

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación genotóxica del tripanocida  
GHPMF en SMART en ala de *Drosophila  
melanogaster* (Cruza E)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

**ZAIRA YURIRIA OLVERA ROMERO**

DIRECTOR DE TESIS:

**BIOL. LUIS FELIPE SANTOS CRUZ**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2014



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.

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a mi Padre Celestial por la vida y personas que puso en mi camino.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme ser parte de esta máxima casa de estudios.*

*Agradezco al Biólogo LUIS FELIPE SANTOS CRUZ. Por ser mi abuelito académico que me adoptó y cuidó, gracias por tus consejos, regaños y ayuda ya que por eso logré la meta después de tanto. Gracias por ser mi maestro, verdugo y amigo, pero sobre todo amigo, por escucharme tantas veces, por todo tu apoyo.*

*A las M. en C. MARIA EUGENIA HERES Y PULIDO e IRMA DUEÑAS GARCÍA por su tiempo, tolerancia, apoyo y atención durante mi estancia en el Laboratorio de Genética Toxicológica. Gracias por sus enseñanzas y su experiencia en la revisión de esta tesis.*

*Al Dr. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS por su apoyo en esta tesis y darnos la oportunidad de ser parte del proyecto del compuesto estudiado.*

*Al Biólogo LUIS HERNÁNDEZ PORTILLA por su intervención como revisor de esta tesis.*

*Al M. en C. ANGEL DURÁN por su apoyo en el área de estadística.*

*Al proyecto UNAM-PAPIIT IT216411 por el apoyo proporcionado para la difusión de los resultados obtenidos del trabajo de tesis realizado en un Congreso Nacional.*

*Al M. en C. César Mendoza Martínez por haber sintetizado el compuesto tripanocida objeto de este estudio de tesis.*

## DEDICATORIAS

*A Mi Madre DINA ROMERO: Gracias por darme la vida, apoyarme y cuidarme en cada paso que di, por ser madre y padre, demostrándome tu fortaleza en cada obstáculo que superaste. Por tu honestidad y rectitud ante la vida, por darme los mejores valores. Por ser el más grande, fuerte y central pilar en mi vida.*

*A Mis Abuelitos GUADALUPE Y FELIPE OLVERA: por ayudarnos como lo hubiera hecho mi padre, por cuidar de mí con su cariño y gran apoyo, gracias por despertarme cuando no tenía ganas. Forman parte del pilar que es mi padre.*

*DARY OLVERA: gracias por ser parte de mi vida, por ser mi motor para ser una mejor persona día a día, siempre serás mi mayor tesoro. Esperando ser un buen ejemplo. Te amo mi niña.*

*A Mi FAMILIA: mis hermanos ELI Y KITZIA porque a pesar de todo salimos adelante gracias por cuidar a su pequeña hermana, los amo. Mis abuelitos CELIA Y ALFONSO ROMERO por su amor, educación y apoyo en vida, los extraño. Mis tíos Tere, Ela, Ruth, Yuri, Adán, David, Fer, Mary, Mirna, por su apoyo en alguna etapa de mi vida. PRIMOS por sus oraciones. Juntos forman parte de mi tercer pilar que me mantiene en pie*

*LUIS ANGEL GARCIA: por estar a mi lado en las buenas y malas, por tu apoyo en mi vida académica, por tu paciencia y amor por ser parte de mi vida,*

*A MIS AMIGOS: Jhano, Scarlett, Dafne, Ari, Chino, Kary, Lulu, Carlos que comenzamos una historia y que con mucho esfuerzo, desveladas y mucha diversión por fin terminamos, a cada uno en cada etapa gracias por ser parte de mi vida y los llevaré conmigo en donde este. Espero que esta amistad que comenzó en la UNAM FESI nunca termine. Los quiero mucho!!!*

*COMPAÑEROS DE LABORATORIO Jacky, Sofi, Lucero, Cindy, Andy por su compañía y ayuda. FAMILIA GARCÍA JARA gracias por su cariño y apoyo, los llevaré en mi corazón, pensamiento y oración. Los quiero mucho.*

**GRACIAS A TODOS... LO LOGRAMOS!!!**

## INDICE

Resumen.....	11
Introducción.....	12
Enfermedad de Chagas.....	12
Tripanocidas.....	12
GHPMF.....	13
Pruebas de Genotoxicidad.....	16
SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> .....	18
Metabolismo Xenobiótico.....	18
Uretano.....	22
Antecedentes.....	24
Justificación.....	26
Hipótesis.....	26
Objetivo General.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Químicos.....	27
Biológicos.....	27
Propagación de cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	28
Colecta de huevos y recuperación de larvas.....	28
Prueba de Toxicidad (CL <sub>50</sub> ).....	29
SMART en ala.....	30
Resultados y Discusión.....	34

Prueba de Toxicidad (CL <sub>50</sub> ).....	34
SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> .....	37
Testigos negativos.....	37
Testigo URE.....	40
Tratamientos GHPMF.....	43
Conclusiones.....	49
Recomendaciones.....	49
Referencias.....	50
Anexos	
1.- Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	60
2.- Pruebas de genotoxicidad .....	61
3.- Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	64
4.- Eventos genéticos que se pueden reconocer en SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	66
5.- Discos imaginales en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	68
6.- Cepas utilizadas para SMART y CL <sub>50</sub> .....	69
7.- Dimorfismo sexual de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	71
8.- Resultados de la prueba U.....	72

## Índice de Figuras

Figura 1.-	Compuesto GHPMF ( <i>N</i> <sup>6</sup> -[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolin-2,4,6-triamina).....	14
Figura 2.-	El papel de las coenzimas del folato en la síntesis de: timidilato, nucleótidos de purina y metionina.....	15
Figura 3.-	Reacciones catalizadas por DHFR, PTR1 y PTR2 .....	15
Figura 4.-	Reacciones del metabolismo xenobiótico.....	21
Figura 5.-	Metabolismo del uretano .....	23
Figura 6.-	Transformación del uretano a vinil carbamato epóxido .....	23
Figura 7.-	Cultivo y propagación de las cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	28
Figura 8.-	Incubadora con los tratamientos con GHPMF para prueba CL <sub>50</sub> .....	30
Figura 9.-	Tratamientos GHPMF para SMART.....	31
Figura 10.-	Preparaciones permanentes .....	32
Figura 11.-	Análisis de preparaciones permanentes .....	32
Figura 12.-	Porcentaje de mortalidad obtenido en la prueba de toxicidad para la cepa flare de <i>D. melanogaster</i> tratada con GHPMF [15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 µM/EtOH 2%], y testigo EtOH 2%.....	35
Figura 13.-	Porcentaje de mortalidad obtenido en la prueba de toxicidad para la cepa Oregon-flare de <i>D. melanogaster</i> tratada con GHPMF [15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 µM/EtOH 2%], y testigo EtOH 2%.....	35
Figura 14.-	Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en los testigos disolventes EtOH 1.25, 2.5 y 5 %.....	39
Figura 15.-	Frecuencia acumulada de manchas/individuo por cada tamaño de clon <i>mwh</i> en los testigos disolventes EtOH 1.25, 2.5 y 5%.....	39

Figura 16.-	Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el testigo positivo URE/Agua.....	42
Figura 17.-	Frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon <i>mwh</i> en el testigo positivo URE/Agua.....	42
Figura 18.-	Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 4 $\mu$ M/EtOH 1.25% con respecto al testigo disolvente EtOH 1.25% en SMART.....	45
Figura 19.-	Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 8 $\mu$ M/EtOH 2.5% con respecto al testigo disolvente EtOH 2.5% en SMART.....	45
Figura 20.-	Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 16 $\mu$ M/EtOH 5% con respecto al testigo disolvente EtOH 5% en SMART.....	46
Figura 21.-	Frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon <i>mwh</i> en el tratamiento con GHPMF 4 $\mu$ M/EtOH 1.25%.....	46
Figura 22.-	Frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon <i>mwh</i> en el tratamiento con GHPMF 8 $\mu$ M/EtOH 2.5%.....	47
Figura 23.-	Frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon <i>mwh</i> en el tratamiento con GHPMF 16 $\mu$ M/EtOH 5%.....	47
Figura 24.-	Sitio activo de la enzima TcDHFR.....	48
Figura 25.-	Sitio activo de la enzima hDHFR.....	48
Figura 26.-	Ciclo de vida <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	60
Figura 27.-	Ciclo de vida <i>Drosophila melanogaster</i> .....	65
Figura 28.-	Discos imaginales y estructuras adultas que forman.....	68
Figura 29.-	Expresión fenotípica de tricomas multiples del marcador <i>mwh</i> .....	69
Figura 30.-	Expresión fenotípica de ala con marcador <i>mwh</i> .....	69



Figura 31.-	Expresión fenotípica de tricomas malformados del marcador <i>flr<sup>3</sup></i> .....	70
Figura 32.-	Expresión fenotípica de ala con marcador <i>Bd<sup>s</sup></i> .....	70
Figura 31.-	Dimorfismo sexual en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	71

## Índice de Tablas

Tabla I.-	Pruebas de genotoxicidad.....	17
Tabla II.-	Toxicidad y/o genotoxicidad de tripanocidas naturales y sintéticos.....	24
Tabla III.-	Pruebas de toxicidad y/o genotoxicidad a derivados de quinazolininas.....	25
Tabla IV.-	Tratamientos con el tripanocida GHPMF para la prueba de toxicidad CL <sub>50</sub> en <i>D. melanogaster</i> .....	29
Tabla V.-	Tratamientos con el tripanocida GHPMF en la CE de SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> .....	31
Tabla VI.-	Resultados obtenidos de SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> para la progenie trans-heterocigota de la crucea CE después del tratamiento crónico de larvas (72 ± 4 h) con los testigos negativos Agua y EtOH al 1.25, 2.5 y 5%.....	38
Tabla VII.-	Resultados obtenidos de SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> para la progenie trans-heterocigota de la CE, después del tratamiento crónico de larvas (72 ± 4 h) con Agua y el testigo positivo URE 20 mM.....	41
Tabla VIII.-	Resultados obtenidos de SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> para la progenie trans-heterocigota de la CE, después del tratamiento crónico de larvas (72 ± 4 h) con testigos disolventes EtOH 1.25, 2.5 y 5% y los tratamientos con GHPMF 4, 8 y 16 µM disuelto en EtOH 1.25, 2.5 y 5% respectivamente.....	44

## Lista de Abreviaturas

<b><i>Bd<sup>s</sup></i></b>	<i>Beaded Serrate.</i>
<b>CE</b>	Cruza estándar.
<b>CYP450s</b>	Citocromos P450.
<b>dTMP</b>	timidilato.
<b>dUMP</b>	desoxiuridilato.
<b><i>flr<sup>3</sup></i></b>	<i>flare.</i>
<b>GHPMF</b>	<i>N</i> <sup>6</sup> -[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolin-2,4,6-triamina.
<b>K-S</b>	Prueba Kolmogorov-Smirnov.
<b>MTX</b>	Metotrexato.
<b><i>mwh</i></b>	<i>multiple wing hairs.</i>
<b>SMART</b>	Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas.
<b>URE</b>	Uretano o carbamato de etilo.

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas que puede ocasionar lesiones en corazón, aparato digestivo y sistema nervioso. La OMS reporta que 7 a 8 millones de personas en el mundo están infectadas, principalmente en América Latina, donde ésta es endémica. El tratamiento contra esta enfermedad radica en la utilización de tripanocidas, muchos de los cuales han presentado efectos adversos a la salud. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles efectos genotóxicos del tripanocida GHPMF, sintetizado en la Facultad de Química (UNAM), sobre *D. melanogaster*. Se realizó la prueba CL<sub>50</sub> con el GHPMF [15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 µM/EtOH 2%] en las líneas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*, en tres experimentos independientes con cinco réplicas por concentración y 10 larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) por réplica; los resultados se analizaron con la prueba Kolmogorov-Smirnov. Se evaluó el efecto genotóxico del GHPMF con la cruza estándar de SMART en ala de *D. melanogaster*, exponiendo larvas de tercer estadio a los tratamientos crónicos: agua miliQ, EtOH (1.25, 2.5 y 5%), Uretano (20 mM), GHPMF (4, 8 y 16 µM disueltas en EtOH 1.25, 2.5 y 5%, respectivamente). Las moscas adultas fueron recuperadas en EtOH 70 %, se disectaron las alas de fenotipo silvestre y se revisaron, sin prejuicio, a 40X. Los datos se analizaron con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1. Los resultados indicaron que en la prueba CL<sub>50</sub> no se encontró efecto tóxico a ninguna de las concentraciones probadas de GHPMF. En SMART en ala se encontraron diferencias significativas para manchas grandes en el tratamiento EtOH 1.25%, y manchas pequeñas, grandes y totales en el tratamiento Uretano, ambos con respecto al agua. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones probadas de GHPMF con respecto a sus testigos disolventes. Se discute el resultado del tratamiento EtOH 1.25% y se concluye que el tripanocida GHPMF no presenta efecto tóxico, ni genotóxico en este modelo biológico y bajo estas condiciones experimentales.

## INTRODUCCIÓN

El parasitismo constituye un serio problema médico-social, que afecta no solamente a los países subdesarrollados, donde las condiciones climáticas y la presencia de áreas con pobreza extrema son dos de los factores que contribuyen para una situación epidemiológica de esta enfermedad, teniendo baja mortalidad pero con consecuencias altas en cuanto a morbilidad, sino también afecta a países desarrollados debido al rápido incremento de los viajes intercontinentales y la migración. Por si fuera poco, la frecuencia y el tipo de parásito pueden variar de una región a otra, afectando un gran número de personas en cualquier lugar sin importar raza, estado económico o situación geográfica (Holveck *et al.*, 2007). En América Latina el *Trypanosoma cruzi* tiene mucha importancia médica ya que provoca la enfermedad de Chagas.

## ENFERMEDAD DE CHAGAS

Esta enfermedad puede ocasionar lesiones en corazón, aparato digestivo y sistema nervioso y puede transmitirse por diferentes vías, siendo la más frecuente a través de la picadura de insectos hematófagos de la familia Reduviidae; en México existen siete géneros con aproximadamente 30 especies distribuidas a lo largo del territorio nacional. Otras vías de transmisión son las transfusiones de sangre, el trasplante de órganos de donantes infectados, a través de la placenta (Chagas congénito) o bien por contacto directo con la sangre de personas o animales parasitados. La OMS estima que entre 7 y 8 millones de personas en todo el mundo están infectadas, principalmente en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica (OMS, 2013). Para ver ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* ver el Anexo 1

## TRIPANOCIDAS

El tratamiento en contra de estos protozoos radica en la utilización de tripanocidas, dos de los más importantes han sido Nifurtimox (NFX) de Bayer y Benznidazol (BNZ), originalmente de Rocher, sin embargo, estos fármacos son a menudo mal tolerados y producen efectos secundarios graves en el huésped, especialmente cuando se requieren protocolos largos de tratamiento; en el caso del NFX puede producir anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dermatitis y compromiso del SNC con insomnio, alucinaciones,

parestesias y psicosis; por otro lado se ha demostrado que el BNZ produce erupción cutánea, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia, artralgia, trombocitopenia, púrpura, agranulocitosis, polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica. En animales de experimentación ambos han demostrado efecto mutagénico y teratogénico (Castro y Díaz de Toranzo, 1988; Castro *et al.*, 2006).

Otro compuesto ampliamente estudiado es el Metotrexato (MTX) debido a su propiedad antifolato, que también inhibe la síntesis de nucleótidos de timidina (Creek *et al.*, 2013); sin embargo, se han reportado en diversos estudios efectos adversos del MTX tales como la genotoxicidad del compuesto (Würgler *et al.*, 1983; Padmanabhan *et al.*, 2008) y citotoxicidad (Padmanabhan *et al.*, 2008).

Debido a los efectos adversos que los tripanocidas han presentado y a que su uso intensivo ha provocado la selección de variedades resistentes del parásito (Campos *et al.*, 2009; Schormann *et al.*, 2005), es necesario el descubrimiento de nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad.

## GHPMF

En 1972 Davoll y colaboradores sintetizaron el compuesto  $N^6$ -[4-(metoxibencil)quinazolin-2,4,6-triamina y demostraron que poseía actividad antiplasmodial; sin embargo, este trabajo fue aparentemente abandonado años más tarde. El Dr. Hernández y colaboradores del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM retomaron la investigación con este compuesto y encontraron actividad tripanocida en pruebas *in vitro* e *in vivo* con una  $CL_{50}$  de 99  $\mu$ M, aunque también un alto nivel de toxicidad, en las ratas Wistar utilizadas como modelo de prueba. Por lo que el Dr. Hernández y su equipo diseñaron un nuevo compuesto derivado del ensamblamiento de fragmentos farmacofóricos de la molécula base 2,4,6-triaminquinazolina con efecto tripanocida llamado GHPMF ( $N^6$ -[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolin-2,4,6-triamina) (Figura 1). El GHPMF presenta mayor afinidad al tripanosoma con una  $CL_{50}$  de 9  $\mu$ M y sin demostrar toxicidad en ratas Wistar a las concentraciones probadas (Comunicación personal con el Dr. Hernández Luis, 2012).

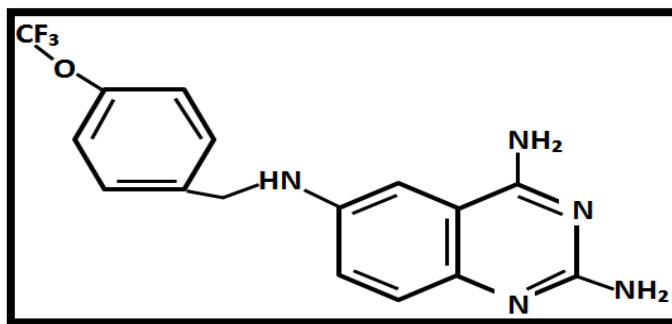


Fig. 1.- Compuesto GHPMF ( $N^6$ -[4-(trifluorometoxi)benzill]quinazolin-2,4,6-triamina)

Los derivados de la quinazolina tienen un amplio espectro de actividades farmacológicas, que incluye entre otros, propiedades antifúngicas (Ghorab *et al.*, 2000), antifolato (Al-Omary *et al.*, 2010), antiparasitarias (Ommeh *et al.*, 2004), antibacteriales (Panneerselvam *et al.*, 2009) y anticancerígenas (Chandrika *et al.*, 2008., Kasibhatla *et al.*, 2007).

