
EFFECTO DEL CARBAMATO EN EL DESARROLLO DE EXTREMIDADES SUPERIORES EN RATONES BLANCOS (*Mus musculus*)

THE EFFECT OF CARBAMATE IN THE DEVELOPMENT OF UPPER LIMB IN WHITE MICE (*Mus musculus*)

Marleny Salazar Salazar¹, Nidia Arango Restrepo¹

¹ Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Facultad de Educación, Universidad del Quindío. masasa@uniquindio.edu.co, narango@uniquindio.edu.co.

Recibido: Septiembre 30 de 2014

Aceptado: Octubre 10 de 2014

*Correspondencia del autor. Marleny Salazar Salazar. Programa Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Universidad del Quindío Avenida Bolívar 12N, Armenia Colombia. Teléfono (576) 7359346. masasa@uniquindio.edu.co.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del Carbamato en los neonatos, hijos de madres sometidas a aspersiones del insecticida los días 4, 4-5-10, 4-5-10 y 12 del periodo de gestación, durante 1^{ra}, 2^{da} y 4^{ta}; teniendo en cuenta las costumbres populares de uso doméstico del insecticida. Se encontró agenesia de húmero y codo en los neonatos, con frecuencias relativas que oscilan entre 0.27 (5/18) hasta 0.66 (20/30), lo que permite deducir que estas alteraciones se presentan por interrupción en la cascada de genes y factores de crecimiento como *Wnt*, *SHH*, *Ihh*, FGF, BMP, que modelan la formación de la estructura ósea.

Palabras claves: insecticida, carbamato, ratón blanco, genes y húmero

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of carbamate in the neonates children's of mothers who were exposed to sprays of the insecticide on the days 4, 4-5-10, 4-5-10 and 12 of the gestation cycle during 1st, 2nd and 4th; taking into account the popular traditions of using the insecticide at home. The results showed lack of development of the humerus in the neonates, with relative frequencies that go from 0.33 (6/18) to 0.63 (22/35), which allows to conclude that these alterations are present because of the interruption in the gene cascades and growth factor, Wnt, SHH, Ihh, FGF, BMP and Ihh, which model the formation of the osseous structure.

Keywords: insecticide, carbamate, white mouse, genes and humerus

INTRODUCCIÓN

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Las preparaciones de los plaguicidas incluyen, además, del principio activo, otro tipo de sustancias como diluyentes o aditivos que son capaces de causar graves daños a la salud y que no son mencionadas en las etiquetas. El sufijo “cida” significa matar; de ahí que la palabra plaguicida se refiere a que mata plagas (1).

La clasificación de los plaguicidas se hace de acuerdo al tipo de plaga que se quiere eliminar: insecticidas, tienen acción rápida, muy tóxicos y están diseñados para atacar el sistema nervioso (2); acaricidas, utilizados para matar ácaros, son menos tóxicos que los insecticidas (3); molusquicidas, matan caracoles y babosas; los rodenticidas que controlan roedores (2); fungicidas, también conocidos como agentes anticriptogámicos, controlan los hongos de plantas y animales; herbicidas compuestos con capacidad de matar plantas que crecen en lugares no deseados (3); y nematocidas matan nematodos que se alimentan de las raíces de las plantas (2).

Los carbamatos forman parte de un gran grupo de plaguicidas que han sido desarrollados, producidos y usados en gran escala en los últimos años. Son usados como insecticidas, herbicidas y fungicidas y son de uso agrícola, veterinario y domisanitario (4). Se clasifican en la clase Ib, como muy peligrosos (5). Estos pueden ser de tres tipos principales: a) derivados de ésteres carbamatados, comúnmente usados como insecticidas; b) derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas; y c) carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas (6).

El insecticida comercial baygón (propoxur o metilcarbamato de oxiproposifenilo, con fórmula molecular $C_{11}H_{15}NO_3$), es ampliamente utilizado como herbicida e insecticida, de amplia distribución en supermercados y tiendas sin ningún tipo de restricción. Los usos más comunes, son en hogares, jardines, lugares de trabajo y públicos. Se transporta fácilmente a través del aire o de los alimentos (7).

