



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Evaluación del potencial genotóxico de Treda en células somáticas de Drosophila melanogaster.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA JULIA ESPINOZA CAMACHO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MÉXICO, D. F. 2007.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

División de Estudios Profesionales


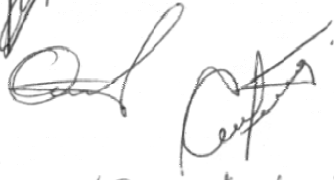



**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:  
Evaluación del potencial genotóxico de Treda en células somáticas de Drosophila  
melanogaster

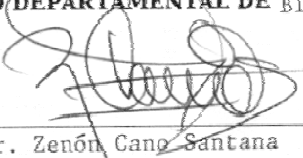
realizado por María Julia Espinoza Camacho

con número de cuenta 402029090 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario	Dra. Patricia Ramos Morales	
Propietario	Dr. Rafael Camacho Carranza	
Propietario	M. en C. Adriana Muñoz Hernández	
Suplente	Biól. Rodolfo Omar Arellano Aguilar	
Suplente	Biól. José Jesús Heraclio Herrera Bazán	

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 11 de diciembre del 2006  
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA FACULTAD DE CIENCIAS

  
Dr. Zenón Cano Santana



1. Datos del alumno

Espinoza

Camacho

María Julia

57 78 78 53

Universidad Nacional Autónoma de Mexico

Facultad de Ciencias

Biología

402029090

2. Datos del tutor

Doctora

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos de sinodal 1

Doctor

Rafael

Camacho

Carranza

4. Datos del sinodal 2

M en C

Adriana

Muñoz

Hernández

5. Datos de sinodal 3

Biól

José Jesús Heraclio

Herrera

Bazán

6. Datos de sinodal 4

Biól

Rodolfo Omar

Arellano

Agular

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del potencial genotóxico de Treda en células somáticas de  
*Drosophila melanogaster*

70pp

2007

## **LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ ESTA INVESTIGACIÓN**

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM.

El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de ciencias, UNAM.

## **LOS DATOS DE ESTA TESIS FUERON PARCIALMENTE PRESENTADOS EN EL:**

**Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética, Edo. de México. Octubre, 2004.** "Determinación del Posible Efecto Mutagénico de Treda en *Drosophila melanogaster*." Espinoza-Camacho J, Hernández-Bernal B y Ramos-Morales P.

## **APOYOS**

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), proyecto No EN206803, DGAPA, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Patricia Ramos Morales*, por su asesoría en la elaboración de esta Tesis, sus comentarios y preguntas adecuadas fueron determinantes en la continuación de mi camino académico.

A los sinodales: *Dr. Rafael Camacho Carranza, M. en C. Adriana Muñoz Hernández, Biól. Rodolfo Omar Arrellado Aguilar y Biól. José Jesús Heraclio Herrera Bazán*, por sus excelentes observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis.

A mis profesores *Biól. Blanca Hernández y Biól. Hugo Rivas*, por su paciencia y apoyo técnico para el avance de esta tesis, asimismo por su ayuda y orientación a mi formación académica.

A la *M. en C. María de Jesús Islas Guzmán*, por compartir conmigo su experiencia académica, profesional y personal de manera incondicional.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque juntos hemos compartido experiencias enriquecedoras para nuestro futuro.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, donde he realizado un objetivo con ayuda del Programa Nacional de Becas-UNAM (PRONABES), durante la Licenciatura en Biología, generación 2002.

A la Facultad de Ciencias, UNAM, por recibirme para realizar mi preparación como Bióloga.

## DEDICATORIAS

*A mi FAMILIA, con amor*

**Padre y Madre:** *Por su esfuerzo para brindarme apoyo incondicional en todo momento.*

**Hermanos todos:**

**Seymur:** *El estímulo de un buen maestro, puede cambiar la vida de un buen discípulo.*

**Dolores Guadalupe, Jael, Ana, Miguel:** *Juntos hemos aprendimos que, si apuntamos hacia las estrellas, podemos alcanzar alguna.*

A Jonatan Mendoza Gutiérrez: *Por mostrarme que, nuestro tesoro más valioso es el placer de las cosas cotidianas, con amor.*

*Ser polvo de estrellas es la tragedia del Homo sapiens sapiens.*



## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1 Toxicología.....	10
Metabolismo y biotransformación.....	11
1.2 Antecedentes de Treda.....	14
Treda.....	15
Caolín.....	17
Pectina.....	18
Neomicina.....	18
Farmacocinética y farmacodinámica.....	19
Mecanismo de acción y efecto nocivos.....	20
Efectos adversos.....	21
Genotoxicidad de neomicina.....	22
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	22
Actividad enzimática en <i>D. melanogaster</i> .....	26
1.4 Prueba de mutación somática y recombinación mitótica (SMART).....	27
Índice de sobrevivencia como indicador de daño genotóxico.....	31
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>V. METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
5.1 Compuesto.....	35
5.2 Obtención de las moscas.....	35
5.3 Diseño experimental.....	36
5.4 Determinación del índice de sobrevivencia.....	36
5.5 Evaluación de la inducción de recombinación mitótica y mutación somática.....	38
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
6.1 Determinación de la toxicidad de Treda.....	40
6.2 Inducción de genotoxicidad.....	40

<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>IX. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el potencial genotóxico del medicamento antidiarreico Treda<sup>®</sup>, mediante la Prueba de mutación somática y recombinación mitótica, en ala de *D. melanogaster*. Treda<sup>®</sup> fue administrado a larvas de 72 ± 4 horas mediante alimentación, en las concentraciones de 25, 22, 19, 16, 13, 10 y 7 ppm, las cuales fueron preparadas mediante diluciones sucesivas, a partir de la mayor concentración probada. Como testigo negativo y disolvente se usó agua destilada. Las larvas tratadas fueron tipo Canton-S (CS) y derivadas de la cruce entre ♀♀ *flr<sup>3</sup> / TM3, Bd<sup>Ser</sup>* x ♂♂ *mwh e / mwh e*, las cuales son: libres de balanceador (+ *flr<sup>3</sup> / + mwh e*) y portadoras de balanceador (*TM3, Bd<sup>Ser</sup> / + mwh e*).

El tratamiento no modificó el índice de sobrevivencia (IS) en las moscas CS ni en las libres de balanceador ( $p > 0.05$ ), pero aumentó el IS de las moscas portadoras de balanceador ( $p < 0.05$ ). En moscas libres de balanceador tratadas con Treda<sup>®</sup> se obtuvieron resultados positivos en la frecuencia de manchas totales a partir de la concentración de 13 ppm, manchas chicas a partir de la concentración 16 ppm y manchas grandes en las concentraciones de 10, 19 y 25 ppm. En las moscas portadoras del balanceador, el tratamiento sólo incrementó la frecuencia de manchas chicas en la concentración de 16 ppm. Al obtener las frecuencias corregidas de manchas totales, de ambos tipos de moscas, se encontró que en moscas portadoras de balanceador las frecuencias fueron menores al testigo en las concentraciones de 7, 10 y 13 ppm; el efecto encontrado en las moscas libres de inversiones implica una gran contribución de la recombinación en el efecto genotóxico de Treda<sup>®</sup>. En ambos tipos de moscas se obtuvo una mayor proporción de manchas chicas, pero en las moscas libres de balanceador se observó una proporción mayor de manchas grandes. La distribución de manchas por mosca, en las moscas tratadas libres y portadoras de balanceador no cambió ( $p > 0.05$ ). De estos resultados se concluye que aunque en las moscas portadoras del cromosoma balanceador el tratamiento favorece el desarrollo de las moscas expuestas, Treda<sup>®</sup> induce mutación y recombinación somática en moscas libres del cromosoma balanceador y mutación somática en moscas portadoras del cromosoma balanceador.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Toxicología

El siglo XX se caracteriza por un avance científico considerable en el que el descubrimiento de sustancias químicas para el tratamiento o prevención de enfermedades ha marcado el inicio de la farmacología como ciencia. Por su parte, la toxicología es la disciplina que se encarga del estudio de la interacción entre agentes químicos, biológicos y físicos con los sistemas biológicos, cuantificando el peligro potencial de esta interacción mediante el uso de metodologías y pruebas apropiadas. Los efectos nocivos inducidos sobre el material genético, son analizados por la toxicología genética (Peña *et al.* 2001).

En nuestros días, las sustancias sintéticas y naturales presentes en el ambiente son numerosas y afectan a todas las actividades humanas. Sin embargo, la mayoría de los agentes químicos son potencialmente peligrosos, sobre todo los contaminantes del ambiente laboral y los medicamentos (Dueñas, 2002). Por ello, existe un fuerte impulso para identificar y analizar la capacidad que tienen estos agentes químicos para modificar al material genético de los seres vivos; se ha encontrado que aproximadamente 10% del total de las sustancias químicas utilizadas por el hombre son genotóxicas (Vogel *et al.*, 1991).

Para comprender la toxicidad de un agente exógeno (cualquier sustancia que es externa a un organismo), además de las diferentes fases del proceso de desintoxicación, es necesario conocer su interacción con proteínas que median la respuesta celular (Muckter, 2003), ya que los polimorfismos, al modular el impacto derivado de la exposición a un agente tóxico, tienen un papel importante en la sensibilidad o susceptibilidad de los seres vivos (Lu, 1998; Lawrence *et al.*, 2003).

La posibilidad de que un individuo presente una reacción adversa ante la exposición a productos químicos tóxicos, como los medicamentos, está determinada por la interacción compleja entre genética, fisiología y exposiciones

anteriores y concurrentes e incluso se asocia con la presencia simultánea de otros productos químicos y sus propiedades físico-químicas (Zijlstra, 1987; Vogel & Zijlstra, 1987; Lu, 1998). Las relaciones entre el genotipo de los organismos y la actividad de los medicamentos es estudiada por la fármaco-genética e involucra el estudio de la variación genética expresada como una respuesta genobiótica (Nebert y Rusell, 2002; Parque y Pirmohamed, 2001).

Mediante el conocimiento de las variaciones en la respuesta desarrollada por los individuos expuestos, es posible identificar el peligro que implica para una población, la exposición a un xenobiótico (una sustancia que no ha sido producida dentro de un organismo y tiene un efecto tóxico para éste) (Lash et al., 2003).

Las consecuencias de la exposición crónica a genotóxicos han sido estudiadas principalmente en las células germinales de varias especies. Otros estudios, enfocados al análisis del efecto de la exposición en las células somáticas son significativos debido a la relación entre las alteraciones genéticas en las células y los procesos cancerosos; además, porque muchas sustancias que causan daño en células somáticas podrían hacerlo también en células germinales (Dueñas, 2002). El tipo de lesiones que pueden ocasionar los genotóxicos sintéticos y naturales, tanto en células somáticas como en germinales, incluyen: aberraciones cromosómicas, pérdida de bases, mutación puntual y no disyunción; su presencia en células somáticas promueve el desarrollo de tumores cancerosos y en células germinales origina efectos hereditarios y de infertilidad.

## **Metabolismo y biotransformación**

La farmacocinética de las sustancias químicas se puede analizar en cuatro pasos: absorción, distribución, biotransformación y excreción de los xenobioticos, mientras que la farmacodinámia estudia la acción y efectos finales inducidos por el fármaco en el organismo (Gilman *et al.*, 1990; Brailowsk, 1995).

El proceso por el que un agente exógeno ingresa a un sistema biológico atravesando una membrana biológica es llamado absorción. Los compuestos

exógenos ingresan al organismo por medio de diferentes vías de contacto. Dependiendo de la vía de administración y de sus propiedades físico-químicas puede ser por ingestión-intestino, respiración-pulmones, contacto cutáneo-piel. Algunas características de los compuestos que intervienen en este proceso son: tamaño molecular, solubilidad en lípidos, estructura tridimensional, afinidad a receptores celulares o moléculas blanco, etc. Por otro lado, las condiciones de la superficie de contacto que también son determinantes en la absorción son: tamaño de área, permeabilidad de la membrana y magnitud del flujo sanguíneo (Peña *et al.*, 2001). Cuando un agente exógeno llega al torrente sanguíneo se considera que entra al organismo; a través del flujo sanguíneo es transportado y distribuido a los distintos órganos, como a hígado y riñones donde puede biotransformarse a uno o varios metabolitos o bioacumularse sin cambios químicos, en ambos casos finalmente será excretado.

La biotransformación de sustancias químicas, incluidas las genotóxicas, es realizada mediante dos fases durante las cuales intervienen varias familias de enzimas localizadas principalmente en el retículo endoplásmico y el citosol (Peña *et al.*, 2001).

La **fase I** (oxido-reducción o hidroxilación) produce reacciones catalizadas por un sistema complejo de enzimas llamadas monooxigenasas u oxigenasas de función mixta que tienen la capacidad de transferir un átomo de oxígeno molecular al compuesto sustrato, incrementando su polaridad y, por consiguiente, su solubilidad en agua; estos nuevos compuestos originados en la fase I son los sustratos de las enzimas de la siguiente fase y son muy reactivos debido a que contienen átomos deficientes en electrones o iones positivos que reaccionan con ácidos nucleicos y proteínas, provocando alteraciones que dan como resultado mutaciones y/o el desarrollo de células cancerosas. Ejemplos importantes de enzimas de fase I son la familia de citocromos P450, las amino-monooxigenasas, flavin-monooxigenasas, peroxidasas, enzimas reductoras como hidroxilasas, esterasas y amidasas (Beedham1997; Nebert y Russell, 2002).

En la **fase II** (conjugación) hay reacciones de conjugación, en las que un conjunto de enzimas con enlaces de alta energía cede un grupo funcional polar al

agente químico o a su producto de transformación de la Fase I. El resultado final de esta serie de reacciones químicas es la excreción de los metabolitos finales hidrosolubles. Algunas de las enzimas que participan en esta fase son metiltransferasas, glucuronil transferasa, sulfotransferasas, glutatión S-transferasa, reductasa, peroxidasa (Peña *et al.* 2001).

La última etapa del metabolismo es la excreción, por la que los metabolitos resultantes, más hidrosolubles que el compuesto inicial, son eliminados.

Los efectos fisiológicos de los agentes químicos dependen de múltiples factores como las propiedades físico-químicas inherentes a la sustancia química: tamaño, afinidad a receptores celulares o moléculas blanco, solubilidad en lípidos, etc.; su biodisponibilidad, dosis y vía de administración: respiratoria, cutánea, gastrointestinal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal; características del órgano blanco o sitio de acción, tiempo de exposición, la dosis que llegue al blanco, además el tóxico debe vencer las barreras físicas y químicas que protegen al órgano blanco (Zijlstra y Vogel, 1988). Dichas barreras pueden ser la permeabilidad de la membrana biológica o la disminución de la difusión mediante la reducción en el riego sanguíneo, lo que puede disminuir el período de exposición del tejido blanco.

La importancia de la biotransformación es que en esta etapa las sustancias llamadas indirectas (profármacos y promutágenos), que no muestran efectos fisiológicos *per se*, al biotransformarse pueden producir metabolitos con efectos fisiológicos (Sosa, 1999). Las sustancias que no requieren ser biotransformadas para mostrar sus efectos son llamadas directas. Si una sustancia al pasar por las rutas de biotransformación produce metabolitos sin efectos fisiológicos se dice que hubo desintoxicación. Cabe mencionar que alrededor del 80% de los genotóxicos se encuentran clasificados como promutágenos (Vogel *et al.*, 1991).

Los efectos fisiológicos inducidos por los agentes químicos que ingresan al organismo se pueden dividir en dos tipos principales: terapéuticos y tóxicos. Sin embargo, la línea que divide estos efectos es delgada, por ejemplo en algunos medicamentos antibióticos, la actividad terapéutica radica en su efecto tóxico,

como es el caso del antidiarreico Treda (Wermuth, 2004, Laboratorios Sanfer, 2004).

## **1.2 Antecedentes de Treda**

Los antibióticos son sustancias químicas que pueden retardar o detener el crecimiento de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios) en un organismo (Waksman et al., 1949). El término antibiótico, del griego anti que significa "contra" y bio "vida", fue propuesto por Waksman et al. (1949) para definir productos del metabolismo microbiano dotados de actividad tóxica; en la actualidad, dichos productos son modificados para mejorar su efectividad (Sosa, 1999), generando nuevas propiedades que es necesario definir y evaluar, para conocer el peligro potencial para las células somáticas y germinales expuestas a estos medicamentos.

Los medicamentos se componen de uno o varios fármacos (sustancia activa) y una sustancia inocua, cuya función es ayudar a introducir a la sustancia activa. Los datos específicos de seguridad que indican la situación clínica de un medicamento incluyen: tiempo, dosis, ruta de exposición, daños reproductivos, genéticos, carcinogénicos y citotóxicos, entre otros (Osterberg y See, 2003); sin embargo, la poca atención que ponen los consumidores a estos datos (reflejada en el abuso cotidiano y excesivo de los medicamentos) y la falta de una vigilancia farmacológica en la fase terapéutica confirmatoria con pacientes hace necesario continuar evaluando el peligro potencial que se tiene al ingerir medicamentos (Bojalil *et al.*, 1993; Kasi *et al.*, 1995).

