

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

43

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DEL POTENCIAL
TERATOGENICO DEL CLORHIDRATO DE
SIBUTRAMINA EN *Drosophila melanogaster*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
MARIA DEL CARMEN DIAZ JIMENEZ



DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. ADRIANA MUÑOZ HERRANDEZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

003 FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

PAGINACION DISCONTINUA



LIBERTAD NACIONAL
AVANZADA
JUSTICIA

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Determinación del potencial teratogénico del Clorhidrato de sibutramina en Drosophila melanogaster"

realizado por Ma. del Carmen Díaz Jiménez

con número de cuenta 7309330-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

M. en C. Armando Muñoz Moya

Suplente

Biól. Rita Virginia Arenas Rosas

Rita V. Arenas R.

Suplente

Biól. Blanca Rosa Hernández Bernal

Blanca Rosa Hernández Bernal

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.A.M.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
 DE BIOLÓGICAS

2

DEDICATORIA

A mis padres: Simona y Enrique

Por brindarme la alternativa de vivir, por darme todo su apoyo, cariño, amor y comprensión y por ser como son.

A mis hermanos: Ma. Esther, José Manuel, Pedro Enrique, Alejandra, José Alberto, Ma. Juana, Adriana Elizabeth y Juan José.

Por su cariño, apoyo y comprensión.

A mi esposo: Rogelio

Por su apoyo y su amor.

A mis hijos: Lourdes Isabel y Eduardo

Porque son la fuerza que me ha impulsado a ser lo que soy.

A mis nietos: Christian Eduardo y Aaliyah Dana

Con todo mi amor y cariño.

A mis amigos del Colegio de Bachilleres y de la Secundaria Técnica No. 72.

Por su apoyo y cariño.

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptional.

NOMBRE: Ma. del Carmen Díaz Jimenez

FECHA: 11 - noviembre - 2003

FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Patricia Ramos Morales, Maestra en Ciencias Adriana Muñoz Hernández, Maestro en Ciencia José Armando Muñoz Moya y a la Bióloga Blanca Rosa Hernández Bernal:

Por su paciencia, comprensión y disposición para la realización de este trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky"

Por su apoyo y hospitalidad.

INDICE

Resumen	3
Introducción	4-25
Metabolismo	
Biología del desarrollo	
Teratogénesis	
<i>Drosophila</i> como modelo biológico	
Generalidades del desarrollo en <i>Drosophila melanogaster</i>	
El gen citocromo P450 en <i>Drosophila melanogaster</i>	
Prueba de teratogénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	
Clorhidrato de sibutramina	
Justificación	26
Objetivo	26
Hipótesis	26
Material y métodos	27-28
Resultados	29-30
Discusión	30-32
Conclusiones	33
Referencias	34-37
Apéndice de figuras	38
Apéndice de tablas y gráficas	39-44

RESUMEN

En el ambiente existen una gran variedad de agentes y factores a los que los seres vivos están expuestos, mismos que pueden provocar mutaciones, procesos relacionados con cáncer o la inducción de malformaciones durante el desarrollo. La Toxicología Genética identifica factores capaces de interactuar con el material genético de los organismos, estudia los posibles mecanismos asociados con su actividad genotóxica con la finalidad de establecer los márgenes de seguridad requeridos para la exposición controlada de los seres vivos.

El clorhidrato de sibutramina es un medicamento aprobado por la FAD a partir de 1999, empleado en los tratamientos prolongados para la reducción de peso. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto teratogénico del clorhidrato de sibutramina a través de la prueba *Drosophila* Teratogenesis Test (DTT) en la cepa silvestre Canton-S de *Drosophila melanogaster*.

Larvas de 72 ± 4 horas de edad fueron expuestas por alimentación en medio instantáneo Carolina, a un tratamiento subcrónico mediante diluciones progresivas del compuesto, considerando la dosis diaria recomendada para el hombre (10 mg). Posterior al tratamiento los organismos recobrados en las series testigo como en las experimentales fueron fijados en alcohol al 70% para su análisis al microscopio. Se registró el índice de sobrevivencia, el índice sexual y la frecuencia de alteraciones. Los resultados mostraron un incremento en el número de organismos recobrados en las series tratadas, atribuido al estímulo que representa la exposición al clorhidrato de sibutramina; con respecto al índice sexual no se encontraron diferencias significativas y por último, en cuanto a la inducción de malformaciones se obtuvo un incremento significativo en la frecuencia de alteraciones que comprometieron a las placas genital y anal de hembras y placa genital de machos en los lotes experimentales.

INTRODUCCION

En la actualidad, la contaminación producida por el hombre ha generado una gran cantidad de compuestos reactivos que están presentes en la biosfera como resultado de los procesos industriales y de la combustión incompleta de las fuentes energéticas como el carbón y la gasolina. Como resultado de esta actividad, los seres vivos están expuestos a agentes químicos ambientales potencialmente nocivos (Tyler, 1994).

Las consecuencias de la exposición a diversos factores han sido estudiadas principalmente en las células germinales de diversos organismos, sin embargo con el tiempo se ha acumulado información de su impacto en las células somáticas, haciendo evidente la importancia de la detección y el estudio de este tipo de procesos sobre todo para el hombre, ya que muchos de ellos se relacionan con cáncer o la inducción de malformaciones (Ames *et al.*, 1973; Ames, 1983; Moutschen, 1985). Entre los factores implicados en la producción de alteraciones congénitas, se incluye también a los contaminantes ambientales con capacidad mutagénica y teratogénica, además de otros cuya acción se manifiesta en infertilidad, aborto y muerte fetal.

Gran parte de los agentes genotóxicos son promutágenos y/o procarcinógenos, por lo que al entrar al organismo sus genotoxinas son transformadas, en órganos como el hígado, el riñón o testículo, a derivados altamente reactivos capaces de unirse a macromoléculas (Vogel, 1991).

La Toxicología Genética es la disciplina científica que identifica factores capaces de interactuar con el material genético de los seres vivos, determina los mecanismos asociados con la actividad genotóxica y establece los márgenes de seguridad requeridos para la exposición controlada de los seres vivos, con base en la predicción del riesgo asociado a la exposición. También estudia los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de los tóxicos, con la finalidad de entender las causas que generan la diferente susceptibilidad, que existe en la respuesta de los diferentes organismos y especies.

Para lograr este objetivo, se han desarrollado diferentes metodologías empleando modelos biológicos o sistemas de prueba, incluyendo sistemas *in vivo* e *in vitro*, así como organismos de diferente complejidad en la escala evolutiva, como: bacterias, levaduras, insectos, plantas y mamíferos (Dean, 1981), cuya respuesta en conjunto estima el posible impacto en los seres humanos (Cassarett, 1975; Sorsa, 1982; Brusick, 1987) y a través de los cuales se han obtenido durante los últimos 20 años, datos importantes en lo referente al daño ocasionado a la salud del

hombre, lo cual de otra manera sólo hubiera sido posible con la exposición accidental a estas sustancias (Cassarett, 1975; Brusick 1987 y 1988). Estos modelos son evaluados con base en su capacidad de respuesta, de tal forma que sólo aquellos que resultan sensibles y capaces de discriminar entre los diferentes tipos de daño, son aceptados para usarse de manera rutinaria (Tabla 1).

Metabolismo

La magnitud de la respuesta tóxica en un organismo determinado depende del tipo de exposición (dosis, tiempo, ruta y vía de ingreso) y de factores relacionados con las características del organismo, del medio ambiente y de la sustancia misma (Albert, 1988). Existen diferentes rutas de ingreso del tóxico al organismo: ingestión, respiración, contacto, vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular y subcutánea. Por otro lado, con base en la magnitud del periodo al cual son expuestos los organismos al tóxico, con relación a la duración de su ciclo de vida, y la dosis administrada, las exposiciones se clasifican en: a) crónicas, b) subcrónicas y c) agudas.

La absorción, distribución, biotransformación y excreción de los agentes genotóxicos, requiere del transporte de sustancias a través de las diversas membranas celulares, por lo que deben tenerse en cuenta los mecanismos mediante los cuales los compuestos pueden atravesarlas, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y de las membranas que afectan esta transferencia, por ejemplo: tamaño, forma y grado de ionización de las moléculas, la solubilidad relativa en lípidos de las formas ionizada y no ionizada, entre otras (Goodman *et al.*, 1990) (Figura 1).

La absorción describe la velocidad con la que un compuesto abandona el sitio de entrada en el organismo y depende de la solubilidad del compuesto, área de transferencia, gradiente de concentración, coeficiente de transferencia de las membranas y capas de células hasta llegar al torrente sanguíneo. La distribución también puede estar restringida por la unión del compuesto a proteínas plasmáticas, lo que limita su concentración en los tejidos y en el sitio de acción. Debido a que la unión de los compuestos con las proteínas plasmáticas puede ser poco específica, los compuestos con características fisicoquímicas similares pueden competir entre sí y con sustancias endógenas por los sitios de unión. La exposición directa al compuesto finaliza comúnmente con su biotransformación y excreción, pero también puede deberse a su

redistribución desde el sitio de acción a otros tejidos o sitios (Goodman *et al.*, 1990; Timbrell, 1989).

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas que permiten el transporte a través de las membranas celulares durante la absorción y la distribución, también afectan a su posterior excreción. Así, la biotransformación enzimática de los compuestos a metabolitos más polares o menos liposolubles incrementa su excreción y disminuye su volumen de distribución. Esta biotransformación reduce la carga de sustancias extrañas y es crítica para la supervivencia del organismo.

Estos conjuntos de reacciones son catalizadas por enzimas, que transforman a los compuestos endógenos. Se distinguen dos tipos de reacciones metabólicas, las llamadas de fase I y las de fase II. Las reacciones de fase I convierten al compuesto original en un metabolito más polar por oxidación, reducción o hidrólisis. Las reacciones de fase II, que también se denominan reacciones de conjugación o síntesis, requieren de la unión del compuesto o de su metabolito polar, con un sustrato endógeno como glucuronato, sulfato, acetato o un aminoácido (Goodman *et al.*, 1990; Timbrell, 1989; Vogel, 1991). Las células cuentan con dos sistemas de enzimas que actúan en la fase I, las amino-oxigenasas y los citocromos P-450. Ambos sistemas se encuentran localizados en el retículo endoplasmático liso del hepatocito (designado en centrifugaciones diferenciales como fracción microsomal). Las primeras oxidan aminas y compuestos sulfurados y los segundos están formados por dos proteínas diferentes, una tiene función de reductasa y la otra es una hemoproteína con actividad de oxigenasa. El estudio de los genes que codifican las enzimas que participan en la transformación metabólica de los compuestos, sugiere que éstos evolucionaron como un mecanismo que elimina a los constituyentes tóxicos de los alimentos, como flavonas, terpenos, esteroides y alcaloides, así como a los tóxicos ambientales (Goodman *et al.*, 1990).