Los plaguicidas que se usan con más frecuencia en nuestro medio son los carbamatos con un 48% del total de intoxicaciones. Se absorbe en el organismo por todas las vías incluidas la piel. La biotransformación se realiza a nivel hepático mediante la oxidación, hidrólisis y conjugación de sus principales metabolitos. Los

carbamatos al igual que los organofosforados inhiben la colinesterasa (8). En nuestro medio el uso de insecticidas es utilizado en forma indiscriminada por niños, hombres trabajadores del campo y las mujeres embarazadas que se exponen a las aspersiones de insecticidas; y pueden absorber el insecticida a través de vía cutánea, respiratoria y digestiva. (9,10,11). Las evaluaciones realizadas en humanos y animales sobre el efecto de los insecticidas han demostrado efectos adversos, que incluyen inhibición de la colinesterasa, intoxicaciones epidérmicas, efectos sobre el comportamiento neurológico y alteraciones óseas, entre otras (12,8).

La estimulación de agentes externos en el desarrollo embrionario juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y reparación esquelética (13). En los ratones sometidos a aspersiones de baygón se observó agenesia de húmero y articulación del codo, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares que influyen en estímulos y eventos celulares durante el desarrollo del esqueleto. La interacción entre los estímulos biofísicos y regulación génica en la diferenciación de las células está emergiendo como un importante fenómeno en múltiples sistemas de desarrollo (14)

Por lo tanto, los estímulos exógenos pueden afectar una variedad de procesos del desarrollo y presumiblemente deben influir con la señalización de vías y cambios moleculares conocidos para guiar estos eventos, que generan modificaciones en la vía de señalización canónica de Wnt, y consecuentemente alteraciones en la articulación del codo (15),

Varios genes reguladores han demostrado tener patrones de expresión alterados, cuando se presenta una estimulación reducida de los genes *Ihh* y *COLX* en el sitio de osificación (16) y factores de crecimiento como *Bmp2*, *Fgf2*, y en el *Pthlp* en la línea de la articulación (17,18). Si la expresión de estos genes es directamente afectada por el entorno, o como consecuencia indirecta del comportamiento de la célula alterada por factores exógenos, esto requiere del conocimiento de todo el genoma para saber más sobre el espectro molecular y cambios que se producen cuando se alteran los estímulos mecánicos, físicos y biológicos de la célula (19)

Este estudio se realizó con ratones blancos *Mus musculus* donde se observó que el húmero y la articulación del codo son los más fuertemente afectados, aunque la articulación del hombro se observa normal. Nuestra hipótesis es que, la estimulación exógena del insectici-

da baygón los días 4-5-10 y 4-5-10-12 con tiempos de 1''-2''-4'', logró ejercer un impacto negativo sobre los genes implicados en una variedad de vías de regulación y procesos biológicos, que alteró el sistema de regulación integrado en la cascada de genes en los neonatos hijos de madres sometidas a diferentes días y tiempos de aspersiones.

Materiales y métodos

Tratamiento experimental

Las hembras gestantes fueron divididas en cuatro grupos; tres grupos experimentales y un grupo control (Tabla 1). Los experimentos se realizaron en ratones blancos hembras (*Mus musculus*) de 60 días de edad, alimentados con una dieta estándar para ratones, en ambientes controlados de temperatura, humedad relativa, y luz de 12x12 horas.

El modelo de aspersión fue diseñado teniendo en cuenta las costumbres populares de uso doméstico de insecticidas (baygón, mata-siete, matón, etc.), según las cuales una o dos aspersiones diarias en la mañana y en la noche, con una duración de 1 a 3 minutos en promedio, en espacios cerrados, en zonas bajas de la cocina, mesones y en los cuartos en presencia de los habitantes del hogar (20). (Tabla 2).

A las crías de un día de nacidos de los controles y experimentales se les practicó un examen físico macroscópico y microscópico, se pesaron y sexaron. Los neonatos con las alteraciones y un representante del grupo control, fueron guardados en frascos rotulados con formol al 10%, para cortes histológicos con coloración hematoxilina y eosina.

