazan la actividad mutagénica de la talidomida (p.e., Smithells, 1998).

I.1.5.4 Reprotoxicidad

Existen algunos reportes que señalan la ausencia de reprotoxicidad de la talidomida en pollos²⁷ y en conejos²⁸, sin embargo, las metodologías son poco claras y los tratamientos son aplicados a organismos adultos con gónadas formadas. La fertilidad en conejos ha sido evaluada en dosis altas. En la actualidad no existen reportes donde los tratamientos sean aplicados a organismos con células gonadales indiferenciadas para evaluar reprotoxicidad.

I.1.6 Usos terapéuticos actuales

En 1965 el médico israelí Jacob Sheskin reportó la eficiencia clínica de la talidomida en el tratamiento de una complicación inflamatoria de la lepra (eritema nodosum leprosum; ENL). En 1967, la Organización Mundial de la Salud confirmó estos resultados en un estudio clínico de doble ciego. En 1997, la FDA aprobó la talidomida en el tratamiento de ENL.

Actualmente la talidomida es utilizada principalmente para el tratamiento de ENL, enfermedad de Behcet, síndrome inflamatorio intestinal (SII), artritis reumatoide, sarcoidosis, úlceras aptosas en infecciones de VIH y lupus eritematoso sistémico, entre otras patologías.

Diversos tipos de cáncer, sarcoma de Kaposi, carcinomas renales, cáncer de próstata, melanomas malignos, cáncer de seno, cáncer de ovario, cáncer hepatocelulares, mesoteliomas malignos y tumores neuroendocrinos metastáticos entre otros, han sido tratados con éxito con talidomida. D'amato (1994)

sugiere que los resultados positivos en el tratamiento de procesos cancerosos se hallan relacionados a su efecto antiangiogénico, sin embargo, su mecanismo de acción aún es desconocido. Por otra parte, en el uso clínico se aprovechan sus propiedades anestésicas, antipiréticas e hipnóticas para mitigar el dolor en enfermos de SIDA, lepra y diversos tipos de cáncer²⁹.

Muchas asociaciones integradas por personas afectadas por talidomida de todo el mundo han rechazado el regreso de la talidomida con fines terapéuticos, ya que si bien ha resultado eficaz en el tratamiento de diversas enfermedades, en países en desarrollo como Brasil la baja información y pobre supervisión de los sistemas de salud en el uso de la talidomida en casos de tratamiento de pacientes leprosos ha causado y hoy en día sigue originando, un alto número de nacimientos con las malformaciones típicas de la talidomida³⁰.

1.2 *Drosophila melanogaster*

1.2.1 Ubicación taxonómica

El género *Drosophila* (Orden Diptera; Familia Drosophilidae) es el más estudiado desde el punto de vista genético y citológico³¹. *Sophophora* es uno de los ocho subgéneros (*Hitodrosophila*, *Pholadoris*, *Dorsilopha*, *Phloridosa*, *Siphlodora*, *Sordophila*, *Sophophora*, y *Drosophila*) en los que se divide el género *Drosophila*, a su vez este subgénero es dividido en cuatro grupos: *obscura*, *saltans*, *willistoni*, y *melanogaster*³². *Drosophila melanogaster* (fig. 2), perteneciente al grupo *melanogaster* y subgrupo *melanogaster* es una de las 900 especies descritas para el género y es el organismo multicelular con mayor cantidad de información genética disponible³³. *Drosophila melanogaster* significa afin (*phila*) al rocío (*droso*) de vientre (*gaster*) negro (*melano*) y es conocida comúnmente como mosca del vinagre, sin embargo es llamada conjuntamente con *Ceratitis capitata* (Familia Tephritidae) como mosca de la fruta.

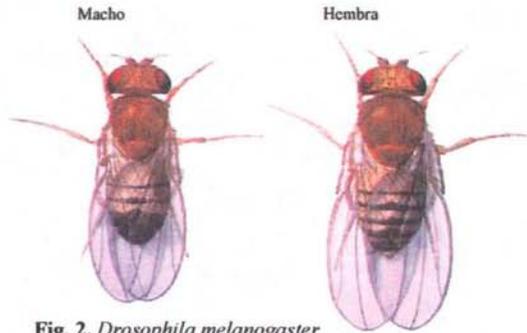


Fig. 2. *Drosophila melanogaster*

I.2.2 Antecedentes históricos

Thomas Hunt Morgan en 1910 seleccionó a *Drosophila melanogaster* para sus trabajos sobre herencia, encontró una mosca mutante de ojos blancos iniciando así el estudio de la genética de *Drosophila* junto con sus estudiantes A.H. Sturtevant, C.B. Bridges y H.J. Müller en el “Fly Room” de la Universidad de Columbia (fig. 3)³⁴.

En 1911, Morgan propuso que los genes para ojos blancos, cuerpo amarillo y alas miniatura en *Drosophila* se hallaban ligados al cromosoma X, y en 1912 determinó que no existían entrecruzamientos meióticos en el macho de *Drosophila*, obteniendo el Premio Nobel en 1933 por aportar evidencias de la teoría cromosómica de la herencia. Sturtevant en 1913 construyó el primer mapa genético y demostró que los genes se hallaban arreglados en forma lineal. Bridges en 1914 descubrió la no disyunción meiótica en *Drosophila*³⁵ y Müller en 1918 introdujo el uso de balanceadores, cromosomas portadores de inversiones que permiten el mantenimiento estable de

mutaciones letales en heterocigosis; actualmente ésta técnica sólo es compartida por el nematodo *Caenorabditis elegans* y aún no es posible desarrollarla en ratón.



Fig. 3. (A) Bridges (*izq.*) y Sturtevant (*de.r*) en 1920. (B) Morgan en 1917. (C)“Flyroom” en la Universidad de Columbia Fotos: (Rubin, 2000)

T. S. Painter de la Universidad de Texas obtuvo en 1934 el primer mapa físico de genes basado en cromosomas politénicos que incluía la localización cromosómica de varios genes, los cromosomas politénicos podían ser fácilmente vistos al microscopio porque después de numerosas rondas de replicación, los cromosomas se mantienen alineados y pueden identificarse bandas citológicas, sin embargo, en 1935 y 1938 Bridges publicó los mapas citogenéticos de cromosomas politénicos que asignaban genes a secciones y bandas específicas que aún en la actualidad son utilizados. Ahora sabemos que estos mapas son a menudo lo suficientemente exactos para localizar genes dentro de un intervalo menor a 100kb³⁶.

Desde entonces y hasta la reciente publicación de su genoma completo en marzo del 2000, *Drosophila melanogaster* ha desempeñado un papel esencial en el desarrollo de las neurociencias, la biología del desarrollo, la evolución, y la ecología, entre otras áreas científicas, pero fundamentalmente ha producido un avance exponencial en el desarrollo de la genética y la toxicología genética.

I.2.3 Características importantes como modelo biológico

D. melanogaster es un organismo eucarionte con dimorfismo sexual claro en el adulto, de progenie numerosa y con un ciclo de vida corto de diez días a 25°C, lo cual permite un rápido análisis de gran cantidad de progenie y distinguir entre tratamientos crónicos, agudos y fraccionados³⁷.

D. melanogaster posee sólo cuatro cromosomas, totalmente mapeados y secuenciados y muestra politenia en todos los tejidos larvarios. Su genoma mide 180Mb, de los cuales un tercio es heterocromatina, que consiste principalmente en secuencias cortas y simples de elementos repetidos de algunas megabases, ocasionalmente interrumpidos por elementos transponibles insertados y arreglos en *tandem* de genes de RNAr³⁸. Se estima que las 120Mb de eucromatina contienen 13,601 genes³⁹ y están comprendidos en dos largos autosomas y el cromosoma X; el par cuatro y el cromosoma Y son pequeños y contienen sólo alrededor de 1Mb de eucromatina.

D. melanogaster presenta sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P-450 y del sistema de citocromo oxidasa, similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos^{40, 41} que permiten la bioactivación de promutágenos. Además, el costo de su mantenimiento es moderado y sencillo en espacios reducidos y actualmente se dispone de numerosos arreglos genéticos y cromosómicos en diversos bancos de moscas alrededor del mundo.

I.2.4 Ciclo de vida⁴²

Drosophila melanogaster, como todo insecto holometábolo, presenta las etapas de huevo, larva, pupa y adulto en su ciclo de vida (**fig. 4**) de alrededor de 10 días de duración, pasando de huevo a adulto, a través de tres estadios larvarios (primero, segundo y tercer instar) cuya última etapa entrará al

proceso de pupación en el que se produce la histólisis de todos los tejidos larvarios –excepto línea germinal– y la diferenciación y organización de nuevos tejidos a partir de discos imagales, paquetes celulares determinados desde la emergencia de la larva y que durante las etapas larvarias presentarán una proliferación acelerada (sin politenia) hasta poco después de iniciar la pupación (24hrs en el caso del ala), momento en el cual empieza la diferenciación para dar origen a las diferentes estructuras del adulto o imago. Existen diversos discos imagales para las respectivas estructuras del imago como ojos, antenas, alas, patas, labium, labrum, halterios y genitales entre otros.

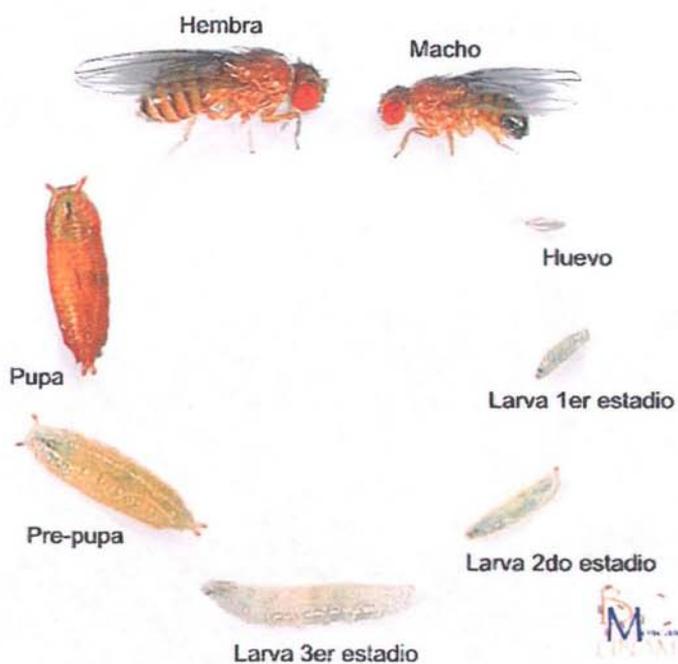


Fig. 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

I.3 Toxicología Genética

De manera natural todos los seres vivos estamos expuestos a numerosos agentes físicos, químicos y biológicos. Las catástrofes naturales y el desarrollo de nuevas tecnologías, industrias y productos que marcaron la rápida industrialización en el siglo XX han provocado que los seres vivos estemos en contacto no sólo con mayores concentraciones de sustancias químicas sino también ante nuevas sustancias y mezclas químicas extrañas a los seres vivos, xenobióticas⁴³. Actualmente, se utilizan en la industria mundial numerosas sustancias químicas diferentes, un número importante de ellas son utilizadas en productos de consumo humano directo, como los fármacos o los conservadores de alimentos. Tan sólo en México, se generan al año 8 millones de toneladas de residuos considerados por la legislación mexicana como peligrosos⁴⁴.

Con frecuencia, estas sustancias son potencialmente tóxicas y pueden alterar a corto, mediano o largo plazo los sistemas fisiológicos, bioquímicos e inclusive genéticos de los seres vivos, causando enfermedades o la muerte. Se considera que cuando las sustancias alteran la expresión, composición o arreglo del genoma de un individuo, tienen actividad genotóxica.

La toxicología es la disciplina científica que estudia el daño real y potencial de ciertas sustancias químicas a los seres vivos y a los ecosistemas, su relación con la exposición y los mecanismos de acción, diagnóstico, prevención y tratamiento⁴⁵, y busca obtener la información necesaria para definir los límites de seguridad de la exposición a los diversos agentes químicos⁴⁶.

La toxicología genética o genotoxicología es la disciplina científica que estudia las interacciones entre los factores ambientales físicos y químicos y la expresión, composición y arreglo del genoma de los seres vivos, su relación con la exposición y sus mecanismos de acción, y los efectos

genéticos derivados de la exposición, sus consecuencias a nivel de patología, su diagnóstico, prevención y tratamiento.

I.3.1 Antecedentes históricos

La existencia de la Toxicología como disciplina científica está ligada con el alquimista Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim-Paracelsus (1493-1541) quien consideraba que la experimentación es esencial en la evaluación de respuestas químicas, que las propiedades tóxicas y terapéuticas de una sustancia son muchas veces indistinguibles, excepto por la dosis, y que uno podría encontrar especificidad en los efectos tóxicos de las sustancias químicas⁴⁷, "*dosis sola facit venenum*" (la dosis hace al veneno). Sin embargo, la historia de la toxicología genética está fuertemente ligada al desarrollo de la genética.

En 1865, los trabajos de Gregorio Mendel sobre patrones de herencia dieron inicio a la genética. A principios del siglo XX, con el redescubrimiento en 1905 de las teorías mendelianas por Hugo de Vries en Holanda, Carl Correns en Alemania y Erich von Tschermak-Seysenegg en Austria, quedó claro que todos los organismos poseían factores transmitidos por herencia, probablemente localizados en los cromosomas. A partir de entonces se intentó hallar las causas de los cambios en las partículas hereditarias. Hugo de Vries acuñó el término *mutación* en 1901 para nombrar a los cambios morfológicos de plantas del género *Oenothera* y sugirió en 1904 que los rayos-X, recién descubiertos (1895), eran capaces de alterar los factores hereditarios.

Herman Müller definió las mutaciones como cambios en la cantidad, calidad y arreglo de los genes –término acuñado en 1909 por W. Johannsen– y demostró la inducción de alteraciones genéticas por rayos X en *Drosophila melanogaster* en 1927. Stadler reportó que los rayos-X eran mutagénicos en

plantas y pocos años después en 1912, demostró la mutagenicidad de la luz ultravioleta⁴⁸, iniciándose la investigación sobre mutagénesis de radiaciones. Aunque algunos reportes aparecían en la literatura científica acerca de la posibilidad de mutagénesis química, no se estableció como área de interés genético sino hasta 1942 con los trabajos de Charlotte Auerbach y J.M. Robson⁴⁹ sobre la inducción de mutaciones en *Drosophila melanogaster* por el gas mostaza, el descubrimiento de aberraciones cromosómicas inducidas por uretano por Oehlkers⁵⁰ en Alemania, y el descubrimiento de Rapoport⁵¹ de la mutagenicidad del óxido de etileno, ethylenimina, epiclohidrina, diazometano, dietil sulfato, glicidol y otras muchas sustancias.

Auerbach⁵² divide la historia de la genotoxicología en cinco periodos:

1900-1927: Origen de los conceptos de mutación y tasas de mutación; formulación de las preguntas básicas acerca de su naturaleza y el desarrollo de métodos para medirlas

1928-1940: Desarrollo de un concepto refinado de mutación y descubrimiento de la mutagénesis de rayos-X

1941-1953: Conocimiento de la mutagénesis química y el desarrollo de nuevos métodos de análisis para evaluar mutación usando microorganismos.

1954-1965: Descubrimiento de la estructura del ADN, integración de la bioquímica al concepto de mutación y crecimiento de la importancia de los procesos celulares en la mutagénesis

1966-al presente: Expansión de la caracterización molecular de la mutación.

A partir de 1969, con la fundación de la *Environmental Mutagen Society* (EMS) por A. Hollaender, J. Lederberg, J. Crow, J. Neel, W. Russell, H. Malling, F. J. de Serres, y M. Meselson entre otros, se inició una carrera para probar la mutagenicidad de cientos de sustancias químicas. Aunque la mutagénesis química consolidó a la toxicología genética, hoy en día conocemos mecanismos indirectos de genotoxicidad como la peroxidación lipídica y los aductos proteicos mediante los cuales ciertos

grupos químicos producen daño genotóxico, aunque no interactúan con el material genético directamente⁵³ y también, la participación de mecanismos epigenéticos que interfieren en su regulación y expresión como la acetilación histónica⁵⁴, la metilación del ADN⁵⁵, los sitios específicos de unión a ADN como homeodominios, y los dominios “Zinc-fingers”, entre otros⁵⁶.

I.3.2 Agentes genotóxicos

Actualmente la toxicología genética se encarga de detectar las alteraciones genéticas producidas por agentes genotóxicos, tanto en células de la línea somática como de la germinal, así como en células indiferenciadas y a partir de ello definir sus efectos sobre la integridad genética y hereditaria de los seres vivos.

Un agente genotóxico puede producir diferentes eventos genéticos terminales (transición, transversión, pérdida, inversión, translocación, duplicación, rompimiento de cromosomas, no disyunción, recombinación de cromátidas hermanas, etc.) que pueden modificar los procesos celulares de regulación genética y afectar la división y organización celular ocasionando mutagénesis, teratogénesis o carcinogénesis⁵⁷, dependiendo del linaje de las células afectadas.

Un mutágeno es aquel agente capaz de ocasionar alteraciones genéticas heredables en células germinales⁵⁸. Un teratógeno es aquel agente capaz de producir alteraciones en los planos de desarrollo embrionarios por eventos mutagénicos o epigenéticos en línea somática que interfieren con la expresión del material genético. Un carcinógeno es aquel agente capaz de alterar los mecanismos normales de división celular en distintas estirpes celulares somáticas que desencadenan el desarrollo de carcinomas, leucemias, sarcomas, etc. Se ha demostrado que la mutagénesis somática –entre otros mecanismos- juega un papel importante en el desarrollo de los procesos cancerosos⁵⁹.

Algunas sustancias genotóxicas son en realidad inertes para los seres vivos y es a través del metabolismo eucarionte que son bioactivadas o biotransformadas a metabolitos activos capaces de interactuar con diversas macromoléculas celulares como las proteínas o los ácidos nucleicos. Estas sustancias son llamadas progenotóxicos⁶⁰. Algunos compuestos o moléculas que alteren la permeabilidad de las membranas celulares, actúen como acarreadores membranales, o modifiquen la estructura química de una sustancia son capaces de facilitar la producción de daño por otro agente genotóxico. Este tipo de sustancias, aunque inertes para los seres vivos, actúan sinérgicamente con sustancias genotóxicas para producir daño genético⁶¹ y por el tipo de actividad se denominan co-mutágenos, co-teratógenos y co-carcinógenos.