Por ejemplo, el antibiótico neomicina, que es utilizado como sustancia activa de antidiarreicos, ocupa el cuarto lugar entre los medicamentos más usados por automedicación en la ciudad de México (Bojalil *et al.*, 1993). Además, su bajo costo le hace accesible a la población. Su empleo como antidiarreico continúa, a pesar de existir fármacos menos tóxicos e igual de potentes como los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y las quinolonas.



## Treda®

Treda® es un medicamento utilizado como antidiarreico por sus propiedades bactericidas, astringentes y demulcentes en el tracto gastrointestinal (Fig. 1). Su nombre genérico es Caolín, Pectina y Neomicina; su primer nombre comercial hasta 1990 fue Kaomycin B®, cuando la farmacéutica alemana Upjhon accedió a la solicitud de la Organización Mundial de la Salud (WHO, sus siglas en inglés) a retirar gradualmente del mercado mundial su producto, al considerarlo tóxico en humanos e inadecuado para el tratamiento de la diarrea (Health Action International-HAI, 2001; Trujillo y Navarro 2006). Actualmente en México, con el nombre comercial Treda®, este antidiarreico es producido por Grimann, S.A. de C.V y distribuido por Laboratorios Sanfer S. A. de C. V. (Reg. Núm. 82212, S. S. A).

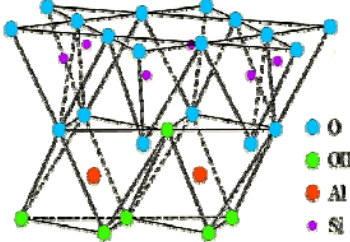
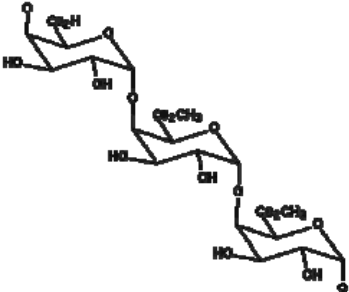
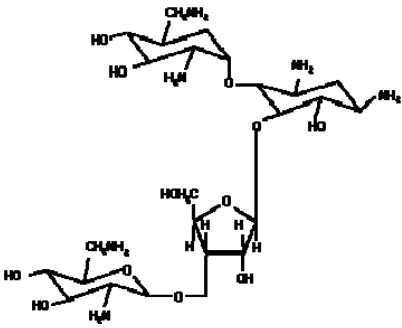


Fig. 1 Treda® suspensión y tabletas.

La formulación de Treda® consiste en una combinación sinérgica de sulfato de neomicina equivalente a neomicina B (129 mg), caolín coloidal (280 mg), pectina cítrica anhidra (30 mg) y excipiente cbp 1 tableta (Tabla 1). La dosis terapéutica administrada vía oral cada 4-6 horas es la siguiente: niños de 6 a 11 años una tableta; niños mayores de 12 años y adultos dos tabletas. Se contraindica en niños menores de 6 años, durante el embarazo, la lactancia, fiebre, diarrea con sangre o crónica, obstrucción intestinal y por hipersensibilidad a los componentes de la fórmula. Treda®, al ser una mezcla compleja sinérgica, tiene un efecto terapéutico superior a la suma de los efectos individuales de sus componentes (Trujillo y

Navarro, 2006), su principio activo contra las bacterias es el antibiótico neomicina, mientras que el caolín y la pectina se consideran que son adsorbentes y demulcentes gastrointestinales (Laboratorios Sanfer, 2004).

**Tabla 1. Comparación química de los componentes de Treda®**

Componentes de Treda®	Estructura química	Fórmula química
Caolín		$Al_2Si_2O_5(OH)_4$
Pectina		Anillos $C_6H_{10}O_7$ unidos por enlaces glucosídicos $\alpha$ -1-4
Neomicina		$C_{23}H_{46}N_6O_{13.3}H_2SO_4$

Cuando se ingiere Treda® puede llegar a inducir efectos secundarios graves como náuseas, cefaleas, urticaria, dolor abdominal, vómito, síndrome de mala absorción, toxicidad por acumulación en oído, riñón y sistema neuromuscular, se considera que estos efectos son causados directamente por contener neomicina

(Laboratorios Sanfer, 2004). Aunque Laboratorios Sanfer (2004) declara que no se han descrito alteraciones en las pruebas de laboratorio con Treda<sup>®</sup>, advierte que no debe administrarse durante el embarazo ya que la neomicina atraviesa la barrera placentaria ocasionando lesión ototóxica o nefrotóxica en el feto humano. Por el peligro que representa para la salud, este medicamento no es recomendado en varios países (no se encuentra en catálogos especializados como en la Farmacopea de E.U. o Vademecum (2007)), aunque en México es permitido y regulado por la IMPI (2007) y la Secretaria de Salud (2007). Además, la neomicina sólo esta permitida para preparaciones intestinales previas a cirugía y uso veterinario (WHO, 2003). La pectina y la mezcla de caolín-pectina son antidiarreicos de clase protectora y adsorbente (Beck *et al.*, 1997; Gebesh *et al.*, 1999; Rabbani *et al.*, 2001) pero sus beneficios en el tratamiento de este padecimiento son cuestionados, porque sólo producen una mejor consistencia a las heces fecales (Heimann, 1984; Roussel & Brumbaugh, 1991).

## **Caolín**

El caolín es una arcilla formada por la mezcla de minerales (Grim, 1968) como cuarzo, mica y caolinita (85-95%), siendo esta última quien le confiere un alto índice de intercambio catiónico (Huertas *et al.*, 1998; Rodríguez, 2001; García y Suárez, 2006), que le permite fijarse por absorción a pequeñas moléculas orgánicas (Mortensen, 1961; Steel y Anderson, 1972; Wallace *et al.*, 1975; Schiffenbauer y Stotzky, 1982; Lipson y Stotzky, 1983). Hoy día, por su capacidad de absorción, el caolín se ha utilizado como antidiarreico de clase absorbente y en la investigación médica, por ejemplo, para inducir la agregación de plaquetas (Cronberg y Caen, 1971). Por sus efectos secundarios cuando es inhalado la WHO (1973) lo clasifica como ligeramente tóxico, aunque estudios de carcinogénesis han reportado resultados negativos después de administrar caolín a cobayos por vía respiratoria, a ratas vía intramuscular (Wagner *et al.*, 1987) y a hámsteres por ingestión (Mossman y Craighead, 1982).

## **Pectina**

La pectina se compone de ácidos pectínicos solubles en agua formados principalmente de cadenas homopoliméricas con residuos parcialmente metilados de ácido galacturónico (Matsuhira y Rubio, 2001; Chaplin, 2005). Esta estructura le confiere la propiedad de unirse a las sustancias y formar geles, lo cual se aprovecha profusamente en la elaboración de alimentos y productos farmacéuticos; además, no causa detrimentos en la salud humana, ya que es una fibra dietética altamente metabolizada en colón (Cummings *et al.*, 1979; Holloway *et al.*, 1983; Bijlani, 1985; Rodríguez, 2006); por otra parte, se encuentra abundantemente en manzana y cítricos, formando parte de la dieta normal diaria humana sin mostrar efectos tóxicos (May, 1990).

La pectina y la mezcla pectina-caolín inducen cambios morfológicos en intestinos, como el aumento de microvelocidades y longitud del intestino delgado (Chun *et al.*, 1989; Tamura y Susuki, 1997; Brunsgaard *et al.*, 1995), además de que modifican la absorción de varias sustancias, ya sea acelerándola o inhibiéndola (Kim y Atallah, 1993; Bucci *et al.*, 1981; Bagheri y Gueguen. 1985; Roussel y Brumbaugh, 1991; Grudeva-Popova y Sirakova, 1998) como es el caso las siguientes sustancias con importancia fisiológica: colesterol, vitamina B12, ácidos grasos y esteroides (Judd y Truswell, 1982; Stark *et al.*, 1996). Las propiedades hidrocoloidales de la pectina la han hecho útil en el tratamiento de diarrea, cáncer de colon y otras enfermedades del tracto intestinal (Kuhnlein *et al.*, 1983; Ohkami *et al.*, 1995; Pagan i Gilabert, 1996; Tazawa *et al.*, 1997; Klurfeld 1992).

## **Neomicina**

En 1949 fueron aisladas las neomicinas a partir de *Streptomyces fradiae*, de estas la neomicina B (neomicina) mostró el mayor efecto tóxico, por lo cual fue ampliamente utilizada durante el periodo 1960-1980. La neomicina es un antibiótico aminoglucósido con una gran polaridad debido a su estructura química

integrada por tres aminoazúcares unidos a la 2-desoxiestreptamina central mediante enlaces glucosídicos (Waksman et al., 1949).

### *Farmacocinética y farmacodinámica*

Cuando se administra neomicina vía oral su absorción es muy escasa, en humanos ~1% de la dosis total administrada es absorbida y llega al torrente sanguíneo, donde ~45-55% se une a los componentes del plasma y el resto se distribuye rápidamente en tejido graso, sistema nervioso, ojo, corteza renal, endolinfa y perilinfa de oído interno; como la neomicina no se metaboliza su excreción es casi completa mediante filtración glomerular (93%) pero, se retrasa cuando hay concentraciones plasmáticas altas (Kunin *et al.*, 1960; Keen, 1975; Tran *et al.*, 1983; Levy, 1986; Aschbacher y Feil, 1994). La neomicina no absorbida se excreta sin cambios en las heces fecales (Poth *et al.* 1950; Aschbacher y Feil, 1991).

La neomicina muestra propiedades tóxicas contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porteus vulgaris*, entre otras y Gram positivas como *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. tuberculosis* (Waksman y Lechevalier, 1949; Rosenstein, 1994). La neomicina al ser un polianión, se une a aniones de la superficie de bacterias como los lipopolisacáridos de Gram negativas, ácidos teicoicos de Gram positivas y fosfolípidos en ambos tipos de bacterias. En Gram negativas, la neomicina penetra primero al espacio periplasmático de la célula por medio de porinas (Nakae y Nakae, 1982), el transporte a través de la membrana citoplasmática interna en todas las bacterias depende del impulso de electrones y pueden bloquearla cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , hiperosmolaridad, disminución de pH y anaerobiosis (Bryan y Kwan 1983; Mead y Williams, 2002; Morris *et al.*, 2002).

### *Mecanismo de acción y efectos nocivos*

Los efectos bactericidas de la neomicina son atribuidos a su capacidad de interferir en la síntesis de proteínas y en los mecanismos de transporte celular. Cuando la neomicina ingresa al espacio intracelular se une por atracción electrostática a la fracción 16S de la subunidad ribosómica 30S del rRNA de procariontes (Kaul y Pilch, 2002; Mehta y Champney, 2003). El sitio de unión es la región A, formada por una horquilla superficial con una secuencia altamente conservada, de hecho, el cambio de un nucleótido en este punto (adenina por guanina) reduce la afinidad de la neomicina al ribosoma (Lynch y Puglisi, 2001). La unión entre la neomicina y el rRNA es fuertemente dependiente del pH y la presencia de iones metálicos bivalentes, lo que sugiere interacciones electrostáticas y de competencia con  $Mg^{2+}$  o  $Fe^{+}$ , por ello se ha propuesto que estos iones son indispensables para la unión del antibiótico al mRNA (Hoch *et al.*, 1998).

La neomicina unida al rRNA cambia la conformación en los ribosomas, por lo cual éstos no se empalman al mRNA o lo hacen de manera incorrecta, de tal manera que durante la síntesis de proteínas se puede bloquear la traducción o inducir una mala lectura del mRNA, lo que produce proteínas aberrantes incompletas o con cambios en su secuencia de aminoácidos (Luzzatto *et al.*, 1969; Tai *et al.*, 1978; Shannon y Phillips, 1982; Brown, 1988; Busse *et al.*, 1992; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

En las bacterias, estos eventos alteran todas las funciones, sin embargo se considera que las proteínas transmembranales con cambios en su estructura tridimensional alteran la permeabilidad de la membrana y el sistema de transporte activo, estimulando la fuga de moléculas como iones pequeños, seguida de moléculas de mayor tamaño (Bryan, 1989 Busse *et al.*, 1992; Prescott *et al.*, 2000). Además, tanto en procariontes y eucariontes la neomicina inhibir fosfolipasas, esfingomielinasas y ATPasas (Queener *et al.*, 1983; Humes *et al.*, 1984).

La neomicina también se une a la subunidad 12S de los ribosomas de la mitocondria. La mutación A1555G en el sitio de unión altera la estructura tridimensional del rRNA mitocondrial incrementando la susceptibilidad de unión con los aminoglucósidos (Hutchin *et al.*, 1993; Prezant *et al.*, 1993; Bacino *et al.*, 1995). Así, en células eucariotas la neomicina interfiere en la síntesis de enzimas importantes en la producción de ATP disminuyendo sus niveles normales y causando un desequilibrio en las concentraciones de iones, acumulación de calcio y finalmente muerte celular (Hu *et al.*, 1991; Jaber *et al.*, 1992; Prezant *et al.* 1992; Prezant *et al.* 1993; Guan *et al.*, 2000).

### *Efectos advesos*

La neomicina es la más tóxica de los aminoglucósidos (Riviere *et al.*, 1991; Kotecha y Richardson, 1994). En humanos tratados con neomicina, se ha reportado ototoxicidad por muerte de neuronas sensitivas, vestibulares y cocleares (Govaerts *et al.*, 1990; Yamasoba y Tsukuda, 2004; Thomas *et al.*, 2005), nefrotoxicidad inducida por necrosis de células tubulares (Schentag *et al.*, 1979; Aronoff *et al.*, 1983; Lietman y Smith, 1983), aumento de vellosidades intestinales y mala absorción en intestinos de grasas, proteínas, colesterol, carotenos mono y disacáridos, vitamina B<sub>12</sub>, sodio y calcio (Jacobson *et al.*, 1960; Faloon *et al.*, 1962; Sirtori *et al.*, 1991). En ratas expuestas a aminoglucósidos se han observado cambios morfológicos en células del endotelio glomerular (lo que se traduce como menos fenestraciones endoteliales), reducción del coeficiente de ultrafiltración del capilar glomerular (Baylis *et al.*, 1977; Luft y Evan, 1980) y parálisis muscular durante la administración intrapleural, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular y oral causada por la inhibición de la liberación presináptica de acetilcolina y una baja sensibilidad sináptica a dicho transmisor (Pittinger y Adamson, 1972; Holtzman, 1976; Sokoll y Gergis, 1981).

## *Genotoxicidad de la neomicina*

Manna y Bardhan (1973) reportaron un efecto genotóxico inducido por la neomicina en ratones, asimismo, con la prueba de aberraciones cromosómicas, en linfocitos en humanos, se encontró un resultado positivo (Jaju et al., 1986). En contraste, otros estudios sobre la genotoxicidad de neomicina han mostrado resultados negativos en hamsters, ratones y con la prueba de Ames en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, (con y sin activación metabólica de la fracción S9 de hígado) (Mayo et al., 1995; Mayo y Aaro, 1995a; Mayo y Aaro, 1995b). Por otro lado, estudios realizados en ratas no han mostrado actividad teratogénica ni carcinogénica de la neomicina (Kakuk, 1980), pero se considera que ésta puede atravesar la barrera placentaria causando ototoxicidad y nefrotoxicidad en el feto. La WHO (2003) clasifica a la neomicina como medicamento tóxico no genotóxico.

Las evidencias anteriores, han resultado materia de debate y muestran una clara controversia sobre el efecto genotóxico de la neomicina. A este respecto, es importante considerar que cuando se realiza una batería de pruebas o se elige una prueba para evaluar los efectos genotóxicos de una sustancia, existen variables importantes a considerar que determinan el efecto obtenido, tales como el tipo de organismo y concentraciones seleccionadas, nivel celular involucrado, si es *in vivo* o *in vitro*, entre otras. En el presente trabajo se eligió determinar el efecto genotóxico de la neomicina con la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas realizada *in vivo* en alas de *Drosophila melanogaster*.

### **1.3 *Drosophila melanogaster***

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* fue seleccionada como modelo biológico por Morgan en 1909 para realizar investigación genética debido a que posee un conjunto de características que lo hacen eficiente y práctico (Rubin y Lewis 2000). Actualmente, aún continúa siendo muy útil en toxicología genética para detectar *in vivo* el impacto de sustancias tóxicas en células somáticas y



germinales, principalmente por ser el eucarionte multicelular mejor conocido genéticamente, con un genoma pequeño (número cromosómico de  $2n=8$ ) que posee un sistema enzimático semejante al de la fracción S9 del hígado de los mamíferos, lo que le confiere la capacidad de metabolizar compuestos químicos de manera similar.

*D. melanogaster* como modelo biológico permite la detección de casi todos los eventos genéticos inducidos: sustitución de pares de base, pérdidas, recombinación en células somáticas y germinales, no disyunción, mutaciones puntuales, inversiones o translocaciones cromosómicas, utilizando diferentes metodologías en baterías de prueba (Tabla 2) (Vogel y Zijlstra, 1987; Russell, 1998).

