

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL GLUCANTIME
MEDIANTE EL TEST DE MUTACION Y RECOMBINACIÓN SOMATICA EN
*Drosophila melanogaster***

Postulante: ROCÍO PATRICIA LOZA ALMANZA

TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA
LA PAZ - BOLIVIA
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL GLUCANTIME
MEDIANTE EL TEST DE MUTACION Y RECOMBINACIÓN SOMATICA EN
*Drosophila melanogaster***

Postulante: ROCÍO PATRICIA LOZA ALMANZA

Asesores:

Dr. EDUARDO GONZALES DAVALOS *Ph. D.*
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS
Universidad Mayor de San Andrés

Dra. ARACELLY PILLCO TITO *M. Sc.*
CENTRO DE CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES
Universidad Autónoma de Madrid - España

TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA
LA PAZ - BOLIVIA
2009

Dedicado a:

Nazaria Orellana Antezana.

Clemente Almanza Alarcón.

Doris Almanza Orellana.

*Siempre están presentes en todos mis
actos.*

AGRADECIMIENTOS

- ✚ *Agradezco a Dios por toda la fortaleza brindada y sin el cual el presente trabajo no hubiese podido realizarse.*
- ✚ *Agradezco a mi Mamá Doris, a mis abuelos Nazaria y Clemente por toda la paciencia q tuvieron conmigo y por las enseñanzas que me inculcaron.*
- ✚ *Agradezco a mis Hermanos: Willy, Milenka Wendy, Raquel y Helencita por haber estado apoyándome durante la elaboración de este trabajo y en todo el tiempo de estudio en la facultad.*
- ✚ *Agradezco a mis hermosos compañeros de la vida, mis mascotas chico, puskı y Ricardo quienes alegraron y alegraran mis días dándome un sincero cariño.*
- ✚ *Agradezco a una persona incondicional en su apoyo y en su ayuda.Blady.*
- ✚ *Agradezco a Jimmy un amigo muy apreciado y recordado.*
- ✚ *Agradezco al Dr. Eduardo Gonzáles D. por haberme brindado su apoyo y su guía en el proceso de este trabajo.*
- ✚ *Agradezco al Dr. Juan Luis Arias M. por guiarme, enseñarme, colaborarme antes y durante el desarrollo de este trabajo.*
- ✚ *Agradezco a mis amigos de la carrera de bioquímica y a los de la carrera de farmacia por brindarme su apoyo y amistad a lo largo del desarrollo de este trabajo.*
- ✚ *Agradezco también a los nuevos amigos, Carlos, Claudia, Benny, Martín, Luz que llegaron a lo largo de este proceso.*
- ✚ *Agradezco el apoyo de AECID mediante el proyecto "Plantas medicinales como recurso terapéutico en Bolivia."*
- ✚ *Agradezco El apoyo de IDH mediante el proyecto "Aplicación de tecnología fito-farmacéutica en el desarrollo de enfermedades articulares a base de extractos".*



INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.1. JUSTIFICACION	2
II. ANTECEDENTES	1
II.1. GENETICA TOXICOLOGICA	1
II.2. TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)	3
II.3. DROSOPHILA MELANOGASTER.....	8
II.3.1. <i>Morfología Externa en adultos</i>	10
II.3.1.a Cabeza.....	10
II.3.1.b Tórax.....	11
II.3.1.c Alas	12
II.3.1.d Patas.....	12
II.3.1.e Abdómen.....	12
II.3.2. <i>Dimorfismo Sexual</i>	12
II.3.2.a Tamaño	13
II.3.2.b Abdomen.....	13
II.3.2.c Peines Sexuales.....	14
II.3.2.d Organos Sexuales.....	14
II.3.3. <i>Ciclo Biológico</i>	15
II.3.3.a Huevo.....	16
II.3.3.b Larva	17
(A) Estadios del Desarrollo Larvas.....	17
i.) Estadio I ó “Primer Instar”	17
ii.) Estadio II ó “Segundo Instar”	17
iii.) Estadio III ó “Tercer Instar”	17
II.3.3.c Pupa o Crisálida	18
II.3.3.d Imago o adulto.....	19
II.4. LOS ANTIMONIALES.....	21
II.4.1. <i>Generalidades</i>	21
II.4.1.a Antimoniato de meglumina (Glucantime)	22
(A) Modo de acción.....	22
(B) Mecanismo de acción.....	22
(C) Farmacodinamia.....	24
(D) Efectos secundarios.....	25
(E) Precauciones.....	25
III. OBJETIVOS	26
III.1. GENERAL.....	26
III.2. ESPECÍFICOS.....	26
IV. METODOLOGIA.....	27
IV.1. ESQUEMA METODOLÓGICO	27
IV.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO	28
IV.2.1. <i>Muestras</i>	28
IV.2.1.a Determinación de Concentraciones Sub-tóxicas.....	28
IV.2.1.b Determinación de la actividad genotóxica del Glucantime.....	28
IV.2.2. <i>Criterios de Inclusión</i>	29
IV.2.3. <i>Criterios de Exclusión</i>	29
IV.3. AMBIENTE DE TRABAJO.....	29
IV.4. MANTENIMIENTO Y CULTIVO	29
IV.4.1. <i>Manejo e Identificación de Moscas</i>	30



IV.4.1.a	Eterificación.....	30
IV.4.1.b	Identificación del Sexo en moscas.....	30
IV.4.1.c	Separación De Hembras Vírgenes.....	31
IV.5.	TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART) EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	31
IV.5.1.	<i>Fármacos evaluados y Linajes de Drosophila melanogaster</i>	31
IV.5.1.a	Fármacos.....	31
IV.5.1.b	Linajes de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
IV.5.2.	<i>Procedimiento Experimental</i>	32
IV.5.2.a	Genotipo de las Larvas Testadas.....	33
IV.5.2.b	Preparación y Análisis Microscópico de Alas.....	33
IV.5.2.c	Análisis Estadístico.....	33
V.	RESULTADOS	35
V.1.	DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SUB-TOXICAS.....	35
V.2.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLUCANTIME – CRUCES ALTA BIOACTIVACIÓN Y ESTANDAR.....	40
V.2.1.	<i>Cruce Estándar (ST), progenie Transheterocigotas</i>	40
V.2.2.	<i>Cruce Alta Bioactivación (HB), progenie Transheterocigotas</i>	43
VI.	DISCUSION	45
VII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
VII.1.	CONCLUSIONES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VII.2.	RECOMENDACIONES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49

Índice de Tablas

TABLA 1. DATOS DEL ENSAYO DE MANCHAS EN ALAS EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> OBTENIDOS DEL GLUCANTIME® (10000, 15000, 20000, Y 30000 μM) EN EL ENSAYO SMART –	41
TABLA 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLUCANTIME EN	42
TABLA 3. DATOS DEL ENSAYO DE MANCHAS EN ALAS EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> OBTENIDOS DEL GLUCANTIME® (10000, 15000, 20000, Y 30000 μM) EN EL ENSAYO SMART –	43
TABLA 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLUCANTIME EN CRUCE	44

Índice de Figuras

FIGURA 1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE UN COMPUESTO GENOTÓXICO	2
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> Y SU RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO DE DISCOS IMAGINALES	6
FIGURA 3. TIPOS DE TRICOMAS ANALIZADOS EN EL TEST SMART DE ALA	7
FIGURA 4. TIPOS DE MANCHAS ANALIZADOS EN EL TEST SMART DE ALA.	7
FIGURA 5. ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	10
FIGURA 6. DIMORFISMO SEXUAL EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ADULTO	13
FIGURA 7. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ADULTO	14
FIGURA 8. PEINES SEXUALES EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	14
FIGURA 9. ÓRGANOS SEXUALES EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	15
FIGURA 10. ESTADÍOS BIOLÓGICOS EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	20



FIGURA 11. CICLO BIOLÓGICO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	20
FIGURA 12. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS ANTIMONIALES PENTAVALENTES: GLUCANTIME Y PENTOSTAM	21

Índice de Gráficas

GRÁFICA 1. TOXICIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCANTIME EN EL CRUCE DE ALTA BIOACTIVACION EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	35
GRÁFICA 2. TOXICIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCANTIME EN EL CRUCE ESTANDAR EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	35
GRÁFICA 3. CURVA DOSIS - EFECTO DEL GLUCANTIME® (500, 1000, 2500, 5000, 7500 Y 10000 UM) SOBRE EL NÚMERO DE INDIVIDUOS SOBREVIVIENTES DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> EN CRUCES ESTANDAR Y ALTA BIOACTIVACIÓN	38
GRÁFICA 4. CURVA DOSIS - EFECTO DEL GLUCANTIME® (10000, 15000, 20000, Y 30000 UM) SOBRE EL NÚMERO DE INDIVIDUOS SOBREVIVIENTES DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> EN	39



I. INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud considera que las Leishmaniosis se encuentran distribuidas en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia y que son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países. Su distribución geográfica está limitada por la distribución del mosquito, su susceptibilidad a los climas fríos, su tendencia a ingerir sangre del hombre o únicamente de los animales y por su capacidad de soportar el desarrollo interno de las especies de *Leishmania*. Sin embargo, los datos oficiales de que se dispone subestiman la realidad de la afección humana por estos protozoos flagelados debido a varios factores limitantes como la distribución de las zonas de transmisión en áreas endémicas es frecuentemente discontinua, numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, el número de personas infectadas, pero sintomáticas, es mucho mayor que el número de casos manifiestos de leishmaniosis visceral y, por último, la leishmaniosis es de declaración obligatoria en tan sólo 40 de los 88 países endémicos.¹

Un alto número de casos son reportados en muchas áreas de Centro y Sud América, en los cuales la enfermedad es ahora considerada, un problema de salud pública. En el aspecto de salud pública dentro del sistema Boliviano, es necesario considerar que utilizan a los antimoniales pentavalente como las drogas anti-leishmaniosis de primera elección en el tratamiento desde hace 50 años², el antimonio de N-metil-glutamina (Glucantime). Y probablemente las más regularmente activas; fueron utilizadas a partir del inicio del siglo XX,³ han sido repetidamente probadas y motivo de numerosas publicaciones.

El efecto de estos medicamentos son actualmente cada vez mejor conocidos, su utilización exclusivamente parenteral y su toxicidad condicionan una delicada utilización del producto en zonas geográficas donde la cobertura médica es insuficiente. Así es necesario valorar al paciente, tratando de detectar temprano una eventual hepatotoxicidad, nefrotoxicidad o cardiotoxicidad, por lo que se aconseja la realización de un perfil hepático y renal en laboratorio y un electrocardiograma antes del tratamiento y cada 10 días durante el mismo, de esta manera se evitaban posibles accidentes mortales rara vez citados.⁴

El género *Drosophila* ha aportado un gran avance en el mundo de la ciencia, sobre todo en genética, esta mosca ofrece una mayor manejabilidad que otras especies, la *Drosophila* tiene un ciclo vital muy corto, produce una gran descendencia, fácil de cultivar, tiene solo ocho cromosomas y presenta características hereditables fácilmente notables.⁵

¹ (Montserrat G. y Cristina R., 2007).

² (Desjeux, 2001)

³ (Greig E.D.N., 1917)

⁴ (Pérez, S., 2002).

⁵ (Morgan T.; 1984)



I.1.JUSTIFICACION

En Bolivia, la Leishmaniosis se encuentra en sus tres formas (cutánea; muco-cutánea y visceral) transmisible desde las llanuras amazónicas, hasta la cordillera andina oriental, la población en riesgo de enfermar corresponde aproximadamente 800.000 habitantes, repartidos en 7 de 9 departamentos, entre los que se cuentan Pando, Beni, La Paz, (provincias de nor y sud Yungas), Santa Cruz (provincias Chiquitos y Ñuflo de Chávez), Cochabamba (provincia Chapare) y Chuquisaca (provincia Acero). En los últimos años más de 4,700 casos fueron oficialmente registrados, especialmente en el departamento de La Paz, donde las Leishmaniosis cutánea y muco-cutánea son frecuentes. El número de casos de Leishmania adquirida en las zonas tropicales de Bolivia, no se conocen con exactitud, ya que las poblaciones locales migran por fuentes de trabajo y los turistas infectados con esta parasitosis, suelen desarrollar la enfermedad fuera del país.⁶

El costo aproximado de tratamiento completo, para una persona de 60 Kg., es de 360 dólares americanos y en general la toxicidad de estas drogas disponibles, provoca una caída de la actividad laboral en las personas tratadas, además pueden ser de poca tolerancia en algunos pacientes (paro cardíaco, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, fiebre, náuseas, poli neuropatías, síncope, artralgias, entre otros) Adicionalmente a los efectos adversos se tiene el problema de la **resistencia** (natural o adquirida) que tienen estos fármacos, la cual pueda deberse a las siguientes causas: a) modificación de las características de la proteína diana; b) aumento del proceso de inactivación farmacológica; c) disminución de los mecanismos de penetración del fármaco; incremento de los mecanismos de salida o expulsión; aumento en la velocidad de reparación del DNA alterado. Los efectos secundarios comúnmente asociados con las terapias, parecen tan malas como la enfermedad misma. Estos efectos pueden ser tan severos que limitan las dosis que se pueden administrar a los pacientes.⁷

Entre los diversos bioensayos genotoxicológicos, se halla la prueba *In vivo* de Mutación y Recombinación Somática (SMART: Somatic Mutation and Recombination Tes., Graf et al., 1984) que utiliza a la mosca *Drosophila melanogaster* como organismo modelo experimental, así los resultados con esta técnica pueden ofrecer resultados relevantes que pueden ser extrapoladas a humanos con un alto índice de acierto, debido a que existe una elevada similitud entre rutas bioquímicas y funciones reguladoras; y adicionalmente genes estudiados en *Drosophila* probaron ser homólogos a genes supresores de tumor y oncogenes humanos.⁸

Gracias a más de 80 años de estudio, hoy sabemos que muchos de los procesos biológicos de *Drosophila* tienen, a pesar de la simplicidad genética de esta mosca, una gran similitud con vertebrados superiores como los humano, "La bioquímica fundamental de *Drosophila* (mosca de la fruta) y los seres humanos es notablemente similar".⁹

⁶ (Zeballos R., Valda L., Rollado F.; 2007).

⁷ (Giménez A.; 2006).

⁸ (Graf et al., 1992).

⁹ (Hoskins R.;2005).



Por todos estos argumentos señalados y debido a que en Bolivia este fármaco es utilizado como fármaco de primera elección en esta enfermedad y las investigaciones genotoxicológicas *In vivo* son escasas, el presente trabajo pretende dar esta información en el entendido que dé una respuesta de genotoxicidad positiva puede dar indicios de una posible expresión carcinogénica si se presenta a nivel de líneas celulares somáticas, mas una interacción a nivel de las líneas germinales hecho que dará lugar a la afectación de las siguientes generaciones por procesos como: mutaciones génicas y cromosómicas, representadas por eventos aneugénicos (perdida de cromosomas enteros) y clastogénicos (perdida de fragmentos cromosómicos), y eventos de recombinación somática.¹⁰



¹⁰ (Graf et al., 1984; Wrügler & Vogel, 1986; Vogel & Zijlstra, 1987).



II. ANTECEDENTES

II.1. GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Los orígenes de la Genética Toxicológica se remontan a 1927, cuando Müller realizó experimentos de mutabilidad debida a la radiación. Ya en los años 40 las sustancias químicas empezaron a ser el blanco para determinar sus efectos a nivel del material genético y a mediados de siglo la preocupación se volcó a la determinación del impacto genético potencial que podrían ocasionar los agentes químicos introducidos al ecosistema.¹¹ Pero recién en 1969 la genética toxicológica es reconocida como disciplina, y con este impulso en los años 70 mediante la aplicación del test de Ames se descubre que muchas sustancias necesitan una activación metabólica para ejercer su efecto mutagénico.

Por tal motivo, la Genética Toxicológica es la disciplina científica que ha sido desarrollada para cumplir funciones de identificación y análisis de aquellos agentes que a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados mediante mecanismos acción directa o indirecta. En ambos casos puede darse lugar a la producción de intermediarios reactivos, capaces de formar complejos con el ADN y ocasionar: muerte celular, mutación o transformación celular **Ver (Figura 1)**.