En algunos casos, la biotransformación deriva en la bioactivación del compuesto, es decir, se producen metabolitos que son más tóxicos que la molécula original. En consecuencia, un producto químico puede interactuar y alterar el DNA dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, así como de la intensidad, forma y duración de la exposición, la dote genética de los organismos, sexo, edad, hábitos, salud, preñez, exposición a múltiples factores y asociación con otras enfermedades, entre otros factores (Ames, *et al.*, 1973; Clayson 1980 y Graf *et al.*, 1984).

Tabla 1. Pruebas empleadas en la evaluación genotóxica de diferentes xenoblífcos (Tomado de Vega, 1985)

Tipo de daño investigado	EN CELULAS SOMATICAS		EN CELULAS GEMINALES
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>
Ateraciones cromosómicas	<p>1) Pruebas en cultivos de células de mamíferos</p> <p>-Ateraciones cromosómicas</p> <p>-Intercambio de cromátidas hermanas</p>	<p>1) Micronúcleos (MN)</p> <p>2) Análisis citogenético de las células de la médula ósea</p> <p>-Ateraciones cromosómicas</p>	<p>1) Prueba de letales dominantes y de translocaciones heredables en <i>Drosophila</i></p> <p>2) Prueba de letales dominantes en ratón</p> <p>3) Prueba de translocaciones en ratón</p> <p>4) Análisis citogenético de células germinales</p> <p>5) Prueba de no-disyunción cromosómica</p>
Mutación génica	<p>1) Pruebas bacterianas mutaciones específico</p> <p>2) Pruebas de levaduras mancha</p> <p>3) Pruebas de hongos</p> <p>4) Pruebas de cultivos de células de mamíferos</p>	<p>1) Pruebas de en un locus (ratón) (Prueba de la o Spol test)</p>	<p>1) Pruebas de letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila</i></p> <p>2) Pruebas de mutaciones en un locus específico en ratón; mutaciones esqueléticas, morfológicas, electroforéticas, etc.</p> <p>3) Anomalías de los espermatozoides en la descendencia (ratón)</p>

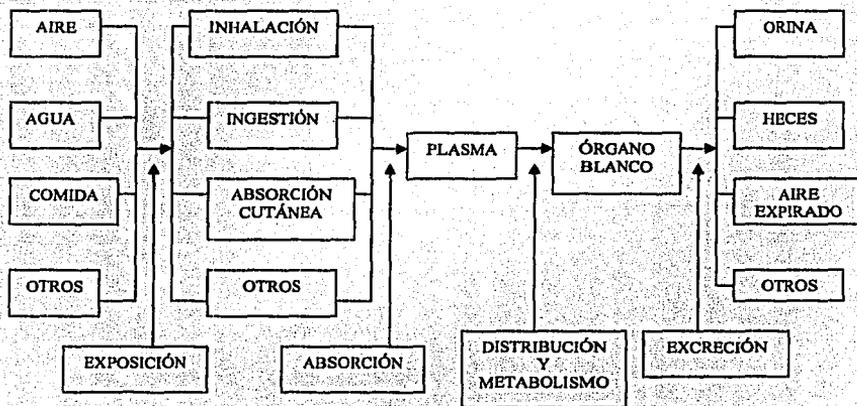


Figura 1. Etapas de la Interacción entre un xenobiótico y los organismos (Tomado de Vega 1985).

Con base en el tipo de efecto que provocan los diferentes compuestos en los organismos, se les ha clasificado de la siguiente manera: 1) **mutágenos**, son sustancias que producen cambios genéticos heredables que se manifiestan en la descendencia de los organismos expuestos; 2) **carcinógenos**, son compuestos que actúan en células somáticas alterando la regulación del ciclo celular, el daño se hereda sólo dentro de la estirpe celular, lo que genera la formación de clonas, dando origen a procesos malignos como el cáncer; y 3) **teratógenos**, los cuales actúan preferentemente durante la organogénesis, provocando alteraciones que se expresan como malformaciones congénitas las cuales, aunque no son heredables, alteran el desarrollo de los organismos, llegando incluso a ser letales (WHO, 1984) (Tabla II).

Tabla II. Clasificación de los compuestos de acuerdo con su efecto en los organismos (Tomado de Vega, 1985).

CLASIFICACIÓN	CÉLULAS SUSCEPTIBLES O BLANCO	PERIODO DE SUSCEPTIBILIDAD
Mutágeno	Germinales	Todos los estadios de la gametogénesis
Carcinógeno	Somáticas	Probablemente todas las etapas del ciclo celular
Teratógeno	Tejidos inmaduros	Periodos de diferenciación temprana

Biología del desarrollo

La ontogénesis o embriogénesis, de un individuo corresponde a una sucesión continua de cambios y variaciones más o menos complejas (Figura 2). El desarrollo embrionario posee características que marcan fases durante las que se desarrollan los procesos del mismo orden. El inicio del desarrollo en la mayoría de los organismos requiere de la sucesión cronológica de las siguientes etapas:

- a) Fertilización
- b) Segmentación
- c) Gastrulación
- d) Organogénesis

El desarrollo de la ingeniería genética es decir, el arreglo dirigido de genes dentro de receptores biológicos, ha permitido un gran avance en la investigación del desarrollo embrionario en insectos, anfibios y mamíferos, llegándose a establecer el mecanismo por el cual las células logran una diferenciación en este proceso (Wolpert, 1998).

La estructura de un organismo está controlada por sus genes. La información genética fluye del DNA al RNA y a las proteínas. Durante el proceso de la transcripción, la secuencia de bases de

una hebra del DNA cromosómico se transcribe, formando una sola hebra de RNA. Después de la transcripción, el RNAm pasa a los ribosomas, que sintetizan la ordenación secuencial de los aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Wolpert, 1998).

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* ha desempeñado un papel esencial para el desarrollo de la genética. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto la existencia de un tipo de genes que participan en el control del desarrollo y cuya función específica es la de determinar el patrón corporal. El sistema de regulación genética consiste en tres clases de genes que controlan el patrón de desarrollo: 1) los productos de los genes de polaridad del huevo actúan definiendo las coordenadas espaciales del embrión, mediante la formación de gradientes del morfogen en el huevo; 2) los genes de segmentación, interpretan la información de posición proporcionada por el gradiente inicial del morfogen. Estos genes dividen el embrión en una serie de segmentos, las unidades básicas modulares a partir de las cuales se construyen los insectos y 3) los productos de los genes de segmentación modulan la expresión de los genes homeóticos selectores, que mantienen la diferencia entre un segmento y otro (Griffiths, 2000).

Por medio de las actividades combinadas de los genes de segmentación y de los genes homeóticos selectores, las células de cada segmento reciben la información de valores posicionales, que guía su comportamiento posterior. Por último, en el interior de cada subdivisión de los segmentos del cuerpo, las células se comunican entre sí generando los detalles concretos de la estructura madura, gobernada aparentemente por la función de intercalación de la información (Wolpert, 1998).

Durante las divisiones celulares que ocurren después de la fertilización, las células toman diferentes formas, tamaños, funciones y potenciales, además de establecer relaciones espaciales particulares. Todos estos eventos ocurren según factores definidos de tiempo. En algunas especies como el ratón, las células que se forman en las primeras divisiones poseen todas el mismo potencial. A medida que la división celular procede, las células diferentes se orientan hacia la formación de sólo un número limitado de tipos celulares. Las células determinadas están destinadas a diferenciarse en una forma específica y sus células hijas heredan este programa. La determinación viene seguida de una diferenciación, adquisición de diferentes fenotipos, ya sea a nivel morfológico o de propiedades bioquímicas. Existen evidencias que indican la existencia de un mecanismo de expresión génica diferencial, tanto en el tiempo como en el espacio, que determina el desarrollo y la diferenciación.

En *Drosophila*, se han realizado estudios a nivel molecular con la finalidad de correlacionar los cambios espacio-temporales con la expresión génica diferencial. Los segmentos que se observan tanto en moscas en desarrollo, como en adultas se encuentran normalmente asociados con caracteres morfológicos específicos como ojos, antenas, alas y patas. Se han identificado grupos de mutantes en *Drosophila* (*antennapedia*, *bithorax*, etc.), en los que los caracteres morfológicos particulares se desarrollan en posiciones anormales. En *antennapedia* por ejemplo, aparecen patas donde deberían encontrarse antenas. Los genes que están involucrados en este tipo de transformaciones morfológicas son denominados, genes homeóticos. El descubrimiento de mutantes homeóticos permitió realizar ingeniosos experimentos que demuestran que el cuerpo de la mosca normal está formado por un conjunto de regiones discretas, cada una de las cuales expresa un conjunto diferente de genes homeóticos (Gilbert, 1990).

El análisis de la secuencia de estas proteínas sugiere que existen similitudes entre las pertenecientes a vertebrados y las de *Drosophila*. Todos los vertebrados tienen cuatro complejos homeobox, cada uno localizado en cromosomas separados. Durante la evolución estos complejos homeobox probablemente aparecieron como resultado de las duplicaciones de un grupo simple de genes homeobox en el ancestro primitivo de invertebrados. Consecuentemente cada humano por ejemplo, tiene cuatro genes que asemejan al gen *Abdominal - B* de *Drosophila* y otro que asemeja a *Deformed* (Casares y Sánchez, 1995).

Teratogénesis

La Teratogénesis, o dismorfogénesis, puede definirse como aquella alteración morfológica, bioquímica o funcional que ocurre durante el desarrollo embrionario. Estas alteraciones pueden clasificarse en mayores por ejemplo fucomelia o menores (retraso en el desarrollo). Cualquier factor (radiaciones, medicamentos) o condición (enfermedad genética) que tiene la capacidad de generar anomalías del desarrollo, es considerado como teratógeno (Estivill, 1993).

Cada teratógeno actúa en un aspecto particular del metabolismo celular, por lo que diferentes agentes teratogénicos tienden a producir efectos diferentes, pueden actuar en distinto periodo del desarrollo embrionario (Figura 3) y sobre el mismo sistema, sin embargo, cada fármaco producirá un modelo o patrón específico de malformaciones. Existen otros factores como la

concentración o la dosis, el metabolismo materno y el transporte placentario que pueden modificar la intensidad de la respuesta (Goldstein, 1978).

En humanos algunos medicamentos pueden afectar el desarrollo en diversos momentos de la gestación, aunque el período de mayor riesgo es el primer trimestre, ya que es durante la fase embrionaria (desde el día 20 hasta el 55) en la que tiene lugar la formación de la mayoría de los órganos (organogénesis) por lo que es el período donde se tiene mayor riesgo de que un medicamento induzca anomalías sobre el feto (Alzpuru, *et al.*, 1989; Estivill, 1993). Se considera que de 5 a 10% de las malformaciones congénitas son provocadas por la acción de teratógenos conocidos como el virus de la rubéola (Olson, 1993).