Resultados

Las hembras preñadas que recibieron aspersiones de baygón, en los días 4-5, 4-5-10 y 4-5-10-12 de embarazo presentaron alteraciones en el sistema óseo, especialmente en el desarrollo del húmero y la articulación del codo de las dos extremidades. El baygón no demostró tener efecto teratogénico cuando se aplicó los días 4,

4-5 del embarazo, con aspersiones de 1-2 y 4 segundos. El peso fetal de los neonatos de experimentación (días 4-5-10-12) fue menor que los controles y los efectos

Tabla 2. Modelo del Proceso Experimental de Aspersión

ASPERSIÓN		PROMEDIO OBTENIDO DE ASPERSIÓN	CANTIDAD RESIDUAL
Tiempo	Hora		
1''	8:am	1.2*	0.0245**
	6:pm	1.2*	0.0245
2''	8:am	2.47	0.0504
	6:pm	2.47	0.0504
4''	8:am	4.7.07	0.096
	6:pm	4.7.07	0.096

*Cantidad pesada en campana de extracción

**Cantidad residual pesada después de la aspersión

Las aspersiones se realizaron los días 4, 4-5, 4-5-10 y 4-5-10 y 12 del periodo de gestación

después de las aspersiones en las hembras gestantes fue pérdida del apetito, mayor consumo de agua e infecciones por hongos en diferentes partes del cuerpo. La frecuencia y tipo de alteraciones se muestra en la tabla 3. La frecuencia relativa se halló teniendo en cuenta las características de cada alteración presentada, en relación al número de nacimientos por camada.

Agnesia de húmero

La agnesia de húmero se encontró en neonatos hijos de madres sometidas a aspersión los días 4-5-10 del periodo de gestación con un tiempo de aspersión de 1'' la frecuencia relativa fue de 0.27 (5/18), para 2'' 0.47 (9/19) y para 4'' 0.68 (15/22). En los días 4-5-10 y 12 del periodo de gestación con un tiempo de aspersión de 1'' la frecuencia relativa encontrada, 7/12 (0.58), para 2'' 0.57 (15/26) y para 4'' 0.66 (20/30) (Tabla 3).

Discusión

Los plaguicidas por sí solos, o sus metabolitos electrofilicos originados en el proceso de biotransformación, pueden interactuar con los centros nucleofílicos de las macromoléculas, como el ácido desoxirribonucleico, y ocasionar cambios en su estructura conocida como lesión primaria. Los daños o lesiones primarias producidas en el ADN por las sustancias químicas, pueden causar la muerte de la célula afectada o ser reparados por sistemas enzimáticos, que pueden remover y reemplazar los segmentos del ADN alterados. La célula cuenta con varios mecanismos de reparación para los diferentes tipos de daños en el ADN. Si las lesiones no son reparadas o son reparadas incorrectamente, luego

Tabla 1. Grupos de animales experimentales

DÍAS DE GESTACIÓN	TIEMPO DE ASPERSIÓN			GRUPO CONTROL
4	1''	2''	3''	
4,5				GRUPO D
4,5,10	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	Sin tratamiento
4,5,10,12				

de transcurrir una división celular, los daños son fijados y expresados como mutaciones (21).

Las mutaciones pueden ser génicas, genómicas o cromosómicas. Las mutaciones génicas, o microlesiones, que no son visibles a nivel citogenético, son causadas a nivel de un gen por cambios cualitativos o cuantitativos en la constitución de nucleótidos. Otras mutaciones pueden llegar a ser observables a través del análisis citogenético, estas alteraciones pueden variar desde la ganancia o pérdida de uno a varios cromosomas (21),

Tabla 3. Relación de ausencia de húmero y articulación del codo en neonatos hijos de madres sometidas a aspersiones de baygón.

AUSENCIA DE HÚMERO Y ARTICULACIÓN DEL CODO	TIEMPO DE ASPERSIÓN						FRECUENCIA DE ASPERSIÓN EN DÍAS
	1"		2"		4"		
	F/R	F/R	F/R	F/R	F/R	F/R	
	5/18	0.27	9/19	0.47	15/22	0.68	4-5-10
	7/12	0.58	15/26	0.57	20/30	0.66	4-5-10-12

también pueden ser observadas a nivel macroscópico el daño o lesión en el tejido o estructura afectada. (7)

El periodo embrionario es la etapa donde se presenta el desarrollo y crecimiento del embrión/feto en el útero materno, en los ratones el proceso se presenta en 21 días, donde va a desarrollar la mayoría de órganos y sistemas de su organismo. En la etapa embrionaria es la más sensible a cualquier agente tóxico que puede llegar a través de la sangre materna, donde se encuentran todos los nutrientes necesarios para su normal crecimiento. En el ratón blanco, el periodo embrionario va hasta el día 12, el fetal termina en el día 21 (22). Durante periodo fetal el individuo crece y es más resistente a posibles interferencias con el desarrollo de sus órganos (23)

El baygón es uno de los insecticidas ampliamente utilizados en hogares, lugares de trabajo, jardines, para el control de insectos, sin ningún tipo de protección por las personas que lo asperjan, como las habitantes de casas y oficinas entre otros. Las mujeres embarazadas no son la excepción en la utilización de plaguicidas (20). Los estudios de experimentación con diferentes especies animales han puesto de manifiesto el potencial teratogénico de un elevado número de compuestos plaguicidas (24,25,7), que generan diversas alteraciones y pueden alterar el material genético y las cascadas de genes para una organogénesis normal. En el caso, de

que la alteración generada por los plaguicidas afectara a las células germinales masculinas o femeninas, podría manifestarse también en forma de defectos a sus descendientes (26,7).