La actividad antiparasitaria de la molécula base 2,4,6-triaminquinazolina, es debida a que inhibe las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y pteridín reductasa (PTR) presentes en *Trypanosoma cruzi*. Las enzimas DHFR y PTR son vitales para la sobrevivencia del parásito ya que son organismos pteridín y folato auxótrofos (Schormann *et al.*, 2005). La enzima DHFR cataliza la reducción del folato del hospedero a 7,8-dihidrofolato (DHF) y subsecuentemente a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) (Figura 2 y 3) (Beverley, 1991; Webber and Whiteley, 1985). La enzima serina-hidroximetil-transferasa convierte al THF en 5,10-metil-tetrahidrofolato que es co-factor de la timidilato sintasa (TS) la cual a su vez convierte al desoxi-uridina-monofosfato (dUMP) en desoxi-timidina-monofosfato (dTMP) liberando DHF (O'Neil *et al.*, 2003), mientras que la enzima PTR cataliza la reducción de pterinas conjugadas y no conjugadas, además puede llevar a cabo la reducción del folato a DHF y THF (Nare *et al.*, 1997; Schormann *et al.*, 2005) (Figura 2). Por lo anterior, el THF es fundamental en el metabolismo intermediario de nucleótidos pirimídicos y ácidos nucleicos, catalizando secuencialmente reacciones en la síntesis *de novo* de la desoxi-timidina-monofosfato (dTMP). Por tanto al bloquear la actividad de dichas enzimas disminuye la dTMP en la

célula y la falta de timidina lleva a la muerte celular (Blakey, 1984, Santi y Danenberg, 1984).

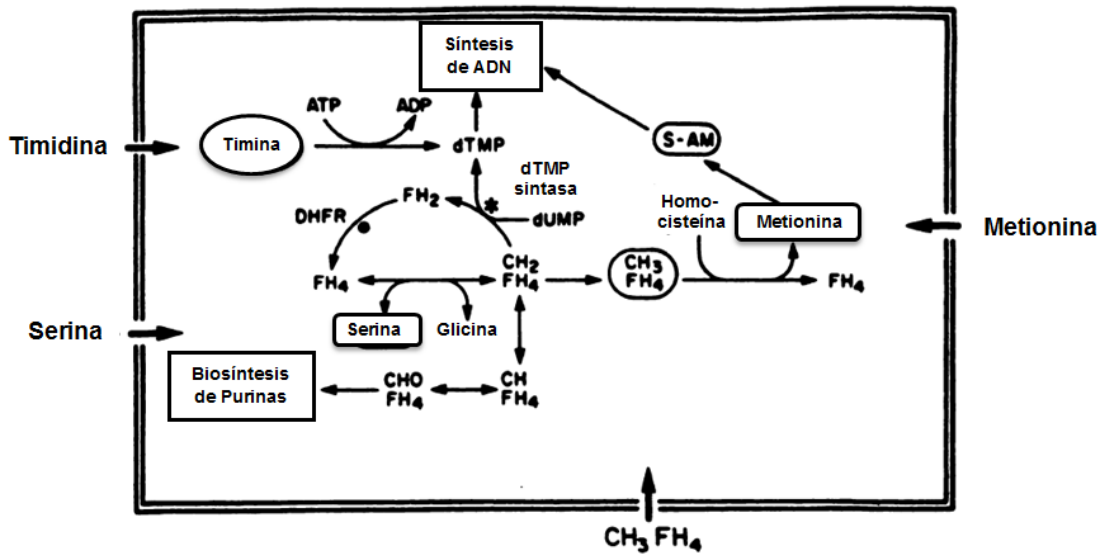


Fig. 2.- El papel de las coenzimas del folato en la síntesis de: timidilato, nucleótidos de purina, y metionina. Abreviaturas: **CHO<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>**: 5-formiltetrahidrofolato; **CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>**: 5,10-metiltetrahidrofolato; **CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>**: 5,10-metilenotetrahidrofolato; **CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>**: 5-metiltetrahidrofolato; **FH<sub>2</sub>**: 7,8-dihidrofolato; **FH<sub>4</sub>**: 5,6,7,8-tetrahidrofolato; **S-AM**: S-adenosilmetionina. Modificado de Scanlon y Kashani, 1988.

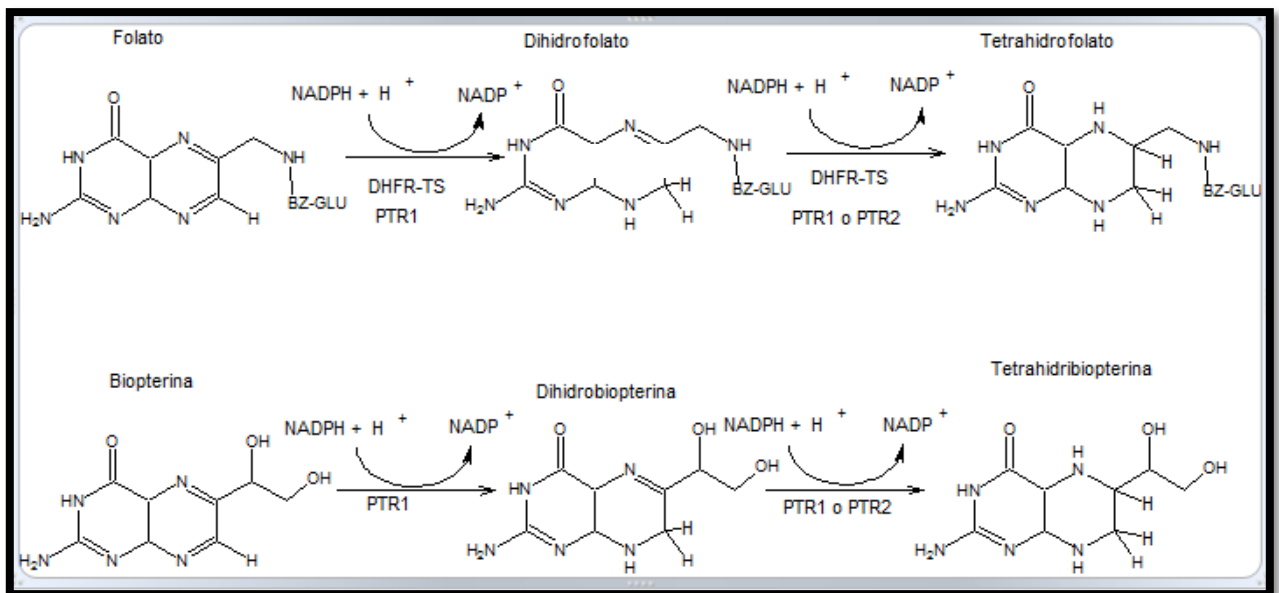


Fig. 3.- Reacciones catalizadas por DHFR, PTR1 y PTR2. Modificado de Schormann *et al.*, 2005.



## PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

Pese a no encontrar efectos tóxicos de GHPMF en ratas Wistar, es esencial el estudio de los efectos tóxicos y genotóxicos que pueda tener sobre la mayor cantidad de modelos biológicos, antes de que se utilicen de manera comercial.

La genética toxicológica es la disciplina que identifica y analiza la acción de agentes cuya toxicidad recae sobre el material hereditario de los seres vivos, ya sea en células germinales trayendo como consecuencia una mutación hereditaria o infertilidad, o células somáticas ocasionando muerte celular o cáncer (Vogel *et al.*, 1999).

Para evaluar la genotoxicidad muchas veces se deben realizar pruebas previas de toxicidad que pueden ser crónicas, subcrónicas, subagudas o agudas, estas últimas sirven para establecer cuantitativamente la toxicidad de un compuesto mediante la administración en dosis únicas relativamente altas, pudiendo calcular la Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ), dosis individual de una sustancia que provoca la muerte de 50% de la población estudiada, normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal. Sin embargo en organismos pequeños es difícil conocer la dosis exacta consumida por el individuo, por lo que se utiliza como alternativa la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) que expresa la concentración de la sustancia que causa la muerte de 50% de la población presente. Se expresa en mililitros (Repetto y Repetto, 2009) o milimoles (Vogel *et al.*, 1999) por kilogramo de peso animal.

Una vez que se conoce la dosis o concentración subtóxica del compuesto con que se va a trabajar, se determinan los efectos genotóxicos mediante alguna de las pruebas (Tabla I), la selección de ésta depende del tipo de daño causado reconociéndose cuatro niveles:

Tabla I.- Pruebas de genotoxicidad.

<p><b>Nivel I.- Pruebas para reconocer el daño en la estructura primaria del DNA</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Ensayo cometa.</li><li>❖ SOS Chromotest (<i>E. coli</i> PQ 37).</li><li>❖ Prueba de segregación mitótica en <i>Aspergillus nidulans</i>.</li><li>❖ Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</li><li>❖ Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas en <i>D. melanogaster</i> (SMART)</li><li>❖ Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) <i>in vitro</i> con células de mamífero</li></ul>
<p><b>Nivel II.- Ensayos para mutaciones génicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Ensayo Ames (<i>Salmonella typhimurium</i>).</li><li>❖ SOS Chromotes (<i>E. coli</i> PQ 37).</li><li>❖ Letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i>.</li><li>❖ Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en <i>Drosophila melanogaster</i>.</li><li>❖ Prueba de mutación de los pelos estaminales de <i>Tradescantia</i></li></ul>
<p><b>Nivel III.- Ensayos para mutaciones cromosómicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Ensayo de micronúcleos.</li><li>❖ Ensayo en la línea celular CHO.</li><li>❖ Aberraciones cromosómicas.</li><li>❖ Prueba citogenética <i>in vitro</i> en células de mamífero.</li><li>❖ Prueba citogenética <i>in vivo</i> en ratones.</li><li>❖ Prueba de letales dominantes en ratones.</li><li>❖ Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).</li><li>❖ Prueba citogenética de las células meristemáticas de la raíz de <i>Vicia faba</i>.</li></ul>
<p><b>Nivel IV.- Otras pruebas. Daño a la célula.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>❖ Morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.</li><li>❖ Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).</li></ul>

Para detalles de cada prueba véase Anexo 2.

## SMART

El Bioensayo a corto plazo Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster* (para ver ciclo de vida vea Anexo 3) detecta mutaciones puntuales, deleciones, aneuploidías y recombinaciones somáticas (para detalles vea Anexo 4) provocadas por la exposición a distintas concentraciones de algún agente químico o físico (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

SMART emplea dos diferentes sistemas fenotípicos: mutaciones en las células de los ojos o en los tricomas de las alas (Graf *et al.*, 1984). Ambos sistemas tienen como fundamento la pérdida de heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas (Anexo 5). En el caso de la prueba en ala, cuando se exponen las larvas a un agente sospechoso, el daño se expresa como clones o manchas de células mutantes en las alas de los organismos adultos. Las manchas se pueden observar o contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas contra la obtenida en organismos no expuestos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Este ensayo está validado en más de 400 agentes (Vogel *et al.*, 1999), requiere sólo de una generación para conocer el potencial genotóxico del compuesto probado y es capaz de detectar el papel del metabolismo xenobiótico en este efecto (Graf y Van Schaick, 1992).

## METABOLISMO XENOBIÓTICO

Todos los organismos están constantemente expuestos a agentes químicos externos denominados xenobióticos que pueden ser sintéticos (fármacos, drogas, pesticidas, sustancias industriales), o naturales (alcaloides, metabolitos secundarios de plantas, toxinas vegetales y/o animales). Los xenobióticos pueden ser absorbidos por los organismos a través de piel, pulmones y tubo digestivo. Debido a su naturaleza lipofílica es difícil su eliminación, por lo que ésta depende de su biotransformación a sustancias químicas más hidrosolubles que pueden ser excretadas por la orina o bilis (Figura 4). El proceso de biotransformación se subdivide en 2 fases:

## Fase I

Comprende reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación; exponiendo o induciendo un grupo funcional (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) (Curtis y Watkins, 2001). El metabolito resultante es más polar, más reactivo y sensiblemente menos lipófilo. Estas reacciones son catalizadas por un grupo de enzimas que se encuentran tanto en el citosol como en retículo endoplásmico, tales como las esterasas, reductasas, deshidrogenasas, hidrolasas y monooxigenasas. Dentro de estas últimas se encuentran dos familias principales; las flavin monooxigenasas y los citocromos P450 (Murray *et al.*, 2004)

### Citocromos P450 (Cyp450)

Hemoproteínas formadas por complejos de hierro-porfirina, conocidos como grupo hemo, se caracterizan por una intensa absorbancia cerca de los 450 nm después de la reducción con CO, catalizan reacciones que introducen un átomo de oxígeno (derivado del oxígeno molecular) al sustrato, lo cual origina un producto hidroxilado. El NADPH y la enzima NADPH-P450 reductasa intervienen en el mecanismo de reacción del complejo. En vertebrados los CYP450s se hallan abundantemente en el hígado, el tracto gastrointestinal, el pulmón y los riñones, son los más importantes debido a su gran variedad de isoformas y se consideran los biocatalizadores más versátiles hasta ahora (Murray *et al.*, 2004). Las familias 1-3 participan en la eliminación de xenobióticos incluyendo 70-80% de los medicamentos (Bertz y Granneman, 1997; Evans y Relling, 1999).

Se encuentran ampliamente distribuidas entre las distintas especies y grupos taxonómicos: mamíferos, aves, bacterias, insectos, etc. En el caso de *Drosophila melanogaster* los tejidos reconocidos como los principales sitios de desintoxicación mediada por los Cyp450 son: el intestino medio, túbulos Malpighi y la grasa corporal (Giraudó *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2007), la resistencia a insecticidas en algunas cepas se atribuye a la presencia de diferentes Cyp450, por ejemplo Cyp6G1, Cyp6A2, Cyp12D1 y Cyp12A4 (Yang *et al.*, 2007).

## Fase II

Los derivados obtenidos de la Fase I son conjugados con moléculas endógenas dando lugar a reacciones de glucuronidación, sulfatación, aminoacidación, glutacionización, metilación y acetilación. El objetivo es que el xenobiótico se vuelva más soluble y más pesado para posteriormente ser excretado por la orina o bilis (Murray *et al.*, 2004).

Glucuronidación → catalizada por la enzima UDP-glucuronil transferasa (UGT) agrega un grupo glucuronil al grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del xenobiótico. El donador del grupo polar es el ácido UDP-glucurónico (Murray *et al.*, 2004).

Sulfatación → la realizan enzimas sulfotransferasas (SULT) que transfieren un grupo sulfato a un grupo hidroxilo o amino del sustrato (Murray *et al.*, 2004).

Glutacionización → la enzima glutatión-S-transferasa (GST) añade glutatión (GSH), tripéptido compuesto de Glu-Gli-Cis, a través de su grupo sulfhidrilo con un carbono electrofílico del sustrato. Esta reacción es importante para la eliminación de epóxidos y peróxidos, como el de hidrógeno. Cuando las cifras de glutatión disminuyen significativamente, el organismo puede desarrollar daños considerables por peroxidación de lípidos (Murray *et al.*, 2004).

Metilación → catalizada por enzimas metiltransferasas que transfieren un metilo a un hidroxilo, amino o sulfhidrilo del xenobiótico. Utilizan la S-adenosilmetionina como donador. La metilación puede enmascarar grupos funcionales impidiendo que participen en reacciones de la Fase II y por lo tanto disminuyen su tasa de eliminación (Murray *et al.*, 2004).

Acetilación → realizada por la N-acetiltransferasa siendo el donador de acetilo la acetil-CoA.

Por lo general las reacciones de biotransformación modifican los xenobióticos para convertirlos en metabolitos más hidrosolubles, dichas modificaciones conllevan generalmente la disminución del potencial tóxico, por lo cual también es conocido como desintoxicación. Sin embargo, existen casos en que las modificaciones pueden producir una gran variedad de efectos biológicos, incluyendo respuestas farmacológicas,

citotoxicidad, genotoxicidad, toxicidad, mutagenicidad, reacciones inmunológicas y/o cáncer (Murray *et al.*, 2004).

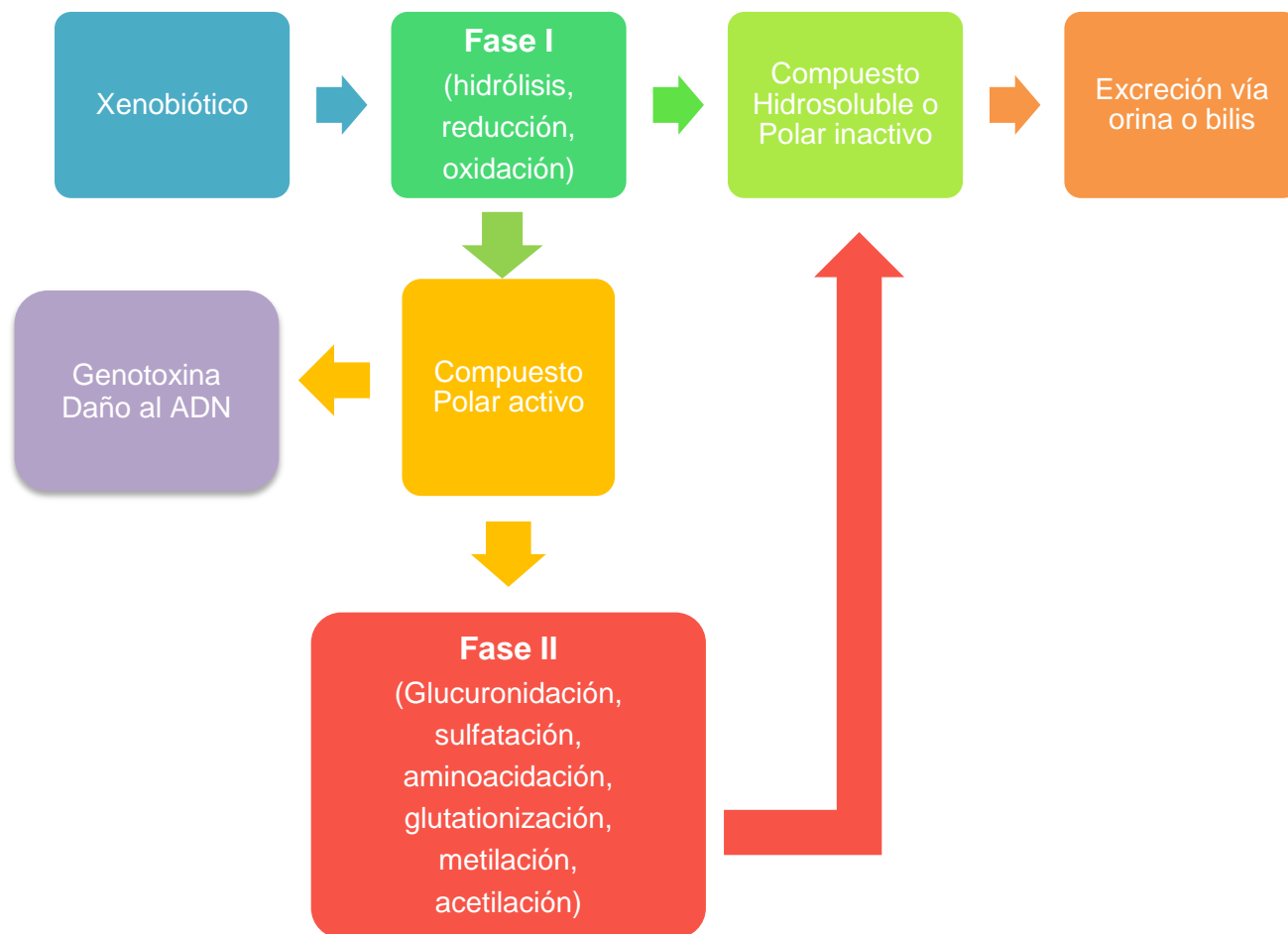


Fig. 4. Reacciones del metabolismo xenobiótico

## URETANO

El uretano o carbamato de etilo (URE), es un compuesto que daña el material genético, se encuentra en las hojas y el humo del tabaco (Schmeltz *et al.*, 1978) así como en la mayoría de los alimentos fermentados. El URE es un promutágeno, es decir *per se* no tiene efecto cancerígeno o mutagénico; sin embargo, al pasar por el metabolismo xenobiótico se activa convirtiéndose en una genotoxina. El metabolismo xenobiótico del URE puede ser llevado a cabo por tres vías diferentes (Figuras 5 y 6). En la primera es hidrolizado por esterasas adosadas al retículo endoplásmico en etanol, amonio y dióxido de carbono, compuestos hidrosolubles que son excretados sin causar daño. En la segunda, es convertido por los CYP450s a *N*-hidroxiuretano, pudiendo generar un radical nitroso o por enzimas esterasas producir hidroxilamina, este último aumenta el O<sub>2</sub> que causa daños por oxidación al ADN. En la tercera, es transformado por los CYP450s, en mamíferos se reporta que por el CYP2E1, a carbamato de vinilo, que después de una segunda oxidación produce vinil carbamato epóxido (Sakano *et al.*, 2002; Woo Cha *et al.*, 2000), el cual puede unirse covalentemente a proteínas, RNA y DNA formando aductos (Frölich y Wurgler, 1990; Fossa *et al.*, 1985; Miller y Miller, 1983). Los metabolitos del URE inducen carcinogénesis a través de la formación de aductos, depuración (sitios AP) del DNA y en menor medida oxidación (Sakano *et al.*, 2002). También se ha demostrado que el URE afecta la división celular, ya que puede incrementar (Hoffler *et al.*, 2005) o inhibir (Field y Lang 1988) la actividad mitótica. En *D. melanogaster* el URE ha demostrado ser tóxico a concentraciones > 30 mM (Dueñas-García *et al.*, 2005), y genotóxico a la concentración de 20 mM (Santos, 2006; Frölich y Wurgler, 1990) para este modelo biológico.