Es necesario considerar que los cambios fisiológicos propios de la gestación (aumento de volumen plasmático, incremento del aclaramiento renal, etc.) pueden afectar los parámetros farmacocinéticos de los medicamentos, alterando su eficacia y su toxicidad, tanto para la madre como para el feto. Por otro lado, aparecen otros compartimentos (placenta y órganos fetales) que también pueden modificar la respuesta farmacológica (Rubio *et al.*, 1993; Estivill, 1993).

En los Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA), clasifica a los fármacos en cinco categorías, en función de los riesgos potenciales de teratogénesis (Rubio *et al.*, 1993; Estivill, 1993; Briggs *et al.*, 1994). Estas categorías se asignan con fundamento en el tipo de estudios realizados y de la información disponible para evaluar el posible riesgo (Briggs, *et al.*, 1994):

Categoría A: los estudios controlados realizados no han demostrado un riesgo para el feto durante el primer trimestre, y no existe evidencia de riesgo en trimestres posteriores, por lo que la posibilidad de teratogénesis parece remota.

Categoría B: se distinguen dos supuestos:

1. cuando los estudios en animales no han mostrado riesgo teratogénico, aunque no se dispone de estudios controlados en embarazos humanos, o
2. cuando los estudios en animales han mostrado un efecto teratogénico que no fue confirmado en estudios en embarazadas durante el primer trimestre de gestación, y no existe evidencia de riesgo en trimestres posteriores.

Categoría C: Se asigna a aquellos fármacos para los que se considera que sólo han de administrarse si el beneficio esperado justifica el riesgo potencial para el feto. Pueden existir dos posibilidades:

1. que los estudios en animales hayan revelado efectos teratogénos sobre el feto y no existan estudios en mujeres, o
2. que no existan estudios disponibles, ni en mujeres ni en animales.

Categoría D: Serán aquellos fármacos para los que existe una clara evidencia de riesgo teratogénico, aunque los beneficios pueden hacerlos aceptables a pesar de los riesgos que comporta su uso durante el embarazo; por ejemplo cuando el medicamento es necesario para tratar una enfermedad grave o una situación límite y no existen alternativas más seguras.

Categoría X: Los medicamentos con esta categoría están contraindicados en mujeres que están o pueden quedar embarazadas. Los estudios, en animales o en humanos, han mostrado la aparición de anomalías fetales, y/o existen evidencias de riesgo teratogénico basado en la experiencia humana; por lo que el riesgo de su empleo en embarazadas claramente supera el posible beneficio.

Para realizar una prescripción basándose en esta clasificación hay que tener en cuenta que los estudios en animales son orientativos, pero no totalmente extrapolables a la especie humana.

La tragedia de la talidomida (nacimiento de aproximadamente 10 000 niños con malformaciones de las extremidades, en Alemania, Japón y otros países) al comienzo del decenio de 1960 despertó gran preocupación acerca de la posibilidad de que ciertos medicamentos produjeran malformaciones congénitas durante el desarrollo embrionario de los organismos. Este compuesto no demostró ser un agente teratogénico en los ensayos realizados en roedores, y actualmente está totalmente contraindicada en el embarazo (categoría X). Su efecto nocivo se induce durante los días 35 y 50 del embarazo, sin embargo, no produce ningún efecto en el embrión antes o después de ese periodo (Figura 3) (Goldstein, 1978).

Con base en lo anterior es importante establecer el riesgo que representa para los organismos la exposición a estas sustancias. Una de las medidas ha sido la identificación del problema a través de estudios epidemiológicos y de laboratorio, utilizando diferentes sistemas de prueba *in vivo* o *in vitro*, para establecer y caracterizar el efecto potencial que se provocaría en las poblaciones expuestas.

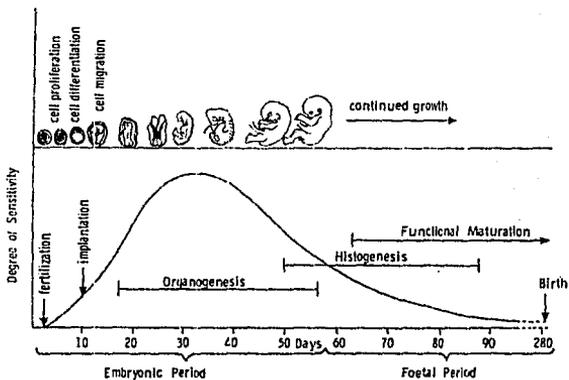


Figura 2. Etapas de la embriogénesis (Tomado de Gilbert, 1990).

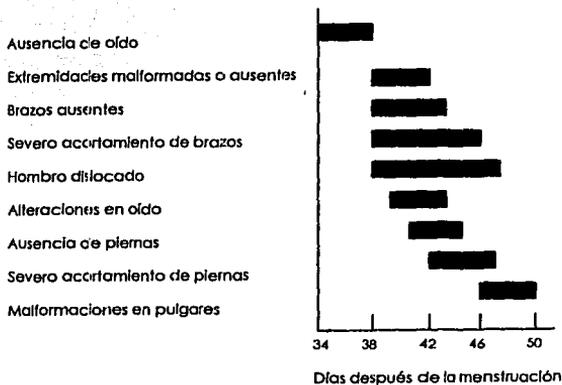


Figura 3. Periodo de susceptibilidad al efecto teratogénico de la talidomida durante el desarrollo embrionario (Tomado de Gilbert, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

***Drosophila melanogaster* como modelo biológico**

El empleo de los diversos bioensayos se orienta hacia la determinación del riesgo potencial que implica la exposición a alguna sustancia en particular, y hacia la predicción de la asociación entre genotoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad, involucrando el estudio de los posibles mecanismos de acción (De Serres, 1979; Vogel y Natarajan, 1979a y b; Todd *et al.*, 1983; Würzler *et al.*, 1983 y Brusick, 1988).

Algunas características que se han señalado para un sistema de prueba ideal son: costo moderado, corta duración del ensayo, detección de un rango amplio de eventos genéticos, reproducibilidad en el efecto detectado, potencial de biotransformación mediada por el metabolismo, producción de prole numerosa que proporcione muestras representativas, entre otras (De Serres, 1979; Kilbey *et al.*, 1981 y Valencia *et al.*, 1984).

Por muchos años la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada como sistema para evaluar daño genético inducido por contaminantes ambientales. Las investigaciones de genética clásica han llevado a la identificación de numerosas mutaciones que afectan su morfología y desarrollo, contribuyendo a un mejor conocimiento genético y molecular de sus genes. Al comparar la homología de muchas de las mutaciones implicadas en los diversos organismos, incluyendo humanos, se ha revelado que una buena parte de los mecanismos implicados en la respuesta mutagénica son similares (Russell, 1998).

Recientemente se han desarrollado programas de calibración que permitan utilizar a la mosca como biomonitor para la detección de daño teratogénico inducido por agentes contaminantes. La finalidad de estos proyectos es la búsqueda de biomarcadores que permitan elucidar los posibles mecanismos de acción de ciertos contaminantes y establecer de manera cualitativa los efectos sinérgicos o antagónicos de las mezclas que se forman directamente en el ambiente natural (Ramos *et al.*, 2000)

Entre las principales ventajas que la han hecho un organismo exitoso en el área de la Toxicología genética, se encuentran:

- ✓ Es el eucarionte más estudiado desde el punto de vista genético.
- ✓ Su ciclo de vida tiene una duración entre 9.5 y 10 días bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, 25° C y 60%, respectivamente (Figura 4).
- ✓ El número de organismos recobrados por generación es numeroso, lo que permite obtener en poco tiempo, poblaciones numerosas.

- ✓ Se cuentan con un gran número de mutantes que son identificables en el fenotipo.
- ✓ Presenta cuatro pares de cromosomas que han sido totalmente mapeados.
- ✓ Presenta actividad metabólica similar a la fracción S9 de hígado de mamíferos, lo que permite distinguir entre el efecto de compuestos genotóxicos y progenerotóxicos.
- ✓ Se pueden aplicar protocolos de administración agudos, subcrónicos, crónicos y fraccionados (Mitchell y Cambes, 1984).

Generalidades del desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Un aspecto interesante durante el desarrollo de este organismo, es que durante el estadio larvario, se presentan en los organismos dos linajes celulares: las células larvarias y las imagales. Las primeras están implicadas en la formación del cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las segundas no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva y son distinguibles de las primeras porque tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división celular y están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis; estas células se localizan en estructuras denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que aumentan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario, dando origen a estructuras del adulto como antenas, ojos, halteres, alas, patas y aparato genital (Figura 5) (Ramos *et al.*, 1993; Russell, 1998).

En todo estudio que involucra la manipulación de organismos resulta indispensable reconocer el sexo de cada uno de ellos recurriendo al empleo de las características sexuales secundarias. Por otra parte, es indispensable conocer la morfología externa del adulto de tipo silvestre para distinguir aquellas que pueden estar modificadas por la exposición a diferentes compuestos.

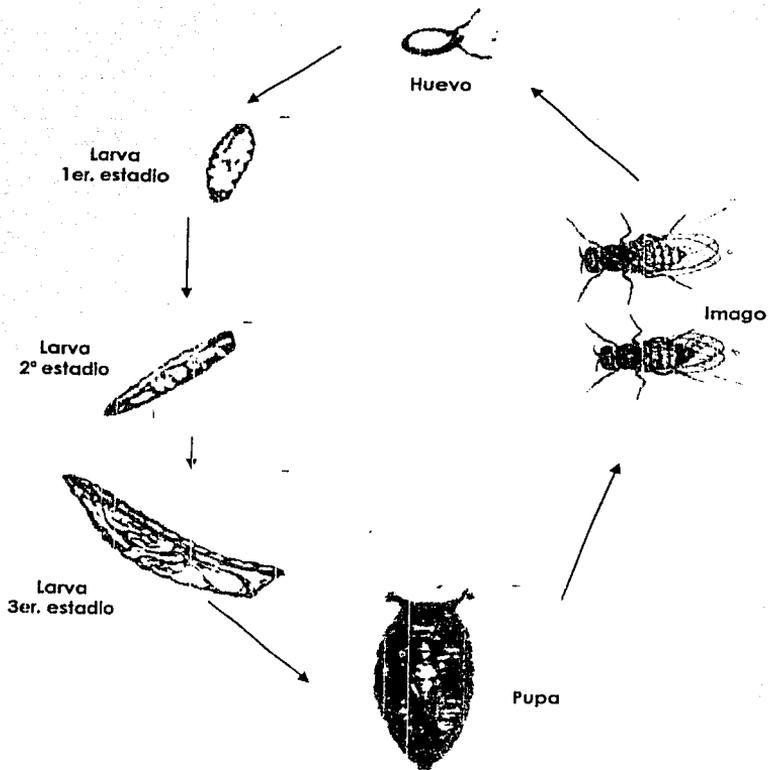


Fig. 4: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Flybase.indiana.edu)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

