



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Evaluación de los posibles efectos tóxicos y genotóxicos
de los tripanocidas GHPM y GHPMF con las pruebas CL_{50} y
SMART en ala de *Drosophila melanogaster*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS FELIPE SANTOS CRUZ

TUTOR PRINCIPAL: M. en C. MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

MÉXICO, CDMX. JUNIO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Evaluación de los posibles efectos tóxicos y genotóxicos
de los tripanocidas GHPM y GHPMF con las pruebas CL_{50} y
SMART en ala de *Drosophila melanogaster*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS FELIPE SANTOS CRUZ

TUTOR PRINCIPAL: M. en C. MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

MÉXICO, CDMX. JUNIO 2016.



UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de marzo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SANTOS CRUZ LUIS FELIPE**, con número de cuenta 400014948, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS TÓXICOS Y GENOTÓXICOS DE LOS TRIPANOCIDAS GHPM Y GHMPF CON LAS PRUEBAS CL₅₀ Y SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster*."**, realizada bajo la dirección de la M. EN C. **MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO**:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Vocal: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Secretario: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRAN
Suplente: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
Suplente: M. EN C. MA. DE JESÚS LAURA CASTAÑEDA PARTIDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al proyecto de investigación PAPIIT “Evaluación del efecto tóxico y genotóxico de tres tripanocidas, derivados de la quinazolina en *Drosophila melanogaster* y evaluación de los perfiles de expresión de cinco familias de genes de citocromos P450” con número de registro IG200814-3. A la División de Investigación y Posgrado de la FES-Iztacala con el proyecto “Genética Toxicológica proyecto independiente S/N”.

A mi tutor principal la M. en C. María Eugenia Isabel Heres Y Pulido.

A los miembros de mi Comité Tutoral la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz y la M. en C. Irma Elena Dueñas García.



AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a los miembros del jurado para la obtención del grado, Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, Dr. Juan José Rodríguez Mercado, Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán, Dr. Francisco Hernández Luis y M. en C. Ma. De Jesús Laura Castañeda Partida por la importante contribución para la culminación de este trabajo de tesis.

Agradezco a la M. en C. María Eugenia Heres Y Pulido por el apoyo infinito en el nacimiento, desarrollo y seguimiento de este proyecto de vida científica.

Agradezco al M. en C. Ángel Duran Díaz por su enorme contribución en el entendimiento matemático de la vida.

Agradezco al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla por su valiosa aportación al desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco finalmente el apoyo que todos y cada uno de los que sin duda estarán leyendo estas páginas, y sin afán de olvidar a nadie, quiero hacer mención especial de mi familia académica Maru Heres, Irma Dueñas, Laura Castañeda y Ángel Durán; de mis amigos de vida Elías Piedra, Rosario Fernández, Angélica Serrano; de mi familia genética y espiritual Juana Cruz, Felipe Santos, Carmen Ovando, Cesar Santos, Esmeralda Santos; y por supuesto agradezco a mí, porque en verdad sin mí nada sería posible en mi vida.



ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Manifestaciones clínicas	5
1.1.1. Fase aguda	5
1.1.2. Fase crónica	6
1.2. Vía de transmisión vectorial	6
1.2.1. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	7
1.2.2. Vía de transmisión vectorial en México	9
1.3. Vías de transmisión no vectorial	9
Transmisión oral por comida y bebida contaminada	10
Transmisión congénita	10
Transfusiones sanguíneas	10
Trasplante de órganos	11
1.4. Tratamiento	11
1.5. Desarrollo de nuevos fármacos	13
1.5.1. Compuestos tripanocidas sintéticos con efecto tóxico	13
1.5.2. Compuestos tripanocidas de productos naturales con efecto tóxico	16
1.5.3. Compuestos tripanocidas con efecto genotóxico	16
1.6. Alternativa de tratamiento	17
1.6.1. DHFR	17
1.6.1.1. Interacción de la DHFR con los tripanocidas derivados de quinazolina	18
1.6.1.2. DHFR de <i>D. melanogaster</i>	20
1.6.2. PTR	20
1.6.3. Estudios de toxicidad con tripanocidas derivados de quinazolina	21
1.7. Pruebas para el análisis de la genotoxicidad	22
1.7.1. Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	22
1.8. Dimetilnitrosamina (DMN)	26



2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVO GENERAL	28
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. MATERIALES	29
4.1.1. Químicos	29
4.1.2. Biológicos	30
4.2. MÉTODOS	31
4.2.1. Cultivo y propagación de cepas de <i>D. melanogaster</i>	31
4.2.2. Prueba de toxicidad (CL ₅₀) para el GHPM y el GHPMF en las cepas flare y Oregon-flare de <i>D. melanogaster</i>	31
4.2.2.1. Análisis estadístico	31
4.2.2.1.1. Análisis de Varianza para un diseño experimental con dos factores (ANOVA Factorial)	31
4.2.2.1.2. Prueba de Fisher o de la diferencia mínima significativa (LSD)	32
4.2.3. SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> para GHPM y GHPMF	33
4.2.3.1. Cruzas Estándar (CE) y Bioactivación Elevada (CBE)	33
4.2.3.2. Diseño experimental	33
4.2.3.2.1. Análisis estadístico	34
4.2.3.2.1.1. SMART PC-versión 2.1	34
4.2.3.2.1.2. Prueba U de Mann-Whitney	36
4.2.3.2.1.3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S)	37
4.2.3.2.1.4. Prueba Wald-Wolfowitz (W-W)	37



4.2.4. Análisis HPLC de moscas tratadas con GHPM o GHPMF -----	38
5. RESULTADOS -----	39
5.1. Prueba de toxicidad (CL ₅₀) -----	39
5.1.1. CL ₅₀ del tripanocida GHPM -----	39
5.1.1.1. Comparación de los tratamientos GHPM vs EtOH 2% -----	39
A) Estadística descriptiva -----	39
B) Estadística inferencial -----	40
5.1.1.2. Diferencias entre las cepas (flare y Oregon-flare) -----	41
A) Estadística descriptiva -----	41
B) Estadística inferencial -----	41
5.1.1.3. Interacción concentración-cepa -----	42
5.1.1.3.1. Cepa flare -----	42
A) Estadística descriptiva -----	42
5.1.1.3.2. Cepa Oregon-flare -----	43
A) Estadística descriptiva -----	43
5.1.1.3.3. Estadística inferencial de la interacción concentración-cepa -----	44
5.1.2. CL ₅₀ del tripanocida GHPMF -----	46
5.1.2.1. Comparación de los tratamientos GHPMF vs EtOH 2% -----	46
A) Estadística descriptiva -----	46
B) Estadística inferencial -----	47
5.1.2.2. Diferencias entre las cepas (flare y Oregon-flare) -----	48
A) Estadística descriptiva -----	48
B) Estadística inferencial -----	48
5.1.2.3. Interacción concentración-cepa -----	49
5.1.2.3.1. Cepa flare -----	49
A) Estadística descriptiva -----	49



5.1.2.3.2. Cepa Oregon-flare -----	50
A) Estadística descriptiva -----	50
5.1.2.3.3. Estadística inferencial de la interacción concentración-cepa -----	51
5.2. Prueba de genotoxicidad SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> -----	53
5.2.1. Cruza Estándar (CE) -----	53
5.2.1.1. Testigos -----	53
5.2.1.2. Tratamientos con el tripanocida GHPM -----	56
5.2.1.3. Tratamientos con el tripanocida GHPMF -----	58
5.2.2. Cruza Bioactivación Elevada (CBE) -----	60
5.2.2.1. Testigos -----	61
5.2.2.2. Tratamientos con el tripanocida GHPM -----	64
5.2.2.3. Tratamientos con el tripanocida GHPMF -----	66
5.3. Análisis por HPLC de remanencias de los tripanocidas -----	68
5.3.1. GHPM -----	69
5.3.2. GHPMF -----	70
6. DISCUSIÓN -----	73
6.1. GHPM -----	73
6.1.1 Efecto subtóxico del GHPM -----	73
6.1.2. Efecto genotóxico de GHPM -----	75
6.1.2.1. Testigos -----	75
6.1.2.1.1. Etanol sólo alteró la división celular en la CE -----	75
6.1.2.1.2. Efecto genotóxico de la DMN -----	75
6.1.2.2. El GHPM fue genotóxico y alteró la distribución de clones <i>mwh</i> -----	76
6.1.3. Sin trazas de metabolitos de GHPM en la HPLC -----	78



6.2. GHPMF -----	78
6.2.1. Efecto subtóxico del GHPMF -----	78
6.2.2. Ausencia de genotoxicidad con el GHPMF -----	79
6.3. Sin trazas de metabolitos de GHPMF en la HPLC -----	80
7. CONCLUSIONES -----	82
8. LITERATURA CITADA -----	83
9. ANEXOS -----	95
9.1. Anexo 1, resultados de la prueba de U de Mann-Whitney, Cruza E -----	95
9.2. Anexo 1, Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney, Cruza BE ----	100
9.3. Anexo 2, Resultados de las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald- Wolfowitz (W-W), CE -----	104
9.4. Anexo 2, Resultados de las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald- Wolfowitz (W-W), Cruza BE -----	110
9.5. Eventos genéticos que conducen a la pérdida de heterocigosis -----	116
10. Glosario -----	119



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en el continente americano----	4
Figura 2. Manifestaciones clínicas de la fase aguda -----	6
Figura 3. <i>Triatoma infestans</i> “Chinche besucona” -----	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> -----	8
Figura 5. Tipos de transmisión de la enfermedad de Chagas -----	12
Figura 6. Estructura química de N ⁶ - (4 metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina (GHPM) -----	17
Figura 7. Estructura química de N ⁶ -[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina (GHPMF) -----	17
Figura 8. Comparación del sitio de interacción del metotrexato con la DHFR de <i>T. cruzi</i> y humano -----	19
Figura 9. Estructura química del Mtx -----	21
Figura 10. Expresión fenotípica de cerdas silvestres -----	25
Figura 11. Expresión fenotípica del marcador <i>mwh</i> y <i>flare</i> -----	25
Figura 12. Estructura química de la DMN -----	27
Figura 13. Porcentaje de mortalidad para las cepas <i>flare</i> y Oregon- <i>flare</i> tratadas con GHPM. -----	42



Figura 14. Porcentaje de mortalidad en la interacción concentración-cepa de los tratamientos con GHPM. -----	45
Figura 15. Porcentaje de mortalidad para las cepas flare y Oregon-flare tratadas con GHPMF. -----	49
Figura 16. Porcentaje de mortalidad en la interacción concentración-cepa de los tratamientos con GHPMF. -----	52
Figura 17. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para los testigos disolvente: agua y testigo negativo: EtOH 2%, CE -----	55
Figura 18. Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo de los testigos, CE. -----	56
Figura 19. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para el testigo disolvente: EtOH 2% y los tratamientos con GHPM 2, 4, 8 y 16 μ M, CE -----	57
Figura 20. Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo de los tratamientos GHPM, CE. -----	58
Figura 21. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ mosca para el testigo negativo: EtOH 2% y los tratamientos con GHPMF 2, 4, 8 y 16 μ M, CE -----	59
Figura 22. Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo de los tratamientos GHPMF, CE. -----	60
Figura 23. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para los testigos disolventes: agua y EtOH 2%, CBE -----	63



Figura 24. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los testigos, CBE. -----64

Figura 25. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para el testigo negativo: EtOH 2% y los tratamientos con GHPM 2, 4, 8 y 16 μ M, CBE -----65

Figura 26. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los tratamientos GHPM, CBE. -----66

Figura 27. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ mosca para el testigo negativo: EtOH 2% y los tratamientos con GHPMF 2, 4, 8 y 16 μ M, CBE -----67

Figura 28. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los tratamientos GHPMF, CBE. -----68

Figura 29. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas flare tratadas con GHPM -----69

Figura 30. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas Oregon-flare tratadas con GHPM -----70

Figura 31. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas flare tratadas con GHPMF -----71

Figura 32. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas Oregon-flare tratadas con GHPMF -----72



LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Pruebas genotóxicas -----	23
Cuadro II. Distribución de los tratamientos crónicos (~48 h) -----	34
Cuadro III. Medidas descriptivas por tratamiento del porcentaje de mortalidad de Drosophilas expuestas a GHPM -----	40
Cuadro IV. Medidas descriptivas por cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de las cepas flare y Oregon-flare expuestas a GHPM -----	41
Cuadro V. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje del mortalidad de Drosophilas de la cepa flare expuestas a GHPM -----	43
Cuadro VI. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa Oregon-flare expuestas a GHPM -----	44
Cuadro VII. Medidas descriptivas por tratamiento del porcentaje de mortalidad de Drosophilas expuestas a GHPMF -----	47
Cuadro VIII. Medidas descriptivas por cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de las cepas flare y Oregon-flare expuestas a GHPMF -----	48
Cuadro IX. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa flare expuestas a GHPMF -----	50
Cuadro X. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa Oregon-flare expuestas a GHPM -----	51



Cuadro XI. Resultados del SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la cruza estándar de los tratamientos crónicos con GHPM o GHPMF 2, 4, 8, 16 μ M. Testigos negativos: EtOH 2 % y agua miliQ y testigo positivo: DMN 76 μ M -----54

Cuadro XII. Resultados del SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la cruza bioactivación elevada de los tratamientos crónicos con GHPM o GHPMF 2, 4, 8, 16 μ M. Testigos negativos: EtOH 2 % y Agua miliQ y testigo positivo DMN 76 μ M -----62



LISTA DE ABREVIATURAS

Bd^{ser}: *Beaded Serratia* (marcador dominante).

Bzn: Benznidazol.

CBE: Cruza bioactivación elevada.

CE: Cruza estándar.

CL₅₀: Concentración letal media.

Cyp450: Citocromos P450

DHF: 7,8-dihidrofolato.

DHFR: Dihidrofolato reductasa.

DHFR-TS: complejo bifuncional dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa.

DIM: Drosophila Instant Medium.

DMN: Dimetilnitrosamina.

EC₅₀: Concentración efectiva media para la acción de un fármaco.

flr³: marcador genético *flare*.

G2: Fase G2 del ciclo celular.

GHPM: N⁶ - (4 metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina.

GHPMF: N⁶-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina.

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (High Performance Liquid Chromatography).

IARC: International Agency for Research on Cancer.

K-S: Kolmogorov-Smirnov, prueba estadística.

M: fase de mitosis.

mwh: *multiple wing hairs* (marcador genético).

Mx: Metotrexato.

Nfx: Nifurtimox.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: Ácido pimaradienoico.

Pos: Posaconazol.

PTR: pteridin reductasa.

Q1: cuartil 1.



Q3: cuartil 3.

S: Fase de síntesis del ciclo celular donde se lleva a cabo la duplicación del DNA.

SMART: Somatic Mutation And Recombination Test.

TAQ: 2,4,6-triaminquinazolina.

Tc-TOX: Proteína citotóxica de *T. cruzi*.

THF: 5,6,7,8- tetrahidrofolato.

TM3: cromosoma balanceador con tres inversiones cromosómicas.

TS: timidilato sintasa.

W-W: Wald-Wolfowitz (prueba estadística).



RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad mortal, provocada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Para combatirla se han usado compuestos tripanocidas, pero éstos han mostrado efectos secundarios. Recientemente, se sintetizaron dos nuevos tripanocidas, GHPM y GHPMF; sin embargo, como parte de su desarrollo hacia nuevos fármacos, se deben estimar sus efectos adversos en diferentes modelos biológicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos tóxicos y genotóxicos de ambos tripanocidas en *Drosophila melanogaster*. Se realizó la prueba CL_{50} de GHPM y GHPMF a las concentraciones 0, 1.9, 3.8, 7.9, 15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508 $\mu\text{M}/\text{EtOH}$ 2% en las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster* en tres experimentos independientes con cinco réplicas por concentración y 10 larvas por réplica; los resultados fueron analizados con ANOVA factorial. El efecto genotóxico fue evaluado en las cruces estándar (CE) y bioactivación elevada (CBE) de SMART en ala de *D. melanogaster*, exponiendo larvas de 72 ± 4 h a los tratamientos crónicos: agua miliQ, EtOH 2 %, DMN 76 μM , GHPM o GHPMF 2, 4, 8 y 16 μM . Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y en tres experimentos independientes. Las alas de fenotipo silvestre fueron revisadas por “doble ciego”, bajo microscopio a 40X y los resultados de la frecuencia de manchas fue analizada con las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney, y la frecuencia acumulada de las distribuciones de tamaño de clones *mwh* fue analizada con las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Wald-Wolfowitz. Adicionalmente, dos grupos de 150 moscas tratadas con GHPM y GHPMF respectivamente, fueron analizados por HPLC para determinar el metabolismo de los tripanocidas. Nuestros resultados indicaron que GHPM mostró una toxicidad media de 40 %, mientras GHPMF sólo mostró ese efecto a concentraciones bajas. En la CE del SMART el GHPM fue genotóxico porque incrementó la frecuencia de manchas grandes a 16 μM y alteró la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh*; mientras GHPMF sólo alteró la distribución de clones. En la CBE no se encontraron diferencias entre los tratamientos con tripanocidas y EtOH 2%. Sin embargo, encontramos diferencias entre las cruces E y BE para la



genotoxicidad de GHPM y diferencias en la distribución de clones en ambos tripanocidas. El análisis HPLC no mostró trazas de ninguno de los tripanocidas o sus metabolitos. Se concluye que la diferencia en nuestros resultados es debido a la estructura química de GHPM y GHPMF ya que ambos resultaron subtóxicos, pero solo GHPM fue genotóxico. Las evidencias también indican la participación del sistema enzimático Cyp450s en el metabolismo de ambos tripanocidas. Se sugiere realizar estudios con otros modelos experimentales y la utilización de análisis molecular y bioquímico para confirmar lo anterior.

Abstract

The Chagas disease is a fatal one, it is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. To combat it trypanocidal compounds have been used, but these have shown side effects. Recently, two new Trypanocides were synthesized, GHPM and GHPMF; however, as part of its development into new drugs, their adverse effects must be assessed on different biological models. The aim of this work was evaluate the toxic and genotoxic effects of both Trypanocides in *Drosophila melanogaster*. CL₅₀ tests of GHPM and GHPMF were perform at concentrations 0, 1.9, 3.8, 7.9, 15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 and 508 μ M/EtOH 2% in the flare and Oregon-flare strains of *D. melanogaster* in three independent experiments with five replicates per concentration and 10 larvae per replicate; the results were analyzed with factorial ANOVA. The genotoxic effect was evaluated in the standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses of the *Drosophila* wing spot test, exposing third instar larvae (72 ± 4 h) to chronic treatments: miliQ water, EtOH 2%, DMN 76 mM, GHPM or GHPMF 2, 4, 8 and 16 μ M. All treatments were performed by triplicate and in three independent experiments. Wings of wild phenotype were scored "double-blind" under the microscope at 40X and the results of the frequency of spots were analyzed with the Kastenbaum-Bowman and U Mann-Whitney tests, and the cumulative frequency of the mwh clones size distribution was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov and Wald-Wolfowitz tests. In addition, two batches of



150 flies each, treated with GHPM and GHPMF respectively, were analyzed by HPLC to determine these trypanocides metabolism. Our results indicated that GHPM showed a mean toxicity of 40%, while GHPMF only showed this effect at low concentrations. In the ST cross GHPM was genotoxic because it increased the frequency of large spots at 16 μ M and altered the cumulative frequency of mwh clones distribution; while GHPMF only altered the clones distribution. In the HB cross, there were no differences between trypanocides treatments and EtOH 2%. However, we found differences between the ST and HB crosses for the genotoxicity GHPM and differences in the clones distribution in both trypanocides. The HPLC analysis did not find traces of any of the trypanocides or their metabolites. It is concluded that the differences in our results are due to the chemical structure of GHPM and GHPMF since both resulted subtoxic but only GHPM was genotoxic. All these evidences also indicate the participation of the CYP450s enzyme system in the metabolism of both trypanocides. It is suggested to conduct studies with other experimental models and the use of molecular and biochemical analysis to confirm the above.



I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, organismo flagelado transmitido a los seres humanos principalmente por vía de las heces de triatominos infectados (vector transmisor en zonas endémicas), por la transfusión de sangre infectada, donadores de órganos infectados, o la transmisión congénita de madre a hijo (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; Senkovich *et al.*, 2009).

La enfermedad de Chagas fue descrita en 1909 por el doctor brasileño Carlos Chagas; debido a la distribución de los parásitos a través de Norte, Centro y Sudamérica, la enfermedad es comúnmente conocida como “Tripanosomiasis Americana”, y es considerada endémica en 21 países de América Latina (Figura 1). Esta enfermedad está estrechamente vinculada con aspectos socioeconómicos-culturales, siendo reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas en el mundo (Roca *et al.*, 2015).



Fig. 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en el continente americano (Tomado de www.highlabperu.net).

La OMS en el 2010 reportó alrededor de 10 millones de personas infectadas, y más de 25 millones de personas en riesgo de ser infectadas en las zonas endémicas (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).



La enfermedad de Chagas ha tomado mucha importancia, ya que históricamente los procesos de migración e importación han sido los principales factores de diseminación de esta enfermedad, encontrándose hoy en día de manera importante, en zonas no endémicas tales como Canadá, Estados Unidos y varias ciudades de Europa, solamente en esta última, se estiman de 68 a 123 mil personas infectadas por *T. cruzi* (Pinazo y Gascon, 2015; Nunes *et al.*, 2013).

En México, existen 18 zonas endémicas, pero se han reportado casos en todos los estados de la República, incluida la Ciudad de México, donde no se ha reportado la presencia del vector. Entre los estados más afectados destacan Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos, con un reporte final de 5.5 millones de mexicanos afectados por esta enfermedad (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012; Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

1.1. Manifestaciones clínicas

1.1.1. Fase aguda

La mayoría de las veces, la fase aguda de la enfermedad de Chagas es asintomática o está acompañada de síntomas menores, tales como inflamación del sitio de inoculación (chagoma) (Figura 2), edema, fiebre, dolor de cabeza, anorexia, vómito, diarrea y apatía, lo que provoca la falta de atención médica, pues estos síntomas se confunden con otras enfermedades. Esta fase tiene un periodo de duración de 2-4 meses; sin embargo, en algunos casos (2-6 %) puede causar la muerte, principalmente debido a miocarditis y meningoencefalitis (Malik *et al.*, 2015; Carabarin-Lima *et al.*, 2013).



Fig. 2. Manifestaciones clínicas de la fase aguda
(Tomado de maiquiflores.over-blog.es y www.oei.es).

1.1.2. Fase crónica

De los pacientes sobrevivientes de la fase aguda, 40-50 % pasan a una fase crónica de larga duración, la cual es irregular presentando síntomas en algunos casos y en otros no, efecto dependiente de la cepa de *T. cruzi*. En el caso de las cepas presentes en México, la fase es asintomática y los síntomas se presentan hasta su etapa final después de 10-30 años de la primera infección, con severas complicaciones cardíacas y gastrointestinales (megasíndromes), hasta la muerte súbita por colapso visceral (Nunes *et al.*, 2013; Cencig *et al.*, 2012).

1.2. Vía de transmisión vectorial

Trypanosoma cruzi infecta alrededor de 180 especies de 25 familias de mamíferos, puede ubicarse en diversos ecosistemas y a diferentes latitudes y altitudes, desde la Patagonia hasta el sur de Canadá. Como ya se comentó, su transmisión generalmente es a través de triatominos (orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae) que pueden transmitir fácilmente el parásito por vía dérmica a través de la contaminación de la piel de mamíferos con sus heces fecales (de Noya y González, 2015). Los triatominos son insectos conocidos como “vinchuca” en Bolivia, Argentina y Chile, “chipo” en Colombia, “chinche besucona” en México (Figura 3) o “barbeiro” en Brasil (Roca *et al.*, 2015). En Norteamérica se han reportado 40 especies de triatominos como posibles vectores (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).



Fig. 3. *Triatoma infestans* “chinche besucona”
(Tomado de www.milenio.com).

1.2.1. Ciclo de vida de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi está adaptado a la variedad de microambientes de sus hospederos y presenta diferentes transformaciones (mastigonte, epimastigonte, y tripomastigonte), que ocasionan cambios estructurales y metabólicos, lo cual posibilita la viabilidad del parásito. Los hospederos animales del ciclo de vida de *T. cruzi* incluyen un mamífero y un invertebrado hematófago que actúa como vector (Martins *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 4) inicia cuando un triatomino infectado pica a un mamífero para alimentarse con su sangre, cuando su sistema digestivo se encuentra lleno sincrónicamente se fuerza la eliminación de la masa de excreta acumulada, constanding de heces fecales y orina. La excreta es depositada en la superficie de la piel del mamífero, la cual puede llegar a contener de 3000 a 4000 tripomastigotes metacíclicos por microlitro de heces (de Noya y González, 2015). Los tripomastigotes metacíclicos por movimiento activo y por la liberación de enzimas histolíticas pueden penetrar la piel o las mucosas. Una vez que el tripomastigote metacíclico está en el tejido del hospedero vertebrado, es endocitado por el sistema fagocítico mononuclear, en un proceso de fagocitosis inducida. Después el tripomastigote se libera al segregar la proteína citotóxica (Tc-TOX), que actúa de manera similar a las perforinas de los linfocitos T citotóxicos (Martins *et al.*, 2012).