**Tabla 2. Bioensayos a corto plazo en *D. melanogaster*** (Tomado de Vogel *et al.*, 1999).

Ensayo genético	Núm. de generaciones	Tipos de daño al DNA
<b>Pruebas con células germinales masculinas</b>		
Letales recesivos ligados al sexo	2	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, pérdida de ADN, pequeñas aberraciones.
Letales recesivos autosómicos	3	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, pérdida de ADN, pequeñas aberraciones.
Mutaciones visibles de loci selectos	1-2	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, pérdida de ADN, pequeñas aberraciones (análisis molecular).
Translocaciones heredables	2	Aberraciones cromosómicas recíprocas.
Aberraciones cromosómicas, pérdida de anillos X, cromosomas barra X ó Y	1	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas.
Letales dominantes	1	Aberraciones cromosómicas letales.
Aneuploidias	1	Aberraciones cromosómicas, no disyunción.
<b>Pruebas con células somáticas</b>		
Pérdida de heterocigosis debido a la recombinación y a eventos mutacionales	1	Recombinación intracromosómica homóloga, pérdida de ADN, aberraciones cromosómica, no disyunción, mutación.
Mutación somática, inserción o pérdida de fragmentos de DNA	1	Mutación, aberraciones cromosómicas, recombinación.
Reparación de DNA	1	DNA dañado procesado por reparación por escisión y/o postreplicativa.

Su mantenimiento en el laboratorio no requiere espacios grandes y el costo de su manutención es reducido respecto a los mamíferos; ya que al ser un organismo pequeño de apenas 5 mm, muy fértil y con un ciclo de vida corto, se pueden obtener en poco tiempo y espacio grandes cantidades de individuos, lo cual facilita la aplicación de análisis estadísticos confiables.

*D. melanogaster* pertenece a los insectos holometábolos, con metamorfosis completa y estadios de desarrollo bien definidos. El ciclo vital comienza con la ovoposición de los huevos que, al eclosionar, originan una larva que pasa por tres estadios para luego formar a la prepupa, pupa y, finalmente, al adulto (Fig. 2). Esta secuencia tiene una duración de 10 a 12 días a una temperatura óptima de  $25 \pm 1$  °C y con una humedad relativa de 60%. Es posible la administración de tratamientos agudos, subcrónicos o crónicos. Además, una característica muy importante para su manipulación es su claro dimorfismo sexual en imagos.

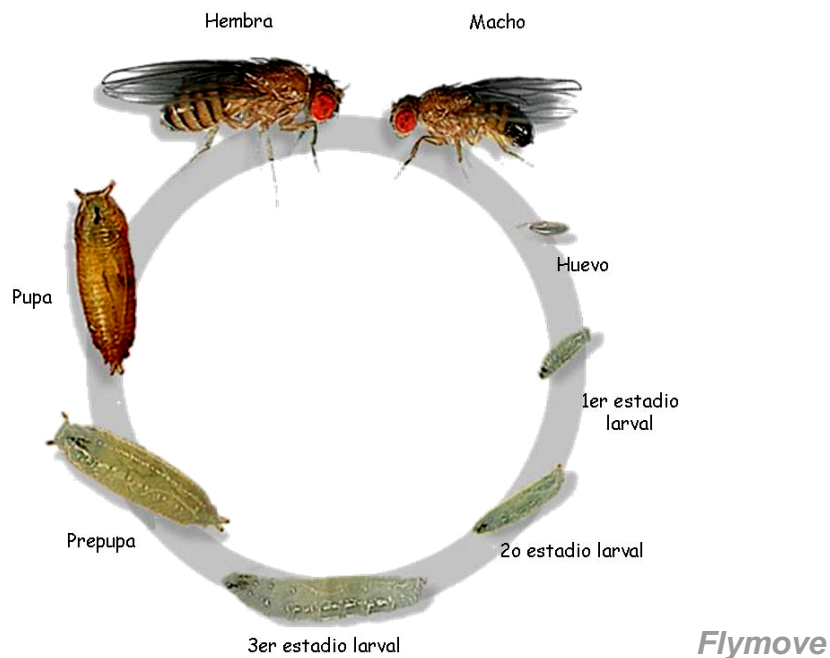


Fig. 2. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. (Tomado de <http://www.flymove.uni-muenster.de/>)

Las larvas presentan dos tipos de células. Las células larvales no se dividen y sólo aumentan de tamaño en cada estadio, una característica importante en estas células es la presencia de cromosomas gigantes politénicos y poliploides, los cuales se observan fácilmente en las glándulas salivales. Durante la fase de larva la ingestión de alimento es continua, lo que permite administrar los compuestos a prueba por medio del alimento.

La otra clase de células son las imagales, que se encuentran en pequeños sacos denominados discos imagales que, al iniciar la metamorfosis, se diferencian y dan origen a las estructuras del adulto y son diploides (García-Bellido y Merriam 1971a; Ramos *et al.*, 1993; Russell, 1998) (Fig. 3). Por ejemplo, los discos mesotorácicos dorsales de *D. melanogaster* se diferencian durante la metamorfosis dentro de un riguroso modelo que da origen al mesonotum y a las alas por mitosis continuas, siendo ésta una base fundamental de la prueba de mutación y recombinación somáticas. Es primordial observar que la actividad enzimática de *D. melanogaster* está presente tanto en larvas como en moscas adultas.

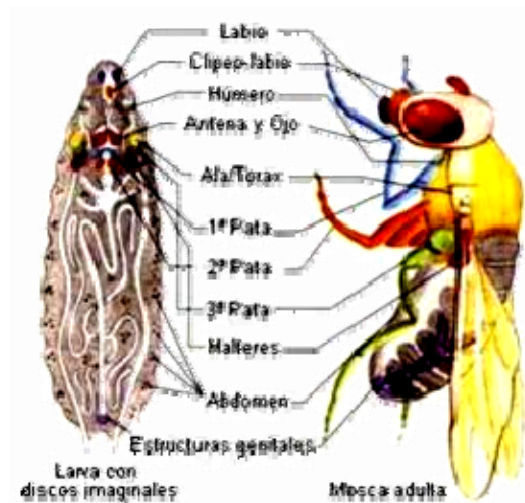


Fig 3. Ubicación morfológica de los discos imagales en *D. melanogaster*. (Tomado de [www.ucm.es/.../grupod/Genenzima/Genenzima.htm](http://www.ucm.es/.../grupod/Genenzima/Genenzima.htm) )

## Actividad enzimática en *D. melanogaster*

Gran parte de la actividad enzimática de *D. melanogaster* es llevada a cabo por la superfamilia de enzimas dependientes de citocromos P450, glutatión S-transferasa, glucuronil transferasa, sulfotransferasas, metiltransferasas, entre otras. Los genes P450 encontrados en *D. melanogaster* sugieren que es capaz de realizar una amplia variedad de reacciones metabólicas similares a las encontradas en mamíferos y esto se corrobora al revisar la cantidad de funciones fisiológicas vitales en las que se ha reportado la participación de citocromos P450 en *D. melanogaster*, como la síntesis de hormonas necesarias para el desarrollo y metamorfosis o la resistencia y biotransformación de xenobióticos (Jeffrey *et al.*, 1998; Schenkman *et al.*, 2003; Rewitz *et al.*, 2004)

Recientes evidencias muestran que estos genes en *D. melanogaster* tienen su homólogo conocido en humanos, ejemplo de ello son *Cyp1a*, *Cyp 4e 2*, *Cyp 6a 2* y *Cyp 6a 8* (Amichot *et al.*, 1998). Otros ejemplos que tienen formas similares a través de la filogenia son los genes que originan a las enzimas progesterona hidroxilasa (CYP2C3 en conejos, CYP17 y CYP21 en humanos) y ecdisona (CYP18 en *D. melanogaster*) (Schenkman, *et al.*, 2003). Además, la familia CYP4 en los dípteros tiene el mismo papel que la familia CYP2 en los mamíferos, tanto en el desarrollo como en el metabolismo de tóxicos o desintoxicación (Rodríguez-Arnaiz, 1997). Sin embargo, la mayoría de estos genes no pueden ser comparados fácilmente entre las especies, debido a que éstos tienen una expresión diferencial, incluso en la misma especie (Jeffrey *et al.*, 1998). Una muestra de ello es la dramática variación de los niveles de actividad de las monooxigenasas durante el desarrollo embrionario de los insectos, ya que la expresión de los genes P450 varía entre y dentro de los estadios de vida (Schenkman *et al.*, 2003).

La mayoría de los genes P450 tienen isoformas múltiples (Korytko *et al.*, 2000) evidenciando la gran diversidad de su expresión y regulación. En humanos, por ejemplo, se tienen 57 diferentes isoformas contenidas en 18 familias y 33 subfamilias. Los miembros de la familia 1 son considerados responsables de la

activación de un gran número de procarcinógenos (Schenkman *et al.*, 2003). En *D. melanogaster* se han identificado actualmente 83 genes funcionales de CYP (Rewitz *et al.*, 2004), distribuidos en varias familias, entre ellas CYP 1, CYP 2, CYP 3, CYP 4 (CYP4D, CYP4C, CYP4E), CYP 6 (CYP6A8 y CYP6A9) (Maitra *et al.*, 1996), CYP 9, CYP 18 (Amichot *et al.*, 1998), aunque la mayoría de genes se ubica en las familias CYP4 y CYP6 (Rewitz *et al.*, 2004).

#### **1.4 Prueba de mutación somática y recombinación mitótica (SMART)**

La SMART fue desarrollada por Graf *et al.* (1983) después de conocer la correlación entre la actividad mutagénica y la carcinogénica de sustancias químicas siendo útil para detectar mutágenos, promutágenos, así como otros compuestos que no interactúan directamente con el DNA (venenos del huso) (Graf *et al.*, 1984; Vogel *et al.*, 1991). Esta prueba se realiza *in vivo* y se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imagales, de los ojos o de las alas de las larvas de *D. melanogaster* (García-bellido y Dapena, 1974). Los eventos que conducen a la pérdida de heterocigosis y son detectados en la SMART son principalmente recombinación mitótica, pérdida de ADN mutación puntual y no-disyunción (Graf, *et al.*, 1984).

Para la elaboración de la prueba es necesario el uso de marcadores genéticos fenotípicos (en ojos o alas de *D. melanogaster*), los cuales son expresados fenotípicamente como manchas mutantes en el adulto cuando se produce un evento que cambia la información del material genético durante la diferenciación celular de los discos imagales correspondientes (Fig. 4). Durante el desarrollo larvario, las manchas mutantes se originan por una continua división primordial de células del disco imagal, derivadas de una célula alterada genotípicamente (García-Bellido y Merriam, 1971a).

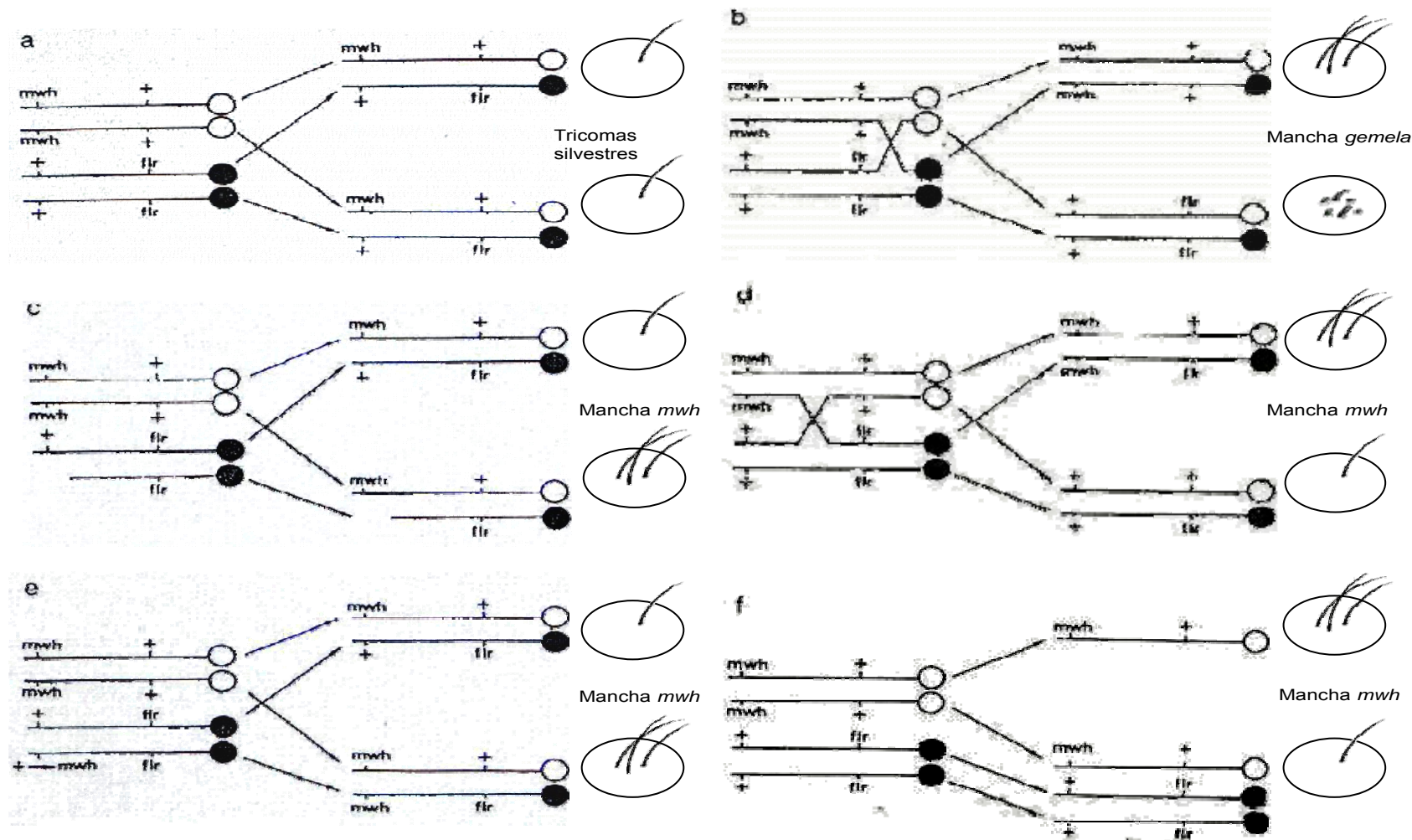


Fig 4 Inducción de manchas mutantes detectadas en la SMART. a) normal, b) gemela, recombinación mitótica entre el centrómero y el marcador *flr*, c) simple, pérdida de ADN, d) simple, recombinación mitótica entre el marcador *mwh* y el *flr*<sup>3</sup>, e) simple, mutación puntual y f) simple, no-disyunción (Tomado de Graf, *et al.*, 1984).

Es un ensayo a corto plazo que permite administrar diferentes concentraciones y evaluar a nivel somático la posible actividad mutagénica y/o recombinogénica de diversos compuestos químicos, cuantificando las manchas formadas por los tricomas o pelos mutantes en el contexto silvestre de la superficie de las alas de la mosca adulta (Tabla 3). En el caso de la SMART en ala, los marcadores genéticos empleados codifican para la producción de los tricomas celulares (García-Bellido y Merriam, 1971b; García-Bellido y Dapena, 1974).

**Tabla 3 Eventos genéticos que llevan al origen de manchas en moscas libres y portadoras de balanceador**

Tipo de manchas	Libres de inversión (Silvestres)	Portadoras de cromosoma balanceador (Serratas)
<i>mwh</i>	Mutación puntual Pérdida de ADN Recombinación mitótica No disyunción	Mutación puntual Pérdida de ADN No disyunción
<i>flr</i>	Mutación puntual Pérdida de ADN Recombinación mitótica No disyunción	
gemelas	Recombinación entre el marcador <i>flr</i> y el centrómero.	

Los marcadores en la prueba de las alas afectan a la diferenciación de los tricomas y son *flr*<sup>3</sup> y *mwh*:

- *multiple wing hair (mwh)*, se localiza distalmente en el brazo izquierdo del cromosoma tres a 0.03 unidades de mapa: es una mutación recesiva viable en células somáticas. Se expresa produciendo numerosos tricomas en lugar de uno por célula, como en el fenotipo silvestre (Lindsley *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1993).

- *flare* (*flr<sup>3</sup>*) se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma tres a 38.8 unidades de mapa, fenotípicamente produce tricomas con forma de flama (amorfa) producida por acumulación de melanocitos sobre la superficie del ala. Es una mutación recesiva que al estar en condición homocigótica resulta letal en células germinales, por lo que, se utiliza el cromosoma balanceador *TM3* [*in* (3LR)- *TM3*, *y<sup>+</sup>* *ir* *p<sup>o</sup>sep* *bx<sup>34e</sup>* *e* *Bd<sup>Ser</sup>*] (*TM3*) para su mantenimiento. El cromosoma *TM3*, presenta múltiples inversiones que alteran la secuencia de los genes lo que tiene como consecuencia que no se recuperan eventos viables a través de la recombinación entre el cromosoma libre de inversiones y el *TM3*. A un arreglo como el descrito se le denomina sistema de letales balanceados. La presencia del cromosoma balanceador se confirma por la expresión de dos marcadores fenotípicos: *Serate* y *ebony* (Lindsley *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1993; Graf y Würigler, 1996).
- *Serrata* (*Bd<sup>Ser</sup>*) se localiza en el cromosoma tres. Es un gen letal dominante que en las moscas heterocigóticas viables produce muescas en el borde de las alas y hace evidente la presencia del cromosoma balanceador (Lindsley *et al.*, 1992).
- *ebony* (*e*) es un marcador fenotípico recesivo. Las moscas portadoras muestran el cuerpo color *ébano* y no miel como en el tipo silvestre (Lindsley *et al.*, 1992).