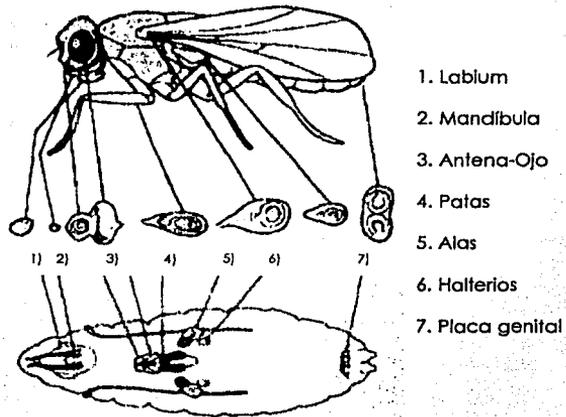


Figura 5. Discos imaginales presentes en larvas de *Drosophila* y estructuras a las que dan origen en el adulto (Modificado de Kalthoff, 1996)

En *Drosophila*:

- ✓ El dimorfismo sexual es positivo hacia la hembra, es decir, las hembras son de mayor tamaño que los machos (Figura 6).
- ✓ En la región basal del tarso del primer par de patas, únicamente los machos presentan una estructura con apariencia de peine denominada "peine sexual", la cual es una hilera de diez cercas cortas y gruesas, de color negro (Figura 7).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

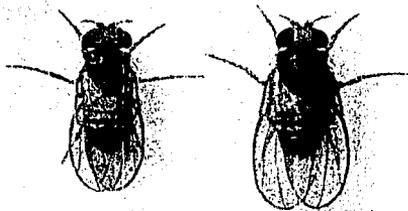
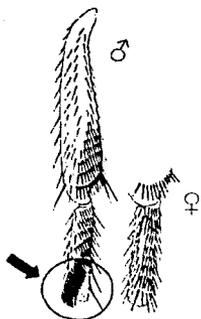


Figura 6. Dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster*.
(Tornado de Flybase.indiana.edu)

- ✓ El abdomen del macho tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados, visiblemente melanizados y la terminación es redondeada (Figura 8), mientras que en la hembra, el abdomen presenta una terminación ligeramente puntiaguda, no presenta fusión de segmentos y la coloración es uniforme (Figura 9).
- ✓ En la hembra la placa genital presenta un ovopositor (Figura 10a), mientras que en el macho, la placa genital está constituida por múltiples piezas y es de coloración oscura (Figura 10b).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Comparación de la parte basal del torso del primer par de patas en machos y hembras de *Drosophila*. La flecha indica la presencia de peine sexual en machos (Tornado de Demerec, 1965)

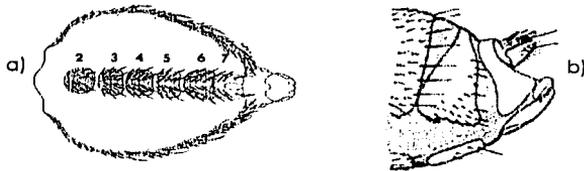


Figura 8. Morfología externa del abdomen de una hembra de *Drosophila*. a) Vista ventral, b) Vista terminal. (Tomado de Bate y Martínez-Arias, 1993)

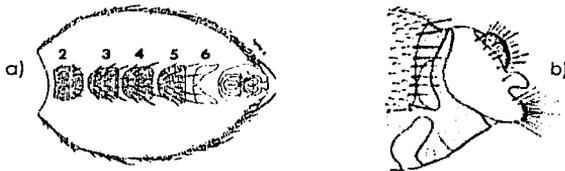


Figura 9. Morfología externa del abdomen de un macho de *Drosophila*. a) Vista ventral, b) Vista terminal. (Tomado de Bate y Martínez-Arias, 1993)

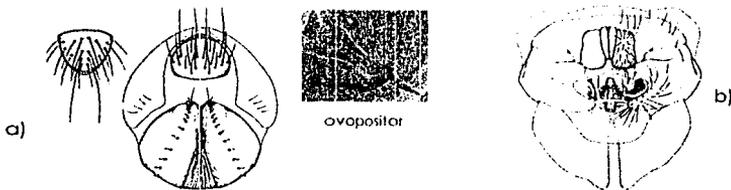


Figura 10. Morfología externa de la placa genital de *Drosophila*. a) Hembra y b) macho (Tomado de Flybase.indiana.edu)

La necesidad de control en el uso de sustancias químicas requiere que cada sustancia química de síntesis a la cual el hombre está parcialmente expuesto, sea homologada. La legislación de varios países ha establecido reglamentaciones que toman en cuenta, entre otros elementos, el potencial tóxico de estas sustancias. El número y tipos de pruebas toxicológicas para fines de

homologación varían de país en país. Algunas de esas pruebas son los estudios de corta duración o mediana duración, ensayos metabólicos, de mutagenicidad y de reproducción (Vetorazzi, 1985).

El gen citocromo P450 en *Drosophila melanogaster*.

En el genoma de *Drosophila melanogaster* la superfamilia del gen P450 se encuentra representada por 90 secuencias, de las cuales 83 codifican para genes aparentemente funcionales y, 7 son aparentemente pseudogenes. Más de la mitad de estos genes pertenecen a sólo 2 familias: la familia CYP4 y la familia CYP6. La CYP6 es específica de insectos mientras que la CYP4 incluye secuencias también comunes a vertebrados.

El mapa genético de la distribución de genes P450 de *Drosophila melanogaster* muestra:

- a) La ausencia de genes P450 en el cromosoma 4 y en el cromosoma Y.
- b) Más de la mitad de los genes P450 se localizan en el cromosoma 2.
- c) Las grandes agrupaciones contienen 9 genes.

Las enzimas P450 están involucradas en el metabolismo de una variedad de señales moleculares tales como hormonas, vitaminas, oxilipinas, etc. (Nebenl, 1994), sin embargo, se les confiere una mayor participación en la biotransformación de sustancias xenoblóticas (Coon, et al., 1996).

En insectos las enzimas P450 están involucradas en las vías biosintéticas de ecdisteroides y hormonas juveniles, ambas importantes en la etapa central de crecimiento, desarrollo y reproducción en los insectos. También metabolizan productos naturales de plantas e insecticidas resultando en bioactivación o desintoxicación (Tijet, et al., 1999).

Los miembros de la familia CYP12 de *Drosophila melanogaster* (CYP12A4, 12A5, 12B2, 12C1, 12D1, 12E1, CYP301A1 y CYP302A1) presentan algunos rasgos estructurales en común con CYP12A1 y P450 mitocondrial de mamíferos (Tijet, et al., 1999).

Prueba de Teratogénesis en *Drosophila*.

En 1991, Lynch et al., proponen criterios para clasificar como teratogénos a compuestos que inducen alteraciones durante el desarrollo de *Drosophila*, mediante la inducción de dos tipos principales de fenocopias: la modificación de las cerdas humerales (originalmente rectas), las cuales forman un ángulo de 45°, por lo que las cerdas humerales alteradas de esta manera son

denominadas "tipo bent", o bien, éstas se presentan en un número diferente al par habitual y, la discontinuidad en el borde de las alas, similar al fenotipo mostrado por moscas portadoras del gen *Notch*, por lo que a esta alteración se denomina "tipo *Notch*".

A partir de los resultados obtenidos al evaluar el efecto de algunos aneuploidógenos como la colchicina, la vinblastina y la vincristina, Muñoz y Ramos (1997) reportaron que en *Drosophila*, un efecto asociado a la actividad genotóxica de estos compuestos, era recobrar en número significativo, organismos con malformaciones en cabeza, ojos, proboscis, tórax y abdomen. Sin embargo, en otros trabajos en los que se ha evaluado el efecto de diversos compuestos a concentraciones bajas, se han identificado otras variables de respuesta que muestran diferente sensibilidad, dependiendo de la naturaleza química del compuesto (Muñoz et al., 2002).

Clorhidrato de Sibutramina

El clorhidrato de sibutramina, también conocido como Mesura, Raductil, Reductil, Hipogras, Satón, Meridia o Atenix (Figura 11), es un medicamento que a partir de su aprobación por la FAD en 1999, se emplea en los tratamientos prolongados para la reducción de peso. Se utiliza asociada a dietas hipocalóricas pero no asociado con otros medicamentos para la obesidad. Entre los efectos secundarios que se han reportado se encuentran: Dolor de cabeza, insomnio, estreñimiento, aumento de la frecuencia cardiaca y siendo más frecuente, la elevación de la tensión arterial (5-10% de los pacientes), por lo que el tratamiento debe ser suspendido (Somarriba, 1999).

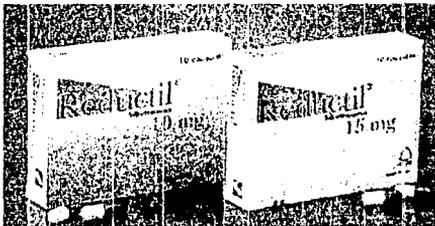


Figura 11. Presentación farmacéutica del clorhidrato de sibutramina (Tomado de <http://www.ish.org.il/reductil.htm>).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es un compuesto químico que se presenta en forma racémica (Figura 12), del cual se pueden obtener dos enantiómeros mediante una cromatografía de fase estacionaria (Qun, 1999) (Figura 13).

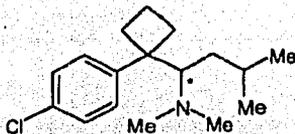


Figura 12. Estructura química del clorhidrato de sibutramina (Tomado de Qun, 1999).

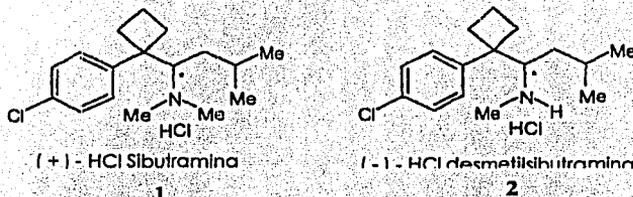


Figura 13 Fórmula de los enantiómeros del clorhidrato de sibutramina. El asterisco indica el cambio de conformación (Tomado de Qun, 1999).

Es una amina terciaria que ejerce su efecto a través de sus metabolitos aminos primario y secundario, producidos por una desmetilación de la molécula original (Figura 14). Es un inhibidor de la recaptación de la serotonina y la noradrenalina, lo que provoca un aumento de estos neurotransmisores en el cerebro, dando una sensación de saciedad. Este compuesto al igual que sus metabolitos no son agentes liberadores de monoaminas, ni inhibidores de la monoamino-oxidasa; tampoco tienen afinidad con un amplio rango de receptores de neurotransmisores (Grundlah, 1997).