La identificación del daño genético puede ser llevado a cabo mediante técnicas *in vitro* como el test de Intercambio de Cromátides Hermanas (SCE), test de Micronúcleos (MN), test de Electroforesis en una sola célula, test de Aberraciones Cromosómicas, entre otras y por técnicas *in vivo* como el test de Mutación y Recombinación Somática (SMART), basada en la pérdida de heterocigocidad de células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

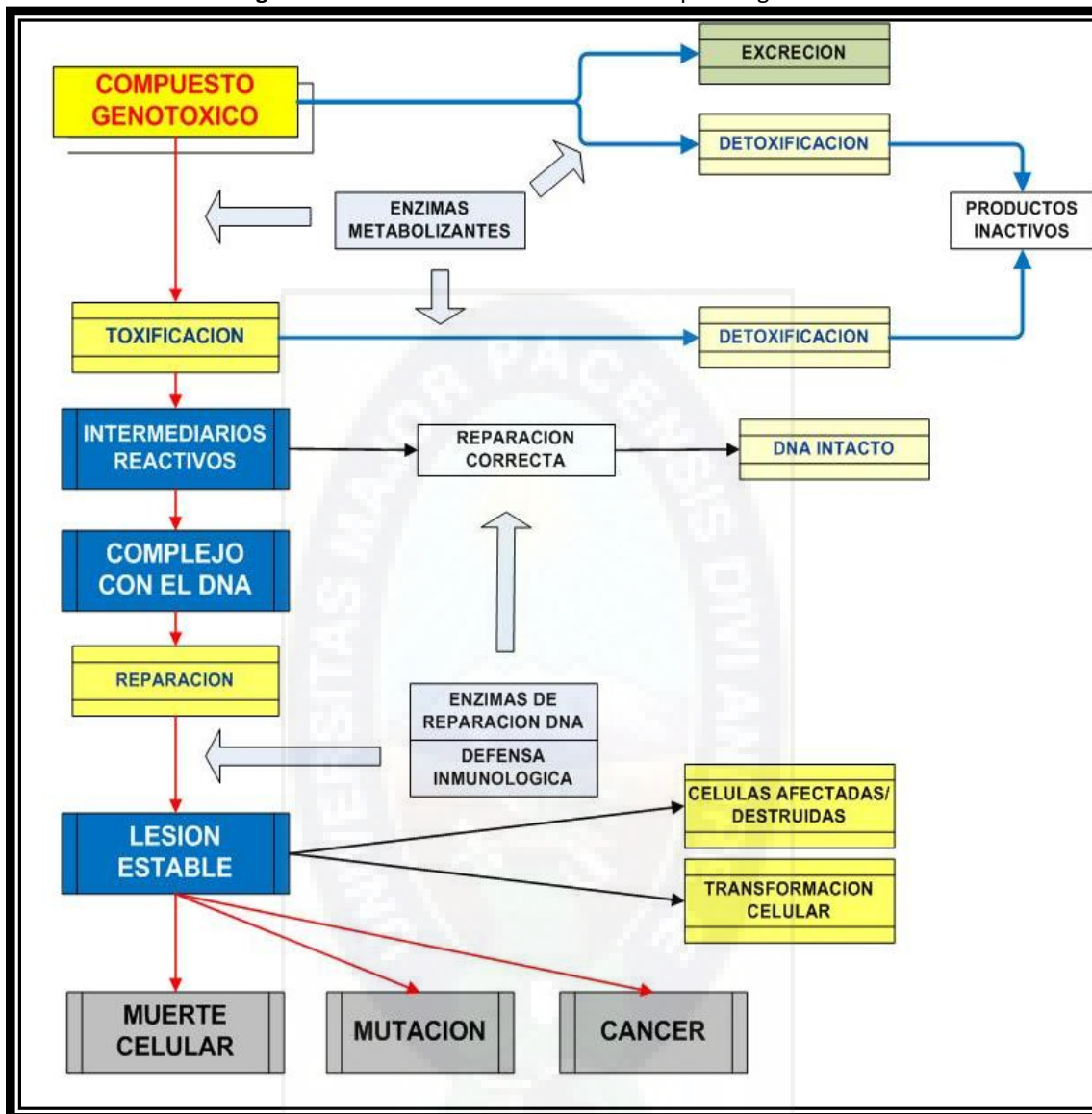
Hasta hace diez años, el papel central de la Genética Toxicológica se refería a la creación de ensayos que diagnostiquen agentes genotóxicos capaces de inducir mutaciones génicas y mutaciones cromosómicas. Entre tanto, en la última década se descubrió que muchos agentes que participan de las etapas de iniciación o promoción de tumores malignos, no inducen tales tipos de daños. Estos hallazgos impulsaron a la creación de ensayos genéticos específicos, esperando detectar otro parámetro genético: la Recombinación.

De hecho, actualmente se sabe que la Recombinación contribuye de manera significativa al origen de: Dolencias coronarias, diabetes, envejecimiento en general y principalmente el cáncer. Por ello, la Genotoxicología está centrando sus investigaciones en agentes que inducen mutaciones en células germinales (porque se pone en riesgo a generaciones futuras) y en células somáticas (porque puede darse lugar a la formación de procesos tumorales o cancerígenos).

¹¹ Flanders, 1981 cit. en Lafuente, 1997



Figura 1 Mecanismos de acción de un compuesto genotóxico



Un compuesto que produce toxicidad directa ó indirecta a través de enzimas metabolizantes o compuestos xenobióticos puede producir compuestos intermediarios que forman complejos con el ADN. Sin embargo a través de mecanismos de detoxificación se convierten en productos inactivos y son excretados. Asimismo, si los mecanismos de reparación del ADN son correctos, el ADN se mantiene intacto, pero si la reparación es incorrecta la lesión es estable y puede ocasionar muerte celular, mutación y finalmente transformación que lleva al cáncer (Marcos, 1998).

Para determinar el grado de daño genético que pueda generar un agente, la Genética Toxicológica maneja criterios de valoración que permiten determinar su Potencial Genotóxico o Capacidad Genotóxica. Considerando como:

- **Genotóxico Potente:** Cuando el agente es mutagénico y carcinogénico.



- **Genotóxico:** Cuando la evaluación expresa resultados positivos pero debe realizarse otros ensayos *in vivo* para confirmar el riesgo.
- **Supuesto Genotóxico:** Cuando solo algunos tratamientos expresaron una respuesta positiva, por lo tanto se requiere de pruebas adicionales.
- **Insuficiente respuesta genotóxica:** Cuando los datos no permiten sospechar de sus genotoxicidad.
- **No genotóxico:** Cuando se observa suficiente respuesta negativa.

II.2. TEST DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART)

Una de las primeras estrategias para evitar el desarrollo del cáncer y otras dolencias degenerativas, depende de la evaluación de toxicidad genética, en diferentes sistemas de ensayos. Especialmente en células somáticas, que son capaces de expresar potencialidades de agentes inductores de tumores malignos. Por esta razón, es necesaria la utilización de un test sensible, capaz de detectar el mayor número posible de lesiones, tanto clásicas (mutación génica y cromosómica), como también las que ocurren por recombinación mitótica.

Actualmente la técnica SMART es una de las más utilizadas a nivel mundial para análisis genotóxicos; posee la capacidad de detectar simultáneamente mutaciones génicas y cromosómicas, representadas por eventos aneugénicos (perdida de cromosomas enteros) y clastogénicos (perdida de fragmentos cromosómicos), también detecta eventos de recombinación somática. Emplea como organismo experimental a *Drosophila melanogaster*, caracterizada por ser de fácil manutención en laboratorio, posee un corto tiempo de generación, morfología definida y amplio tamaño de progenie.

Además, aunque *Drosophila melanogaster* presente apenas aproximadamente 13.000 genes, comparados a los cerca de 35.000 de los humanos, la mayoría de estos son equivalentes y consecuentemente, existe una alta conservación entre rutas bioquímicas y funciones reguladoras de las dos especies. En función a estas similitudes, *Drosophila* es considerada como un excelente modelo para estudiar la genotoxicidad y sus mecanismos moleculares, pudiendo proporcionar respuestas relevantes que pueden ser extrapoladas a humanos con un alto índice de acierto.

La técnica SMART posee las siguientes ventajas, es:

- Simple
- Reproducible
- Específico
- Selectivo
- Económico



- Expresa resultados con rapidez
- Precisa de mínimos requerimientos de muestra

La premisa que basa a esta técnica es que durante el desarrollo embrionario, grupos de células (Discos Imaginales) proliferan mitóticamente hasta el punto en que se diferencian durante la metamorfosis en estructuras que originan las alas de las moscas adultas **Ver (Figura 2)**. Pero durante ese proceso, debido a una inducción de alteración genética se origina la pérdida de heterocigocidad de los grupos celulares, de modo tal que fenotípicamente dichas alteraciones pueden ser observadas en la superficie del ala de *Drosophila melanogaster*.

Para ello hace uso de dos marcadores genéticos: formación de pelos múltiples *mwh* (se observa el crecimiento de tres o más tricomas en lugar de uno) **Ver (Figura 3-b)** y pelos *Flr³* que poseen la característica de presentar una base ensanchada respecto a la delgada que presentan los pelos normales (**Ver Figura 3-a y 3-c**).

El análisis de las alteraciones genéticas inducidas, es realizado por observación microscópica de los grupos de células mutadas, ya sea que expresen el marcador genético *Flr³* o *mwh*, dichos grupos celulares son conocidos como **manchas mutantes**.

El número total de manchas observadas ofrece información cuantitativa sobre la actividad genotóxica del compuesto evaluado; el tipo de mancha revela las diferentes lesiones que originaron dicha actividad genotóxica y pueden ser clasificadas como:

- **Manchas Simples Pequeñas (MSP) y Manchas Simples Grandes (MSG):** Ambas expresan el marcador genético *Flr³* o *mwh* (**Ver Figura 4-a y 4-b**) e indican la ocurrencia de mutación puntual, delección, no disyunción o recombinación entre el gen *Flr³* y *mwh* (**Ver Figura 4**).
- **Mancha Gemela (MG):** Expresa ambos marcadores genéticos (*Flr³* y *mwh*), ofrece la información de que aconteció exclusivamente un evento recombinogénico entre el gen *Flr³* y el centrómero ocasionado por el agente evaluado (**Ver Figura 4**).

También es importante distinguir entre MSP (cuando una ó dos células presentan expresión *Flr³* ó *mwh*) y MSG (cuando más de dos células expresan fenotipo *Flr³* ó *mwh*) especialmente porque las primeras son formadas durante el último y penúltimo y/o ciclos de división mitótica que está ocurriendo en la pupa y las Grandes porque son producidas más tempranamente, durante el desarrollo larval. Existe todavía otra razón para evaluar MSP separadamente, ya que deficiencias genéticas debidas a mutaciones cromosómicas de tipo aneuploidías y/o grandes delecciones llevan, en una gran mayoría de las veces a la formación



de MSP, independientemente del tiempo en que ellas fueron inducidas, ya que estas células presentan una baja tasa de proliferación celular.¹²

Los individuos analizados provendrán de dos tipos de cruce:

- **Cruce Estándar (ST):** Su progenie está caracterizada por presentar niveles basales de enzimas de metabolización, por lo tanto detecta genotoxinas de acción directa (Mutágenos).
- **Cruce de Alta Bioactivación (HB):** Su progenie permite detectar genotoxinas de acción indirecta (Promutágenos). Esto se debe a que poseen un incremento en los niveles de acción del citocromo P-450 encargado de suministrar centros conjugados en las genotoxinas de modo tal, que la capacidad de interactuar con el material genético se ve potencializado gracias a la activación metabólica.

Además en lo que se refiere a los marcadores recesivos, en ambos tipos de cruce se tiene dos progenies cuyos genotipos distintos ayudan a determinar el principal evento genotóxico que pueda estar generando el compuesto evaluado:

- **Individuos Trans-heterocigotos (mwh/Flr^3):** ofrecen la información de acontecimientos de mutación génica, cromosómica y recombinogénica.
- **Individuos Heterocigotos ($mwh/TM3$):** ofrecen información de acontecimientos de mutación génica y cromosómica, pero no de actividad recombinogénica. El cromosoma *TM3* presenta múltiples inversiones, que tornan inviables los productos de recombinación. Por tanto los Imagos o adultos heterocigotos para el cromosoma *TM3*, expresan solamente mutaciones génicas y/o cromosómicas.

Esta diferencia permite cuantificar la real contribución de la recombinación que puede generar un agente en estudio cuando estos resultados son comparados con aquellos obtenidos en los adultos Trans-Heterocigotos. La importancia de determinar dicha cuantificación, se basa en que la recombinación contribuye de manera significativa al origen del cáncer.

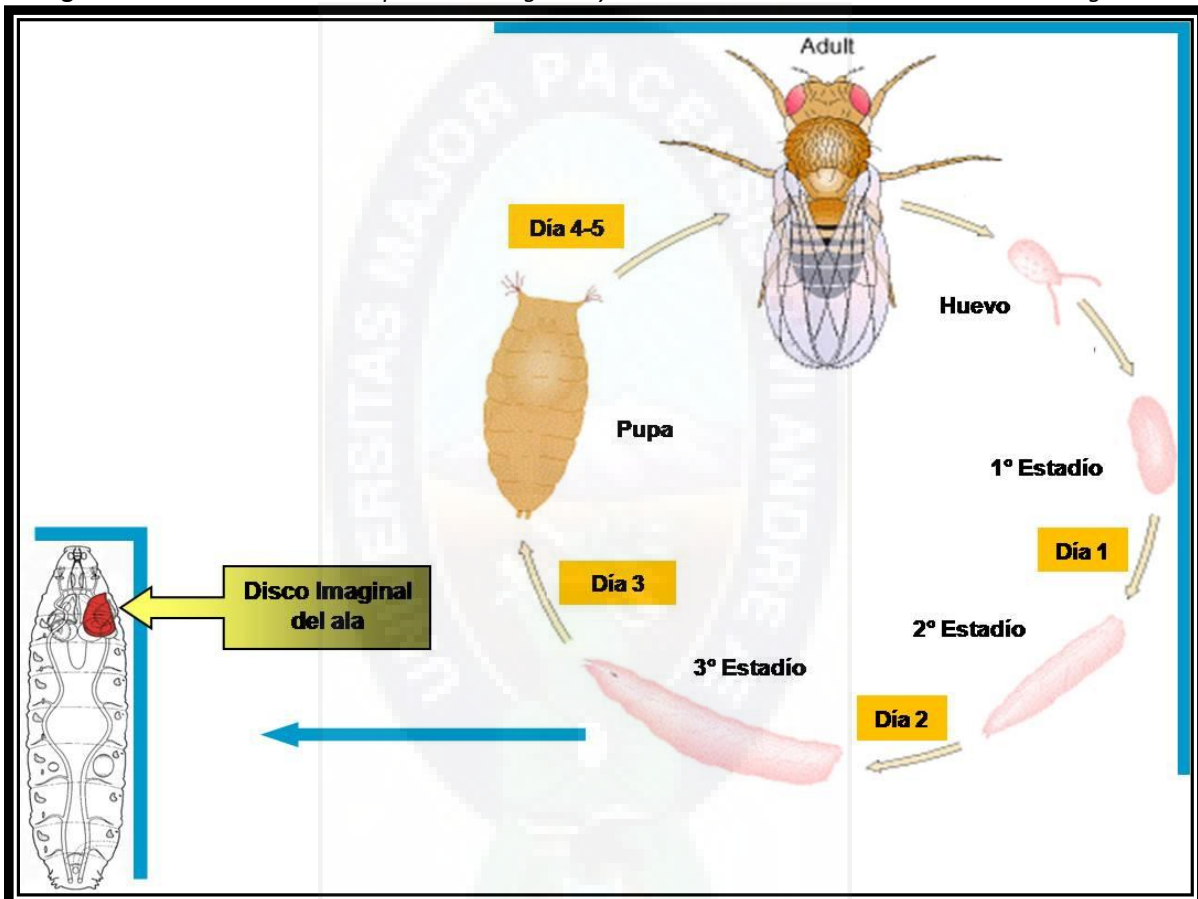
Este ensayo permite, también la detección de genotoxinas de acción directa, o bien como de aquellas que solamente cuando son metabolizadas, ejercen su actividad genotóxica. Este diagnóstico basase, respectivamente en el análisis de los individuos provenientes del **cruce Estándar (ST)** que utiliza linajes portadores de niveles basales de Enzimas de metabolización del tipo CYP6A2 y del **cruce de Alta Bioactivación (HB)**, que emplea linajes con niveles elevados de citocromo CYP6A2.¹³

¹² Grafet al.; 1984

¹³ Frolich & Wurgler, 1989; Saner et al., 1996

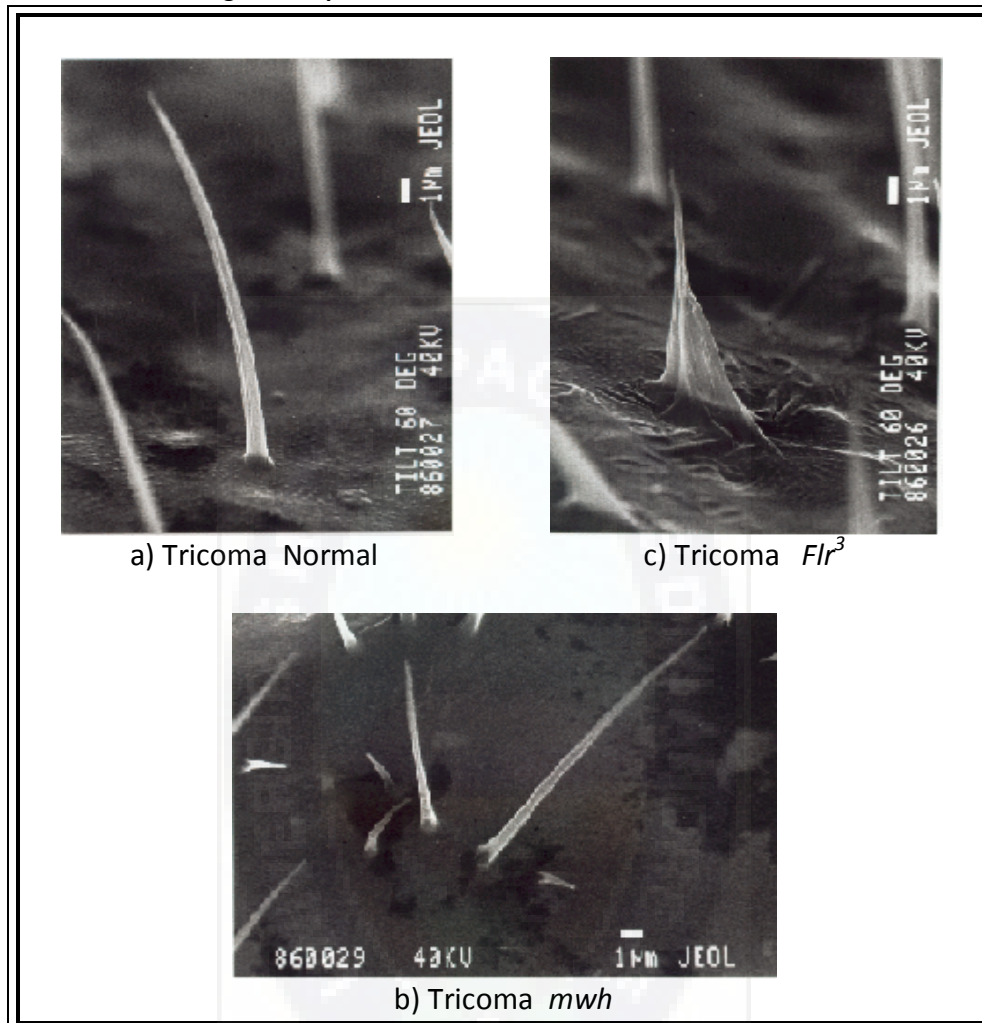
La aplicación de esta técnica ha sido plasmada en aproximadamente 400 compuestos, entre ellos productos puros y mezclas complejas como bebidas alcohólicas, extractos de té, diferentes tipos de cafés y vinos así como también en la investigación del potencial de partículas aéreas y efectos asociados a la mutagénesis ambiental.

Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* y su relación con el crecimiento de Discos Imaginales



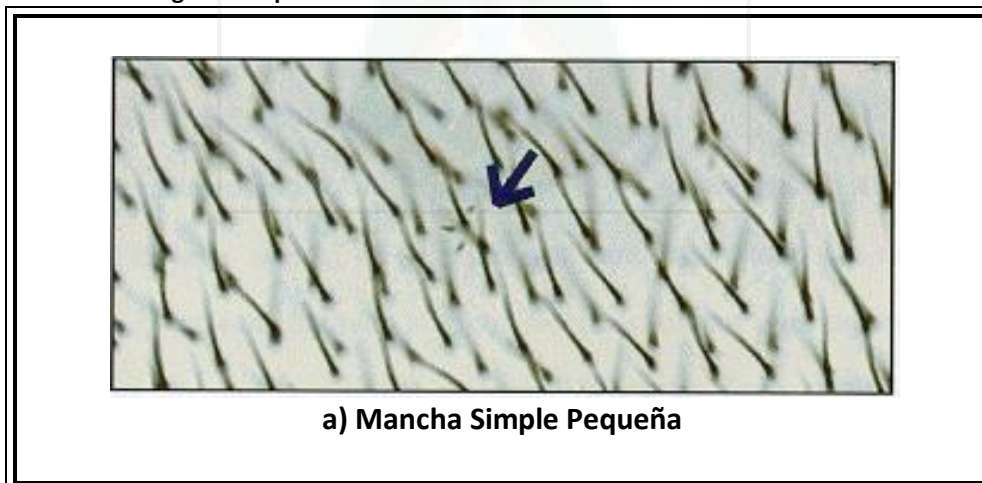
Desde el momento de la ovoposición hasta la conformación del Segundo estadio larval transcurren dos días, es en esta etapa que la división mitótica de las células que conforman el disco imaginal proliferan mitóticamente para posteriormente ingresar a la fase de metamorfosis (pupa) (Rodríguez, 2002)

Figura 3. Tipos de tricomas analizados en el Test SMART de ala

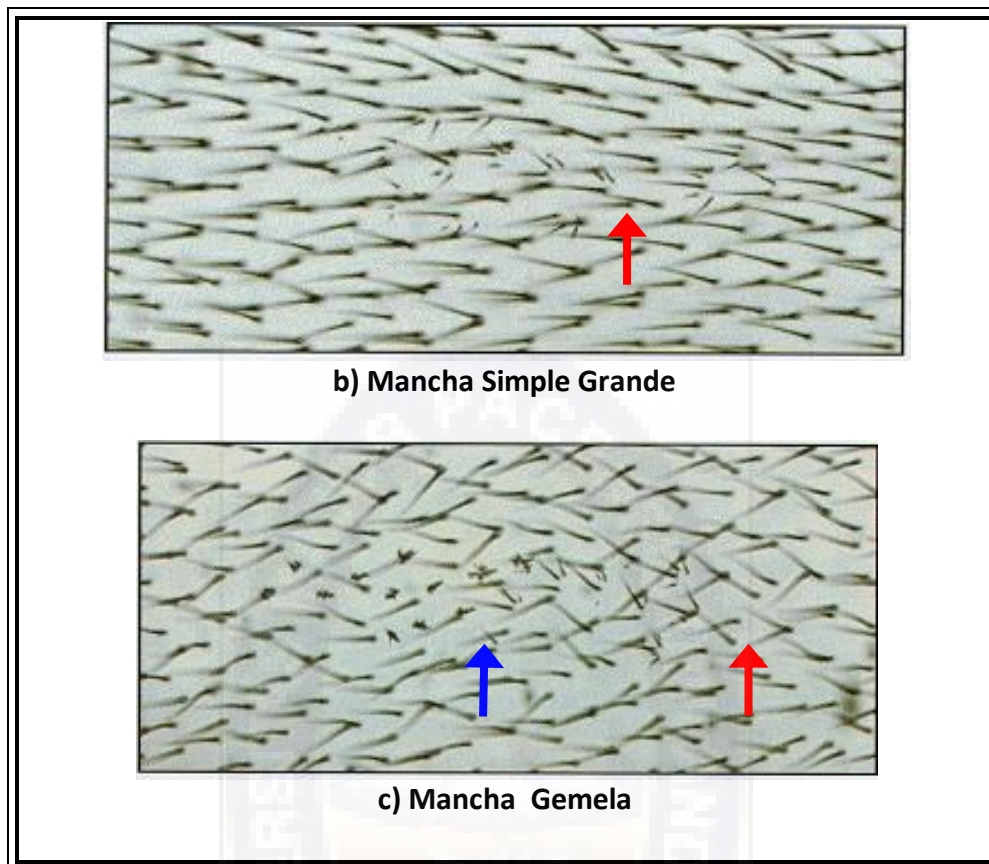


a) *Tricoma Normal*, b) *Tricoma de expresión múltiple (mwh)*, c) *Tricoma de expresión Flr* caracterizado por la formación de una base ensanchada (2002).

Figura 4. Tipos de manchas analizados en el Test SMART de ala.



a) **Mancha Simple Pequeña**



a) Mancha Simple Pequeña (MSP) cuando una ó dos células presentan expresión Flr^3 ó mwh .; **b)** Mancha Simple Grande (MSG), cuando más de dos células expresan fenotipo Flr^3 ó mwh .; **c)** Mancha Gemela (MG), cuando la expresión Flr^3 (flecha azul) y mwh (flecha roja) se hallan adyacentes. (Rodríguez, 2002)

II.3. DROSOPHILA MELANOGASTER

La denominación binomial introducida por **Meigen** en 1830: ***Drosophila*** ("amante del rocío") ***melanogaster*** ("abdomen de coloración negra"), conocida también como la "mosca de la fruta" o "mosca del vinagre" debido a que se le encuentra alimentándose de frutas en proceso de fermentación en donde las levaduras constituyen una parte importante de su dieta, y con alto contenido en ácido acético, uno de los principales constituyentes del vinagre. Es una mosca de pequeño tamaño de aproximadamente 3 mm en estado adulto, y cuya clasificación científica (**Ver Cuadro 1**) lo engloba dentro el orden Díptera (dos alas) que agrupa a aquellos organismos en el que solo el primer par de alas es funcional y el segundo se ha transformado en órganos de equilibrio, los llamados halterios o balancines. Es un organismo representativo de la familia *Drosophiloidae* la que incluye a las mosquitas pequeñas, con algunas cerdas y venación de las alas, el género ***Drosophila*** comprende varias especies de moscas con la vena subcostal degenerada, incompleta o ausente, las pertenecientes a la especie *melanogaster* tienen 2 interrupciones en la vena costal. Es un insecto holometabolo y es de hábitat cosmopolita, es decir, están ampliamente distribuidas, por lo que se les encuentran en todo tipo de clima, altitud y latitud.



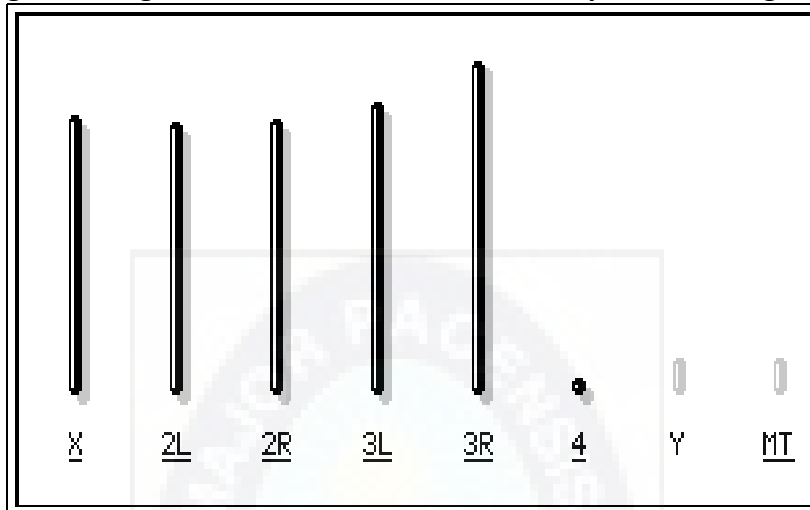
Cuadro 1. Clasificación Sistemática para *Drosophila melanogaster*

Reino	<u>Animalia</u>
Familia	<u>Arthropoda</u>
Clase	<u>Insecta</u>
Orden	Diptera
Familia	<u>Drosophilidae</u>
Subfamilia	<u>Drosophilinae</u>
Género	<u>Drosophila</u>
Subgénero	<u>Sophophora</u>
Grupo especie	Grupo <i>melanogaster</i>
Subgrupo de Especie	Subgrupo <i>melanogaster</i>
Complejo de Especie	Complejo <i>melanogaster</i>
Especie	<i>D. melanogaster</i>
Nombre Binomial: <i>Drosophila melanogaster</i>	
Meigen, 1830	

Sus características biológicas, genómicas y citogenéticas hacen de este organismo un material ideal para la investigación en áreas relacionadas y aplicadas a la genética; debido a varias razones, entre las que se destacan: poseen un reducido número de cromosomas ($2n = 8$, cuatro pares y un par x/y) lo que simplifica el estudio citogenético de la especie (**Ver Figura 5**), son pequeñas y fáciles de manejar y cultivar en el laboratorio y su mantenimiento es de bajo costo, tienen un ciclo biológico muy corto (9-10 días a 25°C), son muy fértiles; cada hembra puede poner hasta unos 500 huevos, se han descrito más de 1000 mutantes diferentes, las larvas constituyen el material idóneo para el estudio de los cromosomas politénicos de las células de las glándulas salivales, de ahí la necesidad de conocer sus características y desarrollo. Es más, "aproximadamente el 61% de los **genes** de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el código genético de las moscas de la fruta, y el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca tiene análogos en los mamíferos".

De esta forma, para propósitos de investigación, fácilmente pueden reemplazar a los humanos. Se reproducen rápidamente, de modo que muchas generaciones pueden ser estudiadas en un corto tiempo, y ya se conoce el mapa completo de su **genoma**. Fue adoptada como animal de experimentación genética por Thomas Morgan a principios del siglo XX. Sus 165 Mb de genoma (1 Mb = 1 millón de pares de bases) fueron publicados en marzo de 2000 gracias al consorcio público y la compañía *Celera Genomics*. Alberga alrededor de 13.600 genes.

Figura 5. Organización cromosómica en *Drosophila melanogaster*



II.3.1. Morfología Externa en adultos

Bridges y Brehme (1944) y **Braver (1956)** fueron los pioneros de la descripción y localización génico-cromosómica de gran parte de los mutantes conocidos en esta especie. En la gran mayoría de los trabajos con estas moscas, se utilizan sus características morfológicas como el tipo, la forma y/o la disposición de sus estructuras. En particular, en los estudios genéticos resulta indispensable conocer de una manera general la morfología externa del adulto, para poder distinguir las características que presentan las moscas de ambos sexos o las que han sido afectadas por mutaciones. Creemos conveniente dar una descripción del fenotipo salvaje, normal para todos los caracteres:

II.3.1.a Cabeza

En la estructura de los insectos, la cabeza se forma por seis segmentos: Labrum, clipeus, antenal-ocular, mandibular, maxilar, labial.

En la cabeza se encuentra sobre todo los organos de los sentidos. La parte frontal está completamente formada por el tercer segmento antenal-ocular constituido por tres ocelos u ojos simples, además se encuentran en ambos costados un par de ojos compuestos relativamente grandes y redondeados, su superficie es mate y su color rojo oscuro, del mismo tamaño y forma en los dos sexos, constituidos por aproximadamente 800 omatidios dispuestos regularmente en filas e hileras. Entre los ojos se encuentran un par de antenas globosas con una arista plumosa, muy cercanas entre sí, formadas por seis segmentos: los tres primeros son muy pequeños, en el



segundo aparecen cerdas alargadas de varios tamaños y en el tercero constituye una estructura bulbosa.

En la región ventral de la cabeza se encuentran las partes bucales: el labrum y el clipeus, que están altamente modificadas con respecto al plan general de los insectos ya que forman un aparato chupador o proboscis. No presentan mandíbulas. En la cabeza también se encuentran numerosas cerdas muy grandes, designadas por términos derivados de sus posiciones.

Así mismo, repartidas por la cabeza y tórax se encuentran una serie de cerdas o quetas que tienen función de órganos de los sentidos; según su tamaño se dividen en: Macroquetas (las más largas) y las Microquetas (tres veces más cortas que las anteriores).

II.3.1.b Tórax

El tórax se encuentra dividido en tres segmentos: Protórax, Mesotórax y Metatórax, en cada uno de los cuales se inserta un par de patas. Como prolongación triangular del tórax, sobresale una estructura típica llamada “escutelo”.

El concepto convencional del tórax asume que las paredes de cada segmento involucran transversalmente una placa dorsal, una lateral en cada lado entre las alas y la base de las patas, y en una placa ventral entre las bases de las patas. Todos los segmentos del tórax se encuentran casi fusionados formando una caja casi sólida.

El prototorax por sí mismo es muy reducido y sólo sirve de soporte para el primer par de patas. La posición dorsal o notum es exclusivamente un collar estrecho que se extiende a través del tórax, está fusionando posteriormente con el mesonotum y lateralmente con los elementos pleurales de su propio segmento, separados por un pliegue.

Los esternitos, dos pequeñas placas ventrales que separan las coxas de las patas. Los grandes pelos del tórax ocupan una posición casi definitiva y fija, están formados por dos tipos de células, tricogénitas y termogénitas con función nutricional y sensorial respectivamente. Las setas dorsocentrales, los postalares y los estructurales son importantes fenotípicamente.

Los segmentos desde donde aparecen las alas están estrechamente unidos y son llamados pterotórax. Se presentan un marcado alargamiento del mesotórax y una reducción del metatórax, por lo que las alas mesotorácicas tienen la función total del vuelo, mientras que las alas metatorácicas se han reducido a los halterios que funcionan como órganos de equilibrio. Estos se dividen en tres partes: una porción basal, una porción media y una porción apical.



II.3.1.c Alas

Solamente tienen un par de alas funcionales; las alas posteriores están reducidas a “balancines”, que funcionan como estabilizadores de vuelo. Las alas funcionales son de borde redondeado y sobrepasan del abdomen en una tercera parte de su longitud. Tienen cinco venas longitudinales sobre su superficie y dos venillas trasversales, con lo que el ala queda dividida en ocho regiones llamadas "celdas". Su superficie es plana, son transparentes y prácticamente incoloras.

II.3.1.d Patas

Las patas constan de las siguientes piezas: coxa, trocanter, fémur, tibia y tarso, éste último con varios artejos.

II.3.1.e Abdómen

En ambos sexos, se distinguen una serie de bandas claras alternando con bandas oscuras, sin embargo, en ocasiones, debido a que la segmentación ha sido modificada por desarrollos secundarios, el número primitivo de segmentos es difícil de encontrar. En ambos sexos falta el esternito del primer segmento abdominal, y el color del cuerpo tiende a ser amarillo-grisáceo.

II.3.2. Dimorfismo Sexual

Existen diferencias entre los individuos masculinos y femeninos, lo que permita distinguirlos unos entre otros (**Ver Cuadro 2**). Sin embargo, a partir del tercer estadio larvario las gónadas masculinas son mayores que las femeninas, pudiéndose observar esta diferencia por transparencia mediante iluminación de abajo a arriba en una lupa de disección. Así mismo, en el estado de pupa el macho posee ya el llamado “peine sexual”, en el primer artejo tarsal del primer par de patas. Dicho peine es ya visible en pupas de más de tres días de edad.

Cuadro 2. Dimorfismo Sexual en *Drosophila melanogaster* adultos

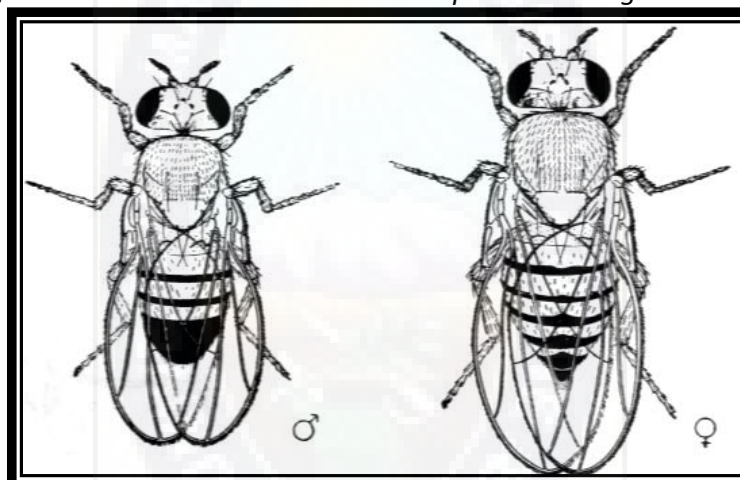
Característica	Hembra	Macho
Tamaño Imago	Grande	Pequeño
Forma del Abdómen	Termina en punta	Corto y redondeado

Segmentos abdominales	No fusionados	3 últimos fusionados
Peine sexual	Ausente	Presente
Genitalia externa	Ovopositor	Ganchos pigmentados
Disco Imagal genital	Pequeño	Grande

II.3.2.a Tamaño

Las hembras son ligeramente más grandes que los machos, en general las especies de *Drosophila* miden alrededor de 3 mm de longitud, por lo cual pueden visualizarse fácilmente con una lupa (**Ver Figura 6**).