1.3.3 Factores relacionados con la genotoxicidad de una sustancia⁶² (fig. 5)

La genotoxicidad de una sustancia está determinada por múltiples factores como son:

- Su naturaleza fisicoquímica, lo que determina su estabilidad, dispersión, distribución (aire, agua, suelo o alimentos)
 - Su persistencia y permanencia en el ambiente
 - Su presencia como una sustancia individual o formando mezclas complejas
 - La vía o modo de exposición al compuesto (aire, oral, piel o parenteral)
 - La intensidad de la exposición: concentración o dosis, cantidad y duración de la exposición
- Las condiciones inherentes al organismo expuesto como son: especie, edad, etapa del ciclo de vida, sexo, raza, constitución genética, características metabólicas, estado nutricional y de salud, entre otras.

- Los procesos de absorción, la producción de metabolitos por bioactivación, la acumulación en órganos, la excreción, la distribución y la disponibilidad sistémica del compuesto durante su farmacocinética
- La producción inmediata de una respuesta o una respuesta retrasada

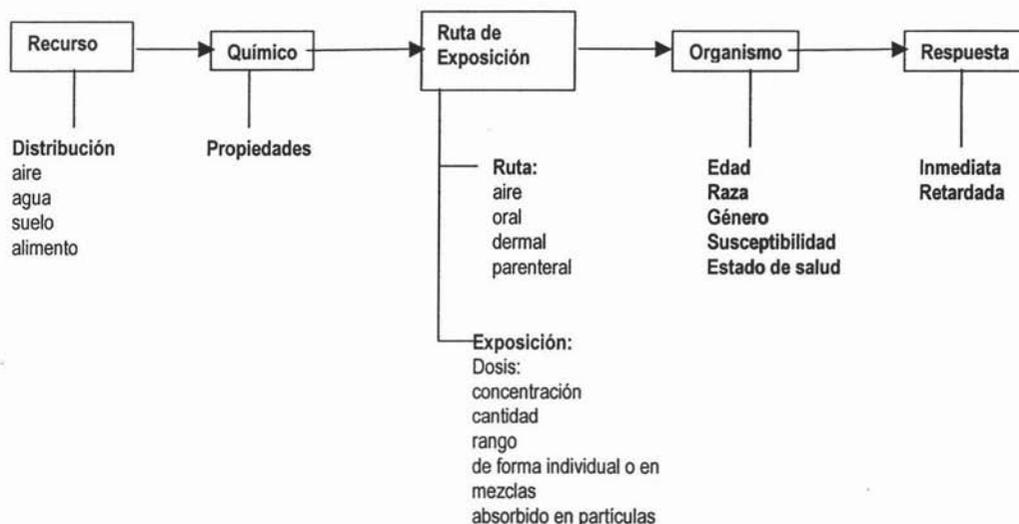


Fig. 5 Algunos factores críticos que influyen la interacción entre los organismos y una sustancia química

1.3.4 Sistemas de Prueba usados en Toxicología Genética

La toxicología genética ha desarrollado pruebas y métodos de evaluación para identificar de forma sencilla, rápida, confiable y a bajo costo a agentes químicos potencialmente mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos, antes de que la integridad del genoma de los seres vivos y la salud humana se vean afectadas. Paulatinamente, la mayor disponibilidad tecnológica y científica ha favorecido el uso de pruebas que involucran a diferentes organismos para evaluar genotoxicidad.

Un sistema de prueba es una metodología estandarizada para evaluar determinados eventos genéticos terminales⁶³. Además del bajo costo, corta duración del bioensayo, fácil evaluación, fácil manejo y tamaño de muestra suficiente, es necesario que los sistemas de prueba sean sensibles y las respuestas evaluadas, altamente reproducibles. La sensibilidad se refiere a la capacidad del sistema para detectar con facilidad y exactitud estadística un efecto inducido. La reproducibilidad está relacionada con la precisión estadística en la respuesta de un sistema en y entre grupos de investigación.

Los sistemas de prueba pueden ser utilizados en hilera o en baterías de prueba para evaluar genotóxicos. La aproximación en hilera consiste en el uso de una sola prueba que debe ser rápida, confiable y barata, este diseño es utilizado para probar gran número de sustancias a la vez. Sólo aquellos agentes que produzcan respuestas positivas, serán evaluados posteriormente con pruebas más específicas y costosas. El empleo de una batería de pruebas implica el uso de diferentes sistemas de prueba para evaluar una -o pocas- sustancias en varias concentraciones. Un agente será no genotóxico cuando sea inactivo en todos los sistemas de prueba de la batería⁶⁴. En contraparte, aquel que produzca una respuesta positiva en cualquier bioensayo empleado en la batería será considerado como posible genotóxico⁶⁵.

La selección de la batería de pruebas que se va a utilizar debe hacerse, tomando en consideración los siguientes puntos:

- 1) Las pruebas seleccionadas deben incluir diversos tipos de organismos, tanto procariontes como eucariontes.
- 2) La combinación de las pruebas debe detectar más de un tipo de daño genético que mida diferentes mecanismos de genotoxicidad.
- 3) Deben incluirse pruebas *in vivo* e *in vitro*.
- 4) Las pruebas *in vitro* deben detectar metabolitos activos derivados de bioactivación.

- 5) Los sistemas de pruebas considerados en una batería deben ser de bajo costo, corta duración, fácil evaluación y manejo, alta sensibilidad y reproducibilidad y producir progenie numerosa.
- 6) El diseño de una batería de pruebas debe considerar y cubrir lo más ampliamente posible todos los factores que intervienen en la genotoxicidad de una sustancia.

Aunque en la actualidad existen numerosos sistemas de prueba en diferentes modelos biológicos, solamente se utilizan unos pocos para evaluar agentes químicos ambientales. Algunas de los sistemas de prueba más utilizados en las baterías y requeridos por los organismos reguladores internacionales^{66, 67} son:

- **Prueba de aductos a proteínas.** Procedimiento *in vitro/in vivo* que detecta y cuantifica la cantidad de aductos unidos covalentemente a hemoglobina y albúmina.
- **Prueba de aductos a ADN.** Procedimiento *in vitro/in vivo* que detecta y cuantifica la cantidad de aductos unidos covalentemente al ADN.
- **Ensayo cometa.** Procedimiento *in vitro/in vivo* que permite la identificación de daño al ADN causado por clastógenos como rompimientos, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos y sitios de reparación por escisión incompleta.
- **Prueba de mutación de locus específico HPRT.** Técnica *in vivo* que detecta mutaciones puntuales, corrimiento de marcos de lectura y pequeñas deleciones al medir la frecuencia de linfocitos T resistentes a análogos purínicos deficientes de la enzima HPRT que cataliza la conversión a análogos purínicos como la 6-tioguanina, que tienen efectos citotóxicos.
- **Prueba de aberraciones cromosómicas en linfocitos.** Metodología que permite evaluar aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales en linfocitos de sangre periférica en organismos expuestos a clastógenos y aneuploidógenos.

- **Prueba de micronúcleos.** Evalúa la frecuencia de linfocitos o células epiteliales exfoliadas con micronúcleos causados por la exposición a clastógenos y aneuploidógenos.
- **Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (SCE).** Evalúa en cromosomas metafásicos de linfocitos de sangre periférica la modificación en la frecuencia de intercambio de ADN asociada a la exposición a clastógenos y recombinógenos entre los productos de réplica en loci homólogos.
- **Prueba de Ames.** Permite la detección de mutágenos cuantificando el número de reversiones de mutaciones en *Salmonella his-*.
- **Prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila* (SLRLT).** Técnica *in vivo* que permite la expresión de genes letales recesivos del cromosoma X de machos expuestos a mutágenos. Las mutaciones letales se muestran como un desbalance en la proporción de sexos de la progenie.

I.3.5 Prueba de esterilidad en *Drosophila melanogaster*

La prueba de esterilidad en *Drosophila melanogaster* es uno de los primeros bioensayos utilizados para evaluar un posible agente genotóxico y nos ayuda a organizar baterías de pruebas genéticas posteriores pues es un buen indicador de daño en línea germinal.

En esta prueba⁶⁸, grupos de machos adultos son alimentados con las concentraciones seleccionadas del compuesto a probar durante un periodo definido de tiempo. Al término de éste, los machos de cada concentración son cruzados con hembras vírgenes en una relación 2:1 en frascos con medio de cultivo fresco. Después de uno o dos días, dependiendo del procedimiento adoptado, los machos son separados de las hembras que se regresan al mismo frasco (o a medio fresco) durante cuatro o cinco días y después son eliminadas. Los machos tratados que fueron separados son cruzados con nuevas hembras vírgenes en la misma proporción y puestos en un frasco con medio fresco para dar

seguimiento por camadas. Este cultivo se deja seguir hasta el día 10 ó 14, cuando los progenitores son eliminados.

La reducción de fertilidad o la esterilidad completa inducida por ciertas concentraciones de un compuesto puede ser analizada determinando la progenie de los diferentes frascos y calculando índices de fertilidad con base en una corrida control que no recibió el compuesto a evaluar, pero donde las moscas control son sometidas a los mismos procedimientos experimentales. Si al término de esta prueba se detecta reducción en la fertilidad o esterilidad completa se efectúan otro tipo de pruebas como la Prueba de inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* para determinar si la pérdida de fertilidad deriva de un origen genético o de los efectos tóxicos del compuesto ⁶⁹.

1.4 Importancia de las bajas dosis

1.4.1 Modelo Clásico Dosis-respuesta

El alquimista alemán considerado padre de la toxicología, Paracelsius, atribuyó a las dosis altas la cualidad tóxica de una sustancia, “*la dosis hace al veneno*”, hasta hoy muchos estudios para determinar el nivel seguro de exposición de diversas sustancias químicas se han realizado sobre esta premisa.

Los sistemas biológicos generalmente se ajustan a un modelo normal Gaussiano en el que la media, mediana y moda coinciden y la probabilidad delimitada por un intervalo de 1 desviación estándar alrededor de la media es de 64%, dos desviaciones 95% y tres de 99% aproximadamente. Esta respuesta está enmarcada en un esquema similar al de Townsend y Luckey⁷⁰ donde la mayoría de los organismos en una población natural se encuentran sanos y su desviación está relacionada con las dosis extremas (ausencia o presencia) de la sustancia en el ambiente (**fig. 6**).

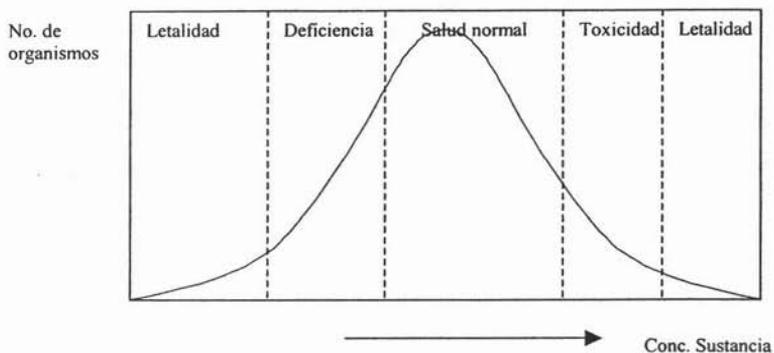


Fig. 6 Distribución normal de una población biológica respecto a la presencia de una sustancia.

Según los modelos toxicológicos, cuando una población normal es expuesta a un estímulo químico, su respuesta poblacional está relacionada de manera directamente proporcional a la dosis, de tal manera que a mayor dosis corresponde un mayor efecto (**fig 7**). La relación entre el grado de respuesta de un sistema biológico y la cantidad de tóxico administrado asume una forma que ocurre consistentemente y por ello es considerada clásica y fundamental como una relación dosis-respuesta ⁷¹. Esta relación implica una etapa lineal de correlación directa y proporcional de relación y cuya pendiente dependerá de la prontitud de la respuesta respecto a la dosis. A partir de esta relación generalmente se hacen varias determinaciones, como estimar la dosis tóxica media (DTM) que será aquella dosis en la cual se presenta 50% de la respuesta, en el caso de que la repuesta sea evaluada por la sobrevivencia de los organismos expuestos, entonces la DTM corresponderá a la Dosis Letal Media (LD_{50}) que a su vez depende de la concentración letal media (LC_{50}), i.e., aquella dosis (y concentración respectivamente) en la cual sobrevive sólo la mitad de los organismos expuestos. Los modelos toxicológicos asumen que el tramo recto de una respuesta toxicológica debe encontrarse entre 16 y 84⁷² por ciento, que corresponden a los límites del intervalo generado por una desviación estándar (indicados por puntos en la **fig. 7**).

El modelo clásico de dosis-respuesta es recurrentemente asumido en la evaluación de la toxicología de una sustancia y las determinaciones generalmente se realizan con base en la determinación de la LD₅₀ como lo expone Rodríguez Arnáiz “el criterio toxicológico más frecuentemente empleado es la concentración letal media (...) y a partir de ella se seleccionan dos o tres concentraciones más con el objeto de obtener la curva dosis-respuesta”⁷³, cuando no en la disolución máxima de la sustancia.

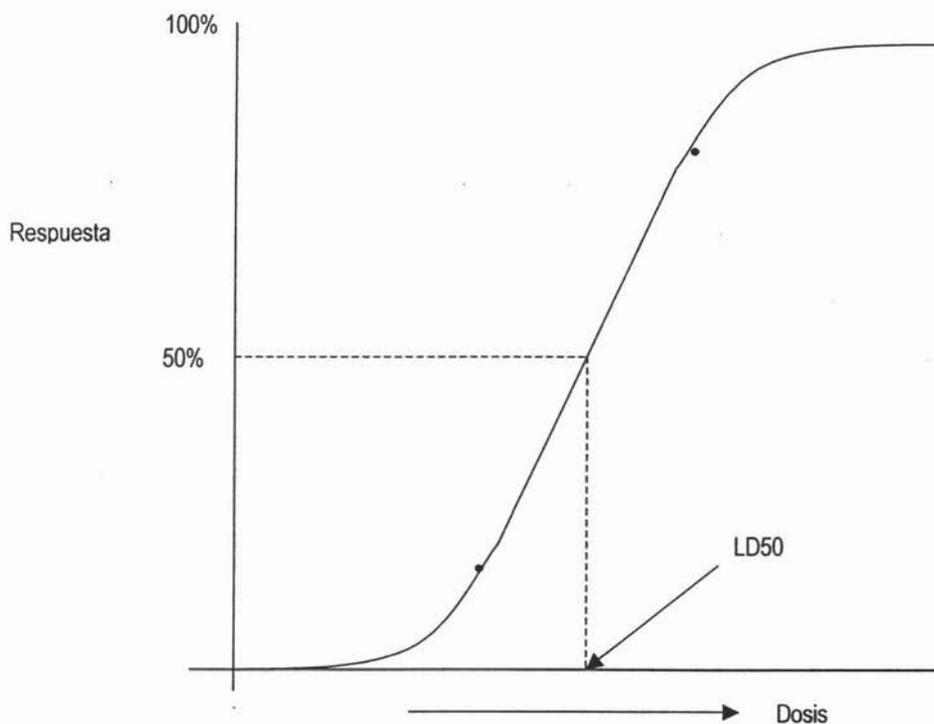


Fig . 7 Modelo Clásico de curva dosis-repuesta

Teóricamente, la evaluación de la toxicidad de una sustancia debería cubrir un espectro amplio de dosis y concentraciones, incluyendo dosis y concentraciones altas, que son necesarias para comparar la toxicidad de diversos compuestos con base en la mortalidad que provocan en los organismos expuestos, hasta muy bajas dosis y concentraciones, que tienen como finalidad establecer el potencial genotóxico

de los compuestos en rangos de concentración más similares a la exposición que puede ocurrir en la naturaleza. Así que el uso de la LD_{50} como criterio para determinar concentraciones experimentales es obsoleto pues concentraciones o dosis en las que sólo sobrevive la mitad de la población expuesta no pueden ser de ninguna manera concentraciones realmente bajas y las respuestas obtenidas de dicha práctica tienen una mínima o nula aplicabilidad para establecer el riesgo de exposición a concentraciones y dosis no letales.

Además, es común la extrapolación entre dosis-respuesta y respuesta-dosis para estimar el nivel de exposición seguro de sustancias en dosis altas con base en la supuesta relación lineal directa y proporcional de la respuesta. No es extraño que la existencia de una relación funcional entre dos variables a menudo se interprete de manera mecánica como una relación proporcional causa-efecto, cuando no siempre existe. Así la extrapolación realizada para bajas y altas dosis (o concentraciones) con base en la supuesta tendencia lineal de la respuesta debe interpretarse con mayor precaución, pues al construir la recta promedio por regresión lineal no se toma en cuenta que la ecuación resultante no es puntual sino se encuentra asociada –en el mejor de los casos cuando se han eliminado los factores de confusión– a una desviación de regresión, formando un intervalo de confianza alrededor de la recta estimada y su anchura es mayor mientras más distante se encuentre el punto a extrapolar de los valores medios de la recta, i.e., la precisión de la predicción disminuye para los valores alejados de aquellos con los que construimos la recta promedio, esto ilustra los peligros de tratar de extrapolar los resultados de un experimento a valores lejanos de los observados; así, aunque el fenómeno mantenga la misma tendencia nuestras predicciones serán poco precisas⁷⁴.

Además, algunos grupos han sugerido que para algunos xenobióticos la relación dosis-respuesta a bajas dosis o concentraciones no se comporta de manera lineal como la radiación⁷⁵, y que el modelo

clásico no considera respuestas umbrales⁷⁶, por lo que la predicción de la respuesta en concentraciones bajas puede ser no sólo poco precisa sino errónea.

1.4.2 Umbrales

Un umbral es aquella concentración o dosis debajo de la cual no existe respuesta⁷⁷. Por debajo del umbral, la sustancia química está presente y puede interactuar con su molécula blanco pero no induce consecuencias, sin embargo, conforme la concentración se acerca a ella se empiezan a presentar respuestas del sistema⁷⁸. Las respuestas umbrales contraponen al modelo clásico de toxicología en el cual el aumento en la respuesta va relacionado al aumento en el estímulo de manera gradual y no de manera súbita en una concentración o rango de concentraciones.

Aparentemente la existencia de umbrales está relacionada con la saturación de rutas metabólicas y mecanismos de defensa y desintoxicación. La toxicidad de una sustancia es un proceso dinámico que incluye la absorción del agente del exterior del organismo, su distribución a varios tejidos mediante reacciones reversibles o irreversibles que son realizadas por componentes celulares o moleculares y finalmente la excreción fuera del cuerpo. Tales procesos farmacocinéticos son generalmente lineales sólo dentro de un determinado rango. Así, la variación en los procesos farmacocinéticos puede ser la base conceptual para entender cómo los umbrales metabólicos permiten un incremento desproporcionado en la toxicidad en ciertos rangos de concentraciones.