En estudios donde se utilizaron ratas en fase de crecimiento y animales obesos, este compuesto redujo el incremento ponderal de peso, lo que se atribuye a un doble mecanismo de acción: 1) reducción de la ingesta calórica a través del aumento de la saciedad e 2) incremento del gasto energético por aumento de la termogénesis. Se ha demostrado que estas acciones están mediadas por la inhibición de la recaptación de serotonina (5-HT) y la noradrenalina. También se ha observado su capacidad para reducir las concentraciones de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas de baja densidad, mientras que aumenta los niveles de lipoproteínas de alta densidad (Hansen, 1999; Seagle, 1998).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Se han reportado efectos de tipo termogénicos (incremento en el potencial de oxidación de los ácidos grasos del músculo) (Connoley *et al.*, 1999) y su eficacia se ha demostrado en diferentes estudios clínicos con más de 5 000 casos controlados (Cuellar y Monsalve, 2000).

Farmacoclinética

El clorhidrato de sibutramina es absorbido aproximadamente en un 77% en el tracto gastrointestinal, alcanzando el pico máximo de concentración a las 1.2 horas de su administración. Este compuesto al igual que sus metabolitos, tienen la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas en un 97% y un 94% respectivamente, lo que favorece que se distribuyan rápidamente en todo el organismo alcanzando en 3 a 4 horas su concentración máxima en riñón e hígado. Su vida medio es de 14 a 16 horas (Seagle, 1998; Apfelbaum, 1999).

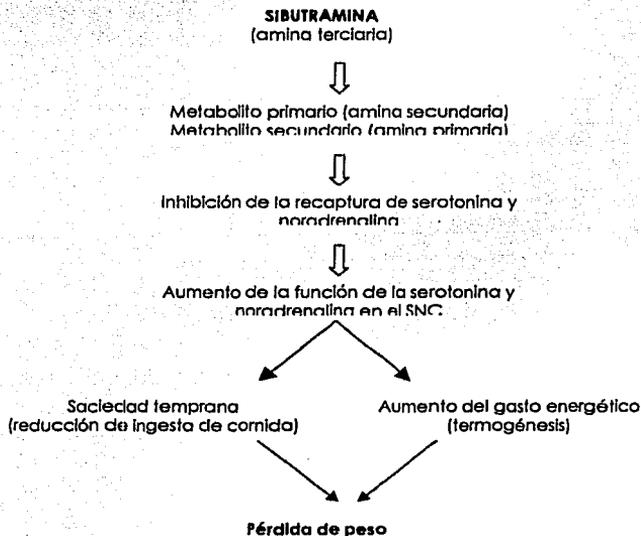


Figura 14. Mecanismo de acción propuesto para el clorhidrato de sibutramina (Modificado de Gundlah, 1997)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El metabolismo hepático es la principal vía de eliminación. Sus metabolitos activos M1 y M2 son hidrolizados y conjugados a M5 y M6 (inactivos), y eliminados preferentemente en la orina, con una proporción orina/heces de 10/1. Se excreta principalmente como un conjugado del ácido glucurónico.

Estudios microsomales hepáticos *in vitro* indicaron que la CYP3A4 es la principal isoenzima del citocromo P450 responsable del metabolismo de este compuesto. Datos *in vitro* revelan que no existe afinidad con CYP2D6, enzima involucrada en las interacciones farmacocinéticas con numerosos fármacos. Otros estudios *in vitro* revelaron que el clorhidrato de sibutramina no tiene efecto significativo en la actividad de las principales isoenzimas del citocromo P450, incluso de CYP3A4 (Gundlach, 1997).

No se tienen evidencias de actividad mutagénica en sistemas *in vitro* y en animales de experimentación; tampoco se han reportado datos sobre actividad carcinogénica en ratas y ratones hembras. En estudios sobre su efecto en la reproducción, utilizando como modelo ratones y conejos, no se tienen reportes de actividad teratogénica; sin embargo, en humanos este medicamento está contraindicado durante la gestación (Somariba, 1999).

Justificación

Los productos farmacéuticos han supuesto una importante aportación para el tratamiento y prevención de las enfermedades humanas. La venta no restringida de medicamentos es un hecho cotidiano y con frecuencia adolece de estudios suficientes para establecer un riesgo de exposición. En los últimos años se ha presentado una especial atención a los peligros de la medicación, ya que ciertos productos o la administración simultánea de varios de ellos pueden dar lugar a reacciones adversas inesperadas (Vega, 1985). Es importante determinar el riesgo de que una sustancia o agente físico, al ser administrada al individuo, pueda causar daño.

Objetivo General

- ✓ Determinar el potencial teratogénico del clorhidrato de sibutramina, empleando el modelo *in vivo* de *Drosophila*.

Hipótesis

- ❖ Si el clorhidrato de sibutramina es un compuesto que tiene la capacidad de interferir en los procesos de diferenciación celular, luego entonces larvas de *Drosophila melanogaster*, expuestas durante su desarrollo a la acción de este compuesto, presentarán alteraciones en la diferenciación de las estructuras del adulto.

Materiales y métodos

Cepa utilizada

Se emplearon hembras y machos de la cepa silvestre Canton-S, los cuales son considerados organismos de referencia y muestran el fenotipo y capacidad metabólica de tipo silvestre.

Compuestos

Clorhidrato de sibutramina, elaborado por los laboratorios Química Knoll de México, S.A. de C. V.

Obtención de las larvas

Para obtener las larvas que se asignarían a las diferentes concentraciones del compuesto, cultivos maduros de moscas silvestres, Canton-S, fueron sincronizados por 8 h en frascos con medio de cultivo fresco, enriquecido con levadura. Al término de este período los organismos fueron regresados a sus frascos originales y se esperó a que los huevos colectados continuaran su desarrollo hasta el tercer día. Las larvas se extrajeron del medio de cultivo mediante una solución de sacarosa al 20%, la cual las hace flotar, por densidad, entonces se hicieron pasar a través de un embudo de separación y se colectaron sobre una malla de nylon (Nöthinger, 1970). Al momento de iniciar el tratamiento las larvas tenían 72 ± 4 h de edad.

Tratamiento

Se realizó una prueba de solubilidad a partir de la dosis diaria administrada en humanos (10 mg). El contenido de la cápsula se pesó en una balanza analítica, registrando 0.2478 g, el cual fue disuelto en un volumen final de 40 mL de agua destilada. A partir de esta solución "stock" se prepararon por dilución las diferentes concentraciones: 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.49, 0.98, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 125 y 250 ppm. Para realizar las diluciones se empleó agua destilada, misma que se consideró como testigo negativo.

En tubos homeopáticos que contenían 0.6 g del medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply Co Burlington, N.C. USA) y 3.5 mL de cada una de las concentraciones a probar, se colocaron grupos de 150-200 larvas. Las larvas permanecieron en este medio hasta que entraron a la metamorfosis y emergieron como moscas adultas (48 h).

Análisis al microscopio

Los adultos recuperados de los tratamientos se fijaron en una solución de alcohol: Tween 80: agua para su posterior análisis al microscopio. Se registró el número total de individuos/sexo obtenidos por concentración en cada uno de los tratamientos y posteriormente se calculó el índice de sobrevivencia (IS) y el índice sexual (Isx). De manera paralela se realizó un análisis morfológico con un microscopio estereoscópico a un aumento de 30x para registrar el número y tipo de alteraciones observadas en diferentes estructuras para cada uno de los organismos. El tamaño de muestra analizado por concentración fue de 500 organismos, mismo que se obtuvo al menos de dos repeticiones del tratamiento.

Análisis Estadístico

Con los datos registrados, se procedió a calcular: 1) el índice de sobrevivencia (IS) y 2) el índice sexual con base a las siguientes fórmulas respectivamente:

$$1) \text{ Índice de sobrevivencia (IS)} = \frac{\# \text{ total de organismos en lote experimental}}{\# \text{ Total de organismos recobrados en lote testigo}}$$

$$2) \text{ Índice sexual (Isx)} = \frac{\# \text{ de machos en lote experimental}}{\# \text{ Total de organismos recobrados en el lote experimental}}$$

Para determinar si existían diferencias significativas entre el número de organismos alterados en los lotes experimentales con respecto a los lotes testigo se realizó una comparación empleando las tablas para el mínimo número de eventos significativos en una muestra binomial de Kastenbaum-Bowman (1970), con un valor de significancia $P < 0.05$.

RESULTADOS

Para descartar un efecto negativo del clorhidrato de sibutramina en la sobrevivencia de los organismos tratados, se procedió a cuantificar el número de organismos recobrados, tanto en el lote testigo como en los lotes experimentales. En la tabla 3 y gráfica 1 se muestran los datos obtenidos en los experimentos para los índices de sobrevivencia (IS). El valor de 1.0 o del 100% corresponde al número de organismos recuperados en los lotes testigo. Con base en estos resultados, en las concentraciones probadas el compuesto no mostró actividad tóxica.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas en el IS obtenido en los tratamientos se realizó un ANOVA de dos vías, el cual mostró que al menos dos de las medias poblacionales no son iguales. Mediante la prueba de Tukey se determinó que las diferencias significativas entre las medias poblacionales se deben al tratamiento I (Tabla 4).

Debido a que en otros experimentos se ha observado que algunos compuestos tienen la capacidad de modificar la proporción de sexos esperada, se procedió a obtener los índices sexuales en los tratamientos con el clorhidrato de sibutramina. Mediante un análisis de varianza se determinó que las variaciones observadas en los datos (tabla 3 y gráfica 2) se deben al azar. Posteriormente, cada organismo fue analizado al microscopio para determinar el número y tipo de alteraciones presentes (Tabla 5 y gráfica 3). Los resultados obtenidos indican que aunque existen diferentes blancos, las malformaciones más frecuentes y evidentes se presentan en las placas genital y anal de hembras y en la placa genital de machos.

En la figura 15 se muestra la morfología normal de la placa genital y la placa anal de una hembra de *Drosophila*. En la figura 16 se muestra la alteración en placa genital de una hembra y la espermateca expuesta en la concentración de 0.12 ppm. La figura 17 corresponde a la concentración de 0.24 ppm y se muestran alteraciones en placas anal y genital.

La frecuencia de organismos alterados en los lotes testigo y en los lotes experimentales, se comparó usando las tablas para el mínimo número de eventos significativos en una muestra binomial de Kastenbaum y Bowman (1966) a una $P = 0.05$ como indicador de significancia (Tabla 5). Las concentraciones en las cuales se superó el número mínimo de organismos alterados, en comparación con los recuperados en los lotes testigos fueron: 0.06, 0.12, 1.95, 15.6 y 125 ppm.