Figura 6. Dimorfismo Sexual en *Drosophila melanogaster* adulto

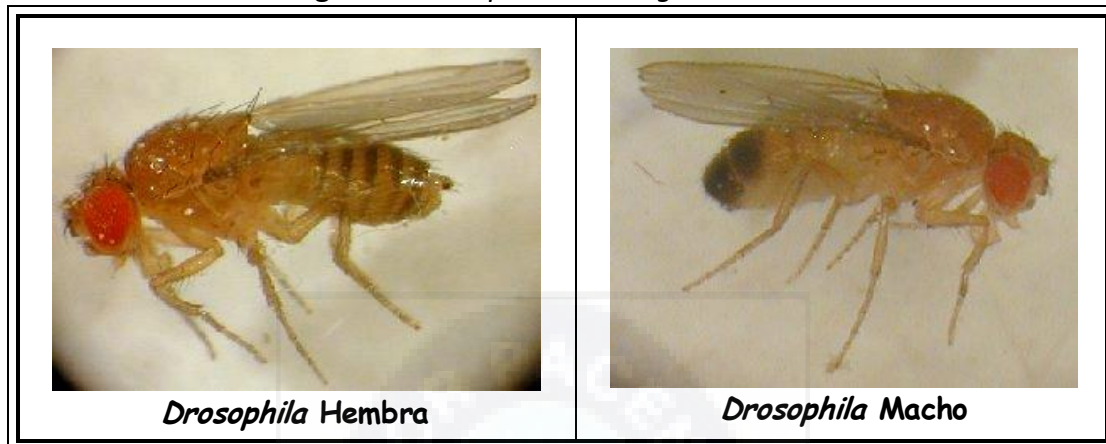


II.3.2.b Abdomen

El abdomen en los machos, es redondeado y de menor tamaño respecto al de las hembras en las cuales el abdomen termina en punta con varios segmentos visibles, debido a que con el tiempo el abdomen de las hembras se distiende por los huevos en maduración que contiene; las moscas de este sexo se reconocen por esto a simple vista, las marcas más oscuras sobre los segmentos abdominales tienen una distribución suficientemente distinta en cada sexo como para permitir su separación sin necesidad del microscopio. El abdomen de la hembra contiene siete segmentos visibles; mientras que el macho contiene solamente cinco.

También se toma en cuenta la pigmentación abdominal como criterio de diferenciación entre machos y hembras, no obstante hay que tener mucho cuidado debido a que en moscas que no están totalmente desarrolladas esta pigmentación no es total, por lo cual puede haber confusiones (**Ver Figura 6 y 7**).

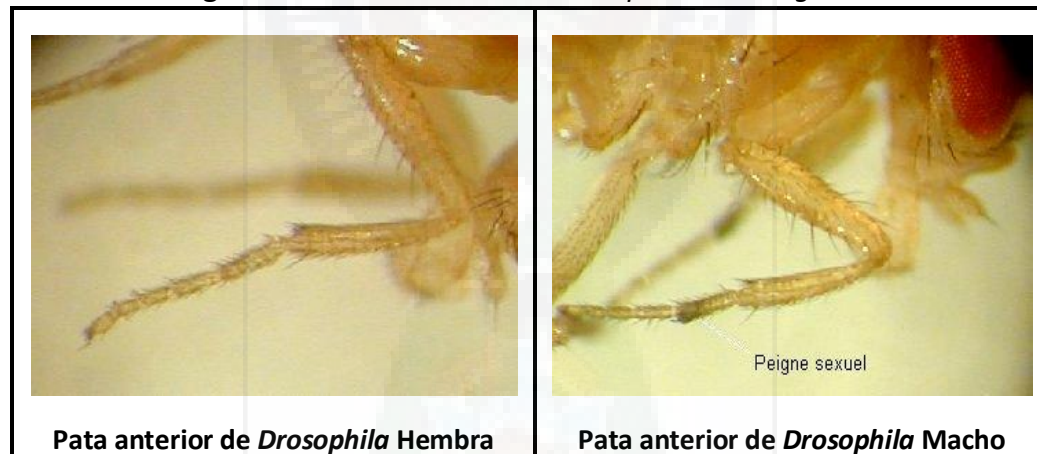
Figura 7. *Drosophila melanogaster* adulto



II.3.2.c Peines Sexuales

Los machos poseen los llamados peines sexuales, un cepillo de aproximadamente diez fuertes setas negras en la articulación basal del tarso del primer par de patas, y lo utilizan para sujetarse a las hembras durante la cópula (Figura 8). Mediante estos caracteres, es posible distinguir el macho de la hembra, ya por inspección visual o, en casos dudosos, con la ayuda de lentes de poco aumento.

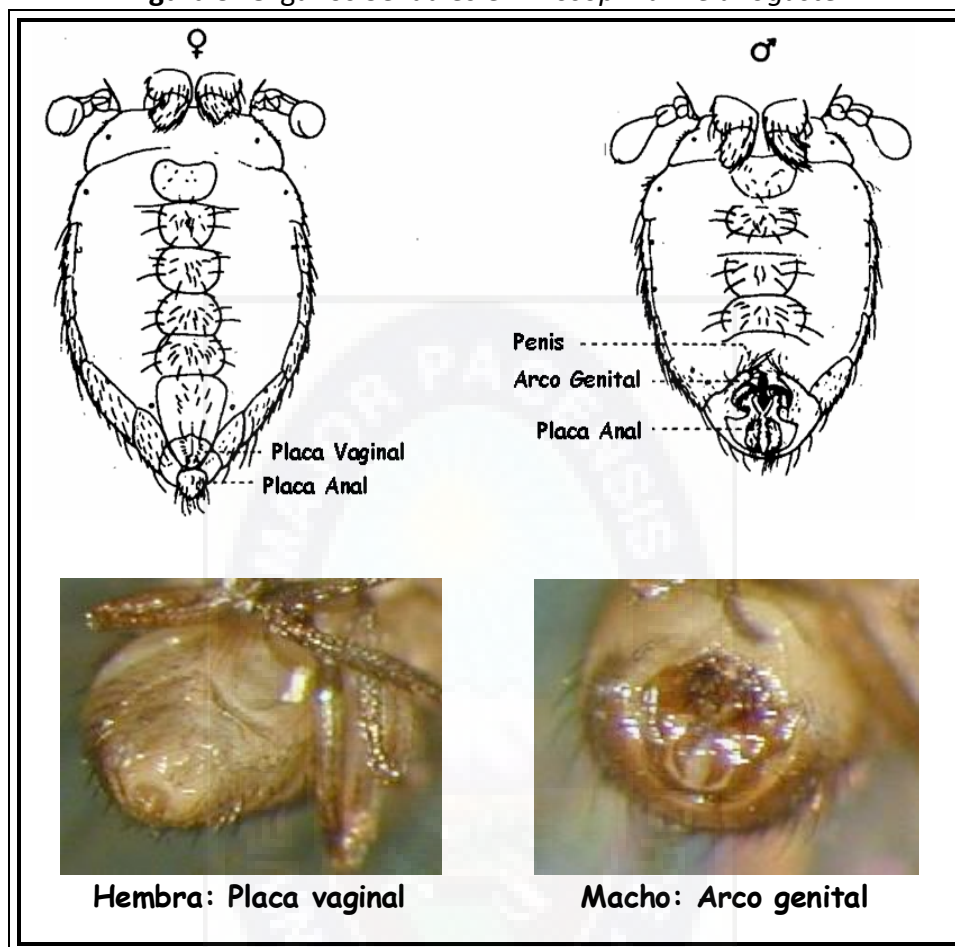
Figura 8. Peines sexuales en *Drosophila melanogaster*



II.3.2.d Órganos Sexuales

Las hembras tienen el abdomen de color claro y solo una placa vaginal de la misma coloración que el resto; los machos tienen un arco genital de color pardo-oscuro (Ver Figura 9).

Figura 9. Órganos Sexuales en *Drosophila melanogaster*



II.3.3. Ciclo Biológico

D. melanogaster tiene un ciclo de vida corto, producen muchos individuos, además, su mantenimiento es de bajo costo. Sin embargo poseen una metamorfosis complicada. Su ciclo biológico, desde la fecundación hasta el adulto, pasa por los estados de huevo - larva (tres estadios) – pupa – imago (Ver Figura 10 y 11).

El desarrollo completo de la mosca posee un tiempo de duración aproximado de nueve a diez días en condiciones ambientales óptimas (temperatura, pH y medio de cultivo adecuado). Tras la fecundación y formación del cigoto, el desarrollo embrionario tiene lugar en el huevo, la duración de los estadios varía debido a un gran número de factores, entre los cuales el más importante es la temperatura. En el **Cuadro 3**, se indica la duración de los diversos estadios y del ciclo completo a diferentes temperaturas de desarrollo¹⁴

¹⁴ (Morgan, Bridges, y Sturtevant, 1925).



Cuadro 3. : Efecto de la temperatura en la duración del ciclo Biológico en *Drosophila melanogaster*

Temperatura °C	Días huevo-Larva	Días pupa	Días ciclo completo
11	57	13,7	70-71
15	18	8	26
20	8	6,3	14-15
25	5	4,2	9-10
27,5	4	3,2	7-8
30	4	3,4	7-8

La exposición continua a una temperatura superior a los 30°C puede conducir a la esterilización y muerte de las moscas, aparte de producir efectos sobre el fenotipo o variaciones en la penetración o expresividad de determinados genes. Así mismo, las temperaturas inferiores a 20°C hacen decrecer la viabilidad de las moscas y prolongar el ciclo biológico.

II.3.3.a Huevo

Una hembra puede empezar a depositar los huevos desde el segundo día después de emerger y podrá estar poniendo durante unos 10 días, al cabo de este tiempo puede haber depositado del orden de 400-500 huevos. La fecundación tiene lugar dentro del útero. A partir de la formación del cigoto, comienza el desarrollo embrionario. El embrión se desarrolla dentro de las membranas de huevo, permaneciendo durante los estadios iniciales del desarrollo, en el cuerpo de la madre y siendo depositado después. El huevo depositado es de forma ovoide, cubierto por una fuerte membrana quitinosa, "corion", con la cara dorsal más aplastada que la ventral que es redondeada. La superficie del corion presenta unas marcas o relieves hexagonales. El huevo tiene un tamaño aproximado de 0.5 mm. De su parte anterior se proyectan dos palas, a modo de remos, cuya función es la de hacer de flotadores para prevenir el hundimiento del huevo en la superficie semilíquida en que son depositados. En la parte anterior, entre los dos apéndices hay un poro diminuto, "micropilo", que es por donde penetra el espermatozoide para fecundar al ovocito.

Los huevos pueden ser ovopositados por la madre poco tiempo después de la penetración del espermio o quedar retenidos en la vagina durante los primeros estados de desarrollo embrionario. Todo el desarrollo del huevo se completa dentro de 24 horas.



II.3.3.b Larva

Terminado el desarrollo embrionario emerge del huevo una pequeña larva de gran movilidad, blanca, segmentada, con unas piezas negras en su región anterior que son las mandíbulas. En las regiones anterior y posterior tiene un par de espiráculos de función traqueal.

La larva de *Drosophila*, externamente, no presenta muchas estructuras. Internamente es más interesante. El tubo digestivo es diferenciado y enrollado en la porción media posterior. Las glándulas salivales se vacían en la parte anterior del tubo digestivo mientras los tubos de Malpighi desembocan en el tracto digestivo.

(A) Estadíos del Desarrollo Larvas

En general se acepta que las larvas de *Drosophila* pasan por tres estadíos de desarrollo:

i.) Estadío I ó “Primer Instar”

Se considera en este estado de desarrollo las larvas que van desde que eclosiona el huevo hasta que cumplen 24 horas y es el periodo comprendido entre la eclosión y la primera muda. Este estado se caracteriza porque las larvas presentan gran movilidad y su principal función es la búsqueda de alimento.

ii.) Estadío II ó “Segundo Instar”

Va desde las 24 horas a las 72 horas de vida y comprende el periodo entre las mudas primera y segunda. En general se consideran larvas de estado II las que tienen entre 48 y 72 horas y su función principal también es la búsqueda del alimento.

iii.) Estadío III ó “Tercer Instar”

Va desde las 72 a las 96 horas de vida y va desde la segunda muda hasta la inmovilización de la larva para dar lugar a la pupa; en este estadío larvario la larva llega a alcanzar una longitud de 4,5 mm. Las larvas pierden su interés por el alimento y su principal función es encontrar un lugar seco donde pupar.



La larva sufre dos mudas hasta alcanzar el tamaño del adulto; a cada periodo entre muda y muda se le denomina “estadio larvario”. El cambio se produce cuando se rasga la piel del anterior estadio y sale de ella una larva un poco mayor.

Todo el periodo larvario es de gran movilidad. La distinción entre los estadios larvarios se puede hacer fijándose tanto en el tamaño de la larva como en el número de piezas mandibulares.

II.3.3.c Pupa o Crisálida

Cuando la larva está preparada para pupar, abandona al medio de cultivo y se adhiere a alguna superficie seca como las paredes de la botella o el papel secante en que se ha insertado el alimento.

La larva en el tercer estadio cambia sus espiráculos por las antenas pupales, se transforma en pupa dentro del penúltimo tegumento larval que al principio es suave y blando pero lentamente se endurece y oscurece su color, y un poco después se va inmovilizando y acortando su longitud, la cutícula se oscurece y fortalece formando el “puparium”. A esta prepupa se le puede considerar también como el cuarto estadio larvario, que termina en una muda.

A partir de entonces comienza el periodo de “pupa” o “crisálida” en el que se producen cambios histolíticos para dar lugar a los tejidos del adulto. Las estructuras del adulto que se van adquiriendo van tomando unas formas y color conforme avanza el estado de pupa.

Durante la fase de pupa se produce la metamorfosis, en la que se destruyen la mayor parte de las células de la larva y se forman las estructuras externas del adulto (Imago) a partir de tejidos larvales en el preadulto denominados "discos imaginales", estas estructuras, debido a la facilidad de su aislamiento se han utilizado mucho en Genética del Desarrollo. El metabolismo pupal se centra en la sustitución de los tejidos larvarios por los del adulto.

Finalizada la metamorfosis, la pupa se abre por la parte superior y emerge el adulto. Pasadas 8 horas tras la eclosión de la pupa, las hembras adultas pueden ser fecundadas.

En un principio la mosca es alargada y con las alas sin expandir todavía. Dentro de poco tiempo, sin embargo, las alas se expanden y el cuerpo gradualmente adquiere la forma redonda del adulto. Las moscas recién nacidas son de color claro, pero se



oscurecen dentro de pocas horas. Es posible, entonces, distinguir en el cultivo las moscas recién emergidas de las más viejas.

II.3.3.d Imago o adulto

Si el medio en el que se desarrolla el animal está a 25 °C entre el cuarto y quinto día de la vida pupal se rasga el puparium y surge el individuo adulto. En un principio la mosca es alargada y con las alas sin expandir todavía. Dentro de poco tiempo, sin embargo, las alas se expanden y el cuerpo gradualmente adquiere la forma redonda del adulto. Las moscas recién nacidas son de color claro, pero se oscurecen dentro de pocas horas. Es posible, entonces, distinguir en el cultivo las moscas recién emergidas de las más viejas.