Además, un organismo, está compuesto de un gran número de células y posee mecanismos de defensa eficientes que hacen que aunque los organismos están expuestos a concentraciones continuas de genotóxicos, no todas las moléculas que entran en contacto con nuestro cuerpo pueden causar daño genotóxico, sino sólo una parte de ellas en un momento específico, así, los umbrales están

influenciados por la probabilidad de ocurrencia de procesos estocásticos⁷⁹ y su detección en concentraciones bajas de un compuesto es menos probable si la frecuencia espontánea del evento genético terminal es alta, pues esto dificultará la estimación de incrementos pequeños⁸⁰.

Las respuestas umbrales se han detectado en las respuestas a rangos de concentraciones y dosis bajas de diversos compuestos a excepción de mutágenos y carcinógenos⁸¹.

A pesar de que la existencia de umbrales en las relaciones dosis respuesta se halla bien documentada para muchos tipos de efectos toxicológicos, su existencia ha sido discutida desde mediados del siglo pasado por la falta de este tipo de respuestas en mutágenos y carcinógenos, y hasta hoy la búsqueda de estos umbrales ha cobrado importancia.⁸²

La presencia de respuestas umbrales en carcinógenos químicos ha sido rechazada porque en teoría, *in vitro* una sola molécula de un compuesto genotóxico es capaz de ocasionar un evento de mutación que desencadene un proceso canceroso. Un umbral biológico indica un comportamiento discontinuo en la relación lineal dosis-respuesta en concentraciones bajas de un compuesto. Si cada umbral fuera específico para cada sustancia individual y se debiera a la ocurrencia de varios procesos estocásticos, entonces seríamos incapaces de establecer la presencia de cocarcinógenos y comutágenos ambientales.

Además, la ocurrencia espontánea de casos en personas no expuestas a factores de riesgo y la no presencia de casos de cáncer en algunas personas expuestas de manera crónica a sustancias genotóxicas, hacen evidente que si el desarrollo de procesos carcinogénicos estuvieran relacionados con umbrales, estos serían umbrales aleatorios y no podría existir una exposición totalmente segura para todos los organismos expuestos⁸³.

1.4.3 Hormesis

Paralelamente a la gran controversia acerca del tipo de modelo que explica la respuesta a bajas concentraciones, un modelo lineal o la existencia de umbrales, ha surgido una hipótesis que sugiere que el comportamiento fundamental en este rango de concentraciones es la hormesis.

En 1877, Hugo Schulz observó que bajas concentraciones de algunos tóxicos como el cloruro de mercurio, iodo, bromo, ácido arsénico, ácido crómico, ácido salicílico y ácido fórmico estimulaban la respiración y crecimiento de levaduras, pero concentraciones mayores las inhibían. Resultados similares fueron obtenidos por Rudolph Arndt promulgando la Ley de Arndt-Schulz:

“Un estímulo ligero acelera la actividad vital, uno medio la promueve, uno fuerte la inhibe y uno muy fuerte la extingue”

Pocos años más tarde en 1887 y 1888, el bacteriólogo Hueppe publicó sus resultados reportando el mismo fenómeno, y no fue sino hasta 1943 cuando el fenómeno observado por Schulz fue llamado hormesis por Southam y Ehrlich.

La hormesis es definida como la producción de efectos benéficos en una población a bajas exposiciones (inclusive por debajo de la NOAEL) y efectos adversos a exposiciones altas de una sustancia química dada, o más generalmente, los efectos producidos a altas exposiciones son inversos o aparentemente inversos de aquellos producidos a bajas exposiciones de una sustancia química resultando en un comportamiento dosis-respuesta en forma de U (o J) o U invertida dependiendo del evento medido⁸⁴ (**fig. 8**), por ejemplo, recobrar una sobrevivencia mayor en los organismos expuestos a

bajas concentraciones de un xenobiótico que a altas concentraciones es tóxico, que la que se recobra en organismos testigo (no expuestos).

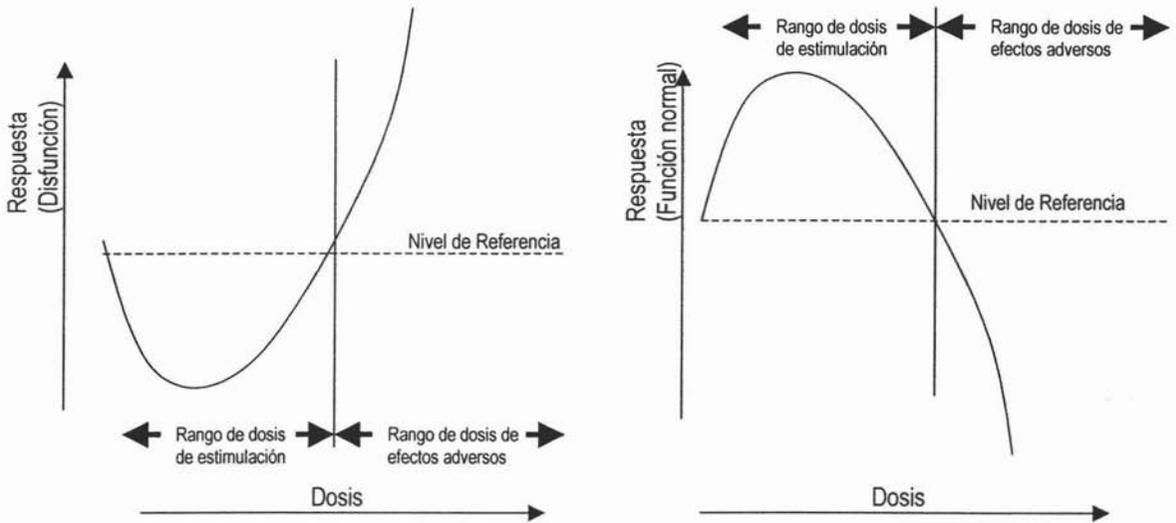


Fig. 8. Curva Hormética

Desafortunadamente el concepto de la estimulación a bajas dosis por sustancias tóxicas fue mal interpretado y derivó en la práctica homeopática, según C.D. Holland⁸⁵ la intensa hostilidad entre los médicos y los practicantes de homeopatía y la falta de un mecanismo biológico que explicara este fenómeno fueron algunas razones para que la comunidad científica olvidara la hormesis, sin embargo, este fenómeno continuó siendo reportado por muchos investigadores en décadas posteriores. Una búsqueda realizada por Calabrese y Baldwin en 4,000 reportes arrojó que existen aproximadamente 350 publicaciones en diferentes modelos y sistemas de prueba que contienen una respuesta hormética en sus resultados, aunque ésta no es identificada como tal por sus autores respectivos⁸⁶. El fenómeno de hormesis parece ser ubicuo respecto a especies, sustancias químicas y eventos terminales, ya que dichas publicaciones incluyen sistemas de prueba en animales, bacterias, hongos, humanos, plantas y protozoarios; sustancias químicas como el alcohol y sus metabolitos, antibióticos, fungicidas,

herbicidas, hidrocarburos, insecticidas, metales y pesticidas entre otros, y eventos terminales como crecimiento, longevidad, metabolismo, reproducción, sobrevivencia y otros varios; incluso podrían existir mecanismos horméticos en el comportamiento a bajas dosis de carcinógenos para los cuales no se ha detectado la presencia de umbrales⁸⁷.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar la existencia de la hormesis, desde una alteración inicial de la homeostasis que provoca una sobrecompensación como un esfuerzo para reestablecer los parámetros biológicos de equilibrio propuesta por Stebbind⁸⁸, hasta la medición de variables no controladas o variaciones inherentes al sistema. Calabrese y Baldwin han propuesto algunos mecanismos enzimáticos que podrían estar relacionados con el desarrollo de respuestas herméticas, como la inactivación de sustancias químicas inhibitoras de procesos biológicos — como el cianuro, que mezclado con trazas de iones de metales pesados incrementa la actividad de un gran número de enzimas resultando en un proceso estimulador; la reacción entre el xenobiótico y alguno de los reactantes en una vía metabólica puede resultar en la producción ligeramente aumentada o disminuida de la enzima involucrada en la ruta que alterará el funcionamiento de otras rutas metabólicas; el reemplazamiento de un ión metálico activador por un inhibidor como el mercurio puede promover la actividad enzimática de ciertos procesos biológicos—. Por otra parte, se ha demostrado que la estimulación con bajas dosis de cadmio (por debajo de la NOAEL) puede inducir la expresión de genes que producen proteínas protectoras como las metalotioneinas o las proteínas protectoras de temperatura HSP (Heat Shock Proteins)⁸⁹. Lo cierto es que a pesar de la existencia de respuestas no explicadas por los modelos lineales o de umbrales, los fenómenos biológicos que las producen no han sido establecidos. Incluso para Wayne B. Jonas⁹⁰, muchas respuestas “normales” en la relación dosis-respuesta podrían deberse a la combinación de efectos horméticos y tóxicos sobre diferentes receptores

celulares y quizás en diferentes niveles del flujo de información dentro de la célula (núcleo, aparato de Golgi, membrana celular, etc.).

Según C.D.Holland⁹¹ los mecanismos biológicos y químicos por los cuales la respuesta estimulante ocurre deben diferir de un agente químico a otro, sin embargo, para Calabrese y Baldwin el efecto de ciertos químicos en las enzimas y los inhibidores metabólicos pueden resultar en una respuesta estimulante de ciertos procesos biológicos y dada la ubicuidad y la importancia de ciertas rutas metabólicas en el mantenimiento de la homeostasis, los mecanismos por los cuales se dispara una respuesta hormética no deben ser muy diferentes entre compuestos ni entre modelos, incluso para Calabrese⁹² en el marco de la selección natural; la hormesis podría ser una manifestación particular del concepto de adaptación biológica a ambientes de estrés.

Mientras algunos autores han rechazado la existencia de los mecanismos horméticos a bajas concentraciones bajo el supuesto de que dosis altas de una sustancia aplicada a un organismo puede incluir concentraciones bajas de la sustancia en diferentes tejidos o células del mismo dependiendo del tiempo de administración y vías de excreción de la sustancia, por lo que los efectos de estimulación deberían de ser observados también en altas dosis en órganos o líneas celulares específicos, otros aceptan su existencia pero sugieren la aplicación no indiscriminada de explicaciones horméticas pues podría ser arriesgado para el establecimiento de las concentraciones de riesgo humano⁹³, de cualquier manera, es evidente la falta de comportamiento lineal de la respuesta a bajas dosis y el modelo de umbrales no explica la existencia de respuestas mayores al control en bajas dosis.

Calabrese y Baldwin⁹⁴, han identificado numerosos estudios que involucran eventos reproductivos terminales que exhiben evidencia de hormesis, como el aumento en la síntesis de ADN en células de embriones de pollo estimuladas con metales pesados. Estos estudios involucran diversos

modelos como insectos, peces y roedores entre otros y los metales pesados y pesticidas son los agentes más comunes en ellos (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Estudios que muestran evidencia de respuestas horméticas a bajas concentraciones sobre eventos reproductivos⁹⁵

Agente	Modelo	Evento Genético Terminal	Referencias
METALES PESADOS			
Cadmio	Daphnia (Crustáceo)	Número de neonatos	Bodar (1998)
	Carpa	Producción de huevos	Pickering y Gast (1972)
	Poliquetos	Fecundidad	Reish y Carr (1978)
	Ratón	Número de implantes	Daston (1991)
Cobre		Número de fetos vivos	Daston (1991)
	Poliquetos	Fecundidad	Reish y Carr (1978)
Mercurio	Hydra (Cnidario)	Producción de gemas	Stebbing y Pomroy (1977)
	Poliquetos	Fecundidad	Reish y Carr (1978)
Zinc	Poliquetos	Fecundidad	Reish y Carr (1978)
Plomo	Poliquetos	Fecundidad	Reish y Carr (1978)
	Hydra (Cnidario)	Producción de gemas	Browne y Davis (1977)
PESTICIDAS			
Azinfosmetil	Áfidos	Número de descendientes	Fouk y McClanahan (1970), Gordon y McEwen (1984), Ritcey (1982) Lowery y Sears (1986)
Dieldrin	Grana	Producción de huevos	Hodjat (1971)
	Mosquito	Número de foliculos basales	Sutherland (1967)
DDT	Mosquito	Número de foliculos basales	Sutherland (1967)
	Ácaros	Producción de huevos	Heuck (1952)
Carbaryl		Número de descendientes	Kuene (1958) y Rodríguez (1957)
	Orugas	Producción de huevos	Essac (1972)
	Lombriz	Producción de huevos	Ball y Su (1979)
Carbufuran	Lombriz	Producción de huevos	Ball y Su (1979)
Dimetoato	Ácaros	Producción de huevos	Folker y Hansen (1996)
Fluoruro de sodio	Escarabajos	Producción de huevos	Johansson (1947)
Dicol	Tisanópteros de cítricos	Número de descendientes	Morse y Zarch (1991)
Esfenvalerato	Tisanópteros de cítricos	Número de descendientes	Morse y Zarch (1991)
Formetanato	Tisanópteros de cítricos	Número de descendientes	Morse y Zarch (1991)
Malation	Tisanópteros de cítricos	Número de descendientes	Morse y Zarch (1991)
VARIOS			
BRDU	Ratón	Número de implantes	Daston (1991)
		Número de fetos vivos	Daston (1991)
DPH	Ratón	Número de implantes	Daston (1991)
		Número de fetos vivos	Daston (1991)
Azul de Tripano	Ratón	Número de implantes	Daston (1991)
		Número de fetos vivos	Daston (1991)

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

Existen reportes experimentales que indican la actividad mutagénica de la talidomida y recientemente se reportaron algunos casos de hijos de padres focomélicos (por exposición a la talidomida durante su gestación) que presentan malformaciones límbicas⁹⁶, sin embargo, los efectos mutagénicos de la talidomida han sido muy discutidos. En 1997 un equipo multidisciplinario comandado por Ashby *et al*⁹⁷ corrió una batería de pruebas con talidomida que incluía 32 bioensayos obteniendo resultados negativos, sin embargo, todos los sistemas de prueba utilizados involucraron células de la línea somática, ninguno es transgeneracional y las concentraciones utilizadas en este estudio se determinaron a partir de la disolución máxima.

Trabajos anteriores de nuestro grupo han mostrado que concentraciones altas pueden enmascarar la respuesta genotóxica de algunas sustancias. El rango de concentraciones de talidomida probados hasta ahora se halla alrededor del límite de solubilidad y no incluye concentraciones realmente bajas por lo que es probable que esto no haya permitido evidenciar su potencial genotóxico. Resultados preliminares de nuestro grupo sobre la curva dosis-respuesta a bajas concentraciones indican la existencia de actividad genotóxica de la talidomida en células somáticas en *Drosophila melanogaster*⁹⁸, sin embargo, no se conoce el efecto de estas concentraciones sobre células de la línea germinal ni si éstas son capaces de traspasar generaciones.

Los pocos estudios⁹⁹ realizados hasta hora sobre la fertilidad de organismos expuestos a talidomida son confusos en sus metodologías e involucran organismos en estado adulto (con gónadas diferenciadas) pero ninguno evalúa la fertilidad de organismos expuestos a talidomida antes de la diferenciación de células germinales y de una generación sexual a la siguiente. Tampoco existen

referencias sobre la fertilidad de mujeres expuestas a la talidomida durante su desarrollo embrionario, ni de la fertilidad de hombres o mujeres adultos expuestos a la talidomida.

Así, a pesar de la reincorporación de la talidomida al mercado para tratar diversas patologías, su mecanismo de acción aún se desconoce, no existen estudios transgeneracionales con talidomida que involucren línea germinal y su curva dosis-respuesta a bajas dosis aún no está resuelta.

El presente trabajo forma parte de una batería de pruebas en *Drosophila melanogaster* realizadas con concentraciones bajas de talidomida en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y que involucra entre otros, los siguientes bioensayos:

Prueba de Fertilidad

Prueba de Mutación y Recombinación Somática

Curva de Tiempo para Mutación y Recombinación Somática

Prueba de Teratogénesis

Prueba de Letales Recessivos Ligados al Sexo

Prueba de Pérdida Parcial y No Disyunción de Cromosomas Sexuales (Clastogenia).

Así, el presente trabajo incluye la primera prueba de dicha batería y su objetivo es determinar si la exposición a bajas concentraciones de talidomida durante el desarrollo larvario altera la fertilidad del adulto de *Drosophila melanogaster*.

II. 1 Hipótesis

Si la talidomida interfiere con la diferenciación de células y tejidos, entonces las larvas de *D. melanogaster* expuestas a talidomida durante el proceso de maduración de las gónadas y/o de las células de la línea germinal, mostrarán índices de fertilidad diferentes a los de las moscas testigo. En contraparte, si la talidomida no tiene un efecto sobre línea germinal como los estudios realizados hasta ahora por otros grupos suponen, entonces las moscas tratadas con talidomida no mostrarán índices de fertilidad diferentes a los de las moscas testigo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS_(fig. 9)

La parte experimental del presente trabajo fue realizada en su totalidad en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la UNAM y apoyado por el *Banco de Moscas* de la misma institución en la donación de las cepas utilizadas.

III.1 Manejo de las cepas

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las moscas fue medio de cultivo estándar para *Drosophila*¹⁰⁰.

Las moscas utilizadas en los experimentos fueron organismos de la cepa silvestre Canton-S libres de contaminación y mantenidas a temperatura controlada de 25°C y 60% de humedad relativa.

El anestésico utilizado para la manipulación de las moscás fue éter etílico aplicado por aproximadamente 10 segundos en cada ocasión y una vez analizado, ningún organismo fue liberado al ambiente.

III.2 Preparación de cruza y sincronización de cultivos

A partir de frascos con cultivos maduros de la cepa Canton-S de *Drosophila melanogaster* se seleccionaron hembras vírgenes por sexado y aislamiento de hembras recién emergidas por periodos de 5 h y mediante la identificación de meconio según Ramos (1993). Estas hembras fueron cruzadas con machos de la misma cepa a razón 2:1 (50 ♀♀:25 ♂♂).