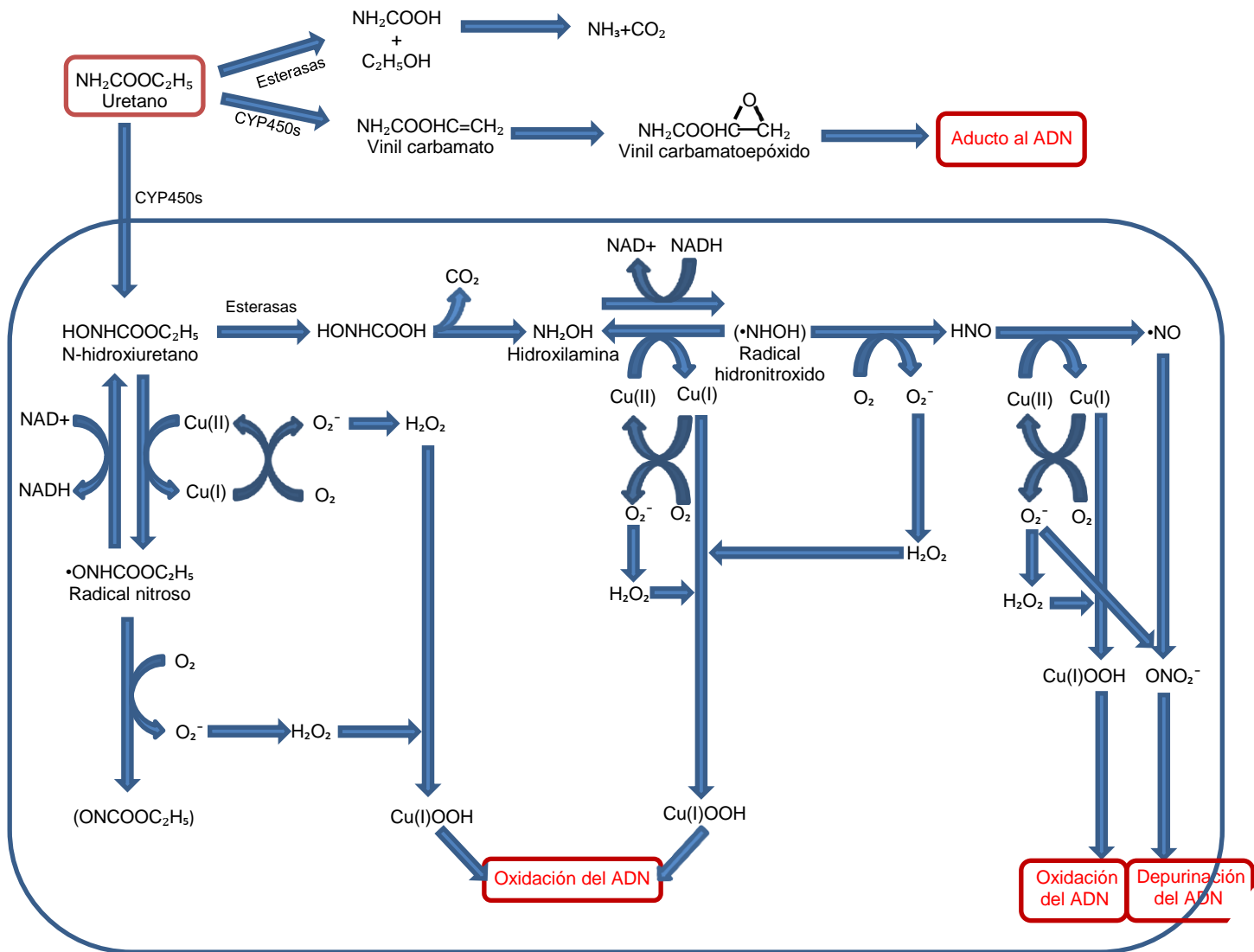


Fig. 5.- Metabolismo del uretano (modificado de Sakano *et al.*, 2002)

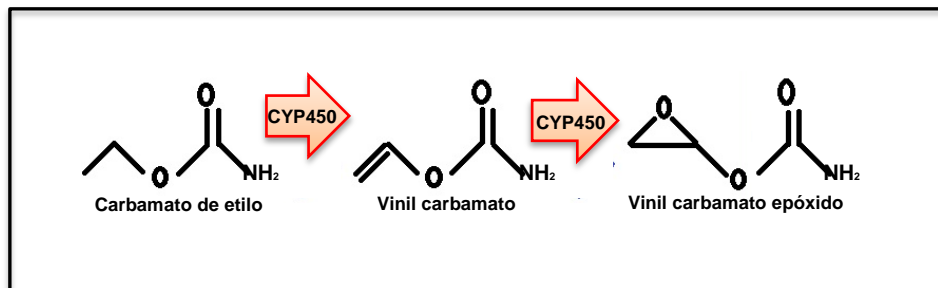


Fig. 6.- Transformación del uretano a vinil carbamato epóxido (modificado de Kemper *et al.*, 1995)



## ANTECEDENTES

Tabla II.- Toxicidad y/o genotoxicidad de tripanocidas naturales y sintéticos.

Autor y año	Ensayo	Resultados
Buschini <i>et al.</i> , 2007.	Ensayo cometa con y sin endonucleasas en leucocitos humanos.	Los tripanocidas 5-nitromegazol y 5-nitroimidazol-tiosemicarbazona [1, 2, 4 y 8 µg/mL] causaron daño al DNA, principalmente por estrés oxidante.
De Rezende <i>et al.</i> , 2011	SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> .	El tripanocida dibenzilbutirolactolico lignano (-)-cubebina [2.0 y 4.0 mM] incrementó la genotoxicidad del agente clastogénico Doxorubicina [0.2 mM], al parecer con participación en el metabolismo xenobiótico.
Da Silva <i>et al.</i> , 2000.	NAC (Contenido de ácido nucleico) en células V79 de fibroblastos de pulmón de hámster chino.	Los tripanocidas Prodigiosina y Benznidazol mostraron alteración del NAC a [20 y 2000 µM], respectivamente.
	Prueba de viabilidad celular MTT en células V79 de fibroblastos de pulmón de hámster chino.	Prodigiosina y Benznidazol mostraron reducción de la viabilidad celular a [6 y 2000 µM], respectivamente.
	NRU (Captación de rojo de metilo) en células V79 de fibroblastos de pulmón de hámster chino.	Solo la Prodigiosina mostró disminución de NRU a [1 µM].
Kato <i>et al.</i> , 2012	Ensayo de formación de colonias.	El ácido pimaradienoico (PA) fue citotóxico a [ $>5$ µg/mL].
	Ensayo cometa en células de mamífero.	PA causó daños al DNA a [2.5 y 5 µg/mL].

	Prueba de micronúcleos en hepatocitos.	PA provocó daños al DNA a la dosis de 80 mg/kg.
Niwa <i>et al.</i> , 2013.	RT-PCR tiempo real en una línea celular de hepatoma en <i>Rattus norvergicus</i> .	Encontraron efecto citotóxico de (-)- cubebina a [280 µM].

Tabla III.- Pruebas de toxicidad y/o genotoxicidad a derivados de quinazolininas.

Autor y año	Ensayo	Resultados
Kabri <i>et al.</i> , 2010	Células K562.	Se encontró toxicidad de 14 derivados con un rango de CL <sub>50</sub> de [15-125 µM].
	Células HepG2.	También se encontró toxicidad en el rango CL <sub>50</sub> [15-100 µM].
Moreno <i>et al.</i> , 2012.	Cultivos de células de glándulas mamarias (184B5) y células de epitelio bronquial (BEAS-2B).	Reportaron 35 derivados casi todos con efecto tóxico a [>100 µM].
Doppalapudi <i>et al.</i> , 2012.	Prueba AMES, Prueba de aberraciones cromosómicas en células CHO y Prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón	El derivado CP-31398 no presentó efectos genotóxicos.
Ferraris <i>et al.</i> , 2007.	Prueba de micronúcleos en ratas Wistar	El tripanocida (-)-hinoquinina a (10, 20 y 40 mg/kg) no mostró efectos genotóxicos.

## **JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Chagas está cobrando mayor atención actualmente, ya que por año se registran miles de nuevos casos en todo el mundo, sobre todo en América Latina donde esta enfermedad es endémica, por lo cual la búsqueda de nuevos fármacos se ha convertido en una necesidad; varios laboratorios han formulado e investigando nuevos tripanocidas; sin embargo, muchos de ellos presentan efectos adversos a la salud, por lo cual es imprescindible la formulación de nuevos tripanocidas y el reconocimiento de sus posibles efectos tóxicos y/o genotóxicos con la mayor cantidad de pruebas posibles antes de comercializarlos.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que varios tripanocidas han presentado efectos genotóxicos, se espera que el tripanocida GHPMF tenga efecto genotóxico en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la genotoxicidad del tripanocida GHPMF en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la toxicidad (CL<sub>50</sub>) del GHPMF en las cepas Oregon-flare y flare de *Drosophila melanogaster*.

Reconocer la posible genotoxicidad del GHPMF en la cruza estándar (CE) de SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### QUÍMICOS

-Tripanocida GHPMF donado por el Dr. Francisco Hernández Luis de la Facultad de Química de la UNAM. El GHPMF fue disuelto con diferentes concentraciones de EtOH (1.25, 2, 2.5 y 5%).

-Etanol grado HPLC (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH). CAS 64-17-5. P.M. 46.07 (Fermont® Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México).

-Medio Instantáneo Carolina (MIC) adquirido de Carolina Biological Supply Company (Burlington North Carolina, USA).

-Entellan. CAS. 1.07961 (Merck®, Darmstadt, Germany).

-Uretano 99% de pureza (NH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) CAS. 51-79-6. P.M. 89.09 (Fluka® 94300).

### BIOLÓGICOS

-Cepas de *D. melanogaster*: Oregon-flare, flare y multiple wing hair del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM, donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology), Universidad de Zurich, Suiza.

-Levadura fresca La Florida®.

## PROPAGACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *D. melanogaster*.

Se propagaron las cepas Oregon-flare, flare y multiple wing hair (para detalles ver Anexo 6) en frascos de vidrio de 250 mL con 5 g de hojuela de papa Maggi® y 20 mL de solución conservadora (5 mL de tegosept al 12% (OH) y 5 mL de ácido propiónico:ortofosfórico, aforado a 1 L de agua) (Figura 7) (Dueñas *et al.*, 2001) en una incubadora a 25°C, humedad relativa (HR) de 65% y total oscuridad.



Fig. 7.- Cultivo y propagación de las cepas de *D. melanogaster*.

## COLECTA DE HUEVOS Y RECUPERACIÓN DE LARVAS.

La colecta de huevos se realizó trasvasando moscas adultas de las cepas Oregon-flare y flare a frascos de 250 mL con levadura fresca activada con sacarosa. El tiempo de colecta fue de 8 h en una incubadora a 25°C, 60% de HR y total oscuridad. Terminado este tiempo se retiraron de los frascos las moscas adultas y los huevos se mantuvieron en la incubadora bajo las condiciones descritas.

Larvas de  $72 \pm 4$  h de edad fueron recuperadas de cada cepa, disolviendo rápidamente la levadura con agua corriente a temperatura ambiente y haciéndola pasar por una coladera de acero de malla fina.

### Prueba de Toxicidad (CL<sub>50</sub>)

Para realizar SMART en ala se llevó al cabo una prueba previa de toxicidad para encontrar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) que el modelo tolerara en las cepas Oregon-flare y flare.

Se colocaron larvas de tercer estadio, de cada cepa, en tubos con 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina y 2 mL de GHPMF en las siguientes concentraciones (Tabla IV):

Tabla IV.- Tratamientos probados con el tripanocida GHPMF para la prueba de toxicidad CL<sub>50</sub> en *D. melanogaster*.

Testigo disolvente	EtOH 2%
Tratamiento 1	GHPMF (508 µM/EtOH 2%)
Tratamiento 2	GHPMF (254 µM/EtOH 2%)
Tratamiento 3	GHPMF (127 µM/EtOH 2%)
Tratamiento 4	GHPMF (63.5 µM/EtOH 2%)
Tratamiento 5	GHPMF (31.75 µM/EtOH 2%)
Tratamiento 6	GHPMF (15.8 µM/EtOH 2%)

Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por concentración colocando 10 larvas por tubo. Las larvas tratadas permanecieron en incubación (Figura 8) hasta que eclosionaron los imagos. Posteriormente se contaron las moscas sobrevivientes y se analizaron los datos mediante regresión, Prueba *t* de Student y la Prueba Kolmogorov-Smirnov.



Fig. 8.- Incubadora con los tratamientos con GHPMF para prueba CL<sub>50</sub>.

#### SMART en ala

La cruce E (CE) se realizó con hembras vírgenes flare y machos mwh (Anexo 7), ésta se mantuvo en frascos con hojuela de papa por tres días para permitir la fecundación de las hembras. Al término de este tiempo las moscas se trasvasaron a frascos con medio de levadura fresca durante 8 h a 25°C, 65% de HR y total oscuridad., para la colecta de huevos. Posteriormente, las moscas adultas fueron retiradas y los frascos con la colecta de huevos se regresaron a la incubadora. Aproximadamente a las  $72 \pm 4$  h se recuperaron las larvas de tercer estadio que se colocaron en tubos con 0.5 g de MIC y 2 mL (Figura 9) del testigo negativo agua, testigos disolventes EtOH, testigo positivo URE y del compuesto GHPMF a las concentraciones mostradas en la Tabla V; dado que no se encontró una CL<sub>50</sub> para el GHPMF las concentraciones utilizadas están basadas en la concentración 8  $\mu$ M que tiene efecto tripanocida en *T. cruzi* (Comunicación personal con el Dr. Hernández Luis, 2013).

Tabla V.- Tratamientos probados del tripanocida GHPMF en la CE de SMART en ala de *D. melanogaster*.

Testigo negativo	Agua
Testigos disolventes	EtOH 5%
	EtOH 2.5%
	EtOH 1.25%)
Tratamiento 1	GHPMF (16 $\mu$ M/EtOH 5%)
Tratamiento 2	GHPMF (8 $\mu$ M/EtOH 2.5%)
Tratamiento 3	GHPMF (4 $\mu$ M/EtOH 1.25%)
Testigo positivo	URE 20 mM/Agua



Fig. 9.- Tratamientos GHPMF para SMART en ala.

Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por concentración colocando aproximadamente la misma cantidad de larvas. Éstas permanecieron en incubación hasta que emergieron como imagos. Éstos se recuperaron en EtOH 70 %. Posteriormente, se separaron las moscas con alas de fenotipo silvestre (trans-heterocigotas *mwh + / + flr<sup>3</sup>*) para disectarles las alas y montarlas en preparaciones permanentes con Entellan® (Figura 10). Se analizaron bajo un microscopio a 40x (Figura 11) para detectar manchas pequeñas (1-2 células), manchas grandes (más de 3 células) y manchas gemelas (fenotipos *mwh* y *flr<sup>3</sup>* adjuntos) (Graf *et al.*, 1984).



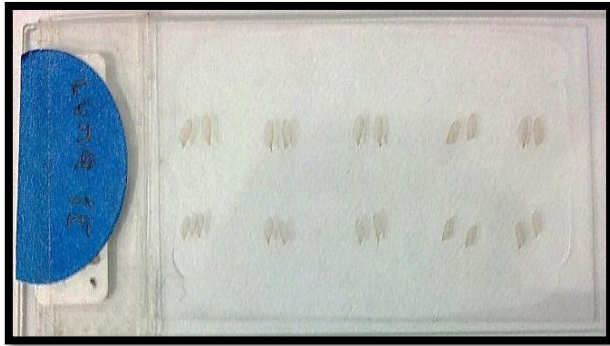


Fig. 10.- Preparaciones permanentes



Fig. 11.- Análisis de preparaciones permanentes

Se analizaron 60 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptima según Frei y Würgler, 1995) con el programa estadístico SMART PC versión 2.1 (Frei y Würgler, 1988) que analiza estadísticamente los resultados detectando las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos de un testigo y las series de tratamientos experimentales; este análisis está basado en la prueba  $\chi^2$  cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad  $p \leq 0.05$ . Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso con base a las siguientes hipótesis:

- ◆ Hipótesis nula ( $H_0$ ): la frecuencia de mutación (inducida + espontánea), de los individuos tratados, no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- ◆ Hipótesis alternativa ( $H_a$ ): la frecuencia de mutación (inducida + espontánea), es  $m$  veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984). Donde  $m$  es el factor de multiplicación utilizado para realizar el análisis estadístico, indicando cuantas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta genotóxica positiva.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y las manchas gemelas (expresión de *flr<sup>3</sup>* junto con *mwh*). De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (obtenida de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas pequeñas es

predominante) se utiliza  $m=2$ , mientras que para las manchas grandes y gemelas  $m=5$  por ser menos comunes. Por ende son posibles las siguientes decisiones (Frei y Würgler, 1988):

1. Aceptar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : negativo.
2. Rechazar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : positivo.
3. Rechazar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : indeciso.
4. Aceptar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : débil positivo.