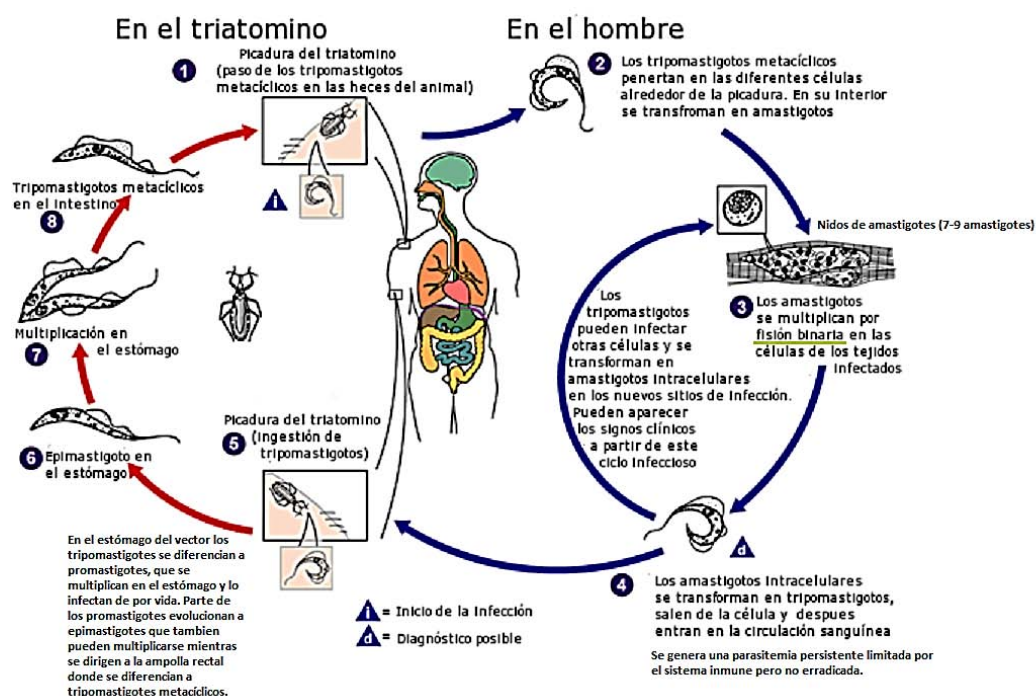


Fig. 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*
(Tomado de updatesaude.wordpress.com).

El tripomastigote liberado en el citoplasma de las células se transforma en amastigote (reduce su tamaño, desaparece el flagelo libre y porta una membrana ondulante redonda). Esta forma se multiplica por fisión binaria, produciendo de 50 a 500 copias. Después los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos, rompen la membrana de la célula infectada e invaden nuevas células nucleadas del hospedero vertebrado, especialmente de músculo liso, esquelético, cardíaco y nervioso. Debido a la circulación de la forma tripomastigote sanguíneo, puede ocurrir la transmisión de la enfermedad por vía transfusional y congénita. Si el vertebrado hospedero es picado por otro triatominio, éste puede ingerir los tripomastigotes sanguíneos, que llegan al estómago, intestino medio y posterior del insecto, transformándose en epimastigote, éste se multiplica y luego se transforman en tripomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis). Luego se adhieren por el flagelo externo a la superficie de la pared del intestino posterior, y parte de éstos serán llevados al exterior por la excreta, seguido por su depósito en



la superficie de la piel en un nuevo mamífero cerrando con esto el ciclo (Martins *et al.*, 2012).

1.2.2. Vía de transmisión vectorial en México

En nuestro país la diversidad de vectores es bastante abundante debido a la enorme variedad de hábitats que proporcionan las condiciones naturales del territorio nacional. Al menos 32 especies de triatominos son conocidos y todos son vectores potenciales; éstos se encuentran distribuidos en siete géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*. De todos éstos, diez especies son los mayores vectores (*Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. infestan*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. picturata*) (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

Además de esto, numerosas especies de mamíferos silvestres y domésticos pueden actuar como reservorios para *T. cruzi*. De acuerdo a los reportes de 15 estados, los mayores reservorios silvestres son tres especies de zarigüeya (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander oposum*), mientras que en los mamíferos domésticos los más importantes son el perro, el gato y la rata (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

1.3. Vías de transmisión no vectorial

Además de la transmisión asociada a un vector, la enfermedad también puede ser transmitida por diversas vías no vectoriales tal como transmisión oral por comida y bebida contaminada, transmisión congénita, por transfusiones sanguíneas o por trasplante de órganos (Figura 5) (Faral-Tello *et al.*, 2014).



Transmisión oral por comida y bebida contaminada

Se ha reportado que una mayor concentración de las formas tripomastigotes sanguíneas y metacíclicas, pueden ingresar al huésped por vía oral, convirtiéndola en una de las vías de infección más eficientes. Ésta forma de transmisión está relacionada con el consumo de jugos caseros o bebidas artesanales contaminadas con triatominos infectados o con sus heces fecales (Pinazo y Gascon, 2015), ya que el protozooario en la forma de tripomastigote puede ser viable en jugos de 6 a 72 h y en leche por 6 h (de Noya y González, 2015).

Transmisión congénita

Esta transmisión se da de madre a hijo y es provocada por la libre circulación de la forma tripomastigote sanguínea en el hospedero (Martins *et al.*, 2012). De acuerdo a estimaciones recientes de la OMS, en América Latina existen 1,125,000 mujeres en edad fértil infectadas con *T. cruzi*, con una incidencia de infección congénita de 8,668 casos por año, de éstos 50 % son distribuidos en tres países: México, Argentina y Colombia (Carlier y Truyens, 2015).

En México, se tienen reportes en los estados de Oaxaca y Jalisco con 20 y 11.9 % de transmisión, respectivamente (Cardoso *et al.*, 2012). Estos datos no parecen alarmantes; sin embargo, la importancia de esta vía de infección radica, según los expertos, en que es el único tipo de transmisión que, difícilmente puede ser prevenido (Bua *et al.*, 2012).

Transfusiones sanguíneas

Se estiman 69,000 nuevas infecciones anuales de la enfermedad de Chagas en México, de las cuales menos del 10 % son debido a la donación de sangre. En nuestro país existen regulaciones oficiales para la donación de sangre, las cuales se incluyen en la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SSA2-1993), que señala la



necesidad de los análisis pertinentes para la disposición de sangre humana y sus componentes con objetivos terapéuticos; sin embargo, estas pruebas (en el caso de la enfermedad de Chagas) sólo son realizadas en donadores con historial de residencia de origen en zonas endémicas de *T. cruzi*. En otros países de América Latina, la prevalencia de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre es mucho mayor, por ejemplo para Argentina el 17 %, Bolivia 51 %, Brasil y Chile el 14 %, Perú 12 % y Honduras 11 %, como los más sobresalientes (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

Trasplante de órganos

El trasplante de órganos es más frecuente en regiones no endémicas que en los países endémicos, y esto ha abierto otra vía de transmisión del parásito. El manejo de esta condición clínica es especialmente importante, debido a la condición de inmunosupresión requerida durante el trasplante (Pinazo y Gascon, 2015).

1.4. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad de Chagas incluye los medicamentos nifurtimox (Nfx) (4[(5-nitrofurfuriliden)amino]-3-metiltiomorflin-1,1-dioxido), sintetizado en 1967 por Bayer (Lampit®), y el benznidazol (Bnz) (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-il) acetamida), generado en 1972 por la casa Roche (Rochangan® o Radanil®), pero transferida la licencia y los derechos de este último fármaco en el 2003 a los laboratorios farmacéuticos del estado Brasileño de Pernambuco (LAFEPE) (Honorato *et al.*, 2014).

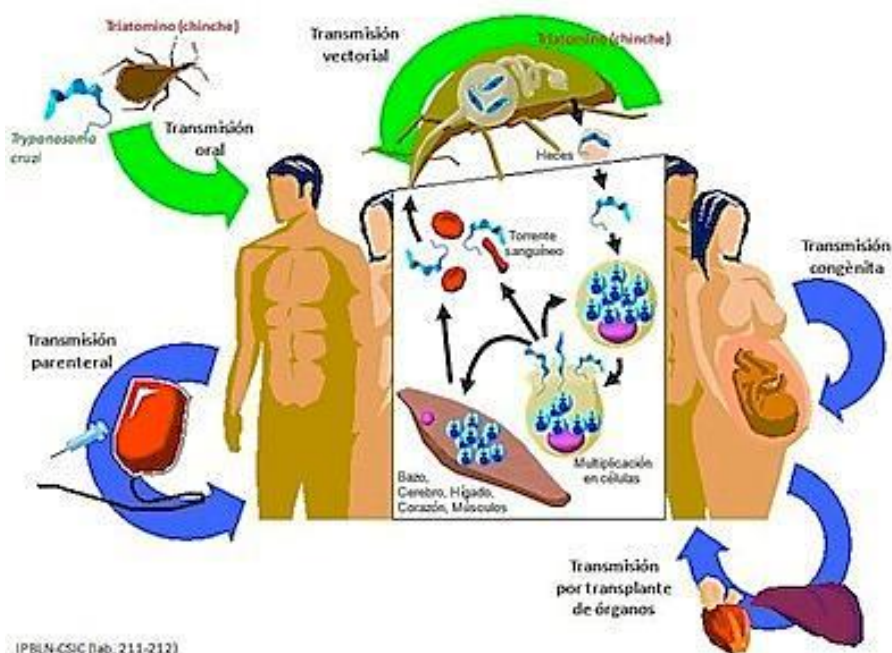


Fig. 5. Tipos de transmisión de la enfermedad de Chagas
(Tomado de enfermedaddechagasnorte.blogspot.com).

Los tripanocidas Nfx y Bnz fueron descubiertos empíricamente hace más de tres décadas y proporcionan un excelente índice de cura en la fase aguda de la enfermedad (60–80 %). Sin embargo, en la fase crónica 80 % de los pacientes no obtienen el mismo efecto (Malik *et al.*, 2015).

Ambos fármacos han sido asociados con varios efectos secundarios, y 40 % de los pacientes tratados presentan reacciones adversas, por ejemplo, el Bnz puede provocar reacciones de hipersensibilidad, toxicidad medular, y neuropatías periféricas al final del tratamiento, mientras que el Nfx puede inducir síntomas digestivos, tales como náuseas, vómito, diarrea, anorexia, pérdida de peso y síntomas neuropsiquiátricos como irritabilidad, desorden del sueño y neuropatías periféricas (Lescure *et al.*, 2010).

Posiblemente, los efectos secundarios de ambos tripanocidas se deben a que al ser profármacos, necesitan ser activados por nitroreductasas o por citocromos p450 (Cyp450s) específicos del parásito en un proceso dependiente de NADPH.



Aunque se cree que este mecanismo es la base de la selectividad del parásito, también es posible que puedan provocar toxicidad en el tejido hospedero, ya que en algunos casos también podrían activarse por las enzimas presentes en el tejido de mamíferos (Cancado, 1999, citado en Faral-Tello *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que a la fecha, ambos tripanocidas no están totalmente validados por evidencia médica y son recomendados, pero no permitidos, por la *Food and Drug Administration* de los EE.UU. y la *European Medicines Agency* (Rassi *et al.*, 2010).

1.5. Desarrollo de nuevos fármacos

Como se mencionó anteriormente, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo se disponen de los tripanocidas Nfx y Bnz, que presentan una eficacia variable, toxicidad y un pobre efecto sobre la fase crónica de la enfermedad. Dadas las limitaciones de los fármacos disponibles para combatir la enfermedad se justifica la investigación de nuevos agentes tripanocidas que puedan reemplazar las actuales terapias o proporcionar una alternativa de mejor calidad.

1.5.1. Compuestos tripanocidas sintéticos con efecto tóxico

Faral-Tello y colaboradores, (2014), investigaron el efecto de quince compuestos imidazol en concentraciones de 0.9 a 50 μM , con diferentes sustituciones y patrones de oxidación en sus estructuras, contra *T. cruzi*. Los resultados mostraron que cinco de los compuestos probados fueron efectivos contra las tres formas morfológicas de *T. cruzi*, aunque también presentaron baja toxicidad en células Vero (línea celular de mono verde Africano, ATCC).

Cardoso y colaboradores, (2014), estudiaron el efecto tripanocida de varios derivados de 2-piridina tiosemicarbazona. La mayoría de los compuestos



presentaron excelente inhibición del tripomastigote. Sin embargo, un derivado fluorado exhibió toxicidad para las células HepG2 a la concentración de 18.2 μM y los demás compuestos mostraron niveles bajos de citotoxicidad a 85.11 μM .

Velásquez y colaboradores, (2014), evaluaron la actividad tripanocida de bencilaminas (N^1, N^2 -dibenciletano-1,2-diamina) y ferrocenildiaminas (N^1 -bencil, N^2 -metiferroceniletano-1,2-diamina) a las concentraciones 0.35 a 10.9 μM contra *T. cruzi* y *T. brucei*. En ese trabajo demostraron que las aminas tienen buena actividad tripanocida y que la modificación de la estructura de la bencildiamina, introduciendo un grupo ferroceno, incrementa dicha actividad. Sin embargo, todos los tripanocidas presentaron toxicidad leve, principalmente el compuesto con el grupo ferroceno, en el ensayo de citotoxicidad en células HepG2.

Gutiérrez y colaboradores, (2013), evaluaron la actividad tripanocida de varios compuestos glicosil disulfuro aromático oligovalentes y diglicosil disulfuros a las concentraciones 4 a 11 μM . Los resultados indicaron un buen efecto de los compuestos contra tripomastigotes; aunque en las pruebas de citotoxicidad en cultivos celulares HeLa, Vero y macrófagos peritoneales, se mostró citotoxicidad leve de todos los compuestos a concentraciones $> 240 \mu\text{M}$.

Suryadevara y colaboradores, (2013), trabajaron con compuestos modificados de dialquilimidazol, cuyo efecto se basa en la inhibición de 14α -desmetilasa (Cyp51), esencial en la biosíntesis de esteroides relacionados con el ergosterol, componentes esenciales para la membrana del parásito; esto lo hicieron en cultivos *in vitro* de *T. cruzi*, encontrando una Concentración Efectiva $50 < 1 \text{ nM}$. Sin embargo, también encontraron efectos citotóxicos a las concentraciones 5 a 10 μM en líneas celulares linfocíticas de mamífero CRL-8155.

Cencig y colaboradores, (2012), investigaron el efecto tripanocida de la combinación de varios compuestos (benznidazol, nifurtimox, posaconazol y/o AmBisome) en ratones hembras BALB/cJ en fase aguda y crónica de la



enfermedad, con cepas de *T. cruzi* sensibles y resistentes al benznidazol. Los resultados indicaron que el co-tratamiento de benznidazol y posaconazol o nifurtimox a dosis de 100 mg/Kg/día, durante un periodo de tiempo corto, curó ambas fases de la enfermedad en los ratones infectados; sin embargo, los tratamientos a largo plazo presentan un efecto tóxico acumulativo dependiente de la dosis.

Díaz-Chiguer y colaboradores, (2012), evaluaron el efecto tripanocida de cinco derivados de bencimidazol en pruebas *in vitro* e *in vivo* contra dos cepas de *T. cruzi* (NINOA y INC5). En la prueba *in vitro* se evaluó el porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos. Los resultados indicaron que el compuesto 5-cloro-1H-bencimidazol-2-tiol fue el que presentó mejor efecto con una Concentración Lítica 50 de 0.014 mM (cepa NINOA) y 0.32 mM (cepa INC5). Mientras que en la prueba *in vivo* realizada en un modelo murino, con etapa aguda de la enfermedad de Chagas, mostró también efecto tripanocida similar. Sin embargo, todos los derivados mostraron toxicidad leve en una línea celular epitelial de riñón de mono (células Vero), con el ensayo colorimétrico MTT.

Por otro lado, De Souza y colaboradores, (2011), estudiaron seis aminas aromáticas (nombradas DB1201, DB1470, DB829C, DB1540, DB820D, DB1282) contra los estados infectivo e intracelular de *T. cruzi*. Los resultados indicaron que las arilimidaminas DB1470 y DB1201 fueron más efectivas con una Concentración Letal Media (CL₅₀) de 2.6 y 8.4 µM, respectivamente. Sin embargo, también se demostró toxicidad de todas las aminas con el ensayo MTT en cultivos primarios de cardiomiocitos, por ejemplo, la DB1470 a la concentración 96 µM provocó pérdida de viabilidad celular a las 24 h, y la DB1540 a las concentraciones de 10.8 y 24 µM mostraron pérdida a las 72 h de la incubación.



1.5.2. Compuestos tripanocidas de productos naturales con efecto tóxico

Santos y colaboradores, (2012), reportaron que una alternativa para combatir la tripanosomiasis es el uso de productos naturales aislados de plantas usadas en la medicina tradicional. Estos autores evaluaron el extracto etanólico de *Eugenia uniflora* (conocida en Brasil como “Pitanga”) a las concentraciones 1, 10 y 100 µg/mL contra los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL-B5). Los resultados indicaron un excelente efecto tripanocida de 80 % con la concentración de 100 µg/mL. Pero por otra parte, el estudio de toxicidad con macrófagos J774 indicó una toxicidad leve (8%) a la misma concentración.

Kato y colaboradores, (2012), reportaron que el diterpeno ácido pimaradienoico (PA), encontrado en las raíces de la planta brasileña *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae), produjo daños al DNA a concentraciones 2.5 y 5 µg/mL en el ensayo cometa en fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79).

Niwa y colaboradores, (2013), demostraron el efecto citotóxico en células de hepatoma de *Rattus norvegicus* a la concentración 280 mM de la (-)-Cubebina, lignano extraída de las semillas de la pimienta (*Piper cubeba*).

1.5.3. Compuestos tripanocidas con efecto genotóxico

Cabrera y colaboradores, (2009), analizaron seis derivados de 5-fenil-etenil-benzofuroxanos en varias pruebas *in vitro*; en la prueba Ames uno de ellos resultó mutagénico con y sin activación metabólica, y cuatro fueron mutagénicos sólo después de su activación; en el ensayo cometa dos derivados fueron genotóxicos a la concentración 100 µM.

Buschini y colaboradores, (2007), encontraron que el 5-nitromegazol y su análogo el 5-nitroimidazol-tiosemicarbazona causaron daños al DNA de leucocitos humanos por estrés oxidante en el ensayo cometa.



1.6. Alternativa de tratamiento

En la actualidad, algunas terapias están enfocadas en la inhibición de dos enzimas muy importantes para la sobrevivencia de *T. cruzi*, la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la pteridin reductasa (PTR). En ese sentido, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, Hernández Luis y sus colaboradores, han desarrollado fármacos con actividad tripanocida, derivados de la quinazolina, haciendo uso de la estrategia de ensamblamiento de fragmentos farmacofóricos a partir de la molécula 2,4,6-triaminquinazolina (TAQ), que es inhibidora de la DHFR y la PTR. Entre sus resultados están los compuestos N⁶-(4 metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina (GHPM) (Figura 6) y N⁶-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina (GHPMF) (Figura 7).

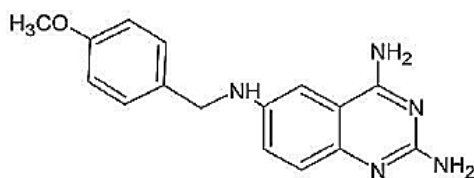


Fig. 6. Estructura química de N⁶-(4 metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina (GHPM).

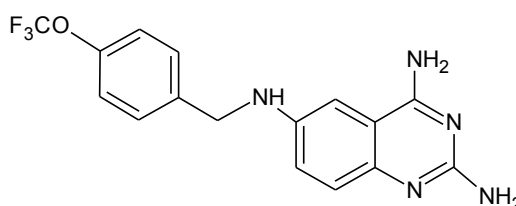


Fig. 7. Estructura química de N⁶-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina (GHPMF).

1.6.1. DHFR

La DHFR es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del folato (FA), nutriente esencial para la sobrevivencia de los organismos, a 7,8-dihidrofolato (DHF) y de DHF a 5,6,7,8- tetrahidrofolato (THF) (Senkovich *et al.*, 2009).



El metabolismo del folato y la producción de THF son necesarios para la transferencia de una unidad de carbono en la biosíntesis de purinas, timidilato y varios aminoácidos, todos necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Affleck *et al.*, 2006).

La inhibición de la DHFR por compuestos conocidos como antifolatos puede inhibir la síntesis del DNA, evitando la proliferación celular y eventualmente llevando a la muerte celular; razón por la cual los antifolatos, tales como el metotrexato, que inhiben las DHFRs de mamíferos, se han utilizado en el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades como la artritis reumatoide (Affleck *et al.*, 2006).

Por otra parte, los cambios evolutivos que determinan la síntesis de la DHFR en varios grupos taxonómicos de organismos inducen diferencias en su inhibición por ciertos análogos de folatos. Esta selectividad es la base para el desarrollo de antifolatos específicos para el tratamiento de infecciones parasitarias (Senkovich *et al.*, 2009).

1.6.1.1. Interacción de la DHFR con los tripanocidas derivados de quinazolina

Gilbert, (2002), comparó con el programa GRID las estructuras tridimensionales de los sitios de interacción de la enzima DHFR con el sustrato (folato) de *T. cruzi* y humano. Los resultados indicaron que existen ligeras diferencias en estos sitios, la enzima del protozooario tiene más residuos no polares en el sitio activo que la enzima del humano. En particular, los residuos Phe88 y Arg53 de la DHFR del parásito interactúan con la región glutamato del folato, mientras que la enzima humana lo hace en sus residuos Asn64 y Gln35.

De manera más específica, Mendoza-Martínez y colaboradores, (2015), determinaron que la DHFR consta de tres regiones, la región I es no polar por la presencia de aminoácidos con cadenas alquil y aromáticas, la región II está



formada principalmente por aminoácidos polares y la región III porta una arginina capaz de unirse al hidrógeno del sustituyente 4-metoxilo del GHPM.

Por otra parte, Senkovich y colaboradores, (2009), compararon las DHFR de humano y de *T. cruzi* (Figura 8), encontrando diferencias importantes en la región I, donde la enzima del parásito tiene aminoácidos con anillos aromáticos (Phe o Tyr), mientras que la del humano es más hidrofílica (Asn64), esto es importante ya que la primera interacción de la estructura quinazolina con los compuestos, tales como el metotrexato y el GHPM, se lleva a cabo en la región I de la DHFR y la PTR (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015).

Por otro lado, la DHFR es una proteína monofuncional en mamíferos, mientras que en *T. cruzi* y otros protozoarios parásitos tienen una forma bifuncional, el dominio DHFR está unido al dominio timidilato sintasa (TS) con una secuencia de unión de longitud variable dependiendo de un parásito a otro (Schormann *et al.*, 2010).

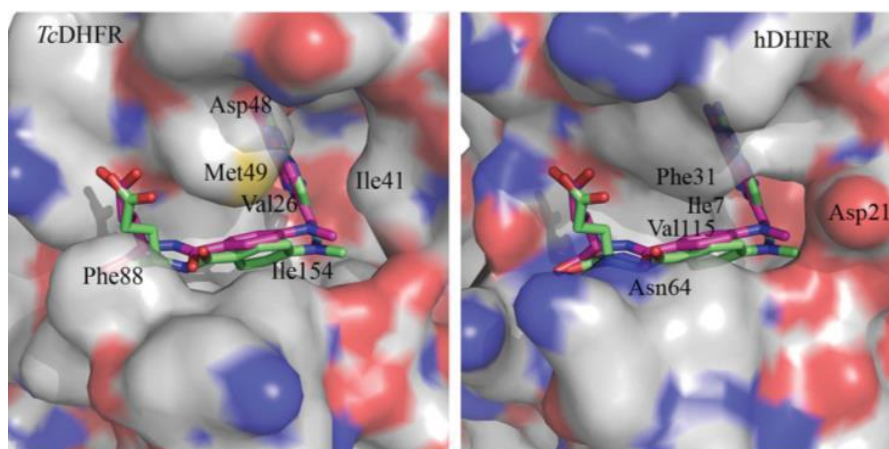


Fig. 8. Comparación del sitio de interacción del metotrexato con la DHFR de *T. cruzi* (izquierda) y humano (derecha) (Tomado de Senkovich *et al.*, 2009).



1.6.1.2. DHFR de *D. melanogaster*

La DHFR de *Drosophila* es una proteína monomérica de 17-22 kDa. Mediante experimentos de fracción subcelular se ha determinado que es una proteína citoplasmática, asociada a complejos supramoleculares que se involucran en la replicación del DNA. Por otra parte, se ha comprobado que su secuencia amino-terminal de 23 residuos es similar en 60 % a la de mamíferos (Rancourt y Walker, 1990).

Se ha demostrado que la DHFR de *Drosophila* comparte muchas propiedades con la del humano, por ejemplo 17 de los residuos involucrados en la unión con el sustrato, inhibidor y cofactor son idénticos en ambos organismos y difieren de los de *T. cruzi* (Affleck *et al.*, 2006).

1.6.2. PTR

La PTR es una enzima con actividad oxido-reductasa dependiente de NADPH, que parece ser importante para los mecanismos de resistencia de parásitos como *Leshmania* spp. y *T. cruzi*, bajo condiciones de estrés celular o cuando el metabolismo del folato es reducido por moléculas que inhiben la DHFR. La PTR puede reducir el folato, por lo que este último puede participar en la síntesis de DNA, y esto contribuye a la resistencia del parásito. Por eso, nuevas investigaciones se enfocan en encontrar antifolatos capaces de inhibir ambas enzimas (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015). De hecho, las DHFRs en protozoarios y plantas están relacionadas con la timidilato sintasa formando un complejo bifuncional dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS).



1.6.3. Estudios de toxicidad con tripanocidas derivados de quinazolina

Los estudios toxicológicos realizados con el derivado GHPM han mostrado resultados variables. Davoll y colaboradores, (1972), quienes sintetizaron por primera vez este compuesto, no encontraron efectos tóxicos de GHPM en perros y pollos a dosis orales de 25, 50, 100, 200 y 400 mg/Kg ni a dosis inyectadas de 100, 200, 400 y 800 mg/Kg. Sólo encontraron cuadros clínicos de diarrea, vómito, anorexia y pérdida de peso a dosis mayores de 100 mg/Kg. Sin embargo, Hernández-Luis, (2013), encontró efecto tóxico del GHPM en ratones a una sola dosis oral de 99 mg/Kg ($\sim 334.6 \mu\text{M}$) (comunicación personal).

El Metotrexato (Mtx) (Figura 9), es un derivado de la quinazolina, usado como fármaco antineoplásico por sus efectos clastogénicos, indujo aberraciones cromosómicas y reducción del índice mitótico en células de médula ósea de ratón a la dosis de 10 mg/Kg por tres días (Sekeroglu y Sekeroglu, 2012). En la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* el Mtx ha demostrado ser un potente agente recombinógeno (Graf *et al.*, 1984).