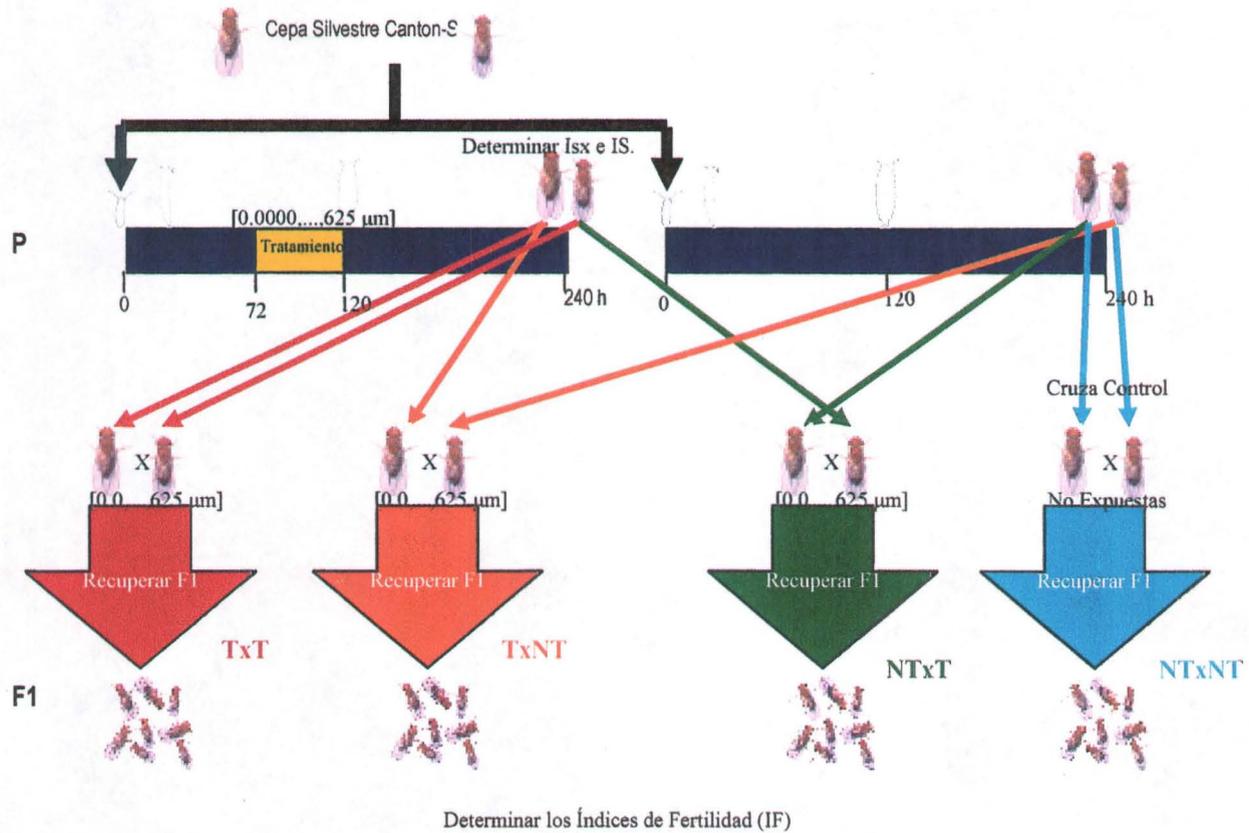


Fig. 9. Metodología

Después de un periodo de maduración de crusa de tres días, las moscas de la crusa fueron transvasadas a frascos con medio fresco enriquecido con levadura para estimular la ovoposición. Se dejaron durante un periodo de 8 h al término del cual la crusa fue desechada y los frascos con huevos se conservaron en condiciones estándar. De esta manera se sincroniza la edad de los organismos que se utilizarán en los experimentos.

III. 3 Tratamiento

Tres días después, las larvas, ahora de 72 ± 4 h de edad fueron extraídas por flotación utilizando una solución concentrada de sacarosa según la técnica de Nöthinger¹⁰¹ evitando la manipulación directa y la exposición a temperaturas extremas.

Las larvas extraídas fueron tratadas subcrónicamente durante 48 h con soluciones frescas de talidomida (ICN Biomedicals, Ohio, CAS [158753]) preparadas por diluciones sucesivas a partir de una solución inicial a $625 \mu\text{M}$ ($16.13 \text{mg}/100 \text{ml}$). Las concentraciones probadas fueron: 0.14, 0.15, 0.61, 2.4, $625 \mu\text{M}$, las cuales se seleccionaron a partir de experimentos previos, además nuestra concentración más alta corresponde con la más baja probada por Ashby *et al*¹⁰² (0.625, 1.25, 2.5 y 5 mM). Las soluciones se mezclaron con el alimento en una proporción 3.5 ml por 1gr de medio instantáneo para moscas (Carolina, Biological Supply). Como testigo negativo y disolvente se utilizó agua destilada ($0 \mu\text{M}$). Las larvas permanecieron en este medio hasta completar su desarrollo y emerger como adultos. Se realizaron 5 repeticiones.

III.4 Colecta de Adultos y Preparación de Cruzas

Los adultos recobrados de estos tratamientos fueron colectados y cuantificados determinando los índices de sobrevivencia y sexual.

$$\text{Índice de Sobrevivencia } [X_i] = \frac{\text{Hembras } [X_i] + \text{Machos } [X_i]}{\text{Hembras } [X_0] + \text{Machos } [X_0]}$$

$$\text{Índice Sexual de Hembras } [X_i] = \frac{\text{Hembras } [X_i]}{\text{Hembras } [X_i] + \text{Machos } [X_i]}$$

donde $[X_i]$ representa a cada una de las concentraciones experimentales (0.14, 0.15, 0.61, 2.4, 625 μm) y $[X_0]$ al testigo negativo de agua destilada (0 μm).

De estos adultos recobrados se aislaron hembras vírgenes y machos para ser cruzados con machos y hembras vírgenes no tratados, respectivamente. Los organismos no tratados son moscas de que no fueron sometidas al tratamiento pero provienen de la misma sincronización. Se realizaron cuatro tipos de cruzas por cada concentración (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Esquemas de cruzas realizadas.

		Machos	
		No Tratados	Tratados
Hembras	No Tratadas	NTxNT	NTxT
	Tratadas	TxNT	TxT

Los sistemas de cruce (50 ♀♀:25 ♂♂) fueron puestos a ovopositar en medio de cultivo fresco durante 72hrs, posteriormente las cruces fueron sembradas en medio fresco durante otras 72 hrs para incrementar el tamaño de muestra. Al término de las 144 h totales de colecta de huevos, los progenitores fueron sacrificados por sobreeterización y ambas siembras se dejaron seguir hasta completar su desarrollo.

El desarrollo experimental consistió en 7 repeticiones independientes involucrando el uso de más de 74,000 organismos.

III.5 Evaluación

Los adultos (F₁) fueron colectados, sacrificados por sobreeterización y cuantificados, determinando por concentración el índice de fertilidad total y por sexos para cada tipo cruce según Ramos (1993).

$$\text{Índice de Fertilidad } [X_i] \text{ (IF}[X_i]) = \frac{\text{Hembras } F_1 [X_i] + \text{Machos } F_1 [X_i]}{\text{Hembras P } [X_i]},$$

Índice de fertilidad para cada sexo de la progenie,

$$\text{Índice de Fertilidad Hembras} = \frac{\text{Hembras } F_1 [X_i]}{\text{Hembras P } [X_i]}$$

$$\text{Índice de Fertilidad Machos} = \frac{\text{Machos } F_1 [X_i]}{\text{Hembras P } [X_i]}$$

y se corrigieron (IFC_x) con su respectivo control [0mM] para poder comparar entre las diferentes cruza:

$$\text{IFC}_x = \frac{\text{IF}[X_j]}{\text{IF } [X_0]}$$

Para descartar un efecto de manipulación se compararon los IF [X₀] de cada cruza con el de la cruza de organismos **no expuestos** NTxNT.

Se compararon los IFCx de las cruzas TxNT, NTxT, TxT en las diferentes concentraciones y cruzas mediante Prueba de Bartlett y Análisis de Varianza las cuales se llevaron a cabo con el software: *Statistica '98 Edition* (StatSoft, Inc. 1998. Statistica for Windows) y *SPSS V.11.0.0* (Lead Tools Technologies. 2001. SPSS for Windows)

IV. RESULTADOS

IV.1 Supervivencia de organismos tratados (P)

Los índices de supervivencia (**Cuadro 3**) (IS) promedio (de cinco repeticiones) de las moscas tratadas con talidomida fueron similares entre las diferentes concentraciones (ANOVA, $p > 0.05$) (**Cuadro 4**).

Cuadro 3. Índices de supervivencia (IS) de las moscas tratadas con talidomida

Concentración [μm]	Índice de Supervivencia Prom.	n (repeticiones)	Error Estándar (ES)
0	1.000	5	0.000
0.14	0.757	5	0.092
0.15	0.728	5	0.111
0.61	0.740	5	0.102
2.4	0.737	5	0.141
625	0.915	2	0.184

Cuadro 4. Análisis de Varianza (ANOVA) para los IS de cada concentración.

	Cuadrados medios	F	p
Entre Grupos	0.0598	1.1561	0.3630
Dentro de Grupos	0.0517		

Con excepción de la concentración más alta, en todas las concentraciones [0.14 - 2.4 μM] el IS se halla alrededor del 70%, mientras que en 625 μM el IS fue semejante al de las moscas control (IS =0.915) (**fig. 10**). Además, los errores estándar en las diferentes concentraciones no varían considerablemente.

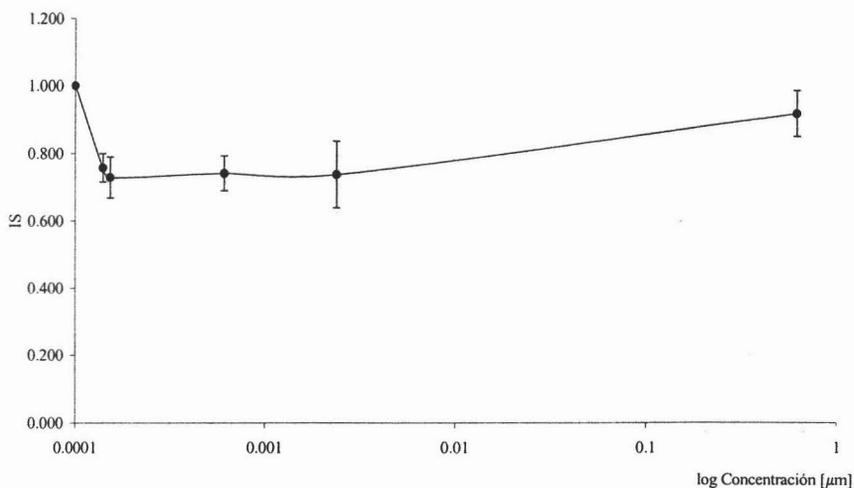


Fig. 10 Índice de Supervivencia (IS) de las moscas tratadas

Los índices sexuales (ISx) promedio (de cinco repeticiones) (**Cuadro 5**) de hembras y machos tratados con talidomida fueron similares en las diferentes concentraciones (ANOVA, $p > 0.05$) (**Cuadro 6**) aunque a partir de la menor concentración, la proporción de sexos es contraria a la del testigo (**fig. 11**)

Cuadro 5. Índices Sexuales (ISex) de las moscas tratadas con talidomida

Concentración [μm]	Isx. Prom.	n	ES Isx	Isx.	n	ES Isx
	Hembras	Hembras	Hembras	Prom. Machos	Machos	Machos
0	0.504	5	0.022	0.496	5	0.022
0.14	0.479	5	0.015	0.521	5	0.015
0.15	0.496	5	0.012	0.504	5	0.012
0.61	0.496	5	0.019	0.504	5	0.019
2.4	0.495	5	0.011	0.505	5	0.011
625	0.459	5	0.019	0.541	5	0.019

Cuadro 6. Análisis de Varianza (ANOVA) para los ISx de cada concentración.

	g.l.	Cuadrados medios	F	p
Entre Grupos	5	0.000508	0.635	0.675
Dentro de Grupos	21	0.0008		

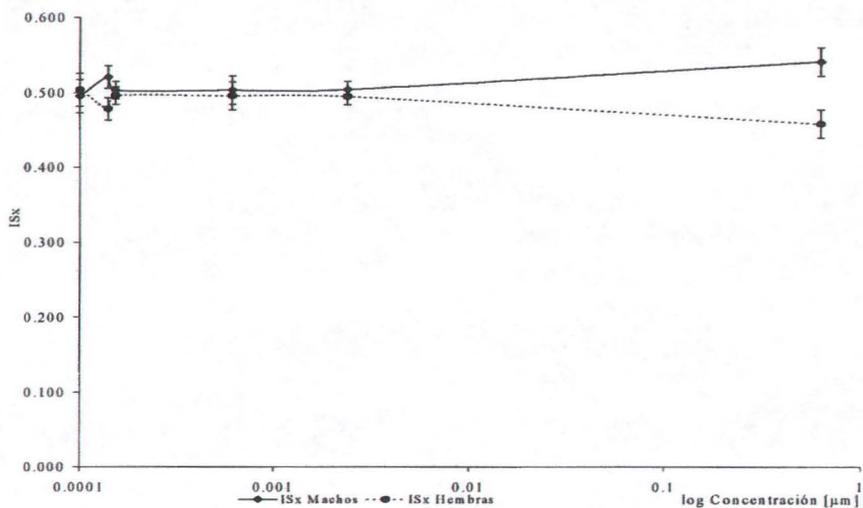


Fig. 11 Índices Sexual de moscas tratadas

IV.2 Fertilidad de organismos tratados (F1)

La comparación de los IF de los controles de concentración de cada craza [0.00] μm y el control de craza **NTxNT** (Cuadro 7) no arrojó diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$) (Cuadro 8, fig. 12).

Cuadro 7. Índices de Fertilidad (IF) de los controles de concentración de las diferentes cruzas y de la craza control

Tipo de Cruza	IFert. Prom.	n	Error Estándar (ES)
NTxNT	14.028	17	1.559
TxNT [X ₀]	14.100	7	3.912
NTxT [X ₀]	13.318	7	2.886
TxT [X ₀]	12.324	7	2.273

Cuadro 8. Análisis de Varianza (ANOVA) para el IF de los controles de concentración de las diferentes cruzas y de la cruza control

	g.l.	Cuadrados Medios	F	P
Entre Grupos	3	5.607	0.101	0.958
Dentro de Grupos	34	55.026		

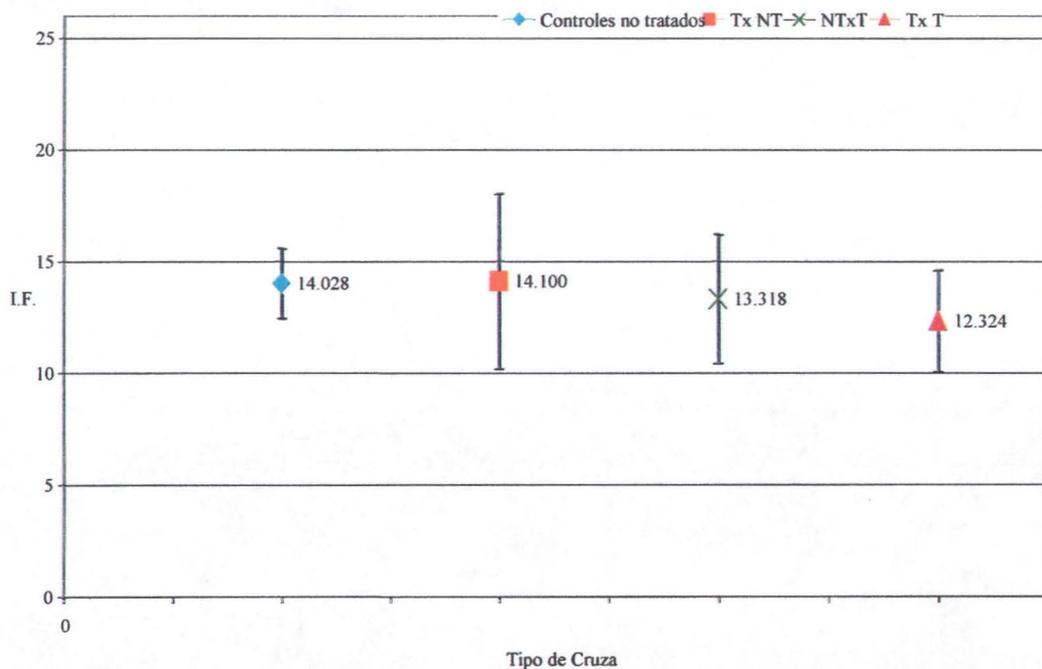


Fig. 12. Comparación de controles experimentales con el control de cruza

Los IFCx de las diferentes cruzas se muestran en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Promedios de Índices de Fertilidad Corregidos (IFCx), Índices de fertilidad (IF), Error Estándar (ES) y Tamaño de muestra (N) para 7 repeticiones de moscas tratadas con talidomida nF1 (tamaño total)= 74.266

Concentración		NTXNT	TXNT	NTXT	TXT
0	IFCx		1.000	1.000	1.000
	IF	14.0282953	14.101	13.318	12.324
	ES		0	0	0
	N	8925	4199	4444	4010
0.14	IFCx		1.516	0.893	1.209
	IF		21.379	11.893	14.894
	ES		0.437	0.073	0.127
	N		4086	3972	3995
0.153	IFCx		1.572	1.068	0.773
	IF		22.1720709	14.223	9.527
	ES		0.70320477	0.259	0.117
	N		4010	3406	2444
0.61	IFCx		1.543	0.827	0.945
	IF		21.759	11.014	11.651
	ES		0.571	0.136	0.108
	N		4237	3869	3406
2.4	IFCx		1.312	1.050	0.815
	IF		18.496	13.982	10.044
	ES		0.264	0.085	0.083
	N		4348	4261	3084
625	IFCx		1.049	1.032	0.968
	IF		14.797	13.747	11.928
	ES		0.199	0.118	0.111
	n		2646	2726	2198

IV.2.1 Cruza **TxNT**

En esta cruce, donde las hembras recibieron el tratamiento de talidomida, el IFCx fue mayor en las concentraciones más bajas, siendo en 0.153 μm , 0.572 veces mayor que el testigo; y el menor, con respecto al control lo presentó la concentración más alta (625 μm), tal que en este punto el IFCx es sólo 0.04937 veces mayor que el del control.

Para determinar si existían diferencias en las desviaciones obtenidas en cada concentración, se aplicó la prueba de homoscedasticidad de Bartlett, la cual confirmó diferencias significativas entre las varianzas de cada concentración (P. Bartlett, B/C= 9.248, $p \chi^2 (B/C)=0.055$, $p<0.05$). La obtención y comparación de los IFCx para cada sexo de la progenie muestra curvas similares (fig. 13).