A los resultados indecisos o débiles positivos, obtenidos con SMART se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos (prueba no paramétrica) con modificaciones para dos colas, para datos individuales usando el programa estadístico STAT-Graphics versión 6.0. en este análisis estadístico, el diagnóstico es significativo cuando  $p \leq 0.05$ .

Para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S), que es una prueba no paramétrica que permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones, comparando *las frecuencias acumuladas* de una distribución con las de otra. Cuando el valor de  $p \leq 0.05$  los resultados indican que hay diferencias significativas entre ambas distribuciones, y por lo mismo una distribución acumulada de clones *mwh* es diferente a otra. Esto significa que la mitosis de las células de los discos imaginales del ala fue alterada con respecto al testigo correspondiente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *T. cruzi* y puede ocasionar lesiones en corazón, aparato digestivo y sistema nervioso. Para el tratamiento contra ésta enfermedad se han utilizado varios tripanocidas, entre los más utilizados se encuentran nifurtimox (De Conti *et al.*, 1996; De Castro and De Meirelles, 1987) y benznidazol (De Andrade *et al.*, 1996), la desventaja del uso de estos compuestos es que presentan poca eficacia dada la resistencia de los parásitos (Campos *et al.*, 2009) y efectos adversos para la salud (De Castro, 1993; Souza *et al.*, 1991; Nagel, 1987). Por tanto, En el presente trabajo se evaluó la toxicidad y genotoxicidad del GHPMF, un compuesto derivado de la quinazolina que ha dado buenos resultados como tripanocida en roedores (comunicación con el Dr. Francisco Hernández Luis, UNAM).

PRUEBA DE TOXICIDAD ( $CL_{50}$ ) del GHPMF en las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*.

En la Figura 12 se muestra el promedio de tres experimentos independientes que se realizaron para calcular el porcentaje de mortalidad de la cepa flare tratada con las concentraciones de GHPMF (15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508  $\mu$ M/disueltas en EtOH 2%) y el testigo EtOH 2%. Los resultados se analizaron con los estadísticos de regresión, la Prueba *t* de Student y la Prueba K-S. Todas las concentraciones probadas mostraron una mortalidad  $>$  a la  $CL_{10}$ .

En la Figura 13 se muestra el promedio de tres experimentos independientes para evaluar la mortalidad de la cepa Oregon-flare tratada con las concentraciones de GHPMF (15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 $\mu$ M/disueltas en EtOH 2%) y el testigo EtOH 2%. Los resultados se analizaron con los estadísticos de regresión, la Prueba *t* de Student y la Prueba K-S. En esta cepa todas las concentraciones probadas mostraron una mortalidad  $>$  a la  $CL_{20}$ .

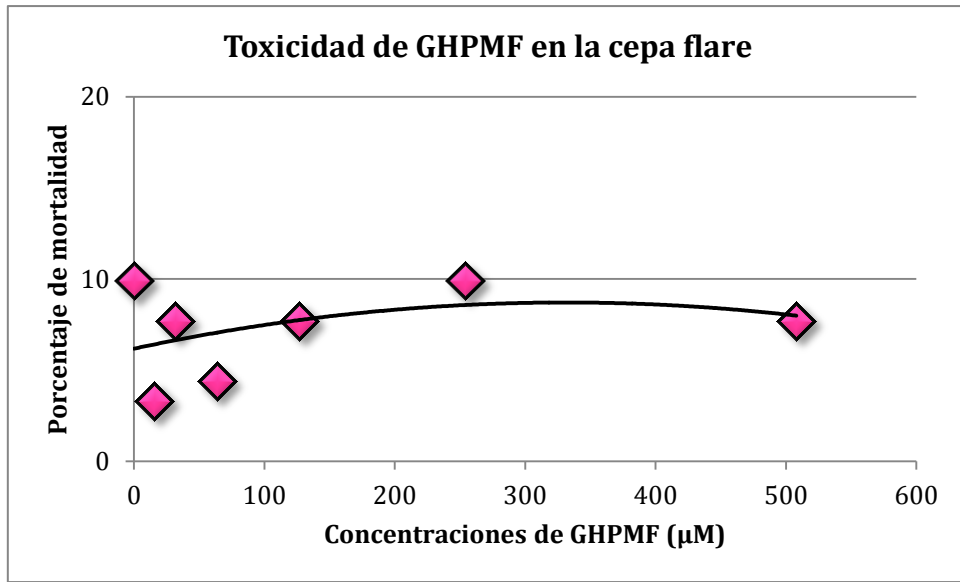


Fig. 12.- Muestra el porcentaje de mortalidad obtenido en la prueba de toxicidad para la cepa flare de *D. melanogaster* tratadas con GHPMF [15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 µM/EtOH 2%] y el testigo EtOH 2%.

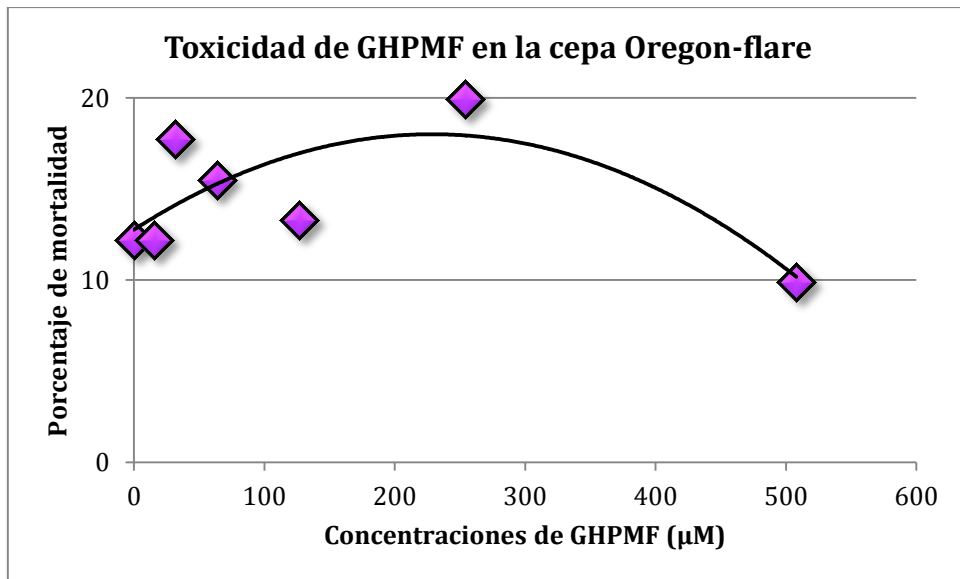


Fig. 13.- Muestra el porcentaje de mortalidad obtenido en la prueba de toxicidad para la cepa Oregon-flare de *D. melanogaster* tratadas con GHPMF [15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 µM/EtOH 2%] y el testigo EtOH 2%.

El no haber encontrado efecto tóxico mayor de 20% en este ensayo con ninguna de las concentraciones probadas y con ninguna de las cepas, podría indicar que el ensamblaje de fragmentos farmacofóricos hecho en la molécula base 2,4,6-triaminquinazolina evitó su posible efecto tóxico; existen reportes de compuestos, con una quinazolina como estructura base, que resultaron tóxicos, tales como el realizado por Kabri y colaboradores en 2010, quienes probaron 14 derivados de quinazolininas como antiparasitarios, sus resultados indicaron que la mayoría de los derivados fueron efectivos tripanocidas a las concentraciones 0.95 y 1.3  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, los derivados tuvieron el inconveniente de ser tóxicos en modelos celulares, obteniendo una  $\text{CL}_{50}$  a concentraciones de 15-125  $\mu\text{M}$  en células K562 y de 15-100  $\mu\text{M}$  en células HepG2. Otro trabajo fue el de Moreno y colaboradores que en el 2012, probaron 35 derivados de quinazolininas obteniendo en la mayoría de los casos efecto tóxico a concentraciones mayores a 100  $\mu\text{M}$ , utilizando cultivos de células de glándulas mamarias (184B5) y células de epitelio bronquial (BEAS-2B).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad entre las cepas flare y Oregon-flare, y debido a que esta última presenta los cromosomas 1 y 2 de la cepa Oregon y en el cromosoma 2 porta la mutación dominante Rst (2) DDT que le permite expresar altos niveles de CYP450 (Graf y Van Schaik, 1992), los resultados indican de manera indirecta que el GHPMF no es metabolizado vía los Cyp450s.

SMART en ala de *D. melanogaster*.

Testigos negativos EtOH (1.25, 2.5 y 5%)

El testigo etanol 1.25% incrementó significativamente la frecuencia de manchas grandes y totales con respecto al agua mostrando un efecto genotóxico (véase Tabla VI y Figura 14), esto concuerda con Ribeiro y Gaivão quienes en 2010 observaron que el etanol a concentraciones 1.25, 2.5 y 5 % mostraron efecto genotóxico en el ensayo cometa, causando rupturas al DNA de neuroblastos de *D. melanogaster*; asimismo Agar *et al.* (1999) y Ribiere *et al.* (1994), reportaron que el etanol a concentraciones altas causan daño cerebral.

Los resultados del presente trabajo podrían explicarse tomando en cuenta que del porcentaje total de etanol que se ingiere, alrededor de 90 % es excretado del cuerpo vía excreción metabólica; sin embargo, el porcentaje restante puede ser metabolizado por la enzima acetaldehído deshidrogenasa convirtiéndolo en acetaldehído, este último puede inducir efectos carcinógenos, genotóxicos y mutagénicos (Brooks y Theruvathu, 2005). Más aún, Kayani y Parry (2010) inhibieron la actividad de acetaldehído deshidrogenasa, utilizando el compuesto disufiram, y demostraron que el EtOH por sí solo también puede producir daños al DNA. Nordmann *et al.* (1992) refiere que la administración crónica de EtOH puede inducir en células humanas al CYP2E1, lo cual favorece la generación de radicales libres microsomales y estos a su vez ocasionan estrés oxidativo.

En este trabajo no se encontró una relación concentración-dependiente, ya que las concentraciones probadas de etanol (2.5 y 5%), no mostraron diferencias significativas, ni una respuesta dependiente de la concentración, esto está de acuerdo con Kayani y Parry (2010) quienes obtuvieron resultados similares, por lo que se puede sugerir que la falta de correlación genotoxicidad-concentración en ambos trabajos pueda deberse a que el EtOH es capaz de presentar una gran variabilidad en su absorción, distribución y metabolismo lo cual es derivado de factores ambientales y genéticos (Ramachandani *et al.*, 2001). Sin embargo, las diferencias significativas encontradas en la distribución del tamaño de clones a las concentraciones 1.25 y 2.5% podrían indicar efecto citotóxico,

citostático o apoptótico (Figura 15), tal como lo reportó Ewald y Saho en 1993, en timocitos de ratón a concentraciones de etanol de 0.2 a 0.8%.

Tabla VI.- Resultados obtenidos de SMART en ala de *Drosophila melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la CE, después del tratamiento crónico a larvas ( $72 \pm 4$  h) con los testigos negativos Agua y EtOH al 1.25, 2.5 y 5%.

Tratamiento (Concentración)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estadístico*										
		Manchas pequeñas (1-2 cél.) m=2		Manchas grandes (> 2 cél.) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas con clon mwh		
		0.92	(55)	0.03	(02)	0.00	(00)	0.95	(57)			
Agua	60	0.92	(55)	0.03	(02)	0.00	(00)	0.95	(57)		57	
EtOH 1.25%	60	0.98	(59)	- 0.18	(11)	+ 0.00	(00)	i,ns	1.17	(70)	- 70	
EtOH 2.5%	60	0.70	(42)	- 0.05	(03)	i,ns	0.02	(01)	i,ns	0.77	(46)	- 46
EtOH 5%	60	0.95	(57)	- 0.05	(03)	i,ns	0.00	(00)	i,ns	1.00	(60)	- 59

\* Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; i, indeciso ( $p < 0.05$ ). Los resultados indecisos se analizaron con la prueba U de Mann Whitney y Wilcoxon. Resultado: ns, no significativo ( $p < 0.05$ ). Para detalles vea anexo 8.

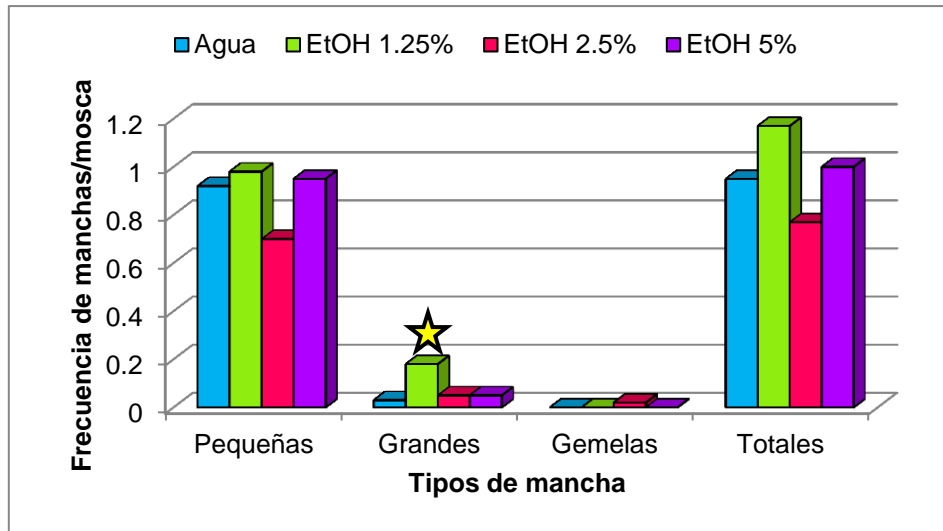



Fig. 14.- Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en los testigos disolventes EtOH 1.25%, 2.5% y 5%. Donde  indica un incremento estadísticamente significativo de acuerdo a SMART con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo negativo agua.

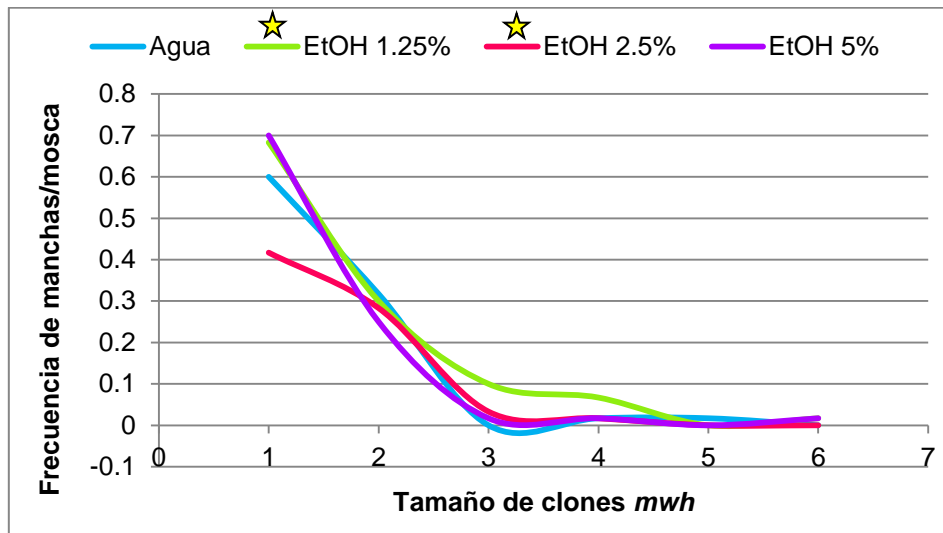



Fig. 15.- Representa la distribución acumulada de la frecuencia de manchas /individuo por cada tamaño de clon *mwh* en los testigos disolventes EtOH 1.25%, 2.5% y 5%. Donde :1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32), 7 (33-64) células;  indica una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba K-S con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo negativo agua



## Testigo URE

En este trabajo el URE, a la concentración de 20 mM, es genotóxico (Tabla VII y Figura 16), esto era de esperarse ya que el URE es un compuesto promutágeno que al ser metabolizado por los citocromos P450 (CYP450 2E1 en el caso de mamíferos) (Sakano *et al.*, 2002; Woo Cha *et al.*, 2000), genera epóxidos, los cuales pueden ocasionar daño al material genético mediante la formación de aductos (Fossa *et al.*, 1985; Miller y Miller, 1983). Frölich y Würgler en 1990 demostraron que el URE [5, 10, 20 y 30 mM] tiene actividad genotóxica concentración-dependiente y la participación de los Cyp450s en su activación, con SMART en ala de *D. melanogaster*.

El análisis de la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* mostró que el URE altera la división celular (Figura 17), debido a que puede incrementar (Hoffler *et al.*, 2005) o bien inhibir (Field y Lang, 1988) la actividad mitótica.

Tabla VII.- Resultados obtenidos de SMART en ala de *Drosophila melanogaster* para la progenie transheterocigota de la CE, después del tratamiento crónico de larvas ( $72 \pm 4$  h) con Agua y el testigo positivo URE 20 mM.

<b>Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estadístico*</b>						
<b>Tratamiento (Concentración)</b>	<b>Número de moscas</b>	<b>Manchas pequeñas (1-2 cél.) m=2</b>	<b>Manchas grandes (&gt; 2 cél.) m=5</b>	<b>Manchas gemelas m=5</b>	<b>Manchas totales m=2</b>	<b>Manchas con clon <i>mwh</i></b>
Agua	60	0.92 (055)	0.03 (002)	0.00 (00)	0.95 (057)	57
URE/Agua	60	3.40 (204) +	0.37 (022) +	0.00 (00) i,ns	3.77 (226) +	225

\* Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: +, positivo; i, indeciso ( $P < 0.05$ ). El resultado indeciso se analizó con la prueba U de Mann Whitney y Wilcoxon. Resultado: ns, no significativo ( $p < 0.05$ ). Para detalles vea anexo 8.

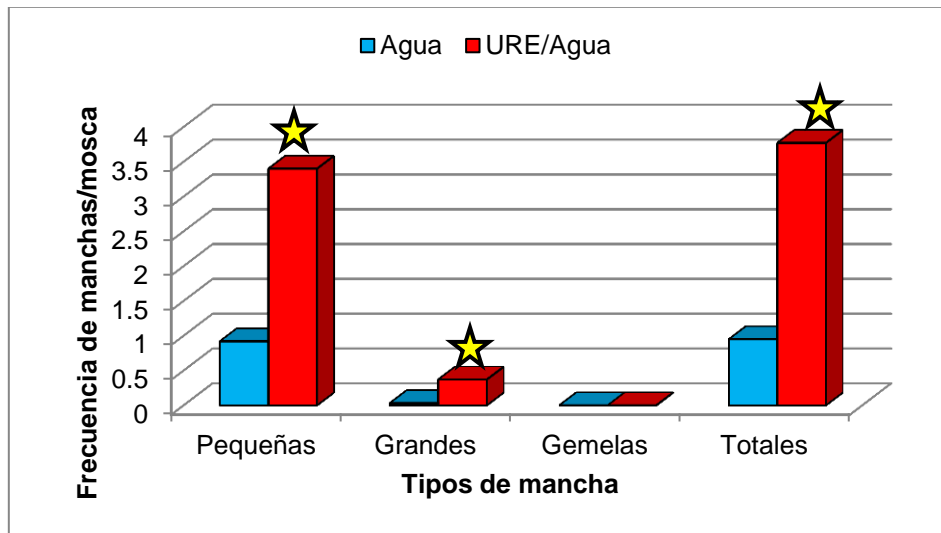



Fig. 16.- Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el testigo positivo URE/Agua. Donde  indica un incremento estadísticamente significativo de acuerdo a SMART con una  $p \leq 0.05$  y comparadas con respecto al testigo negativo agua.