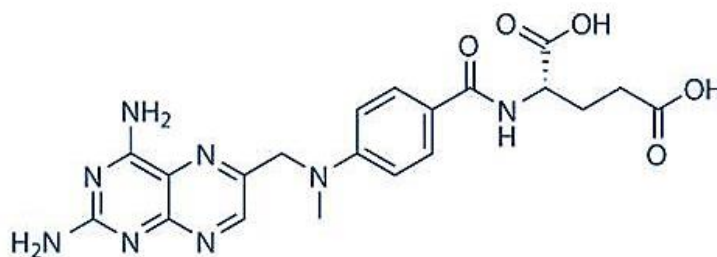


Fig. 9. Estructura química del Mtx
(Tomado de www.selleckchem.com).

Otros derivados de quinazolinas han mostrado efectos apoptóticos en líneas celulares cancerosas (HepG2, SH-SY5Y, DU145, MCF-7 y A549) (Chen *et al.*, 2011) y en una línea celular de epitelio gástrico (GES-1) (Li *et al.*, 2013); así como efectos citotóxicos en las líneas L1210, HeLa y HT-29 y de leucemia (Jantová *et al.*, 2016).



No obstante, los efectos adversos de los tripanocidas derivados de la quinazolina no han sido determinados completamente, ya que se tienen reportes del equipo de trabajo del Dr. Hernández-Luis que demuestran resultados diferentes. Mendoza-Martínez y colaboradores, (2015), no encontraron toxicidad del GHPM y del GHPMF a las concentraciones 32 y 20 μ M, respectivamente, en células de mamífero VERO, ni a dosis de 50 mg/Kg en modelos murinos de malaria cerebral ocasionada por *Plasmodium bergeri*, y reportan que el GHPMF tiene un buen potencial antioxidante.

Por ello es indispensable realizar más estudios sobre los efectos tóxicos y genotóxicos que estos tripanocidas puedan tener sobre los organismos, como parte de su desarrollo hacia nuevos fármacos.

1.7. Pruebas para el análisis de la genotoxicidad

Existen diferentes pruebas para identificar cambios genéticos inducidos por agentes químicos que tienen en cuenta, en última instancia, el riesgo potencial que puedan presentar para el ser humano (Cuadro 1).

1.7.1. Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*

El SMART hace uso del modelo biológico *Drosophila melanogaster*, el cual tiene muchas ventajas, pero la principal es que realiza *in vivo* la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los hepatocitos humanos (Yang *et al.*, 1992; Hälstrom *et al.*, 1984), lugar donde se activan gran cantidad de cancerígenos y mutágenos indirectos (Guzmán y Graf, 1995), Danielson y colaboradores (1998) mostraron que hay una fuerte homología entre la familia *Cyp6* de *D. melanogaster* y la familia *CYP3* de vertebrados, por lo que los resultados obtenidos con este organismo no necesitan ser confirmados con otros modelos biológicos, como sucede por ejemplo con los ensayos realizados con bacterias.



Cuadro I. Pruebas genotóxicas

ENSAYOS PARA MUTACIONES GÉNICAS.

- * Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium* / microsomas de mamífero).
- * Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*.
- * Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster*.
- * Prueba de mutación de los pelos estaminales de *Tradescantia*.

ENSAYOS PARA MUTACIONES CROMOSÓMICAS.

- * Prueba citogenética *in vitro* en células de mamífero.
- * Prueba citogenética *in vivo* en ratones.
- * Prueba de micronúcleos (ratones y células de ovario de Criceto Chino: CHO).
- * Prueba de letales dominantes en ratones.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART): deleciones y aneuploidías parciales.
- * Prueba citogenética de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*.

OTROS DAÑOS.

- * Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.
- * Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- * Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamífero.
- * Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART): detección de recombinación somática.

Modificado de Sánchez Lamar *et al.*, 2000.



El SMART se basa en el hecho de que al inicio del desarrollo larvario en *D. melanogaster* se encuentran dos linajes celulares: larval e imaginal. El primero implicado exclusivamente en el desarrollo larvario, mientras que el imaginal está formado por paquetes de células (discos imaginales). En el caso de los discos que formarán las alas, éstos permanecen en estado embrionario durante todo el desarrollo larvario, proliferando mitóticamente durante la metamorfosis desde un promedio inicial de 50 células por disco hasta alcanzar las 24,400 células. Durante la metamorfosis parte del material larvario degenera y las estructuras del adulto se derivan de cada disco imaginal (Soriano *et al.*, 1995). Por esta razón, SMART tiene la posibilidad de exponer a tratamientos a grandes poblaciones de células, que se reproducen mitóticamente en los discos imaginales de la larva. Si una alteración genética ocurre en una de las células de los discos imaginales que originan las alas o los ojos, esta alteración estará presente en todas las células descendientes, lo que podría originar un clon o mancha de células mutantes en las alas o en los ojos (Graf *et al.*, 1984).

El fundamento de la prueba SMART es “la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de cerdas múltiples o malformadas, derivadas de células mutantes en las alas de los organismos adultos” ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones somáticas y aneuploidías (Anexo 3) (Graf *et al.*, 1984).

La prueba SMART utiliza tres cepas mutantes de *D. melanogaster* con marcadores recesivos:

multiple wing hairs → *mwh* / *mwh*: mutación autosómica recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de tres o más cerdas por célula (Figura 11) en lugar de una, como es el caso del fenotipo silvestre (Figura 10) (Graf *et al.*, 1996).

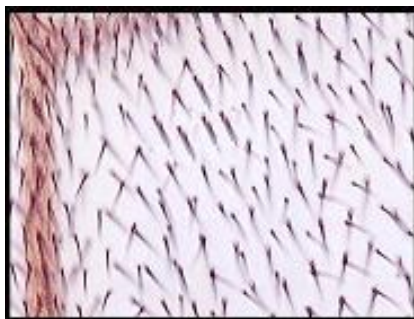


Fig. 10. Expresión fenotípica de cerdas silvestres.

flare \rightarrow flr^3 / TM3, Bd^s : mutación autosómica recesiva ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8). La expresión fenotípica son cerdas malformadas y cortas en forma de "flama" o "rosetas de maíz" (Figura 11). En condición homocigota es letal por lo que esta cepa posee el cromosoma balanceador TM3 con inversiones múltiples que le permiten mantener los marcadores en heterocigosis; este cromosoma balanceador se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante Bd^{ser} (*Beaded Serratia*), el cual se expresa presentando muescas en el borde de las alas (Graf *et al.*, 1984).

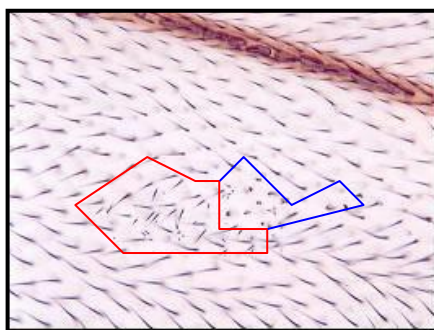


Fig. 11. Expresión fenotípica del marcador mwh (encerrado en color rojo) y flare (encerrado en color azul)

Oregon-flare \rightarrow ORR(1); ORR(2); flr^3 / TM3, Bd^s : esta cepa presenta los cromosomas 1 y 2 de la cepa ORR (resistente a DDT). El marcador dominante Rst (2) DDT está localizado en el cromosoma 2 a 65 unidades de mapa (2-65) y provoca la expresión alta de los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2 (Graf *et al.*, 1998). Recientemente se demostró la



expresión alta, pero no constitutiva de los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2* en la cepa Oregon-flare de *D. melanogaster* (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010).

Con estas cepas se realizan en SMART en ala, dos cruza: la cruza estándar (CE) (hembras vírgenes flare con machos *mwh*) (Graf *et al.*, 1989) y la cruza de bioactivación elevada (CBE) (hembras vírgenes Oregon-flare con machos *mwh*) (Graf y Van Schaik, 1992).

En la CE se producen dos tipos de descendientes: trans-heterocigotos *mwh* *+/+* *flr*³ con alas de tipo silvestre y heterocigotos *mwh* *+/* TM3, *Bd*^s con alas de fenotipo *Beaded Serratia*; la CBE produce dos tipos de descendientes: trans-heterocigotos ORR(1); ORR(2); *mwh* *+/+* *flr*³ con alas de fenotipo silvestre y heterocigotos ORR(1); ORR(2); *mwh* *+/* TM3, *Bd*^s con alas de fenotipo *Beaded Serratia*.

1.8. Dimetilnitrosamina (DMN)

El compuesto químico DMN (Figura 12) se utiliza como disolvente industrial para fibras y plásticos, suavizante para copolímeros, aditivo para lubricantes y para condensadores eléctricos, se utiliza en la síntesis de 1,1-dimetilhidrazina y como combustible para cohetes (IARC, 1972).

En investigación experimental la DMN se emplea como testigo positivo en pruebas de genotoxicidad, ya que actúa como agente alquilante monofuncional indirecto (tiene que ser activado por los Cyp450s) y ha mostrado propiedades mutagénicas y cancerígenas en diferentes especies de animales y tejidos (Vogel, 1991; IARC, 1972). Por ejemplo, en ratones tratados con 10 ppm de [¹⁴C]DMN, se encontró que genera alquilaciones 7-metilguanina (7-meG) en el DNA (Den Engelse y Emmelot, 1972), mientras que en hepatocitos de rata indujo rompimientos de cadena del DNA (Mendoza-Figueroa *et al.*, 1983).



En la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* la DMN ha demostrado ser genotóxica (Castañeda-Partida *et al.*, 2011; Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996; Graf *et al.*, 1984), y también se ha comprobado que en la activación metabólica de este promutágeno participan los Cyp450s, como lo reportó Castañeda-Partida y colaboradores (2011) al encontrar diferencias entre las CE y CBE de esta prueba; también demostrado por el aumento de la genotoxicidad de la DMN con el tratamiento previo con Fenobarbital, inductor de las enzimas Cyp450, en *D. melanogaster* (Hällström *et al.*, 1982) y en hepatocitos de rata (Mendoza-Figueroa *et al.*, 1983).

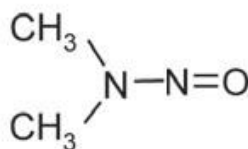


Fig. 12. Estructura química de la Dimetilnitrosamina
(Tomada de innovayemprendealimentos.blogspot.com).

2. Hipótesis

Debido a los reportes previos de toxicidad de los compuestos derivados de la quinazolina, se espera que el GHPM sea tóxico y genotóxico en el SMART en ala de *D. melanogaster*, mientras que se espera que estos efectos no se presenten en el GHPMF por la sustitución del grupo metoxilo por un trifluoro.



3. Objetivo General

- Evaluar el efecto tóxico y genotóxico de los tripanocidas GHPM y GHPMF mediante las pruebas CL_{50} y SMART en ala de *D. melanogaster*.

3.1. Objetivos Particulares

- Delimitar la CL_{50} de los tripanocidas GHPM y GHPMF en las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*.
- Determinar la genotoxicidad de GHPM y GHPMF en las CE y CBE del SMART en ala de *D. melanogaster*.
- Inferir la participación de los Cyp450s en el metabolismo de GHPM y GHPMF, mediante las diferencias entre las CE y CBE.
- Definir y cuantificar los posibles metabolitos de GHPM y GHPMF, mediante HPLC.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Químicos

- ❖ EtOH, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, peso molecular 46.07 g/mol, No. CAS 64-17-5 (Marca Fermont, Productos Químicos Monterrey, MX).
- ❖ Dimetilnitrosamina (DMN), $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$, peso molecular 74.1 g/mol, No. CAS 62-75-9 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).
- ❖ Tripanocidas: N^6 -[4-(metoxibencil)quinazolin-2,4,6-triamina (GHPM), peso molecular 295.143 g/mol y N^6 -[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolin-2,4,6-triamina (GHPMF), peso molecular 349.115 g/mol, sintetizados y donados por el Dr. Francisco Hernández Luis del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.
- ❖ Medio Instantáneo para *Drosophila* (DIM) (Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C. USA).
- ❖ Hojuela de papa Maggi® (Walmart, MX).
- ❖ Propil parabeno (Tegosept), $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOC}_3\text{H}_7$, peso molecular 180.2 g/mol, CAS. 94-13-3 (Farmácia Paris, MX).
- ❖ Ácido propiónico, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$, peso molecular 74.08 g/mol, No. CAS 79-09-4 (Química Meyer, MX).
- ❖ MEtOH °HPLC (MeOH), CH_3OH , peso molecular 32.04 g/mol, No. CAS 67-56-1 (JT Baker, MX).



- ❖ Ácido fosfórico °HPLC, H_3PO_4 , peso molecular 98 g/mol, No. CAS 7664-38-2 (JT Baker, MX).
- ❖ Acetonitrilo °HPLC, C_2H_3N , peso molecular 41 g/mol, No. CAS 75-05-8 (JT Baker, MX).

4.1.2. Biológicos

- ❖ Cepas de *D. melanogaster*: Oregon-flare (ORR(1);ORR(2);*flr*³/TM3,*Bd*^s), flare (*flr*³/TM3,*Bd*^s) y multiple wing hairs (*mwh/mwh*) 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) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.
- ❖ Levadura fresca La Florida® (Casa del Pastelero, MX).



4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cultivo y propagación de cepas de *D. melanogaster*.

Las cepas Oregon-flare, flare y multiple wing hairs se cultivaron y propagaron en frascos de vidrio de 250 mL con 5 g de hojuela de papa y 20 mL de solución conservadora (5 mL de tegosept al 12% (EtOH) y 5 mL de ácido propiónico, aforados a 1 litro de agua), y los cultivos se incubaron a 25 °C y humedad relativa (HR) de 65 %.

4.2.2. Prueba CL₅₀ para el GHPM y GHPMF en las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*.

La prueba se realizó con las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster*, colocando 10 larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) en tubos con 0.5 g de DIM y 2 mL de GHPM o GHPMF. Para ambos tripanocidas se evaluaron las concentraciones 0, 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μ M del compuesto disuelto en EtOH 2%. Se realizaron tres experimentos independientes con 5 réplicas por concentración. Las larvas tratadas permanecieron en una incubadora a 25°C y 65 % HR hasta que emergieron los imagos. Posteriormente, se cuantificó la sobrevivencia de éstos y los datos se analizaron estadísticamente con ANOVA factorial utilizando el paquete de cómputo Minitab versión 15.

4.2.2.1. Análisis estadístico

4.2.2.1.1. Análisis de Varianza para un diseño experimental con dos factores (ANOVA Factorial)

Este tipo de análisis se utiliza cuando nos interesa evaluar el efecto de dos o más factores (con varios tratamientos o niveles), sobre una determinada variable de respuesta o dependiente.



Hipótesis

En este diseño experimental con dos factores cualesquiera (A y B) se deberá probar si existe o no interacción entre ellos. Por tanto, los juegos de hipótesis son los siguientes:

- a) Hipótesis nula (H_0): no existe efecto del factor A sobre la variable de respuesta.
Hipótesis alterna (H_a): sí existe efecto del factor A sobre la variable de respuesta.
- b) H_0 : no existe efecto del factor B sobre la variable de respuesta.
 H_a : sí existe efecto del factor B sobre la variable de respuesta.
- c) H_0 : no existe interacción entre los factores A y B.
 H_a : sí existe interacción entre los factores A y B.

4.2.2.1.2. Prueba de Fisher o de la diferencia mínima significativa (LSD)

La comparación múltiple de medias se realiza exclusivamente cuando en el ANOVA, la H_0 es rechazada, y sirve para determinar cuál o cuáles pares de medias son las que difieren significativamente.

Hipótesis

- 1) Nula (H_0): $M_x \neq M_y < LSD$
- 2) Alternativa (H_a): $M_x \neq M_y > LSD$

Dónde:

$M_x \neq M_y$ = La diferencia entre las medias de cada tratamiento experimental.

LSD = valor de la diferencia mínima significativa.

(Durán *et al.*, 2004).



4.2.3. SMART en ala de *D. melanogaster* para GHPM y GHPMF

4.2.3.1. Cruzas estándar (CE) y bioactivación elevada (CBE)

Se realizó la CE con hembras vírgenes flare y machos multiple wing hairs y la CBE con hembras vírgenes Oregon-flare y machos multiple wing hairs. Cada cruce se trasladó a frascos con levadura fresca activa suplementada con sacarosa para colectar huevos, durante 8 h a 25 °C y 65 % de HR. Terminado este tiempo las moscas adultas fueron retiradas y los frascos con la colecta de huevos se mantuvieron en incubación. Después de 72 ± 4 h se recuperaron las larvas diluyendo el medio de levadura en agua corriente a temperatura ambiente usando una coladera de malla fina de acero inoxidable.

4.2.3.2. Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por tratamiento colocando aproximadamente la misma cantidad de larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) en viales con 0.5 g de DIM más 2 mL de las soluciones para los tratamientos: GHPM o GHPMF a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μ M, agua como testigo negativo y disolvente de la DMN, EtOH 2% como testigo disolvente de los tripanocidas, y DMN 76 μ M como testigo positivo, Ver Cuadro 2. Las larvas fueron expuestas a un tratamiento crónico de ~ 48 h.

Las larvas tratadas permanecieron en la incubadora hasta que emergieron como imagos, estos se colectaron y conservaron en EtOH 70 %, posteriormente se disectaron las alas de los organismos trans-heterocigotos ($mwh\ flr^{3+}/mwh^+\ flr^3$) y se montaron en preparaciones permanentes con la resina Entellan®. Se revisaron a 40x las superficies dorsal y ventral de las alas de un mínimo de 55 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptimo), registrando la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y gemelas de acuerdo con Graf *et al.* (1984). La lectura se realizó bajo estricta clave para evitar prejuicios en la revisión. Para identificar las



diferencias estadísticas de las frecuencias de manchas entre el testigo negativo y los tratamientos experimentales se emplearon las pruebas Kastenbaum-Bowman y la prueba U de Mann-Whitney, con $p \leq 0.05$; y para reconocer diferencias estadísticas entre las frecuencias acumuladas de las distribuciones de tamaño de clones *mwh* se usaron las pruebas Kolmogorov-Smirnov (KS) y Wald-Wolfowitz (W-W), ambas con $p \leq 0.05$.

Cuadro II. Distribución de los tratamientos crónicos (~48 h).

Testigos y tratamientos	Compuesto concentración	GHPM	GHPMF	Agua miliQ	EtOH 2%	DMN
Testigo negativo	Agua			+		
Testigo disolvente	EtOH 2%				+	
Testigo positivo	DMN 76 μ M			+		+
Tratamiento 1	GHPM 2 μ M	+			+	
Tratamiento 2	GHPM 4 μ M	+			+	
Tratamiento 3	GHPM 8 μ M	+			+	
Tratamiento 4	GHPM 16 μ M	+			+	
Tratamiento 5	GHPMF 2 μ M		+		+	
Tratamiento 6	GHPMF 4 μ M		+		+	
Tratamiento 7	GHPMF 8 μ M		+		+	
Tratamiento 8	GHPMF 16 μ M		+		+	

Dónde: + significa presente

4.2.3.2.1. Análisis estadístico

4.2.3.2.1.1. SMART para PC-versión 2.1

El programa SMART analiza estadísticamente las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos del testigo y las series de tratamientos experimentales. El análisis está basado en la prueba Kastenbaum-Bowman, a $p < 0.05$ y el efecto genotóxico es diagnosticado porque la frecuencia de manchas de los tratamientos es al menos el doble de la frecuencia obtenida en los testigos



negativos. Para manchas pequeñas y totales el factor de multiplicación es $m = 2$ y para manchas grandes y gemelas $m = 5$.

La prueba Kastenbaum-Bowman, maneja la probabilidad de definir un riesgo genotóxico mínimo como inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente; es decir, que en los casos no concluyentes no se puede excluir la hipótesis nula pero tampoco la alterna. Por lo anterior, los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos, negativos, débiles positivos y no concluyentes. Para evitar los resultados no concluyentes en al menos 95 % de los casos se recomienda revisar como mínimo 110 alas (55 individuos) por tratamiento (Frei y Würigler, 1995). De esta manera las hipótesis que se trabajaron fueron:

Hipótesis

- 1) Nula (H_0): la frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es mayor que la frecuencia de mutación espontánea del testigo negativo.
- 2) Alterna (H_a): la frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es menor que la frecuencia de mutación espontánea del testigo negativo.

Cada hipótesis fue probada con $P < 0.05$. Con base en las hipótesis pueden ser posibles las siguientes decisiones:

- 1) Aceptar ambas hipótesis: resultado no concluyente.
- 2) Aceptar la primera hipótesis y rechazar la segunda: resultado negativo.
- 3) Rechazar la primera hipótesis y aceptar la segunda: resultado positivo.
- 4) Rechazar ambas hipótesis: efecto débil (Graf *et al.*, 1984).



4.2.3.2.1.2. Prueba U de Mann-Whitney

La prueba U es una de las alternativas a la prueba *t*-Student para comparar dos muestras independientes; se utiliza cuando se requiere conocer si dos poblaciones tienen la misma distribución de probabilidades, o bien, si tienen la misma mediana. Considera la variabilidad entre los individuos y no requiere que la distribución de los datos sea normal (prueba no paramétrica), puede estar basada en hipótesis unilateral o bilateral, por lo que se dice que puede realizarse con modificaciones para dos colas:

Hipótesis unilateral:

- 3) Nula (H_0): $M_x \geq M_y$
- 4) Alternativa (H_a): $M_x < M_y$

Hipótesis unilateral:

- 5) Nula (H_0): $M_x \leq M_y$
- 6) Alternativa (H_a): $M_x > M_y$

Hipótesis bilateral:

- 7) Nula (H_0): $M_x = M_y$
- 8) Alternativa (H_a): $M_x \neq M_y$

Dónde:

M = La distribución de probabilidades o la mediana de una población.

x= Testigo

y = Tratamiento experimental

La prueba U se usa cuando no se puede definir el riesgo genotóxico mínimo inaceptable basándose en la frecuencia de las manchas en los testigos negativos; por lo tanto sólo se comparan los datos contra la hipótesis nula. Los resultados son significativos o no significativos. La ausencia de significancia nos dice que uno



no puede concluir que el tratamiento produjo un efecto genotóxico, sin embargo no se puede eliminar completamente esta posibilidad, por lo tanto es lo mismo que un resultado no concluyente. Los resultados significativos nos permiten concluir con certeza que los resultados son positivos (Frei y Würzler, 1995). La prueba se realizó con el programa estadístico STAT Graphics versión 6.0.

4.2.3.2.1.3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S)

En la prueba K-S se hace un procedimiento de “bondad de ajuste”, que permite medir el grado de concordancia que existe entre la distribución del conjunto de datos y una distribución teórica específica. Su objetivo es señalar si los datos provienen de una población con distribución teórica específica. El procedimiento consiste en establecer frecuencias relativas acumuladas referentes a la información muestral $F_o(x_i)$ y compararlas con las teóricas (García Bellido *et al.*, 2010).

4.2.3.2.1.4. Prueba Wald-Wolfowitz (W-W)

La prueba W-W se utiliza cuando se desea hacer inferencias sobre dos poblaciones independientes. Mediante esta prueba se determina si las dos poblaciones difieren, en alguna medida de tendencia central, de dispersión o en su distribución de probabilidad.

Para ambas pruebas (K-S y W-W) tenemos las siguientes hipótesis

- 1) Nula (H_0): la distribución de las probabilidades de la variable de respuesta en las dos poblaciones es la misma, $F_A(x) = F_B(x)$. Si la hipótesis se cumple quiere decir que las dos poblaciones son iguales con respecto a la característica que se está comparando.



- 2) Alternativa (Ha): La distribución de probabilidades de las dos poblaciones es diferente, $FA(x) \neq FB(x)$, por lo que las dos poblaciones difieren significativamente (Durán *et al.*, 2004).

4.2.4. Análisis HPLC de moscas tratadas con GHPM o GHPMF

Se realizó una cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) para determinar la remanencia de GHPM o GHPMF en moscas adultas de cada tratamiento 2, 4, 8 y 16 μM para las cepas flare y Oregon-flare o de sus metabolitos. 150 moscas adultas (hembras y machos) emergidas de cada tratamiento fue homogenizada en 500 μL de MeOH ($^{\circ}\text{HPLC}$) y centrifugadas (Eppendorff 5415C) a 14,000 rpm por 10 min. Como patrones se usaron: GHPM a la concentración 40 μM , GHPMF a los 28 μM y MeOH 99% ($^{\circ}\text{HPLC}$). Se analizaron 30 μL de cada patrón y tratamiento con una unidad HPLC Hewlett-Packard serie 1100 USA y una columna Allsphere ODS-1 (longitud 250 X 2 mm, tamaño de partícula 5 μm) marca Grace. La fase móvil fue una mezcla de 25 % ácido fosfórico 0.005 %, 50 % MeOH y 25 % acetonitrilo. El índice de flujo fue de 1 mL/min durante 18 min. La detección se llevó a cabo con un detector con arreglo de diodos HP marca Agilent Technologies, serie 1100, USA. Los datos fueron procesados con el software LC 3D Chemstation, USA. La identificación de los compuestos presentes se hizo: comparando el comportamiento cromatográfico, tiempo de retención y espectro UV-VIS, con los de los patrones en el rango de 200 - 400 nm.



5. Resultados

5.1. Prueba de toxicidad (CL₅₀)

5.1.1. CL₅₀ del tripanocida GHPM

Con los resultados de la prueba CL₅₀ se realizó un ANOVA factorial, con un nivel $p < 0.05$, en el que se calcularon las medidas descriptivas: media, desviación estándar (δ), valor mínimo, cuartil 1 (Q1), mediana, cuartil 3 (Q3) y valor máximo de los siguientes parámetros: a) comparación de los tratamientos con GHPM 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2% y el testigo EtOH 2%, b) comparación de las cepas (flare y Oregon-flare) y c) interacción concentración-cepa. No se encontraron diferencias significativas entre los experimentos independientes (datos no mostrados), por lo que se trabajó sólo con las medias de éstos.

5.1.1.1. Comparación de los tratamientos GHPM vs EtOH 2%

A) Estadística descriptiva

Los resultados de mortalidad de los tratamientos con GHPM 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2%, mostraron que las medias de todos los tratamientos GHPM son similares entre sí, y son diferentes con respecto al testigo EtOH 2%, además existe una gran dispersión en los datos (Cuadro III). Las mortalidades más altas se observaron a las concentraciones 31 y 508 μM de GHPM, con valores de 53.33 y 51.67 %, respectivamente.