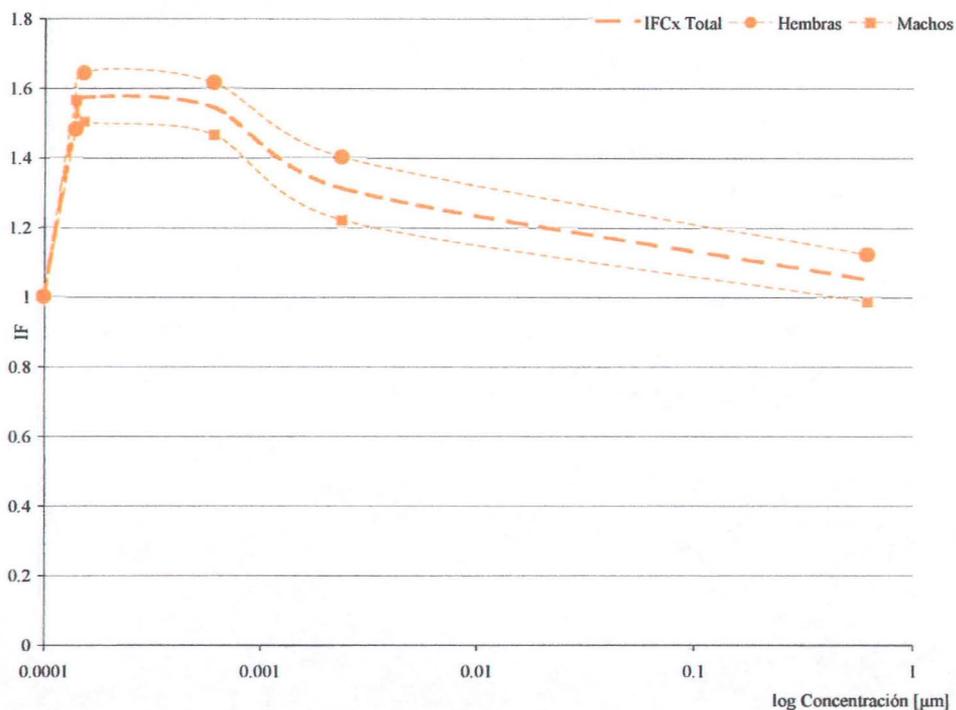


Fig. 13 IFCx por sexo de la progenie par ala cruz a TxNT

IV.2.2 Cruza NTxT

La craza donde los machos fueron tratados con talidomida presenta una tendencia muy diferente a la craza anterior donde las hembras fueron las tratadas (TxNT).

El IFCx resultó menor en las concentraciones 0.14 μ m y 0.61 μ m, de tal manera que el rango de mayor variación en los IFCx se localizó nuevamente en las concentraciones más bajas. Al igual que en la craza anterior, en la concentración más alta (625 μ m) el IFCx se encuentra muy cercano al del control y es sólo 0.032 veces mayor que éste.

Los ES disminuyeron conforme aumentó la concentración y la prueba de homoscedasticidad de Bartlett arrojó diferencias significativas entre las varianzas del IFCx de cada concentración (P. Bartlett, B/C= 11.358, $p \chi^2(B/C)=0.23$, $p<0.05$).

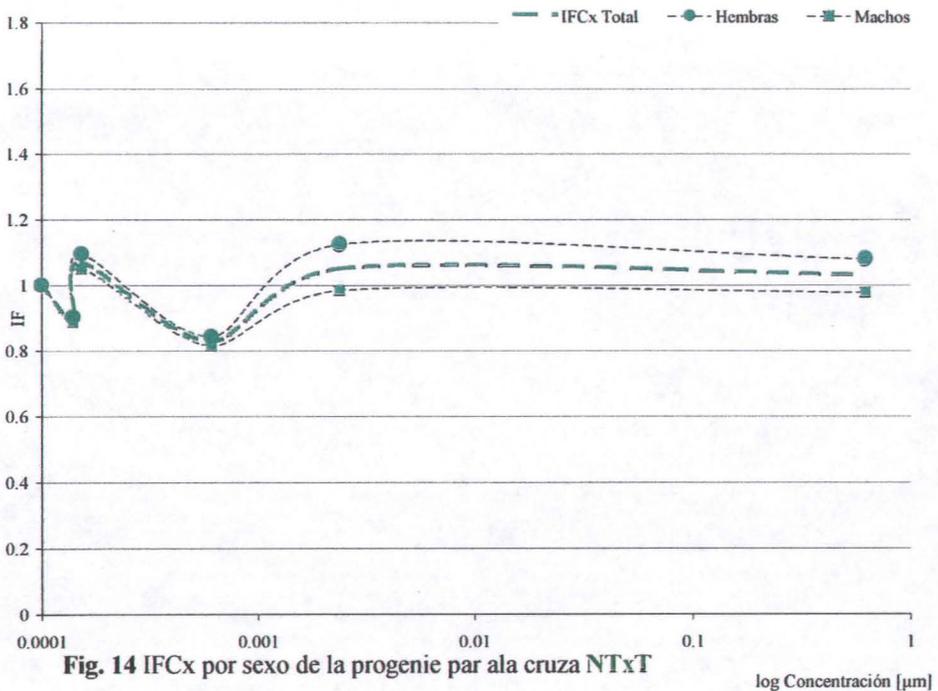


Fig. 14 IFCx por sexo de la progenie para ala craza NTxT

log Concentración [μ m]

En las concentraciones más bajas los cambios en el IFCx van acompañados por fluctuaciones en el ES peculiares, el IFCx de 0.14 μ M fue menor al del control y mostró un error estándar bajo, mientras que el IFCx de 0.15 μ M fue mayor al control y presentó un error estándar mayor.

La obtención y comparación de los IFCx para cada sexo de la progenie muestra curvas similares (fig. 14).

IV.2.3 Cruza TxT

En este sistema de cruce donde ambos progenitores fueron tratados con talidomida, las dos concentraciones menores (0.14 y 0.153 μ M) mostraron la mayores variaciones en el IFCx respecto al control al presentar el mayor y menor IFCx respectivamente, estas variaciones junto con los ES encontrados hicieron posible que el análisis de varianza detectara diferencias significativas entre la concentración más baja y el control (ANOVA, $p < 0.1$; Tukey HSD, $p < 0.1$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de Varianza (ANOVA) para el IFCx de las concentraciones de la cruce TxT

	g.l.	Cuadrados Medios	F	P
Entre Grupos	5	0.140	2.22	0.077
Dentro de Grupos	30	0.063		

De nuevo, el IFCx de la concentración más alta (625 μ M) es muy cercano al control (sólo 0.032 veces menor que él). La comparación de los IFCx para cada sexo de nuevo muestra curvas similares.

En esta cruce se recobraron los ES menores y más homogéneos, la Prueba de homoscedasticidad de Bartlett no arrojó diferencias significativas (P. Bartlett, B/C= 1.240, $\rho \chi^2(B/C)=0.871$, $p>0.05$).

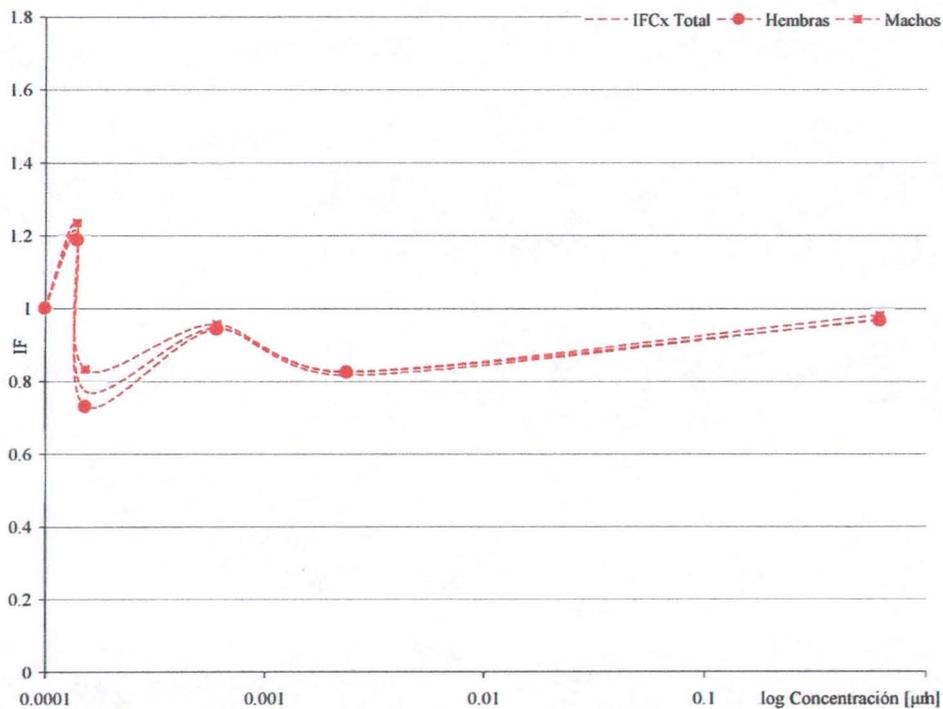


Fig. 15 IFCx por sexo de la progenie par ala cruce **TxT**

La curva de respuesta concentración- efecto fue diferente de los otros dos sistemas y mostró una correlación negativa con la cruce anterior (NTxT) (Kendall tau $b=-0.600$, $p<0.1$) (**fig. 15**)

IV. 2.4 Comparación entre cruza

La comparación de las varianzas entre cruza mediante la prueba de Bartlett arrojó diferencias significativas (P. Bartlett, $p < 0.05$) por lo que no pudo aplicarse el análisis de varianza, sin embargo, las curvas de las tres cruza se observan diferentes.

De manera consistente en los tres sistemas de cruza, el IFCx no fue lineal (fig. 16) y es en las concentraciones más bajas en las que se recobraron las mayores variaciones del IFCx respecto al control, así como las mayores fluctuaciones de las varianzas (fig. 17). En todas ellas, la concentración más alta mostró los IFCx más cercanos al control y ES bajos.

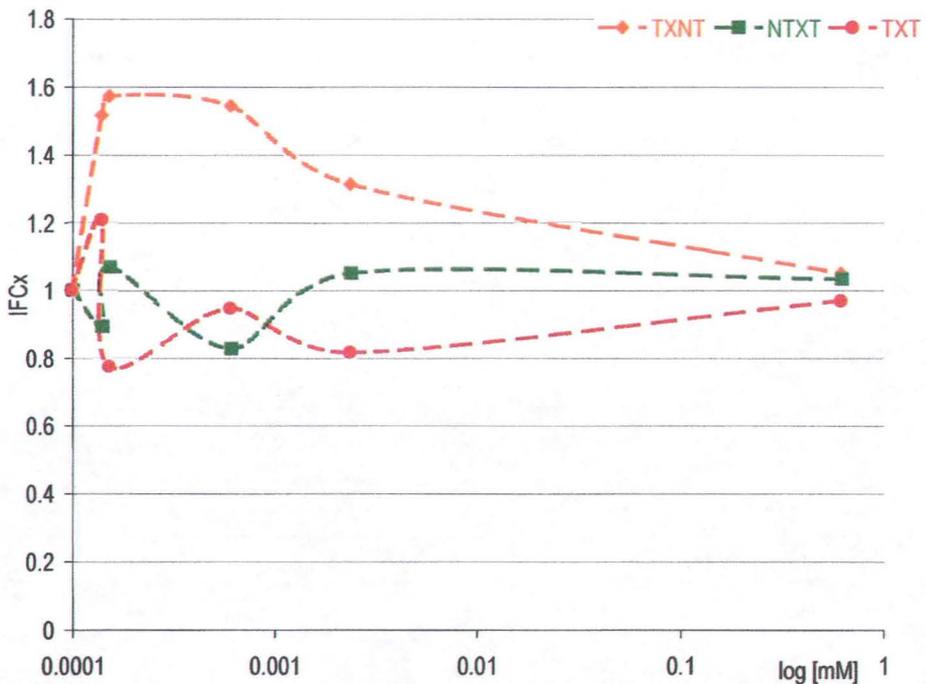


Fig. 16 IFCx de los diferentes sistemas de cruza

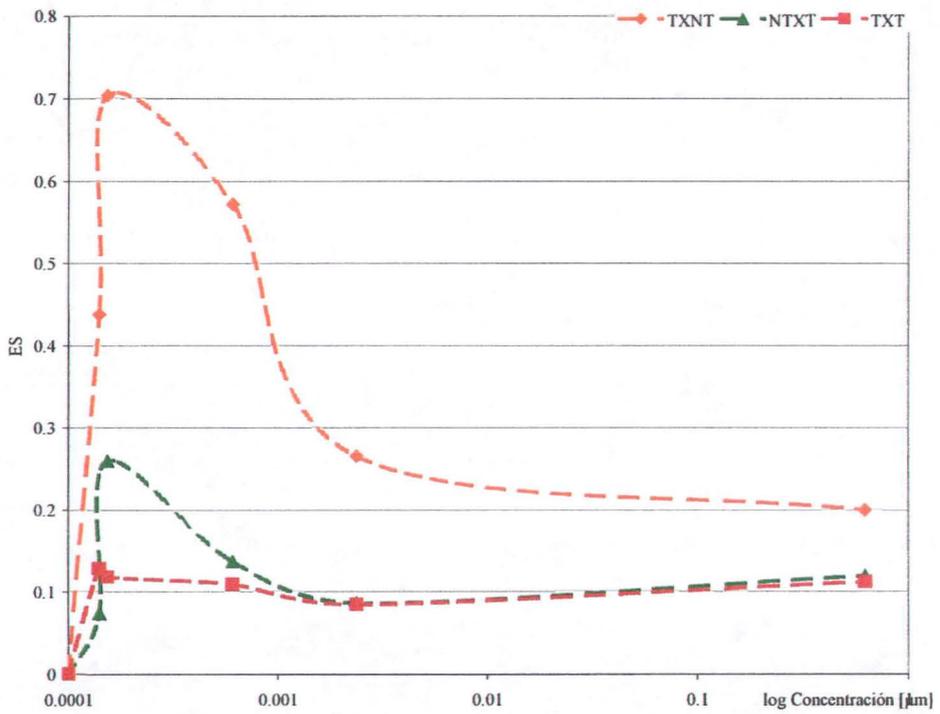


Fig. 17. Comparación del Error Estándar (ES) de las diferentes sistemas de cruza en las concentraciones

V. DISCUSIÓN

La máxima eliminación posible de factores de confusión es indispensable en el desarrollo de cualquier protocolo experimental. El efecto de la metodología sobre la variable de respuesta debe ser determinado a través del uso de controles en los que se presenten prácticamente las mismas condiciones de manipulación, pero en los que el posible factor causal no esté presente. De manera que los cambios observados en aquellos organismos expuestos al factor causal puedan ser atribuidos a éste.

Por otro lado, el uso de tratamientos energicos puede seleccionar excesivamente a los organismos, lo que reduce la posibilidad de extender las conclusiones derivadas de estos estudios al resto de la población.

En nuestro caso, la obtención de los índices de sobrevivencia y sexual de las moscas tratadas, como indicadores de la fracción sobreviviente de la población expuesta y la presencia de controles de cruza que descarten el efecto de la manipulación como origen de las variaciones es importante debido a que se prueban concentraciones bajas del compuesto. Los índices de sobrevivencia obtenidos de los organismos tratados con concentraciones bajas de talidomida no muestran una muerte excesiva de organismos y tampoco una selección energética de los mismos.

El índice de fertilidad poblacional (IFCx) es un biomarcador integral dependiente de factores como citotoxicidad, metabolismo y daño en material genético entre otros y que se distribuye de manera estadísticamente normal. En poblaciones expuestas a un estímulo que produce una determinada selección (reflejada en el IS), se espera que la distribución del IFCx de esta población seleccionada muestre desviaciones de los valores característicos de los organismos no expuestos a ese estímulo¹⁰³. Entre los factores que pueden estar involucrados en la desviación se encuentran organismos en los que

las rutas metabólicas pueden estar modificadas, ya sea para una mayor o una menor eficiencia (presencia de rutas metabólicas de desintoxicación o inactivación o ausencia de rutas de activación del compuesto). Por otro lado, no siempre un IS similar entre los organismos experimentales y los controles indicará la falta de selección pues si bien el número de sobrevivientes puede mantenerse constante entre las concentraciones experimentales y el control, la composición de los organismos sobrevivientes puede ser genéticamente distinta. Así, el IS es una primera aproximación de la selección que sufre la población expuesta y la cual influirá en el IFCx.

La ausencia de diferencias significativas entre el IF de los controles [X_0] de cada cruce y la cruce control descartan un efecto de la manipulación de los organismos.

Por otra parte, la existencia de curvas diferentes del IFCx en cada uno de los sistemas de cruce hace evidente que el sistema no es sólo capaz de responder a las diferentes concentraciones de talidomida sino que también logra discriminar el efecto del sexo del progenitor tratado. La diferencia entre la curva TxNT y NTxT muestra que la fertilidad se ve afectada por el sexo del progenitor tratado. El sistema de cruces y el evaluar el IFCx como variable de respuesta permite discriminar un efecto materno de un daño a cromosomas. La curva de TxT lleva por el diseño el efecto sumado de tratar a ambos progenitores y es poco similar con las dos cruces anteriores.

Aunque las varianzas no permitieron establecer diferencias significativas entre el IFCx de las diferentes concentraciones en las cruces TxNT y NTxT, el comportamiento del IFCx es diferente entre cada concentración, mostrando mayor variabilidad en las concentraciones más bajas; el IFCx tiende a ser similar al del control ($IFC_x=1$) conforme la concentración de talidomida aumenta.

Este comportamiento es semejante al de las respuestas horméticas observadas por Calabrese y Baldwin (2003) en cuanto a una potenciación en la expresión de una función biológica particular en concentraciones bajas. Según Calabrese¹⁰⁴, a diferencia de la respuesta en concentraciones mayores, donde la curva dosis respuesta presenta linealidad y una respuesta positiva puede fácilmente doblar los valores basales característicos de los organismos, la variación hormética fluctúa sólo alrededor de 30 a 60% del valor del control, por lo que su detección requiere estudios verdaderamente controlados, tamaños de muestra considerables y frecuencias espontáneas altas para poder diferenciar entre variaciones debidas al error y variaciones asociadas al tratamiento.