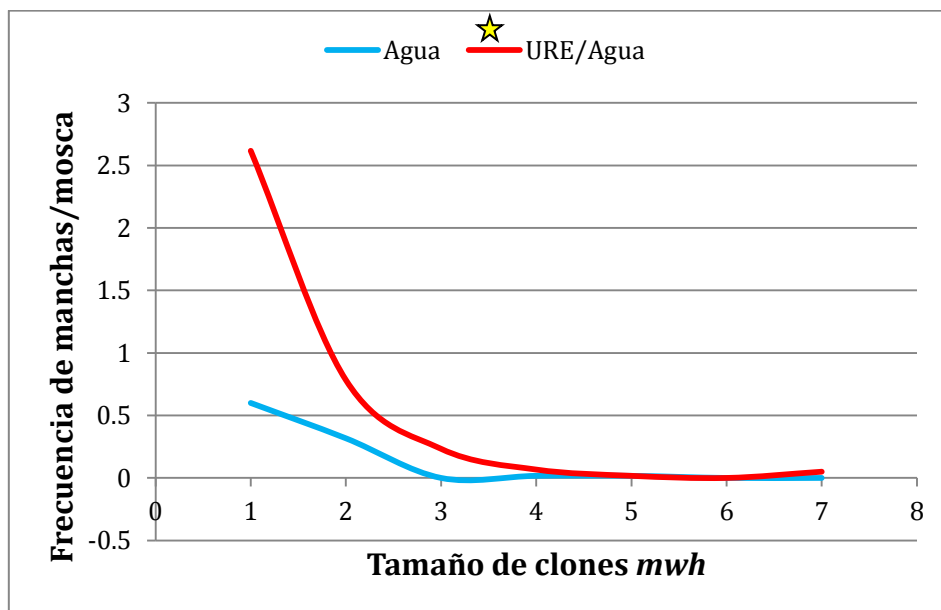



Fig. 17.- Representa la frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon *mwh* en el testigo positivo URE/Agua. Donde :1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32), 7 (33-64) células;  indica una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba K-S con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo negativo agua.

## Tratamientos GHPMF

Al comparar los tratamientos GHPMF (4  $\mu$ M/ EtOH 1.25%, 8  $\mu$ M/ EtOH 2.5% y 16  $\mu$ M/ EtOH 5%) contra sus testigos disolventes etanol (1.25, 2.5 y 5%, respectivamente) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla VIII y Figuras 18, 19 y 20), lo cual indica que el compuesto GHPMF no presenta efecto genotóxico a las concentraciones utilizadas.

La falta de genotoxicidad del GHPMF es comparable con trabajos tales como el de Doppalapudi *et al.* (2012) quienes probaron al CP-31398, un derivado de la quinazolina modulador de p53, y no encontraron efecto genotóxico en la prueba AMES, en la prueba de aberraciones cromosómicas en células CHO y en la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón. Asimismo, Ferraris *et al.* (2007) probaron el tripanocida (-)-hinoquinina (10, 20 y 40 mg/kg) en la prueba de micronúcleos en ratas Wistar y no encontraron efectos genotóxicos.

La reducción de la frecuencia de manchas pequeñas y totales del tratamiento con GHPMF 4  $\mu$ M/ EtOH 1.25% con respecto a su testigo EtOH 1.25 % (Figura 18) y las diferencias en la distribución acumulada de clones *mwh* de los tratamientos GHPMF 4  $\mu$ M/ EtOH 1.25% (Figura 21) y 8  $\mu$ M/ EtOH 2.5% (Figura 22) con respecto a sus testigos pueden indicar un posible efecto quimioprotector del GHPMF o citotóxico. Este primer efecto podría ser provocado por la propiedad antioxidante reportada para algunos tripanocidas, por ejemplo Ferraris *et al.* (2007) encontraron que el tripanocida (-)-hinoquinina redujo el daño cromosómico inducido por DXR (90 mg/kg) debido a su potencial antioxidante tal como refieren Myers y colaboradores, 1977. La distribución acumulada de clones *mwh* de los tratamientos GHPMF 16  $\mu$ M/ EtOH 5% no mostró diferencias significativas (Figura 23).

Tabla VIII.- Resultados obtenidos de SMART en ala de *Drosophila melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la CE, después del tratamiento crónico de larvas ( $72 \pm 4$  h) con testigos disolventes EtOH 1.25, 2.5 y 5% y los tratamientos con GHMPF 4, 8 y 16  $\mu$ M disuelto en EtOH 1.25, 2.5 y 5% respectivamente.

Tratamiento (Concentración)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estadístico*				Manchas con clon <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 cél.) m=2	Manchas grandes (> 2 cél.) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	
EtOH 1.25%	60	0.98 (059)	0.18 (011)	0.00 (00)	1.17 (070)	70
GHMPF 4 $\mu$ M/ EtOH 1.25%	60	0.60 (036)	0.08 (005)	0.00 (00) i,ns	0.68 (041)	41
EtOH 2.5%	60	0.70 (042)	0.05 (003)	0.02 (01)	0.77 (046)	46
GHMPF 8 $\mu$ M/ EtOH 2.5%	60	0.70 (042)	0.12 (007) i,ns	0.02 (01) i,ns	0.83 (050)	50
EtOH 5%	60	0.95 (057)	0.05 (003)	0.00 (00)	1.00 (060)	59
GHMPF 16 $\mu$ M/ EtOH 5%	60	0.80 (048)	0.15 (009) i,ns	0.02 (01) i,ns	0.97 (058)	58

\* Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; i, indeciso ( $p < 0.05$ ). Los resultados indecisos se analizaron con la prueba U de Mann Whitney y Wilcoxon. Resultado: ns, no significativo ( $p < 0.05$ ). Para detalles vea Anexo 8.

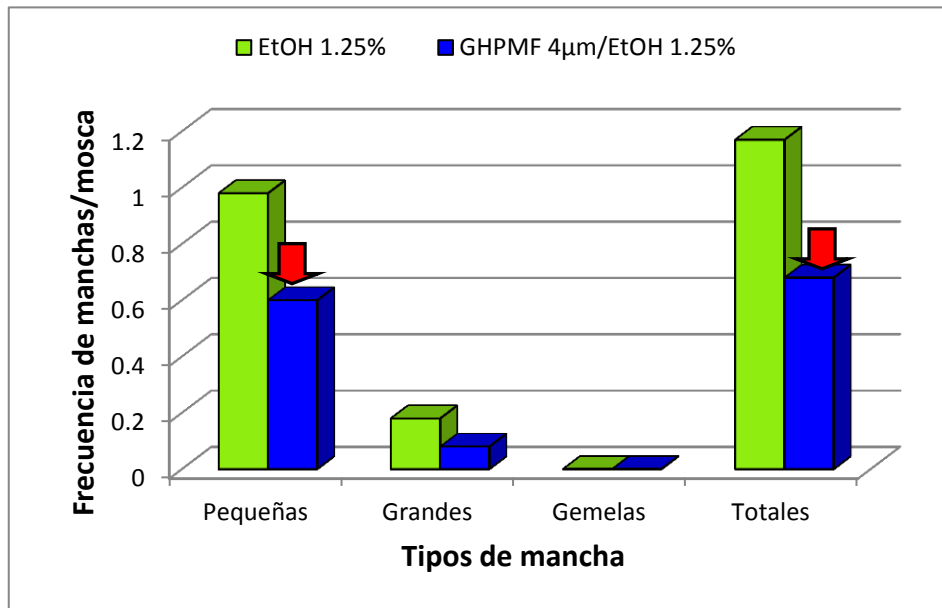



Fig. 18.- Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 4 μm/ EtOH 1.25%. Donde  indica una reducción estadísticamente significativa de acuerdo con SMART con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo disolvente EtOH 1.25%.

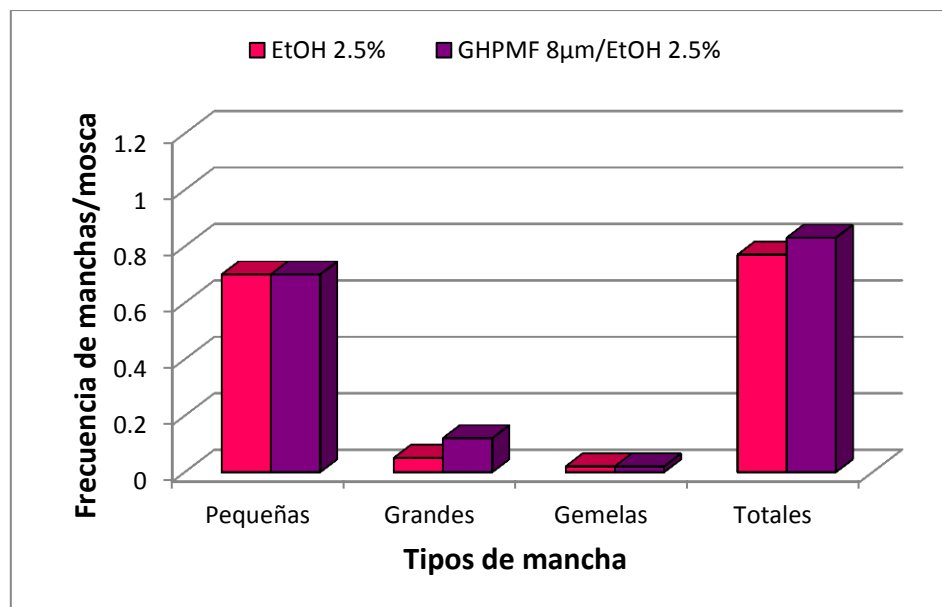


Fig. 19.- Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 8 μm/ EtOH 2.5% con respecto al testigo disolvente EtOH 2.5% en SMART.

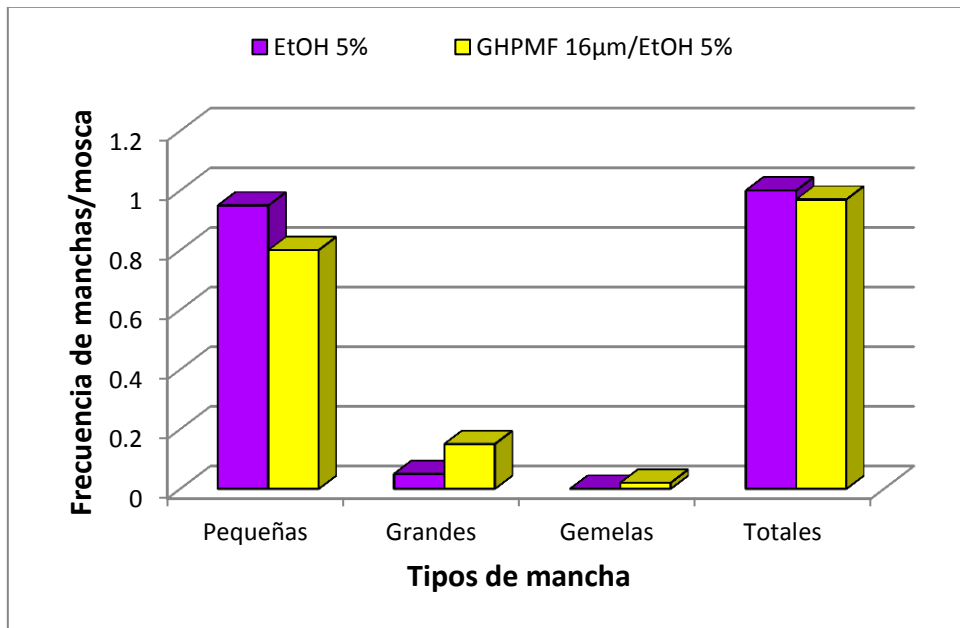


Fig. 20.- Frecuencia/individuo de los diferentes tipos de mancha en el tratamiento con GHPMF 16 µM/ EtOH 5% con respecto al testigo disolvente EtOH 5% en SMART.

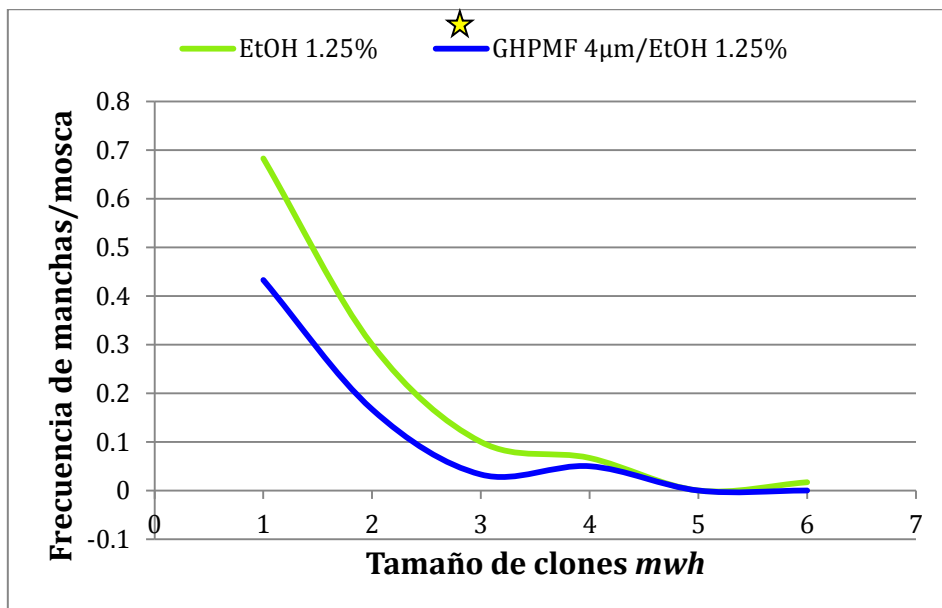


Fig. 21.- Representa la frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon *mwh* en el tratamiento con GHPMF 4 µM/ EtOH 1.25%. Donde :1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32), 7 (33-64) células; y ★ indica una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba K-S con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo disolvente EtOH 1.25%.

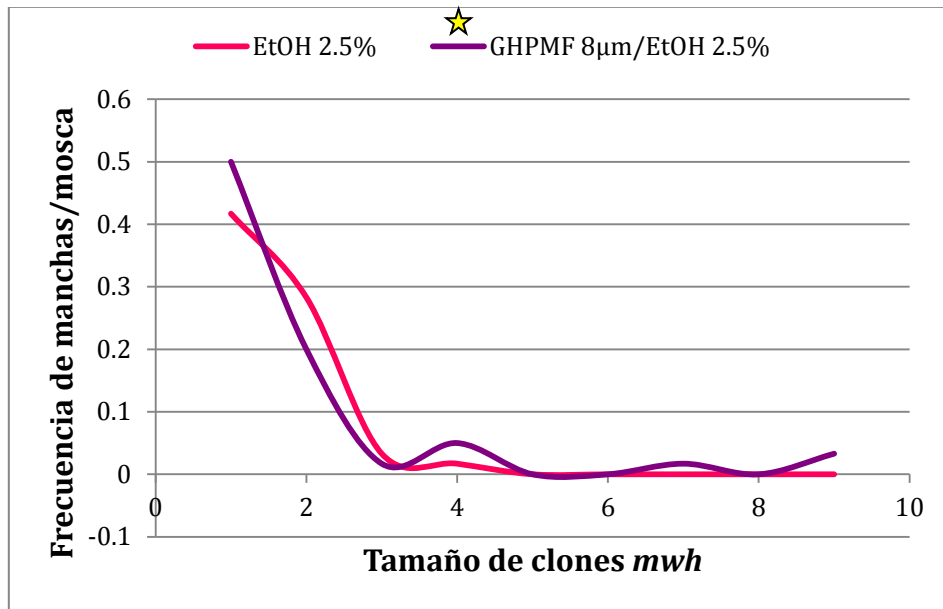


Fig. 22.- Representa la frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon *mwh* en el tratamiento con GHPMF 8 µM/ EtOH 2.5%. Donde :1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32), 7 (33-64) células; y ★ indica una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba K-S con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo disolvente EtOH 2.5%.

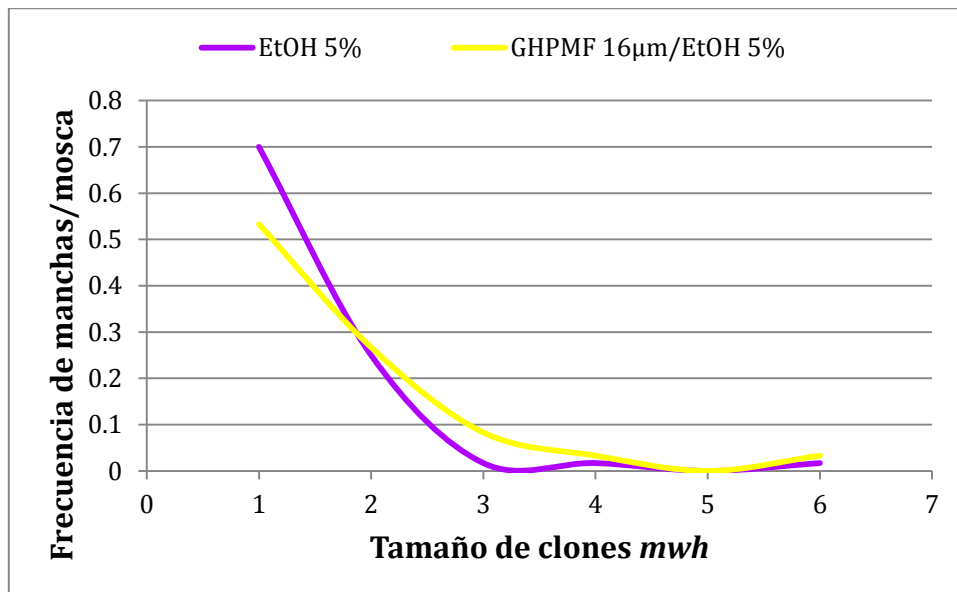


Fig. 23.- Representa la frecuencia acumulada de manchas /individuo por cada tamaño de clon *mwh* en el tratamiento con GHPMF 16 µM/ EtOH 5%. Donde :1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32), 7 (33-64) células; de acuerdo con la prueba K-S con una  $p \leq 0.05$  con respecto al testigo disolvente EtOH 5%.