Cuadro III. Medidas descriptivas por tratamiento del porcentaje de mortalidad de Drosophilas expuestas a GHPM.

Tratamiento (μM)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	13.73	12.3	0	0	10	20	50
1.9	43.67	31.68	0	17.5	40	62.5	100
3.9	37.67	32.87	0	10	25	62.5	100
7.9	46.67	34.57	0	17.5	40	80	100
15.8	39	22.64	10	20	30	60	90
31.7	53.33	23.83	10	30	55	70	100
63.5	49.67	21.73	20	30	50	70	100
127	39	24.12	0	20	40	52.5	90
254	43.67	27.23	0	27.5	40	60	100
508	51.67	26.14	0	30	60	70	100

B) Estadística inferencial

El ANOVA mostró que hubo diferencias significativas entre los tratamientos GHPM con respecto al testigo EtOH 2% ($F=9.8$, $p=0.000$). El análisis LSD de Fisher $p \leq 0.05$ demostró que todos los tratamientos GHPM son estadísticamente diferentes al testigo EtOH 2%.



5.1.2.2. Diferencias entre las cepas (flare y Oregon-flare)

A) Estadística descriptiva

La comparación de los porcentajes de mortalidad de las cepas flare y Oregon-flare muestran medias similares, aunque existe una gran dispersión en sus datos (Cuadro IV y Figura 13). La mortalidad media para la cepa flare fue de 35.21 % y para Oregon-flare de 43.48 %.

Cuadro IV. Medidas descriptivas por cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de las cepas flare y Oregon-flare expuestas a GHPM.

Cepa	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
Flare	35.21	29.1	0	10	30	60	100
Oregon-flare	43.48	26.87	0	20	40	60	100

B) Estadística inferencial

El ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre las dos cepas ($F=8.04$, $p=0.005$).

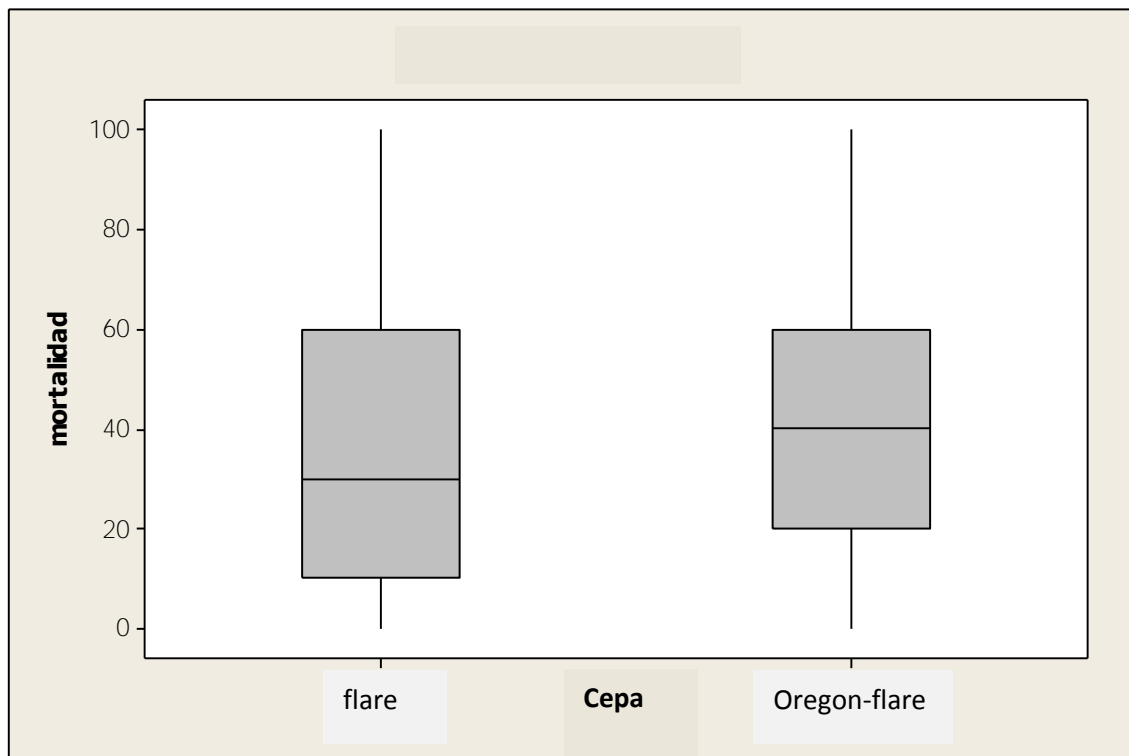


Figura 13. Porcentaje de mortalidad para las cepas flare y Oregon-flare tratadas con GHPM. Las cajas muestran la relación entre Q1, mediana y Q3, que representa 50 % del total de datos analizados, los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos obtenidos.

5.1.1.3. Interacción concentración-cepa

5.1.1.3.1. Cepa flare

A) Estadística descriptiva

Los resultados de mortalidad de los tratamientos de GHPM 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2% para la cepa flare, mostraron que las medias de todos los tratamientos GHPM son similares entre sí, y son diferentes con respecto al testigo EtOH 2%, además existe una gran dispersión en los datos (Cuadro V). Las mortalidades más altas se observaron a las concentraciones 63.5 y 508 μM de GHPM, con valores de 50 y



56.67 %, respectivamente (Figura 14). Debido a que no hubo una relación concentración-respuesta y a que no se alcanzó a ninguna concentración el 100 % de mortalidad, no pudo ser definida una CL_{50} .

Cuadro V. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa flare expuestas a GHPM.

Tratamiento (μ M)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	9	8.45	0	0	10	12.5	30
1.9	30.67	30.81	0	0	20	60	90
3.9	38	40	0	10	20	80	100
7.9	36	38.32	0	0	20	70	100
15.8	34.67	20.31	10	20	30	60	70
31.7	47.33	20.86	20	30	40	70	80
63.5	50	25.63	20	30	50	80	100
127	41.33	25.88	0	20	40	60	90
254	34.67	24.16	0	20	30	40	100
508	56.67	23.8	0	30	60	70	90

5.1.1.3.2. Cepa Oregon-flare

A) Estadística descriptiva

Los resultados de mortalidad de los tratamientos con GHPM 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μ M disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2% para la cepa Oregon-flare, mostraron que las medias de todos los tratamientos GHPM son similares entre sí, y son diferentes con respecto al testigo EtOH 2%, además existe una gran dispersión en los datos (Cuadro VI). Las mortalidades más altas se observaron a las concentraciones 7.9 y 31.7 μ M de GHPM, con valores de 57.67 y 59.33 %, respectivamente (Figura 14).



Debido a que no hubo una relación concentración-respuesta y a que no se alcanzó a ninguna concentración el 100 % de mortalidad, no pudo ser definida una CL_{50} .

Cuadro VI. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de *Drosophilas* de la cepa Oregon-flare expuestas a GHPM.

Tratamiento (μ M)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	18.62	13.82	0	10	20	25	50
1.9	56.67	27.69	10	40	60	70	100
3.9	37.33	25.2	0	20	30	60	90
7.9	57.33	27.64	10	30	60	80	100
15.8	43.33	24.69	10	20	30	60	90
31.7	59.33	25.76	10	40	60	80	100
63.5	49.33	17.92	20	40	50	70	80
127	36.67	22.89	10	20	30	40	90
254	52.67	27.89	10	30	50	80	100
508	46.67	28.20	20	20	40	70	100

5.1.1.3.3. Estadística inferencial de la interacción concentración-cepa

El ANOVA mostró que no hubo diferencias significativas entre la interacción concentración-cepa ($F=1.68$, $p=0.092$). Sin embargo, el análisis LSD de Fisher $p \leq 0.05$ demostró que todos los tratamientos GHPM son estadísticamente diferentes al testigo EtOH 2% para ambas cepas, y que también existen diferencias entre las concentraciones 1.9, 7.9 y 254 μ M entre las cepas (Figura 14).

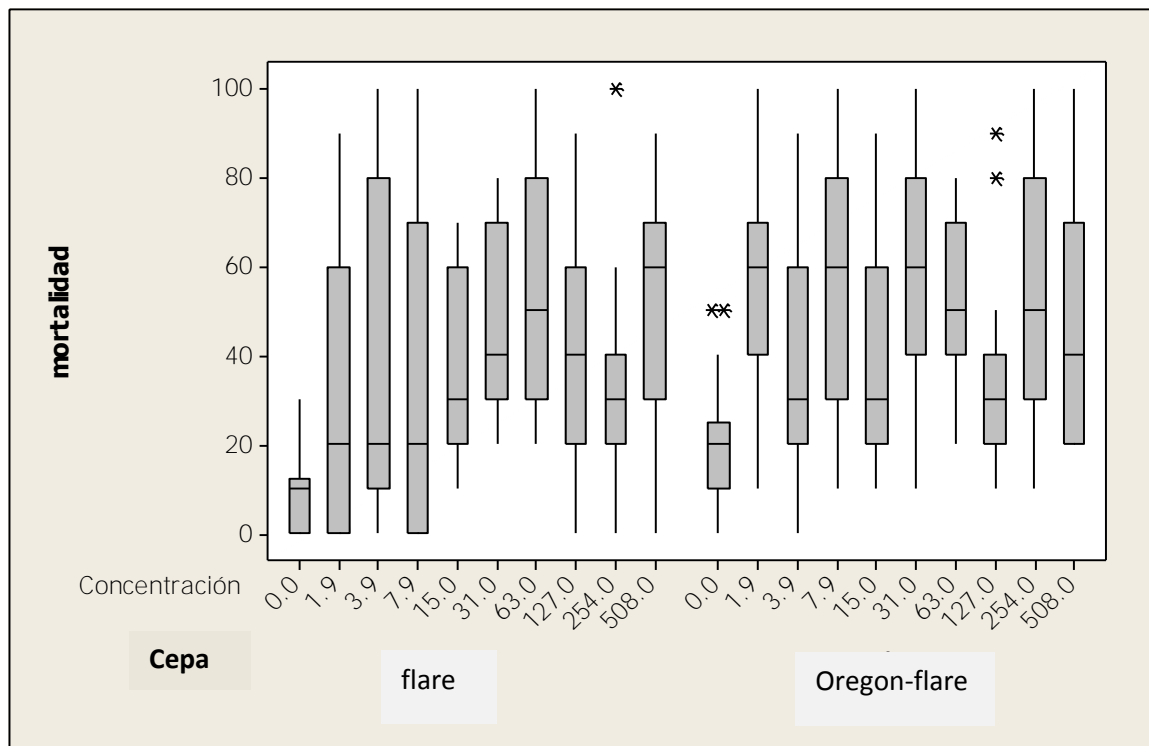


Figura 14. Porcentaje de mortalidad en la interacción concentración-cepa de los tratamientos con GHPM. Las cajas muestran la relación entre Q1, mediana y Q3, que representa el 50 % del total de datos analizados, los extremos de las cepas son los valores máximos y mínimos obtenidos y el * datos fuera de rango.



5.1.2. CL₅₀ del tripanocida GHPMF

Se realizó un ANOVA factorial, con un nivel $p < 0.05$, en el que se calcularon las medidas descriptivas: media, desviación estándar ($\bar{\sigma}$), valor mínimo, cuartil 1 (Q1), mediana, cuartil 3 (Q3) y valor máximo de los siguientes parámetros: a) tratamientos de GHPMF 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2%; b) cepas (flare y Oregon-flare); c) interacción concentración-cepa. No se encontraron diferencias significativas entre los experimentos independientes (datos no mostrados), por lo que se trabajaron sólo las medias de éstos.

5.1.2.1. Comparación de los tratamientos GHPMF vs EtOH 2%

A) Estadística descriptiva

Los resultados de mortalidad de los tratamientos con GHPMF a las concentraciones 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2%, mostró que sólo las medias de los tratamientos GHPMF 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM son similares entre sí y con respecto al testigo EtOH 2%, mientras que a las concentraciones 1.9, 3.9 y 7.9 μM presentaron una mayor mortalidad (Cuadro VII). Las mortalidades más altas se observaron a las concentraciones 7.9 y 31.7 μM de GHPMF, con valores de 46.18 y 51.25 %, respectivamente.



Cuadro VII. Medidas descriptivas por tratamiento del porcentaje de mortalidad de Drosophilas expuestas a GHPMF.

Tratamiento (μM)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	16.11	12.25	0	10	10	27.5	40
1.9	46.18	20.75	0	30	50	62.5	80
3.9	51.25	17.37	20	40	50	60	90
7.9	40.26	18.08	10	30	40	50	80
15.8	7.78	8.78	0	0	10	10	30
31.7	12.78	13.2	0	0	10	20	50
63.5	10.56	11.62	0	0	10	20	40
127	10.56	9.98	0	0	10	20	30
254	15.56	16.17	0	0	10	30	50
508	8.89	9.63	0	0	10	10	40

B) Estadística inferencial

El ANOVA mostró que hubo diferencias significativas entre los tratamientos GHPMF con respecto al testigo EtOH 2% ($F=33.77$, $p=0.000$). El análisis LSD de Fisher $p \leq 0.05$ demostró que sólo los tratamientos GHPMF a las concentraciones 1.9, 3.9 y 7.9 μM fueron estadísticamente diferentes al testigo disolvente.



5.1.2.2. Diferencias entre las cepas (flare y Oregon-flare)

A) Estadística descriptiva

La comparación de los porcentajes de mortalidad de las cepas flare y Oregon-flare mostraron medias similares, aunque existió una gran dispersión en sus datos (Cuadro VIII y Figura 15). La mortalidad media para la cepa flare fue de 22.77 % y para Oregon-flare de 30.08 %.

Cuadro VIII. Medidas descriptivas por cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de las cepas flare y Oregon-flare expuestas a GHPMF.

Cepa	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
flare	22.3	21.77	0	0	10	40	80
Oregon-flare	30.08	22.72	0	10	30	50	90

B) Estadística inferencial

El ANOVA generó diferencias significativas entre las dos cepas ($F=12.01$, $p=0.001$) como se muestra en la Figura 15. A pesar de la gran dispersión de los datos se reconoce la marcada diferencia que existe entre las medianas de ambas cepas.

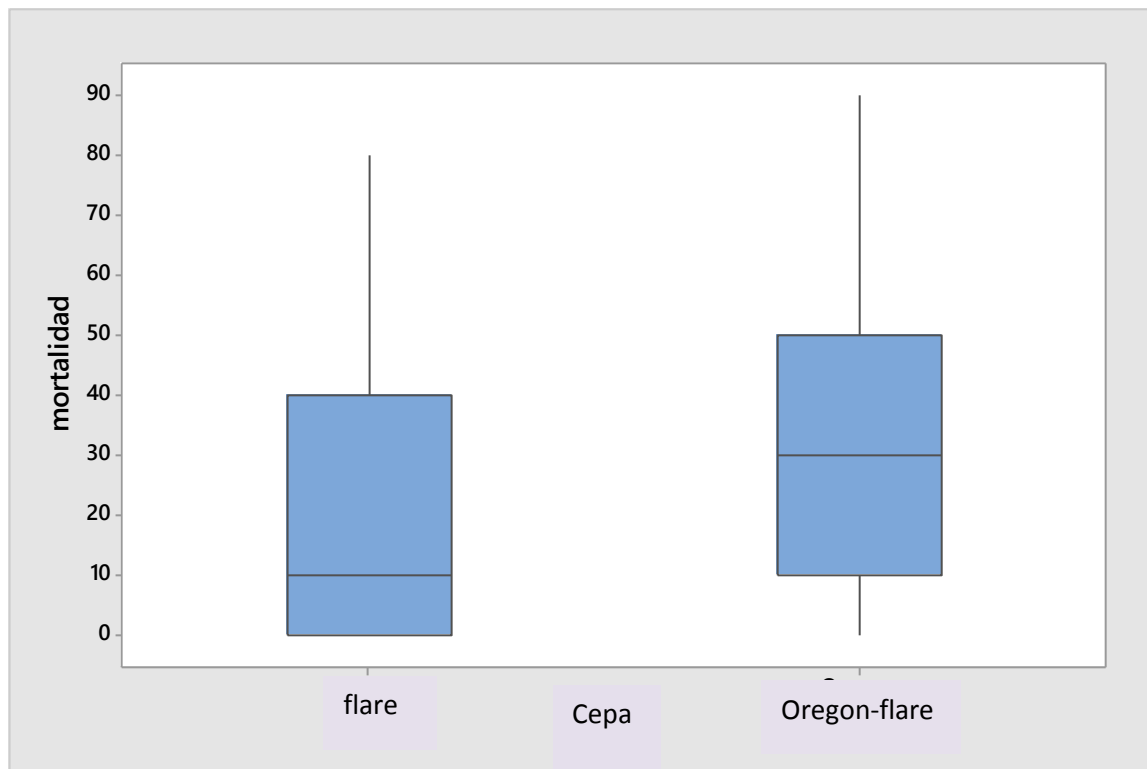


Figura 15. Porcentaje de mortalidad para las cepas flare y Oregon-flare tratadas con GHPMF. Las cajas muestran la relación entre Q1, mediana y Q3, que representa el 50 % del total de datos analizados, los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos obtenidos.

5.1.2.3. Interacción concentración-cepa

5.1.2.3.1. Cepa flare

A) Estadística descriptiva

En la cepa flare los resultados de mortalidad de los tratamientos de GHPMF 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2% mostraron que sólo las medias de los tratamientos GHPMF a las concentraciones 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM son similares entre sí y con respecto al testigo EtOH 2%, mientras que las concentraciones 1.9, 3.9 y 7.9 μM presentan una mayor mortalidad (Cuadro IX). Las mortalidades más altas se



observaron a las concentraciones 1.9 y 3.9 μM de GHPMF, con valores de 44 y 46.67 %, respectivamente (Figura 16). Debido a que no hubo una relación concentración-respuesta y a que no se alcanzó a ninguna concentración el 100 % de mortalidad, no pudo ser definida una CL_{50} .

Cuadro IX. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa flare expuestas a GHPMF.

Tratamiento (μM)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	14.21	10.17	0	10	10	20	40
1.9	44	24.14	0	30	50	70	80
3.9	46.67	13.97	20	40	50	60	60
7.9	37.37	19.39	10	20	40	50	80
15.8	3.33	5	0	0	0	10	10
31.7	7.78	8.33	0	0	10	15	20
63.5	4.44	7.26	0	0	0	10	20
127	7.78	8.33	0	0	10	15	20
254	11.11	13.64	0	0	10	20	40
508	7.78	4.41	0	5	10	10	10

5.1.2.3.2. Cepa Oregon-flare

A) Estadística descriptiva

En la cepa Oregon-flare los resultados de mortalidad de los tratamientos de GHPMF 1.9, 3.9, 7.9, 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM disueltos en EtOH 2%, y el testigo EtOH 2% mostraron que sólo las medias de los tratamientos GHPMF a



las concentraciones 15.8, 31.7, 63.5, 127, 254 y 508 μM son similares entre sí y con respecto al testigo EtOH 2% (Cuadro X). Las mortalidades más altas se observaron a las concentraciones 1.9 y 3.9 μM de GHPMF, con valores de 47.89 y 55.29 %, respectivamente (Figura 16). Debido a que no hubo una relación concentración-respuesta y a que no se alcanzó a ninguna concentración el 100 % de mortalidad, no pudo ser definida una CL_{50} .

Cuadro X. Medidas descriptivas por interacción tratamiento-cepa del porcentaje de mortalidad de Drosophilas de la cepa Oregon-flare expuestas a GHPM.

Tratamiento (μM)	Media	Desviación estándar (δ)	Valor Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor Máximo
EtOH 2%	18.24	14.25	0	5	20	30	40
1.9	47.89	18.13	20	30	50	60	70
3.9	55.29	19.4	20	40	60	70	90
7.9	43.16	16.68	10	30	40	50	80
15.8	12.22	9.72	0	5	10	20	30
31.7	17.78	15.63	0	5	20	25	50
63.5	16.67	12.25	0	10	10	25	40
127	13.33	11.18	0	0	20	20	30
254	20	18.03	0	5	10	35	50
508	10	13.23	0	0	10	15	40

5.1.2.3.3. Estadística inferencial de la interacción concentración-cepa

Aunque el ANOVA mostró que no hubo diferencias significativas entre la interacción concentración-cepa ($F=0.24$, $p=0.988$), el análisis LSD de Fisher $p \leq 0.05$ demostró que los tratamientos GHPMF 1.9, 3.9 y 7.9 μM son



estadísticamente diferentes al testigo EtOH 2% para ambas cepas y no se encontraron diferencias entre las cepas.

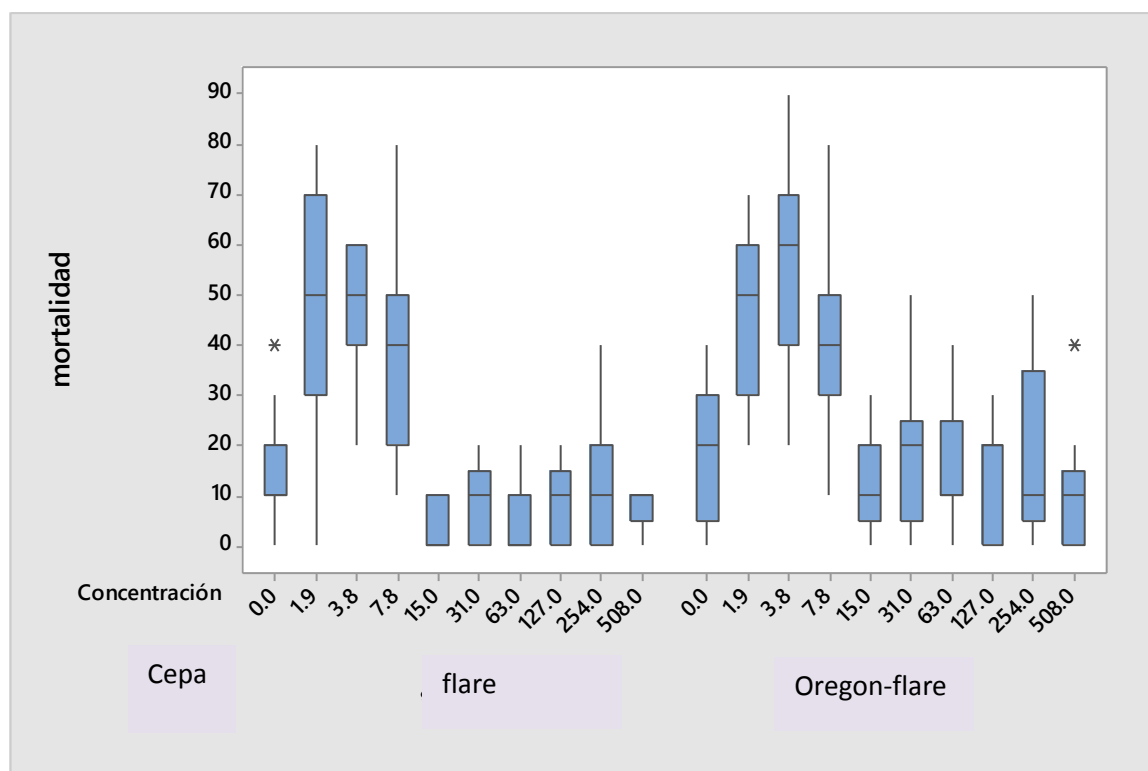


Figura 16. Porcentaje de mortalidad en la interacción concentración-cepas de los tratamientos con GHPMF. Las cajas muestran la relación entre Q1, mediana y Q3, que representa el 50 % del total de datos analizados, los extremos de las cepas son los valores máximos y mínimos obtenidos y el * datos fuera de rango.



5.2. Prueba de genotoxicidad SMART en ala de *D. melanogaster*

5.2.1. Cruza Estándar (CE)

En el Cuadro XI se muestran los resultados obtenidos con las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney, ambas a $p < 0.05$ (Frei y Würgler, 1988), donde se compararon las frecuencias y el número de manchas por individuo de cada uno de los tratamientos contra los testigos correspondientes. El análisis de la distribución de clones *mwh* se realizó con las pruebas Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald-Wolfowitz (W-W), ambas a $p < 0.05$, donde se compararon las distribuciones de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* de cada tratamiento contra los testigos correspondientes.

5.2.1.1. Testigos

La comparación de los testigos agua y EtOH 2%, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ningún tipo de mancha de estos testigos (Cuadro XI y Figura 17; para visualizar resultados estadísticos detallados vea también el Anexo 1-1), aunque hubo diferencias en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* (Figura 18; ver resultados estadísticos en el Anexo 2-1), lo que indica que el EtOH al 2% no fue genotóxico para *D. melanogaster*, aunque podría tener efectos de citotoxicidad.

Cuadro XI. Resultados del SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la cruce estándar de los tratamientos crónicos con GHPM o GHPMF 2, 4, 8, 16 μ M. Testigos negativos: EtOH 2 % y agua miliQ y testigo positivo: DMN 76 μ M.



Tratamiento	N° Ind	Diagnostico estadístico de manchas por individuo*											
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2			Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clon mwh	
A (agua vs testigos)													
Agua	60	0.65	(039)		0.17	(010)		0.05	(003)		0.87	(052)	52
EtOH 2 %	60	0.87	(052)	-	0.07	(004)	-	0.02	(001)	-	0.95	(057)	55
DMN 76 μ M	59	2.12	(125)	+	0.80	(047)	+	0.42	(025)	+	3.34	(197)	184
B (EtOH 2 % vs GHPM)													
EtOH 2 %	60	0.87	(052)		0.07	(004)		0.02	(001)		0.95	(057)	55
GHPM 2 μ M	60	0.80	(048)	-	0.10	(006)	-	0.03	(002)	-	0.93	(056)	55
GHPM 4 μ M	60	0.82	(049)	-	0.12	(007)	-	0.08	(005)	-	1.02	(061)	59
GHPM 8 μ M	60	0.73	(044)	-	0.03	(002)	-	0.00	(000)	-	0.77	(046)	46
GHPM 16 μ M	60	0.58	(035)	-	0.20	(012)	+	0.03	(002)	-	0.82	(049)	46
C (EtOH 2 % vs GHPMF)													
EtOH 2 %	60	0.87	(052)		0.07	(004)		0.02	(001)		0.95	(057)	55
GHPMF 2 μ M	60	0.63	(038)	-	0.10	(006)	-	0.07	(004)	-	0.80	(048)	44
GHPMF 4 μ M	60	0.67	(040)	-	0.07	(004)	-	0.02	(001)	-	0.75	(045)	43
GHPMF 8 μ M	60	0.70	(042)	-	0.07	(004)	-	0.07	(004)	-	0.83	(050)	47
GHPMF 16 μ M	60	0.58	(035)	-	0.08	(005)	-	0.07	(004)	-	0.73	(044)	43

*Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Würzler (1988, 1995). Pruebas estadísticas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney y Wilcoxon, ambas a $p < 0.05$. m = factor de Multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo.