Los carbamatos como el baygón generan alteraciones esqueléticas (26), éste reporte está en concordancia con lo reportado en este estudio, donde se encontró neonatos de ratón blanco con agenesia de húmero, cuando sus madres en estado de gravidez fueron sometidas a aspersiones 1, 2 y 4 segundos, en los días 4-5-10 y 1-5-10-12 de desarrollo embrionario (Fig. 1). No se encontraron alteraciones en los neonatos con aspersiones de 1". Lo que puede demostrar que el plaguicida no ejerce una acción mutagénica en periodos cortos de exposición. En la Fig. 1, se observa el desarrollo anormal del húmero en un neonato con exposición a baygón, lo que corrobora que el baygón en esta población de estudio generó alteraciones en el desarrollo normal de la estructura ósea.

Los genes expresados en el desarrollo esquelético, al inicio del proceso de osificación en condiciones normales, permiten la formación de las estructuras para que el individuo pueda ejercer sus funciones vitales. Cuando se presentan alteraciones en la expresión normal de los genes, estos pueden ser auxiliados por otros genes que regulan el desarrollo y la diferenciación, y están involucrados en el reordenamiento de los componentes de la matriz extracelular del citoesqueleto, que incluye la adhesión celular a moléculas de señalización (19).

Los componentes de múltiples vías de señalización durante el desarrollo se ven afectados, en particular, por componentes de la vía de Wnt. (27) y cambios en el citoesqueleto representando un enfoque valioso para la regulación integrada por señales bioquímicas y moleculares durante el desarrollo esquelético entre los estadios E9.5 y E 11.5 (22,28). Los genes del factor de crecimiento tipo insulina Igf2 y IGF1 y sus receptores asociados Igf2r y IGF1R son también altamente expresados para desempeñar un papel regulador importante en el desarrollo esquelético (29)

Las vías de señalización reglamentarios para el desarrollo esquelético, están involucrados genes y factores de crecimiento como: SHH (Sonic hedgehog), FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos, incluyendo BMP y Wnt; expresados en el húmero, indicando los posibles roles de en cada uno. La importancia de Ihh (Indian hedgehog) en la condensación del cartilago está bien establecida (30,31).

La pérdida de elementos esqueléticos sugiere interferencia con el proceso del modelado del eje anterior de cuerpo. (32). Los estudios realizados en el ala de pollo indican que los Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) producidos por la Zona de Crecimiento Apical (ZPA), junto con el gen *Wnt7a* coordinan la regulación de la expresión de SHH en el mesodermo postaxial (33,34,35). El dominio de expresión SHH es coincidente con una característica adicional que es la actividad de la ZPA en el mesodermo postaxial (36,37).

La condensación mesenquimal para el desarrollo del húmero inicia normalmente con la formación de la articulación; posiblemente el baygón altera la cascada de genes, impidiendo el establecimiento del cartilago, condrogénesis y la osificación endocondral. Como la cascada en la expresión normal de los genes se ve afectada por las aspersiones de baygón en diferentes estadios del desarrollo embrionario, alteró la vía de señalización de Wnt que desempeña un papel central durante desarrollo embrionario y es conocido por ser un importante regulador de la formación ósea (38).

El mediador intracelular clave en la señalización canónica es Wnt, que es altamente expresado en el húmero y articulaciones asociadas. El ligando Wnt promueve la expresión *Wnt5a*, *Wnt4*, *Wnt9* y *Wnt16* que están asociados a la proliferación de los condrocitos en las articulaciones y el pericondrio (39).