La falta de genotoxicidad podría deberse a que el compuesto GHPMF tiene sustituyentes específicos para el sitio activo de las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y pteridín reductasa (PTR) en *T. cruzi*, enzimas importantes para la síntesis de algunos aminoácidos y bases nitrogenadas. A pesar de que se ha demostrado que estas enzimas son homólogas para varios organismos, se propone que presentan ciertas diferencias en los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de sustrato y cofactor en DHFR, lo que parece causa grandes diferencias en la sensibilidad de las enzimas a la inhibición para los antifolatos (Barclay *et al.*, 1988., Senkovich *et al.*, 2009), esta afinidad fue vista por el Dr. Hernández y colaboradores al realizar pruebas *in silico* y demostrar que el GHPMF puede ser 100 veces más específico para *T. cruzi* que para las enzimas del humano (Comunicación personal con el Dr. Hernández Luis, 2013) (Figuras 24 y 25).

**Sitio activo de DHFR de *T. cruzi*.**

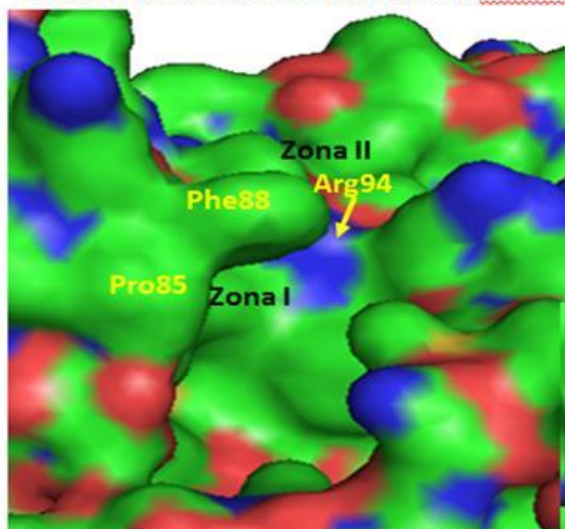


Fig. 24.- Sitio activo de la enzima TcDHFR. Proporcionadas por el Dr. Hernández Luis, 2013.

**Sitio activo de DHFR de humano.**

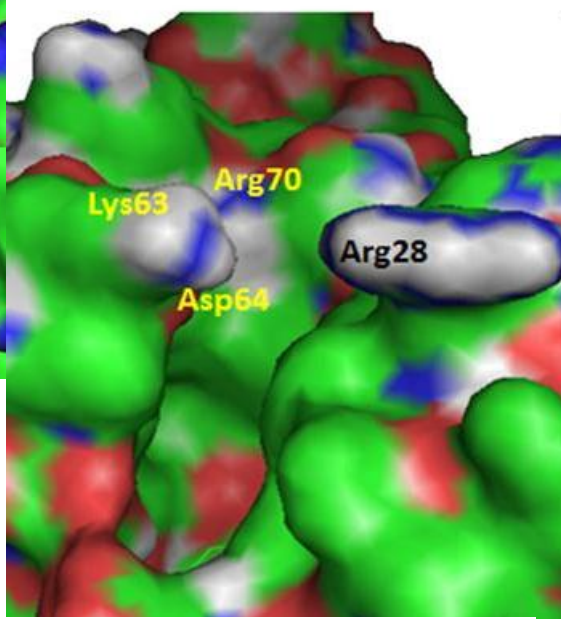


Fig. 25.- Sitio activo de la enzima hDHFR. Proporcionadas por el Dr. Hernández Luis, 2013.



## CONCLUSIONES

- El GHPMF no fue tóxico, ni genotóxico, en ninguna de las concentraciones probadas en este modelo biológico y bajo estas condiciones experimentales.
- El tratamiento GHPMF 4  $\mu$ M/ EtOH 1.25% mostró reducción significativa de la frecuencia de clones *mwh* comparada con el testigo EtOH 1.25 %.
- Los tratamientos GHPMF 4  $\mu$ M/ EtOH 1.25% y 8  $\mu$ M/EtOH 2.5% alteraron la distribución acumulada de los clones *mwh*, por lo que ambos tratamientos afectaron la división de las células imaginales de los discos de las alas

## RECOMENDACIONES

Probar otras concentraciones del compuesto GHPMF para respaldar el presente trabajo.

Realizar la cruza de bioactivación elevada (BE) de SMART en ala de *D. melanogaster* para analizar la participación de los Cyp450s en el metabolismo de GHPMF.

Valorar los resultados obtenidos con pruebas complementarias, tales como métodos para cuantificar apoptosis.

## REFERENCIAS

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

Agar, E., Amanvermez, R., Bosnak, M., Demir, S., Ayyildiz, M., and Celik, C. (1999). The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. *Neuroreport*. **10**: 1799–1801.

Al-Omary, F.A.M., Abou-zeid, L.A., Nagi, M.N., Habib, E.E., Abdel-Aziz, A.A.M., El-Azab, A.S., Abdel-Hamide, S.G., Al-Omar, M.A., Al-Obaid, A.M., and El-Subbagh, H.I. (2010). Non-classical antifolates. Part 2: Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling study of some new 2,6-substituted-quinazolin-4-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 2849-2863.

Amorós, G. (2001). Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*. El gen *as-2* como regulador de diferenciación celular. Departamento de Genética de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. 165pp.

Barclay, B.J., Huang, T., Nagel, M.G., Misener, V.L., Game, J.C., and Wahl, G.M. (1988). Mapping and sequencing of the dihydrofolate reductase gene (DFR1) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **63**: 175–185.

Beverley, S. M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 417-444.

Bertz, R.J., and Granneman, G.R., (1997). Use of *in vitro* and *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.* **32**: 210-258.

Blakey, R.L. (1984). Dihydrofolate reductase in: folates and pteridines (Blakey R.L. and Benkovic S.J., eds). John Wiley and Sons, Vol. 1, New York. EUA. 191- 253 pp.

Brooks, P.J., and Theruvathu, J.A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* **35**: 187–193.

- Buschini, A., Giordani, F., Northfleet, C., Pellacani, C., Pelosi, G., Rossi, C., Domingues, T., and Poli, P. (2007). Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. *Biochem. Pharmacol.* **73**: 1537–1547.
- Castro, J.A., De Mecca, M.M., and Bartel, L.C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* **25** (8): 471-479.
- Castro, J.A., and Díaz de Toranzo, E.G. (1988). Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed. Environ. Sci.* **1**(1): 19-33.
- Campos, F.M., Liarte, D.B., Mortara, R.A., Romanha, A.J., and Murta, S.M. (2009). Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **111**: 56–63.
- Chandrika, P.M., Yakaiah, T., Rao, A.R., Narsaiah, B., Reddy, N.C., Sridhar, V., and Rao, J.V. (2008). Synthesis of novel 4,6-disubstituted quinazoline derivatives, their anti-inflammatory and anti-cancer activity (cytotoxic) against U937 leukemia cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **43**(4): 846-852.
- Chien, S., Reiter, L.T., Bier, E., Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **30**: 149-151.
- Creek, D.J., Nijagal, B., Kim, D., Rojas, F., Matthews, K.R., and Barrett, M.P. (2013). Metabolomics Guides Rational Development of a Simplified Cell Culture Medium for Drug Screening against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (6): 2768-2779.
- Curtis, D.K. y Watkins, J.B. (2001). Casarett y Doull. Manual de Toxicología. Edit. Mc Graw Hill Interamericana. 5a Edición. México, D.F. 981pp.
- Curtis, H., Schnek, A., Massarini, A. (2008). Biología I. Edit. Medica Panamericana. 7a Edición. Santiago, Chile. 293.
- Da Silva, P., Durán, N., and Haun, M. (2000). Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. *Toxicol. Lett.* **116**: 237-242.

Davoll, J., Johnson, A.M., and Davies, H.J. (1972). Folate antagonists. 2. 2,4-Diamino-6-((aralkyl and (heterocyclic)methyl)amino)quinazolines, a novel class of antimetabolites of interest in drug-resistant malaria and Chagas' disease. *J. Med. Chem.* **15**: 812–826.

De Andrade, A.L.S.S., Zicker, F., and De Oliveira, R.M. (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* **348**: 1407–1413.

De Castro, S.L. (1993). The challenge of Chagas disease chemotherapy: an uptake of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **53**: 83–98.

De Castro, S.L., and De Meirelles, M.N. (1987). Effect of drugs *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell “in vitro”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **82** (2): 209-218.

De Conti, R., Gimenez, S.M., Haun, M., Pilli, R.A., De Castro, S.L., and Durán, N. (1996). Synthesis and biological activities of *N,N*-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **31**: 915–918.

De Rezende, A.A., Silva, M.L., Tavares D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C., Bastos, J.K., Lehmann, M., Andrade, H.H., Guterres, Z.R., Silva, L.P., and Spanó, M.A. (2011). The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 1235–1241.

Doppalapudi, E. S., Riccio, E. S., Davis, Z., Menda, S., Wang, A., Du, N., Green, C., Kopelovich, L., Rao, C. V., Benbrook, D. M., and Kapetanovic, I. M. (2012). Genotoxicity of the cancer chemopreventive drug candidates CP-31398, SHetA2, and phosphor-ibuprofen. *Mutat. Res.* **746**: 78-88.

Dueñas, G.I.E., Heres, P.M.E., Castañeda, P.L. and Graf, U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *D.I.S.*, **84**:166.

Dueñas-García, I. E., Vega-Contreras, V., Gómez-Luna, J. C., Santos-Cruz, L. F., Castañeda-Partida, L., Durán-Díaz, A. and Heres-Pulido, M. E. (2005). Toxicity

parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and Oregon-*flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *D.I.S.* **88**: 83-89.

Evans, W.E., and Relling, M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. **286**: 487- 491.

Ewald, S.J., and Shao, H. (1993). Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes *in vitro*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**: 359-365.

Ferraris, M.J., Pedigone, C.V., Pesqueira, S.E.P., De Andrade, R.V., Da Silva, R., Saraiva, J., Albuquerque, S., Kenupp, B.J., Andrade, S.M.L., and Crispim, T.D. (2007). (-)Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **45**: 638-642.

Field, K. J. and Lang, C. M. (1988). Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Lab. Anim.* **22**: 255-262.

Fossa, A. A., Baird, W. M. and Carlson, G. P. (1985). Distribution of urethane and its binding to DNA, RNA and protein in SENCAR and BALB/c mice following oral and dermal administration. *J. Toxicol. Environ. Health.* **15 (5)**: 635-654.

Frei, H. and Wurgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**: 297–308.

Frei, H. and Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **334**: 247-258.

Friedberg, E. C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995). *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press. Washington D.C. 698.

Frölich, A., and Wurgler, F.E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.* **244**: 201–208.

Ghorab, M.M., Abdel-Gawad, S.M., and El-Gaby, M.S. (2000). Synthesis and evaluation of some new fluorinated hydroquinazoline derivatives as antifungal agents. *Farmaco*. **55**: 249-255.

Giraudou, M. Chandran, U.G., Le Goff, G., and Feyereisen, R. (2010). Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. *Pestic. Biochem. Phys.* **97**: 115-122.

Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., and Kale, P. G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* **6**:153-188.

Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J. and Würgler, F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Reserch*.**222**: 359-373.

Graf, U. and Van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271** (1): 59-67.

Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster* *Experientia*. **51**: 168-173.

Graf, U., Spanó, M. A., Guzmán, R. J., Abraham, S. K. and Andrade, H. H. (1996). The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *The Afr. Newslett. On Occup. Health. And Safety*. **6**: 9-13.

Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J and Würgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **402**: 203-209.

Guzmán-Rincón, J. and Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomotor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Envir. Sci. R.* **50**: 169-181.

Hoffler, U., Dixon, D., Peddada, S. and Ghanayema, B. I. (2005). Inhibition of urethane-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. *Mut. Res.* **572**: 58-72.

Holveck, J.C., Ehrenberg, J.P., Ault, S.K., Rojas, R., Vásquez, J., Cerqueira, M.T., Ippolito-Shepherd, J., Genovese, M.A. and Roses-Periago, M. (2007). Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the America: Pathways to integrated, interprogrammatic, intersectoral action for health and development. *BMC Public Health.* **7**: 6.

Kabri, Y., Azas, N., Dumètre, A., Hutter, S., Laget, M., Verhaeghe, P., Gellis, a., and Vanelle, P. (2010). Original quinazoline derivatives displaying antiplasmodial properties. *Eur. J. Med. Chem.* **45**: 616-622.

Kasibhatla, S., Baichwal, V., Cai, S.X., Roth, B., Skvortsova, I., Lukas, P., English, N.M., Sirisoma, N., Drewe, J., Pervin, A., Tseng, B., Carlson, R.O., and Pleiman, C.M. (2007). MPC-6827: a small- molecule inhibitor of microtubule formation that is not a substrate for multidrug resistance pumps. *Cancer Res.* **67** (12): 5865-5871.

Kato, F. H., Viana, N. I., Santini, C. B., Gomes de Souza, C. G., Sola, R. C., Ambrósio, S. R., and Tavares, D. C. (2012). Assessment of the in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. *Mutat. Res.* **749**: 87-92.

Kayani, M. A., and Parry, J. M. (2010). The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol. In Vitro.* **24**: 56-60.

Kemper, R.A., Myers, S.R., Hurst, H.E. (1995). Detoxification of vinyl carbamate epoxide by glutathione: evidence for participation of glutathione S-transferases in metabolism of ethyl carbamate. *Toxicol. Appl. Pharm.* **135**: 110-118.

Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S., and Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **168**: 649-659.

Miller, J. A. and Miller, E. C. (1983). The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: Recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *Br. J. Cancer.* **48**: 1-15.

Moreno, E., Plano, D., Lamberto, I., Font, M., Encío, I., Palop, J. A., and Sanmartín, C. (2012). Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: Synthesis and study of their potential cytotoxic activity *in vitro*. *Eur. J. Med. Chem.* **47**: 283-298.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., y Rodwell, V.W. (2004). Harper Bioquímica Ilustrada. Edit. Manual Moderno 16a Edición. 695-702 pp.

Myers, C. E., MacGuire, W. P., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, K., and Young, R. C. (1977) Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*. **197**: 165-167.

Nagel, R., (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutat. Res.* **191**: 17–20.

Nare, B., Hardy, L. W., and Beverly, S. M. (1997). The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **272**: 13883-13891.

Niwa, A. M., Marcarini, J. C., Sartori, D., Maistro, E. L., Mantovani, M. S. (2013). Effects of (-)-cubebin (Piper cubeba) on cytotoxicity, mutagenicity and expression of p38 MAP kinase and GSTa2 in a hepatoma cell line. *J. Food Compos Anal.* **30**: 1-5.

Nordmann, R., Ribiere, C., and Rouach, H. (1992). Implication of free radical mechanism in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.* **12**:219–240.

Ommeh, S., Nduati, E., Mberu, E., Kokwaro, G., Marsh, K., Rosowsky, A., and Nzila, A. (2004). In vitro activities of 2,4-diaminoquinazoline and 2,4-diaminopteridine derivatives against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (10): 3711-3714.

OMS. (2013). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Nota descriptiva N° 340 Marzo de 2013. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. Fecha de acceso 4 de enero 2014.

O'Neil, R.H., Lilien, R.H., Donald, B.R., Stroud, R.M., Anderon, A.C. (2003) Phylogenetic classification of protozoa based on the structure of the linker domain in the bifunctional



enzyme, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *J. Biol. Chem.* **278**(52): 52980-52987.

Panneerselvam, P., Rather, B.A., Reddy, D.R.S., and Kumar, N.R. (2009). Synthesis and anti-microbial screening of some Schiff bases of 3-amino-6,8-dibromo-2-phenylquinazolin-4(3H)-ones. *Eur. J. Med. Chem.* **44** (5): 2328-2333.

Padmanabhan, S., Tripathi, D.N., Vikram, A., Ramarao, P., and Jena, G.B. (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat. Res.* **655** (1-2): 59-67.

Ramachandani, V.A., Bosron, W.F., and Li, K.T. (2001). Research advances in ethanol metabolism. *Pathol. Biol. (Paris)*. **49**: 676-682.

Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**: 1114-1125.

Repetto, J.M. y Repetto, K.G. (2009). Toxicología fundamental, (4a. ed.). Ed: Ediciones Díaz de Santos. 25-26 pp.

Ribeiro, P.I. and Gaivão, I. (2010). Genotoxic effect of ethanol in *Drosophila melanogaster* neuroblast. *Rev. Port. De Sau. Públ.* **28**: 199-204.

Ribiere, C., Hininger, I., Saffar-Boccaro, C., Sabourault, D., and Nordmann, R. (1994). Mitochondrial respiratory activity and superoxide radical generation in the liver, brain and heart after chronic ethanol intake. *Bioch. Phar.* **47**:1827–1833.

Rodríguez, A.R., Castañeda, S.A.N., and Ordaz, T.M.G. (2006). Biotransformación de xenobióticos mediada por los citocromos P450 en *Drosophila melanogaster*. En: Tópicos de Genética, UNAM, México, pp. 78-79.

Sakano, K., Oikawa, S., Hiraku Y., and Kawanishi, S. (2002). Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radical Bio. Med.* **33**: 703-714.

Santi, D.V. and Danenberg, P.V. (1984). Folates in pyrimidine nucleotide biosynthesis. In: Folates and Pteridines (Blakey R. L. and Benkovic S. J., eds). **Vol. 1**, John Wiley and Sons, New York,

Santos, C.L.F. (2006). Interacción del Brocoli (*Brassica oleracea var. Italica*)-uretano (carbamato de etilo) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 65 pp.

Senkovich, O., Schormann, N. and Chattopadhyay, D. (2009). Structures of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Trypanosoma cruzi* in the folate-free state and in complex with two antifolate drugs, trimetrexate and methotrexate. *Acta Cryst. D65*: 704-716.

Scanlon, K. J., and Kashani-Sabet, M. (1988). Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A2780 cells. *Proc. NatL Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 650-653.

Schmeltz, I., Chiong, K.G. and Hoffmann, D.J. (1978). Formation and determination of ethyl carbamate in tobacco and tobacco smoke. *Analytical Toxicology.* **2**: 265-268.

Schormann, N., Pal, B., Senkovich, O., Carson, M., Howard, A., Smith, C., DeLucas, L., and Chattopadhyay, D. (2005). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* pteridine reductase 2 in complex with a substrate and an inhibitor. *J. Struct. Biol.* **152**: 64-75.

Souza, S.C., Takahashi, C.S., and Da Silva, J.S. (1991). Evaluation of the mutagenic potential of the drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. *Mutat. Res.* **259**:139–145

Vogel, E. W., Graf, U., Frei H. and Nivard, M. M. J. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC. Sci. Publ.* **146**: 427-470.

Webber, S., and Whiteley, J. M. (1985). Comparative activity of rat liver dihydrofolate reductase with 7,8-dihydrofolate and other 7,8-dihydropteridines. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**: 681-690.

Woo Cha, S., Gu, H. K., Lee, K. P., Lee, M. H., Han, S. S., and Jeong, T. C. (2000). Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicol. Lett.* **115**: 173-181.

Würgler, F.E., Graf, U., Frei, H., and Juon, H. (1983). Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **122**: 321-328.

Yang, J., McCart, C., Woods, D.J., Terhzaz, S., Greenwood, K.G., Ffrench-Constant, R.H. and Dow, J.A.T. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics.* **30**: 223-231.