En nuestro caso los IFCx obtenidos a bajas concentraciones quedan comprendidos en un intervalo de variación de 60% alrededor del control y gracias al tamaño de muestra y al diseño experimental utilizado, fue posible encontrar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, no se observaron efectos adversos en las concentraciones mayores, como lo suponen las teorías de la hormesis, sino más bien valores parecidos al control.

La talidomida ha sido estudiada en diversos organismos sin encontrar evidencias contundentes de su actividad mutagénica (**Cuadro 11**¹⁰⁵). Debido a su baja solubilidad en agua, se han utilizado otros solventes inclusive para obtener concentraciones altas (como Dimetil sulfóxido , DMSO), en un esfuerzo por asociar algún tipo de actividad genotóxica con el conocido efecto en el desarrollo¹⁰⁶. En este estudio se seleccionó la concentración menor ensayada en *Drosophila* (625 μ M) en la cual la respuesta reportada es negativa, como la concentración más alta, seleccionando concentraciones menores que abarcan tres órdenes de magnitud.

Cuadro 11. Resultados de experimentos con talidomida para mutagénesis. Ashby, *et al.* 1997

	Tipo de mezcla S9 utilizada								Concentraciones	Resultado
	No	Hígado Humano	Hígado de Rata		Conejo					
			Inducidos con Aroclor	Inducidos con Fenobarbital	Hígado		Tejido Fetal			
					No. Inducidos	Inducidos	No. Inducidos	Inducidos		
Mutación génica <i>S. Typhimurium</i> (ensayo con 2 cepas y preincubación)	*		*						8-5000µg/placa	-
Células CHO, Ab. Crom	*	*		*	*	*	*		4.8-300 µM	-
Linfocitos Humanos, Ab. Crom	*					*			1-77.5 µg/ml; 6.3-300 µM	-
Linfocitos Humanos, MN	*								50-2000 µg/ml	-
Mutación Génica L5178Y TK	*								31-250 Linfocitos Humanos/ml	-
Mutación Somática en <i>Drosophila</i>	*								0.625-5mM	-
Neuroblastos de Grillo, Ab. Crom	*		*						10-3 M	-
Ratones Hembra y Macho (C57 y CBA), MN en médula ósea (BMMN)									2760-4400 mg/kg; 1250- 2000mg/kg	-
Conejos Hembras, BMMN									250mg/kg	-
Sensibilización cutánea en ratón									1-5%	-

Nuestros resultados no mostraron efectos evidentes sobre el IFCx de las moscas tratadas en esta concentración, sin embargo, hacia las concentraciones más bajas el efecto del tratamiento con talidomida fue evidente en el IFCx. Resulta interesante notar que si nuestro protocolo hubiera incluido concentraciones cercanas a la más alta probada y al límite de solubilidad, el IFCx recobrado sería similar al de las moscas testigo, con lo que el efecto de la talidomida sobre el IFCx se clasificaría erróneamente como negativo. La falta de actividad genotóxica de la talidomida en los protocolos realizados por otros grupos podría deberse, de manera similar, al enmascaramiento de la respuesta genotóxica.

Las concentraciones probadas en este trabajo derivan de experimentos anteriores de nuestro grupo en los que se encontró actividad mutagénica ($p < 0.05$) en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

En este trabajo, las concentraciones probadas se elaboraron por diluciones sucesivas, por lo que estamos seguros de que la menor de las concentraciones contiene efectivamente menos talidomida que la anterior y así sucesivamente. Esta estrategia metodológica es útil si se busca comprender el efecto de bajas concentraciones.

Además, el comportamiento de los IFCx en las concentraciones bajas en todas y cada una de las cruza se presentaron también en los IFCx obtenidos por sexo para cada una de las progenies. Esta ausencia de efecto descarta la posibilidad de que la actividad de la talidomida involucre genes ligados al sexo.

Además de la mayor variabilidad en los IFCx en las bajas concentraciones y los IFCx muy cercanos al control en la concentración más alta, todas las cruas coinciden en presentar mayor dispersión en las concentraciones bajas, que tienden a disminuir en las concentraciones más altas.

La dispersión de los datos en cada muestra alrededor de un promedio puede ser evaluada por medidas de dispersión como el recorrido o rango, la amplitud, la varianza, la desviación estándar y el error estándar. El error estándar de la media, es un buen estimador de la dispersión poblacional¹⁰⁷. Así, aunque las muestras provenientes de una población pueden ser predecibles en un determinado intervalo, no se espera que dos muestras aleatorias del mismo tamaño y provenientes de la misma población tengan la misma media muestral¹⁰⁸.

Basado en el diseño de un experimento, se espera que todas las categorías a evaluar presenten errores estándar similares, pues se asume que si la metodología es controlada y se evitan al máximo errores de muestreo, factores de confusión y errores sistemáticos, la variación en cada categoría debe estar dada por las características del sistema de prueba de manera constante. La distribución de una variable como el IF en una población biológica es estadísticamente normal por la presencia de organismos genéticamente diferentes¹⁰⁹ y su dispersión depende de la proporción y características de los organismos.

Las alteraciones fisiológicas, bioquímicas y la expresión, composición y arreglo del genoma de un organismo producidas por cambios ambientales o por la exposición a un xenobiótico, son aleatorias y tienen lugar independientemente de las consecuencias que dichos cambios puedan tener en la adaptación al ambiente y en la sobrevivencia y eficiencia reproductiva de un organismo¹¹⁰, sin embargo, la selección por sobrevivencia de genotipos puede tener profundos cambios en la variabilidad alélica de la población¹¹¹ y alterar drásticamente las frecuencias alélicas poblacionales en periodos de

tiempo relativamente cortos¹¹². El cambio de frecuencias alélicas puede resultar como consecuencia de adaptación a ambientes contaminados¹¹³. La exposición a ambientes contaminados o a xenobióticos puede resultar en un aumento (mutaciones) o disminución en la variación genética, de tal manera que se seleccionen loci importantes para la sobrevivencia de los organismos en ambientes contaminados¹¹⁴.

Si la exposición a un xenobiótico modifica de tal manera el equilibrio fisiológico, bioquímico, y genético funcional u homeostático afectando la sobrevivencia de los organismos, la respuesta poblacional tenderá a homogenizarse y dependerá de las similitudes genéticas entre los organismos sobrevivientes, por ejemplo, organismos genéticamente similares con respecto a las rutas metabólicas relacionadas con la desintoxicación de un compuesto.

Por otra parte, si un estímulo produce alteraciones en los sistemas de los organismos pero no afecta de manera vital su homeostasis, el efecto recuperado puede ser heterogéneo, aunque no necesariamente irá acompañado con algún cambio detectable en el valor promedio de la variable de interés, ya que la respuesta poblacional está definida por el conjunto de acervos genéticos individuales no seleccionados. Por último, si la exposición a un xenobiótico no altera los sistemas biológicos de un organismo, la dispersión esperada de la variable de interés será similar a la de organismos no expuestos.

Aunque el daño ocasionado por la exposición de organismos (*in vivo*) a un xenobiótico puede ser a nivel molecular, bioquímico, celular o funcional, entre otros, los efectos pueden ser observados en parámetros que involucren mayores niveles de organización biológica como deterioro reproductivo¹¹⁵, aumento en la tasa de mortalidad, cambios en las frecuencias alélicas y en los niveles de variabilidad genética¹¹⁶, que difícilmente pueden predecirse únicamente con el conocimiento de los mecanismos de toxicidad de las sustancias químicas que los producen¹¹⁷.

A pesar de que los modelos estadísticos y toxicológicos clásicos suponen desviaciones muestrales constantes, cuando todas las posibles causas de error metodológicas han sido controladas y la variación en los errores estándar persiste, debe buscarse la implicación biológica de tales variaciones antes que asumirlas como variaciones inherentes al sistema o descartar al estadístico muestral en cuestión como el estimador adecuado para el parámetro poblacional. El análisis estadístico de las distribuciones asociadas con los estadísticos muestrales, nos permite hacer inferencias sobre un parámetro poblacional desconocido¹¹⁸.

El análisis de varianza (ANOVA) evalúa diferencias de las medias de grupos independientes, sin embargo, no contrasta los valores de las medias directamente sino supone a las medias de cada grupo incluidas en el intervalo de la varianza y compara entonces la posición de los intervalos de los diferentes grupos tomando el valor de la varianza entre grupos, i.e., si la varianza entre los grupos a comparar es muy grande, pero la varianza dentro de cada grupo es pequeña, entonces los grupos están distribuidos en un gran intervalo pero quedan alejados unos de los otros, por el contrario si la varianza entre grupos es pequeña y la varianza dentro de grupos es grande entonces los intervalos de los diferentes grupos quedarán sobrelapados y se dice que no existen diferencias significativas. Dado que el ANOVA compara los intervalos de la varianza alrededor de las medias debe suponerse que cada grupo sigue una distribución normal y que la varianza entre cada grupo a comparar es igual, i.e., existe homogeneidad de varianzas. Este último supuesto es necesario pues el ANOVA considera solamente un valor para la varianza dentro de grupos al suponerla similar. La homogeneidad de varianzas, u homoscedasticidad es importante al realizar comparaciones pues si comparamos grupos con varianzas diferentes mediante el ANOVA la explicación del resultado del análisis puede ser incorrecta. La falta de homogeneidad en las varianzas generalmente es asociada con un mal manejo de las metodologías y vuelve inútil al análisis de varianza ANOVA para evaluar bajo estas situaciones, que generalmente son tratadas con pruebas no paramétricas, sin embargo, no siempre la homogeneidad de varianzas está dada

por errores en las metodologías. En nuestro caso además de que el tamaño de muestra y el número de repeticiones son considerables, no existen diferencias significativas en los IS de los organismos tratados, pero si en los IFCx de las diferentes concentraciones para cada cruz. La obtención de varianzas diferentes en la siguiente generación de organismos vivos tiene un significado biológico.

Pocas veces, los modelos toxicológicos ponen atención a la distribución de las desviaciones, pues son interpretadas como variaciones inherentes al sistema, esto es cierto en modelos físicos o matemáticos, pero no necesariamente se aplica en la evaluación de un biomarcador integral en un modelo biológicos *in vivo* como es el caso del IF.

La existencia de pruebas estadísticas para la comparación de datos cuantitativos numéricos con escalas absolutas pero con varianzas diferentes es limitada, pues generalmente son tratados con pruebas gruesas que convierten los puntajes simplemente en signos “+” o “-“ como la prueba de la mediana o en rangos como la prueba de Kruskall-Wallis, esto hace imposible evaluar la diferencia específica entre grupos aún cuando los datos están en puntajes en escalas mayor a la ordinal y evaluar las interacciones entre las variables independientes pues no existen pruebas no-paramétricas para probarlas¹¹⁹. Además, el uso de la prueba Kruskall-Wallis, cuando los supuestos del análisis de varianza no se cumplen es injustificado y especialmente no aceptable cuando no hay homogeneidad de varianzas. Aunque Kruskall-Wallis es menos sensible a la heterogeneidad en las varianzas que la distribución F, también asume una homoscedasticidad de los grupos a contrastar pues al comparar sus rangos de distribución supone que las distribuciones básicas a partir de las cuales se derivan las muestras son idénticas en forma; aunque no es indispensable que la forma de la distribución sea normal, implica que la dispersión de los datos de cada distribución es similar¹²⁰.

En nuestro caso, no sólo la evaluación de la respuesta promedio, sino la de la dispersión en el IFCx en las diferentes concentraciones y cruzas es importante. La mayor dispersión en las concentraciones bajas que se obtuvo en las cruzas realizadas es indicativa de que el sistema empleado detecta la presencia de la talidomida, mientras que la disminución de los ES hacia las concentraciones más altas muestra una mayor uniformidad en la respuesta de organismos genéticamente similares.

Por otra parte, la relación entre el IFCx promedio y su dispersión, como en las dos concentraciones mas bajas de la craza NTxT son similares las presentados por organismo expuestos justo por debajo ó por encima de un umbral¹²¹.

La talidomida genera numerosos metabolitos por hidrólisis espontánea no enzimática que produce radicales libres que interfieren con la expresión y regulación del material genético. Es conocido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la exposición a xenobióticos pueden producir la oxidación de bases en el ADN y aunque las células poseen sistemas de reparación del daño oxidativo en el ADN, algunas lesiones pueden persistir durante la replicación del ADN y producir mutaciones en células de mamíferos¹²².

Los mecanismos indirectos de genotoxicidad incluyen la presencia de aductos a proteínas involucradas en la reparación de ADN (OGG1, XPD, Ni) y las involucradas en la oxidación celular como el glutatión¹²³. Kirsch *et al*¹²⁴ suponen que, a diferencia de los mutágenos que interactúan con el ADN, los mutágenos que no lo hacen muestran umbrales en sus curvas de respuesta concentración - efecto.

El comportamiento del IFCx de moscas expuestas a concentraciones bajas de talidomida parece presentar una respuesta hormética, posiblemente relacionada con la activación de vías metabólicas

protectoras de la oxidación celular provocada por la hidrólisis de la talidomida al generar una sobrecompensación en las concentraciones bajas.

Los IFCx obtenidos en las concentraciones experimentales son diferentes de los de las moscas testigo, por lo que concluimos que concentraciones bajas de la talidomida tienen un efecto sobre la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) que se refleja, tanto en el promedio como en la dispersión de los datos.

La evaluación de la fertilidad es un acercamiento al estudio en línea germinal, por lo que es necesario que en estudios futuros se caracterice el efecto transgeneracional de la talidomida para determinar si el efecto en la fertilidad es derivado de alteraciones en la diferenciación gonadal somática, de citotoxicidad en las células de la línea germinal o de daño a material genético, entre otros posibles.

Finalmente, estamos convencidos que la evaluación de riesgo de la talidomida y de otros compuestos, debe incluir la caracterización de la curva concentración-efecto en concentraciones realmente bajas, utilizar tamaños de muestra considerables y no concluir sólo a partir de la comparación de los promedios de los biomarcadores evaluados, sino también involucrar otros indicadores como la dispersión o la tendencia de la curva concentración-efecto que reflejen la respuesta diferencial de los organismos ante los estímulos del ambiente.

Así, es necesario que antes de ampliar el uso de la talidomida para el tratamiento de otras enfermedades se reevalúe su genotoxicidad en concentraciones más bajas, utilizando diversos protocolos y sistemas de prueba.

VI. CONCLUSIONES

El IFCx de moscas expuestas a concentraciones bajas no es lineal.

El IF de la concentración más alta no muestra diferencias con su control ni el de cruza y muestra los menores errores estándar.

La alteración de la fertilidad aparentemente no está ligada a daño a cromosomas sexuales en *Drosophila melanogaster*.

La dispersión asociada a los IFCx disminuye conforme aumenta la concentración de talidomida probada.

La fertilidad está asociada con el estado de las células germinales en el organismo y su alteración es un buen indicador de la existencia de actividad genotóxica transgeneracional.

La fertilidad de moscas expuestas en el estado larvario a talidomida es diferente de las moscas testigo.

Apéndice I. Historia de la Talidomida

La talidomida fue sintetizada originalmente por una farmacéutica suiza interesada en producir un sedante en 1954, pero fue descartada por no mostrar los efectos deseados en animales de laboratorio, sin embargo, como la estructura de la molécula sugería un posible efecto sedante, la firma química alemana Chemie Grünenthal retomó el desarrollo del compuesto y lo probó como anticonvulsivo para tratar epilepsia, si bien no prevenía convulsiones trabajaba como hipnótico, induciendo rápidamente sueño profundo nocturno sin efectos secundarios y su sobredosis causaba sueño prolongado pero no la muerte, además, parecía no ser tóxica pues la LD₅₀ no pudo ser establecida en ratón¹²⁵.

La talidomida fue comercializada inicialmente en 1956 bajo el nombre de Contergan® (fig. 17) en la República Federal Alemania, Alemania Occidental. Para 1960 el Contergan® era la tableta favorita del sueño en este país, de costo moderado, disponible sin prescripción médica y ampliamente usada en casas, hospitales e instituciones mentales. Rápidamente, compañías farmacéuticas en otras ciudades, empezaron a lanzar al mercado la talidomida bajo licencia de Grünenthal. Distillers Biochemicals Ltd. lanzó al mercado del Reino Unido, Australia y Nueva Zelanda la talidomida bajo el nombre de Distaval® en 1958, sin embargo, aunque fue autorizada sólo bajo prescripción médica fue ampliamente utilizada para tratar síntomas comunes del embarazo temprano. Desde Portugal, la talidomida alcanzó canales de distribución locales e internacionales como la compañía Softenon. En Canadá, la compañía Frank W. Horner Ltd de Montreal comercializó la talidomida bajo el nombre de Talimol® y la filial canadiense de la Wm.S.Merrell Company de Cincinnati bajo el nombre de Kevadon®.

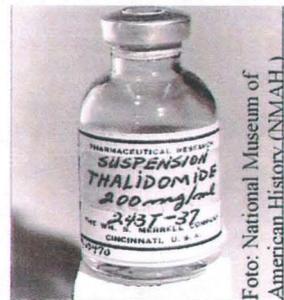
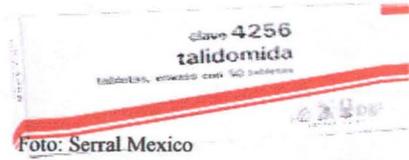


Fig. 17 Presentaciones de la talidomida en el mercado

En septiembre de 1960, la Wm.S.Merrell Company solicitó a la Oficina Federal de Administración de Medicamentos estadounidense (Federal Drugs Administration; FDA) su autorización para vender Kevadon® en los Estados Unidos, si bien aún no existían reportes de efectos colaterales de la talidomida, en los meses siguientes se publicaron algunos reportes en revistas médicas alemanas que asociaban el uso prolongado de la talidomida con el desarrollo de neuritis periférica irreversible, inflamación de nervios caracterizada por el debilitamiento o la abolición de los reflejos osteotendinosos, atrofia muscular, reacción de degeneración completa o parcial, hipotonía, trastornos de la motilidad y de la sensibilidad, dichos pacientes se quejaban de comezón en las manos, alteraciones de los sentidos y finalmente de alteraciones motoras y atrofia del pulgar, por esto la talidomida no fue aprobada para uso clínico en los Estados Unidos, tal decisión fue tomada gracias a la Dra. Helen Brooke Taussig de la Escuela de Medicina Johns Hopkins y la investigadora de la FDA Dra. Frances Oldham Kelsey que alertó acerca de la seguridad de la talidomida y que fue galardonada con la *French Chevalier Legion d'Honneur*, el Premio Italiano *Feltrinelli*, la medalla de Honor Presidencial de Perú, el Premio Elizabeth Blackwell y la Medalla de la Libertad de los Estados Unidos entregada el 7 de Agosto de 1962 por el Presidente John F. Kennedy (**fig. 18**), por la prohibición de la liberación de la talidomida en este país, sin embargo, la farmacéutica Wm.S.Merrell Company había enviado en Abril muestras médicas a miles de médicos en los Estados Unidos.¹²⁶



Fig. 18 Frances Oldham Kelsey recibiendo la medalla de la libertad de manos del Presidente John F. Kennedy

En poco tiempo, fueron comercializadas en otros países preparaciones compuestas que combinaban la talidomida con otras drogas para el tratamiento de diversas indicaciones como asma, hipertensión, migraña, nerviosismo, neuralgia, e incluso fue combinada con aspirina para el tratamiento sintomático de gripes y catarros; algunos de estos preparados eran Asmaval®, Tensival®, Valgraine®, Valgis®, Algosediv®, Peracon®, Expectorans®, Gripes® y Polygrippan®, entre otros.