La vida de este puede alcanzar un mes o incluso más. En este entendido, la cronología del desarrollo a 25 °C se muestra en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Cronología de desarrollo para
Drosophila melanogaster a 25 °C

Días	Estadío
0	Puesta
0-1	Desarrollo embrionario
1	Comienzo del primer estadío larvario
2	Primera muda 2º estadío larvario
3	Segunda muda 3º estadío larvario
5	Formación del puparium
5	Muda prepupal
5-6	Pupa, aparición de cabeza, alas y patas
7	Pigmentación de los ojos
9	Emerción del Adulto
9	Extensión de las alas del adulto



Figura 10. Estadios Biológicos en *Drosophila melanogaster*

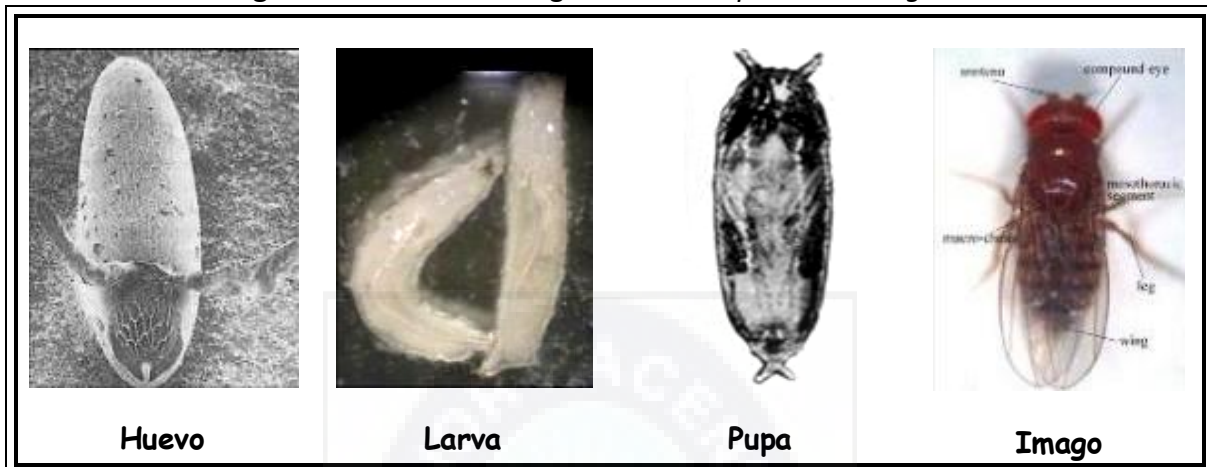
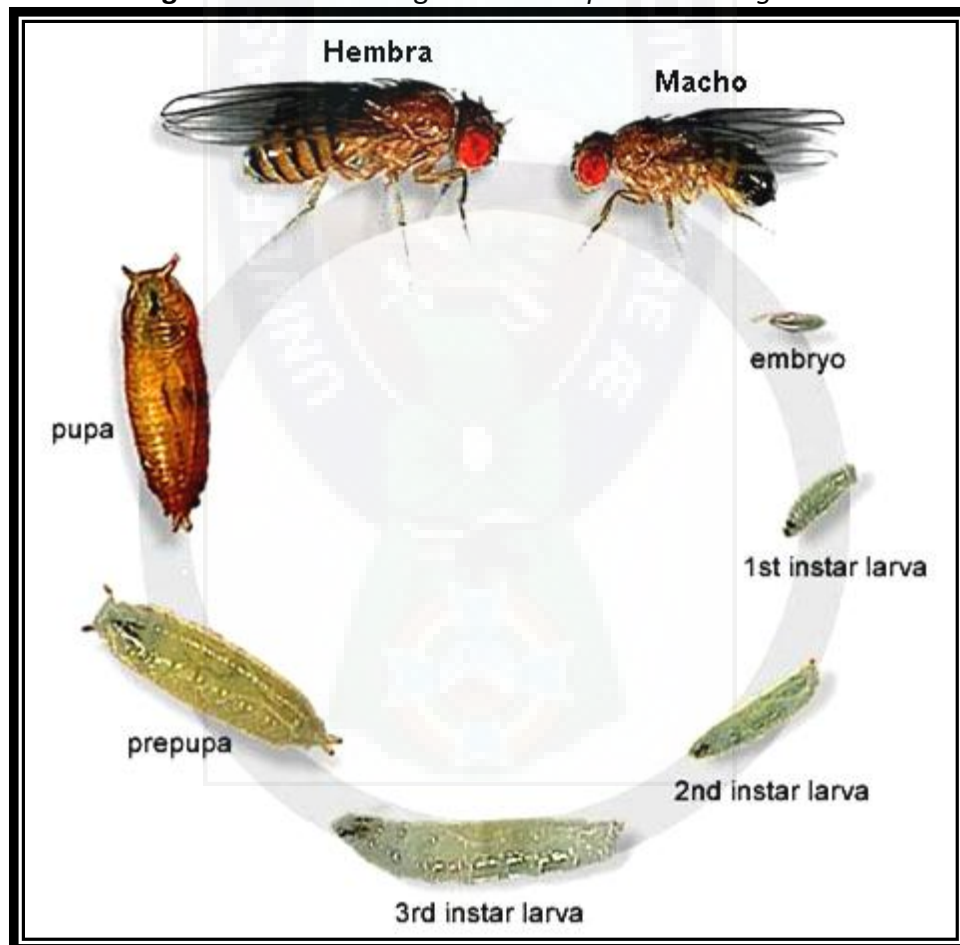


Figura 11. Ciclo Biológico de *Drosophila melanogaster*





II.4. LOS ANTIMONIALES

Numerosos productos medicamentosos fueron propuestos, ensayados o son corrientemente utilizados para el tratamiento de las Leishmaniosis, la larga lista de productos comprende diversas categorías químicas: arsenicales, antimoniales trivalentes, antimoniales pentavalentes, Nivaquina, Quinacrina, dehidroemetina, Metronidazol, pamoato de cicloguanil (Camolar), Anfotericina B, Rifampicina, Estreptomina, Isoniacida, Aureomicina, Sulfas (cotrimoxazol), Ketoconazol, Itraconazol, Penicilina, Aminosidina, Interferon gamma, entre otros.

Los antimoniales pentavalentes son conocidos como los compuestos más antiguamente usados en el tratamiento de la Leishmaniosis, inicialmente bajo la forma de compuestos trivalentes como el tártrato potásico de antimonio (tártaro emético), que fueron luego desplazados por los antimoniales pentavalentes derivados del ácido fenilestibónico. Irónicamente, la estructura exacta de estas drogas no se ha caracterizado pues está constituida por múltiples formas moleculares no obstante existen reportes mencionados por ciertos investigadores¹⁵ (Ver Figura 12).

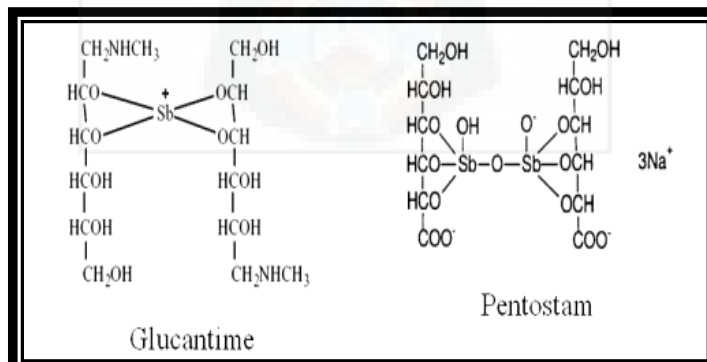
II.4.1. Generalidades

Existen dos tipos de sales de antimonio; los antimoniales trivalentes y pentavalentes; los antimoniales pentavalentes son las drogas anti leishmaniosis de primera línea desde hace más de 40 años y probablemente las más regularmente activas; fueron utilizadas a partir del inicio del siglo XX¹⁶, han sido repetidamente probadas y motivo de numerosas publicaciones.

Existen dos formulaciones disponibles en el comercio internacional, aunque en nuestro país solo encontramos el primero:

- Antimoniato de N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina o Glucantime)
- Estibogluconato de sodio (Pentostam)

Figura 12. Estructura Molecular de los Antimoniales Pentavalentes: Glucantime y Pentostam



¹⁵ (Revista Talleres. Publicación N°6. Noviembre, 1999)

¹⁶ (Greig E.D.N., 1917)



El efecto de estos medicamentos son actualmente cada vez mejor conocidos, su utilización exclusivamente parenteral y su toxicidad condicionan una delicada utilización del producto en zonas geográficas donde la cobertura médica es insuficiente.

En el aspecto de salud pública dentro del sistema de salud Boliviano, es necesario considerar que las personas que enferman de Leishmaniosis, son la población del área rural que tienen nivel bajo de instrucción y socio económico, situación que dificulta la buena realización de esquemas de tratamiento, debido principalmente al costo elevado del producto; una solución a este problema es que el estado, prefectura y/o municipio se hagan cargo de los costos de tratamiento, al igual que las empresas donde laboran los eventuales enfermos de Leishmaniosis.

Los antimoniales pentavalentes Glucantime® y Pentostam® son los medicamentos de primera línea usados en el tratamiento anti-*Leishmania*; sin embargo, no hay estudios in vivo que comparen su eficacia y toxicidad controlando variables del hospedero¹⁷.

II.4.1.a Antimoniato de meglumina (Glucantime)

Es un compuesto antimonial pentavalente. Se absorbe poco y es muy irritante para la mucosa gastrointestinal, por eso debe administrarse por vía parenteral o inyección local. Indicaciones. Es activo frente a *Leishmania*, tanto en la leishmaniosis visceral (kala-azar) como en la forma cutánea y cutaneomucosa¹⁸.

(A) Modo de acción

Los antimoniales pentavalentes inoculados en el paciente para poder ejercer su acción tienen que convertirse en trivalentes en el interior de los macrófagos; estos antimoniales trivalentes reaccionan con los grupos sulfhidrilos del parásito, dando como resultado la inhibición de su glucólisis y la oxidación de sus ácidos grasos, con lo que se reduce la formación de energía (ATP).

(B) Mecanismo de acción

Diversos autores difieren con un mecanismo de acción definitivo del antimoniato de meglumina por lo cual se propusieron diferentes mecanismos:

1. *Los estudios recientes sobre los mecanismos de acción anti-Leishmania del SbV, enfocados a evaluar la inhibición de enzimas como las tirosín-*

¹⁷ WHO. WHO expert committee on the control of the leishmaniasis. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series No. 793. Geneva: WHO; 1990.

¹⁸ (Aparicio P, et al. *Terapéutica antiparasitaria Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(10):579-94)



fosfatasas (pTpasas)¹⁹ y ADN topoisomerasa han descrito diferencias en los efectos inhibitorios *in vitro* e *in vivo* entre los principios activos. Los estudios bioquímicos en *Leishmania* detectaron diferencias entre los dos medicamentos (GLUCANTIME Y PENTOSTAM) en la inhibición de la topoisomerasa I, que podrían reflejarse en diferencias en su efectividad. La información bioquímica existente indica que el Pentostam® y el Glucantime® inhiben un rango distinto de pTpasas y la topoisomerasa I sólo es inhibida por Pentostam® y no por Glucantime®, pero se desconoce en qué medida estas diferencias influyen en la respuesta clínica al tratamiento.^{20, 21}

2. *Inhibidores del metabolismo energético:* los arsenicales trivalentes (melarsoprol) y antimoniales pentavalentes (estibogluconato sódico, antimoniato de meglumina) parecen bloquear las quinastas de la glucólisis, sobre todo la piruvatoquinasa del citoplasma,
3. *Existen autores que piensan que se trata de una alteración en la reducción del tripanotión (similar a glutation). La suramina, efectiva en la fase inicial de la Tripanosomiasis africana, actúa sobre las enzimas glucolíticas de la oxidación de la nicotinamida adenindinucleótido reducido (NADH). Un buen número de medicamentos frente a los esporozoarios (primaquina, parvaquona) bloquean el transporte mitocondrial de electrones interfiriendo la cadena respiratoria.*
4. El mecanismo de óxido-reducción es una de las hipótesis más consideradas, donde se propone la reducción *in vivo* de los complejos de Sb(V) a compuestos más tóxicos de Sb(III). Se destaca aún más el papel que cumplen los grupos tiol, comunes en biomoléculas que contienen cisteína, los cuales muy probablemente estén implicados en esta conversión. Sin embargo, otros estudios indican que el papel del Sb(III) estaría mucho más asociado a la toxicidad, que a la actividad específica antileishmaniasis
5. Por otro lado se ha propuesto también como mecanismo de acción la capacidad del Sb(V) de formar complejos con nucleótidos, interfiriendo en su metabolismo e inhibiendo la topoisomerasa del parásito. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que los nucleósidos y polinucleótidos presentan elevado número de funciones oxigenadas y

¹⁹ **Berman J.** Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684-703.

²⁰ **Chulay JD, Flechenstein L, Smith DH.** Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:69-72.

²¹ **Sáenz RE, Paz HM, Johnson CM, Narváez ER, De Vásquez AM.** Evaluación de efectividad y toxicidad del Pentostam® y Glucantime® en el tratamiento de leishmaniasis cutánea. *Rev Med Panamá* 1987;12: 148-64.



nitrogenadas convirtiéndose en ligandos potenciales de iones metálicos. A diferencia de lo observado en células de mamíferos, los protozoarios son incapaces de sintetizar purinas, por lo que estos parásitos utilizan mecanismos bioquímicos alternativos que tienen como punto de partida la translocación de purinas pre-formadas. Esta estrategia de una alta producción de purinas en la leishmaniasis puede contribuir también para la formación de complejos Sb(V)-purina, los cuales a su vez tendrían influencia negativa en toda la bioquímica del ADN. Estudios de la cinética de formación de complejos entre mezclas que contienen antimonio de potasio y derivados de la adenina comprueban esta teoría. Se ha constatado por técnicas de resonancia magnética (RMN) y dicroísmo circular (DC), la formación de complejos de Sb (con adenosina y adenosina monofosfato utilizando los residuos de ribosa). Este hecho presume la posibilidad de interacciones con otras biomoléculas que contengan ribosa tales como guanina, uracilo, citosina, hipoxantina, así como algunos dinucleótidos. Otra hipótesis habla al respecto de la formación de complejos entre Sb(V) y guanosina 5'-difosfato-D-manosa (5'-GDP) u otros glicoconjugados ricos en manosa, sintetizados por este parásito y ampliamente distribuidos sobre su superficie celular. A su vez, la formación de mono-aductos de bis-aductos entre Sb (V) e 5'-GDP manosa u otros glicoconjugados interfiere en la virulencia del parásito.¹

6. Otro probable mecanismo de acción de los compuestos metálicos es la inhibición de la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya actividad de importancia aumenta en los parásitos infecciosos. Tal inhibición provocaría a la vez un aumento del nivel de radicales superóxido y muerte del parásito.¹⁰

Farmacodinamia

La droga interfiere la bioenergética de los amastigotos de leishmania al inhibir la actividad glicolítica y la oxidación de los ácidos grasos a nivel de los glicosomas, acompañándose esto de una reducción neta en la generación de ATP y GTP. Se ha demostrado también experimentalmente la inhibición de enzimas específicas tales como la tripanotión reductasa, una enzima equivalente a la glutatión reductasa de los mamíferos. Otro mecanismo que además podría estar involucrado es la unión no específica del antimonial con los grupos sulfidrilos de las proteínas del amastigote. Cuando se administran



intralesionalmente es probablemente que interfieran con la presión osmótica del citoplasma celular del parásito²².

Los compuestos antimoniales encapsulados en liposomas han demostrado éxito en estudios experimentales. La droga es captada selectivamente por endocitosis y alcanza los fagolisosomas de los macrófagos donde residen los parásitos²³.

Un aspecto farmacocinético relevante deriva de la capacidad de los macrófagos para acumular, concentrar y retener el antimonial intracelularmente durante al menos 3 días; a pesar de su patrón de acelerada eliminación renal²⁴.

(C) Efectos secundarios

Los más frecuentes son tromboflebitis (si la administración es intravenosa), dolor local en el punto de la inyección intramuscular; fiebre, diarrea, náuseas, exantema, artromialgias, anorexia, letargia, cambios electrocardiográficos relacionados con la dosis y reversibles (inversión de la onda T y prolongación del intervalo QT antes de arritmias graves). También produce toxicidad renal y hepática.

(D) Precauciones

Está contraindicado en alteraciones hepáticas graves, renales o cardíacas. Se debe monitorizar durante el tratamiento la función hepática y renal y realizar controles electrocardiográficos. En el embarazo y lactancia, si es posible, se debe recurrir a alternativas.^{25, 26}

²² **Cunningham & Fairlamb**, 1995; Tracy & Webster, 1996.

²³ **Sharquie**, 1994

²⁴ **Roberts et al.**, 1995

²⁵ **Terapéutica antiparasitaria** Pilar Aparicio, Esperanza Rodríguez, Teresa Gárate, Ricardo Molina, Alicia Soto y Jorge Alvar a Centro Nacional de Medicina Tropical. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. memoria del Congreso Mexicano de Dermatología, 1970.

²⁶ **Meyerhoff A.** US Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniosis. *Clin Infect Dis* 1999;28:42-8.



III. OBJETIVOS

III.1. General

Evaluar el efecto genotóxico del Glucantime mediante la prueba de Mutación y Recombinación Somática en *Drosophila melanogaster*.

III.2. Específicos

- Determinar las concentraciones sub-tóxicas para evaluar el efecto genotóxico del glucantime.
- Evaluar el efecto genotóxico del Glucantime mediante el cruce Estándar del Test SMART.
- Evaluar el efecto genotóxico del Glucantime mediante el cruce de Alta Bioactivación del test SMART.

III.3. HIPOTESIS

H₀

La frecuencia de manchas producto de los tratamientos de Glucantime en *Drosophila melanogaster* es Menor que la frecuencia de manchas del control negativo dando un resultado negativo a la actividad genotóxica.