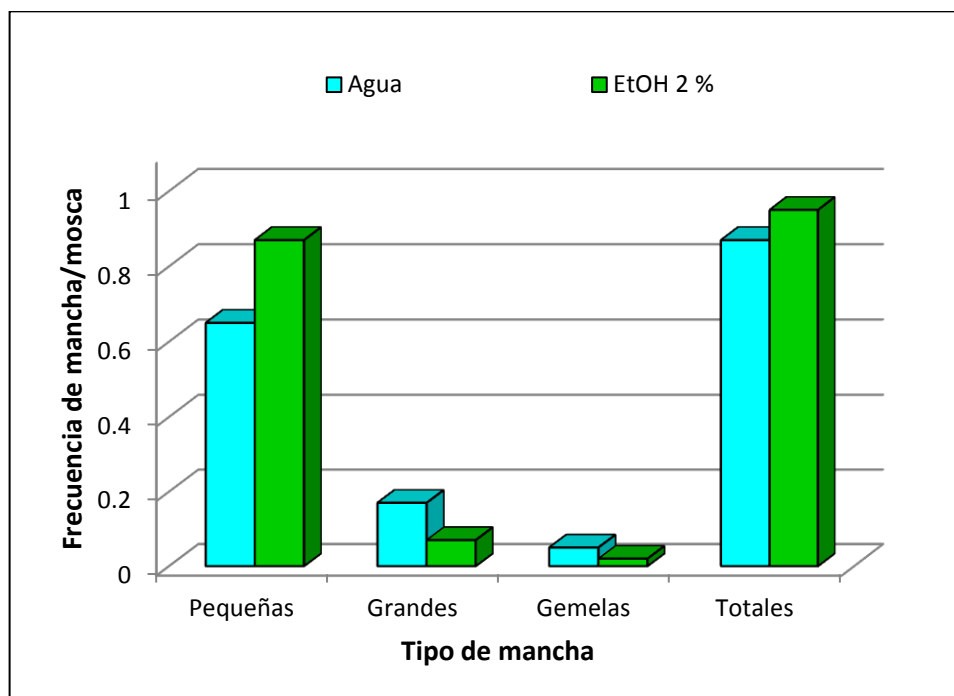


Figura 17. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para los testigos disolvente: agua y testigo negativo: EtOH 2%, CE.

Como se esperaba para un testigo positivo, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de todos los tipos de mancha al comparar la DMN (76 μ M) con el testigo agua (Cuadro XI, para visualizar resultados estadísticos detallados vea también el Anexo 1-2), así como diferencias en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* (resultados estadísticos en el Anexo 2-2).

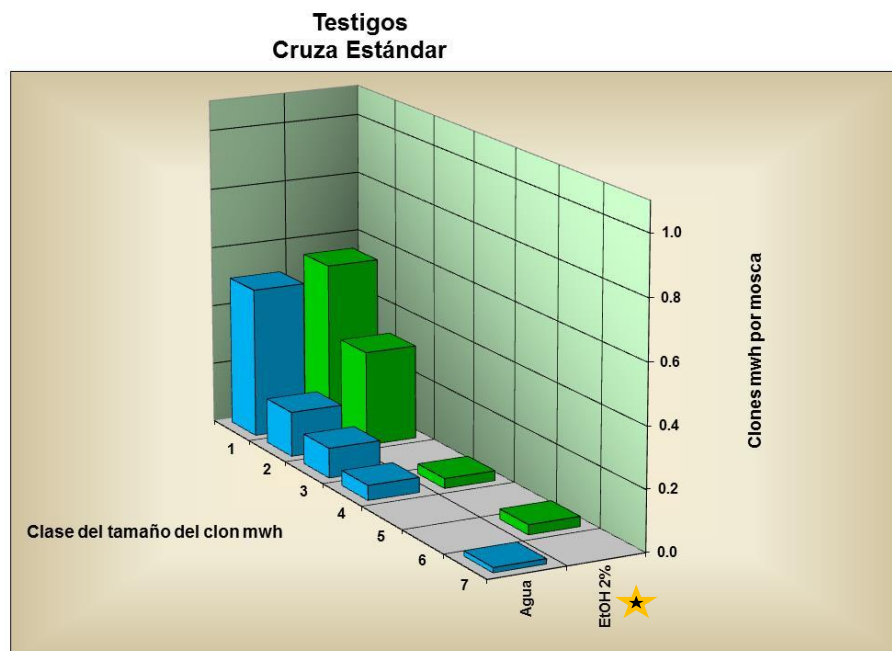


Figura 18. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los testigos, CE.

Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.2.1.2. Tratamientos con el tripanocida GHPM

En el Cuadro XI y Figura 19 se muestran los resultados de la comparación entre el testigo EtOH 2% con el tripanocida GHPM a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM . El estadístico del programa SMART mostró reducción significativa de la frecuencia de manchas pequeñas y aumento en manchas grandes a la concentración 16 μM con respecto al testigo EtOH 2%; sin embargo, la prueba U sólo mostró diferencias significativas en la comparación de manchas grandes (los resultados estadísticos detallados se muestran en el Anexo 1-6). Por otro lado, el GHPM a las concentraciones 8 y 16 μM alteró la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* (Figura 20; para visualizar resultados estadísticos detallados vea también los Anexos 2-5 y 2-6) con respecto al testigo negativo. Esto nos indica



que este compuesto es genotóxico para *D. melanogaster* y modifica la distribución de clones mwh aunque estos efectos no hayan sido dependientes de la concentración.

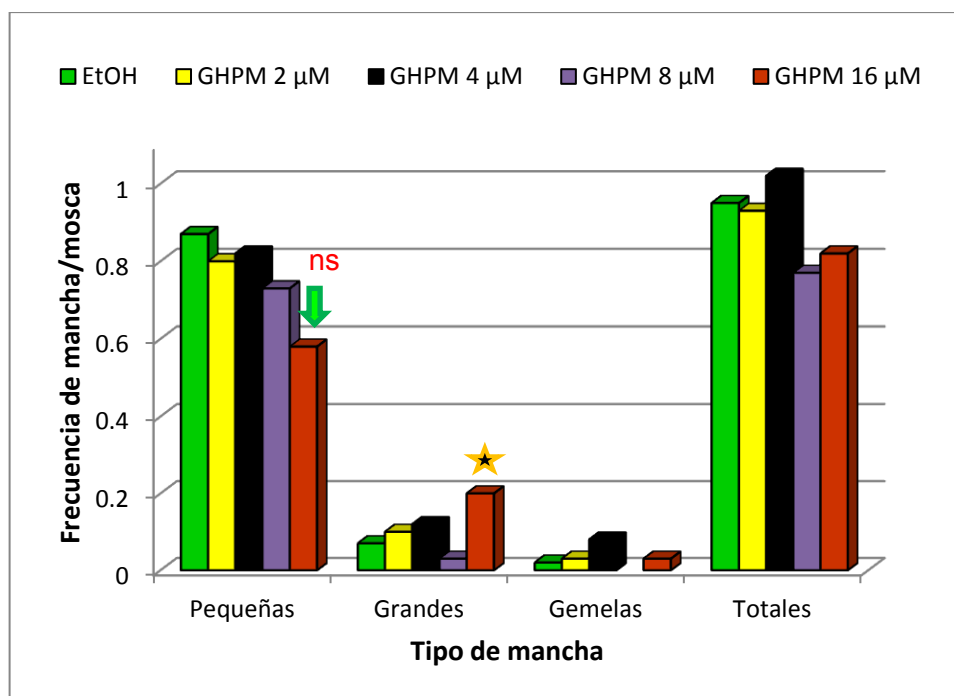


Figura 19. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para testigo negativo: EtOH 2% y tratamientos con GHPM 2, 4, 8 y 16 μ M, CE.

★ Aumento y ↓ reducción estadísticamente significativos según la prueba Kastenbaum-Bowman; y ns: sin significancia estadística con la prueba U de Mann-Whitney (ambas a $p < 0.05$).

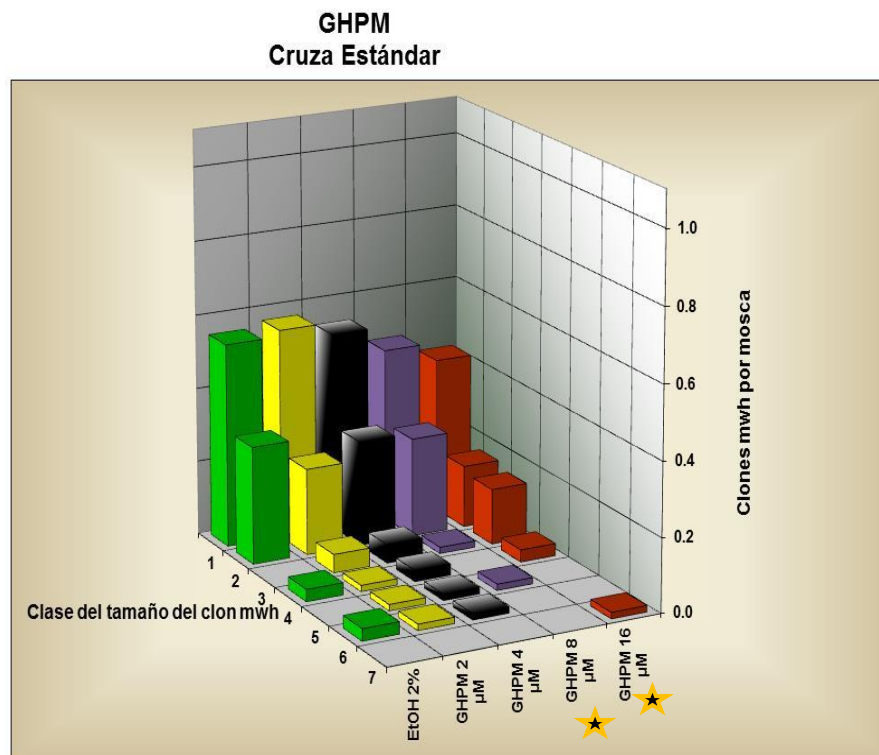


Figura 20. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los tratamientos GHPM, CE. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.2.1.3. Tratamientos con el tripanocida GHPMF

En el Cuadro XI y Figura 21 se muestra la comparación entre el testigo EtOH 2% contra el tripanocida GHPMF a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM . El programa SMART definió que existe reducción significativa de la frecuencia de manchas pequeñas a la concentración 16 μM , pero la prueba U no mostró significancia estadística (los resultados estadísticos detallados se muestran en los Anexos 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, respectivamente). Por otra parte, todas las concentraciones de GHPMF modificaron la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* (Figura 22; para visualizar resultados estadísticos detallados vea también los Anexos 2-7, 2-8, 2-9, 2-10) con respecto al testigo negativo. Este resultado junto



con el de la prueba CL_{50} nos indican que aunque el tripanocida GHPMF no es genotóxico para *D. melanogaster*, presenta un leve efecto tóxico.

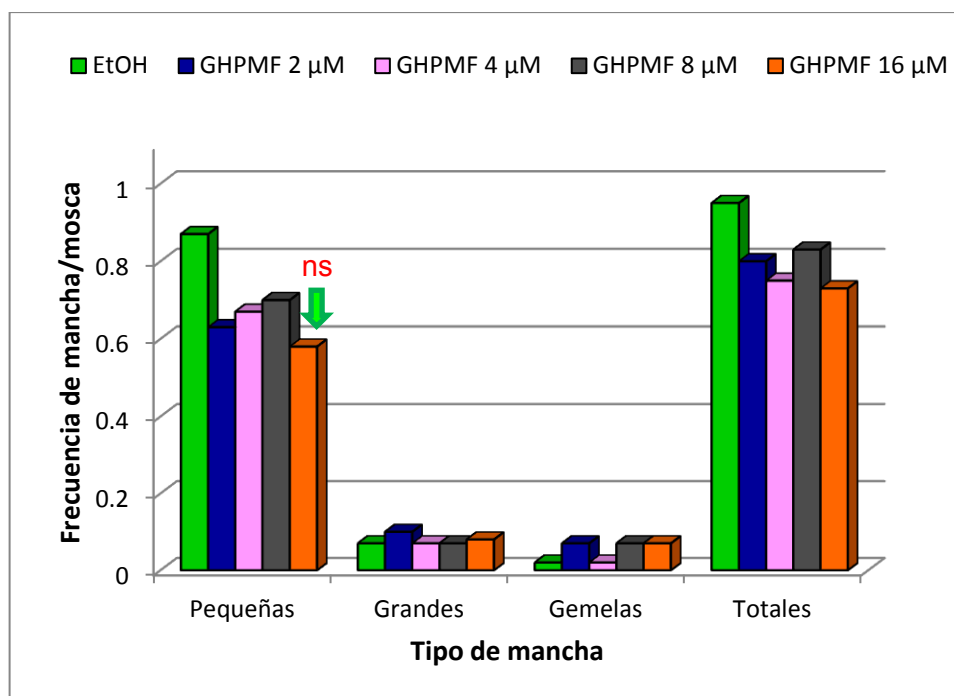


Figura 21. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ mosca para Testigo negativo: EtOH 2% y tratamientos con GHPMF 2, 4, 8 y 16 μ M, CE.

↓ Reducción estadísticamente significativa según la prueba Kastenbaum-Bowman; y **ns**: sin significancia estadística con la prueba U de Mann-Whitney (ambas a $p = 0.05$).

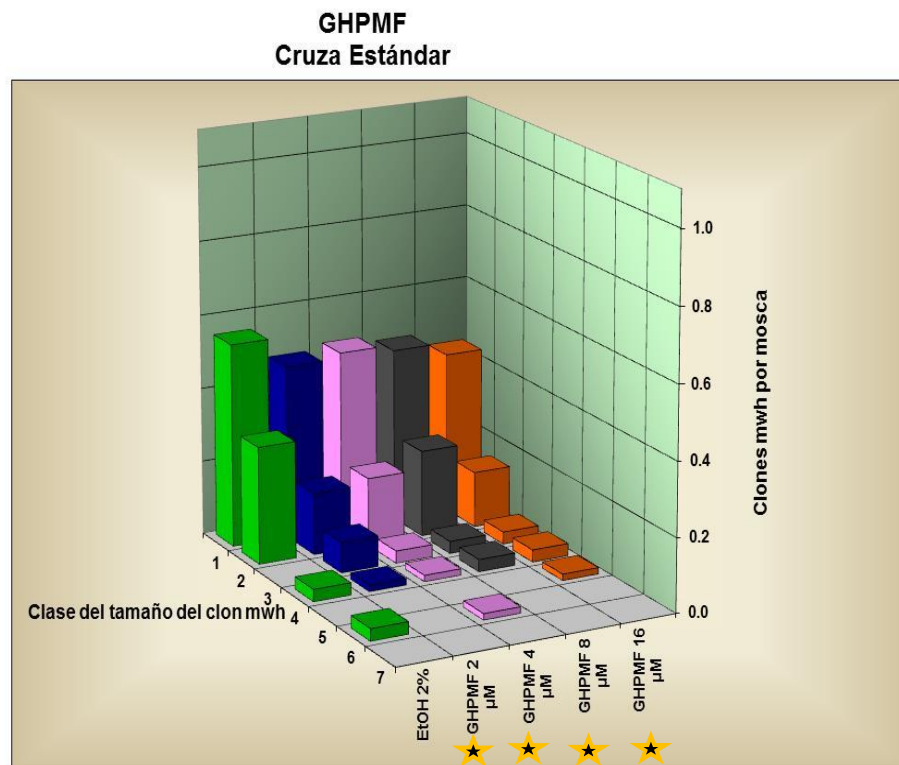


Figura 22. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los tratamientos GHPMF, CE. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.2.2. Cruza Bioactivación Elevada (CBE)

En el Cuadro XII se muestran los resultados obtenidos con el programa SMART para PC (basado en la prueba Kastenbaum-Bowman), y la prueba U de Mann-Whitney, ambas a $p < 0.05$ (Frei y Würzler, 1988) comparando las frecuencias y el número de manchas por individuo de cada uno de los tratamientos contra los testigos correspondientes. El análisis de la distribución acumulada de clones *mwh* se realizó con las pruebas Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald-Wolfowitz (W-W), ambas a $p < 0.05$, donde se compararon las distribuciones de las frecuencias



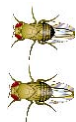
acumuladas de clones *mwh* de cada tratamiento contra los testigos correspondientes.

5.2.2.1. Testigos.

En el Cuadro XII y Figura 23 se muestra la comparación entre el testigo agua y el EtOH 2%. Los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ningún tipo de mancha (los resultados estadísticos detallados se muestran en el Anexo 1-11), tampoco existen diferencias en la comparación de la distribución de clones *mwh* (Figura 24 y Anexo 2-11). La falta de genotoxicidad concuerda con lo reportado para la CE, mientras que es diferente con respecto a la distribución de las frecuencias acumuladas de los clones *mwh*.

Se encontraron diferencias en la distribución de las frecuencias acumuladas de clones entre los tratamientos agua y los tratamientos EtOH 2% de ambas cruas.

Cuadro XII. Resultados del SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie trans-heterocigota de la cruce bioactivación elevada de los tratamientos crónicos con GHPM o GHPMF 2, 4, 8, 16 μ M. Testigos negativos: EtOH 2 % y agua miliQ y testigo positivo: DMN 76 μ M.



Tratamiento	N° Ind	Diagnostico estadístico de manchas por individuo*											
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Clon mwh			
A (agua vs testigos)													
Agua	60	0.62	(037)		0.07	(004)		0.05	(003)		0.73	(044)	41
EtOH 2 %	58	0.66	(038)	-	0.07	(004)	-	0.00	(000)	-	0.72	(042)	40
DMN 76 μ M	60	5.75	(345)	+	3.35	(201)	+	1.10	(066)	+	10.20	(612)	522
B (EtOH 2 % vs GHPM)													
EtOH 2 %	58	0.66	(038)		0.07	(004)		0.00	(000)		0.72	(042)	40
GHPM 2 μ M	60	0.65	(039)	-	0.07	(004)	-	0.03	(002)	-	0.75	(045)	45
GHPM 4 μ M	57	0.67	(038)	-	0.14	(008)	-	0.05	(003)	-	0.86	(049)	49
GHPM 8 μ M	60	0.92	(055)	-	0.08	(005)	-	0.02	(001)	-	1.02	(061)	60
GHPM 16 μ M	60	0.63	(038)	-	0.05	(003)	-	0.05	(003)	-	0.73	(044)	42
C (EtOH 2 % vs GHPMF)													
EtOH 2 %	58	0.66	(038)		0.07	(004)		0.00	(000)		0.72	(042)	40
GHPMF 2 μ M	60	0.75	(045)	-	0.17	(010)	-	0.07	(004)	-	0.98	(059)	59
GHPMF 4 μ M	59	0.75	(044)	-	0.14	(008)	-	0.03	(002)	-	0.92	(054)	54
GHPMF 8 μ M	57	0.53	(030)	-	0.07	(004)	-	0.02	(004)	-	0.61	(035)	35
GHPMF 16 μ M	57	0.60	(034)	-	0.09	(005)	-	0.05	(003)	-	0.74	(042)	40

*Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Würzler (1988, 1995). Pruebas estadísticas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney y Wilcoxon, ambas a $p < 0.05$. m = factor de Multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo.

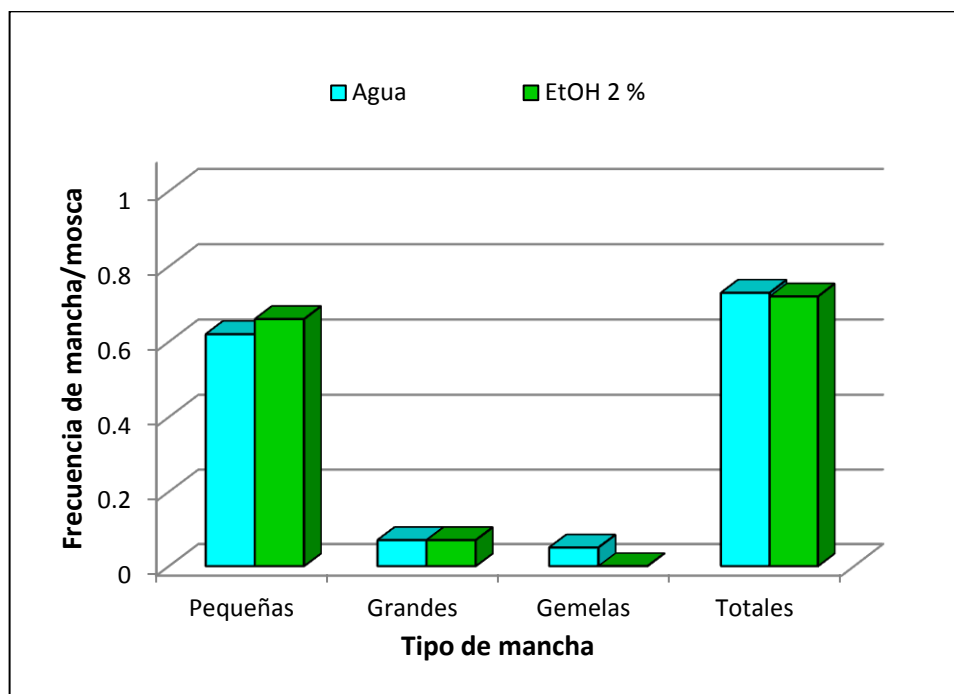


Figura 23. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para los testigos disolventes: agua y EtOH 2%, CBE.

La comparación del testigo DMN a la concentración 76 μM con el testigo agua (Cuadro XII) mostró diferencias significativas en la frecuencia de todos los tipos de mancha (los resultados estadísticos detallados se muestran en el Anexo 1-12) y modificación de la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* (ver resultados estadísticos en el Anexo 2-12). Estos datos concuerdan con lo encontrado en la CE.

Finalmente, hubo diferencias significativas en la frecuencia de manchas entre ambas cruces, lo que confirma la bioactivación del DMN por la participación de los Cyp450s en su metabolismo.

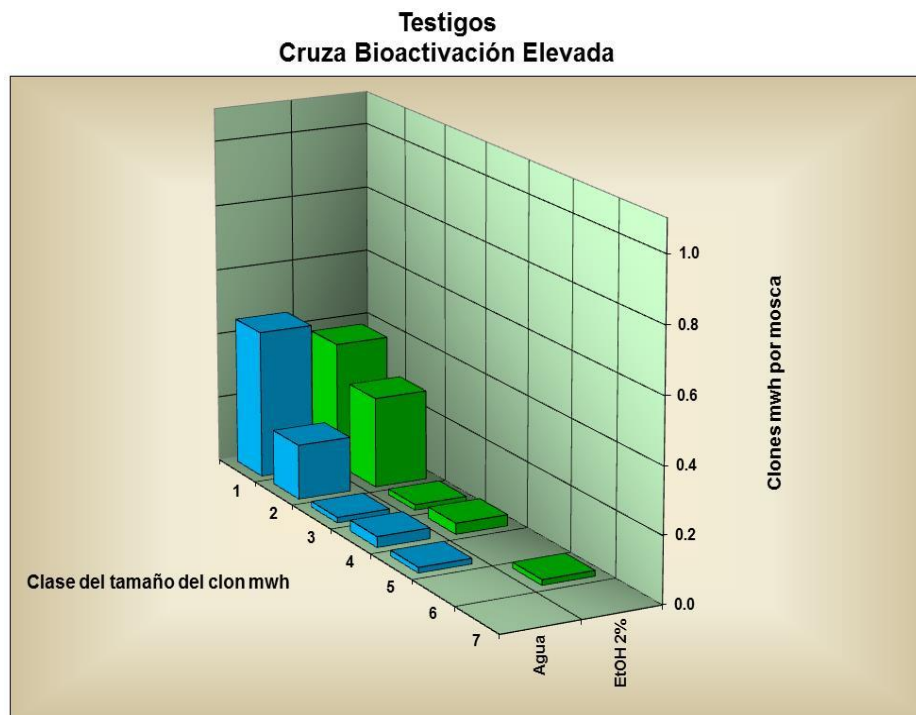


Figura 24. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de los testigos, CBE.

Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

5.2.2.2. Tratamientos con el tripanocida GHPM

En el Cuadro XII y Figura 25 se muestran los resultados de la comparación entre el testigo EtOH 2% con el tripanocida GHPM a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM para la CBE. El estadístico SMART y la prueba U mostraron que no existen diferencias en la frecuencia de manchas entre los tratamientos con respecto al testigo EtOH 2% (para visualizar resultados estadísticos detallados vea también los Anexos 1-13, 1-14, 1-15 y 1-16). Mientras que la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* se alteró sólo a la concentración 8 μM (Figura 26 y Anexo 2-15). Por otro lado, el análisis de la distribución de clones *mwh* entre las cruza mostró diferencias entre todos los tratamientos con GHPM.