Al comparar la tendencia de las curvas del IS y la frecuencia total de alteraciones obtenidas (Gráfica 4), se observó que entre ambos parámetros existe una correlación negativa, es decir, que a medida que aumenta el IS, la frecuencia de alteraciones va disminuyendo. Un aspecto interesante es que el número mayor de organismos con alteraciones se recupera a concentraciones bajas y conforme ésta aumenta, el número de organismos disminuye.

Si se ampliara el rango de concentraciones consideradas, posiblemente a concentraciones mayores a 125 ppm se llegará a un punto de inflexión entre ambas curvas.

DISCUSIÓN

En el campo de la Toxicología genética han surgido diversos planteamientos con relación a los sistemas de prueba que han de emplearse a fin de estimar el riesgo de la exposición a sustancias con posible potencial teratogénico. Los experimentos con animales pueden ser divididos en dos grandes clases: 1) estudios para probar compuestos o agentes con potencial desconocido y 2) estudios de segunda fase o ampliación sobre efectos de agentes cuyo potencial para causar malformaciones ya ha sido establecido (IPCS, 1984).

Drosophila melanogaster, es un modelo utilizado ampliamente en la detección de daño tanto en células somáticas como en células germinales, sin embargo, de manera reciente se propuso su uso en pruebas teratogénicas.

En el presente trabajo un aspecto que llamó la atención fue el hecho de que se recobró un número mayor de organismos en los lotes experimentales que en el lote testigo. Un factor que se considera de gran importancia en los estudios con *Drosophila*, es la posible respuesta al estrés, la cual pudiera generarse debido a: 1) una excesiva manipulación o 2) por el estímulo que representa la exposición a los genotóxicos.

Con relación al primer punto, el número de larvas que se colocó en cada vial fueron grupos de entre 100 y 150 individuos, sin en realidad haber hecho un conteo, lo cual implicaría una manipulación directa. Se considera que aún con esta precaución el efecto de la manipulación no se elimina en su totalidad, por lo que probablemente las larvas respondieron a este evento desfavorable aumentando la producción de las proteínas de estrés térmico o proteínas anti-estrés cuya función principal es la de proteger a las células del efecto dañino permitiéndoles su recuperación y permanencia (Paez 1998). Sin embargo sí la manipulación fuera la causa, el efecto se hubiera visto reflejado de igual forma en la respuesta de las series testigo y experimentales y lo cual se observa claramente que no ocurrió.

Por otro lado, se tienen referencias de que en los organismos que son sometidos a estrés durante su desarrollo se pueden recobrar efectos adversos (IPCS, 1984). Paez (1998) reporta que cuando los organismos se exponen a metales pesados, alcoholes y otros venenos metabólicos, se

induce la expresión de estas proteínas anti-estrés. Lo anterior comparado con lo obtenido en este trabajo, permite inferir que el contacto con el compuesto pudo ser un estímulo que generara esta respuesta.

Se ha reportado que en *Drosophila* estas proteínas participan durante el desarrollo y/o la diferenciación y en el restablecimiento de la función celular después del estrés (Tanguay, 1983; Nover, 1984; Salomón *et al.*, 1991; Arrigo *et al.*, 1980; William, 1993), por lo que probablemente en los lotes experimentales se indujera una mayor producción que permitiera su disponibilidad y permanencia para que los procesos bioquímicos propios del desarrollo se realizaran de manera favorable, generando en los organismos una mejor respuesta de sobrevivencia.

Con respecto a la inducción de malformaciones, se obtuvo mediante la prueba estadística de Kastenbaum y Bowman un incremento en las alteraciones en placas genital y anal de hembras y placa anal de machos que fueron expuestos al clorhidrato de sibutramina en sus diferentes concentraciones, sin embargo al realizar el análisis al microscopio de los adultos no se observó otro tipo de malformaciones, como las cerdas humerales tipo "beni" y las alas tipo "notch", reportadas por Lynch y colaboradores (1991), las cuales proponen como las más consistentes y de mayor frecuencia en este tipo de pruebas.

Existen otros trabajos en los que de igual manera se reporta un efecto a nivel de las placas genital y anal en ambos sexos (Figueroa, 2003).

Con base en lo reportado por Riddiford (1993), una posible explicación a lo anterior es que durante las primeras fases de la diferenciación celular de los discos imagales, que tienen lugar justo después de la formación de la pupa, cuando se activan los genes específicos de las estructuras del adulto, pudieran haber ejercido sus efectos las proteínas anti-estrés.

La morfogénesis de la región terminal de la hembra comienza aproximadamente después de la formación del pupario involucrando procesos celulares, que completan el desarrollo de la región terminal a las 52 horas después de la formación del pupario (Jürgens y Haerstein 1993). En los machos, la morfogénesis de la región terminal comienza dentro de las primeras 10 horas después de haberse formado el pupario y se completa 31 horas después de haberse formado el pupario (Jürgens y Haerstein 1993). En ambos casos, la morfogénesis de la región final abdominal se completa en las últimas horas de la fase de pupa, cuando, muy probablemente, existe un patrón diferencial de disponibilidad de receptores de superficie de las membranas de las células que están en proceso de diferenciación. Quizá las células involucradas en la

formación de las regiones finales abdominales en ambos sexos posean una mayor disponibilidad de receptores apropiados para la unión con el clorhidrato de sibutramina, por lo que resultan afectadas.

Aunque diferentes compuestos actúen en el mismo período del desarrollo embrionario y sobre el mismo sistema, cada uno producirá un modelo o patrón específico de malformaciones. Esto permite suponer una correlación entre el compuesto químico y las estructuras blanco (Muñoz, et al., 2002).

Los resultados mostraron que *Drosophila melanogaster* es sensible al efecto teratogénico inducido por el clorhidrato de sibutramina, lo que permite suponer que existe biotransformación del compuesto, probablemente dependiente del citocromo P450. En insectos se ha reportado que las enzimas dependientes del citocromo P450 están involucradas en las vías biosintéticas de ecdisteroides y hormonas juveniles, ambas importantes en la etapa central de crecimiento, desarrollo y reproducción en los insectos. Estudios realizados por Tijet, et al., (1999) reportan que estas enzimas también participan en la bioactivación o desintoxicación de algunos productos naturales de plantas e insecticidas.

Tijet et al., (1999) reportan que la CYP3A4 es la principal isoenzima del citocromo P450 responsable del metabolismo del clorhidrato de sibutramina, sin embargo no existen reportes de la presencia de esta molécula en el genoma de *Drosophila*, por lo que es posible que exista otra molécula que realice las funciones de la CYP3A4 o bien que ésta no ha sido identificada aún.

Puede suponerse que el clorhidrato de sibutramina al generar la síntesis de proteínas anti-estrés permitió que éste actuara en el interior celular, activando o reprimiendo la expresión de ciertos genes indispensables en el desarrollo.

Debido a que no se han reportado evidencias de actividad teratogénica para el clorhidrato de sibutramina (Somarriba, 1999), se sugiere realizar otro tipo de análisis para obtener la respuesta genotóxica del clorhidrato de sibutramina y establecer una relación entre su genotoxicidad y la inducción de alteraciones.

CONCLUSIONES

1. *Drosophila melanogaster* es un modelo *in vivo* sensible a compuestos con actividad teratogénica.
2. El clorhidrato de sibutramina no indujo efecto negativo en el índice de supervivencia recobrado en los tratamientos con moscas de la línea Canton-S.
3. El clorhidrato de sibutramina presentó actividad teratogénica durante el desarrollo de moscas de la línea Canton-S.
4. El clorhidrato de sibutramina alteró de manera específica el desarrollo de placa anal y genital de hembras y placa anal en machos.
5. La DIT (*Drosophila* Teratogenesis Test) puede ser utilizada en estudios de monitoreo de compuestos con posible actividad teratogénica.
6. Con base en los resultados obtenidos en este y otros trabajos, es importante considerar otras estructuras como indicadoras de la actividad teratogénica de diversas sustancias en el desarrollo en *Drosophila melanogaster*.
7. Se requieren de más estudios para establecer los criterios morfológicos de respuesta ante la exposición a diversos compuestos con potencial teratogénico.

REFERENCIAS

1. Ades J., Arellano V. (2001) **Manual de Toxicología para la carrera de QFB**. 1ª. Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Cuauhtitlán 2001. 191 pp
2. Alzpuru, K. et al (1989) **Medicamentos y embarazo**. Inf Farmacoter Vasca 1989; 2: 49-51
3. Albert, L.A. (1988) **Curso básico de Toxicología Ambiental**. México. Limusa 311 pp.
4. Ames B.N., Durston W.E. y Lee F.D. (1973) **Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70,2281-2285.
5. Ames B (1983) **Dietary carcinogens and anticarcinogens**. Science 221:1256-1264
6. Apfelbaum M., Vague P., Ziegler O., Hanling C. Thomas F., Leutenegger E. (1999) **Long-term Maintenance of Weight Loss after a Very-Low-Calorie Diet: A Randomized Blinded Trial of the Efficacy and Tolerability of Sibutramine**. Am J Med 1999; 106: 179-84
7. Arellano, A. O. (2000) **Drosophila como modelo in vivo para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 61 pp
8. Arigo, A.P., Fojan S. and Tissières A. (1980) **Localization of the heat shock induced proteins in Drosophila melanogaster tissue culture cells**. Dev. Biol. 78: 86-103
9. Bate, M. (1993) **The Development of Drosophila melanogaster**. Alfonso Martínez Arias, Cold Spring Harbor.
10. Briggs, G.G., et al (1994) **Drugs in pregnancy and lactation**. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
11. Brusick D., (1987) **Principles of Genetic Toxicology**, 2a. Ed., Plenum Press, Londres, 204 p
12. Brusick D. (1988) **Evolution of testing strategies for genetic toxicity**. Mutat. Res. 205, 69-78
13. Casares, F., Sánchez, H.E. (1995) **El complejo bithorax de Drosophila melanogaster**. Investigación y Ciencia, marzo, 1995: 48-56
14. Cassarett L.J. (1975) **Toxicology of the poisons the basic science**. Mc Millan
15. Clayson, D. (1980) **Comparison between in vitro and in vivo test for carcinogenicity**. Mutation Res., 75: 205-213
16. Coon, M.J., Vaz, A.D., Bestervelt, L.L., (1996) **Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversezymes**. FASEB J. 10, 428-434.
17. Connoley I.P., Lin Y.L., Frost I., Reckless I.P., Heal D.J., Stock M.L. (1999) **Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites**. Br. J Pharmacol. Mar; 126 (6): 1487-95
18. Cuellar G.E., Ruiz A.M., Monsalve M.C. (2000) **Six-month treatment of obesity with sibutramine 15 mg; a double-blind, placebo-controlled monocenter clinical in a Hispanic population**. Obes Res 8: 71-82
19. Demerec, M. (1965) **Biology of Drosophila**. Ed. 1965
20. De Serres, F.J. (1979) **Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens**. Am. N.Y. Acad Sci. 74-84
21. Dean R. (1981) **Toxicology in: Water reuse**. Problems and solutions Academic Press, USA 264 p
22. Estivill I Palleja (1993) **Tratamiento farmacológico en la mujer gestante**. Farm Clin 1993; 10: 206-14
23. Figueroa, T. G. (2003) **Evaluación del potencial teratogénico del Misoprostol en Drosophila melanogaster**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
24. Goldstein A., Aronow L., Kalman S. (1978) **Farmacología**. 1a. Edición. Limusa 1000 pp.
25. Graf U., Wüler F.E., Kats A.J., Frei H.J., Juon H., Hall C.B. y Kale P.G. (1984) **Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster**. Environ. Mutagen. 6, 153-188
26. Griffiths, J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. y Gelbart, W.M. (2000) **An Introduction to Genetic Analysis**. 7th. Edition. Freeman and Co.