Se espera que los agentes con actividad mutagénica que no induzcan manchas por eventos de recombinación produzcan la misma frecuencia de manchas *mwh* en larvas libres de inversión como en las que tienen el cromosoma balanceador, mientras que compuestos con actividad recombinogénica inducen una mayor frecuencia de manchas *mwh* en moscas libres de balanceador.



## **Indice de sobrevivencia (IS) como indicador de daño genotóxico**

El IS es un parámetro poblacional que proporciona información valiosa y adicional sobre el comportamiento de un genotóxico en el organismo, debido a que es dependiente de numerosos factores, que incluyen características del modelo *in vivo*, como pueden ser su constitución genética y capacidad metabólica; y las propiedades de la sustancia probada, por ejemplo, su polaridad y estructura química. El análisis del IS de las moscas expuestas a genotóxicos es una herramienta que ayuda a esclarecer factores de confusión y reconocer falsos negativos y falsos positivos en la SMART (González y Ramos, 1997; Rivas, 1999; García, 2006), especialmente cuando se desconocen las características fisicoquímicas y mecanismo de acción de un genotóxico, como es el caso del antidiarreico Treda<sup>®</sup>.

## II. JUSTIFICACIÓN

En la industria farmacéutica existe un gran número de medicamentos cuya capacidad genotóxica no es del todo comprendida, siendo necesaria su correcta evaluación para identificar el peligro que representan para los pacientes. En el caso particular del antidiarreico Treda<sup>®</sup>, son bien conocidos sus efectos tóxicos en riñón, oído interno, y sistema neuromuscular, se considera que puede atravesar la barrera placentaria humana y ocasionar nefrotoxicidad y ototoxicidad en el feto Laboratorios Sanfer (2004). Además, al menos dos de sus componentes (neomicina y caolín) son clasificados como tóxicos (Riviere *et al.*, 1991; Kotecha y Richardson, 1994; WHO 2005). Algunos reportes indican que la neomicina tiene un efecto genotóxico (Manna y Bardhan 1973; Jaju *et al.*, 1986) y que altera la viabilidad celular e induce muerte celular (Hu *et al.*, 1991; Jaber *et al.*, 1992; Hutchin *et al.* 1993, Prezant *et al.* 1993 Bacino *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, consideramos primordial evaluar el potencial genotóxico de Treda<sup>®</sup>.

### **III. HIPÓTESIS**

Si, el medicamento Treda<sup>®</sup> es genotóxico, entonces en las larvas tratadas con Treda<sup>®</sup> durante el tercer estadio de desarrollo, se espera encontrar, una frecuencia de manchas mutantes diferente a la de las moscas del grupo testigo.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general

- ❖ Determinar el potencial genotóxico de Treda<sup>®</sup> en *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos particulares

1. Determinar si la administración de Treda<sup>®</sup> modifica la supervivencia en *Drosophila melanogaster*.
2. Evaluar la inducción de recombinación mitótica y mutación somática por Treda<sup>®</sup>, en *Drosophila melanogaster* a través de la prueba SMART.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Compuesto

Se utilizó Treda<sup>®</sup> en tabletas (Laboratorio Sanfer, S.A. de C.V.). Para la preparación de las concentraciones, 2 tabletas fueron trituradas y disueltas en agua destilada y las concentraciones se obtuvieron a partir de la dosis recomendada (22 ppm) por el Laboratorio Sanfer. Cada tableta contiene sulfato de neomicina equivalente a 129 mg de neomicina y la dosis es 2 tabletas cada 4 a 6 horas. Una persona promedio de 70 kg consume en 24 horas 22.1 mg/Kg (22.1 ppm). Se prepararon soluciones por diluciones sucesivas a partir de la concentración 25 ppm, hasta obtener las concentraciones finales: 7, 10, 13, 16, 19 y 22 ppm. Como testigo negativo y disolvente se usó agua destilada.

### 5.2 Obtención de las moscas

En el presente trabajo se trataron larvas de  $72 \pm 4$  horas, obtenidas de dos cruza entre diferentes cepas de *D. melanogaster*. Se utilizaron larvas de tipo silvestre, Canton-S (CS) derivadas de la crusa entre machos y hembras CS, como testigo de línea, ya que no poseen alteraciones en su constitución genética (marcadores fenotípicos o cromosomas con múltiples inversiones) y, por otro lado, para la prueba de mutación y recombinación somáticas se utilizaron las larvas obtenidas de la crusa entre ♀♀ *flr<sup>3</sup> / TM3, Bd<sup>Ser</sup>* x ♂♂ *mwh e / mwh e*, que resultan de dos tipos: + *flr<sup>3</sup> / + mwh e* (alas y cuerpo de tipo silvestre) y *TM3, Bd<sup>Ser</sup>/+ mwh e* (alas Serrata y cuerpo color ébano. Esta crusa difiere de la propuesta inicialmente por Graf et al. (1984) al incluir el marcador *e* en la línea de machos (Muñoz, 1997). La presencia del cromosoma balanceador *TM3* es fundamental ya que debido a las múltiples inversiones que presenta no se recuperan eventos viables producidos por recombinación además, al contener el marcado *Bd<sup>Ser</sup>* permite distinguir a las

moscas libres y a las portadoras de balanceador. La clasificación de las moscas portadoras del balanceador se confirma porque muestran el cuerpo de color ebano.

### 5.3 Diseño experimental

Las larvas de tercer estadio fueron separadas por el método de Nöthinger (1970) y distribuidas en grupos de 50–100 larvas en tubos homeopáticos que contenían 1 gr de alimento instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply, fórmula 4-24) adicionado con 5 ml de las diferentes concentraciones a probar (7, 10, 13, 16, 19, 22 y 25 ppm) o de agua destilada (testigo negativo). Las larvas se expusieron durante las siguientes 48 horas previas a la formación del pupario y los organismos permanecieron en los tubos hasta la emergencia de los imagos (Fig. 5).

Los adultos recobrados de ambas cruzas se sacrificaron por sobre-eterización y se fijaron en etanol al 70%, para su posterior observación y análisis. Este procedimiento se realizó por triplicado, contando cada tratamiento con dos series

### 5.4 Determinación del índice de sobrevivencia

Para cada uno de los tres experimentos, las moscas CS y SMART se cuantificaron de manera independiente por sexo. Sólo las moscas de la craza SMART se cuantificaron por fenotipo: con alas y color de cuerpo tipo silvestre las moscas libres de balanceador (+ *flr*<sup>3</sup> / + *mwh e*) y con muescas en las alas y cuerpo de color ébano, las moscas portadoras de balanceador (*TM3, Bd*<sup>Ser</sup>/+ *mwh e*). A partir de la cuatificación realizada se calculó el índice de sobrevivencia, con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de sobrevivencia (IS)} = \frac{\Sigma \text{adultos experimental}}{\Sigma \text{adultos Testigo}}$$

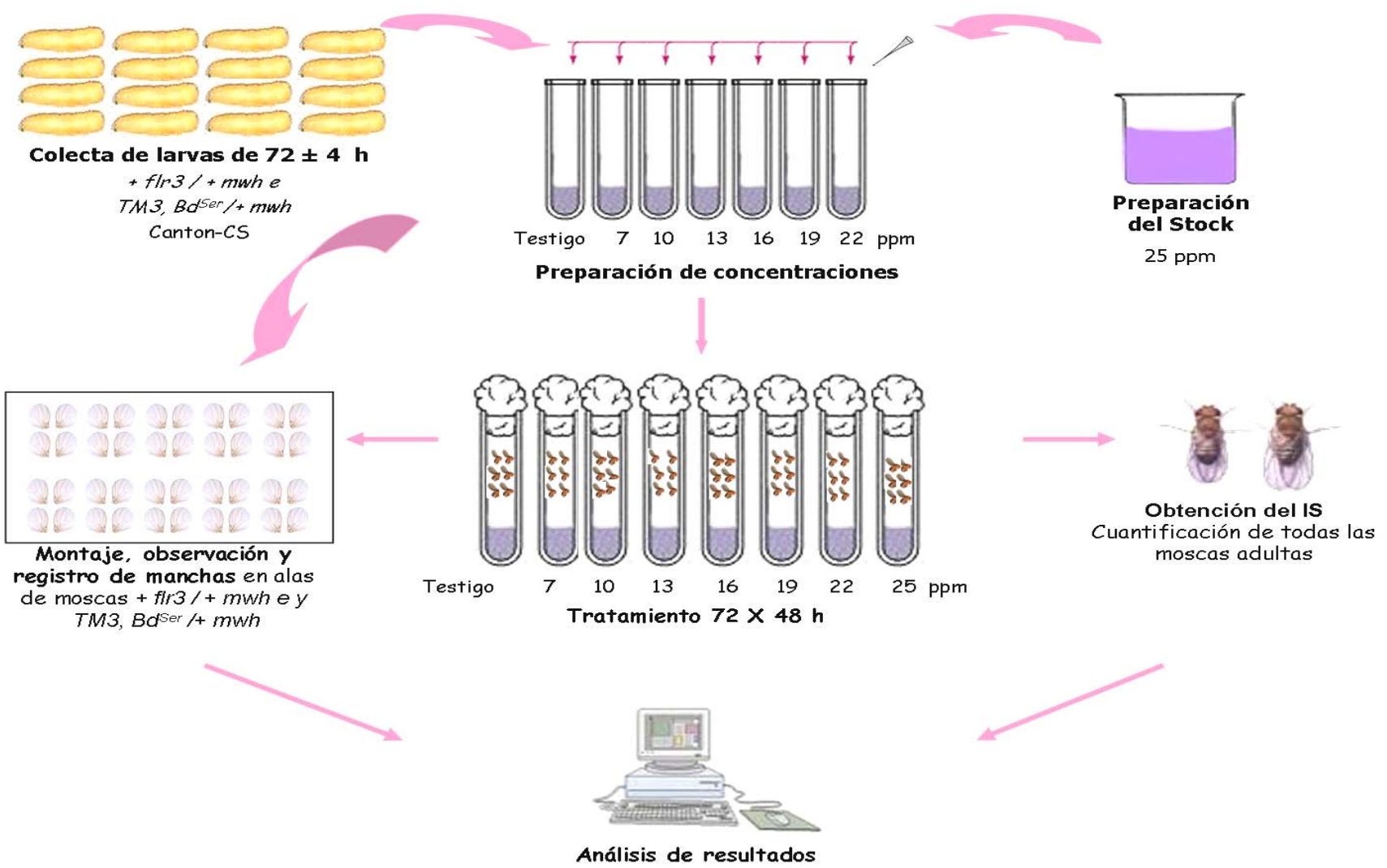


Fig. 5. Diseño experimental

Con el IS de los tres experimentos se obtuvo, para cada concentración, un único valor promedio, con su respectivo error estándar. Finalmente el IS promedio obtenido para cada tipo de mosca fue comparado con la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el testigo.

## **5.5 Evaluación de la inducción de recombinación mitótica y mutación somática**

De cada experimento se disectaron las alas de 10 hembras y 10 machos y se montaron en un portaobjetos con solución Fauré. Finalmente para cada concentración se revisaron 120 alas por fenotipo.

La clasificación de las manchas en las alas se hizo siguiendo el criterio señalado por Graf *et al.* (1984) utilizando un microscopio óptico (40X). Se considera la presencia de una mancha *mwh* cuando una célula tiene tres tricomas a lo menos, ya que un número menor de tricomas por célula puede ser fácilmente producido por eventos aleatorios y no por el tratamiento. Se considera que dos manchas son independientes si se separan por al menos tres hileras de tricomas regulares. Las manchas se clasifican en chicas (1 a 2 células) y grandes ( $\geq 3$  células). Por otro lado, las manchas pueden ser simples, si están formadas por células que expresan alguno de los marcadores involucrados: *mwh* ó *flr<sup>3</sup>* ó gemelas, si se observan ambos marcadores en las células de una mancha.

El análisis cuantitativo de la inducción de recombinación mitótica y mutación somática está integrado por la frecuencia de manchas totales y por el número de células por mancha y la distribución de manchas por mosca. La frecuencia de manchas es obtenida mediante el programa de cómputo Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), donde se compara mediante la prueba no paramétrica  $X^2$ , la frecuencia de manchas en los lotes testigo y experimentales y se determina si el compuesto tiene un efecto positivo (+), negativo (-), débil positivo (w) o indeterminado (i) (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würigler, 1988).

Cuando se contrasta la frecuencia de manchas totales presentes en las moscas libres de inversión respecto a la encontrada en moscas portadoras de



inversión es posible conocer la proporción de manchas inducidas por recombinación, debido a las propiedades del cromosoma balanceador que contiene las múltiples inversiones en casi todo el cromosoma y cuya presencia evita recobrar eventos producidos por recombinación.

La distribución de células por mancha es analizada de manera cualitativa para cada lote experimental y testigo las manchas se clasifican por tamaño con 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 32-64, -128, -256 y >512 células.

Por otro lado, para el análisis de la distribución de manchas por mosca las frecuencias de manchas se clasifican en conjuntos con 0, 1, 2, 3, 4,...n, manchas por mosca para cada concentración y se considera el total de manchas presentes en ambas alas de una misma mosca. Las frecuencias de manchas por mosca para cada tipo de progenie, libres y portadoras de inversión son contrastadas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para conocer si existen diferencias significativas entre la distribución de manchas por mosca de los diferentes lotes experimentales y testigo.

Estos dos últimos análisis tienen la finalidad de proporcionar información sobre el posible efecto citotóxico del compuesto a prueba y, además, contribuir a esclarecer factores de confusión, para poder discriminar falsos positivos o falsos negativos.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Determinación de la toxicidad de Treda

El índice de sobrevivencia (IS) promedio obtenido de las moscas CS y libres del cromosoma balanceador (+ *flr*<sup>3</sup> / + *mwh* e) tratadas con Treda<sup>®</sup> (Tabla 4) fue similar al IS de sus testigos respectivos; asimismo, al comparar por ANOVA el IS de estos dos tipos de moscas no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En las moscas portadoras del balanceador (*TM3, Bd<sup>Ser</sup>/+ mwh* e) el tratamiento aumento la sobrevivencia (excepto en la concentración menor) de manera que se obtuvo un IS diferente significativamente al en las moscas CS y libres del balanceador (ANOVA  $p < 0.05$ ) (Gráfica 1).

### 6.2 Inducción de genotoxicidad

El análisis cuantitativo de la frecuencia de manchas en moscas libres de inversión tratadas con Treda<sup>®</sup> (Tabla 5), arrojó un resultado positivo para la inducción de manchas totales a partir de la concentración 13 ppm y de manchas chicas desde la concentración 16 ppm. En cuanto a la inducción de manchas grandes, se encontró un efecto positivo en las concentraciones 10, 19 y 25 ppm. En las moscas portadoras del balanceador tratadas con Treda, el tratamiento sólo incrementó la frecuencia de manchas chicas en la concentración 16 ppm (Tabla 6).

Las frecuencias corregidas de manchas totales, de moscas libres y portadoras de balanceador, fueron ajustadas a una línea de tendencia. Al comparar ambas líneas se observó que el coeficiente de regresión de la línea sobre las frecuencias de moscas libres era mayor (0.58) al obtenido en la línea de las moscas portadoras de balanceador (0.22). Además, fue claro que las frecuencias de mutación fueron mayores en las moscas libres de balanceador (Gráfica 2).

Cuando se examinó la distribución de células por manchas (Gráfica 3), en moscas libres de inversión, se encontró una mayor proporción de manchas chicas, principalmente de una célula, mientras que, las manchas de dos a ocho células muestran una frecuencia menor, pero se observan en todas las concentraciones experimentales, excepto en 7 y 10 ppm. De igual manera, se pudo observar, aunque en menor proporción, la presencia de manchas que tienen un número mayor de nueve células, las cuales tuvieron una distribución heterogénea en las distintas concentraciones experimentales.

En moscas portadoras de inversión, la distribución de células por mancha (Gráfica 4) mostró más manchas chicas (de una célula), mientras que manchas de dos o más células presentaron una distribución irregular en los distintos lotes experimentales de manera que, manchas con cinco u ocho células sólo se obtuvieron en las moscas del lote testigo y de las concentraciones 10 y 25 ppm.

Al contrastar la distribución de manchas por moscas (Gráfica 5), de los diferentes lotes experimentales, en las moscas libres de inversión encontramos que dicha distribución en los lotes experimentales no presenta diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ) respecto a la encontrada en el lote testigo. Sin embargo, las frecuencias de moscas con cero o más manchas cambiaron en las diferentes concentraciones, respecto al testigo. De manera que disminuyó la frecuencia de moscas sin manchas y se incrementaron las frecuencias de moscas con manchas. A partir de la concentración 13 ppm se encuentran moscas con cinco o más manchas.