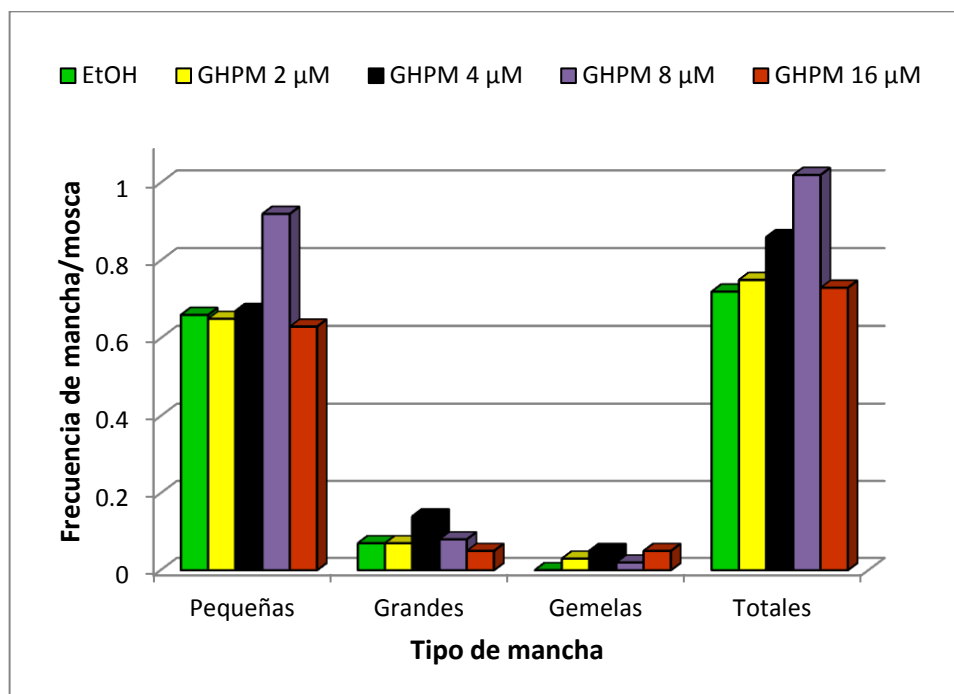


Figura 25. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/mosca para testigo negativo: EtOH 2% y tratamientos con GHPM 2, 4, 8 y 16 μ M, CBE.

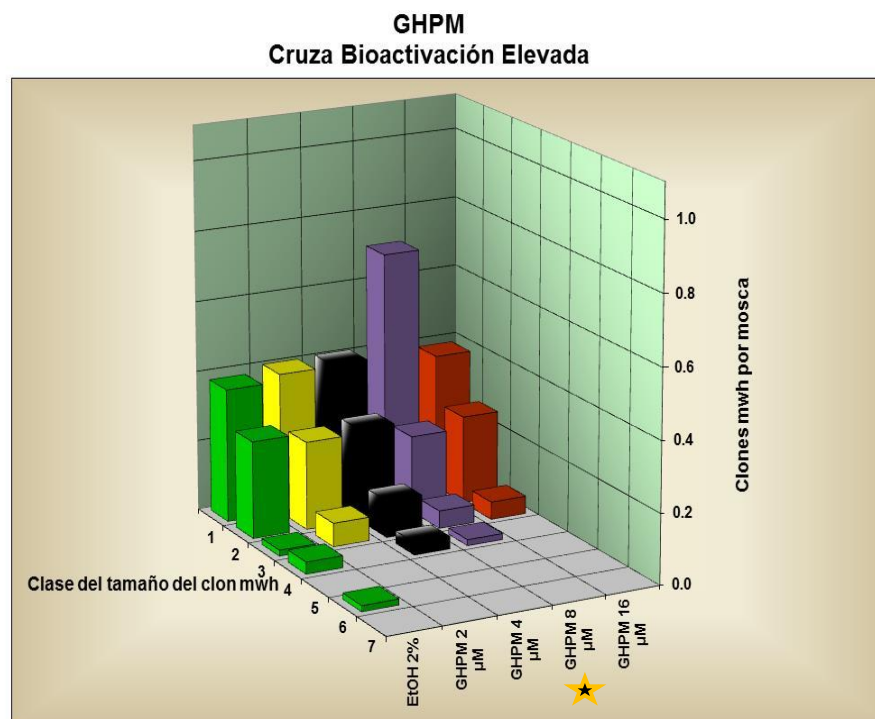


Figura 26. Distribución de tamaños de clones mwh por individuo de los tratamientos GHPM, CBE. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.2.2.3. Tratamientos con el tripanocida GHPMF.

En el Cuadro XII y Figura 27 se muestra la comparación entre el testigo EtOH 2% con el tripanocida GHPMF a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM . El programa SMART y la prueba U demostraron que no existen diferencias en la frecuencia de manchas para ningún tratamiento (los resultados estadísticos detallados se muestran en el Anexo 1-17, 1-18, 1-19 y 1-20). Mientras que la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* fue alterada a las concentraciones 2, 4 y 8 μM (Figura 28 y Anexos 2-17, 2-18, 2-19 y 2-20). Finalmente sólo se encontraron diferencias en la distribución de clones *mwh* entre ambas cruza para las concentraciones 2 y 8 μM .

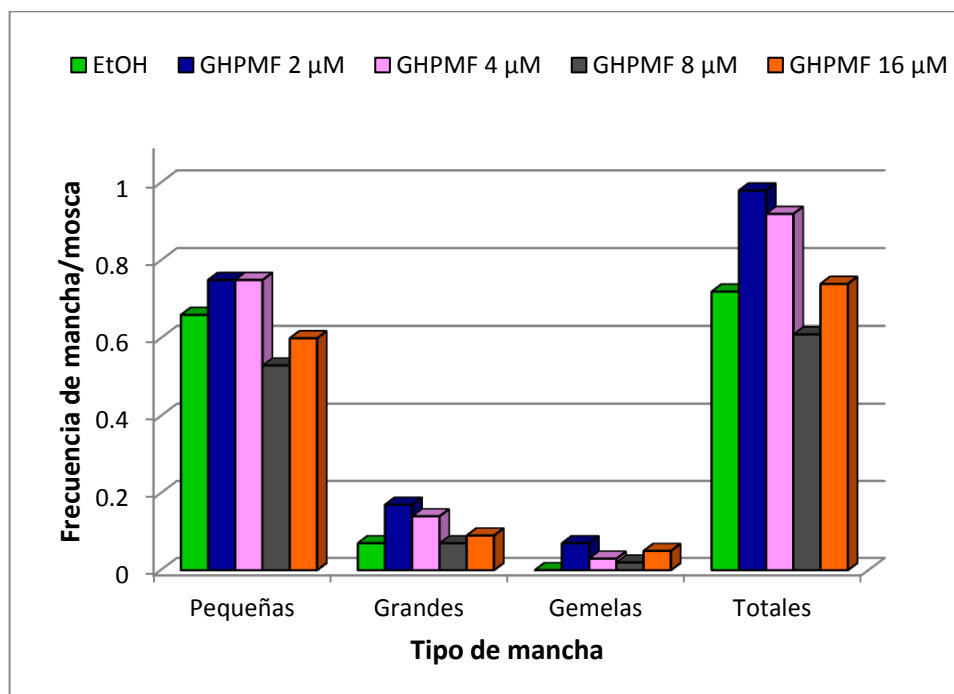


Figura 27. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ mosca para testigo negativo: EtOH 2% y tratamientos con GHPMF 2, 4, 8 y 16 μ M, CBE.

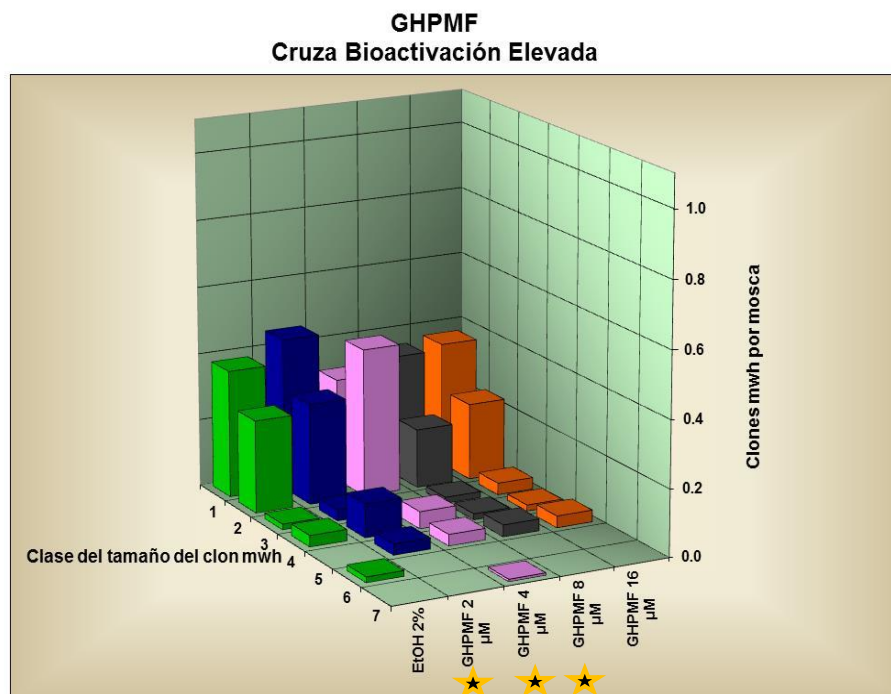


Figura 28. Distribución de tamaños de clones mwh por individuo de los tratamientos GHPMF, CBE. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imaginal del ala.

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.3. Análisis por HPLC de remanencias de los tripanocidas

Se llevó a cabo un análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con moscas adultas procedentes de larvas tratadas con EtOH 2%, GHPM o GHPMF a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM de las cepas flare y Oregon-flare, para conocer: (i) si los compuestos primarios eran almacenados o absorbidos en las larvas, (ii) si los compuestos generaban metabolitos, (iii) si los resultados de las anteriores determinaciones eran diferentes en ambas cepas.



5.3.1. GHPM.

En las Figuras 29 y 30 se muestra la comparación de GHPM 40 μM (patrón) contra los tratamientos GHPM a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 μM para las cepas flare y Oregon-flare, respectivamente.

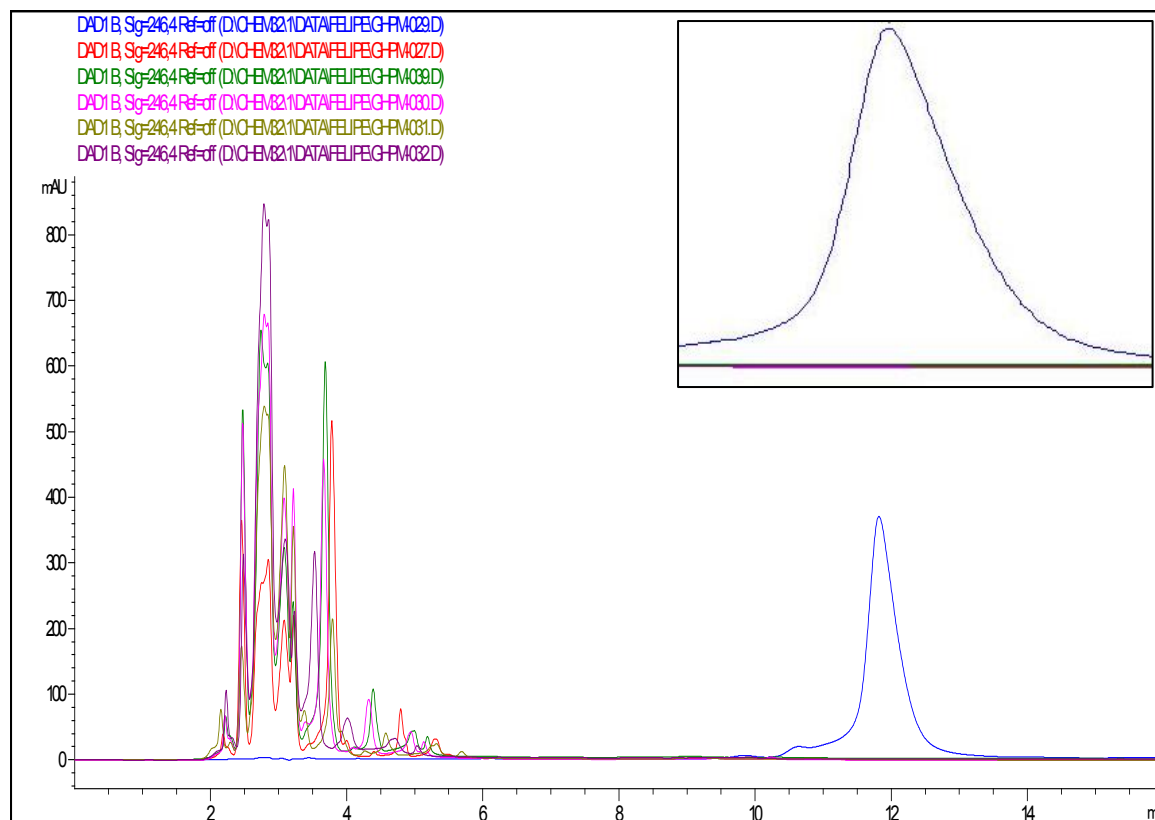


Figura 29. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas flare tratadas con GHPM. El patrón GHPM 40 μM (línea azul) muestra un pico con un tiempo de retención de 12 min.

En la línea roja se muestra la corrida de EtOH 2 %, línea verde GHPM 2, línea rosa GHPM 4, línea café GHPM 8 y línea morada GHPM 16 μM ; sin embargo, en estas sólo se observan los picos correspondientes al solvente de corrida. En el cuadro superior derecho se muestra un acercamiento del pico del patrón.

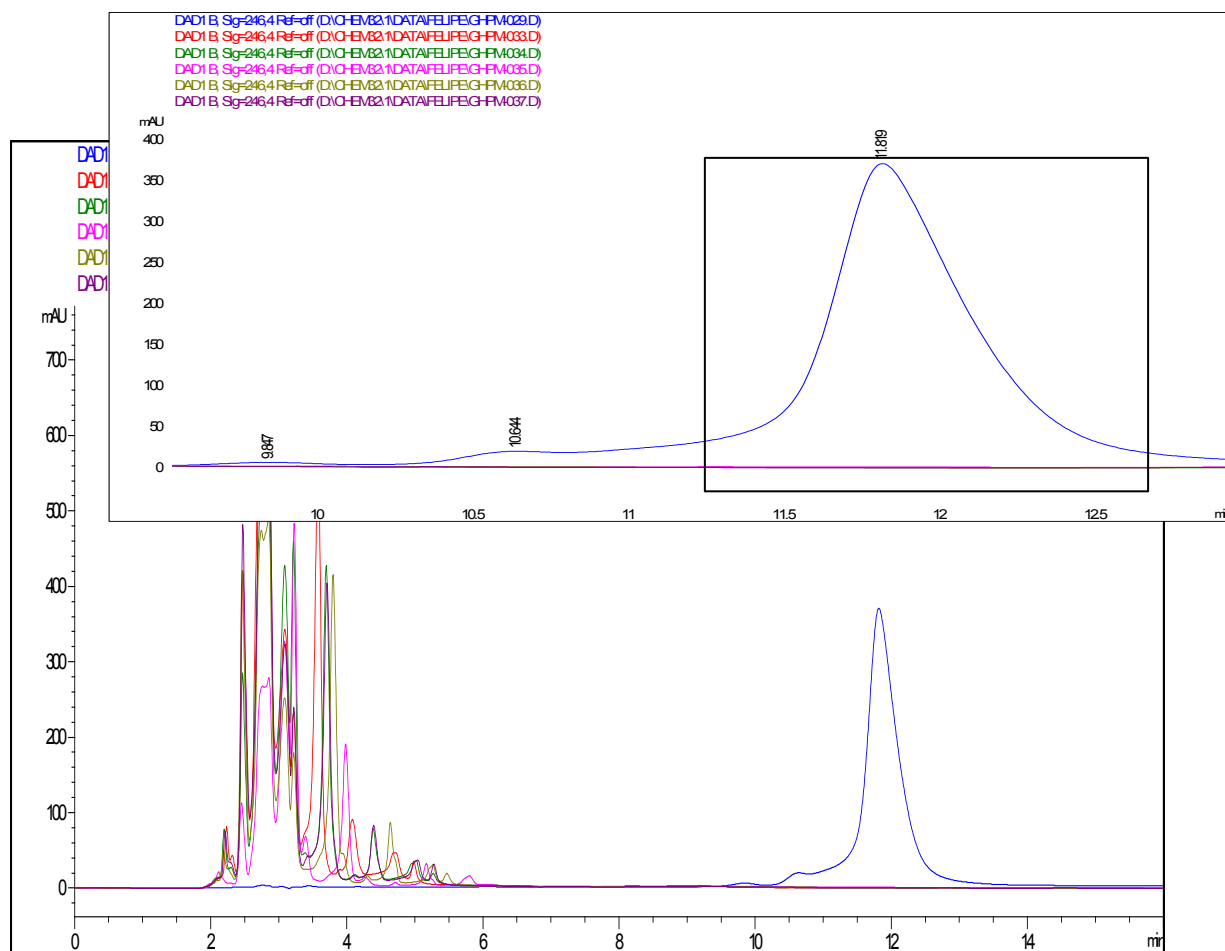


Figura 30. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas Oregon-flare tratadas con GHPM. El patrón GHPM 40 μM (línea azul) muestra un pico con un tiempo de retención de 12 min. En la línea roja se muestra la corrida de EtOH 2 %, línea verde GHPM 2, línea rosa GHPM 4, línea café GHPM 8 y línea morada GHPM 16 μM ; sin embargo, en estas sólo se observan los picos correspondientes al solvente de corrida. En el cuadro superior derecho se muestra un acercamiento del pico del patrón.

5.3.2. GHPMF

En las Figuras 31 y 32 se muestra la comparación entre el GHPMF 28 μM (patrón) contra los tratamientos GHPMF 2, 4, 8 y 16 μM para las cepas flare y Oregon-flare, respectivamente.

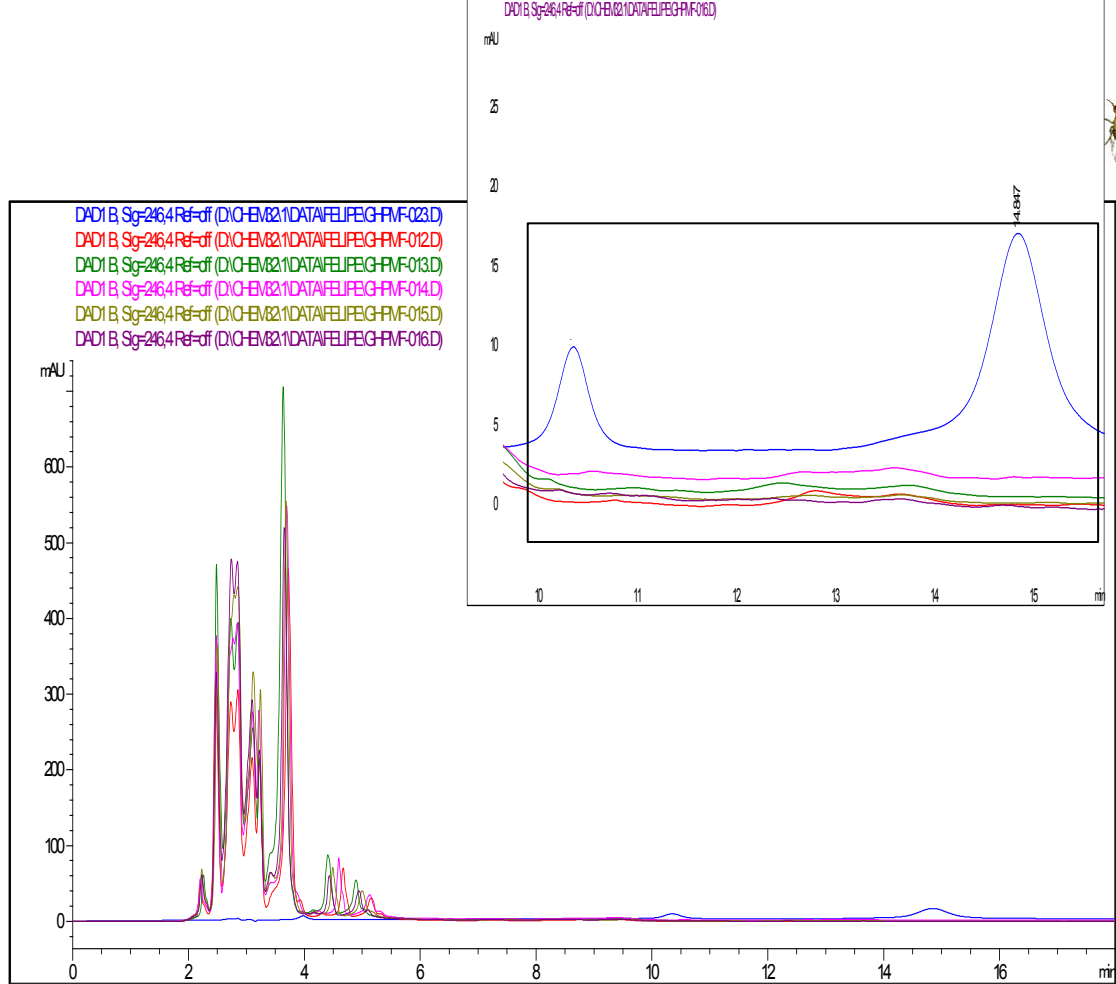


Figura 31. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas flare tratadas con GHPMF. El patrón GHPMF 28 μ M (línea azul) muestra dos picos con tiempo de retención de 10.5 y 15 min, respectivamente. En la línea roja se muestra la corrida de EtOH 2 %, línea verde GHPM 2, línea rosa GHPM 4, línea café GHPM 8 y línea morada GHPM 16 μ M; sin embargo, en estas sólo se observan los picos correspondientes al solvente de corrida. En el cuadro superior derecho se muestra un acercamiento de los picos del patrón.

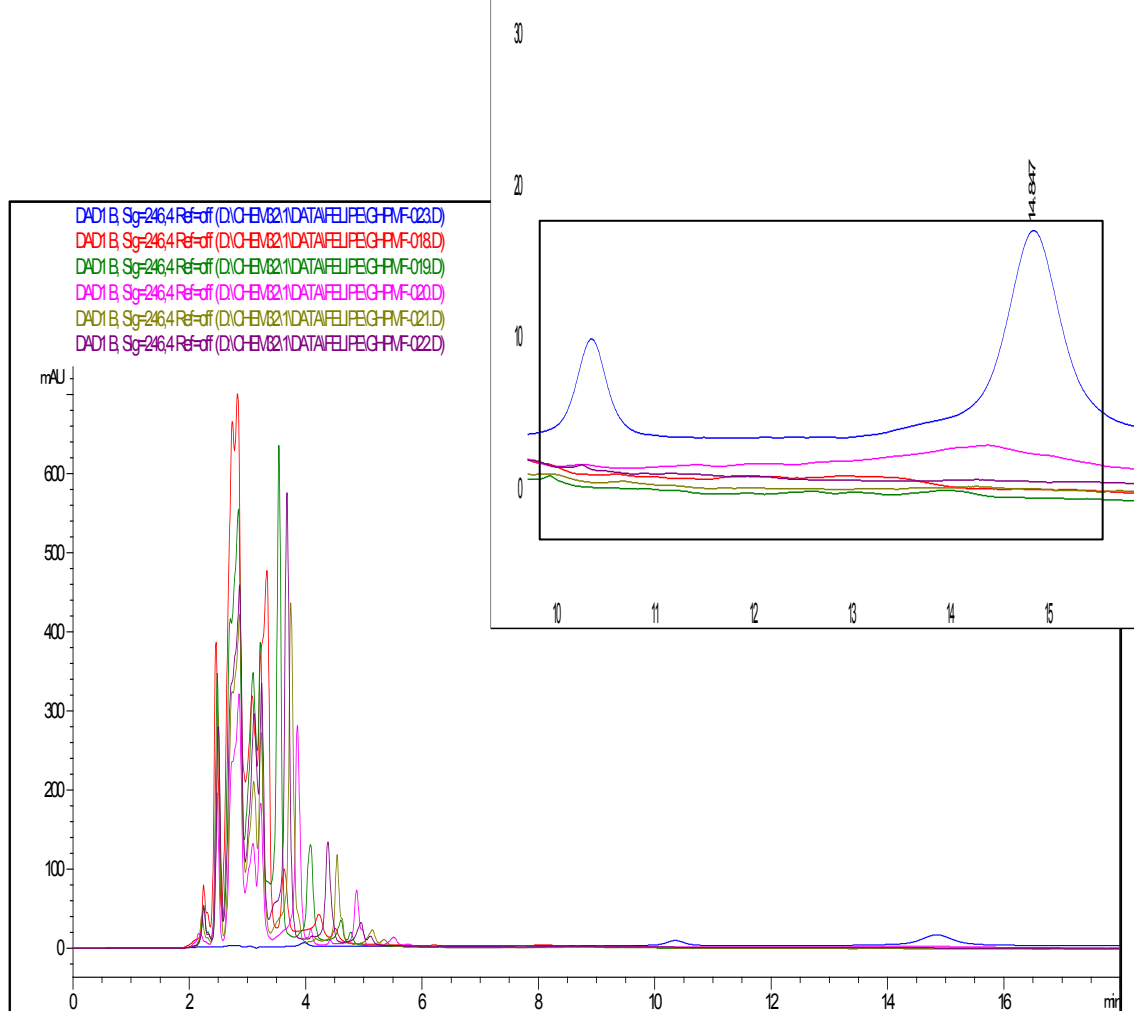


Figura 32. Cromatograma del análisis con HPLC de moscas Oregon-flare tratadas con GHPMF. El patrón GHPMF 28 μM (línea azul) muestra dos picos con tiempo de retención de 10.5 y 15 min, respectivamente. En la línea roja se muestra la corrida de EtOH 2 %, línea verde GHPM 2, línea rosa GHPM 4, línea café GHPM 8 y línea morada GHPM 16 μM ; sin embargo, en estas sólo se observan los picos correspondientes al solvente de corrida. En el cuadro superior derecho se muestra un acercamiento de los picos del patrón.

El análisis de los espectros UV-VIS y las comparaciones de los tiempos de retención de los patrones y los tratamientos mostraron que no existen trazas de estos compuestos en los homogenizados de moscas procedentes de larvas tratadas, por lo que se puede decir que los compuestos fueron adsorbidos y metabolizados completamente.