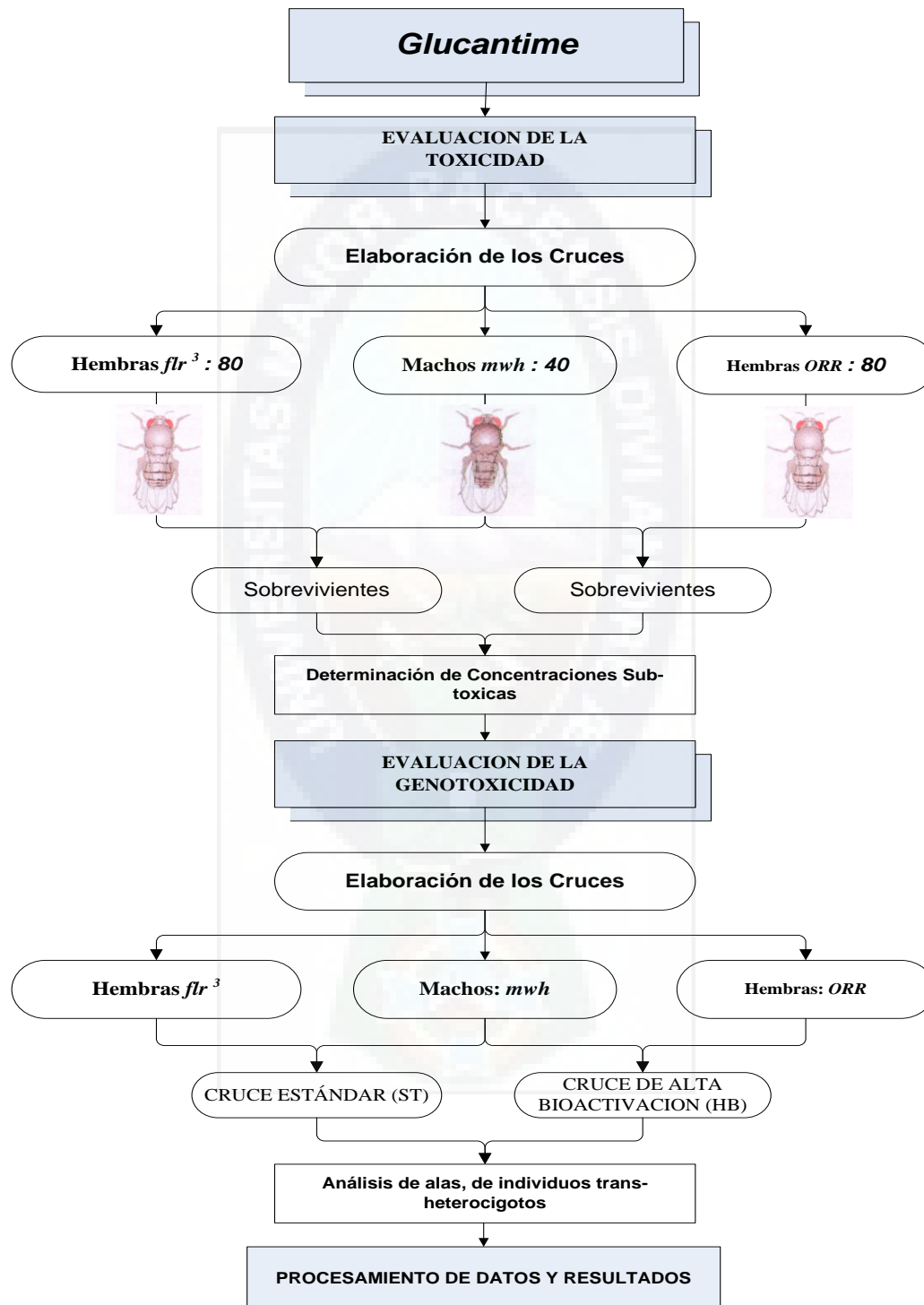
H₁

La frecuencia de manchas producto de los tratamientos de Glucantime en *Drosophila melanogaster* es Mayor que la frecuencia de manchas del control negativo dando un resultado positivo a la actividad genotóxica.



IV. METODOLOGIA

IV.1. Esquema Metodológico





A partir del fármaco empleado en el presente estudio (Glucantime®), se evaluó inicialmente la Toxicidad del mismo, para ello se realizaron cruces entre los linajes de *Drosophila melanogaster*: hembras *flr*³ (n=80), *ORR* (n=80) con machos *mwh* (n=40). De esta forma se determinaron inicialmente las concentraciones sub-tóxicas a partir del número de sobrevivientes obtenidos para cada uno de los cruces (Cruces ST y HB).

Posteriormente de los cruces realizados entre los linajes *flr*³ con machos *mwh* (Cruce Estándar), y hembras *ORR* con machos *mwh* (Cruce de Alta Bioactivación). La progenie de estos cruces se sometió a diferentes concentraciones del fármaco en estudio, para determinar el posible efecto Genotóxico por la presencia de manchas observadas en las alas de las moscas en estudio y determinados por el Test SMART.

IV.2. Población en estudio

IV.2.1. Muestras

IV.2.1.a Determinación de Concentraciones Sub-tóxicas

Para la determinación de las concentraciones sub-tóxicas, en cada ensayo realizado por duplicado se tomaron 200 larvas de Segundo *Instar* provenientes tanto de los cruces Estándar, como de los Alta Bioactivación.

IV.2.1.b Determinación de la actividad genotóxica del Glucantime

Para la determinación de la actividad genotóxica, en cada ensayo realizado por duplicado se analizaron las alas de 20 individuos adultos Trans-Heterocigotos y Heterocigotos descendientes de los cruces Estándar y Alta Bioactivación.



IV.2.2. Criterios de Inclusión

Dentro de los criterios de inclusión sólo se tomaron en cuenta individuos tratados con el Fármaco en estudio (Glucantime): Larvas de *Drosophila melanogaster* de Segundo *Instar* evaluados por triplicado tras 48 horas de exposición al fármaco para los cruces Estandar y Alta Bioactivación.

IV.2.3. Criterios de Exclusión

No fueron incluidas individuos en estadíos larvales inferiores a los del estudio (Huevos, ni larvas de Primer o Segundo *Instar*), así mismo no se incluyeron al estudio moscas no tratadas con Glucantime y que no cumplieron con el tiempo de 48 horas de exposición al fármaco.

IV.3. Ambiente De Trabajo

El estudio se realizó en el laboratorio de Genotoxicidad de la Unidad de Toxicidad del área de Farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) que se encuentra ubicado en la zona de Miraflores de la ciudad de La Paz.

El laboratorio cuenta con las siguientes áreas de trabajo:

- **Área 1:** Área de Cultivo y Mantenimiento.
- **Área 2:** Área de Ensayos de Genotoxicidad.
- **Área 3:** Actividades administrativas.

IV.4. Mantenimiento y Cultivo

Las cepas de *D. melanogaster* se cultivaron en botellas de cuello ancho (1/4 L) en cuyo fondo se ha depositado una capa de medio alimenticio de mantenimiento (*Para 12 frascos (500 mL):* Agar (3,668 g), Harina de maíz (65,500 g), Sacarosa (40,8 g), Levadura fresca *Sacharomyces cereviciae* (25,0 g), Nipazol (0,002 g), 2,3 mL de Solución ácida 10:1 (ácido ortofosfórico: ácido propiónico), 500 mL de Agua destilada).

Las botellas son cerradas con un tapón de goma-espuma que permite el intercambio de oxígeno interno y externo. Los frascos se mantienen en estufas reguladas a 25 ± 1 °C y con un 60% de humedad relativa (HR). Los medios alimenticios para esta especie deben contener una proporción suficiente de carbohidratos sobre los que se desarrollen bien las levaduras; ambos, carbohidratos y levaduras (éstas como fuente de proteínas) constituyen el alimento básico de las cepas. Además estos cultivos deben poseer una consistencia semilíquida blanda; para ello se utiliza agar-agar.



Para evitar contaminaciones por hongos o ácaros se añade a la papilla un inhibidor del crecimiento de estos organismos (Nipazol).

IV.4.1. Manejo e Identificación de Moscas

IV.4.1.a Eterificación

Para el manejo y observación de *Drosophila* es necesario anestesarlas. Para ello, se empapan con gotas de éter una torunda de algodón envuelto en gasa, el que se encuentra en el tapón de la botella que se usa como anestesiador. Se deja que el éter difunda y sature el frasco un minuto. Se invierte rápidamente el frasco y con la ayuda de un embudo que se coloca sobre la boca del eterificador. Se traspasa las moscas hacia el eterificador.

Si el medio de cultivo es demasiado blando, no deberá invertirse el frasco de cultivo, deberá colocarse la boca del eterificador encima del frasco. Una vez que las moscas en el anestesiador se suelten de la pared del frasco, dejarlas de 15 a 20 segundos y entonces pasarlas a la placa de recuento para su separación en base al sexo.

No es recomendable trabajar con muchas moscas de una vez en una placa. Las moscas pueden ser movidas en la placa usando el pincel fino. Si las moscas comienzan a despertar en la placa, deben ser reanestesiadas.

IV.4.1.b Identificación del Sexo en moscas

Para el sexaje se recomienda la observación de las moscas en un estereomicroscopio para una mejor observación de las características anatómicas. Se toman en cuenta varias diferencias morfológicas que permiten distinguir a machos de las hembras de *Drosophila*: El extremo del abdomen es alargado en la hembra y algo redondeado en el macho, la distribución de bandas oscuras en los segmentos abdominales permite distinguir a ambos sexos sin necesidad de usar microscopio. El abdomen de la hembra tiene 7 segmentos y el macho 5. Los machos poseen el llamado peine sexual en el primer par de patas.



Así mismo se tuvo cuidado de no utilizar la pigmentación como criterio único para distinguir los sexos, ya que en las moscas recién nacidas la pigmentación aún no se ha completado. Un macho recién nacido es tan descolorido como una hembra y puede confundirse.

IV.4.1.c Separación De Hembras Vírgenes

La separación de Hembras vírgenes es necesaria cuando se realiza los cruzamientos entre diferentes cepas de *Drosophila melanogaster*.

Las hembras no copulan sino hasta 6 horas después de haber emergido de la pupa. Por lo tanto, la forma más simple y segura, es descartar todas las moscas que han nacido en la botella de cultivo en la “morgue de moscas” destinada para este fin (Frasco con aceite). A partir de este momento se deben separar todas las hembras que eclosionen de las pupas hasta obtener el número esperado de individuos. Opcionalmente, pueden separarse las hembras vírgenes a las 8 horas, se observa nuevamente la botella de cultivo, se separan las hembras de los machos que han nacidos durante ese lapso de tiempo, todas ellas son vírgenes y pueden ser guardadas en frascos de cultivo con alimento.

IV.5. Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*

IV.5.1. Fármacos evaluados y Linajes de *Drosophila melanogaster*

IV.5.1.a Fármacos

El fármaco usado en este estudio fue el Antimonial pentavalente de primera elección para el tratamiento de la Leishmaniosis, **Glucantime®** (antimoniato de meglumina o antimoniato de N-metil-glucamina) [**Rhodia Pharma, S.P., Brasil**]. Todas las concentraciones requeridas (**10000, 15000, 20000, 30000 uM**) para el ensayo genotóxico fueron preparados por diluciones con agua destilada justo antes de su uso para evitar una posible inactivación de la acción del fármaco. Así mismo, se uso agua destilada como control Negativo. El control Positivo usado fue Mitomicina C®.



IV.5.1.b Linajes de *Drosophila melanogaster*

Tres linajes de *Drosophila melanogaster* fueron empleadas: *flr*, *mwh* y *ORR*²⁷.

- A. Linaje *flr*³ (*flr*³ /In (3LR) TM3, ri p^psepn 1(3) 89Aabx^{34e} & Bd⁵)
- B. Linaje *ORR* (*ORR/ORR*: *flr*³ /In (3LR) TM3, ri p^psepn 1(3) 89Aabx^{34e} & Bd⁵)
- C. Linaje *mwh* (*mwh/mwh*)

El linaje *ORR* posee los cromosomas 1 y 2 provenientes del linaje Oregon R (R), resistente al DDT conteniendo genes responsables por altos niveles constitutivos de enzimas de metabolización de tipo citocromo P(CYP)6A2²⁸ Este cruce aumenta el rendimiento del test SMART de alas en caso de agentes promutagénicos dependientes de activación vía citocromo P450.

Los linajes fueron mantenidos y cultivados a una temperatura constante de 25 ± 1 °C al 60 % de humedad relativa.

IV.5.2. Procedimiento Experimental

Un número de 80 hembras vírgenes del Linaje *flr*³ fueron cruzadas con 40 machos del linaje *mwh* llamado Cruce Estándar (ST), y 80 hembras vírgenes del linaje *ORR* cruzan con 40 machos del linaje *mwh* llamado Cruce de Alta Bioactivación (HB).

Huevos derivados de los cruces ST y HB, fueron recolectados en oscuridad después de 8 horas de cruce. En medio de ovoposición²⁹ [Para 12 frascos (500 mL): Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (250 g), Sacarosa (15,0 g), 20 mL de Agua destilada], tres días después (72 ± 4 Horas) las larvas trans-heterocigotas (*mwh/flr*³ y *mwh/ORR*) obtenidas de ambos cruces fueron lavadas con agua destilada (25 ± 1 °C) para eliminar la presencia de levaduras, separadas y trasladadas a frascos que contenían 1,5 g de Medio Instantáneo para *Drosophila* [Carolina Biological Supply Burlington, NC. U.S.A.] rehidratadas con 5 mL de cada una de las soluciones y concentraciones del fármaco a evaluar mencionadas anteriormente. El control negativo fue el solvente.

Las larvas se alimentaron de este medio vía oral (Tratamiento crónico) hasta llegar a su fase de pupación (aproximadamente 48 ± 4 Horas). Todos los experimentos

²⁷ Lindsley DL, Zimm GG. (Eds.), *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, 1992.

²⁸ (Lindsley & Zimm (1992; Graf & van Schaik, 1992).

²⁹ Graf U, Wrgler FE, Katz AJ, et. al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6: 153-188, 1984.



fueron realizados a 25 ± 1 °C y aproximadamente al 60% de HR. En cada frasco se colocaron 200 larvas de cada cruce respectivamente, a fin de realizar paralelamente el análisis de sobrevivencia y determinar el efecto tóxico. Las moscas adultas que emergieron fueron colectadas, cuantificadas y conservadas en etanol al 70% hasta el análisis de alas. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

IV.5.2.a Genotipo de las Larvas Testadas

Las larvas testadas, provenientes de ambos cruces (ST y HB) presentan dos configuraciones fenotípicas:

- A. Trans_heterocigotas ($mwh +/+ flr^3$) para los marcadores recesivos, que se expresan en las alas: pelos múltiples (mwh) y pelos con base ensanchada (flr^3).
- B. Heterocigotas para el cromosoma balanceador TM3 ($mwh +/TM3, Bd^S$), que contienen múltiples inversiones. Las moscas adultas portadoras de este genotipo se diferencian de las Trans-heterocigotas por presentar alas dentadas en sus extremos, determinados por el gen del pelo Bd^S .

IV.5.2.b Preparación y Análisis Microscópico de Alas

Después de la metamorfosis, y tras su clasificación en base al sexo, la superficie Dorsal y Ventral de las alas de las moscas conservadas en etanol al 70%, fueron removidas, montadas y fijadas con solución de faure [Goma arábica (30,0 g), Glicerol (20 mL), Hidrato de Cloral (50,0 g), Agua Destilada (50 mL)] y analizadas según la técnica descrita por *Graf et al*, 1984 bajo magnificación microscópica de 400 X, donde se observaron el número, tipo y tamaño de las manchas mutantes que indican la presencia de clones de células que se expresan en patrones de pelos malformados en las alas de las moscas. Los clones mutantes fueron clasificados dentro de tres tipos, contándose: (1) *Mancha Simple pequeña (MSP)*: cuando una o dos células están afectadas; (2) *Macha Simple Grande (MSG)*: cuando más de dos células están afectadas; 1 y 2 pueden ser del fenotipo mwh o flr y (3) *Mancha Gemela (MG)*: fenotipos mwh y flr juntos en una misma mancha.³⁰ Un total de 80 alas fueron examinadas en las concentraciones evaluadas.

IV.5.2.c Análisis Estadístico

³⁰ IDAOMAR, M., EL HAMSS, R., BAKKALI, F., MEZZOUG, N., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., MUÑOZ-SERRANO, A., LIEMANS, V. AND A., ALONSO-MORAGA. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2002, Volume 513, Issues 1-2. 61-68.



La determinación de la concentración subtóxica fue determinada de acuerdo al número de sobrevivientes para cada una de las concentraciones del fármaco evaluado, para este propósito se determinó el valor de la Dosis Letal Media (DL_{50}), mediante ANOVA

Para la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos, las frecuencias de manchas para las alas fueron analizadas de acuerdo al test Binomial condicional de *Kastenbaum – Bowman*, con un nivel de significancia ($\alpha = \beta$) del 5% (0,05), el cual indica: una respuesta positiva, negativa e inconclusiva, según las hipótesis planteadas.^{31, 32}



³¹ FREI, H. & WURGLER, F. *Mutat. Res*, **1988**, 203: 297-308.

³² *Kastenbaum, MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 9: 527-549, 1970.*

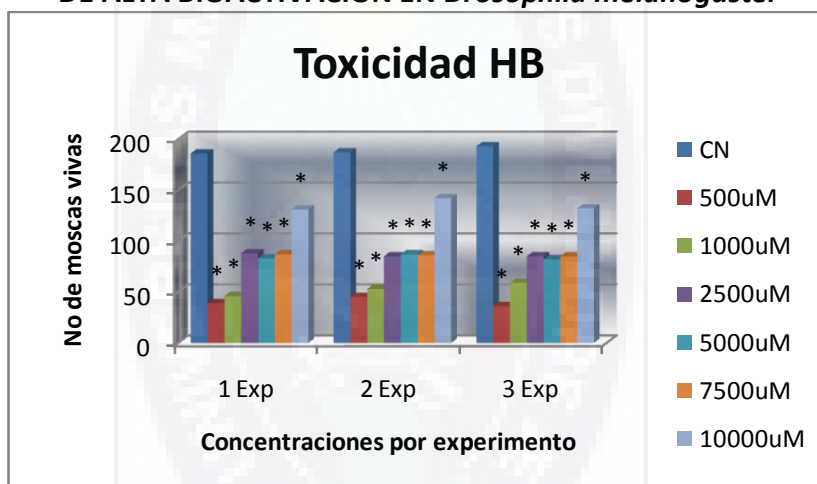


V. RESULTADOS

V.1. Determinación de las concentraciones Sub-Toxicas

La Toxicidad del Glucantime® en el cruce de ALTA BIOACTIVACION fue inicialmente evaluada a seis concentraciones (500, 1000, 2500, 5000, 7500 y 10000 uM), y tras la realización de los cruces entre los linajes: hembras *flr³* (n=80), *ORR* (n=80) con machos *mwh* (n=40) se determinó que la concentración sub-tóxica en la que el porcentaje de individuos con una sobrevivencia mayor al 60% se da a partir de la concentración de 10000 uM respecto al control Negativo (Ver Gráfica 1).