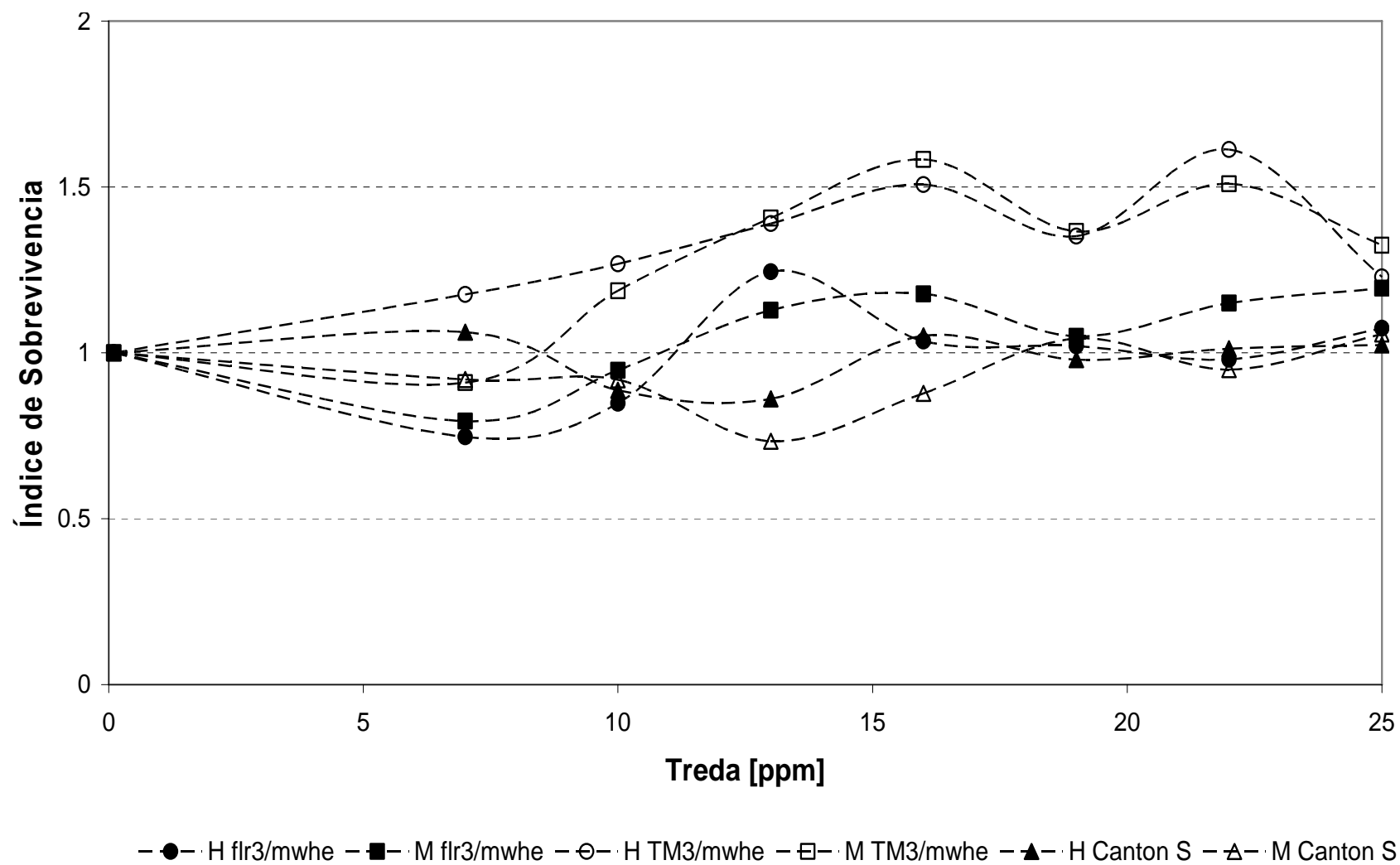
Asimismo, en las moscas portadoras de inversión, la distribución de manchas por mosca (Gráfica 6) fue similar a la mostrada en el testigo ( $p > 0.05$ ), pero se observó que la frecuencia de moscas con dos o más manchas, fue mayor a la observada en el testigo desde la concentración 16 ppm.

**Tabla 4. Total de progenie e Índice de Supervivencia<sup>1</sup> por fenotipo de moscas tratadas con TREDA<sup>®</sup>.**

[ppm]	N	Tipo de Progenie							
		<i>flr<sup>3</sup>/mwhe</i>		<b><i>TM3, Bd<sup>Ser</sup> /mwhe</i></b> *				<i>Canton-S</i>	
		Hembras	Machos	Hembras	Machos	N	Hembras	Machos	
Testigo	685	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	<b>1,00 ± 0,00</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>	627	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
7	558	0,75 ± 0,17	0,79 ± 0,17	<b>1,18 ± 0,23</b>	<b>0,91 ± 0,30</b>	564	1,06 ± 0,34	0,92 ± 0,10	
10	658	0,85 ± 0,23	0,95 ± 0,19	<b>1,27 ± 0,50</b>	<b>1,19 ± 0,42</b>	518	0,89 ± 0,25	0,92 ± 0,13	
13	818	1,24 ± 0,36	1,13 ± 0,13	<b>1,39 ± 0,15</b>	<b>1,41 ± 0,31</b>	459	0,86 ± 0,22	0,73 ± 0,14	
16	830	1,04 ± 0,19	1,18 ± 0,26	<b>1,51 ± 0,21</b>	<b>1,58 ± 0,45</b>	593	1,05 ± 0,10	0,88 ± 0,04	
19	729	1,02 ± 0,34	1,05 ± 0,16	<b>1,35 ± 0,39</b>	<b>1,37 ± 0,44</b>	636	0,98 ± 0,15	1,04 ± 0,13	
22	799	0,98 ± 0,16	1,15 ± 0,14	<b>1,61 ± 0,30</b>	<b>1,51 ± 0,48</b>	549	1,01 ± 0,31	0,95 ± 0,23	
25	772	1,07 ± 0,11	1,19 ± 0,18	<b>1,23 ± 0,19</b>	<b>1,32 ± 0,25</b>	582	1,02 ± 0,35	1,06 ± 0,18	

<sup>1</sup> promedio ± error estándar del Índice de Supervivencia de los tres experimentos

\* IS mayor respecto a *flr<sup>3</sup>/mwhe* y *Canton-S*. (ANOVA p<0.05).



**Gráfica 1. Índice de Supervivencia<sup>1</sup> por fenotipo de moscas tratadas con TREDA<sup>®</sup>.**

<sup>1</sup> promedio de los tres experimentos.

**Tabla 5. Frecuencia y número de manchas en moscas libres de inversión tratadas con TREDA®.**

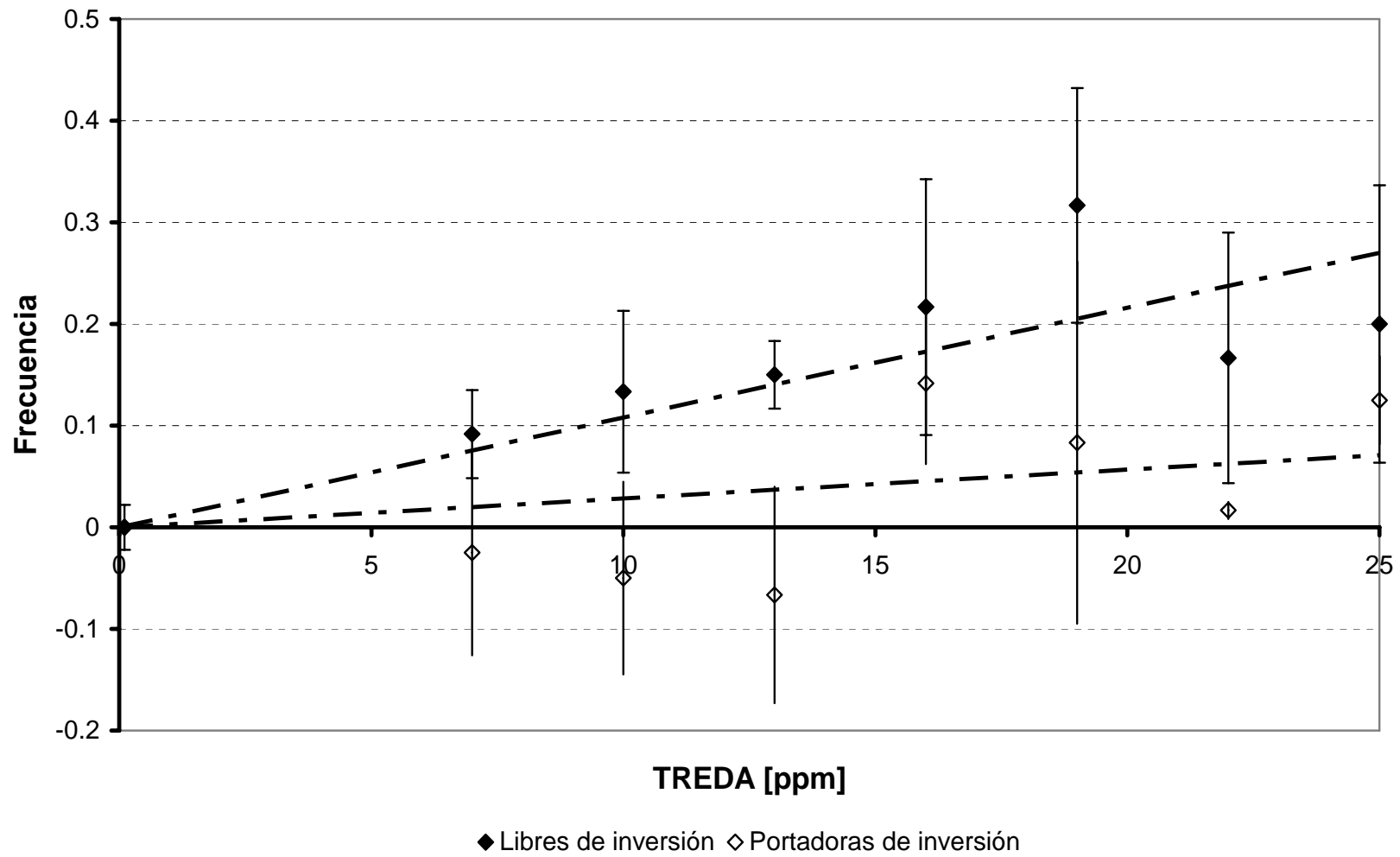
[ ppm ]	Número de alas N	Tipo y (número de manchas) Diagnóstico estadístico*						Totales m = 2	
		Chicas m = 2		Grandes m = 5		Gemelas m = 5			
Testigo	120	0.28	(34)	0.00	(0)	0.00	(0)	0.28	( 34)
7	120	0.34	(41)-	0.03	(4)i	0.00	(0)-	0.37	( 45)-
10	120	0.37	(44)-	0.04	<b>(5)+</b>	0.01	(0)-	0.42	( 50)i
13	120	0.41	(49)i	0.03	(3)i	0.00	(0)-	0.43	<b>( 52)+</b>
16	120	0.47	<b>(56)+</b>	0.03	(4)i	0.00	( 0)-	0.50	<b>( 60)+</b>
19	120	0.48	<b>(58)+</b>	0.12	<b>(14)+</b>	0.00	(0)-	0.60	<b>( 72)+</b>
22	120	0.43	<b>(51)+</b>	0.03	(3)i	0.00	(0)-	0.45	<b>( 54)+</b>
25	120	0.43	<b>(51)+</b>	0.06	<b>(7)+</b>	0.00	(0)-	0.48	<b>( 58)+</b>

Diagnóstico estadístico según Frei and Würgler (1988). + = positivo; - = negativo; i = indeterminado. M = factor de multiplicación. Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Ensayo de una cola.

**Tabla 6. Frecuencia y número de manchas en moscas portadoras de inversión tratadas con TRED<sup>®</sup>.**

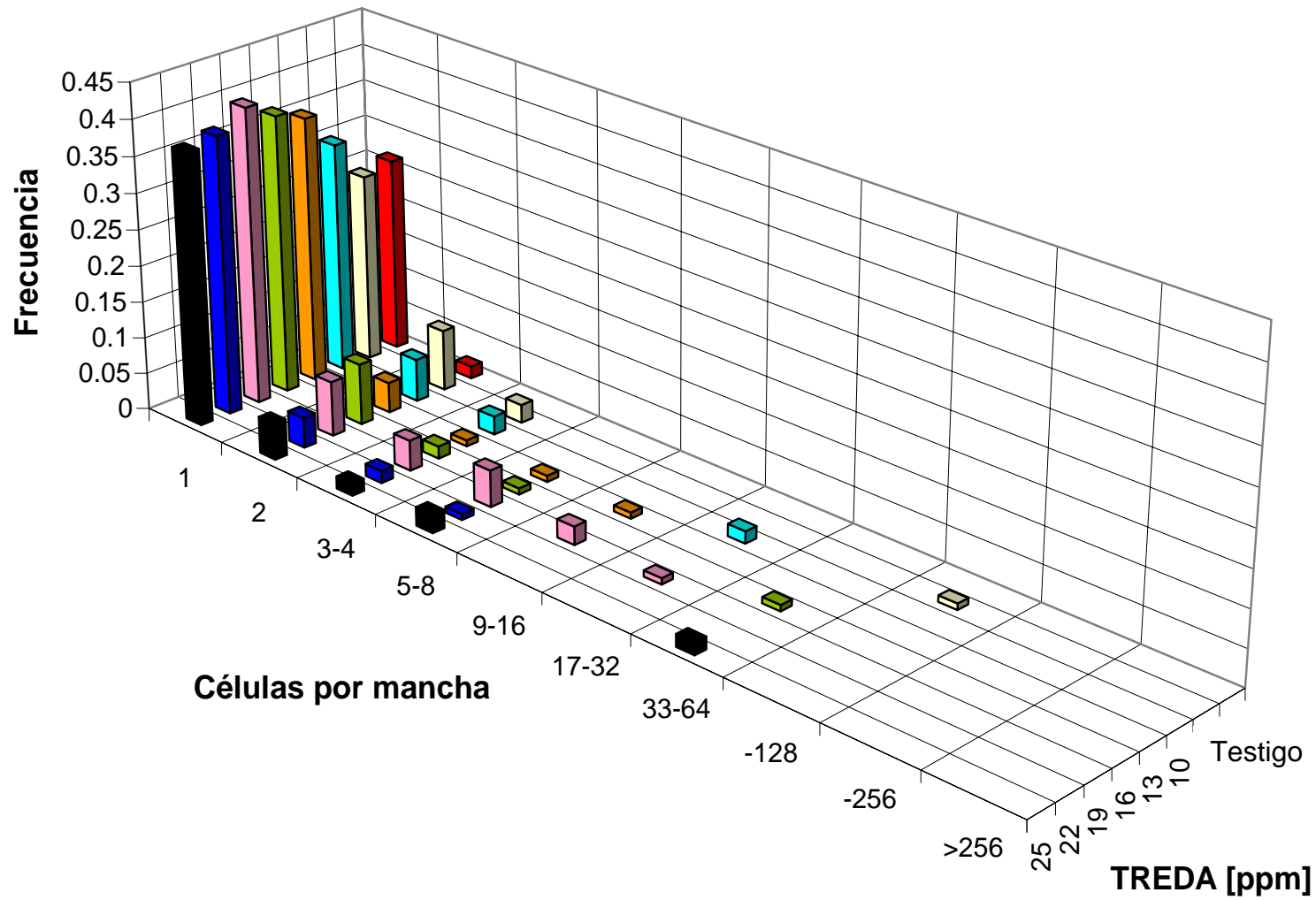
[ ppm ]	Número de alas N	Tipo y (número de manchas) Diagnóstico estadístico*					
		Chicas m = 2		Grandes m = 5		Totales m = 2	
Testigo	120	0,35	(42)	0.40	(48)	0.40	(48)
7	120	0.36	(43)-	0.37	(45)-	0.37	(45)-
10	120	0.32	(38)-	0.35	(42)-	0.35	(42)-
13	120	0.32	(39)-	0.33	(40)-	0.33	(40)-
16	120	0.52	<b>(63)+</b>	0.54	(65)i	0.54	(65)i
19	120	0.48	(58)-	0.48	(58)-	0.48	(58)-
22	120	0.37	(44)-	0.42	(50)-	0.42	(50)-
25	120	0.46	(55)-	0.52	(63)-	0.52	(63)-

Diagnóstico estadístico según Frei and Würigler (1988). + = positivo; - = negativo; i = indeterminado. M = factor de multiplicación. Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Ensayo de una cola.