27. Grundlach C., Martin K.F., Auerbach S.B. (1997) **In Vivo Criteria To Differentiate Monoamine Reuptake Inhibitors from Releasing Agents: Sibutramine Is a Reuptake Inhibitor.** J Pharmacol Exp Ther 1997; 283: 581-91
28. Goodman G.A., Rall W.T., Nies S.A. y Taylor P. (1990) **The pharmacological basic of therapeutics.** Panamericana, Octava edición. 1811p
29. Gilbert, S.F. (1990) **Developmental Biology.** Barcelona Omega, 720 p.
30. Hansen DL., Toubro S., Stock M.J., Macdonald IA., Austrup A. (1999) **The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction.** Int. J Obes 1999; 23: 1016-24
31. Hilario, T. R., Ramos M. P. (2002) **El candelero afecta la diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster*.** Congreso Nacional de Genética. Universidad Michoacana de San Nicolás, Hidalgo.
32. <http://www.flybase.indiana.edu>.
33. <http://www.ish.org.il/reduclil.htm>.
34. I.P.C.S. Internacional Programme on Chemical Safety. (1984) **Principles for Evaluating Health Risks to Progeny Associated with Exposure to Chemicals During Pregnancy.** World Health Organization. Finland. Pag. 15-51.
35. Jürgens G. And V. Hartenstein. (1993). " The Terminal Regions of the Body Pattern" en: " **The Development of *Drosophila melanogaster***" Vol. II (Bate M. Y A. Martínez Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pag. 687-746.
36. Kalthoff, K. (1996) **Analysis of biological development.** McGraw-Hill, USA. 850 pp
37. Kilbey B.L., J.D. Mac Donald, C. Auerbach, S.F. Sobels y W.E. Vogel (1981) **The use of *Drosophila melanogaster* in test for environmental mutagens,** Mutation Res, 85:141-146
38. Linch D.W., Ronald L.S., Ronald D.H. y Davis D.G. (1991) **Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: Test results with eighteen chemicals and presentation of a new *Drosophila* bioassay.** Terat. Carcinog. and Mutag. 11: 147-173
39. Mitchell I. And Corbes (1984) **Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*,** Incluido en: Mutagenicity testing a practical aproch, edited by S. Venitt. J.M. Parry, IRL Press, Uk. 149-155 pp
40. Moutschen, J. (1985) **Introduction to genetic toxicology.** John Wiley & Sons, Nueva York, 184pp.
41. Muñoz Hernández A. (1997) **Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos clorados en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular), Facultad de Ciencias, UNAM.
42. Muñoz, H.A., Hernández, B.B., Rivas, M.H., Herrera, B.J. y Ramos, M.P. (2002) ***Drosophila*: Una alternativa in vivo para la evaluación de actividad teratogénica.** Memorias del Congreso Nacional de Genética, Morelia Michoacán. Septiembre de 2002
43. Nebert, D.W., (1994) **Drugs-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription.** Biochem. Pharmacol. 47,25-37
44. Nöthinger R. (1970) **Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae.** Dros. Inf. Ser. 45:177
45. Nover, L. (ed) (1984) **Heat shock Response of Eukaryotic Cell.** Ver. Georg. Thieme, Leipzig.
46. Olson W., Habermann R.T., et. al. : (1993) **Induction of stomach cancer in rats and mice by halogenated aliphatic fumigants.** J. Nat. Cancer Inst. 51: 1993-1995; 1973
47. Páez S. Y. (1998) **Interacción entre la temperatura y la genotoxicidad de algunos xenobióticos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.** Tesis Maestro en ciencias (Biología Celular). Facultad de ciencias. UNAM. México. 122 pp
48. Qun K.F. (1999) **Firs preparation of enantiomerically pure sibutramine and its major metabolito, and determination of their absolute configuration by single crystal x-ray analysis.** En: Tetrahedron: Asymmetry 10: 4477-4480

49. Ramos M.P., Abundis H.M., Gaytan J.C., Ordaz M.G., Orozco P.G., Maldonado J., Hernández H., González E., Reyes P., Galicia E.M. y Muñoz J.A. (1993) **Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster***. Mc Graw Hill México. 131 pp
50. Ramos, M.P., Ordaz, M.G., Dorantes, A., Rivas H., Campos P., Marfín, M. Y B. Hernández (2000) ***Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution in:** Butlerwoth (ed) *Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental Change 2* Kluwer Academic/Plenum publisher, Nueva York.
51. Ramos-Morales P, Muñoz M A, Muñoz-Hernández A, Hernández B B, Rivas M H, Herrera B J (2002) "La talidomida induce mutación somática a bajas concentraciones en *Drosophila melanogaster*". Memorias del Congreso Nacional de Genética 2002, organizado por la Sociedad Mexicana de Genética, celebrado del 25 al 28 de septiembre, en la ciudad de Morelia, Michoacán.
52. Riddiford Lynn M. (1993). "Hormones and *Drosophila* Development" en: "**The Development of *Drosophila melanogaster***" Vol. II (Bate M. Y A. Marfín Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pag. 899-939.
53. Rubio Barbón S. et al. (1993) **Utilización de fármacos durante el embarazo y la lactancia.** Farm Hosp 1993; 17: 3-24
54. Russell P. (1998) *Genetics*, the Benjamín/ Cummings Publishing Company, Inc, fifth edition. USA. 805 pp
55. Salomon, J. M., Rossi J., Golic M., McGarry T. And Lindquist S. (1991) **Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat shock regulation in *Drosophila*.** New Biologist. 3: 1106-1120
56. Seagle H., Bessesen D., Hill J. (1998) **Effects of Sibutramine on Resting Metabolic Rate and Weight Loss in Overweight Women.** *Obes Res* 1998; 6: 115-21
57. Somarriba A. (1999) **Segundo curso Intensivo de Diabetes, Endocrinología y enfermedades melabólicas.** 3 de Diciembre de 1999, Miami, Florida.
58. Sorsa Marja, Kari Hemminki and Harri Vainio (1985) **Occupational exposure to anticancer drugs — Potential and real hazards,** *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 154(2):135-149
59. Tanguay, R. M. (1983) **Genetic regulation heat shock and function of heat-shock proteins.** A Review. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61: 387-394
60. Tjiet, N., Helving C., Feyereisen R. (1999) **Insect P450 Enzymes.** *Annus. Rev. Entamol.* 44. 507-533
61. Timbrell, J.A. (1989) **Introduction to toxicology,** Taylor & Francis Ltd. USA. 155pp
62. Tyler Miller G. (1994) **Ecología y Medio Ambiente.** Editorial Iberoamericana 827 pp.
63. Tood, N., Clements, J., Zoeller, P. Y Phillips, M. (1983) **Absence of mutagenic effect after feeding 4 anti-cancer drugs to *Drosophila melanogaster*.** *Mutation Res.*, 120: 121-125
64. Valencia, R.S., Abrahamson, W.R., Lee, E.S., Von Halle, R.C., Woodruff, F., Würger, F. Y Zimmering, S (1984) **Chromosome mutation test (SCLT) for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*.** *Mutation Res.* 134: 61-88
65. Vega, S. (1985) **Evaluación epidemiológica del riesgo causado por agentes químicos ambientales,** *Toxicología IV, Carcinogenesis química,* Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la salud y la Organización Mundial de la Salud. 10: 1-47
66. Vettorazzi G. (1985) **Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas.** Programa Internacional de Seguridad de las sustancias químicas. (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS) metepec, Edo. De México, México 1992
67. Vogel, E., Natarajan (1979) **The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila melanogaster*.** *Mutation Res.* 62, 101-123
68. Vogel, E. W. (1991) **Genotoxic chemicals an introduction in to the basic principles of genetic toxicology,** *Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, Ru Leiden, Sylvius Laboratoria.* 66p

69. William, J. W. (1993) **Respuesta de las células al estrés**. Investigación y Ciencia. 22-29
70. WHO (1984) **Principles for Evaluating Health Risks to Progeny Associated with Exposure to Chemicals during Pregnancy**. World Health Organization, Genova. 175 pp.
71. Wolpert, L. (1998) **Principles of Development**. Current Biology, Oxford University Press. 484 pp. ISBN: 0-19-850263-X.
72. Wügler, F., Juon, F. H. Y Frei, H. (1983) **Promutagens detected by a rapid test with *Drosophila* somatic cells** (Abstract) Experimenta, 39: 686.

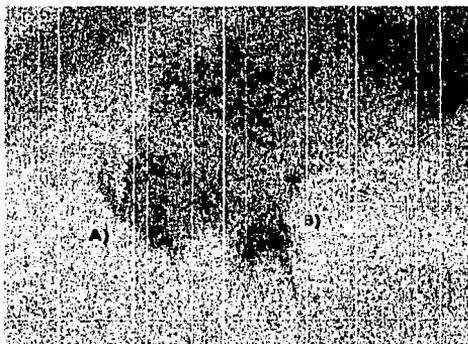


Fig. 15 Morfología normal, testigo negativo. A) placa genital y B) placa anal.



Fig. 17 Alteración en hembra inducida por el clorhidrato de sibutramina [0.24] ppm. A) placa genital y B) placa anal.

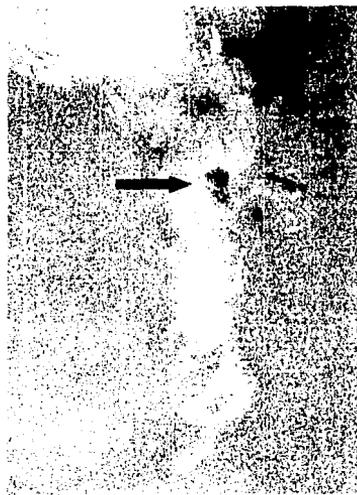


Fig. 16 Hembra con alteración en placa genital. Tratamiento con clorhidrato de sibutramina [0.12] ppm. La flecha muestra la espermateca expuesta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Índice de sobrevivencia, desviación estándar e índice sexual obtenidos en los tratamientos con clorhidrato de sibutramina.