La alta expresión de *Wnt9a* está relacionada con la en la regulación temporal y espacial de *Ihh* como también en la proliferación de condrocitos (40), que pudo haberse reducido significativamente por el baygón

La identificación de la agenesia de húmero y la articulación del codo, en neonatos con aspersiones de baygón, permitió una aproximación de los procesos biológicos y de las vías de señalización de la regulación del desarrollo normal de la extremidad que se ven afectados por estímulos exógenos, que afectan la estimulación de la esqueletogénesis. Llama la atención que los neonatos que presentaron agenesia de húmero, su articulación no presentó alteración y el desarrollo de su estructura y se observó normal, lo mismo que la región muscular circundante al húmero; mientras que, el cúbito y el radio aparecen relativamente normales. La dosis relacionada con el tiempo de exposición (4 segundos los días 4-5-10-12 del desarrollo embrionario), induce una alta incidencia de neonatos afectados con pérdida del húmero y la articulación del codo, irrumpiendo en la morfogéne-

sis normal de la extremidad.

La agenesia de húmero y los defectos por reducción de extremidades se caracterizan por su gran heterogeneidad clínica y patogénica. Desde el punto de vista clínico van desde la ausencia completa de una extremidad hasta la simple agenesia o hipoplasia de una falange (41,42).

La expresión de genes implicados en la vía de señalización Wnt canónica ha demostrado que está involucrada en el mantenimiento, integridad y unión en las articulaciones (43,44) y si se altera esta señalización las articulaciones de los ratones tienen menos fuerza para su formación (15), como se observa en la figura 2, donde no hay formación de la articulación del codo.

Wnt4 presenta una regulación específica en el codo y en la región de la articulación del hombro. La comprensión de la vía de señalización Wnt sería un paso importante en la comprensión molecular para guiar la diferenciación de tejidos espacialmente apropiada y proporcionar indicaciones de cómo las condiciones de laboratorio puede ser recreado con eficacia para identificar que sustancias pueden alterar el normal desarrollo de las extremidades superiores. En este estudio, la articulación del hombro es normal, pero hay ausencia de la articulación del codo.

También hay indicios previos que la vía Wnt es sensible a la estimulación mecánica en las células madre mesenquimales (45), en hueso maduro *in vivo* (46), y en la respuesta a la lesión del cartilago articular (45,46,47).

En conclusión, la capacidad de los plaguicidas para producir anomalías congénitas en condiciones de laboratorio, demuestra un efecto nocivo para los seres vivos. Los hallazgos en laboratorio confirman la plausibilidad biológica de este efecto en el caso del baygón, que se utilizó en ratones blancos, simulando las formas y tiempos de uso de las amas de casa, generando alteraciones que se presentan por interrupción en las vías de señalización reglamentarios para el desarrollo esquelético, como genes y factores de crecimiento entre los que se encuentran SHH, *Ihh*, *Wnt*, BMP y FGF, expresados en el húmero que modelan la formación de la estructura ósea.

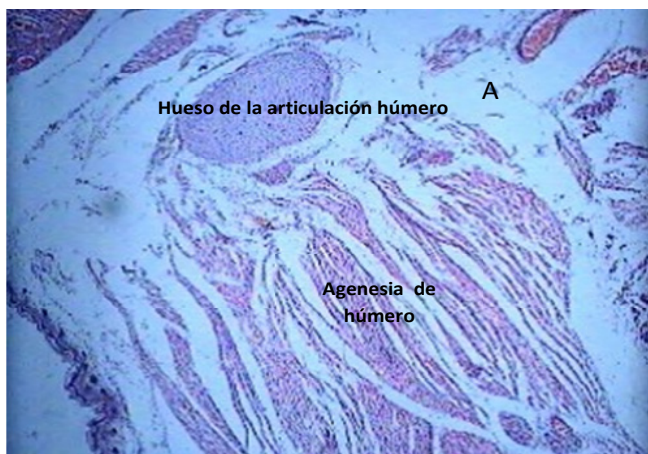


Figura 1. Neonato hijo de madre sometida a aspersión los días 4-5-10 y 12 del desarrollo embrionario por 4^{va}. Se observa ausencia total del desarrollo del húmero.