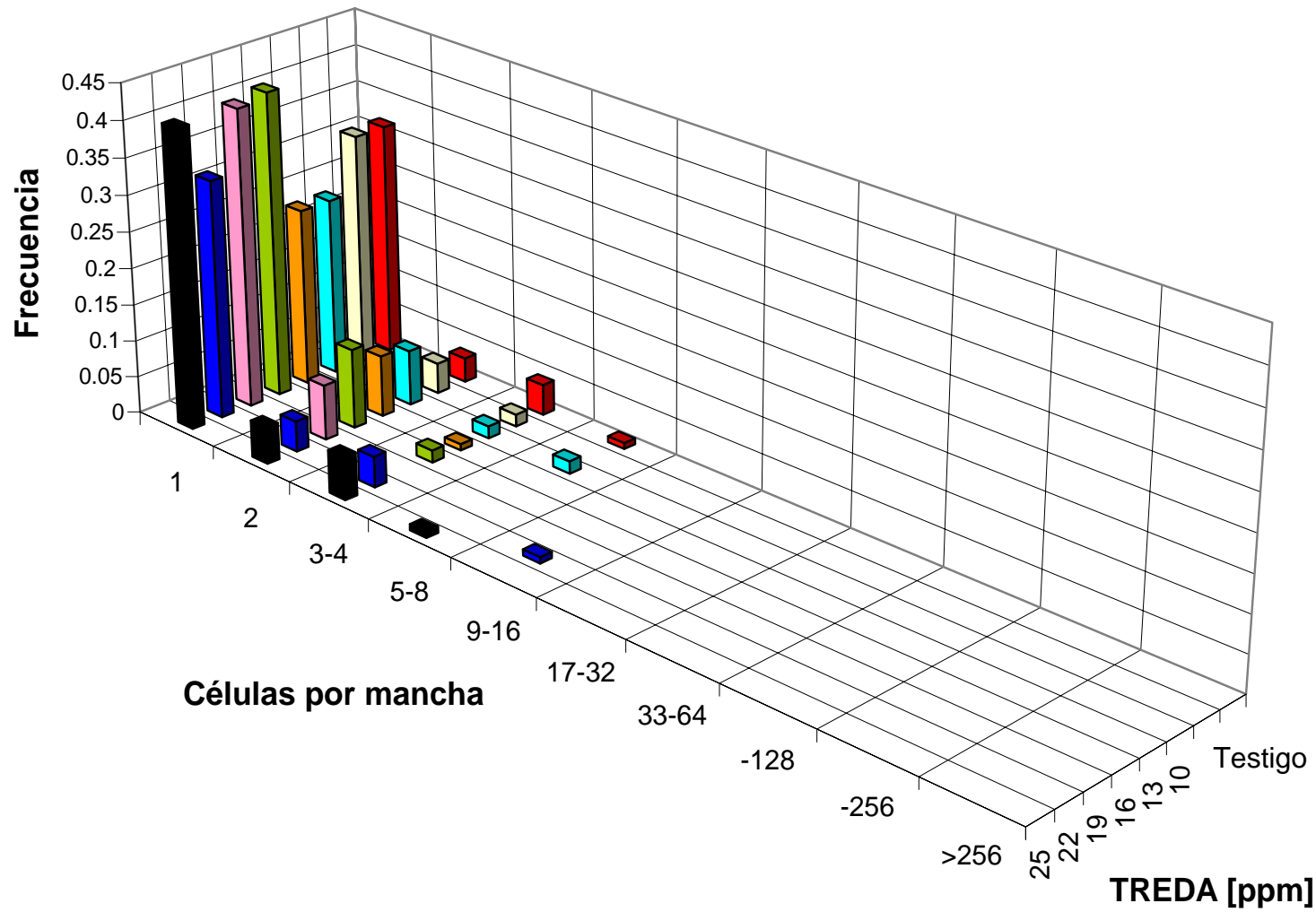


**Gráfica 2. Frecuencia corregida de manchas por ala en moscas libres y portadoras de inversión tratadas con TRED A<sup>®</sup>.**

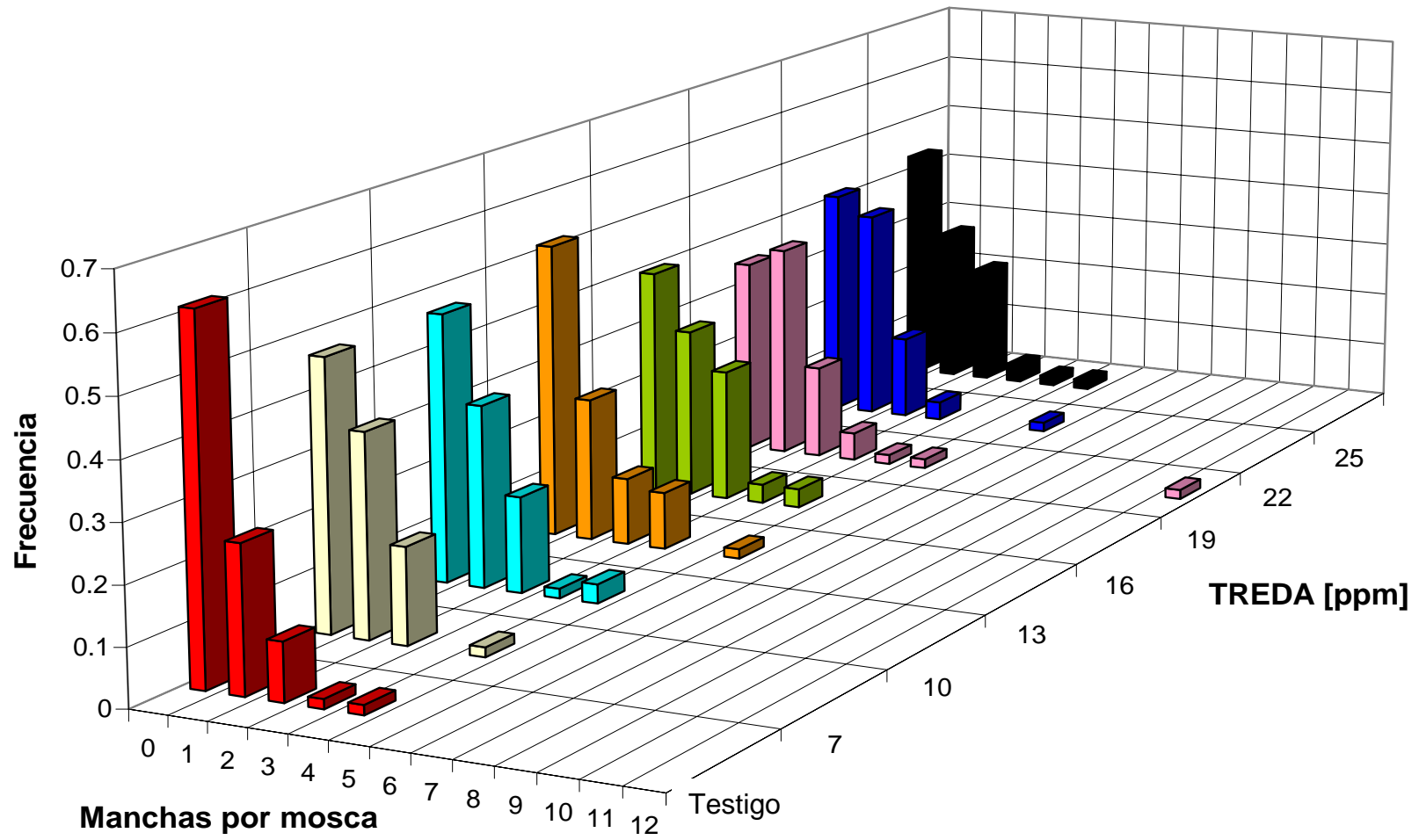




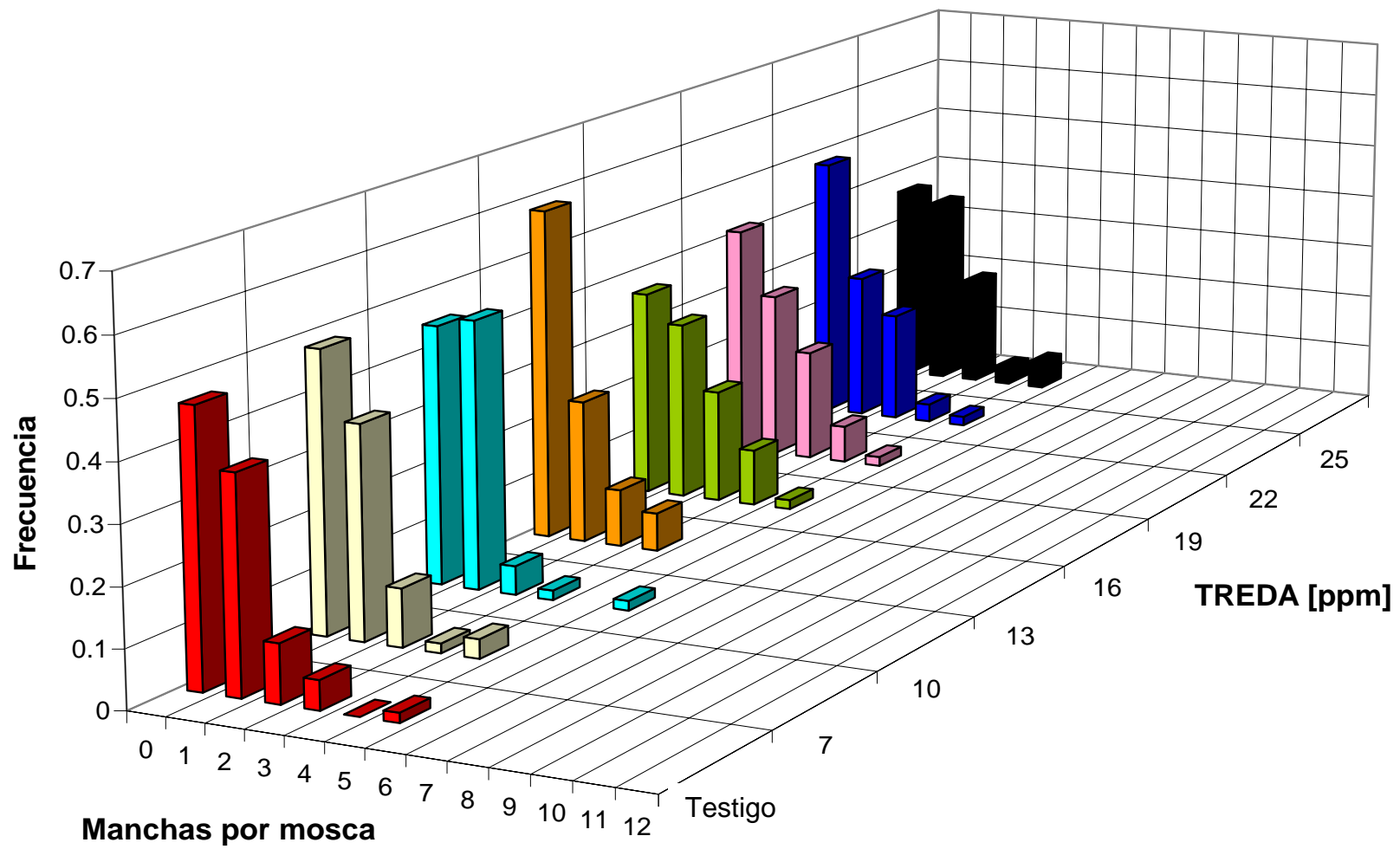
Gráfica 3. Distribución de células por mancha de moscas libres de inversión tratadas con TREDA®.



Gráfica 4 Distribución de células por mancha de moscas portadoras de inversión tratadas con TREDAs®.



Gráfica 5. Distribución de manchas por mosca de moscas libres de inversión tratadas con TREDÁ®.



Gráfica 6. Distribución de manchas por mosca de moscas portadoras de inversión tratadas con TRED<sup>®</sup>.

## VII. DISCUSIÓN

La evaluación del peligro, que implica la exposición a compuestos químicos para los seres vivos puede realizarse a distintos niveles. Por ejemplo, a nivel organismo, en el que la presencia de un agente peligroso puede implicar incluso la muerte del organismo expuesto. Pero también, las consecuencias de la exposición pueden ser evidentes en aspectos particulares de los organismos tratados, por ejemplo, a nivel celular, donde el efecto puede manifestarse como alteración de la célula e incluso su muerte (efecto citotóxico). Por lo anterior al estimar el daño genotóxico es necesario considerar la existencia de secuelas adicionales de dicho efecto, como el daño citotóxico, el cual se manifiesta en última instancia en la sobrevivencia de los organismos.

En el presente trabajo se analizó el IS de las moscas tratadas, ya que proporciona información útil para esclarecer factores de confusión en la SMART. El tratamiento con Treda<sup>®</sup> modificó el IS de las moscas portadoras de balanceador (*TM3, Ser/+ mwh*) y no produjo cambios significativos en el IS de moscas de tipo silvestre CS (no portan en su genotipo inversiones o mutaciones) ni en moscas libres de cromosoma balanceador (no poseen inversiones en la constitución de sus cromosomas). Las diferencias en el IS entre las líneas, se podría atribuir a diferencias en la constitución genética en estas moscas, particularmente por la presencia del cromosoma balanceador en moscas (*TM3, Ser/+ mwh*), pues éste no lo portan moscas CS ni las libres de balanceador. En estudios que incluyen moscas portadoras de cromosomas con múltiples inversiones se han reportado cambios en el IS asociado con éstas (González y Ramos, 1997; Rivas, 1999; García, 2006).

Cuando un cromosoma porta inversiones no pierde información genética, pero sí puede tener consecuencias fenotípicas cuando los rompimientos ocurren en los genes o en las regiones que controlan su expresión y regulación. El cambio de posición de los genes en el cromosoma balanceador induce diferencias en la expresión y/o regulación de éstos, las cuales según el ambiente, podrían ser incluso benéficas (Klug y Cummings, 2000; García, 2006).

Como el IS muestra la fracción de organismos sobrevivientes, podría sugerirse que la interacción entre Treda<sup>®</sup> y estas moscas originó un efecto que proporciona a los individuos mayores posibilidades de sobrevivir, dicho efecto puede ser de variada naturaleza y depende de las condiciones fisiológicas presentes en las moscas y originadas por la presencia del cromosoma balanceador. La forma en que un cambio en la información o arreglo del material genético, afecta la capacidad de sobrevivencia de un organismo depende de factores ambientales (Herrera, 2006).

El efecto genotóxico inducido por Treda en la SMART en moscas libres del balanceador coincide con el daño genotóxico reportado en ratas y células humanas (aberraciones cromosómicas) para la sustancia activa de Treda<sup>®</sup> (Manna y Bardhan 1973; Jaju et al., 1986). Por otro lado, considerando que Treda puede interactuar con cualquier tipo celular al que sea administrada, es importante analizar el hecho de que, sólo hay inducción de genotoxicidad estadísticamente significativa en las moscas libres de balanceador. La diferencia, entre la respuesta de estos dos tipos de moscas, podría estar relacionada con la capacidad de estas moscas para reparar el daño y los eventos genéticos que se involucran. A través de la SMART es posible detectar diferentes eventos genéticos (recombinación, mutación puntual, pérdida de ADN y no disyunción). Sin embargo, en esta prueba sólo es posible discriminar como evento particular a la recombinación, ya que las moscas que portan el cromosoma balanceador, no pueden reparar el daño genético por recombinación, de esta forma, las manchas observadas en las moscas portadoras de balanceador son inducidas exclusivamente por eventos genéticos que no incluyen a la recombinación.

Al estimar la proporción de la genotoxicidad que se explica por recombinación mitótica, se encontró una gran contribución de la recombinación mitótica en la inducción de manchas en las moscas libres de balanceador tratadas con Treda<sup>®</sup>, ya que la frecuencia corregida de manchas en moscas portadoras de balanceador fue menor a la obtenida en las libres de balanceador. El daño inducido por Treda<sup>®</sup> podría estar asociado al rompimiento e inestabilidad cromosómica que puede inducir recombinación, o al efecto de Treda<sup>®</sup> sobre la síntesis de proteínas, incluidas aquellas que se sintetizan en citoplasma y regresan al núcleo para interactuar o estabilizar al genoma.

La frecuencia corregida de manchas totales, también permitió mostrar que en moscas portadoras del balanceador la frecuencia de manchas en las concentraciones más bajas (7,10 y 13 ppm) fue menor a la del testigo, lo cual podría indicar la muerte células dañadas que no pudieron reparar el daño de manera eficiente por recombinación (ya que portan el cromosoma con múltiples inversiones), creando así un falso negativo por reducción de manchas.

En moscas libres del balanceador se obtuvieron manchas grandes mientras que en moscas portadoras de balanceador se presentan, principalmente, manchas chicas. Esta diferencia en el tamaño de mancha podría ser explicada también por pérdida de células en las moscas portadoras de balanceador, en las cuales, por su constitución genética, no es posible recobrar eventos originados por recombinación.

Estos resultados coinciden con la acción citotóxica atribuida a la neomicina (Brummentt, 1983; Moore *et al.*, 1984) al inducir perturbaciones en la membrana celular y alterar la función de mitocondrias y ribosomas (Silverblatt, 1982; Queener *et al.*, 1983; Humes *et al.*, 1984). Para el caolín, otro componente de Treda, también se han reportado efectos citotóxicos a nivel del tracto respiratorio humano (Kalliomäki *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1997) y células sanguíneas (Vallyathan *et al.*, 1988; Adamis y Krass, 1991; Osornio-Vargas *et al.*, 1991).