## ANEXOS

### Anexo 1.

#### Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida que comprende tres formas fundamentales; el epimastigote o forma propia en el insecto vector, tripomastigote metacíclico o forma defecada en el insecto, que infecta al hospedador de sangre caliente por invasión celular, y amastigote, capaz de lisis la célula hospedadora y transformarse nuevamente en tripomastigote, que inicia un nuevo ciclo de invasión. Aunque también se ha reconocido una infección secundaria con la participación única del amastigote, sin requerir la transformación a tripomastigote (Ley *et al.*, 1988).

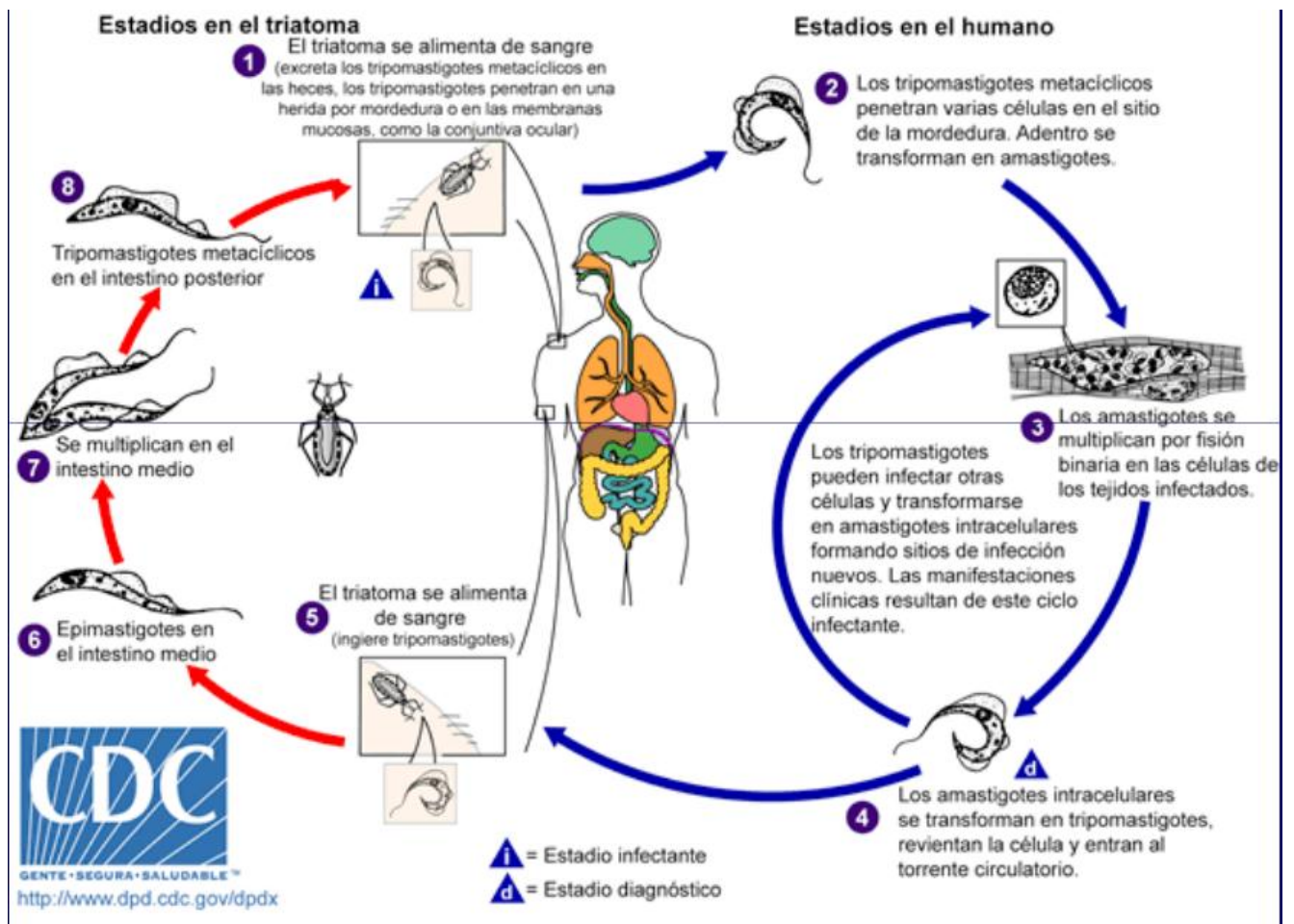


Fig. 26.- Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Tomado de <http://www.hemobaires.org.ar/pdfs/1-Generalidades%20T%20cruzi.pdf>

Anexo 2.

Pruebas de genotoxicidad.

### **Nivel I.- Pruebas para reconocer el daño en la estructura primaria del DNA**

**Ensayo cometa.-** detecta rupturas en el material genético producidas por un agente clastogénico, generando fragmentos que aparentan ser la cola de un cometa y se observan mediante microscopía de fluorescencia, después de una corrida electroforética.

**SOS Chromotest (*E. coli* PQ 37).-** prueba colorimétrica que mide la expresión de genes, inducida por agentes genotóxicos, por medio de una unión al gen estructural para la  $\beta$ -galactosidasa, acción que activa la respuesta SOS.

**Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.-** se basa en la pérdida de heterocigosis de marcadores recesivos del color de los conidios por segregación somática ocasionada por intercambio mitótico y/o mala segregación de cromosomas; ocasionando la aparición de colonias expuestas en sectores, bandas o puntos de color diferente al resto en los conidios.

**Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.-**La recombinación mitótica se basa en intercambio recíproco que se determina por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota; mientras que en la conversión génica los intercambios casi nunca son recíprocos donde se producen inversores prototróficos en una cepa auxótrofa heteroalélica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen.

**Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas en *D. melanogaster* (SMART).-** pérdida de heterocigosis en marcadores mutantes que se expresa como manchas en alas de los organismos adultos.

**Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamífero.-** intercambios recíprocos de DNA entre 2 cromátidas hermanas de un cromosoma, se marcan las cromátidas hermanas con bromodeoxiuridina (BrdU) al DNA cromosómico hasta un segundo ciclo celular.

## **Nivel II.- Ensayos para mutaciones génicas**

**Ensayo Ames (*Salmonella typhimurium*).**- cepas mutadas en genes implicados en la síntesis de histidina que al ser expuestas a un compuesto mutagénico, revierten a la forma silvestre que sí es capaz de producir histidina.

**SOS Chromotest (*E. coli* PQ 37).**- Prueba para determinar la producción de mutaciones génicas por agentes químicos con y sin activación metabólica en cepas haploides y diploides *Saccharomyces cerevisiae*.

**Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.**- descubre la aparición de mutaciones (puntuales o pequeñas deleciones) en la línea germinal del insecto. Las mutaciones del cromosoma X se expresan fenotípicamente en los machos portadores del gen mutante.

**Prueba de mutación de los pelos estaminales de *Tradescantia*.**- cambio de color azul (dominante) a rosa (recesivo), por pérdida, inactivación o mutación del alelo dominante de los pelos estaminales.

## **Nivel III.- Ensayos para mutaciones cromosómicas**

**Ensayo de micronúcleos.**- se observan micronúcleos en frotis de individuos tratados, esto debido a alguna alteración cromosómica (rompimiento) o a un malfuncionamiento del aparato mitótico. Se pueden detectar compuestos clastogénicos y aneugénicos.

**Aberraciones cromosómicas.**- permite evaluar cambios numéricos y estructurales en los cromosomas. Aberraciones primarias aparecen en la primera metafase después de la exposición, ya que influyen en el proceso de división y son letales a la célula. Aberraciones secundarias que no afecten la división celular y puedan ser transmitidas a una segunda generación.

**Prueba citogenética *in vitro* en células de mamífero.**- Mide los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT) en células mutantes capaces de proliferar en presencia de TFT.

**Prueba citogenética *in vivo* en ratones.**- se basa en la pérdida de heterocigosis en algunos genes, expresada como una mancha de otro color del pelo en el ratón resultante.

**Prueba de letales dominantes en ratones.**- la letalidad dominante provoca la muerte del embrión.

**Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART):** determina deleciones y aneuploidías parciales.

**Prueba citogenética de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*.**- pueden observarse formación de micronúcleos y presencia de mitosis atípica en células.

**Nivel IV.- Otras pruebas. Daño a la célula.**

**Morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.**- evalúa los cambios efectuados en la concentración espermática, aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales.

**Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART):** detección de recombinación somática

### Anexo 3.

#### *Drosophila melanogaster*

Conocida comúnmente como “mosca del vinagre o de la fruta”, es un buen modelo biológico debido a que su cultivo es fácil, se obtiene un gran número de descendientes por generación, su mantenimiento es económico y el ciclo de vida es corto (Figura 27). Además de que su genoma está completamente secuenciado (Adams *et al.*, 2000), presentando complementareidad con 77-73.1% de genes humanos causantes de enfermedades (Reiter *et al.*, 2001; Chien *et al.*, 2002), como *p53*, algunos *cyp450s* implicados en el metabolismo de compuestos xenobióticos y en la reparación del DNA (Friedberg *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2006).

Es un insecto holometábolo, es decir, presenta etapas larvales y una etapa adulta separadas por una etapa pupal, durante la cual tiene lugar una metamorfosis completa. El ciclo de vida de *Drosophila* dura aproximadamente 10 días a 25°C. Las hembras adulto son capaces de poner de 50 a 75 huevecillos por día, el desarrollo embrionario del huevo tarda aproximadamente 1 día. La larva emerge del huevo. La fase larvaria es de rápido comer y crecer, consiste en tres estadios a los cinco días la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis. Durante esta etapa, la mayoría de tejidos larvarios son lisados, las estructuras adultas se formarán principalmente a partir de la reorganización de los discos imaginales (que darán lugar a las estructuras epidérmicas de la cabeza, tórax y genitales externos del adulto) y los histoblastos (que formarán la epidermis abdominal del adulto). A las pocas horas de vida, la mosca adulta es fértil y se inicia de nuevo el ciclo vital (Amorós, 2001).



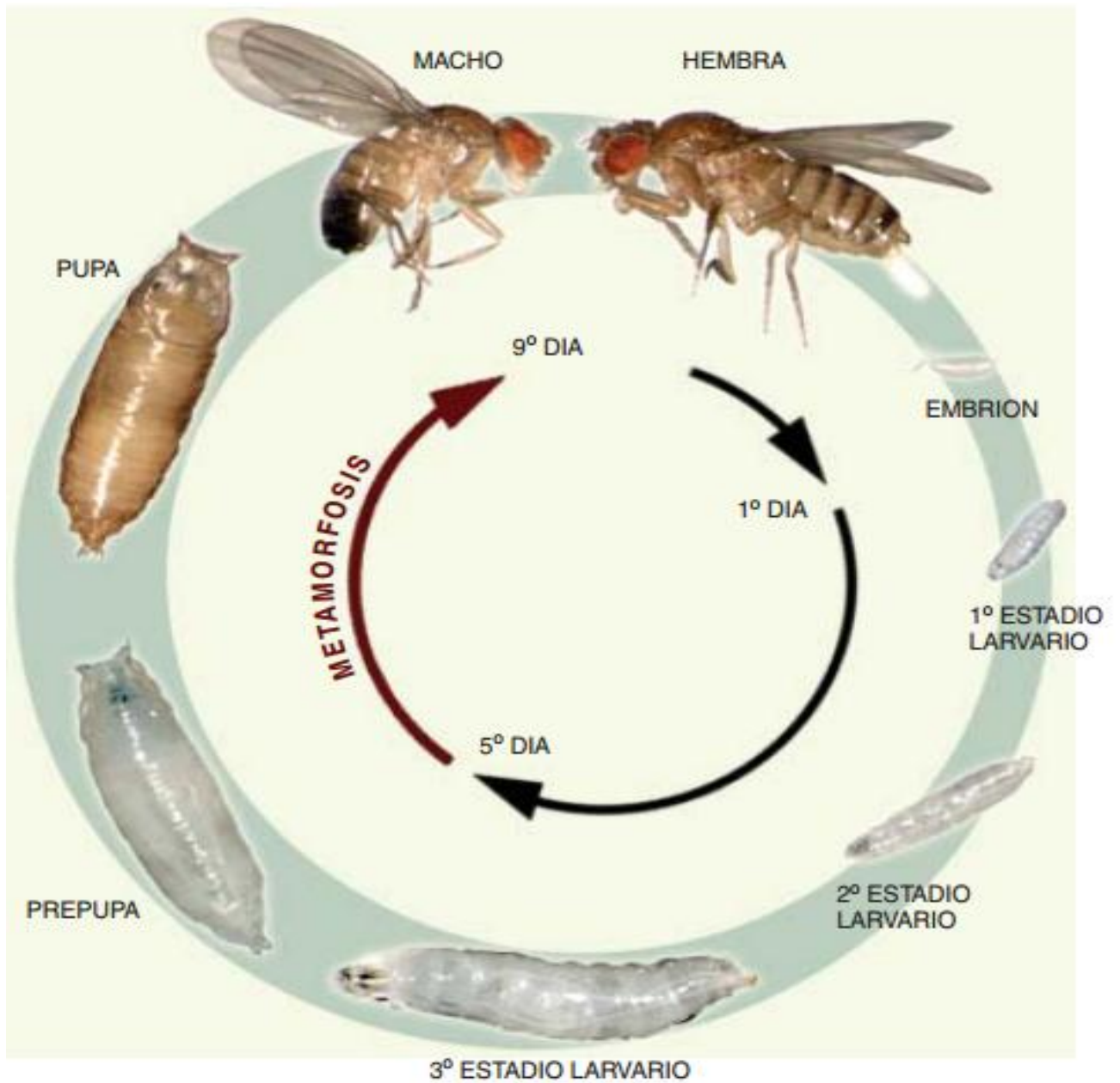


Fig. 27.- Ciclo de vida de *D. melanogaster*.  
 Tomado de: <http://www.investigacionyciencia.es/files/4793.pdf>

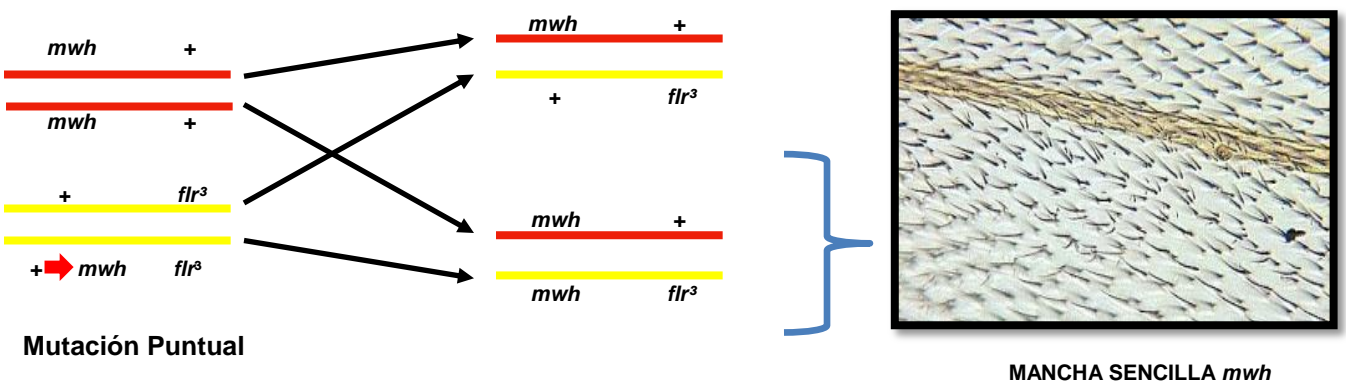
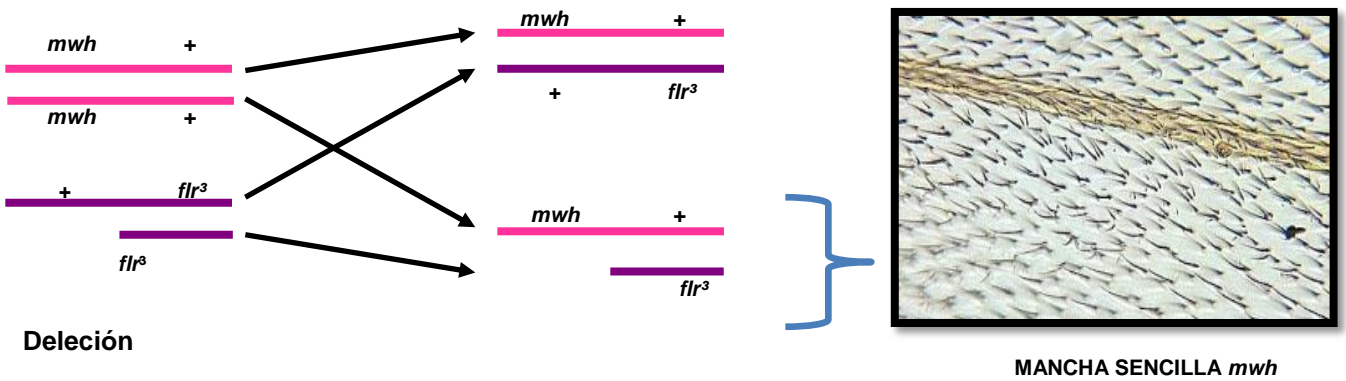
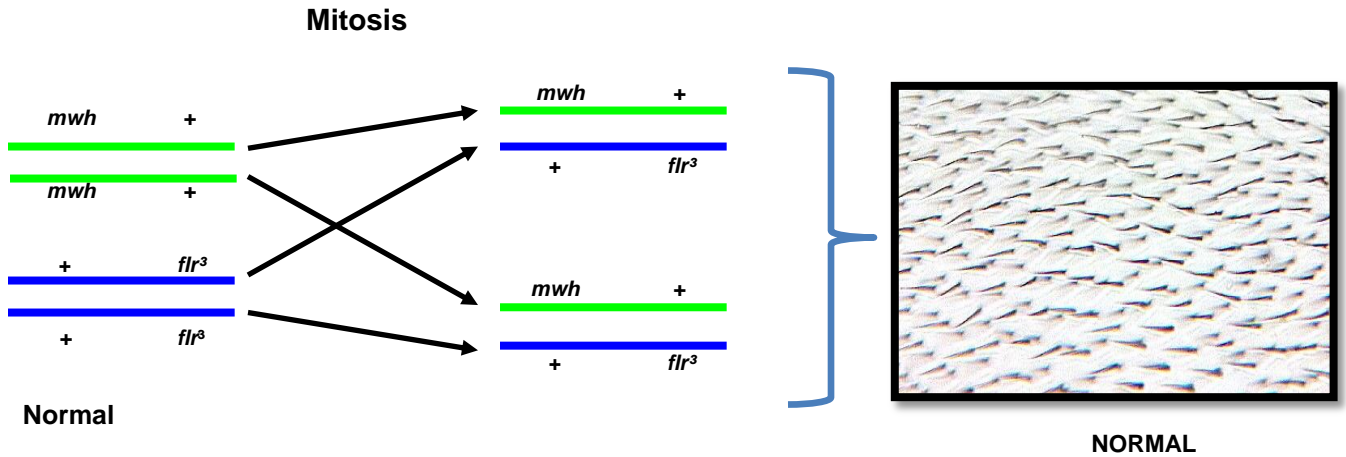
Anexo 4.