6. DISCUSIÓN

Recientemente el estudio de medicamentos para combatir la Enfermedad de Chagas ha tomado mucha importancia debido al creciente número de casos reportados no sólo en zonas endémicas, sino en diversas partes del mundo. La principal problemática de los compuestos tripanocidas es que presentan efectos adversos en el hospedero, tales como toxicidad (Roca *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2015; Lescure *et al.*, 2010). Por esto, resulta indispensable la valoración de los efectos tóxicos sistémicos y en particular los genotóxicos que los tripanocidas puedan tener sobre diferentes modelos biológicos, como parte de su desarrollo hacia nuevos fármacos. En este trabajo se evaluaron los efectos tóxicos y genotóxicos de dos tripanocidas derivados de quinazolina en *D. melanogaster*.

6.1. GHPM

6.1.1. Efecto subtóxico del GHPM

El compuesto GHPM fue sintetizado por primera vez en 1972 por Davoll y colaboradores, encontrando un excelente efecto tripanocida; y aunque las pruebas en ratones no mostraron toxicidad del compuesto a dosis orales de 25, 50, 100, 200 y 400 mg/Kg e inyectadas de 100, 200, 400 y 800 mg/Kg, todas las dosis ocasionaron pérdida de peso. En un tratamiento subagudo de 50, 100, 200 y 400 mg/Kg en un perro observaron que éstas ocasionaban un cuadro clínico de diarrea, vómito, anorexia y pérdida de peso a dosis >100 mg/Kg. Davoll y colaboradores aparentemente abandonaron los estudios de este compuesto por los efectos tóxicos que presentaba (Rojas-Aguirre, 2012). En el 2013, Hernández-Luis y su grupo, sintetizaron nuevamente el compuesto y encontraron efecto tóxico del GHPM en ratones a una sola dosis oral de 99 mg/Kg (~334.6 μ M) (comunicación personal); pese a estos antecedentes los efectos tóxicos de este compuesto no han sido determinados completamente, ya que Mendoza-Martínez y



colaboradores, (2015), determinaron la CL_{50} de GHPM a la concentración de 32 μM para *T. cruzi*, pero a su vez también comprobaron que ésta no fue tóxica en células de mamífero VERO, ni en modelos murinos de malaria cerebral ocasionada por *Plasmodium bergeri*, a dosis de 50 mg/Kg ($\sim 169 \mu\text{M}$).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el GHPM fue subtóxico a todas las concentraciones probadas y en ambas cepas de *D. melanogaster*. Esto concuerda con algunos trabajos previos que demostraron este mismo efecto en varios derivados de la estructura base quinazolina, razón por la cual estos compuestos también han sido utilizados en terapias antineoplásicas. Por ejemplo, el Mtx resultó clastogénico y citotóxico en células de médula ósea de ratón (Sekeroğlu y Sekeroğlu, 2012) y genotóxico en el SMART en ala de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984), las quinazolininas derivadas de la mostaza de nitrógeno fueron citotóxicas en las líneas celulares cancerosas (HepG2, SH-SY5Y, DU145, MCF-7 y A549) y en una línea celular de epitelio gástrico (GES-1) (Li *et al.*, 2013), el derivado 2-isopropil-3-butil-8-(4-fluorofenilamino)-3H-imidazol[4,5-g]quinazolina fue citotóxico en la línea de cáncer de pulmón A549 (Chen *et al.*, 2011); y 4-anilinoquinazolininas mostraron efectos citotóxicos en las líneas L1210, HeLa y HT-29, entre otras (Jantová *et al.*, 2016).

En este trabajo se encontraron diferencias significativas en la toxicidad de GHPM a las concentraciones 1.9, 7.9 y 254 μM entre las cepas flare y Oregon-flare (que difieren en su expresión de Cyp450), lo cual podría indicar la participación de estos en su metabolismo, ya que estudios previos de la estructura de la molécula indicaron que la molécula podía ser metabolizada por estas enzimas (Hernández-Luis comunicación personal, 2013).



6.1.2. Efecto genotóxico de GHPM

6.1.2.1. Testigos

6.1.2.1.1. Etanol sólo alteró la distribución de clones *mwh* en la CE

El EtOH 2 % no fue genotóxico para ninguna craza en *D. melanogaster*; este resultado se esperaba debido a que trabajos previos en el Laboratorio de Genética Toxicológica, tales como los de Olvera (2014) y Silva (2013) (datos no publicados) mostraron tal condición a las concentraciones 2.5 y 1 % de EtOH, respectivamente. A pesar de que el EtOH ha sido clasificado en el Grupo 1 (cancerígeno humano) por la IARC desde 1988, los mecanismos de toxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad y genotoxicidad aún están en discusión, en parte debido a que estos efectos principalmente se han podido demostrar en modelos *in vitro*, por ejemplo, Kayani y Parry (2010) quienes encontraron efectos genotóxicos del EtOH a las concentraciones 0.4, 0.8, 1 y 2 % en el ensayo de micronúcleos con la línea celular de linfoblastos humanos MCL-5; y Hates (1985) quien demostró este efecto a concentraciones mayores a 18 – 19 % en el ensayo RK *mutatest* con células RK⁺. Ahora bien, SMART en ala es una prueba *in vivo*, por lo que se debe considerar la participación del metabolismo y los sistemas de reparación, los cuales intervienen y deben provocar resultados diferentes a los de los ensayos *in vitro*. Proponemos que por esta razón sólo se haya encontrado una alteración de la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* en la CE.

6.1.2.1.2. Efecto genotóxico de la DMN

La DMN a la concentración 76 µM fue genotóxica y alteró la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* para ambas cruzas. Este efecto era el esperado ya que previamente se ha demostrado que la DMN es un compuesto genotóxico, formando alquilaciones 7-metilguanina en el DNA (Engelse y



Emmelot, 1972). Este efecto ha sido reportado en varias pruebas experimentales, tales como el SMART en ala de *D. melanogaster* a la concentración de 76 μM (Castañeda *et al.*, 2011; Rodríguez-Arnaíz *et al.*, 1996; Graf *et al.*, 1984); y en cultivos primarios de hígado de rata a la concentración de 70 μM (Mendoza-Figueroa, 1984).

Por otra parte, al ser un xenobiótico indirecto requiere ser metabolizado por los Cyp450 para generar daño; lo cual se confirmó en este trabajo, ya que las diferencias en la expresión de Cyp450 entre las cruzas CE y CBE generó diferencias en la frecuencia de manchas entre estas, como también lo reportaron Castañeda-Partida y colaboradores (2011) en ambas cruzas de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*; previamente Hällström y colaboradores (1982) habían determinado la participación de los Cyp450 en el metabolismo de la DMN en *D. melanogaster*, al encontrar diferencias en la genotoxicidad de esta nitrosamina con o sin pre-tratamiento con fenobarbital (inductor de Cyp450). Por su parte, Mendoza-Figueroa y colaboradores (1983) encontraron diferencias en la genotoxicidad de la DMN en cultivos primarios de hígado de rata tratados o sin tratar con fenobarbital.

6.1.2.2. El GHPM fue genotóxico y alteró la distribución de clones *mwh*

En este trabajo se encontró que el GHPM incrementó la frecuencia de manchas grandes a la concentración de 16 μM en la CE, alteró la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* a las concentraciones 8 y 16 μM en la CE y 8 μM en la CBE y que esta alteración fue diferente entre las cruzas.

Estos resultados indican que el GHPM tiene efecto genotóxico, y que éste es ocasionado tempranamente en la división de las células de los discos imaginales, porque las frecuencias mayores son de manchas grandes; por otra parte, el que se haya encontrado alteración diferencial de la distribución acumulada de clones



mwh en ambas cruzas y que el incremento de manchas grandes sólo se dé en la CE, podría indicar la participación de los Cyp450 en su metabolismo xenobiótico. Esto está de acuerdo con los estudios previos de la estructura de la molécula, los que indicaron que el grupo metoxilo de la molécula GHPM podía ser metabolizado por los Cyp450 y generar metabolitos, tales como formaldehído que podría ocasionar alteraciones en el DNA (Hernández-Luis, comunicación personal, 2016).

Mientras que la alteración de la distribución de las frecuencias acumuladas está de acuerdo con las propiedades citotóxicas y antiproliferativas que se han reportado en algunos derivados quinazolina, por ejemplo, daños por alquilaciones ocasionados por quinazolinas derivadas de nitrógeno mostaza reflejados en la inhibición de la fase S o en el punto de verificación G2/M del ciclo celular e inducción de apoptosis en varias líneas cancerígenas y una humana (Li *et al.*, 2013). También se ha demostrado la citotoxicidad de cinco derivados 4-anilinoquinazolinas, debido a estrés oxidante, en líneas celulares e inducción de apoptosis en células de leucemia a través de la vía mitocondrial dependiente de las caspasas 3 y 9 (Jantová *et al.*, 2016). Chen y colaboradores (2011), encontraron que el derivado 2-isopropil-3-butil-8-(4-fluorofenilamino)-3H-imidazol[4,5-g]quinazolina inhibió el crecimiento de la línea celular A549 (cancer de pulmón), mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular e inducción de apoptosis vía mitocondrial.

El que el GHPM sólo haya sido genotóxico a la concentración 16 μ M podría indicar el variado comportamiento de este compuesto, ya que en la prueba de toxicidad no se encontró una relación concentración-respuesta, y sí una gran dispersión. De esta manera podría ser que el efecto genotóxico, sea colateral de su efecto tóxico, y que éste tampoco sea dependiente de la concentración.



6.1.3. Sin trazas de metabolitos de GHPM en la HPLC

El análisis HPLC mostró que el GHPM fue transportado y metabolizado; y aunque en este análisis no se encontraron diferencias entre las cepas, las diferencias en la toxicidad y genotoxicidad del compuesto puede indicar la participación de los Cyp450 en su metabolismo.

6.2. GHPMF

6.2.1. Efecto subtóxico del GHPMF

El GHPMF es un tripanocida derivado del GHPM en el que se realizó la sustitución del grupo metoxilo por un trifluorometoxilo en la posición 5 del grupo bencilo del núcleo de quinazolina, esperando que esto pudiera prevenir la toxicidad ocasionada por el GHPM (Hernández-Luis, comunicación personal, 2013). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que aunque disminuyeron los efectos tóxicos en la mayoría de las concentraciones, éstos se mantuvieron en las más bajas 1.9, 3.9 y 7.9 μM , lo cual sugiere un efecto de hormesis. En las pruebas preliminares no se encontró efecto tóxico del tripanocida trifluorado en ratones a una sola dosis oral de 99 mg/Kg (Hernández-Luis, comunicación personal, 2013); tampoco Mendoza-Martínez y colaboradores (2015), encontraron efectos tóxicos en células de mamífero VERO y en modelos murinos de malaria cerebral ocasionada por *P. bergeri*, pero sí encontraron un excelente efecto tripanocida con una CL_{50} de 20 μM y un potente efecto antioxidante.

Cabe señalar que se encontraron diferencias significativas en la toxicidad a las concentraciones 1.9, 3.9 y 7.9 μM entre las cepas flare y Oregon-flare, la cual no se esperaba debido a la sustitución del grupo metoxilo, este último candidato a ser metabolizado por Cyp450 y convertirse en un compuesto dañino para la célula.



Los resultados indican que a pesar de la incorporación del trifluoro al grupo metoxilo, el efecto tóxico persiste.

Los efectos tóxicos de ambos tripanocidas (GHPM y GHPMF) indican que las modificaciones realizadas a la molécula quinazolina aún no son suficientes para evitar este efecto, recordemos que varios trabajos de compuestos con esta estructura base han mostrado efectos citotóxicos Li *et al.* (2013), Jantová *et al.* (2016), y Chen *et al.* (2011). Sin olvidar que otros compuestos diferentes en su estructura base, pero que comparten la actividad tripanocida han sido reconocidos como tóxicos en diversos modelos de prueba, por ejemplo algunos derivados de la tiosemicarbazona (Cardoso *et al.*, 2014) y de bencilaminas y ferrocen diaminas (Velásquez *et al.*, 2014) resultaron ser tóxicos en células HepG2; los imidazoles (Faral-Tello *et al.*, 2014), derivados de bencimidazol (Díaz-Chiguer *et al.*, 2012) y glicosil disulfuro aromático oligovalentes y diglicosil disulfuros (Gutiérrez *et al.*, 2013) en células VERO; el dialquilimidazol resultó citotóxico en líneas celulares linfocíticas de mamífero CRL-8155 (Suryadevara *et al.*, 2013); y la combinación de los tripanocidas comerciales (benznidazol, nifurtimox, posaconazol y/o AmBisome) en ratones hembras BALB/cJ (Cencig *et al.*, 2012), por mencionar algunos.

6.2.2. Ausencia de genotoxicidad del GHPMF

El GHPMF no fue genotóxico para *D. melanogaster* en ninguna de las concentraciones probadas. Esto puede explicarse debido a que el GHPMF contiene la sustitución del grupo 4 metoxilo por el grupo 4-trifluorometoxilo, además de remover la densidad de los electrones oxígeno, lo que reduce la habilidad para unir su hidrógeno con las regiones II y III de la enzima DHFR, pero a su vez incrementa la selectividad por las proteínas del parásito por la preferencia de interacción con la región I (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015). Lo anterior tiene sentido, si recordamos que la DHFR de *Drosophila* comparte muchas propiedades con la del humano, por ejemplo 17 de sus residuos involucrados en la unión con el sustrato, inhibidor y cofactor son idénticos en ambos organismos y difieren de la



de *T. cruzi* (Affleck *et al.*, 2006). Además la DHFR en mamíferos es una proteína monofuncional, mientras que en *T. cruzi* y otros protozoarios parásitos lleva una forma bifuncional, dado que el dominio DHFR está unido al dominio timidilato sintasa (TS) (Schormann *et al.*, 2010).

Por otra parte, la ausencia de genotoxicidad del GHPMF concuerda con otros trabajos donde se ha demostrado la falta de genotoxicidad de compuestos derivados de quinazolininas, tales como los de Doppalapudi y colaboradores (2012) quienes no encontraron efectos genotóxicos para el compuesto N-{2-[2-(4-metoxifenil)-vinil]-quinazolina-4-il}-N,N-dimetil-propano-1,3-diamina HCl (CP-31398) a las concentraciones de 39.1–2,500 µg/placa en la prueba de Ames, de 1.95–5,000 µg/mL en aberraciones cromosómicas en células CHO y 50–2,000 mg/Kg en el bioensayo de micronúcleos en médula de ratón.

Finalmente, se encontró alteración de la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh* a las concentraciones 2, 4, 8 y 16 µM en la CE, y 2, 4 y 8 µM en la CBE, lo que está de acuerdo con nuestros datos previos de toxicidad, ya que estas concentraciones fueron subtóxicas en la prueba CL₅₀ y esto está de acuerdo también con lo reportado en estudios de citotoxicidad previos de la molécula quinazolina, utilizada en la terapia antineoplástica. También al encontrarse diferencias entre ambas cruzas en la distribución de clones *mwh* a las concentraciones 2 y 8 µM hay indicios de la participación de los Cyp450 en el metabolismo del compuesto.

6.2.3. Sin trazas de metabolitos de GHPMF en la HPLC

El análisis HPLC mostró que el GHPMF fue transportado y metabolizado totalmente; y aunque en este análisis tampoco se encontraron diferencias entre las cepas, de igual manera que en el caso del GHPM, las diferencias en la toxicidad y la distribución de las frecuencias acumuladas de clones *mwh*, en cepas y cruzas



que difieren en la expresión de los Cyp450, puede indicar la participación de estos en su metabolismo.



7. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que el tripanocida GHPM tuvo efectos subtóxicos, tal como se había sugerido previamente en otros modelos *in vivo* (Davoll *et al.*, 1972; Hernández-Luis, 2013) y también presentó efectos genotóxicos. Se propone que esto se deba a que el grupo metoxilo, presente en la estructura de la molécula, se pudo metabolizar a formaldehído por acción de los Cyp450s y generar daños en el material genético y celular; esta propuesta se sustenta en la falta de trazas de GHPM en el HPLC, el daño genotóxico mostrado únicamente en la CE y en las diferencias que hubo, entre las CE y CBE, en la alteración de la distribución de los clones *mwh*. Por otra parte, el GHPMF presentó efecto subtóxico a concentraciones bajas, y un efecto de hormesis, relativamente común en algunos medicamentos. La ausencia de genotoxicidad con este compuesto sugiere que la sustitución del grupo metoxilo por el trifluorometoxilo, pudo haber evitado la formación de formaldehído, lo que explicaría la diferencia con el GHPM. Cabe señalar que de este compuesto tampoco se encontraron trazas en el análisis con HPLC y entre las cruas hubo diferencias en la distribución de clones *mwh*, lo que indica que también fue metabolizado. Se concluye que la diferencia en la estructura química de los compuestos GHPM y GHPMF hizo que, aunque ambos fueran subtóxicos, solo el GHPM fuera genotóxico. Las evidencias indican la participación de los Cyp450s en el metabolismo de los dos tripanocidas. Se sugiere realizar estudios con otros modelos experimentales y la utilización de análisis molecular y bioquímico para confirmar lo anterior.



8. LITERATURA CITADA

- Affleck JG., Al-Batayneh KM., Neumann K., Cole SP. and Walker VK. 2006. *Drosophila* dihydrofolate reductase mutations confer antifolate resistance to mammalian cells. *European Journal of Pharmacology*. **529** (1-3): 71-78.
- Bua J., Volta BJ., Velazquez EB., Ruiz AM., Rissio AM. and Cardoni RL. 2012. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and the children by parasite DNA amplification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **106** (10): 623-628. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.015.
- Buschini A., Giordani F., de Albuquerque C., Pellacani C., Pelosi G., Rossi C., Araújo TM., Zucchi D. and Poli P. 2007. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. *Biochemical Pharmacology*, **73** (10): 1537-1547.
- Cabrera, M., Lavaggi ML., Hernández P., Merlino A., Gerpe A., Porcal W., Boiani M., Ferreira A., Monge A., de Cerain AL., González M., and Cerecetto H. 2009. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicology Letters*. **190** (2): 140–149. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.006.
- Cancado JR. 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. **94** (1): 331-335.
- Carabarin-Lima A., González-Vázquez MC., Rodríguez-Morales O., Baylón-Pacheco L., Rosales-Encina JL., Reyes-López PA., and Arce-Fonseca M.



2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*. **127** (2): 126-135. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.04.007.

- Cardoso EJ., Valdéz GC., Campos AC., de la Luz Sanchez R., Mendoza CR., Hernández AP., Ramírez MH., Habana JR., González EB., Matzumura PD., Carlier Y. 2012. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: a problem of public health little studied in Mexico. *Experimental Parasitology*. **131** (4): 425–432. doi: 10.1016/j.exppara.2012.05.013.
- Cardoso MV., de Siqueira LR., da Silva EB., Costa LB., Hernandes MZ., Rabello MM., Ferreira RS., da Cruz LF., Moreira DR., Pereira VR., de Castro MC., Bernhardt PV. and Leite AC. 2014. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: structural desing, synthesis and pharmacological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **86**: 48-59. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.08.012.
- Carlier Y. and Truyens C. 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*. **151**: 103-115.
- Castañeda-Partida L., Heres-Pulido ME., Guzmán-Rincón J., Hernández-Portilla LB., Dueñas-García IE., Durán-Díaz A. and Delfín-Alcalá I. 2011. Lead acetate does not inhibit dimethylnitrosamine activation and interacts with phenobarbital which is genotoxic in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*. **49**: 2172-2179.
- Cencig S., Coltel N., Truyens C. and Carlier Y. 2012. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AnBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *International*



Journal of Antimicrobial Agents. **40** (6): 527-532. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.08.002.

- Chen Z., Huang X., Yang H., Ding W., Gao L., Ye Z., Zhang Y., Yu Y. and Lou Y. 2011. Anti-tumor effects of B-2, a novel 2,3-disubstituted 8-arylamino-3H-imidazo[4,5-g]quinazoline derivative, on the human lung adenocarcinoma A549 cell line *in vitro* and *in vivo*. *Chemico-Biological Interactions.* **189** (1-2): 90-99. doi: 10.1016/j.cbi.2010.11.004.
- Cruz-Reyes A. and Pickering-López JM. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – A Review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **101** (4): 345-354.
- Danielson PB., Foster JLM., McMahon MM., Smith MK., Fogleman JC. 1998. Induction by alkaloids and phenobarbital of family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular & General Genetics.* **259**, 54–59.
- Davoll J., Johnson AM, and Davies HJ. 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. *Journal of Medicinal Chemistry.* **15** (8): 812-826.
- De Noya BA. and González ON. 2015. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Tropica.* **151**: 94-102. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.004.
- De Souza EM., da Silva PB, Nefertiti AS., Ismail MA., Arafa RK., Tao B., Nixon-Smith CK., Boykin DW. and Soeiro MN. 2011. Trypanocidal activity and selectivity *in vitro* of aromatic amidine compounds upon bloodstream



and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. **127** (2): 429-435. doi: 10.1016/j.exppara.2010.10.010.

- Den Engelse L. and Emmelot P. 1972. Effects of feeding the carcinogen dimethylnitrosamine on its metabolim and methylation of DNA in the mouse. *Chemico-Biological Interactions*. **4** (5): 321-327.
- Díaz-Chiguer DL., Márquez-Navarro A., Noguera-Torres B., de la luz León-Ávila G, Pérez-Villanueva J., Hernández-Campos A., Castillo R., Ambrosio JR., Nieto-Meneses R., Yépez-Mulia L. and Hernández-Luis F. 2012. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. **122** (1): 108-112. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.12.009.
- Doppalapudi RS., Riccio ES., Davis Z., Menda S., Wang A., Du N., Green C., Kopelovich L., Rao CV., Benbrook DM. and Kapetanovic IM. 2012. Genotoxicity of the cancer chemopreventive drug candidates CP-31398, SHetA2, and phospho-ibuprofen. *Mutation Research*. **746** (1): 78-88. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.03.009.
- Durán A., Vargas A. y Cisneros AE. Bioestadística. Ed. UNAM FES IZTACALA. México. 2004. 222 pág.
- Faral-Tello P., Liang M., Mahler G., Wipf P. and Robello C. 2014. Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **43** (3): 262-268. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.019.
- Frei, H. and Würzler, FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*. **203** (4): 297-308.



- Frei H. and Würzler FE. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*. **334** (2): 247-258.
- García Bellido R., González Such J. y Jornet Meliá JM. 2010. SPSS: Pruebas no paramétricas. Grupo de Innovación Educativa de la Universidad de Valencia. Disponible en: www.uv.es/innomide/spss/SPSS/SPSS_0802A.pdf. Fecha de acceso: 06-11-15.
- Gilbert IH. 2002. Inhibitors of dihydrofolate reductase in Leishmania and trypanosomes. *Biochemica et Biophysica Acta*. **1587** (2-3): 249-257.
- Graf U. and van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **271** (1): 59-67.
- Graf U., Frei H., Kägi A., Katz AJ., and Würzler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*. **222** (4): 359-373.
- Graf U., Spanó MA., Guzmán Rincón J., Abraham SK. and de Andrade HH. 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. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*. **6**: 9-13.



- Graf U., Abraham SK., Guzmán-Rincón J. and Würgler FE. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **402** (1-2): 203-209.
- Graf U., Würgler FE., Katz AJ., Frei H., Juon H., Hall CB. and Kale PG. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*. **6** (2): 153-188.
- Gutiérrez B., Muñoz C., Osorio L., Fehér K., Illyés T-Z, Papp Z., Kumar AA., Kövér KE., Sagua H., Araya JE., Morales P., Szilágyi L. and González J. 2013. Aromatic glycosyl disulfide derivatives: evaluation of their inhibitory activities against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **23** (12): 3576-3579. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.04.030.
- Guzmán RJ. and Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Environmental Science Research*. **50**: 169-181.
- Hällström I., Magnusson J. and Ramel C. 1982. Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **92** (1-2): 161-168.
- Hayes S. 1985. Ethanol-induced genotoxicity. *Mutation Research*. **143**: 23-27.
- Hernández-Luis, F. "Comunicación personal". 28 octubre 2013.
- Hernández-Luis, F. "Comunicación personal". 19 abril 2016.



- Honorato SB., Mendonça JS., Boechat N., Oliveira AC., Mendes Filho J., Ellena J. and Ayala AP. 2014. Novel Polymorphs of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **118**: 389-394. doi: 10.1016/j.saa.2013.08.096.
- IARC. 1972. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. *IARC Scientific Publications*. **1**: 95-106.
- IARC. 1988. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, Alcohol drinking. *IARC Scientific Publications*. **44**: 101-246.
- Jantová S., Melusová M., Pánik M., Brezová V. and Berbieriková Z. 2016. UVA-induced effects of 2,6-disubstituted 4-anilinoquinazolines on cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **154**: 77-88.
- Kato FH., Viana NI., Santini CB., de Souza CG, Veneziani RC, Ambrósio SR., and Tavares DC. 2012. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental*. **749** (1–2): 87–92. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.09.001.
- Kayani MA. and Parry JM. 2010. The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology In Vitro*. **24** (1): 56–60. doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.003.
- Lescure FX., Le Loup G., Freilij H., Develoux M., Paris L., Brutus L. and Pialoux G. 2010. Chagas disease: changes in knowledge and management.



The Lancet Infectious Diseases. **10** (8): 556-570. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70098-0.

- Li S., Wang X., He Y., Zhao M., Chen Y., Xu J., Feng M., Chang J., Ning H. and Qi C. 2013. Design and synthesis of novel quinazoline nitrogen mustard derivatives as potential therapeutic agents for cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **67**: 293-301. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.06.055.
- Malik LH., Singh GD. and Amsterdam EA. 2015. Chagas heart disease: an update. *The American Journal of Medicine*. **128** (11): 1251.e7-1251.e9. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.04.036.
- Martins VA., Gomes AP., Gomes de Mendoca E., Lopes Rangel Fietto J., Santana LA., Goreti de Almeida Oliveira M., Geller M., de Freitas Santos R., Roger Vitorino R. and Siqueira-Batista R. 2012. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. **16** (1): 45-58. doi:10.1016/S0123-9392(12)70057-7.
- Mendoza-Figueroa T., López-Revilla R. and Villa-Treviño S. 1983. DNA breaks induced by micromolar concentrations of dimethylnitrosamine in liver primary cell cultures from untreated and phenobarbital treated rats. *Toxicology*. **27** (1): 55-69.
- Mendoza-Martínez C., Galindo-Sevilla N., Correa-Basurto, J., Ugalde-Saldivar, VM., Rodríguez-Delgado RG., Hernández-Pineda J., Padierna-Mota D., Flores-Alamo M. and Hernández-Luis F. 2015. Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **92**: 314-331. doi:10.1016/j.ejmech.2014.12.051.