En moscas portadoras de balanceador, tratadas con Treda<sup>®</sup>, el incremento en el IS y la disminución en la frecuencias de manchas totales podrían ser considerados como indicadores de que la administración de este medicamento altera las condiciones estándares de los organismos.

El daño genotóxico inducido por Treda<sup>®</sup> tienen una tendencia similar tanto en moscas libres de inversión como en portadoras de balanceador, aunque dichas respuestas tengan diferencias con el modelo tradicional de concentración-respuesta (a mayor concentración corresponde un efecto mayor). Además, las concentraciones donde se observó una mayor frecuencia de manchas mutantes no son las más altas, sino 19 ppm para moscas libres de inversión y 16 ppm para moscas portadoras de balanceador.

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los agentes químicos es fundamental para comprender el posible origen de sus efectos en los organismos, ya que permite hacer predicciones. Este antidiarreico es una

mezcla sinérgica compleja, donde sus componentes se encuentran interaccionando entre sí, formando un complejo que posiblemente podría mostrar características nuevas o diferentes a las que presenta cada uno por separado. Así, a reserva de conocer el proceso mediante el cual Treda® es desintoxicado en el modelo biológico utilizado, la respuesta genotóxica observada, sugiere que posiblemente los efectos de Treda® pudieran ser modulados por múltiples factores, entre los que se podrían considerar los mecanismos de desintoxicación en *D. melanogaster*.

A este respecto, es sabido que la mayoría de los genes P450 tienen una gran diversidad de expresión y regulación (Korytko *et al.*, 2000), ya que los compuestos químicos que son el substrato pueden originar una inducción o inhibición de estos genes, en este caso aun cuando la expresión aumente, la cantidad de copias de los genes involucrados es finita y la cantidad de enzimas que puede ser sintetizada en un periodo de tiempo es constante, así a pesar de que la concentración del compuesto sea mayor, la cantidad de éste que puede ser metabolizada será constante; el resultado final de esta interacción es diverso y depende de numerosos factores moleculares, bioquímicos, fisiológicos o ambientales, por lo que no es posible comprender en su totalidad el metabolismo y modo de acción de los genotóxicos (Amichot *et al.*, 1998).

De esta forma, es viable que el resultado negativo encontrado en las concentraciones bajas, 7 y 10 ppm en moscas libres de inversión y 7, 10 y 13 ppm en portadoras de balanceador, podría sugerir la existencia de un rango de concentraciones en el que la respuesta de desintoxicación no sería inducida, por lo que el compuesto llegaría a ocasionar alteraciones, que posteriormente se pueden traducir en muerte celular en moscas portadoras de balanceador. Es factible que las concentraciones siguientes de 16 y 19 ppm, alcancen un umbral a partir del cual se desencadenan mecanismos de defensa de la célula, entonces, el daño se observa como un mayor número de lesiones reparadas y células viables, así el número de manchas obtenidas es mayor. Finalmente, en las concentraciones mayores, 22 y 25 ppm, la frecuencia de manchas mutantes menor a la observada en las concentraciones 16 y 19 ppm, se puede explicar al considerar que posiblemente los mecanismos de desintoxicación o sistemas de defensa fueron saturados y el compuesto pudo ser bioacumulado, como se ha confirmado para la neomicina (Levy, 1986).



Este modelo trata de explicar el efecto genotóxico inducido por Treda<sup>®</sup> en nuestro sistema biológico, sin dejar de considerar que existen múltiples factores farmacodinámicos y farmacocinéticos que se desconocen, ya que Treda<sup>®</sup> es una mezcla compleja. Por otro lado, también se descarta que la respuesta observada sea un fenómeno inducido artificialmente por errores metodológicos, ya que para la realización del presente trabajo se desarrollaron tres experimentos independientes, con varias series por cada concentración y las concentraciones fueron obtenidas mediante diluciones sucesivas a partir de una concentración stock de 25 ppm, preparada a partir del homogenizado hecho con el contenido de las tabletas de Treda<sup>®</sup>.

El análisis de la distribución de células por mancha en moscas libres de inversión, mostró una mayor proporción de manchas chicas, aunque también una distribución discontinua de la frecuencia de manchas grandes (clones mayores de 64 células) en diferentes concentraciones, con lo cual, es claro que el daño celular inducido por el medicamento Treda<sup>®</sup> una vez reparado, sea capaz de heredarse a través de la división mitótica, esto es confirmado al analizar la distribución de manchas por mosca.

La distribución de manchas por moscas es un parámetro indicativo de la susceptibilidad que tiene una población al ser sometida a un tratamiento. La variabilidad genética y las diferencias intrínsecas heredadas toman importancia cuando se estudia el patrón de respuesta de las poblaciones que han sido expuestas a cierto agente tóxico, ya que al ser sometidas a un factor de selección presentan respuestas promedio y excepcionales, siendo estas últimas un reflejo de la diversidad genética (polimorfismos) (Parque y Pirmohamed, 2001). El análisis estadístico aplicado para la comparación de la distribución de manchas por mosca en las diferentes concentraciones no mostró diferencias significativas en los dos tipos de moscas, sin embargo, se pueden observar modificaciones sutiles de esta distribución, tanto en moscas libres de balanceador como en moscas portadoras de inversión, principalmente para la categoría de moscas sin manchas, las cuales, en moscas libres de balanceador disminuyeron conforme aumentó la concentración, haciendo evidente las diferentes capacidades de respuesta que presentan los organismos de una misma población.

Estos hallazgos son interesantes porque la mosca comparte con los humanos muchos de los genes responsables de la desintoxicación y biotransformación de genobióticos. Pero, se requieren más evidencias experimentales que determinen si la actividad genotóxica de Treda<sup>®</sup> tiene un posible efecto en relación con la carcinogénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad de los organismos expuestos.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La administración de Treda<sup>®</sup> no reduce el Índice de Supervivencia de las moscas silvestres y libres del balanceador. En las moscas portadoras del cromosoma balanceador el tratamiento favorece el desarrollo de las moscas expuestas.
2. Treda<sup>®</sup> induce mutación y recombinación somáticas en moscas libres del cromosoma balanceador.
3. El tratamiento induce mutación somática en moscas portadoras del cromosoma balanceador.
4. La actividad genotóxica observada no sigue un comportamiento lineal.
5. El incremento en la frecuencia de manchas sugiere la participación de umbrales asociados con los mecanismos involucrados en la desintoxicación.

## IX. REFERENCIAS

- Adamis Z. and Krass B.K. (1991) Studies on the cytotoxicity of ceramic respirable dusts using *in vitro* and *in vivo* test systems. *Ann Occup Hyg.* 35: 469–483.
- Amichot M., Brun A., Cuany A., De Souza G., Le Mouel T., Bride J.M., Babault M., Salaun J.P., Rahmani R., Berge J.B. (1998) Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 121. 311–319.
- Aronoff G.R., Pottratz S.T., Brier M.E., Walker N.E., Fineberg N.S., Glant M.D., Luft F.G. (1983) Aminoglycoside accumulation kinetics in rat renal parenchyma. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23. 74-78.
- Aschbacher P.W. and Feil V.J. (1991). Fate of oral <sup>14</sup>C Neomycin in calves. USDA, ARS, Biosciences Research Laboratory, Farbo, ND. *J. Animal Science.* 69(1):733.
- Aschbacher P.W. and Feil V.J. (1994). Neomycin metabolism in calves. *J. Animal Science.* 72:83-689.
- Bacino C., Prezant T., Bu X., Fournier P., Fischel-Ghodsian N. (1995) Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics.* 5:165–172.
- Bagheri S. and Gueguen L. (1985) Effect of wheat bran and pectin on the absorption and retention of phosphorus, calcium, magnesium and zinc by the growing pig. *Reprod Nutr Dev.* 25(4A):705-16.
- Baylis C., Rennke H.R., Brenner B.M. (1977) Mechanisms of the defect in glomerular ultrafiltration associated with gentamicin administration. *Kidney Int. Nov;* 12(5):344-53.
- Beck I.T., Champion M.C., Lemire S., Thomson A.B., Anvari M., Armstrong D., Bailey R.J., Barkun A.N., Boivin M., Bursey R.F., Chaun H., Chiba N., Cockeram A.W., Connon J.J., Da Costa L.R., Faloon T.R., Fedorak R.N., Gillies R.R., Goeree R., Hunt R.H., Incullet R.I., Klein A., Leddin D.J., Love J.R., Worobetz L.J. (1997) Second Canadian Consensus Conference on the Management of Patients with Gastroesophageal Reflux Disease. *Can J Gastroenterol.* Sep;11 Suppl B:7B-20B.
- Beedham C. (1997) The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci.* Dec;19(6):255-63.
- Bijlani R.L. (1985) Dietary fibre: consensus and controversy. *Prog Food Nutr Sci.* 9(3-4):343-93.

- Bojalil R, Calva J.J., Ortega H. (1993) The use of antibiotics in a community of Mexico City. I. A household survey. *Bol Med Hospital Infantil México*. Feb; 50 (2):79-87.
- Brailowsk S (1995) Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Fondo de Cultura Económica. Disponible en <http://omega.ilce.edu.mx>
- Brown S.A. (1988) Treatment of gram-negative infections. *Vet. Clin. N. Am. Small Animal Pract.* 18:1141–1165.
- Brummett R. (1983) Animal models of aminoglycoside antibiotic ototoxicity. *Rev. Infect. Dis.* 5 Sup 5. s294-s303.
- Brunsgaard G., Eggum B.O., Sandstrom B. (1995) Gastrointestinal growth in rats as influenced by indigestible polysaccharides and adaptation period. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* Jul; 111(3):369-77.
- Bryan L.E. (1989) Two forms of antimicrobial resistance: bacterial persistence and positive function resistance. *J Antimicrob Chemother.* Jun; 23(6):817-20.
- Bryan L.E., and Kwan S. (1983) Roles of ribosomal binding, membrane potential and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:835-845.
- Bucci A.J., Myre S.A., Tan H.S., Shenouda L.S. (1981) *In vitro* interaction of quinidine with kaolin and pectin. *J Pharm Sci.* Sep; 70(9):999-1002.
- Busse H.J., Wostmann C., Bakker E.P. (1992) The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *J Gen Microbiol.* Mar; 138(3):551-61.
- Chaplin M. (2005). Pectin. Disponible en la World Wide Web: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hypec.html>.
- Chun W., Bamba T., Hosoda S. (1989) Effect of pectin, a soluble dietary fiber, on functional and morphological parameters of the small intestine in rats. *Digestion.* 42(1):22-9.
- Cronberg S. and Caen J.P. (1971) Release reaction in washed platelet suspensions induced by kaolin and other particles. *Scand J Haematol.* 8:151–160.
- Cummings J.H., Southgate D.A., Branch W.J., Wiggins H.S., Houston H., Jenkins D.J., Jivraj T., Hill M.J. (1979) The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br J Nutr.* May; 41(3):477-85.

- Dueñas García Irma Elena (2002) Efecto mutagénico y recombinogénico de la p-fenilenediamina y la o-fenilenediamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruza E y AB. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Faloon W.W., Paes I.C., Woolfolk D., Nankin H., Wallace K., Haro E.N. (1962) Effect of neomycin and kanamycin upon intestinal absorption. Ann. N.Y. Acad. Sci. 132:879–887.
- Flymove. Disponible en la World Wide Web:<http://www.flymove.uni-muenster.de/>
- Frei H. and Würzler F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* assays indicate a positive, negative or inconclusive. Mutation res. 203: 297-308.
- García Martínez Víctor (2006) Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 50 pp.
- García R.E. y Suárez B.M. (2006) Las Arcillas: propiedades y usos. Disponible en la World Wide Web:<http://www.uclm.es/users/higueras/yymm/Arcillas.htm>.
- García-Bellido A. and Dapena J. (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. Mol. Gen. Genet. 128:117-87.
- García-Bellido A. and Merriam J.R. (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 24:61-87.
- García-Bellido A. and Merriam J.R. (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 26:264-276.
- Gebesh V.V., Ianchenko V.I., Sukhov (1999) Kaopectate in the combined treatment of patients with intestinal infections. Lik Sprava. Apr-May;(3):140-2.
- Gilman A.G., Rall T. W., Nies A.S., Taylor P. (comps.) (1990) The pharmacological basis of therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, Nueva York.
- González C.E. and Ramos-Morales P. (1997) Sodium Azide induce mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 389:157-165.
- Govaerts P.J., Claes J., van de Hayning P.H., Jorens P.G., Marquet J., de Broe M.E. (1990) Aminoglycoside-induced ototoxicity. Toxicol. Lett. 52, 227.
- Graf U. and Würzler F. (1996) The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mol Mutagen. 27(3):219-26.

- Graf U., Juon H., Katz A.J., Frei H., Würgler F. (1983) Apilot study on a new *Drosophila melanogaster* spot test. Mutation Res. 120:233-239.
- Graf U., Würgler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C., Kale (1984) Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Enviromental Mutagenesis. 6:153-188.
- Grim R.E. (1968) Clay mineralogy. McGraw-Hill. New York. 596 pp.
- Grudeva-Popova J. and Sirakova I. (1998) Effect of pectin on some electrolytes and trace elements in patients with hyperlipoproteinemia. Folia Med (Plovdiv). 40(1):41-5.
- Guan M.X., Fischel-Ghodsian N., Attardi G. (2000) A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. Hum. Mol. Genet. 9:1787–1793.
- Health Action International-HAI (2001). Acción internacional para la salud-AIS expresa su preocupación por la composición de productos farmacéuticos comercializados como “antidiarreicos”. Fármacos. Volumen 4, Número 2. Disponible en la World Wide Web: <http://www.tufts.edu/med/apua/Patients/spanishAntibioticUse.html>.
- Heimann G. (1984) Pharmacotherapy of acute infant enteritis. Monatsschr Kinderheilkd. May;132(5):303-5.
- Herrera Bazán J.J.H. (2006) Efecto de las concentraciones bajas de talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario. . Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 92 pp.
- Hoch I., Berens C., Westhof E., Schroeder R. (1998) Antibiotic inhibition of RNA catalysis: neomycin B binds to the catalytic core of the td group I intron displacing essential metal ions. J Mol Biol. Sep 25; 282(3):557-69.
- Holloway W.D., Tasman-Jones C., Maher K. (1983) Pectin digestion in humans. Am J Clin Nutr. Feb; 37(2):253-5.
- Holtzman J.L. (1976) Letter: Gentamicin and neuromuscular blockade. Ann Intern Med. Jan;84(1):55.
- Hu D.N., Qui W.Q., Wu B.T., Fang L.Z., Zhou F., Gu Y.P., Zhang Q.H., Yan J.H., Ding Y.Q., Wong H. (1991) Genetic aspects of antibiotic induced deafness: Mitochondrial inheritance. J. Med. Genet. 28, 79–83.
- Huertas F.J., Chou L., Wollast R. (1998) Mechanism of kaolinite dissolution at room temperature and pressure: Part 1. Surface speciation. Geochim Cosmochim Acta. 62:417–431.

- Humes H., Sastrasinh M., Weinberg J. (1984) Calcium is a competitive inhibitor of gentamicin-renal membrane binding interactions and dietary calcium supplementation protects against gentamicin nephrotoxicity. *J. Clin. Invest.*, 73, 134-147.
- Hutchin T., Haworth I., Higashi K., Fischel-Ghodsian N., Stoneking M., Saha N., Arnos C., Cortopassi G. (1993) A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* 21:4174–4179.
- Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (2007) Disponible en la World Wide Web: [http://www.impi.gob.mx/impi/jsp/indice\\_all.jsp](http://www.impi.gob.mx/impi/jsp/indice_all.jsp)
- Jaber L., Shohat M., Bu X., Fischel-Ghodsian N., Yang H.-Y., Wang S.-J., Rotter J.I. (1992) Sensorineural deafness inherited in a tissue-specific mitochondrial disorder. *J. Med. Genet.* 29:86–90.
- Jacobson E.D., Chodos R.B., Faloon W.W. (1960) An experimental malabsorption syndrome induced by neomycin. *Am. J. Med.* 28:524–533.
- Jaju M., Jaju M., Ahuja Y. (1986). Cytogenetic effect of neomycin on human lymphocytes *in vitro*. *Ind. J. Exp. Biol.* 24:595-598.
- Jeffrey G., Scott N., Zhimou W. (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 121:147–155.
- Judd P.A. and Truswell S.A. (1982) Comparison of the effects of high- and low-methoxyl pectins on blood and faecal lipids in man. *Br J Nutr.* Nov;48(3):451-8
- Kakuk T.J. (1980). Neomycin sulfate: three-generation rat reproductive teratology study. Technical report No. 756-9610-80-002 dated 30 November 1980, Agricultural Research and Development Laboratories, The Upjohn Company. Submitted to WHO by The Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA.
- Kalliomäki P.L., Taikina-aho O., Paco P., Anttila S., Kerola T., Sivonen S.J., Tienari J., Satinen S. (1989) Smoking and the pulmonary mineral particle burden. *IARC Sci Publ.* 90:323–329.
- Kasi M., Kausar P., Naz R., Millar I.C. (1995) Treatment of diarrhoea in infants by medical doctors in Balochistan, Pakistan. *J Diarrhoeal Dis Res.* 13(4):238-241.
- Kaul M. and Pilch S.D. (2002) Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA. *Biochemistry.* Jun 18;41(24):7695-706.