[ppm]	♀	♂	total	Is ♀	Is ♂	Is $\bar{x} \pm s$	ISX
0	104	128	232	1	1	1.0±0.0	0.55
0.03	197	224	421	1.98	1.75	2.2±1.60	0.53
0.06	179	153	332	1.72	1.2	1.7±1.08	0.46
0.12	201	227	428	1.93	1.77	2.4±2.11	0.53
0.24	173	185	358	1.66	1.45	1.8±1.01	0.52
0.49	176	206	382	1.69	1.61	2.1±1.68	0.54
0.98	161	152	313	1.55	1.19	1.6±1.05	0.49
1.95	163	157	320	1.57	1.23	1.8±1.59	0.49
3.9	219	178	397	2.11	1.39	2.0±1.27	0.45
7.8	183	184	367	1.76	1.44	1.8±0.88	0.5
15.6	160	153	313	1.54	1.2	1.6±0.95	0.49
31.25	194	189	383	1.87	1.48	1.9±1.22	0.49
62.5	133	150	283	1.28	1.17	1.6±1.50	0.53
125	122	124	246	1.17	0.97	1.1±0.57	0.5

Tabla 4. Prueba de Tukey: Variable 1

ANOVA		Probabilidad posterior de una prueba de Hoc en un resultado promedio: Var 2		
		{1}	{2}	{3}
VAR 2		3.138572	1.109286	1.135
	1 {1}		0.000123	0.000123
	2 {2}	0.000123		0.993126
3 {3}	0.000123	0.993126		

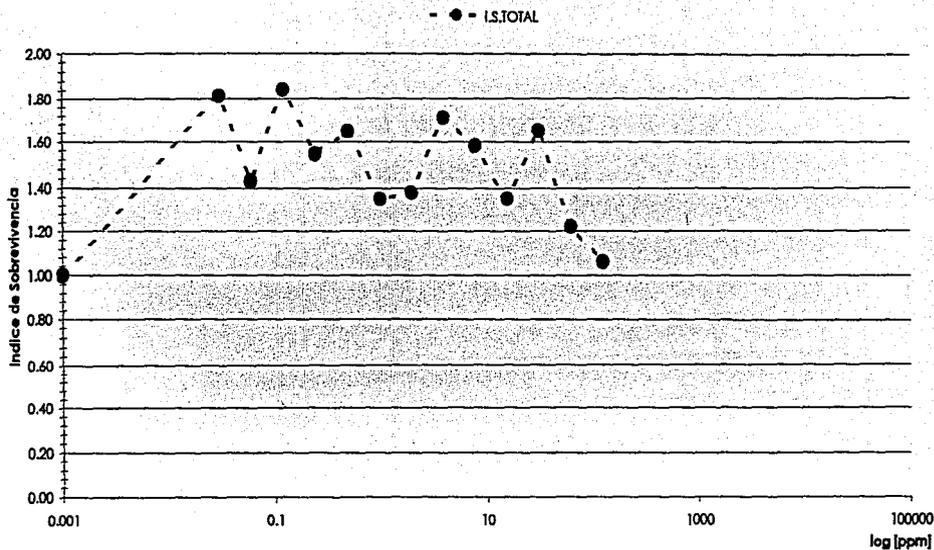
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 5. Tipo de alteraciones inducidas en los tratamientos con Clorhidrato de sibutramina en moscas *Canton-S*.

Compuesto [mM]	No. total de org.	Tipo de alteraciones			Frec. total [%] de alteraciones	
		Ojos	Alas tipo "Notch"	Abdomen abarquillado		
Testigo	232		1(0.004)		43(0.19)	44 (0.19)
0.03	421	1 (0.002)	4(0.001)	1(0.002)	95(0.23)	101 (0.24)
0.06	332		1(0.003)		88(0.27)	89 (0.27) *
0.12	428		2(0.005)	4(0.009)	104(0.24)	110 (0.26) *
0.24	358		1(0.003)	2(0.006)	86(0.24)	89 (0.25)
0.49	382	1(0.002)	1(0.002)		49(0.13)	51 (0.13)
0.98	313				56(0.18)	56 (0.18)
1.95	320		2(0.006)	1(0.003)	79(0.25)	82 (0.26) *
3.9	397	4(0.01)	3(0.008)	4(0.01)	53(0.13)	64 (0.16)
7.8	367		2(0.005)		57(0.16)	59 (0.16)
15.6	313	7(0.02)	1(0.003)		87(0.28)	95 (0.30) *
31.25	383		3(0.008)		75(0.2)	78 (0.20)
62.5	283				46(0.16)	46 (0.16)
125	246		6(0.024)		87(0.4)	93 (0.38) *

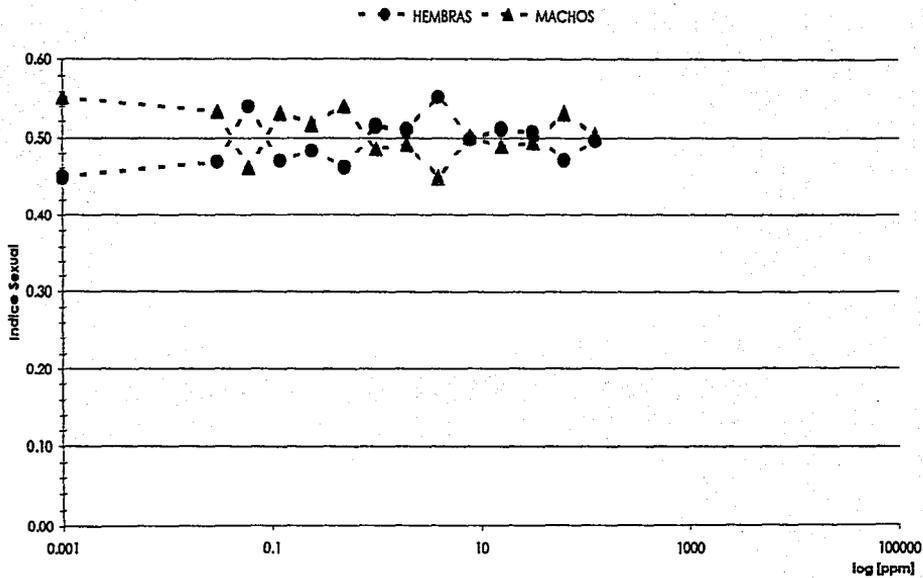
* Prueba de Kastenbaum-Bowman P=0.05

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 1. Índice de sobrevivencia obtenida en los tratamientos con clorhidrato de sibutramina.

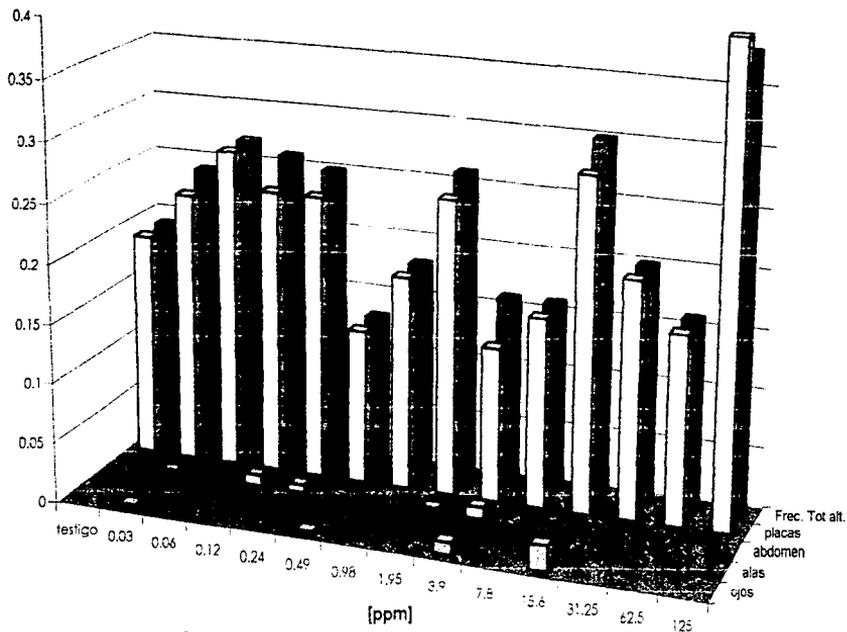
TESIS CON
MILLA DE ORIGEN



Gráfica 2. Índices Sexuales obtenido en los tratamientos con clorhidrato de sibutramina.

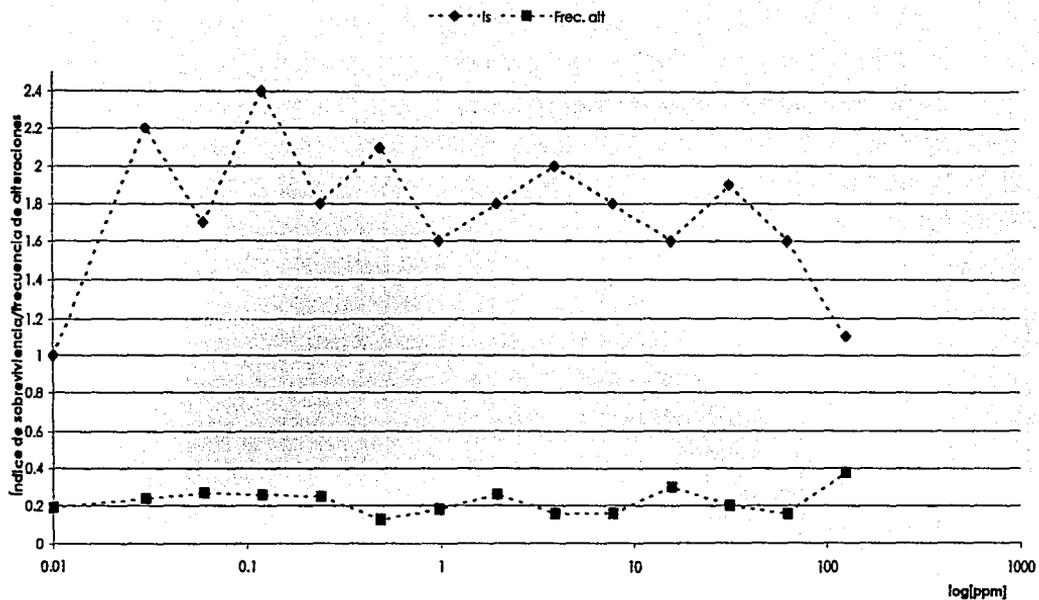
Frecuencia

FRASES CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3. Frecuencia de alteraciones obtenidas en los tratamientos con clorhidrato de sibutramina en *Drosophila melanogaster*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 4. Comparación entre el índice de sobrevivencia y la frecuencia total de alteraciones obtenidos en los tratamientos con clorhidrato de sibutramina en las moscas de la línea Canton-S