Gráfica 1. TOXICIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCANTIME EN EL CRUCE DE ALTA BIOACTIVACION EN *Drosophila melanogaster*



* $P < 0,05$: Estadísticamente significativo según ANOVA

Grafica que representa el numero de moscas vivas del cruce de alta bioactivacion por cada experimento de las diferentes concentraciones del glucantime. Resultando significativo ($P < 0,05$) en todas las concentraciones utilizadas, en un numero menor de sobrevivencia comparando con el control negativo que es el disolvente utilizado.

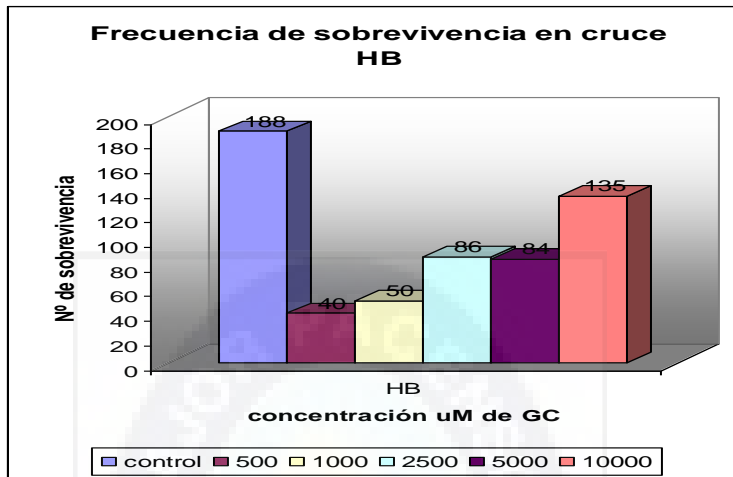
**NUMERO DE MOSCAS VIVAS POR EXPERIMENTO
CRUCE ALTA BIOACTIVACION**

ST	CN	500uM	1000uM	2500uM	5000uM	7500uM	10000uM
1 Exp	169	32	39	78	76	77	121
2 Exp	175	33	46	79	73	80	132
3 Exp	168	27	37	81	75	78	122

El número de moscas vivas por experimento no alcanzo al número necesario para la evaluación genotoxica.



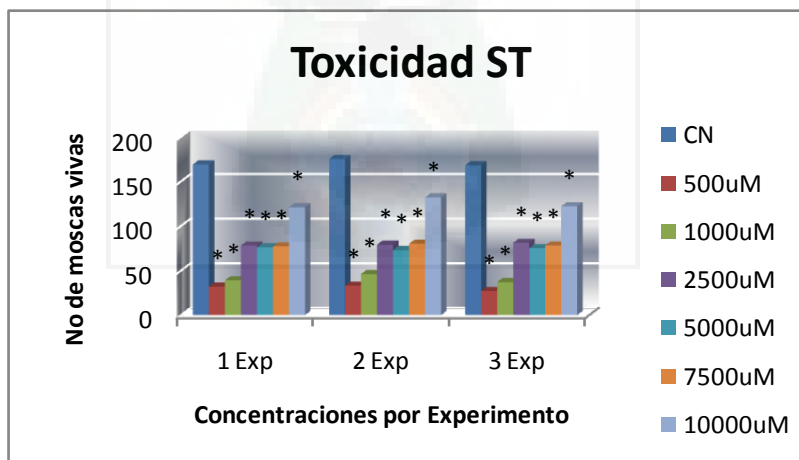
PROMEDIOS DE LAS MOSCAS VIVAS DEL CRUCE DE ALTA ACTIVACION



El promedio de moscas sobrevivientes del cruce de alta bioactivacion de las tres experiencias no fue el suficiente para la evaluación de la actividad genotóxica., observando una reducción significativa de *Drosophila melanogaster* comparando con el control

La Toxicidad del Glucantime® en el cruce STANDAR fue inicialmente evaluada a seis concentraciones (500, 1000, 2500, 5000, 7500 y 10000 uM), y tras la realización de los cruces entre los linajes: hembras *flr³* (n=80), *ORR* (n=80) con machos *mwh* (n=40) se determinó que la concentración sub-tóxica en la que el porcentaje de individuos con una sobrevivencia mayor al 60% se da a partir de la concentración de 10000 uM respecto al control Negativo (Ver Gráfica 2)

Gráfica 2. TOXICIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCANTIME EN EL CRUCE ESTANDAR EN *Drosophila melanogaster*



* P< 0,05 : Estadísticamente significativo según ANOVA



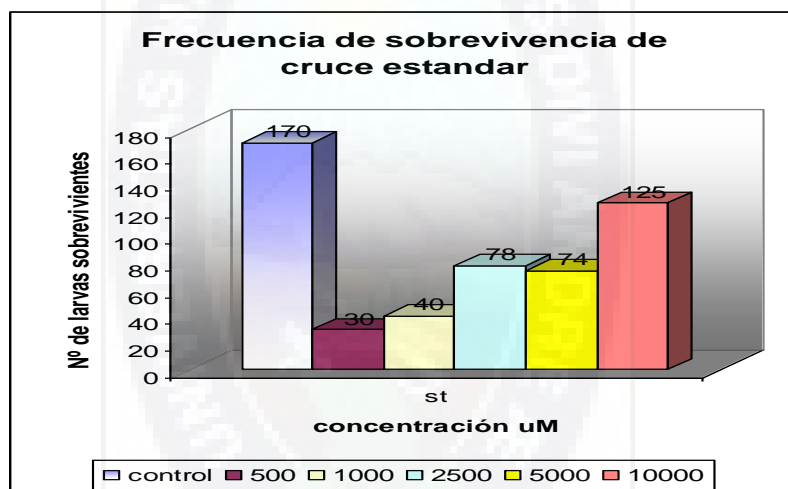
Grafica que representa el numero de moscas vivas del cruce estandar por cada experimento de las diferentes concentraciones del glucantime. Resultando significativo ($P < 0,05$) en todas las concentraciones utilizadas, en un numero menor de sobrevivencia comparando con el control negativo que es el disolvente utilizado.

**MOSCAS VIVAS POR EXPERIMENTO
CRUCE STANDAR**

	CN	500uM	1000uM	2500uM	5000uM	7500uM	10000uM
1 Exp	186	39	46	88	83	87	131
2 Exp	187	45	53	85	87	86	142
3 Exp	193	36	59	85	82	85	132

El número de moscas vivas por experimento no alcanzaba al porcentaje de moscas necesarias para la evaluación genotóxica.

PROMEDIOS DE LAS MOSCAS VIVAS DEL CRUCE STANDAR



El promedio de moscas sobrevivientes del cruce estándar de las tres experiencias no fue el suficiente para la evaluación de la actividad genotóxica, observando una reducción significativa de *Drosophila melanogaster* comparando con el control

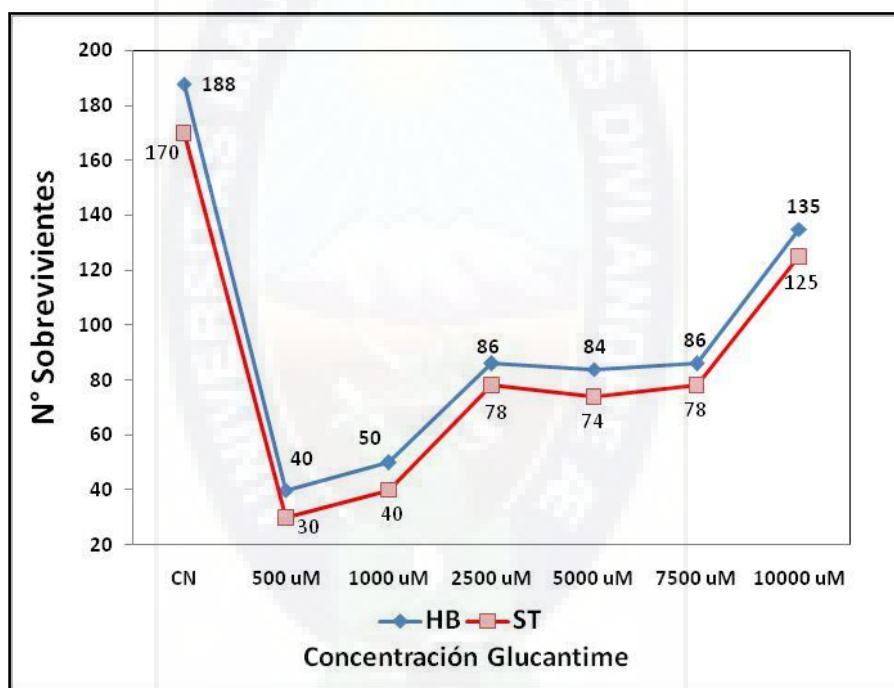
Se continuó con la búsqueda de las concentraciones de glucantime hasta que se mantenga un número de moscas vivas que alcance al porcentaje requerido por la técnica SMART para la evaluación de la actividad genotóxica.

Los resultados obtenidos en las primeras experiencias (**Ver Gráfica 1**) permitieron ampliar el rango de concentraciones evaluadas (10000, 15000, 20000, y 30000 uM), observando que el número de individuos sobrevivientes respecto al control Negativo sobrepasa 60% en todos los casos (**Ver Gráfica 2**).



La progenie de los cruces evaluados a estas concentraciones fueron utilizadas para la determinación del efecto Genotóxico mediante la presencia o no de manchas en las alas de las moscas en estudio y determinados por el Test SMART.

Gráfica 3. Curva Dosis - Efecto del Glucantime[®] (500, 1000, 2500, 5000, 7500 y 10000 uM) sobre el número de individuos sobrevivientes de *Drosophila melanogaster* en Cruces Estandar y Alta Bioactivación



La curva de respuesta muestra que el promedio de la sobrevivencia de moscas a esas concentraciones utilizadas tiene un comportamiento decreciente según aumenta la concentración del fármaco en ambos cruces y el número de moscas vivas es mínima comparando con el control negativo, excepto en la mayor concentración utilizada en esas experiencias.

Tabla de porcentaje de sobrevivencia de moscas (200 larvas)

	CN	500uM	1000uM	2500uM	5000uM	7500uM	10000uM
ST	85%	15%	20%	39%	37%	39%	62,5%
HB	94%	20%	25%	43%	42%	43%	67,5%

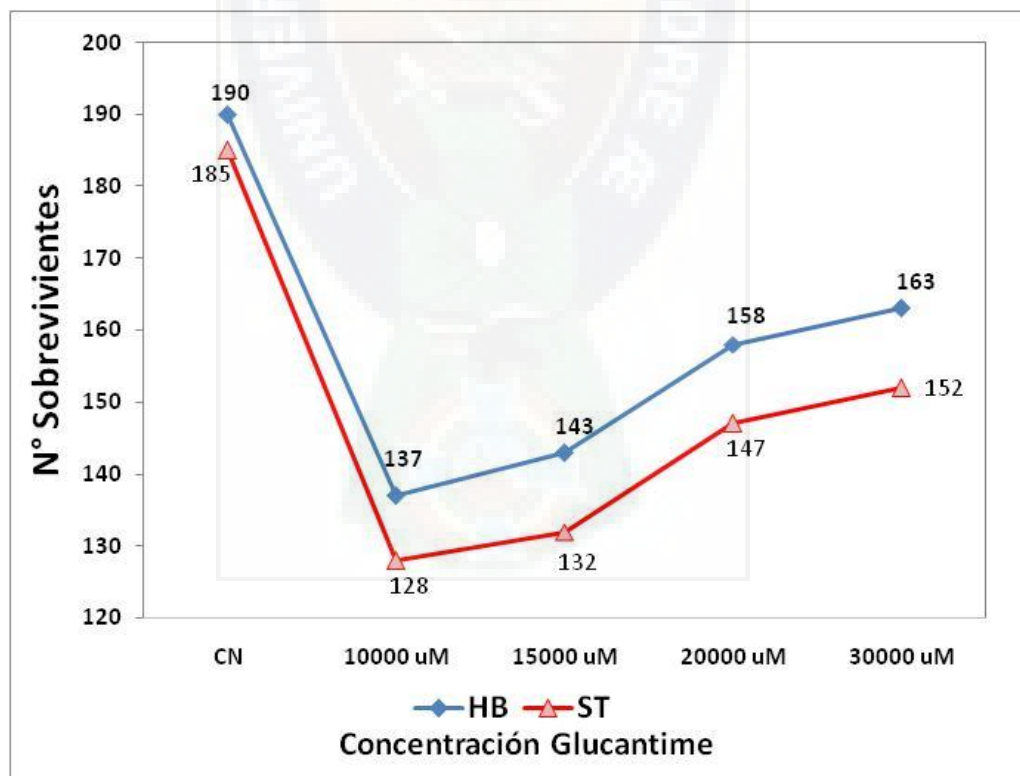


Esta tabla muestra que en las concentraciones utilizadas el porcentaje de sobrevivencia es mínima e insuficiente comparando con el control negativo y no alcanza al porcentaje requerido por la técnica SMART para continuar el estudio genotóxico del fármaco.

Los resultados obtenidos en las primeras experiencias (Ver Gráfica 3) permitieron ampliar el rango de concentraciones evaluadas (10000, 15000, 20000, y 30000 uM), observando que el número de individuos sobrevivientes respecto al control Negativo sobrepasa 60% en todos los casos (Ver Gráfica 4).

La progenie de los cruces evaluados a estas concentraciones fueron utilizadas para la determinación del efecto Genotóxico mediante la presencia o no de manchas en las alas de las moscas en estudio y determinados por el Test SMART.

Gráfica 4. Curva Dosis - Efecto del Glucantime® (10000, 15000, 20000, y 30000 uM) sobre el número de individuos sobrevivientes de *Drosophila melanogaster* en Cruces Estándar y Alta Bioactivación



La curva de respuesta muestra que el promedio de las moscas vivas de las experiencias donde se utilizaron dosis mayores a las anteriores tiene un comportamiento creciente de sobrevivencia según aumenta la concentración del fármaco en ambos cruces y el número de moscas vivas es similar al control negativo.



Tabla de porcentaje de sobrevivencia de moscas (200 larvas)

	CN	10000uM	15000uM	20000uM	30000uM
ST	92,5%	64%	66%	73,5%	76%
HB	95%	68,5%	71,5%	79%	81,5%

Esta tabla muestra que en las concentraciones utilizadas el porcentaje de sobrevivencia es mayor a las concentraciones anteriores y alcanza al requerido por la técnica SMART para continuar el estudio genotóxico del fármaco.

V.2. Determinación de la actividad genotóxica del Glucantime – Cruces Alta Bioactivación y Estandar

V.2.1. Cruce Estándar (ST), progenie Transheterocigotas

Después de la conservación, las alas de las moscas, fueron montadas sobre un portaobjetos y fijadas con solución de faure, y el análisis bajo magnificación microscópica de 400 X, reveló que el Total de manchas encontradas en las concentraciones donde existió mayor cantidad de Manchas (TM) (10000 uM, Total Manchas = 13; manchas mwh = 11 y 15000 uM total de manchas = 13; manchas mwh = 10) No es significativo en comparación al Control Positivo (Mitomicina C) (Total Manchas = 77; manchas mwh = 68).

Por otro lado, tomando en cuenta estas concentraciones: 10000 uM los clones mutantes fueron clasificados dentro en tres tipos, contándose: (1) Mancha Simple pequeña (MSP = 11): cuando una o dos células están afectadas; (2) Mancha Simple Grande (MSG = 2): cuando más de dos células están afectadas; 1 y 2 pueden ser del fenotipo *mwh* o *flr* y (3) Mancha Gemela (MG = 0): en 15000 uM (1) Mancha Simple pequeña (MSP = 9); (2) Mancha Simple Grande (MSG = 4); (3) Mancha Gemela (MG = 0): fenotipos *mwh* y *flr* juntos en una misma mancha. Un total de 80 alas fueron examinadas.



Tabla 1. Ensayo de manchas en alas en *Drosophila melanogaster* obtenidos del Glucantime[®] (10000, 15000, 20000, y 30000 μ M) en el Ensayo SMART – Cruce Estándar

Dosis	N	MSP	MSG	MG	TM	Total manchas mwh*
Control negativo	40	22	18	0	40	40
10,000 μ M	20	11	2	0	13	11
15,000 μ M	20	9	4	0	13	10
20,000 μ M	20	4	2	0	6	4
30,000 μ M	20	2	5	0	7	5
MMC	20	40	19	18	77	68

*= Calculado por el paquete estadístico Kastenbaum & Bowman

CN: Control Negativo

MMC: Control Positivo (Mitomicina C)



Tabla 2. Análisis Estadístico de la actividad genotóxica del Glucantime en Cruce Estandar (ST)														
		Manchas por mosca (N° manchas) diagnóstico estadístico ^a												
Genotipos y Concentración	N° moscas	MSP			MSG			MG			TM		Total Manchas	
(ug/mL)	(N)	(1-2 céls) ^b			(>2 céls) ^b								mwh ^c	
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 2		(<i>n</i>)	
<i>mwh/flr</i> ³														
Contr. Neg.	40	0,55	(22)		0,45	(18)		0,00	(00)		1,00	(40)		40
10,000 uM	20	0,55	(11)	-	0,10	(02)	-	0,00	(00)	i	0,65	(13)	-	11
15,000 uM	20	0,45	(09)	-	0,20	(04)	-	0,00	(00)	i	0,65	(13)	-	10
20,000 uM	20	0,20	(04)	-	0,10	(02)	-	0,00	(00)	i	0,30	(06)	-	4
30,000 uM	20	0,10	(02)	-	0,25	(05)	-	0,00	(00)	i	0,35	(07)	-	5
MMC	20	2,00	(40)	+	0,95	(19)	+	0,90	(18)	+	3,85	(77)	+	68

^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.