- Keen P. (1975). Some aspects of the pharmacology of antibiotics in the cat and dog. *J. Small Anim. Pract.* 16:767-773.
- Kim M. and Atallah M.T. (1993) Intestinal solubility and absorption of ferrous iron in growing rats are affected by different dietary pectins. *J Nutr.* Jan; 123(1):117-24.
- Klung S.W. and Cummings R.M. (2000) *Concept of genetics.* Prentice Hall. Inc. U.S.A. 816 pp.
- Klurfeld D.M. (1992) Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. *Cancer Res.* Apr 1;52(7):2055s-2059s.
- Korytko P.J., MacIntyre R.J., Scott J.G. (2000) Expression and activity of a housefly cytochrome P450, CYP6D1, in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology.* 9 (5):441–449.
- Kotecha B. and Richardson G. (1994) Ototoxicity *in vitro*: Effects of neomycin, gentamycin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hearing Res.* 73:173–184.
- Kuhnlein U., Gallagher R., Freeman H.J. (1983) Effects of purified cellulose and pectin fiber diets on mutagenicity of feces and luminal contents of stomach, small and large bowel in rats. *Clin Invest Med.* 6(4):253-60.
- Kunin C.M., Chalmers T.C., Leevy C.M. (1960) Absorption of orally administered neomycin and kanamycin. *New Engl. J. Med.* 262:380–385.
- Laboratorios Sanfer. (2004) Disponible en World Wide Web: <http://www.mediweb.com.mx/especialistas/PLM.php>
- Lash L., Hines R., Gonzalez F., Zacharewski T., Rothstein M. (2003) Genetics and Susceptibility to Toxic Chemicals: Do You (or Should You) Know Your Genetic Profile? *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward.* 305 (2):403-409.
- Lawrence H., Lash R.N., Hines F.J., Gonzalez T.R., Zacharewski, Mark A.R. (2003) Genetics and Susceptibility to Toxic Chemicals: Do You (or Should You) Know Your Genetic Profile?. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward.* 305(2):403-409.
- Levy J. (1986). Antibiotic activity in sputum. *J Pediatr.* 108(5 Pt 2):841-6.
- Lietman P.S. and Smith C.R. (1983) Aminoglycoside nephrotoxicity in humans. *J. Infect.* 5(2):s284-s292.
- Lindsley D.L. and Zimm G. (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster.* Academic Press, San Diego.

- Lipson S.M. and Stotzky G. (1983) Adsorption of reovirus to clay minerals: Effects of cation-exchange capacity, cation saturation, and surface area. *Appl Environ Microbiol.* 46:673–682.
- Lu A. (1998) Drug-Metabolism Research Challenges in the New Millennium. Individual Variability in Drug Therapy and Drug Safety *Drug Metab Dispos.* Dec;26(12):1217-22. 26(12):1217-1222.
- Luft F.C. and Evan A.P. (1980) Glomerular filtration barrier in aminoglycoside-induced nephrotoxic acute renal failure. *Ren Physiol.* 3(1-6):265-71.
- Luzzatto L., Apirion D., Schlessinger D. (1969) Polyribosome depletion and blockage of the ribosome cycle by streptomycin in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* Jun 14;42(2):315-35.
- Lynch S.R. and Puglisi J.D. (2001) Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol.* 9;306(5):1037-58.
- Maitra S., Dombrowski S., Waters L., Ganguly R., (1996) Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 180:165–171.
- Manna G.K. and Bardhan S. (1973). Effects of two antibiotics on the chromosomes and mitotic frequency in the bone marrow cells of mice. *Chromosomes Today.* 4:277-282.
- Matsuhiro B. and Rubio M.J. (2001) Chemical modification of lemon pectin. *Bol. Soc. Chil. Quím.* [online]. dic. 46(4):481-486. Disponible en la World Wide Web:<[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036616442001000400012&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036616442001000400012&lng=es&nrm=iso)>.
- May C.D. (1990) Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydr. Polymers* 12:79-99.
- Mayo J.K. and Aaron C.S. (1995a). U-4567 (Neomycin Sulfate): Evaluation of U-4567 (Neomycin sulfate) in the ASA52/XPRT mammalian cell mutation assay with and without metabolic activation. Unpublished report No. 7228-95-125. Submitted to WHO by Pharmacia and Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA.
- Mayo J.K. and Aaron C.S. (1995b). U-4567 (Neomycin sulfate): Evaluation of U-4567 (Neomycin sulfate) in the acute test for chemical induction of chromosome aberration in mouse bone marrow cells *in vivo*. Unpublished report No. 7228-95-130. Submitted to WHO by Pharmacia and Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA.

- Mayo J.K., Smith A.L., Aaron C.S. (1995). Neomycin sulphate (U-4567): Evaluation of neomycin sulfate (U-4567) in the preincubation mutagenesis assay in bacteria (Ames Assay). Unpublished report No. 7228-94-133. Submitted to WHO by Pharmacia and Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA.
- Mead F. and Williams (2002) Lock of the ryanodine receptor channel by neomycin is relieved at high holding potentials. *Biophys J.* Apr;82(4):1953-63.
- Mehta R. and Champney W.S. (2003) Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol.* 47(3):237-43.
- Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P. (1999) Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:727–737.
- Moore R.D., Smith C.R., Lietman P.S. (1984) Association of aminoglycoside plasma levels with therapeutic outcome in gram-negative pneumonia. *Am J Med.* Oct; 77(4):657-62.
- Morris S.D., Rycroft R.J., White I.R., Wakelin S.H., McFadden J.P. (2002) Comparative frequency of patch test reactions to topical antibiotics. *British Journal of Dermatology.* 146: 1047-1051.
- Mortensen J.L. (1961) Adsorption of hydrolyzed polyacrylonitrile on kaolinite. *Clays Clay Miner.* 9:530–545.
- Mossman B.T. and Craighead J.E. (1982) Comparative cocarcinogenic effects of crocidolite asbestos, hematite, kaolin and carbon in implanted tracheal organ cultures. *Ann Occup Hyg,* 26: 553–567.
- Muckter H. (2003) What is toxicology and how does toxicity occur? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 17(1):5-27.
- Muñoz Hernández, Adriana (1997) Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencia, UNAM.
- Nakae R. and Nakae T. (1982) Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 22:554-559.
- Nebert D.W. and Russell D.W. (2002). Importancia clínica de los citocromos p450. *Lancet.* 360:1155-1162.
- Nöthinger (1970) Sucrose density separation: a method for collecting larger number of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv.* 45:177.

- Ohkami H., Tazawa K., Yamashita I., Shimizu T., Murai K., Kobashi K., Fujimaki M. (1995) Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis.. *Cáncer Res De Jpn J.* 86(6):523-9.
- Osornio-Vargas A., Hernandez-Rodriguez N., Yanez-Buruel A., Ussler W., Overby L., Brody A. (1991) Lung cell toxicity experimentally induced by a mixed dust from Mexicali, Baja California, Mexico. *Environ Res.* 56:31–47.
- Osterberg R.E. and See N.A. (2003) Toxicity of Excipients-A Food and Drug Administration Perspective. *International Journal of Toxicology.* Vol 22, Num 5. Sep-Oct. Pp 377–380.
- Pagan i Gilabert J. (1996) Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón. Tesis de Posgrado. Servei de Publicacions. Universidad de Lleida. Disponible en la World Wide Web: <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0424101-101108/>.
- Parque B.K. and Pirmohamed M. (2001) Toxicogenetics in drug development. *Toxicol. Lett.* 120:281-291.
- Peña C.E., Carter D.E., Ayala-Fierro F. (2001) Toxicología ambiental. evaluación de riesgos y restauración ambiental. Universidad de Arizona Disponible en la World Wide Web:<http://www.superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c2-3-4-1>.
- Pittinger C. and Adamson R. (1972) Antibiotic blockade of neuromuscular function. *Annu Rev Pharmacol.* 12:169-84.
- Poth E.J., Fromm S.M., Wise R.I., Hsiang C.M. (1950) Neomycin, a new intestinal antiseptic. *Texas Rep. Biol. Med.* 8:353–360.
- Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. (2000) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Ames: Iowa State University Press, 191–228 pp.
- Prezant T.R., Shohat M., Jaber L., Pressman S., Fischel-Ghodsian N. (1992) Biochemical characterisation of a pedigree with mitochondrially inherited deafness. *Am. J. Med. Genet.* 44:465–472.
- Prezant T.R., Agapian J.V., Bohlman M.C., Bu X., Oztas S., Qui W.-Q., Arnos K., Cortopassi G.A., Jaber L., Rotter J.I., Shohat M., Fischel-Ghodsian N. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced deafness and non-syndromic deafness. *Nature Genet.* 4:289–293.
- Queener S.F., Luft F.C., Hamel F.G. (1983) Effect of gentamicin treatment on adenylate cyclase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities in renal tissues of rats. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov;24(5):815-8.

- Rabbani G.H., Teka T., Zaman B., Majid N., Khatun M., Fuchs G.J. (2001) Clinical studies in persistent diarrhea: dietary management with green banana or pectin in Bangladeshi children *Gastroenterology*. Sep;121(3):554-60.
- Ramos P., Abundis H., Gaytán J.C., Ordaz M.G., Orozco P.G., Maldonado J., Hernández J., González E., Reyes P., Galicia E.M., Muñoz J.A. (1993) *Manual de Laboratorio de Genética para Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill. México. 131 pp.
- Rewitz K.F., Kjellerup A., Jorgensen C., Petersen O., Andersen (2004) Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138. 89–96.
- Rivas Martínez Hugo (1999) Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), metilmetano-sulfato (MMS), colchicina, azida de sodio y cloruro de plomo. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, UNAM. 61 pp.
- Riviere J.E., Craigmill A.L., Sundloff, S.F. (1991) *Handbook of comparative pharmacokinetics and residues of veterinary antimicrobials*. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc. 263–275 pp.
- Rodríguez J. (2006) La pectina de manzana. La fibra soluble como complemento de la dieta puede ser útil en el tratamiento de ciertas enfermedades. Disponible en la World Wide Web: [www.consumer.es/web/es/alimentacion/php](http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/php).
- Rodríguez M. (2001) Química inorgánica. El silicio y los silicatos. Disponible en la World Wide Web: <http://depa.pquim.unam.mx/~roperez/silicatosencadenas.html>.
- Rodriguez-Arnaiz R. (1997) Genotoxic activation of hydrazine, two dialkylhydrazines, thiourea and ethylene thiourea in the somatic wrwq assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 395:229–242.
- Rosenstein Ster, Emilio (1994). *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Cuarta edición. Ediciones PLM, S. A. de C. V. México.
- Roussel A.J. and Brumbaugh G. (1991) Treatment of diarrhea of neonatal calves.. *Alimento Anim Pract Del Norte De Clin Del Veterinario*. (3):713-28.
- Rubin G.M. and Lewis E.B. (2000) A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research. *Science*. 287:2216-2220.
- Russell P.J. (1998) *Genetic*. The Benjamín/Cummings Publishing. Company, Inc., Fifth Edition, USA, 894 pp.

- Schenkman J. B., Choudhary, Dharamainder, Jansson, Ingela, Sarfarazi, Mansoor, Stoilov, Ivaylo (2003). Involvement of Cytochromes P450 in Development. Proc. Indian natn Sci Acad. B69. 6:929-941.
- Schentag J.J., Gengo F.M., Plant M.E., Danner D., Mangiones S., Jusko W.J. (1979) Urinary casts as an indicator of renal tubular damage in patients receiving aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 16:468-474.
- Schiffenbauer M. and Stotzky G. (1982) Adsorption of coliphages T1 and T7 to clay minerals. Appl Environ Microbiol, 43:590–596.
- Secretaría de Salud (2007): Disponible en la World Wide Web: <http://www.salud.gob.mx/>
- Shannon and Phillips (1982) Mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates. J Antimicrob Chemother. Feb, 9(2):91-102.
- Silverblatt F. (1982) Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. Rev Infect Dis. Sep-Oct; 4 Suppl:S360-5.
- Sirtori C.R., Manzoni C., and Lovati M.R. (1991) Mechanisms of lipid-lowering agents. Cardiology. 78:226–235.
- Sokoll M.D. and Gergis S.D. (1981) Antibiotics and neuromuscular function. Anesthesiology. Aug;55(2):148-59.
- Sosa A. (1999) Los antibióticos y su uso. Alliance for the prudent use of antibiotics (APUA). Disponible en la World Wide Web: <http://www.tufts.edu/med/apua/Patients/spanishAntibioticUse.html>
- Stark A., Nyska A., Madar Z. (1996) Metabolic and morphometric changes in small and large intestine in rats fed high-fiber diets. Toxicol Pathol. Mar-Apr;24(2):166-71.
- Steel R.F. and Anderson W. (1972) The interaction between kaolinite and *Staphylococcus aureus*. J Pharm Pharmacol. 24(Suppl): 1–129.
- Tai P.C., Wallace B.J., Davis B.D. (1978) Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation. Natl Acad. Sci. U.S.A. 75:275-279.
- Tamura M. and Suzuki H. (1997) Effects of pectin on jejunal and ileal morphology and ultrastructure in adult mice. Ann Nutr Metab. 41(4):255-9.
- Tazawa K., Okami H., Yamashita I., Ohnishi Y., Kobashi K., Fujimaki M. (1997) Anticarcinogenic action of apple pectin on fecal enzyme activities and

- mucosal or portal prostaglandin E2 levels in experimental rat colon carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* Mar;16(1):33-8.
- Thomas S.P., Buckland J.R., Rhys-Williams S.R. (2005) Potential ototoxicity from triamcinolone, neomycin, gramicidin and nystatin (Tri-Adcortyltrade mark) cream. *J Laryngol Otol.* Jan;119(1):48-50.
- Tran Ba Huy P., Meulemans A., Wassef M., Manuel C., Sterkers O., Amiel C. (1983) Gentamicin persistence in rat endolymph and perilymph after a two day constant infusion. *Antimicrob Agents Chemother.* 23:344-346.
- Trujillo O.E., and Navarro A.M. (2006) Antidiarreicos. Disponible en la World Wide Web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/atfm133/revfarma.html>
- Vademécum (2007) Disponible en la World Wide Web: [http://www.vademecum.medicom.es/registro\\_info.cfm](http://www.vademecum.medicom.es/registro_info.cfm)
- Vallyathan V., Schwegler D., Reasor M., Stettler L., Clere J., Green F. (1988) Comparative in vitro cytotoxicity and relative pathogenicity of mineral dusts. *Ann Occup Hyg*, 32(Suppl.): 279–289.
- Vogel E.W. and Zijlstra J.A. (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Oct;182(5):243-64.
- Vogel E.W., Graf U., Frei H.J., Nivard M.M. (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *ARC Sci Publ.* (146):427-70.
- Vogel E.W., Nivard, M.J., Zijlstra, J.A. (1991) Variation of spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: a pilot study on the effects of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. *Mutat Res.* Sep-Oct;250(1-2):291-8.
- Wagner J.C., Griffiths D.M., Munday D.E. (1987) Experimental studies with palygorskite dusts. *Br J Ind Med.* 44:749–763.
- Waksman S.A., Lechevalier H.A., Dale A.H. (1949) Neomicyn- Production and antibiotic properties. *J Clin Invest.* Sep, 28(5 Pt 1): 934–939.
- Wallace W.E., Headley L.C., Weber K.C. (1975) Dipalmitoyl lecithin surfactant adsorption by kaolin dust *in vitro*. *J Colloid Interface Sci*, 51: 535–537.
- Wermuth C.G. (2004) Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? *Drug Discov Today.* Oct 1;9 (19):826-7.
- World Health Organization (1973) Evaluación toxicológica de algunos colores para alimentos, emulsiones, estabilizadores, agentes antiendurecimiento y otras

sustancias. Programa Internacional en seguridad de químicos. Disponible en la World Wide Web: <http://www.WHO.int/es/>.

World Health Organization (2003) Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Neomycin. Disponible en la World Wide Web: [http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec\\_1689.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_1689.htm).

World Health Organization (2005) Neomycin (JECFA Food Additives Series 51)12-13-05. Disponible en la World Wide Web: <http://www.inchem.org/>

Yamada H., Hashimoto H., Akiyama M., Kawabata Y., Iwai K. (1997) Talc and amosite/croc-idolite preferentially deposited in the lungs of nonoccupational female lung cancer cases in urban areas of Japan. *Environ Health Perspect.* 105:504–508.

Yamasoba T. and Tsukuda K. (2004) Ototoxicity after use of neomycin eardrops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA. *J Laryngol Otol.* Jul;118(7):546-50.

Zijlstra J. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral. Druk: Krips repro Meppel. 192 pp.

Zijlstra J. and Vogel E. (1988) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 198:73-83.