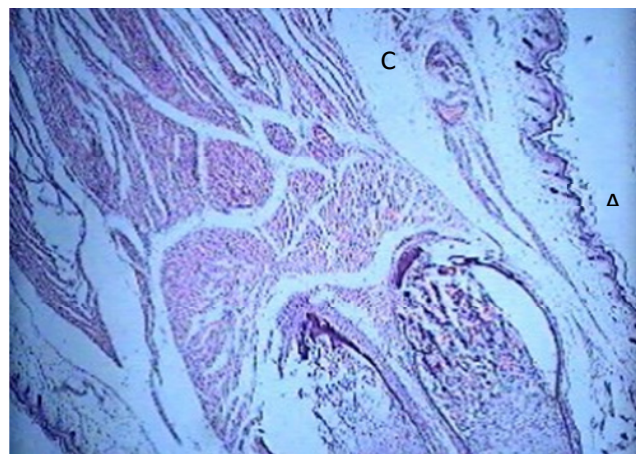


Figura 2. Microfotografía de un corte longitudinal de la extremidad superior de un neonato sometido a aspersión de baygón 4^{va} los días 4-5-10 -12 del desarrollo embrionario. A Ausencia de articulación B. Formación de cúbito y radio C estructura muscular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo I, Chaverry F. Manual de plaguicidas, guía para América Central. Costa Rica. 1995. 7- 9
2. Huici, O. El mundo de los plaguicidas. Fundamentos técnicos para el uso y manejo de plaguicidas. 2a ed. Bolivia. 2007.
3. Pastor S. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002.1:5-7.
4. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia de intoxicación aguda por plaguicidas - Anexo 2. Clasificación y Toxicidad de los Plaguicidas. Recuperado de <http://190.145.112.2/epidemiologia/sivigila/PDF/protocolos/Intoxicacionf.pdf>.
5. Hayes WJ and Laws ER. Handbook of pesticide toxicology. Academic Press, New York. 1991. 612-613
6. Ramírez A., Lacasaña M. Plaguicidas: aspectos generales, clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Archivos de Prevención de Riesgos Laborales. 2001. p. 4: 67-75.
7. Salazar M, Fernández A. & Ruíz O. Efectos del propuxur, ciflutrin, transflutrin (Carbamato) en el desarrollo de agenesia anorrectal durante el periodo de gestación de ratones blancos *Mus musculus*. 2004. 14: 49-57.
8. Grzywacz JG, Quandt SA, Vallejos QM, Whalley LE, Chen H, Isom S, Barr DB, Arcury TA. Job demands and pesticide exposure among immigrant Latino farmworkers. *J Occup Health Psychol.* 2010;3:252-66.
9. Bradman A, Eskenazi B, Marks A, Harley K, Barr DR, Johnson C, Morga N, and Jewell NP. *Environ Health Perspect.* 2005;16:494-499.

10. Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, et al. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect.* 2007;115:792–798.
11. García, A. Efectos teratógenos de la exposición a pesticidas Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. E.U. Relaciones Laborales. Recuperado de <http://www2.uacj.mx/IIT/CUL-CYT/mayo-agosto2006/6ARTPLAGUICIDA.PDF>.
12. Thompson. et al., (2008) Para niños saludables: a community intervention trial to reduce organophosphate pesticide exposure in children of farmworkers. *Environ Health Perspect.* p.116:687–694.
13. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lulis AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics.*2000; 10:767–79.
14. Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Bony up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech*, 2009;1:108–118.
15. Mammoto A, Mammoto T, Ingber DE. (2012). Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *J Cell Sci.* 13:3061–3073.
16. Kahn J, Shwartz Y, Blitz E, Krief S, Sharir A, Breitel DA, Rattenbach R, Relaix F, Maire P, Rountree RB, et al.,. Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate. *Dev Cell.* 2009;5:734–743.
17. Nowlan NC, Prendergast PJ, Murphy P. (2008). Identification of mechano sensitive genes during embryonic bone formation. *PLoS Comput Biol.* 12:e1000250.
18. Roddy KA, Prendergast PJ, Murphy P. (2011). Mechanical influences on morphogenesis of the knee joint revealed through morphological, molecular and computational analysis of immobilised embryos. *PLoS One* 2:e17526.
19. Kavanagh E, Church VL, Osborne AC, Lamb KJ, Archer CW, Francis-West PH, Pittsillides AA. Differential regulation of GDF-5 and FGF-2/4 by immobilisation in ovo exposes distinct roles in joint formation. *Dev Dyn.*2006; 3:826–834.
20. Nowlan NC, Kenny EM, Cormican P, Morris DW, Prendergast PJ, Kelly D, Murphy P. 2014. Identification of mechanosensitive genes during skeletal development: alteration of genes associated with cytoskeletal rearrangement and cell signalling pathways. *Rolfé RA. BMC Genomics.* 20: 15:48.
21. Fernández A, Salazar M, Santodomingo A. Estudio de caso. Año imperforado en el Departamento del Quindío. *Revista*
22. *De Investigaciones Universidad del Quindío* ISSN 0121-795 Vol 10. 2001. 104-111.
23. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia de intoxicación aguda por plaguicidas - Anexo 2. Clasificación y Toxicidad de los Plaguicidas. Recuperado de <http://190.145.112.2/epidemiologia/sivigila/PDF/protocolos/Intoxicacionf.pdf>.
24. Salazar M, & Martínez F. (2001) Embriología del ratón blanco *Mus musculus* Publicaciones Universidad del Quindío. ISSN 958-02-7640-2.
25. García, A. Efectos teratógenos de la exposición a pesticidas Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. E.U. Relaciones Laborales. Recuperado de <http://www2.uacj.mx/IIT/CUL-CYT/mayo-agosto2006/6ARTPLAGUICIDA.PDF>
26. Garcia, A. Pesticide exposed workers in a mediterranean agricultural area and conge-