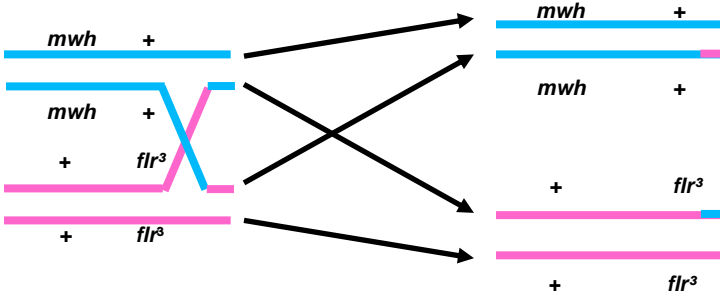
Eventos genéticos que se pueden reconocer en SMART en ala de *D. melanogaster*.

1 Célula en G<sub>2</sub>

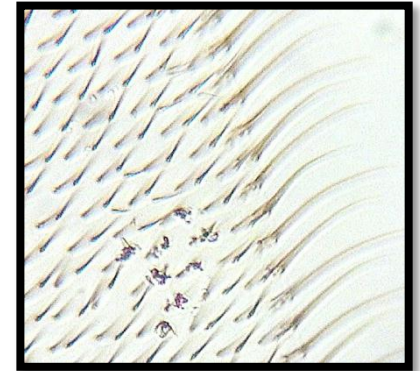
2 Células en G<sub>1</sub>

Clones Resultantes

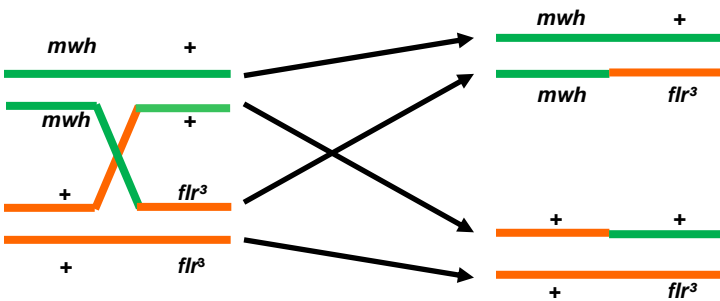




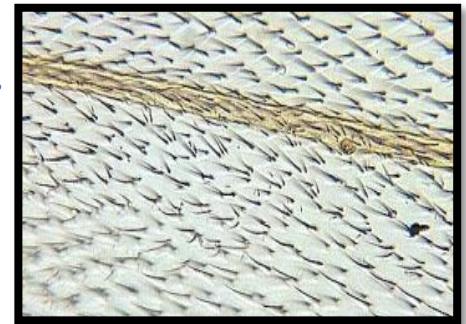
Recombinación cercana al centrómero



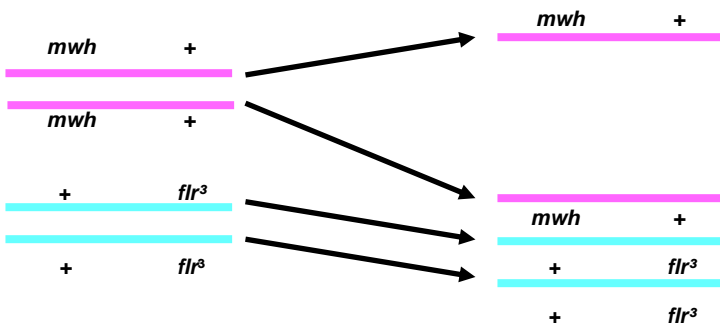
MANCHA GEMELA



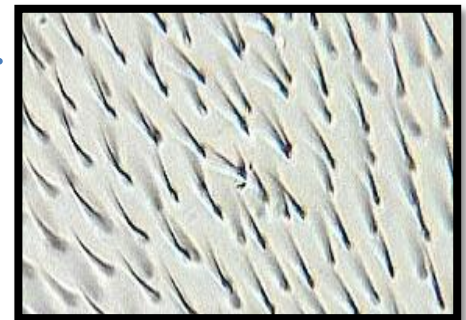
Recombinación distal al centrómero



MANCHA SENCILLA *mwh*



No Disyunción



MANCHA SENCILLA *mwh*

## Anexo 5.

### Discos Imaginales

Los discos imaginales consisten en sacos compuestos de dos láminas de epitelio con forma de disco. Estas estructuras aumentarán en forma progresiva su tamaño casi mil veces pero se mantendrán esencialmente indiferenciadas durante el resto de la embriogénesis y de la vida larval. Mas tarde, durante la metamorfosis, los discos imaginales cambiarán radicalmente su forma, plegándose y extendiéndose para dar lugar a las diversas partes individuales que compondrán el futuro adulto (ojos, patas, alas, antenas, etc.). Al final de la metamorfosis, estas partes se ensamblan unas con otras y, finalmente, el adulto ya formado emerge del pupario (Curtis *et al.*, 2008).

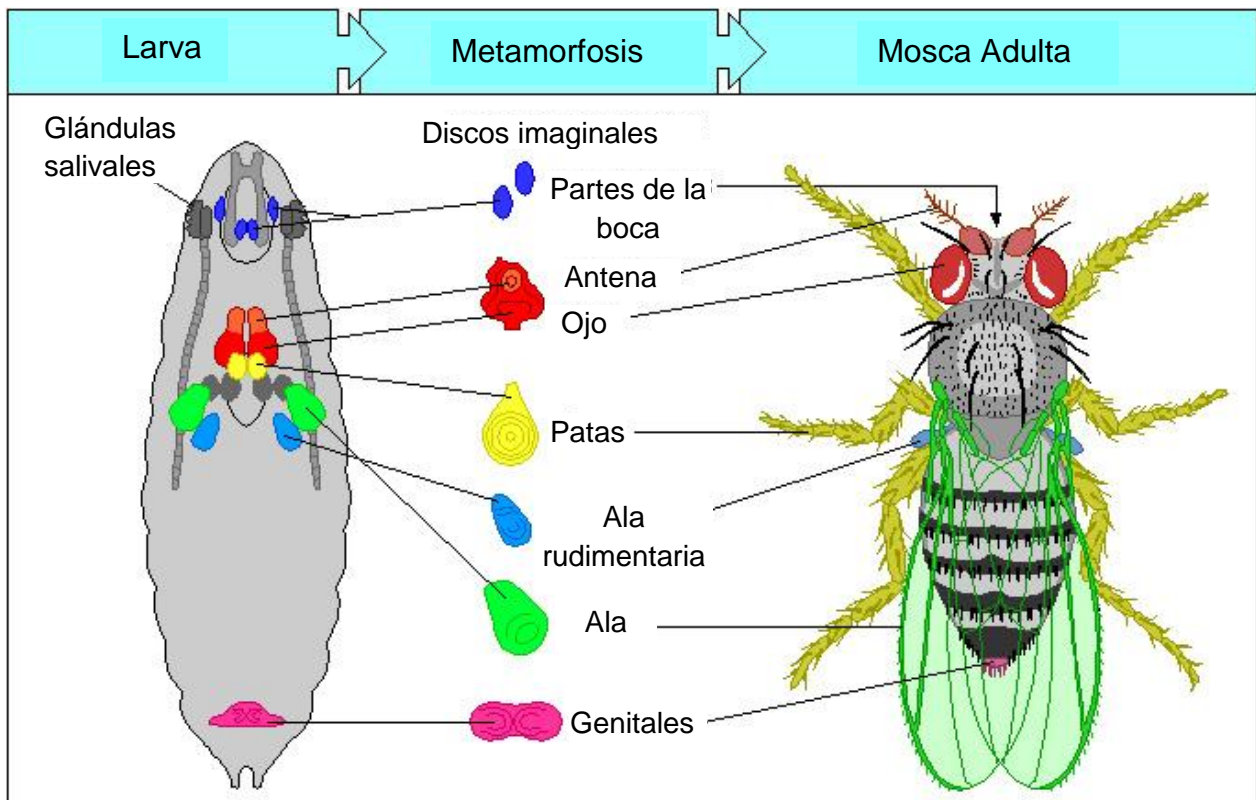


Fig. 28.- Discos imaginales y estructuras adultas que forman

Modificado de: <http://students.iitk.ac.in/projects/timeline>

## Anexo 6.

Cepas utilizadas para SMART y CL<sub>50</sub>.

En el laboratorio de Genética Toxicológica se utilizan tres cepas de *D. melanogaster*: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “Oregon-flare” (ORR(1); ORR (2) y *flr*<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>) “flare” (*flr*<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>) los cuales presentan los marcadores siguientes (Graf, 1995).

1. “multiple wing hairs” (*mwh*), mutación recesiva homocigota viable, que se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3); en homocigosis produce tricomas múltiples por célula (Figura 29) en lugar de un solo tricoma de la condición silvestre (Graf *et al.*, 1996; 1984).

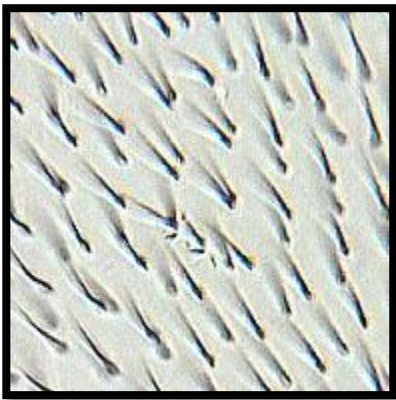


Fig. 29.- Expresión fenotípica de tricomas múltiples del marcador *mwh*.

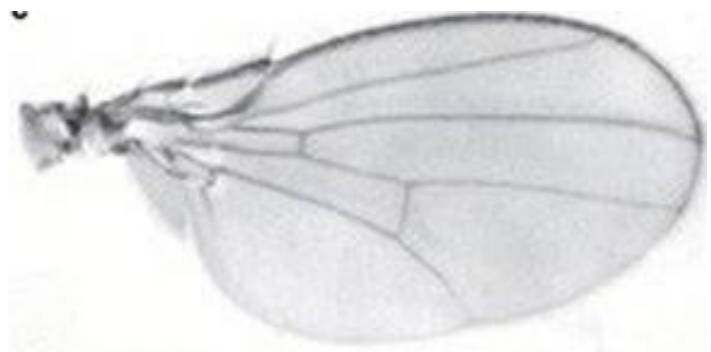


Fig. 30.- Expresión fenotípica de ala con marcador *mwh*

2. Oregon-flare posee las características de la cepa flare y presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon. El cromosoma 2 lleva la mutación dominante Rst (2) DDT, localizada en la región 43E, (2-64.5), que provoca alta expresión de una proteína inductora de los genes *CYP* (*CYP6a8* y *CYP6a9* del cromosoma 1 y *CYP6a2* del cromosoma 2). Estos genes expresan enzimas del complejo enzimático CYP450s. Ésta mutación confiere en consecuencia, no solo la resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Graf *et al.*, 1998; Graf y Van Schaik, 1992).

3. *flr<sup>3</sup>/TM3*, *Bd<sup>s</sup> (flare)*, mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) que afecta la forma de los tricomas al expresarse como tricomas mal formados y cortos con apariencia de flama o roseta de maíz (Figura 31). En homocigosis es letal por lo que la cepa posee el cromosoma balanceador TM3 que le confiere una triple inversión: *Third Multiple 3*, lo que reduce la probabilidad de obtener recombinación entre los cromosomas del par 3 durante la meiosis, manteniendo así intacto al gen mutante de interés, ya que se impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación. Se puede reconocer fenotípicamente el marcador *flare* por la presencia del gen dominante *Bd<sup>s</sup> (Beaded- Serratia)* que se manifiesta como muescas en el borde de las alas (Figura 32), localizado en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5), el cual también es letal en homocigosis (Graf *et al.*, 1996; 1984).

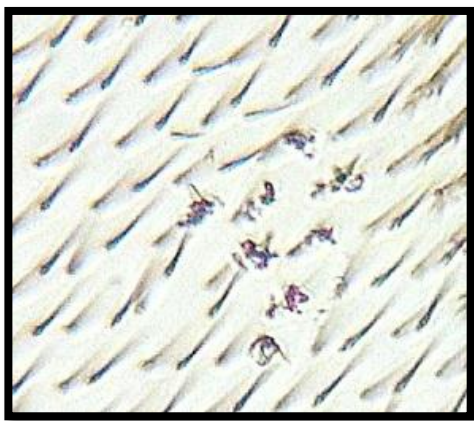


Fig. 31.- Expresión fenotípica de tricomas malformados del marcador *flr<sup>3</sup>*.



Fig. 32.- Expresión fenotípica de ala con marcador *Bd<sup>s</sup>*

En este trabajo se usó la CE que se realiza con hembras vírgenes de la línea *flare* y con machos de la línea *mwh* (Graf *et al.*, 1989). La CE se caracteriza por tener regulada la expresión de los genes *Cyp450*, en esta cruce se producen dos tipos de genotipos: transheterocigotos *mwh, flr<sup>3</sup>+ / mwh+, flr<sup>3</sup>* y heterocigotos *mwh, flr<sup>3</sup> / mwh+, flr<sup>3</sup>+*. Detecta principalmente mutágenos directos (Graf *et al.*, 1996), pero también puede detectar mutágenos indirectos o promutágenos.

## Anexo 7

### Dimorfismo sexual

- |   |  |
|---|--|
| → Hembras   | → Machos   |
| → Mayor tamaño  | → Menor tamaño   |
| → Abdomen acabado en punta y grueso   | → Extremo de abdomen redondeado  |
| → Dorso del abdomen con bandas transversales oscuras y separadas unas de otras hasta el final del mismo | → Ultimas bandas transversales fusionadas, lo que le da una apariencia oscura al final del mismo.    |
|   | → Poseen un peine sexual (quetas modificadas) en el primer segmento tarsiano del primer par de patas |



Fig. 33.- Dimorfismo sexual de *D. melanogaster*

## Anexo 8.

Resultados de la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon.

Prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Wilcoxon donde sólo se comparan los datos contra la hipótesis nula, usando el programa estadístico STAT Graphics versión 6.0.

Este programa nos da como resultado las tablas que se muestran abajo, de ellas se obtienen las Z ajustadas y dependiendo de:

- si el valor de Z ajustada es negativo entonces:

$$p/2 \left\{ \begin{array}{l} - \text{si } > 0 = 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ - \text{si } < 0.05 \text{ entonces si es significativo.} \end{array} \right.$$

- si el valor de Z ajustada es positivo entonces:

$$1 - p/2 \left\{ \begin{array}{l} - \text{si } > 0 = 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ - \text{si } < 0.05 \text{ entonces si es significativo.} \end{array} \right.$$

1.- Las diferencias entre los testigos Agua y EtOH 5% para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales no fue significativa.



STATISTICA - [Workbook4\* - Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)]

Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)  
By variable concentración  
Marked tests are significant at  $p < .05000$

variable	Rank Sum agua	Rank Sum EtOH 5%	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N agua	Valid N EtOH 5%	2*1sided exact p
pequeñas	3648.000	3612.000	1782.000	0.094475	0.924731	0.100606	0.919863	60	60	0.927090
grandes	3600.000	3660.000	1770.000	-0.157459	0.874883	-0.454925	0.649164	60	60	0.877408
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3628.500	3631.500	1798.500	-0.007873	0.993718	-0.008341	0.993345	60	60	0.993742
mwh	3651.000	3609.000	1779.000	0.110221	0.912234	0.116778	0.907036	60	60	0.914636

2.- Las diferencias entre el testigo EtOH 2.5% y GHPMF 8 $\mu$ M para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales no fue significativa.

STATISTICA - [Workbook4\* - Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)]

Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)  
By variable concentración  
Marked tests are significant at  $p < .05000$

variable	Rank Sum EtOH 2.5%	Rank Sum GHPMF 8 $\mu$ m	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 2.5%	Valid N GHPMF 8 $\mu$ m	2*1sided exact p
pequeñas	3637.500	3622.500	1792.500	0.039365	0.968600	0.04308	0.965638	60	60	0.968718
grandes	3510.000	3750.000	1680.000	-0.629837	0.528802	-1.31564	0.188296	60	60	0.531869
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	1.000000
totales	3527.500	3732.500	1697.500	-0.537985	0.590587	-0.58242	0.560285	60	60	0.591853
mwh	3527.500	3732.500	1697.500	-0.537985	0.590587	-0.58242	0.560285	60	60	0.591853

3.- Las diferencias entre el testigo EtOH 5% y GHPMF 16 $\mu$ M para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales no fue significativa.

STATISTICA - [Workbook4\* - Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)]

Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)  
By variable concentración  
Marked tests are significant at  $p < .05000$

variable	Rank Sum EtOH 5%	Rank Sum GHPMF 16 $\mu$ m	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 5%	Valid N GHPMF 16 $\mu$ m	2*1sided exact p
pequeñas	3823.500	3436.500	1606.500	1.015612	0.309815	1.09165	0.274987	60	60	0.311018
grandes	3450.000	3810.000	1620.000	-0.944755	0.344785	-1.81812	0.069047	60	60	0.347412
gemelas	3600.000	3660.000	1770.000	-0.157459	0.874883	-1.00000	0.317311	60	60	0.877408
totales	3719.500	3540.500	1710.500	0.469753	0.638532	0.49950	0.617428	60	60	0.639704
mwh	3695.500	3564.500	1734.500	0.343786	0.731008	0.36572	0.714574	60	60	0.731944

4.- Las diferencias entre el tratamiento GHPMF 4  $\mu$ M con respecto al testigo EtOH 1.25% para manchas grandes y gemelas no fue significativa, mientras que si se encontró significancia en la comparación de manchas pequeñas y totales.

STATISTICA - [Workbook4\* - Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)]

File Edit View Insert Format Statistics Data Mining Graphs Tools Data Workbook Window Help

Workbook4\*

Nonparametrics (D...

Nonparametric...

Mann-Whitr...

Mann-Whitr...

Nonparametrics (D...

Nonparametric...

Mann-Whitr...

Nonparametrics (D...

Nonparametric...

Mann-Whitr...

Mann-Whitr...

Mann-Whitney U Test (Datos Zaira pruebas de U)

By variable concentración

Marked tests are significant at  $p < .05000$

variable	Rank Sum EtOH 1.25%	Rank Sum GHPMF 4um	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1.25%	Valid N GHPMF 4um	2*1sided exact p
pequeñas	3987.000	3273.000	1443.000	1.873764	0.060964	2.025374	0.042830	60	60	0.061160
grandes	3807.000	3453.000	1623.000	0.929009	0.352885	1.669165	0.095086	60	60	0.355547
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	4061.000	3199.000	1369.000	2.262163	0.023688	2.416928	0.015653	60	60	0.023473
mwh	4061.000	3199.000	1369.000	2.262163	0.023688	2.416928	0.015653	60	60	0.023473