La talidomida era ampliamente usada en hospitales para calmar a los niños en estudios clínicos como los electroencefalográficos, incluso, una forma líquida hecha especialmente para niños llegó a ser usada por niñeras de la Alemania Occidental. En Gran Bretaña, un anuncio enfatizaba la seguridad de la talidomida con una fotografía de un bebé tomando una botella de medicina. Como antiemético ayudaba a combatir las náuseas del embarazo y por supuesto la talidomida ofrecía a las mujeres embarazadas noches sin malestares. Se estima que tan sólo en Alemania en 1960 Grünenthal manufacturó 14.6 toneladas de talidomida¹²⁷.

En octubre de 1960, durante el Congreso Anual de Pediatría (Meeting Annual of the Pediatricians) en Kassel, República Federal de Alemania, los médicos W. Kosenow y R.A. Pfeiffer del Instituto de Genética Humana de Münster presentaron el caso de dos infantes fuertemente deformados que sospechaban se trataba de una nueva entidad clínica pues nunca habían visto esta combinación de anomalías en un infante¹²⁸. Las fotografías y los rayos X mostraban que casi todos los huesos largos de los brazos de los niños no se habían desarrollado, sus brazos eran casi tan cortos como sus manos extendidas. Sus piernas se hallaban menos afectadas pero mostraban signos similares de alteraciones en el crecimiento. Ambos infantes presentaban un largo hemangioma –tumor de la piel que forma una pequeña mancha punteada de un rojo vivo o violáceo– que se extendía desde la frente hacia la nariz y a través del labio superior, además, uno de ellos presentaba estenosis duodenal, constricción al principio del intestino delgado. La deformidad de los miembros que presentaban los infantes era característica de

una malformación congénita conocida como focomelia (del griego *phoke*: foca, y *melos*:limbo). La focomelia es sumamente rara y generalmente afecta sólo un limbo. Kosenow y Pfeiffer reportaron que no habían hallado incompatibilidad en los tipos sanguíneos de los padres, anormalidades cromosómicas en las células de ambos niños, ni alguna indicación hereditaria en la historia de ambas familias que pudiera estar relacionada con tal condición. Según Taussig (1962)¹²⁹, el médico pediatra suizo Guido Fanconi, que había estado interesado en las deformidades congénitas declaró que tampoco había visto nunca infantes afectados de tal manera. Desafortunadamente la exposición del caso no atrajo la atención de una gran audiencia.

A lo largo de 1960, la incidencia de focomelia en Alemania Occidental había aumentado, mientras que en ese año se reportaron 27 casos en Münster, 30 en Hamburgo y 19 en Bonn, en 1959 sólo se presentaron alrededor de una docena de casos de focomelia en toda Alemania Occidental y en la década anterior habían sido quizás 15 casos en todo Alemania Occidental¹³⁰.

Para abril de 1961, ya había un número suficiente de efectos reportados en Alemania Occidental y la talidomida como otros fármacos fue recetada bajo prescripción médica, sin embargo, ya era suficientemente popular y continuó siendo usada ampliamente en casas y hospitales de este país.

En octubre de 1961, se iniciaron cuatro investigaciones diferentes en Kiel, Münster, Bonn y Hamburgo.

En el estudio realizado con 32 casos en la ciudad de Kiel y sus alrededores, H.R. Wiedemann determinó un conjunto de malformaciones asociadas en estos niños como enfermedades congénitas cardíacas, microftalmia (desarrollo anormal del ojo y sus anexos), coloborna (fisura del ojo) y malformaciones renales entre otras, además, encontró que las malformaciones seguían un patrón

específico aunque con diferentes grados de severidad. Las anomalías de los huesos largos de los brazos caracterizaban la mayoría de los casos, con las piernas involucradas en la mitad de estos. El radio o ulna (huesos del antebrazo) o ambos estaban ausentes o malformados. En casos extremos el húmero (hueso del brazo superior) también se hallaba ausente. De manera general, ambos brazos estaban afectados aunque no necesariamente de la misma manera. Cuando las piernas estaban involucradas, los huesos de la cadera no estaban totalmente desarrollados. La dislocación de la cadera y la rotación de la cabeza del fémur hacia fuera provocaban que los pies se encontraran deformados hacia fuera. En los casos más severos, los infantes no presentaban brazos ni piernas y generalmente morían por no poder ponerse boca arriba en los cuneros o por neumonía debido a la falta de ejercicio.

En el estudio realizado en la ciudad de Münster con 34 infantes, Pfeiffer y Kosenow no encontraron evidencia de que la deformidad límbica fuera hereditaria y señalaron que el hemangioma facial era el rasgo más característico del síndrome, aunque la nariz aplanada también era común y en algunos casos, la oreja se hallaba ausente con el canal auditivo situado anormalmente bajo, además, muchos niños mostraban parálisis facial y una gran variedad de malformaciones en órganos internos predominando el tracto digestivo y el aparato circulatorio, sin embargo, muchos de los niños parecían normalmente inteligentes. En este estudio, Pfeiffer y Kosenow concluyeron que el causante del daño era un agente ambiental desconocido que afectaba al embrión alrededor de la tercera y hasta la sexta semana de embarazo, periodo en el cual la gran mayoría de las mujeres desconocían estar embarazadas. Taussig ¹³¹ refiere que se pensó entonces en un agente viral, una infección por rubéola o sarampión durante este periodo crítico resultaba en malformaciones severas pero no en el patrón de malformaciones presentadas por los infantes afectados, que hasta este momento se habían presentado todos sólo en Alemania Occidental.

El 8 de noviembre de 1961, Widukind Lenz, con base en el estudio realizado en Hamburgo determinó que el fármaco Contergan® era la causa del aumento de la focomelia, Lenz al igual que otros investigadores había realizado encuestas a los padres de infantes focomélicos y a los médicos que atendieron estos embarazos preguntando por exposición a rayos X, drogas, hormonas, detergentes, comidas y conservadores de alimentos, anticonceptivos y pruebas de embarazo y todo aquello a lo que la madre podía haber estado expuesta durante las primeras semanas de embarazo. Los resultados mostraron que 20% de las mujeres habían tomado Contergan® durante el embarazo, sin embargo, en una encuesta posterior al preguntar específicamente por el Contergan®, 50% de las mujeres reportó su uso al considerarlo inocuo¹³².

El 15 de noviembre de 1961, Lenz alertó a la farmacéutica alemana Chemie Grünenthal que el Contergan® era sospechoso de causar el catastrófico aumento de la focomelia y pidió sacarlo del mercado.

El 20 de noviembre de 1961, durante la realización de un congreso de pediatría en la ciudad de Dusseldorf, Alemania Federal, la comunidad médica se declaró alarmada por el misterioso incremento en el número de nacimientos focomélicos y se propuso a la radiación como causa de las deformaciones, sin embargo, en esta reunión, W. Lenz declaró sospechar que una nueva droga usada en sedantes y tabletas para dormir era la causante del “Síndrome de Wiedemann” como él lo llamó, sin embargo, no mencionó el nombre y sólo refirió haber avisado al fabricante. Taussig¹³³ menciona que esa noche un médico alemán se acercó a Lenz y dijo “Podría decirme confidencialmente, ¿es la droga Contergan?, le pregunto porque mi esposa y yo tenemos un niño con esas características y mi esposa tomó Contergan”. Antes de que el congreso concluyera la mayoría de los médicos sabían que Lenz sospechaba del Contergan®.

El 26 de noviembre, Grünenthal retiró la droga y todos los compuestos que la contenían del mercado alemán.

El 28 de noviembre de 1961, el ministro de salud de Alemania Occidental emitió un cauteloso comunicado que señalaba al Contergan® como el principal sospechoso causante del incremento de la focomelia. Los medios de comunicación rápidamente alertaron a las mujeres embarazadas a no tomar la droga. Para agosto de 1962, era ilegal poseer talidomida en Alemania Occidental¹³⁴.

El 27 de noviembre de 1961, W.G.McBride médico de New South Wales, Australia comunicó a las oficinas en Australia y Londres de la compañía Distillers Biochemicals Ltd. que el Distaval era causante de focomelia. Entre abril y noviembre de 1961 McBride había atendido seis partos de infantes con focomelia severa. McBride se percató que en las historias médicas de las madres se reportaba el uso de Distaval® en todos los casos.

El 3 de diciembre de 1961, la compañía Distillers Biochemicals Ltd. retiró la droga del mercado inglés. El 16 de diciembre del mismo año apareció un reporte de McBride en la revista *The Lancet* que señalaba

A.L. Speirs médico de Stirligshire, Escocia, revisó diez casos de focomelia que había atendido en los meses precedentes y concluyó que 8 de las 10 mujeres habían tomado Distaval ® durante su embarazo temprano. De la misma manera, médicos de todo el mundo, Reino Unido, Kenia, Japón, Suecia, Bélgica, Marruecos, Suiza, Israel, Perú, Canadá, Brasil, Australia, Nueva Zelanda y EUA entre otros empezaron a reportar casos similares al Distaval como la causa de las anormalidades (**fig.19**).

back to form the subject of further discussion. It may not be too much to hope that either the Ministry of Health or the Medical Research Council, or the Ministry through the Medical Research Council, will take the lead.

Department of Paediatrics,
University of Liverpool

CHARLES WELLS.

SMOKING BY SCHOOLCHILDREN

Sir,—Your issue of Nov. 25 contains, under Public Health, yet another comment on smoking by school-children. This repeated what has often been said before—namely, that there is an urgent need for increased anti-smoking education of schoolchildren and of the general population if the rising incidence of lung cancer is to be halted and reversed. Such anti-smoking education has been the function of local health authorities for the past three or four years, but there is little evidence that it is having any effect.

In my opinion the principal difficulty is that the power of the local health authority is limited, both in money and manpower, and that opposed to its efforts are those of the cigarette manufacturers who promote cigarette smoking with an energy that the local health authority cannot approach. Your issue of Oct. 28 contains the gist of an exchange in Parliament between Mr. Francis Noel-Baker and Mr. Niall Macpherson, parliamentary secretary to the Board of Trade. The latter was sceptical of the assertion that £20 million was spent on advertising tobacco in 1960 as compared with £1 million in 1953, but he did not deny that £7.7 million was expended on press and television publicity in 1960. The annual report (part 1) of the Ministry of Health for 1960 (which, incidentally, devotes just 7 lines to smoking and lung cancer) also shows that local health authorities spent less on providing the midwifery services (26.5 million) which delivered one-third of the nation's babies than the tobacco manufacturers spent on promoting the consumption of tobacco, and only a little more (£3 million) was spent on home nursing. The local authorities cannot in fact cope with this sort of expenditure devoted to one aspect only of health education, and we are fighting our battle with both hands tied behind our backs. Mr. Macpherson further denied that this advertising had been accompanied by any marked rise in tobacco consumption and gave the figure of 133 million lb. of tobacco smoked in the six months January to June, 1960, compared with 124 million lb. in the corresponding period of 1959. This is, in fact, a rise of 7%, so that the local authorities are making no headway at all!

The complacency of the authorities is difficult to understand. The number of deaths from lung cancer continue to rise from year to year. One can only conclude that even now the connection between smoking and lung cancer is not accepted in high places although, as Sir Derrick Dunlop is reported in *The Guardian* to have said last week (Dec. 1), "To deny that cigarette smoking is an important factor in the aetiology of lung cancer . . . is to carry scepticism to absurd lengths". The authorities are possibly afraid of losing the revenue from cigarette smoking, but surely it must be appreciated that even with the most energetic efforts the decline in cigarette smoking will be very gradual over the years.

Some help must be given to local health authorities. If, in the interests of liberty (so-called), the advertising industry is to be sacrosanct, then surely an advertising national campaign should be undertaken in the new-

papers and on television on the same scale as is put forth by the tobacco manufacturers. Only in this way can we feel locally that our efforts are really worth while.

Public Health Department,
Huddersfield, West. Yorks.

ALFRED YASNOV
Medical Officer of Health.

THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES

Sir,—Congenital abnormalities are present in approximately 1.5% of babies. In recent months I have observed that the incidence of multiple severe abnormalities in babies delivered of women who were given the drug thalidomide ("Distaval") during pregnancy, as an anti-emetic or as a sedative, to be almost 20%.

These abnormalities are present in structures developed from mesenchyme—i.e., the bones and musculature of the gut. Bony development seems to be affected in a very striking manner, resulting in polydactyly, syndactyly, and failure of development of long bones (abnormally short femora and radii).

Have any of your readers seen similar abnormalities in babies delivered of women who have taken this drug during pregnancy?

Harrold, New South Wales.

W. G. McBRIDE.

••• In our issue of Dec. 2 we included a statement from the Distillers Company (Biochemicals) Ltd. referring to "reports from two overseas sources possibly associating thalidomide ('Distaval') with harmful effects on the fetus in early pregnancy". Reading further investigation, the early decision to withdraw from the market on all its preparations containing thalidomide.—Ed.L.

THE CASUALTY DEPARTMENT

Sir,—Mr. Lamont (Nov. 25) lists a series of libel pitfalls which may befall a doctor but he talks as if these will inevitably beset him. Surely if a registered practitioner (as all casualty officers are) with a whole year of hospital training behind him has no idea how to deal with berchurms proceeding or of the elementary rules of passing the fault lies with the present method of medical education, not the method of staffing.

Mr. Lamont scarcely suggests in his proposed Utopia where all casualty officers will be consultants (able to cook a steak at all and steady) that their work should be screened by the most junior casualty officer! He is in fact advocating that there should be a casualty department for the casualty department. The idea that there should be a casualty consultant seems to me absurd. A specialist in not specialising I suppose. What would in fact happen if there were casualty consultants? Would they come to the department at 1 A.M. on a Saturday morning to decide whether or not the drunk has a head injury any more than the present consultants in charge of casualty departments do now? Of course not. Mr. Lamont knows this and so do I. If there is a serious doubt in the casualty officer's mind he will, as now, call in a registrar to help him—he is a medical, surgical, or orthopaedic one.

Let me put the other side of the picture. I did casualty work and can honestly say that its very nature is a casual. Of course one gambles at the patient who comes to see you but at night complaining of an ache he has had the three days. It so happens that people are ill; that, and anyone who does not want to treat fish, crabs, reptiles, invertebrates, invertebrate, ill-managed, but by and large pleasant, people, should take up pathology.

I think the present casualty arrangement is probably one of the most valuable training-grounds there is for any young man. Everyone has got to learn to take responsibility, and once he has registered the sooner the better. What better place than

Para Diciembre de 1961, no había duda de que la talidomida jugaba un papel importante en la inducción de focomelia y se emitieron alertas en diarios, radio y televisión alemanas para que las mujeres embarazadas no tomaran la droga.¹³⁵

A pesar del retiro de la talidomida del mercado, el problema no había terminado, muchas tabletas de talidomida aún estaban en manos de consumidores desinformados y muchos infantes afectados aún se encontraban en gestación. Se estima que en Alemania la talidomida aún permanecía a la venta en algunas tiendas seis meses después de la alerta¹³⁶. Además, la confusión por los nombres de las marcas en los diferentes países inhabilitó el embargo, por ejemplo, las autoridades brasileñas incautaron 2.5 millones de píldoras seis meses después del retiro en Alemania, junto con 100 toneladas de talidomida sin envasar¹³⁷. En Italia y Japón la talidomida aún permanecía en las tiendas nueve meses después de su retiro en Alemania.¹³⁸ En los Estados Unidos de las más de cinco toneladas que la Wm.S.Merrell Company había repartido como muestras médicas, más de 2 toneladas no fueron recuperadas por lo que el presidente de ese país, John F. Kennedy, alertó a la población norteamericana durante una conferencia de prensa a revisar su botiquín en busca de talidomida.

Inmediatamente los médicos comenzaron a realizar estudios prospectivos preguntando a las mujeres embarazadas acerca del consumo de talidomida para poder correlacionar el consumo de la droga con el estado del bebé al final del embarazo. Taussig¹³⁹ cita el caso de un obstetra alemán que realizó una encuesta a 65 mujeres embarazadas y sólo una reportó el consumo de talidomida, el médico declaró que si ella tenía un bebé anormal él creería en los estudios de Lenz, ella lo tuvo. W. von Massenbach realizó un estudio con 350 mujeres embarazadas en Lübeck, y encontró que 13 habían tomado Contergan®, 6 durante la segunda mitad del embarazo y 7 en los primeros cuatro meses y medio, de estas, dos tuvieron bebés con focomelia, una tuvo un bebé con atresia anal y cuatro tuvieron bebés normales. Una revisión de los reportes clínicos de Dusseldorf hasta marzo de 1961 mostró que

300 mujeres que no habían tomado Contergan® tenían bebés saludables, mientras la mitad de las que habían reportado su consumo tenían bebés focomélicos.

Mientras tanto, Lenz realizaba estudios para conectar la presencia de focomelia con el periodo exacto de consumo de la droga, para ello, consideraba el consumo de Contergan® con base en las historias médicas de los hospitales o si las madres mostraban una copia de la prescripción, esto era difícil ya que antes de 1961 la talidomida era vendida sin prescripción médica en Alemania Occidental y porque las enfermeras de hospitales alemanes daban tabletas para dormir libremente a los pacientes. En un caso, Lenz mencionó que la madre aseguraba no haber recibido Contergan® durante el embarazo pero su bebé presentaba focomelia, Lenz entrevistó al médico y éste insistió en haber recetado otro sedante a la madre, ante tal insistencia, Lenz acudió a la farmacia y encontró que la receta tenía una breve nota: “*Drug not in stock. Contergan given instead*” (Medicamento inexistente en bodega, se dió Contergan en su lugar)¹⁴⁰.