V.2.2. Cruce Alta Bioactivación (HB), progenie Transheterocigotas

Después de la conservación, las alas de las moscas, fueron montadas sobre un portaobjetos y fijadas con solución de faure, y el análisis bajo magnificación microscópica de 400 X, reveló que el Total de manchas encontradas en la concentración donde existió mayor cantidad de Manchas **(TM) (10000 uM, Total Manchas = 16; manchas mwh = 11)** No es significativo en comparación al Control Positivo (Mitomicina C) (Total Manchas = 86; **manchas mwh = 68**).

Por otro lado, tomando en cuenta esta concentración (10000 uM) los clones mutantes fueron clasificados dentro en tres tipos, contándose: **(1)** Mancha Simple pequeña (**MSP = 13**): cuando una o dos células están afectadas; **(2)** Mancha Simple Grande (**MSG = 3**): cuando más de dos células están afectadas; 1 y 2 pueden ser del fenotipo *mwh* o *flr* y **(3)** Mancha Gemela (**MG = 0**): fenotipos *mwh* y *flr* juntos en una misma mancha. Un total de 80 alas fueron examinadas.

Tabla 3. Datos del Ensayo de manchas en alas en *Drosophila melanogaster* obtenidos del Glucantime[®] (10000, 15000, 20000, y 30000 uM) en el Ensayo SMART – Cruce Alta Bioactivación

Dosis	N	MSP	MSG	MG	TM	Total manchas mwh*
CN	40	23	16	0	39	39
10,000 uM	20	13	3	0	16	11
15,000 uM	20	6	0	0	6	4
20,000 uM	20	2	0	1	3	2
30,000 uM	20	4	3	0	7	5
MMC	20	43	25	18	86	68

*= Calculado por el paquete estadístico Kastenbaum & Bowman

CN: Control Negativo

MMC: Control Positivo (Mitomicina C)



Tabla 4. Análisis Estadístico de la actividad genotóxica del Glucantime en Cruce Alta Bioactivación (HB)														
		Manchas por mosca (N° manchas) diagnóstico estadístico ^a												
Genotipos y Concentración	N° moscas	MSP			MSG			MG			TM			Total Manchas
(ug/mL)	(N)	(1-2 céls) ^b			(>2 céls) ^b									mwh ^c
		<i>m</i> = 2			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 2			(<i>n</i>)
<i>mwh/flr</i> ³														
CN	40	0,58	(23)		0,40	(16)		0,00	(00)		0,98	(39)		39
10,000 uM	20	0,65	(13)	i	0,15	(03)	-	0,00	(00)	i	0,80	(16)	-	11
15,000 uM	20	0,30	(06)	-	0,00	(00)	-	0,00	(00)	i	0,30	(06)	-	4
20,000 uM	20	0,10	(02)	-	0,00	(00)	-	0,05	(01)	i	0,15	(03)	-	2
30,000 uM	20	0,20	(04)	-	0,15	(03)	-	0,00	(00)	i	0,35	(07)	-	5
MMC	20	2,15	(43)	+	1,25	(25)	+	0,90	(18)	+	4,30	(86)	+	68

^aDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.



VI. DISCUSION

Ante las escasas opciones terapéuticas que se ofrecen a los pacientes con leishmaniosis en cualquiera de sus formas clínicas, las drogas de primera elección siguen siendo los antimoniales pentavalentes, a pesar de su toxicidad (cardiopatías, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, etc.) y elevado costo, pero se desconoce si el continuo uso de este medicamento tenga algún efecto sobre el material genético.

Para lo cual primero se trabajo buscando concentraciones sub-toxicas exponiendo al fármaco a larvas de Segundo instar en un tratamiento crónico por 48 horas, tomando en cuenta sólo las concentraciones en las que el numero de moscas eclosionadas era mayor al 60%. (el porcentaje por triplicado)

En la grafica 1 de concentraciones subtoxicas se observa que a menor concentración de glucantime era menor el número de moscas y por tanto el porcentaje de sobrevivencia comparando con el control negativo era menor para ambos cruces e insuficiente para la evaluación genotoxica según es requerido por la técnica SMART.

Observando las graficas 2 y 3 que representan el número de moscas vivas por experimentación tanto en el cruce estándar como en el cruce de alta biactivacion respectivamente es significativa la menor viabilidad de las moscas (determinada por ANOVA $p < 0,05$) según la concentración utilizada comparando con el control negativo que solo tenia el disolvente utilizado. Observando también la menor frecuencia de sobrevivencia de ambos cruces resultando significativa y tambien el porcentaje menor a 60 %.

Se vio que el recuento de moscas era mayor al número encontrado en los anteriores experimentos donde la cantidad era mínima y no llegaba al porcentaje requerido por la técnica.

Por lo tanto el glucantime presenta toxicidad a dosis bajas, otorgando resultados estadísticos significantes.

Lo que demostraría que según el porcentaje de sobrevivientes en las concentraciones mas bajas del fármaco es menor debido a una posible acción que tiene el glucantime de inhibir a la enzima súperoxido dismutasa (SOD), aumentando los niveles de radicales libres y actuando de manera toxica en el huésped. Lo que nos llevaría a una cantidad menor de sobrevivencia de moscas siendo este significativo comparando con el control negativo.

Podría deberse a que en las concentraciones mas bajas el fármaco es absorbido en su totalidad por la larva, lo cual lleva a un efecto farmacológico mayor respecto a la de concentraciones altas.



En la grafica 4 se observa las concentraciones altas, tomando un rango que va desde 10.000 a 30,000 uM, donde se observa que el promedio de moscas sobrevivientes entra en el porcentaje de aceptación para el ensayo de toxicidad de la técnica SMART.

Y comparando la frecuencia de sobrevivencia, el porcentaje y el numero de moscas vivas que también es mayor al del experimento anterior se toma la decisión de trabajar con las estas concentraciones que tienen un porcentaje de sobrevivencia mayor al 60%.

Una posible explicación al número de sobrevivientes podría ser una saturación del fármaco impidiendo la acción de este y al no poder ejercer el efecto se refleja en una mayor sobrevivencia de moscas eclosionadas.

La tabla N°1 muestra el numero de manchas en el marcador transheterocigoto (*mwh/flr³*) del cruce estándar, la frecuencia de MT (manchas totales) por mosca en el cruce estándar fue de 1,00 y la frecuencia de MT por mosca en el cruce de alta bioactivacion es de 0,98 de la descendencia.

En cuanto al análisis del tipo de mancha MSP (mancha simple pequeña) MSG (mancha simple grande) y MG (mancha gemela) de las diferentes concentraciones del fármaco, de control negativo (diluyente) y el control positivo (mitomicina C) en las tablas N°1 y N° 2 respectivamente.

El numero de MSP y MSG en toda descendencia trans de los cruces de las moscas expuestas a las diferentes concentraciones de glucantime en el cruce estándar son en menor número refiriéndose al control negativo y existiendo una diferencia significativa con respecto a control positivo.

Presentándose similar resultados en la descendencia trans de los cruces de las moscas expuestas a las mismas concentraciones del mencionado fármaco en el cruce de alta bioactivacion.

En el cruce ST no se observo la presencia de MG pero en el cruce de HB se observo una célula de esta característica con una frecuencia de 0,05 que es no significativa. Al no presentar o presentar el valor mínimo de mancha gemela en la

Progenie transheterocigoto no se hace necesario la lectura de la descendencia heterocigoto (*mwh/TM³*)

La presencia de mancha simple pequeña y la mancha simple grande ambas expresan el marcador genético *Flr³* o *mwh* e indican la ocurrencia de mutación puntual, deleción, no disyunción o recombinación entre el gen *Flr³* y *mwh*.



En cambio la presencia de mancha gemela expresa ambos marcadores genéticos (Flr^3 y mwh) ofrece la información de que aconteció un evento recombinogénico entre el gen Flr^3 y el centrómero ocasionado por el agente evaluado, en este ensayo es mínima la presencia como ya fue mencionado.

Pero lo que se puede observar es la presencia de las manchas simples pequeñas y grandes no en una frecuencia mayor a la del control negativo como en el caso del cruce estándar lo que indica como resultado negativo en el total de manchas.

En el cruce de alta bioactivación observamos un resultado no conclusivo en la presencia de mancha simple pequeña para la concentración de 10,000 μ M la cual no representa una mayor relevancia en el total de manchas que otorga un resultado negativo.

Observándose también en los totales de manchas que a mayor concentración era evidente el menor número de manchas, similar resultado a los obtenidos en las experiencias de toxicidad.

Se podría pensar que existe una relación estrecha entre los resultados de toxicidad (número de sobrevivencia) y los de genotoxicidad (número de manchas).

Una probable respuesta a los resultados obtenidos en los ensayos de experimentación en los cuales era marcada la diferencia del número sea de manchas o sobrevivencia según la concentración, se debería a que el fármaco no produce su efecto en su totalidad, sabiendo que a menor concentración su acción es tóxica debido a la rápida absorción del fármaco, y cuando es mayor la concentración podría existir una saturación lo que impediría el efecto tóxico y probablemente genotóxico.



VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

I. CONCLUSIONES

- Las concentraciones sub-toxicas del Glucantime empleados son 10000 uM, 15000 uM, 20000 uM, 30000 uM.
- Ninguna concentración utilizada demostró poseer una actividad genotóxica directa en la prueba de SMART.
- Las concentraciones evaluadas de Glucantime mostraron que no producen daño a nivel del material genético, detectable por el Cruce Estándar del test SMART.
- Las concentraciones evaluadas de Glucantime, mostraron que no producen daño a nivel del material genético, detectable por el cruce de Alta Bioactivación del test SMART.

II. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la investigación del Glucantime, mediante otros bioensayos.
2. Realizar un estudio genotoxicológico del Glucantime, a concentraciones menores a las utilizadas, con otros ensayos.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aparicio P, et al. Terapéutica antiparasitaria Enferm Infecc Microbiol Clin 2003.
- Berman J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997.
- **Chulay JD, Flechenstein L, Smith DH.** Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988.
- Cunningham & Fairlamb, 1995; Tracy & Webster, 1996.
- **FREI, H. & WURGLER, F.** *Mutat. Res*, **1988**.
- Frolich & Wurgler, 1989; Saner et al., 1996
- Graf et al.; 1984
- Graf U, Wurgler FE, Katz AJ, et. al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen, 1984.
- Greig E.D.N., 1917
- **IDAOMAR, M., EL HAMSS, R., BAKKALI, F., MEZZOUG, N., ZHIRI, A, BAUDOUX, D., MUÑOZ-SERRANO, A., LIEMANS, V. AND A., ALONSO-MORAGA.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2002.
- Kastenbaum, MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res, 1970.
- Lindsley DL, Zimm GG. (Eds.), The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, 1992.
- Liposomal amphotericin B, for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 1999.
- Meyerhoff A. US Food and Drug Administration approval of AmBisome
- Revista Talleres. Publicación Nº6. Noviembre, 1999
- Roberts et al., 1995.
- **Sáenz RE, Paz HM, Johnson CM, Narváez ER, De Vásquez AM.** Evaluación de efectividad y toxicidad del Pentostam® y Glucantime® en el tratamiento de leishmaniasis cutánea. Rev Med Panamá 1987.
- Sharquie, 1994.
- Terapéutica antiparasitaria Pilar Aparicio, Esperanza Rodríguez, Teresa Gárateb, Ricardo Molinab, Alicia Sotoa y Jorge Alvaraa Centro Nacional de Medicina Tropical. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. memoria del Congreso Mexicano de Dermatología, 1970.
- **WHO.** WHO expert committee on the control of the leishmaniasis. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series No. 793. Geneva: WHO; 1990.

ANEXOS

FOTOGRAFIAS

Reactivos utilizados para la preparación de los medios de Cultivo de
Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*



Preparación del Medio de cultivo de Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*



Preparación del Medio de cultivo de Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*



Preparación del Medio de cultivo de Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*: Adición de la Solución Ácida



**Preparación del Medio de cultivo de Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*:
Preparación de los Frascos de Cultivo**



**Preparación del Medio de cultivo de Mantenimiento para *Drosophila melanogaster*:
Preparación de los Frascos de Cultivo antes de la experimentación**





Medio de Cultivo "Carolina" para *Drosophila melanogaster*



Materiales y Reactivos utilizados para los cruces de experimentación para *Drosophila melanogaster*



Preparación del material para los cruces de experimentación para *Drosophila melanogaster*



Material usado para el Recuento de Larvas de *Drosophila melanogaster*



Fascos empleados para la recolección de larvas para el cruce HB durante los ensayos de Genotoxicidad



Fascos empleados para la recolección de larvas para el cruce ST durante los ensayos de Genotoxicidad



Preparación de Diluciones del Fármaco Empleado para Ensayos de Genotoxicidad



Fármaco empleado en los ensayos de Genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*:
Glucantime®



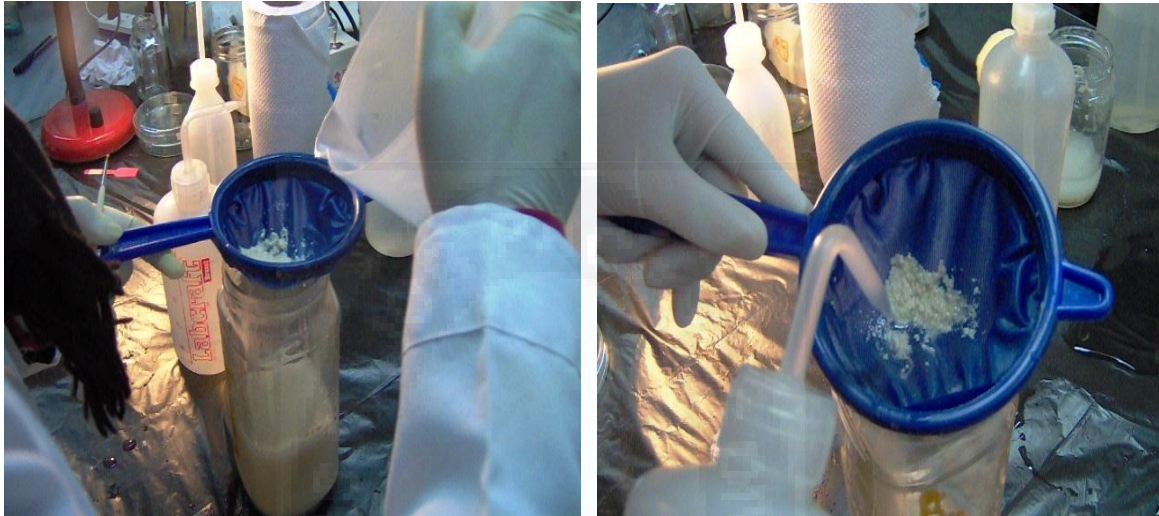
Preparación de Materiales a emplearse en los ensayos de Genotoxicidad



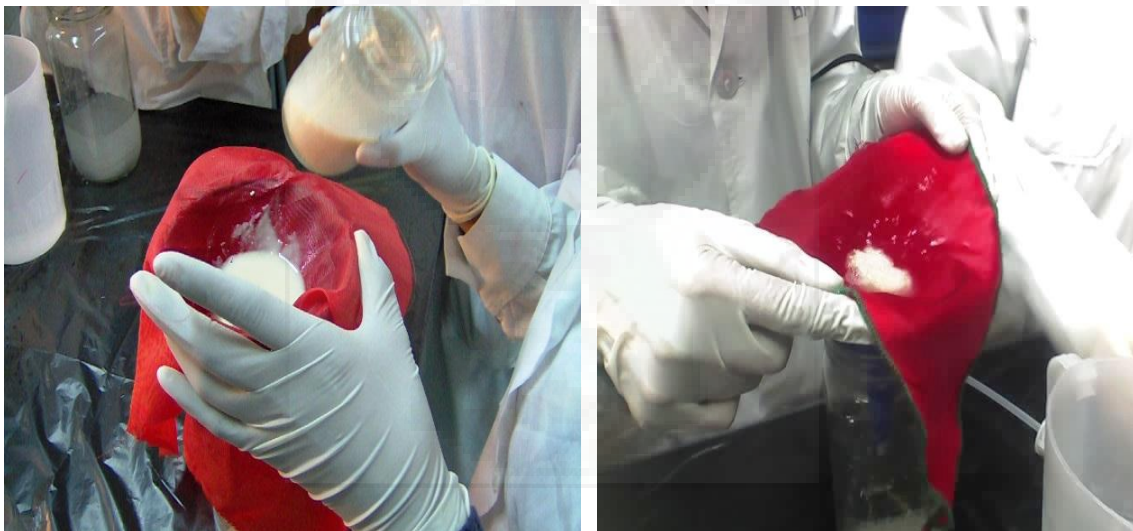
Preparación de Materiales a emplearse en los ensayos de Genotoxicidad



"Lavado de Larvas" para el cruce HB durante los ensayos de Genotoxicidad



"Lavado de Larvas" para el cruce ST durante los ensayos de Genotoxicidad



Recuento de Larvas para los ensayos de Genotoxicidad



Desarrollo de los Linajes de *Drosophila melanogaster* a 25°C y 60% HR



Larvas de Tercer Instar obtenidas tras la realización de los ensayos de Genotoxicidad



Material utilizado para la Eterificación de Moscas de *Drosophila melanogaster*



Proceso de Eterificación de Moscas de *Drosophila melanogaster*