- nital malformations. A case-control study. Tesis doctoral. London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London. 1997
27. García AM, Benavides FG, Fletcher AC, Orts E. Trabajo agrícola exposición a plaguicidas y malformaciones congénitas: estudio de casos y controles en C. Valenciana. *Gaceta Sanitaria*. 1979;11 (Supl.1): 79.
 28. Joffe, M. (1992). *Epidemiology of occupational reproductive hazards: methodological aspects*. *Rev. Epidemiol. et Santé. Publ.* 1992;40: S17-S25.
 29. Chen W, Qing H, He Y, Wang J, Zhu Z, Wang H. Gene expression patterns of osteocyte-like MLO-Y4 cells in response to cyclic compressive force stimulation. *Cell Biol Int* .2010;5:425–432
 30. 28. Taher L, Collette NM, Muruges D, Maxwell E, Ovcharenko I, Loots GG. Global gene expression analysis of murine limb development. *PLoS One*. 2011. 12:e28358
 31. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D. IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J Bone Miner Res*. 2010. 12:2543–2552
 32. Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, Dieterich C, Kornak U, Wilkening U, Brieske N, et al.,. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2 (–/–) mouse model. *Gene Expr Patterns*. 2007;1–2:102–112
 33. Minina E, Schneider S, Rosowski M, Lauster R, Vortkamp A. Expression of Fgf and Tgfbeta signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr Patterns*. 2005.1:102–109.
 34. Parr, B. and McMahon .Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 1995; 374:350- 353.
 35. Niswander. y cols.,. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*. 1994. 371: 609- 612
 36. Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. 2006;79: 993-1003.
 37. Yang, Y, Niswander, L. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. 1995. 80:939- 947.
 38. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*.p. 1993. 75: 1401-1416.
 39. Chang DT, López A, von Kessler DP, Chiang C. Products, genetic linkage, and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*. 1994. 120:3339- 3353
 40. Macsai CE, Foster BK, Xian CJ: Roles of Wnt signalling in bone growth, remodeling, skeletal disorders and fracture repair. *J Cell Physiol* 2008. 3:578–587
 41. Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2002;115:4809–4818.
 42. Spater D, Hill TP, O’Sullivan RJ, Gruber M, Conner DA, Hartmann C: Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development* 2006, 133(15):3039–3049.
 43. Martínez, M., Bermejo, E y Paisan, L. Niños con reducción de extremidades en una

- población de 25193 recién nacidos malformados. Causas reconocidas. *An Esp Pediatr* 1998. 48:49-53.42. WorldHealthOrganization. WorldHealthOrganization International Classification of Diseases. Ed. 9. Geneve. 1997.
44. Cameron TL, Belluoccio D, Farlie PG, Brachvogel B, Bateman JF. Global comparative trans-cryptome analysis of cartilage formation in vivo. *BMC Dev Biol.* 2009; 9:20.
 45. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I, et al.,. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol.* 2011;1:e1000582.
 46. Haudenschild AK, Hsieh AH, Kapila S, Lotz JC. Pressure and distortion regulate human me-senchymal stem cell gene expression. *Ann Biomed Eng.*2009; 3:492–502.
 47. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, MantilaSM, Gluhak-Hein-rich J, Bellido TM, Harris SE, et al., . Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008.9:5866–5875.
 48. Dell’Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O’Dowd J, Pitzalis C. Acti-vation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther.* 2006;5:R139.