Es imposible determinar el número exacto de infantes focomélicos nacidos en Alemania Occidental, pero el brote fue devastador¹⁴¹. Los registros del Instituto de Genética Humana de Münster muestran tres casos de focomelia bilateral en 1959, 26 en 1960 y 96 en 1961. Se estima que alrededor de 10,000 a 12,000 niños fueron afectados en todo el mundo y de ellos sólo 5,000 sobrevivieron a la infancia¹⁴²; tan sólo existen 6,000 casos reportados de malformaciones inducidas en la República Federal de Alemania. Además, se estima que 40,000 personas desarrollaron neuritis periférica por el uso de la talidomida¹⁴³, sin embargo, pese al gran número de infantes afectados pudo haber un número considerable de abortos tempranos de los cuales no se tuvo referencia alguna.

VII. REFERENCIAS

- ¹ Moos, R.V., Stolz, R., Cerny, T. Gillessen, S. 2003. **Thalidomide: from tragedy to promise.** *Swiss. Med. Wkly.* 133:77-87
- ² Science Lab. Chemicals & Laboratory Equipment. <http://www.sciencelab.com>
- ³ Patil, C.R., y Bhise, S.B. 2003. **Re-emergence of Thalidomide.** *Indian Journal of Pharmacology.* 35:204-212
- ⁴ Moos, R.V., Stolz, R., Cerny, T. Gillessen, S. 2003. *Op. cit.* [1]
- ⁵ Xinuy Zhu, Ying Ping Zhang, Gilles Klopman, H. Rosenkranz. 1999. **Thalidomide and metabolites: Indications of the Absence of genotoxic carcinogenic potentials.** *Mutation Research.* 425:153-167
- ⁶ Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. **Free Radical Mediated Oxidative DNA Damage in the Mechanism of Thalidomide Teratogenicity.** *Nat. Med.* 5:582-585
- ⁷ Patil, C.R., y Bhise, S.B. 2003. *Op. cit.* [3]
- ⁸ Moos, R.V., Stolz, R., Cerny, T. Gillessen, S. 2003. *Op. cit.* [1]
- ⁹ D'amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J.1994. **Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4082-4085.
- ¹⁰ Calbiochem. 2003. **Thalidomide Safety Data Sheet.** Catalog#585970
- ¹¹ Patil, C.R., y Bhise, S.B. 2003. *Op. cit.* [3]
- ¹² D'amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J.1994. *Op. Cit.* [9]
- ¹³ Patil, C.R., y Bhise, S.B. 2003. *Op. cit.* [3]
- ¹⁴ *Idem* [3]
- ¹⁵ Taussig, HB. 1962. **The Thalidomide Syndrome.** *Scientific American.* 207(2):29-35
- ¹⁶ Smithells RW y Newman CGH. 1992. **Recognition of Thalidomide Defects.** *J. Med. Genet.* 29:716-23
- ¹⁷ *Idem* [16]
- ¹⁸ *Idem* [16]
- ¹⁹ Patil, C.R., y Bhise, S.B. 2003. *Op. cit.* [3]
- ²⁰ Jason MH, Katie KH, Martin AP y Craig H. 2002 **Thalidomide modulates Nuclear redox status and preferentially depletes Glutathione in Rabbit limb versus Rat Limb.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*200:768-76
- ²¹ J. Ashby, H. Tinwell, R.D. Callander, I. Kimber, P. Clay, S.M. Galloway, R.B. Hill, S.K. Greenwood, M.E. Gaulden, M.J. Ferguson, E. Vogel, M. Nivard, J.M. Parry, J. Williamson. 1997. **thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints.** *Mutation Research.* 396:45-64
- ²² Huang PHT y McBride WG. 1990. **Thalidomide induced alteration in secondary structure of rat embryonic DNA in vivo.** *Teratog. Carcinog Mutagen.* 10:281-294
- ²³ Huang PHT y McBride WG. 1997. **Interaction of (glutaramido-2-14-C)-thalidomide with rat embryonic DNA in vivo.** *Teratog. Carcinog Mutagen.* 17:1-5
- ²⁴ McBride WG. 1994. **Thalidomide may be a mutagen.** *BMJ.* 308:1635-1636
- ²⁵ Read AP. 1994. **Thalidomide may be a mutagen.** *Comment. BMJ.* 308:1636
- ²⁶ J. Ashby, H. Tinwell, R.D. Callander, I. Kimber, P. Clay, S.M. Galloway, R.B. Hill, S.K. Greenwood, M.E. Gaulden, M.J. Ferguson, E. Vogel, M. Nivard, J.M. Parry, J. Williamson. 1997. **Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints.** *Mutation Research.* 396:45-64
- ²⁷ Lai P, y Palmieri G. 1970. **The Influence of Thalidomide on reproductive Capacity in the Cock.** *Eur. J. Toxicol.* 3(2):103-106
- ²⁸ Teo, S.K., Denny, K.H., Stirling, D.I., Thomas, D.T., Morseth, M.L., Hoberman, A.M. 2004. **Effects of thalidomide on reproductive function and early embryonic development in male and female New Zealand white rabbits.** *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology.* 71(1): 1-16
- ²⁹ Moos, R.V., Stolz, R., Cerny, T. Gillessen, S. 2003. *Op. cit.* [1]
- ³⁰ *Idem* [1]
- ³¹ King, R.C. y Stansfield, W.D. 1997. **A Dictionary of genetics.** Oxford University Press.
- ³² O'Grady, P.M. y Kidwell, M.G. 2002. **Phylogeny of the Subgenus Sophophora (Diptera: Drosophilidae) Based on Combined Analysis of Nuclear and Mitochondrial Sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 22(3):442-453
- ³³ R. C. King y W.D. Stansfield. 1997. **A Dictionary of genetics.** Oxford University Press.
- ³⁴ Rubin, G.M. y Lewis, E.B. 2000. **A Brief History of Drosophila's Contributions to Genome Research.** *Science* 287:2216-2220

- ³⁵ Bridges, C. B. 1914. **Direct proof through non-disjunction that the sex-linked genes of *Drosophila* are borne on the X-chromosome.** *Science*. 40: 107-109.
- ³⁶ Rubin, G.M. y Lewis, E.B. 2000. *Op. cit.* [34]
- ³⁷ Mitchell I. y R. Combes. 1984. **Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*.** *En: S.Venitt y J.M. Parry Mutagenicity testing a practical approach.* IRL Press, IK. 149-155pp
- ³⁸ Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferreira S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wej MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. 2000. **The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science*. 287(5461):2185-2195
- ³⁹ Adams, M.A., *et al*, 2000. *Op. cit*[38]
- ⁴⁰ Clark A.M. 1982. **The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens.** *Mutation Research* 2:89-97.
- ⁴¹ Hällström I, Magnusson J y C.Ramel. 1982. **Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*.** *Mutation Research* 92:161-168
- ⁴² Kalthoff K. 1996. **Análisis of biological development.** McGraw-Hill, EUA. Pp850
- ⁴³ IUPAC. **Glossary of terms used in toxicokinetics.** 2004. *Pure Appl. Chem.* 76(5):1033-1082
- ⁴⁴ Durán de Bazúa, Carmen. 2000. **Fuentes de emisión, distribución y dispersión de contaminantes.** Conferencia inaugural en el II curso de toxicología genética. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- ⁴⁵ IUPAC. 2004. *Op. cit.* [44]
- ⁴⁶ Casarett, L.J. y Doull, J. 1975. **Toxicology. The Basic Science of Poisons.** Macmillan Publishing. pp3
- ⁴⁷ *Idem* [46]
- ⁴⁸ Hoffmann, G.R. y MacPhee, D.G. 1999. **Reflections in mutation research: an introductory essay.** *Mutation Research*. 436:123-130
- ⁴⁹ Beale, G. 1993. **The Discovery of Mustard Gas Mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941.** *Genetics* 134: 393-399
- ⁵⁰ Oehlkers, F. 1943. **Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien.** *Z. Ind. Abst. u. Vererbungsl.* 81:313-341.
- ⁵¹ Rapoport, I.A. 1946. **Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutations.** *C.R. Dokl. Acad. Sci. URSS.* 54:65-67.
- ⁵² Auerbach, C. 1976. **Mutation Research: Problems, Results, and Perspectives.** Chapman & Hall, London.
- ⁵³ Micheline Kirsch-Volders, Annelies Vanhauwaert, Ursula Eichenlaub-Ritter, Ilse Decordier. 2003. **Indirect mechanisms of genotoxicity.** *Toxicology Letters* 140-141:63-74
- ⁵⁴ Bryan M. Turner. 2000. **Histone acetylation and epigenetic code.** *Bioessays*. 22:836-845

- ⁵⁵ Takashi Sugimura, Toshikazu Ushijima. 2000. **Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis.** *Mutation Research.* 462:235-246
- ⁵⁶ Peter A. Jones, Peter W. Laird. 1999. **Cancer epigenetics comes of age.** *Nature Genetics.* 21:163-167
- ⁵⁷ Winder. 1993. **The Toxicity of lead.** *Mutation Research.* 285:117-124
- ⁵⁸ Russell. 1996. **Genetics.** Harper Collins College Publishers
- ⁵⁹ John Cairns. 1998. **Mutation and Cancer: the antecedents to our studies of adaptative mutation.** *Genetics.* 148:1433-1440
- ⁶⁰ Trimbell, J. 2002. **Introduction to Toxicology.** CRC Press
- ⁶¹ Casarett 1975 *Op. cit.* [46]
- ⁶² World Health Organization. 1993. **Internacional Program for Chemical Safety (IPCS) Biomarkers and Risk Assesment: concepts and principles.** *Environmental Health Criteria* 155
- ⁶³ Venitt , S,y Parry, J.M. 1984. **Mutagenicity Testing . A Practical Approach.** IRL Press. pp353
- ⁶⁴ Gad, S.C. 1999. **Statistical and experimental design for toxicologists.** CRC Press.
- ⁶⁵ *Idem* [64]
- ⁶⁶ World Health Organization. 1993. *Op. cit.* [62]
- ⁶⁷ Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. 2000. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** *Mutation Research.* 463: 111-172
- ⁶⁸ Wurgler, F.E., Sobels, F.H. y Vogel, E. 1984. **Drosophila as an Assay System for Detecting Genetic Changes.** *En: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. Y Ramel, C.(eds) 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures.* Elsevier Science Publishers
- ⁶⁹ *Idem*[68]
- ⁷⁰ Townsend, J.F, T.D. Luckey. 1960. **Hormoligosis in Pharmacology.** *J. Am. Med. Assoc.* 173(44)
- ⁷¹ Casarett, L.J. y Doull, J, 1975 *Op. cit.*, pp17 [46]
- ⁷² Casarett, L.J. y Doull, J, 1975 *Op. cit.*, pp17[46]
- ⁷³ Rodriguez Amaiz R. 1997. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos.** Fondo de Cultura Económica
- ⁷⁴ Said Infante Gil y guillermo P. Zàrate de Lara. 1984. **Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario.** Trillas. pp510
- ⁷⁵ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* [64]
- ⁷⁶ Micheline Kirsch-Volders, Marilyn aaderma, Azeddine Elhajouji. 2000. **Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis.** *Mutation Research.* 464:3-11
- ⁷⁷ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp232 [64]
- ⁷⁸ Micheline Kirsch-Volders, Annelies Vanhauwaert, Ursula Eichenlaub-Ritter, Ilse Decordier. 2003. **Indirect mechanisms of genotoxicity.** *Toxicology Letters* 140-141:63-74
- ⁷⁹ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp236 [64]
- ⁸⁰ Micheline Kirsch-Volders, Marilyn aaderma, Azeddine Elhajouji. 2000. *Op. cit.* [76]
- ⁸¹ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp232 [64]
- ⁸² Micheline Kirsch-Volders, Marilyn aaderma, Azeddine Elhajouji. 2000. *Op. cit.* [76]
- ⁸³ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp234-235 [64]
- ⁸⁴ Edward J. Calabrese y Linda A. baldwin. 2001. **Hormesis:U-shaped dose response and their centrality in toxicology.** *Trends inPharmacological Science.* 22(8):285-291
- ⁸⁵ C.D. Holland. 1988. **Chemical Hormesis: Beneficial Effects at low exposures , adverse effects at high exposures.** Texas Institute for Advancement of Chemical Technology and Texas A&M University, USA, 1998 <http://www-chen.tamu.edu/Tiact/index.html>
- ⁸⁶ Edward J. Calabrese y Linda A. Baldwin. 1998. **Hormesis as a biological hypothesis.** *Environmental Health Perspectives* 106, Suplemento 1
- ⁸⁷ Edward J. Calabrese y Linda A. Baldwin. 1998. **Can the concept of hormesis be generalized to carcinogenesis?.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 28:230-241
- ⁸⁸ Stebbing ARD. 1997. **A theory for growth hormesis.** *BELLE News* l. 6:1-11
- ⁸⁹ Wayne B. Jonas. 2001. **The future of hormesis: what is the clinical relevance to hormesis.** *Critical Reviews in Toxicology.* 31(4 y 5):655-658
- ⁹⁰ *Idem* [89]

- ⁹¹ C.D. Holland. *Op. cit.* [85]
- ⁹² Edward J. Calabrese y Linda A. Baldwin. 2001. **U-shaped dose-responses in biology, toxicology and public health.** *Annu. Rev. Public Health.* 22:15-33
- ⁹³ Deborah Axelrod, Kathy Burns, Devra Davis, Nicolas Von Larebeke. 2004. **Hormesis. An inappropriate Extrapolation form the Specific to the Universal.** *Int. J. Occup. Environ. Health.* 10(3):335-339
- ⁹⁴ Edward J. Calabrese y Linda A. Baldwin. 1998. **Hormesis as a biological hypothesis.** *Op. cit.* [87]
- ⁹⁵ *Idem* [87]
- ⁹⁶ McBride WG. 1994. *Op. Cit.* [24]
- ⁹⁷ Ashby J, Tinwell H, Callander RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM, Hill RB, Greenwood SK, Gaulden ME, Ferguson MJ, Vogel E, Nivard M, Parry JM, Williamson J. 1997. **Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints.** *Mutation Research.* 396(1-2):45-64
- ⁹⁸ Ramos-Morales P., Muñoz-Moya A., Muñoz-Hernández A., Rivas-Martínez H., Hernández-Bernal B., Herrera Bazán J. 2002. **“Thalidomide: A mutagen at low concentrations?”.** EMS-Annual Meeting Anchorage, Alaska. Abril 27, Mayo
- ⁹⁹ Lai P, y Palmieri G. 1970. *Op. cit.* [27]
- ¹⁰⁰ Ramos Morales, P.1993. **Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster.** McGraw-Hill/Interamericana. Pp131
- ¹⁰¹ Nöthinger, R. 1970. **Sucrose Density Separation: A Method for Collecting Large Number of Droaophila larvae.** *Dros. Inf. Serv.* 45:177
- ¹⁰² Ashby J, Tinwell H, Callander RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM, Hill RB, Greenwood SK, Gaulden ME, Ferguson MJ, Vogel E, Nivard M, Parry JM, Williamson J. 1997. *Op. cit.* [97]
- ¹⁰³ Richard H. ffrech-Constant, Phillip J. Daborn, Gaele Le Goff. 2004. **The genetics and genomics of insecticide resistance.** *TRENDS in Genetics.* 20(3):163-170
- ¹⁰⁴ Edward J. Calabrese y Linda A. Baldwin. 2001. *Op. cit.* [92]
- ¹⁰⁵ Ashby J, Tinwell H, Callander RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM, Hill RB, Greenwood SK, Gaulden ME, Ferguson MJ, Vogel E, Nivard M, Parry JM, Williamson J. 1997. *Op. cit.* [97]
- ¹⁰⁶ *Idem* [97]
- ¹⁰⁷ Weimer, R. 1996. **Estadística.** CECSA
- ¹⁰⁸ *Idem* [107]
- ¹⁰⁹ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp52 [64]
- ¹¹⁰ Cela conde, CJ y Ayala, F.J. 2001. **Senderos de la evolución Humana.** Alianza Editorial
- ¹¹¹ J.W. Bickham , Shabeg Sandhu, Paul D.N. Hebert, Lounes Chikhi, Raghbir Athwal. 2000. **Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology.** *Mutation Research* 463:33-51
- ¹¹² *Idem* [111]
- ¹¹³ *Idem* [111]
- ¹¹⁴ *Idem* [111]
- ¹¹⁵ *Idem* [111]
- ¹¹⁶ *Idem* [111]
- ¹¹⁷ *Idem* [111]
- ¹¹⁸ Weimer, R. 1996. *Op. cit.* [107]
- ¹¹⁹ Sidney Spiegel. 1990. **Estadística No Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta.** 3º ed., México, Trillas, pp.55
- ¹²⁰ Sheskin, D. 2000.**Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures.** Chapman & Hall/CRC. 2ºed. pp.595-596
- ¹²¹ Gad, S.C. 1999. *Op. Cit.* pp52 [64]
- ¹²² Gary M. Williams, Alan M. Jeffrey. 2000. **Oxidative DNA Damage: Endogenous and Chemically Induced.** *Regulatory Toxicology an dPharmacology.* 32:283-292
- ¹²³ Micheline Kirsch-Volders, Annelies Vanhauwaert, Ursula Eichenlaub-Ritter, Ilse Decordier. 2003. *Op. cit* [78]
- ¹²⁴ *Idem* [78]
- ¹²⁵ *Idem* [78]

-
- ¹²⁶ McFadyen, R.E. 1976. *supra* note 8 Richard E. McFadyen, *Thalidomide in America: a Brush with Tragedy*. *Clio Medica*. 11:79-93
- ¹²⁷ Moos, R.V., Stolz, R., Cerny, T. Gillessen, S. 2003. *Op. cit.* [1]
- ¹²⁸ Taussig, HB. 1962. *Op. cit.* [15]
- ¹²⁹ *Idem* [15]
- ¹³⁰ *Idem* [15]
- ¹³¹ *Idem* [15]
- ¹³² *Idem* [15]
- ¹³³ *Idem* [15]
- ¹³⁴ *Idem* [15]
- ¹³⁵ Silverman WA. 2002. **The Schizophrenic Career of a “Monster Drug”**. *Pediatrics*. 110:404-406
- ¹³⁶ *Idem* [135]
- ¹³⁷ *Idem* [135]
- ¹³⁸ *Idem* [135]
- ¹³⁹ Taussig, HB. 1962. *Op. cit.* [15]
- ¹⁴⁰ *Idem* [15]
- ¹⁴¹ *Idem* [15]
- ¹⁴² Silverman WA. 2002. *Op. cit.* [135]
- ¹⁴³ *Idem* [135]