- Niwa A.M., Marcarini JC., Sartori D., Maistro EL., and Mantovani MS. 2013. Effects of (-)-cubebin (*Piper cubeba*) on cytotoxicity, mutagenicity and expression of p38 MAP kinase and GSTa2 in a hepatoma cell line. *Journal of Food Composition and Analysis*. **30**: 1–5. doi:10.1016/j.jfca.2012.12.003.
- Nunes MC., Dones W., Morillo CA., Encina JJ. and Ribeiro AL. 2013. Chagas disease. An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*. **62** (9): 767-776. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- Olvera Romero ZY. Evaluación genotóxica del tripanocida GHPMF en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza E). Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, UNAM, México. 2014. 63 pag.
- Pinazo MJ. and Gascon J. 2015. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*. **151**: 16-20. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.013.
- Ramos-Ligonio A., Torres-Montero J., López-Montero A. and Dumonteil E. 2012. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (7): 1341-1343. doi: 10.1016/j.meegid.2012.04.024.
- Rancourt SL. and Walker VK. 1990. The purification of dihydrofolate reductase from *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1039** (3): 261-268.



- Rassi A Jr., Rassi A. and Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet*. **17; 375** (9723): 1388-1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Roca Saumell C., Soriano-Arandes A., Solsona Díaz L., Gascón Brustengad J. y Grupo de consenso Chagas-APS. 2015. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Atención Primaria*. **47** (5): 308-317.
- Rodríguez-Arnaiz R., Soto PO., Oyarzún JC and Graf U. 1996. Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the Drosophila wing-spot test. *Mutation Research*. **351** (2): 133-145.
- Rojas-Aguirre Y., Hernández-Luis F., Mendoza-Martínez C., Sotomayor CP., Aguilar LF., Villena F., Castillo I., Hernández DJ. and Suwalsky M. 2012. Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1818**: 738-746. doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.026.
- Sánchez Lamar, A., G. Fonseca López, N. Capiro Trujillo y D. Fernández Fuentes. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. **34**: 34-43.
- Santos KK., Matias EF., Tintino SR., Souza CE., Braga MF., Guedes GM., Rolón M., Vega C., de Arias AR., Costa JG., Menezes IR. and Coutinho HD. 2012. Anti-*Trypanosoma cruzi* cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology*. **131** (1): 130-132. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.019.
- Schormann N., Velu SE., Murugesan S., Senkovich O., Walker K., Chenna BC., Shinkre B., Desai A. and Chattopadhyay D. 2010. Synthesis and



characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **18** (11): 4056-4066. doi: 10.1016/j.bmc.2010.04.020.

- Sekeroğlu ZA. and Sekeroğlu V. 2012. Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutation Research*. **746** (1): 56-59. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.02.012.
- 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 Crystallographica Section D*. **65** (7): 704-716. doi: 10.1107/S090744490901230X.
- Silva Calzada J. Efecto modulador del Resveratrol contra el promutageno Uretano con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, Cruza Estándar (CE). Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, UNAM, México. 2014. 68 pag.
- Soriano M., Cruz L. y Ortiz G. Biología, cultivo y manipulación de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Iztacala. UNAM. 1995. 23 pp.
- Suryadevara PK., Racherla KK., Olepu S., Norcross NR., Tatipaka HB., Arif JA., Planer JD., Lepesheva GI., Verlinde CL., Buckner FS. and Gelb MH. 2013. Dialkylimidazole inhibitors of *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase as anti-Chagas disease agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **23**: 6492-6499. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.08.015.
- Vázquez-Gómez G., Sánchez-Santos A., Vázquez-Medrano J., Quintanar-Zuñiga R., Monsalvo-Reyes AC., Piedra-Ibarra E., Dueñas-García IE., Castañeda-Partida L., Graf U. and Heres-Pulido ME. 2010. Sulforaphane



modelates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Food and Chemical Toxicology*. **48** (12): 3333-3339. doi: 10.1016/j.fct.2010.08.038.

- Velásquez AM., Ivo Francisco AI., Kohatsu AA., Silva FA., Rodrigues DF., Teixeira RG., Chiari BG., de Almeida MG., Isaac VL., Vargas MD. and Cicarelli RM. 2014. Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biological and Medical Chemistry Letters*. **24** (7): 1707-1710. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.02.046.
- Vogel EW. 1991. Genotoxic chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Apuntes del primer Taller Latinoamericano en Toxicología Genética en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México.
- Yang CS, Brady JF, Hong JY. 1992. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. *The FASEB Journal*. **6** (2): 737-744.



9. ANEXOS

9.1. Anexo 1, resultados de la prueba de U de Mann-Whitney, Cruza E

En la Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney sólo se comparan los datos contra la hipótesis nula. Se realiza mediante 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:

$p/2$ {
➤ si ≥ 0.05 entonces no es significativo.
➤ si < 0.05 entonces es significativo.

- si el valor de Z ajustada es positivo entonces:

$1 - p/2$ {
➤ si ≥ 0.05 entonces no es significativo.
➤ si < 0.05 entonces si es significativo.



Testigos, Cruza E.

1. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum etanol	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N etanol	2*1sided exact p
pequeñas	3449.500	3810.500	1619.500	-0.947379	0.343446	-1.03047	0.302791	60	60	0.344726
grandes	3750.000	3510.000	1680.000	0.629837	0.528802	1.31457	0.188657	60	60	0.531869
gemelas	3690.000	3570.000	1740.000	0.314918	0.752824	1.01285	0.311133	60	60	0.755682
totales	3599.500	3660.500	1769.500	-0.160083	0.872815	-0.17095	0.864262	60	60	0.873286
mwh	3599.500	3660.500	1769.500	-0.160083	0.872815	-0.17095	0.864262	60	60	0.873286

2. Diferencias significativas en todos los tipos de mancha entre el testigo agua vs DMN 76 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum DMN	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N DMN	2*1sided exact p
pequeñas	2748.500	4391.500	918.500	-4.52567	0.000006	-4.74775	0.000002	60	59	0.000004
grandes	3085.500	4054.500	1255.500	-2.73454	0.006247	-3.56234	0.000368	60	59	0.005949
gemelas	3357.000	3783.000	1527.000	-1.29153	0.196521	-2.31308	0.020719	60	59	0.198209
totales	2560.000	4580.000	730.000	-5.52754	0.000000	-5.68755	0.000000	60	59	0.000000
mwh	2627.500	4512.500	797.500	-5.16878	0.000000	-5.32770	0.000000	60	59	0.000000

GHPM, Cruza E.

3. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM2	2*1sided exact p
pequeñas	3678.500	3581.500	1751.500	0.254559	0.799064	0.27424	0.783903	60	60	0.799789
grandes	3543.000	3717.000	1713.000	-0.456632	0.647936	-1.00060	0.317023	60	60	0.650971
gemelas	3600.000	3660.000	1770.000	-0.157459	0.874883	-0.58226	0.560389	60	60	0.877408
totales	3632.500	3627.500	1797.500	0.013122	0.989531	0.01400	0.988832	60	60	0.989570
mwh	3639.500	3620.500	1790.500	0.049862	0.960232	0.05320	0.957571	60	60	0.960382

4. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μ M.



STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM4	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM4	2*1sided exact p
pequeñas	3610.000	3650.000	1780.000	-0.104973	0.916397	-0.11263	0.910325	60	60	0.918785
grandes	3543.000	3717.000	1713.000	-0.456632	0.647936	-1.00060	0.317023	60	60	0.650971
gemelas	3510.000	3750.000	1680.000	-0.629837	0.528802	-1.66842	0.095233	60	60	0.531869
totales	3548.000	3712.000	1718.000	-0.430388	0.666913	-0.45785	0.647058	60	60	0.669926
mwh	3548.000	3712.000	1718.000	-0.430388	0.666913	-0.45785	0.647057	60	60	0.669926

5. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM8	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM8	2*1sided exact p
pequeñas	3685.000	3575.000	1745.000	0.288675	0.772830	0.311031	0.755777	60	60	0.775642
grandes	3661.000	3599.000	1769.000	0.162708	0.870749	0.470021	0.638340	60	60	0.873286
gemelas	3660.000	3600.000	1770.000	0.157459	0.874883	1.000000	0.317311	60	60	0.877408
totales	3705.000	3555.000	1725.000	0.393648	0.693841	0.421612	0.673309	60	60	0.696814
mwh	3705.000	3555.000	1725.000	0.393648	0.693841	0.421612	0.673309	60	60	0.696814

6. Diferencias significativas sólo en mancha grandes entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM16	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM16	2*1sided exact p
pequeñas	3905.000	3355.000	1525.000	1.44338	0.148916	1.58508	0.112950	60	60	0.150133
grandes	3422.000	3838.000	1592.000	-1.09172	0.274958	-2.02556	0.042811	60	60	0.277214
gemelas	3600.000	3660.000	1770.000	-0.15746	0.874883	-0.58226	0.560389	60	60	0.877408
totales	3704.500	3555.500	1725.500	0.39102	0.695780	0.41861	0.675502	60	60	0.696814
mwh	3749.000	3511.000	1681.000	0.62459	0.532242	0.67063	0.502458	60	60	0.535311



GHPMF, Cruza E.

7. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U H

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF-2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF-2	2*1sided exact p
pequeñas	3819.000	3441.000	1611.000	0.991993	0.321202	1.08051	0.279918	60	60	0.323718
grandes	3600.500	3659.500	1770.500	-0.154835	0.876952	-0.38126	0.703008	60	60	0.877408
gemelas	3540.000	3720.000	1710.000	-0.472377	0.636658	-1.36477	0.172325	60	60	0.639704
totales	3699.500	3560.500	1730.500	0.364780	0.715276	0.39154	0.695400	60	60	0.716256
mwh	3759.000	3501.000	1671.000	0.677074	0.498359	0.72999	0.465398	60	60	0.501399

8. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF4	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF4	2*1sided exact p
pequeñas	3857.500	3402.500	1572.500	1.194065	0.232453	1.304857	0.191942	60	60	0.233383
grandes	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000	0.000000	1.000000	60	60	1.000000
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000	0.000000	1.000000	60	60	1.000000
totales	3824.000	3436.000	1606.000	1.018236	0.308567	1.100108	0.271286	60	60	0.311018
mwh	3848.000	3412.000	1582.000	1.144203	0.252540	1.238956	0.215363	60	60	0.254648

9. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM8	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM8	2*1sided exact p
pequeñas	3813.500	3446.500	1616.500	0.963125	0.335485	1.04787	0.294701	60	60	0.336749
grandes	3602.000	3658.000	1772.000	-0.146962	0.883162	-0.36193	0.717404	60	60	0.885660
gemelas	3570.000	3690.000	1740.000	-0.314918	0.752824	-1.01285	0.311133	60	60	0.755682
totales	3744.500	3515.500	1685.500	0.600969	0.547861	0.64510	0.518861	60	60	0.549190
mwh	3781.000	3479.000	1649.000	0.792544	0.428044	0.85280	0.393772	60	60	0.430956



10. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook3* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U H

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

Arial 10 B I U

Workbook3*

Nonparametr Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)

By variable Tratamiento

Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF16	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF16	2*1sided exact p
pequeñas	3880.500	3379.500	1549.500	1.314784	0.188583	1.44045	0.149740	60	60	0.189295
grandes	3572.500	3687.500	1742.500	-0.301797	0.762807	-0.69832	0.484979	60	60	0.763648
gemelas	3540.000	3720.000	1710.000	-0.472377	0.636658	-1.36477	0.172325	60	60	0.639704
totales	3803.500	3456.500	1626.500	0.910639	0.362486	0.98171	0.326242	60	60	0.363800
mwh	3810.500	3449.500	1619.500	0.947379	0.343446	1.02165	0.306946	60	60	0.344726



9.2. Anexo 1, Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney, Cruza BE

Testigos.

11. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum etanol	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N etanol	2*1sided exact p
pequeñas	3559.000	3701.000	1729.000	-0.372653	0.709407	-0.419842	0.674601	60	60	0.712353
grandes	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000	0.000000	1.000000	60	60	1.000000
gemelas	3720.000	3540.000	1710.000	0.472377	0.636658	1.746792	0.080674	60	60	0.639704
totales	3600.500	3659.500	1770.500	-0.154835	0.876952	-0.171021	0.864208	60	60	0.877408
mwh	3584.500	3675.500	1754.500	-0.238813	0.811251	-0.266368	0.789956	60	60	0.811935

12. Diferencias significativas en todos los tipos de mancha entre el testigo agua vs DMN 76 µM.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum DMN	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N DMN	2*1sided exact p
pequeñas	1960.500	5299.500	130.5000	-8.76260	0.000000	-8.91472	0.000000	60	60	0.000000
grandes	2332.000	4928.000	502.0000	-6.81273	0.000000	-7.66363	0.000000	60	60	0.000000
gemelas	2644.500	4615.500	814.5000	-5.17253	0.000000	-5.29666	0.000000	60	60	0.000000
totales	1922.000	5338.000	92.0000	-8.96468	0.000000	-9.08633	0.000000	60	60	0.000000
mwh	1925.000	5335.000	95.0000	-8.94893	0.000000	-9.08260	0.000000	60	60	0.000000

GHPM, Cruza BE.

13. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 µM.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM 2	2*1sided exact p
pequeñas	3696.000	3564.000	1734.000	0.346410	0.729035	0.38963	0.696808	60	60	0.731944
grandes	3570.000	3690.000	1740.000	-0.314918	0.752824	-0.65782	0.510654	60	60	0.755682
gemelas	3570.000	3690.000	1740.000	-0.314918	0.752824	-1.42019	0.155552	60	60	0.755682
totales	3622.000	3638.000	1792.000	-0.041989	0.966507	-0.04612	0.963218	60	60	0.968718
mwh	3584.500	3675.500	1754.500	-0.238813	0.811251	-0.26332	0.792304	60	60	0.811935



14. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM 4	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM 4	2*1sided exact p
pequeñas	3529.500	3373.500	1699.500	-0.05726	0.954341	-0.06372	0.949195	60	57	0.954517
grandes	3382.000	3521.000	1552.000	-0.86158	0.388921	-1.58198	0.113655	60	57	0.391812
gemelas	3450.000	3453.000	1620.000	-0.49077	0.623589	-1.79257	0.073043	60	57	0.626751
totales	3389.000	3514.000	1559.000	-0.82341	0.410278	-0.89251	0.372118	60	57	0.413238
mwh	3352.500	3550.500	1522.500	-1.02244	0.306573	-1.11191	0.266178	60	57	0.307799

15. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM 8	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM 8	2*1sided exact p
pequeñas	3356.500	3903.500	1526.500	-1.43550	0.151145	-1.55920	0.118950	60	60	0.151631
grandes	3600.000	3660.000	1770.000	-0.15746	0.874883	-0.34514	0.729992	60	60	0.877408
gemelas	3600.000	3660.000	1770.000	-0.15746	0.874883	-1.00000	0.317311	60	60	0.877408
totales	3296.000	3964.000	1466.000	-1.75305	0.079595	-1.88850	0.058960	60	60	0.080021
mwh	3255.000	4005.000	1425.000	-1.96824	0.049041	-2.12540	0.033554	60	60	0.049093

16. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)]

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPM 16	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPM 16	2*1sided exact p
pequeñas	3591.500	3668.500	1761.500	-0.202073	0.839860	-0.22415	0.822641	60	60	0.840447
grandes	3720.000	3540.000	1710.000	-0.472377	0.636658	-1.36477	0.172325	60	60	0.639704
gemelas	3540.000	3720.000	1710.000	-0.472377	0.636658	-1.74679	0.080674	60	60	0.639704
totales	3593.000	3667.000	1763.000	-0.194200	0.846020	-0.21268	0.831578	60	60	0.848633
mwh	3604.500	3655.500	1774.500	-0.133840	0.893529	-0.14781	0.882492	60	60	0.893925



GHPMF, Cruza BE.

17. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF2	2*1sided exact p
pequeñas	3477.500	3782.500	1647.500	-0.80042	0.423470	-0.87753	0.380198	60	60	0.424848
grandes	3506.000	3754.000	1676.000	-0.65083	0.515156	-1.25152	0.210747	60	60	0.518212
gemelas	3540.000	3720.000	1710.000	-0.47238	0.636658	-1.74667	0.080696	60	60	0.639704
totales	3332.500	3927.500	1502.500	-1.56147	0.118414	-1.67421	0.094090	60	60	0.118676
mwh	3294.500	3965.500	1464.500	-1.76092	0.078253	-1.89296	0.058364	60	60	0.078214

18. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF4	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF4	2*1sided exact p
pequeñas	3485.500	3654.500	1655.500	-0.608561	0.542816	-0.67006	0.502818	60	59	0.544162
grandes	3534.000	3606.000	1704.000	-0.350786	0.725749	-0.72951	0.465689	60	59	0.728697
gemelas	3540.000	3600.000	1710.000	-0.318896	0.749805	-1.43223	0.152079	60	59	0.752703
totales	3484.500	3655.500	1654.500	-0.613876	0.539298	-0.66853	0.503797	60	59	0.540648
mwh	3452.000	3688.000	1622.000	-0.786611	0.431510	-0.85986	0.389865	60	59	0.434462

19. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U

Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF8	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF8	2*1sided exact p
pequeñas	3643.500	3259.500	1606.500	0.564387	0.572491	0.63725	0.523965	60	57	0.573821
grandes	3534.000	3369.000	1704.000	-0.032718	0.973899	-0.07484	0.940341	60	57	0.976166
gemelas	3510.000	3393.000	1680.000	-0.163590	0.870054	-1.02598	0.304903	60	57	0.872686
totales	3627.500	3275.500	1622.500	0.477139	0.633264	0.52906	0.596765	60	57	0.634479
mwh	3591.500	3311.500	1658.500	0.280830	0.778841	0.31279	0.754442	60	57	0.779652



20. Sin diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Mann-Whitney U Test (Datos prueba U...]

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

Arial 10 B I U

Workbook2*
Nonparametr
Mann-Whitney U Test (Datos prueba U HB.sta)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum etanol	Rank Sum GHPMF16	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N etanol	Valid N GHPMF16	2*1sided exact p
pequeñas	3533.500	3369.500	1703.500	-0.035445	0.971725	-0.03943	0.968546	60	57	0.971834
grandes	3532.000	3371.000	1702.000	-0.043624	0.965204	-0.09976	0.920535	60	57	0.967504
gemelas	3450.000	3453.000	1620.000	-0.490771	0.623589	-1.79257	0.073043	60	57	0.626751
totales	3480.000	3423.000	1650.000	-0.327181	0.743531	-0.35728	0.720886	60	57	0.746511
mwh	3443.500	3459.500	1613.500	-0.526216	0.598739	-0.57668	0.564157	60	57	0.600024



9.3. Anexo 2, Resultados de las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald-Wolfowitz (W-W), CE.

Testigos.

1. K-S: Diferencias significativas entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos p...]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.875000	0.00	$p < .005$	44.50000	51.62500	6.740072	7.707835	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Spre...]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	9	8	42.44444	51.62500	-2.75081	0.005945	2.499388	0.012441	4	0

2. K-S: Diferencias significativas entre el testigo agua vs DMN 76 μM .

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos p...]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	-1.000000	0.00	$p < .001$	44.50000	148.0000	6.740072	41.06093	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo agua vs DMN 76 μM .



STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	9	8	42.44444	148.00000	-3.75648	0.000172	3.505058	0.000457	2	0

GHPM, Cruza E.

3. K-S: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 μM .

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.125000	0.375000	$p > .10$	51.62500	50.00000	7.707835	6.782330	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	50.00000	-1.03510	0.300624	0.776324	0.437558	7	4

4. K-S: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μM .



STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	-0.125000	0.125000	$p > .10$	51.62500	51.25000	7.707835	8.154753	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	51.25000	0.517549	0.604773	0.258775	0.795809	10	4

5. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μM .

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E3	Std.Dev. C1	Std.Dev. E3	Valid N C1	Valid N E3
frecuencias	0.00	0.875000	$p < .005$	51.62500	43.25000	7.707835	6.204837	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E3	Mean C1	Mean E3	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	43.25000	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

6. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μM .



STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Dato

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

Workbook6*

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E4	Std.Dev. C1	Std.Dev. E4	Valid N C1	Valid N E4
frecuencias	0.00	0.875000	$p < .005$	51.62500	42.00000	7.707835	7.928250	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Workbook4*

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E4	Mean C1	Mean E4	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	42.00000	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

GHPMF, Cruza E.

7. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μM .

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Dato

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

Workbook6*

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.048077	0.721154	$p < .005$	51.62500	43.61538	7.446476	7.077411	16	13

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Workbook4*

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	41.12500	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

8. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μM .



STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	0.00	0.875000	$p < .001$	51.62500	41.12500	7.446476	5.083236	16	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	41.12500	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

9. K-S: Diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μM .

STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E3	Std.Dev. C1	Std.Dev. E3	Valid N C1	Valid N E3
frecuencias	0.00	0.875000	$p < .001$	51.62500	43.00000	7.446476	6.233550	16	8

W-W: Diferencias significativas en ningún tipo de mancha entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E3	Mean C1	Mean E3	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	43.00000	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

10. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 μM .



STATISTICA - [Workbook6* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)

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

Arial 10 B I U

Workbook6*
Nonparametr
Kolmo
Nonparametr
Kolmo
Nonparametr

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E4	Std.Dev. C1	Std.Dev. E4	Valid N C1	Valid N E4
frecuencias	0.00	0.875000	p < .001	51.62500	37.12500	7.446476	4.853202	16	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 µM.

STATISTICA - [Workbook4* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Arial 10 B I U

Workbook4*
Nonparametr
Wald-1
Wald-1
Nonparametr
Wald-1

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

Variable	Valid N C1	Valid N E4	Mean C1	Mean E4	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	51.62500	37.12500	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0



9.4. Anexo 2, Resultados de las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Wald-Wolfowitz (W-W), Cruza BE.

Testigos.

11. K-S: Sin diferencias significativas entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %.

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test]

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet38)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.375000	0.125000	$p > .10$	38.25000	38.37500	4.803273	6.781013	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo Agua miliQ vs EtOH 2 %.

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.25000	38.37500	1.035098	0.300624	0.776324	0.437558	11	5

12. K-S: Diferencias significativas entre el testigo agua vs DMN 76 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test]

Kolmogorov-Smirnov Test (Spreadsheet38)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differe	Max Pos Differe	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	-1.00000	0.00	$p < .001$	38.25000	455.3750	4.803273	141.5536	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo agua vs DMN 76 μM .



STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Workbook2*

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.25000	455.3750	-3.62284	0.000291	3.364070	0.000768	2	0

GHPM, Cruza BE.

13. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 μ M.

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos p

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

Workbook4*

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.750000	0.00	p < .025	38.37500	40.12500	6.781013	6.664136	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 2 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Workbook2*

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	40.12500	-1.55265	0.120508	1.293873	0.195710	6	1

14. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μ M.

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos

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

Workbook4*

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	-0.750000	0.00	p < .025	38.37500	41.87500	6.781013	8.114141	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 4 μ M.



STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	41.87500	-1.55265	0.120508	1.293873	0.195710	6	1

15. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos

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

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E3	Std.Dev. C1	Std.Dev. E3	Valid N C1	Valid N E3
frecuencias	-0.875000	0.00	$p < .005$	38.37500	56.37500	6.781013	5.998512	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 8 μM .

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S

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

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E3	Mean C1	Mean E3	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	56.37500	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	2

16. K-S: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos

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

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E4	Std.Dev. C1	Std.Dev. E4	Valid N C1	Valid N E4
frecuencias	-0.125000	0.375000	$p > .10$	38.37500	38.37500	6.781013	6.300510	8	8

W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPM 16 μM .



STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E4	Mean C1	Mean E4	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	38.37500	0.00	1.000000	-0.258775	0.795809	9	4

GHPMF, Cruza BE.

17. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E1	Std.Dev. C1	Std.Dev. E1	Valid N C1	Valid N E1
frecuencias	-0.875000	0.00	$p < .005$	38.37500	49.00000	6.781013	9.739463	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 2 μM .

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (S)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E1	Mean C1	Mean E1	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	49.00000	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

18. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μM .

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E2	Std.Dev. C1	Std.Dev. E2	Valid N C1	Valid N E2
frecuencias	-0.875000	0.125000	$p < .005$	38.37500	44.12500	6.781013	10.92098	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 4 μM .



STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Datos)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

Variable	Valid N C1	Valid N E2	Mean C1	Mean E2	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	44.12500	-3.10530	0.001901	2.846520	0.004420	3	0

19. K-S: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E3	Std.Dev. C1	Std.Dev. E3	Valid N C1	Valid N E3
frecuencias	0.00	0.875000	p < .005	38.37500	30.50000	6.781013	4.407785	8	8

W-W: Diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 8 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Datos)]

Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

Variable	Valid N C1	Valid N E3	Mean C1	Mean E3	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	30.50000	-2.58775	0.009661	2.328971	0.019861	4	0

20. K-S: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook4* - Kolmogorov-Smirnov Test (Datos)]

Kolmogorov-Smirnov Test (Datos prueba K-S Bioactivada.sta)
By variable tratamiento
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Max Neg Differnc	Max Pos Differnc	p-level	Mean C1	Mean E4	Std.Dev. C1	Std.Dev. E4	Valid N C1	Valid N E4
frecuencias	0.00	0.625000	p < .10	38.37500	35.50000	6.781013	6.141196	8	8



W-W: Sin diferencias significativas entre el testigo EtOH 2 % vs GHPMF 16 μ M.

STATISTICA - [Workbook2* - Wald-Wolfowitz Runs Test (Sp

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

Arial 10 B I U

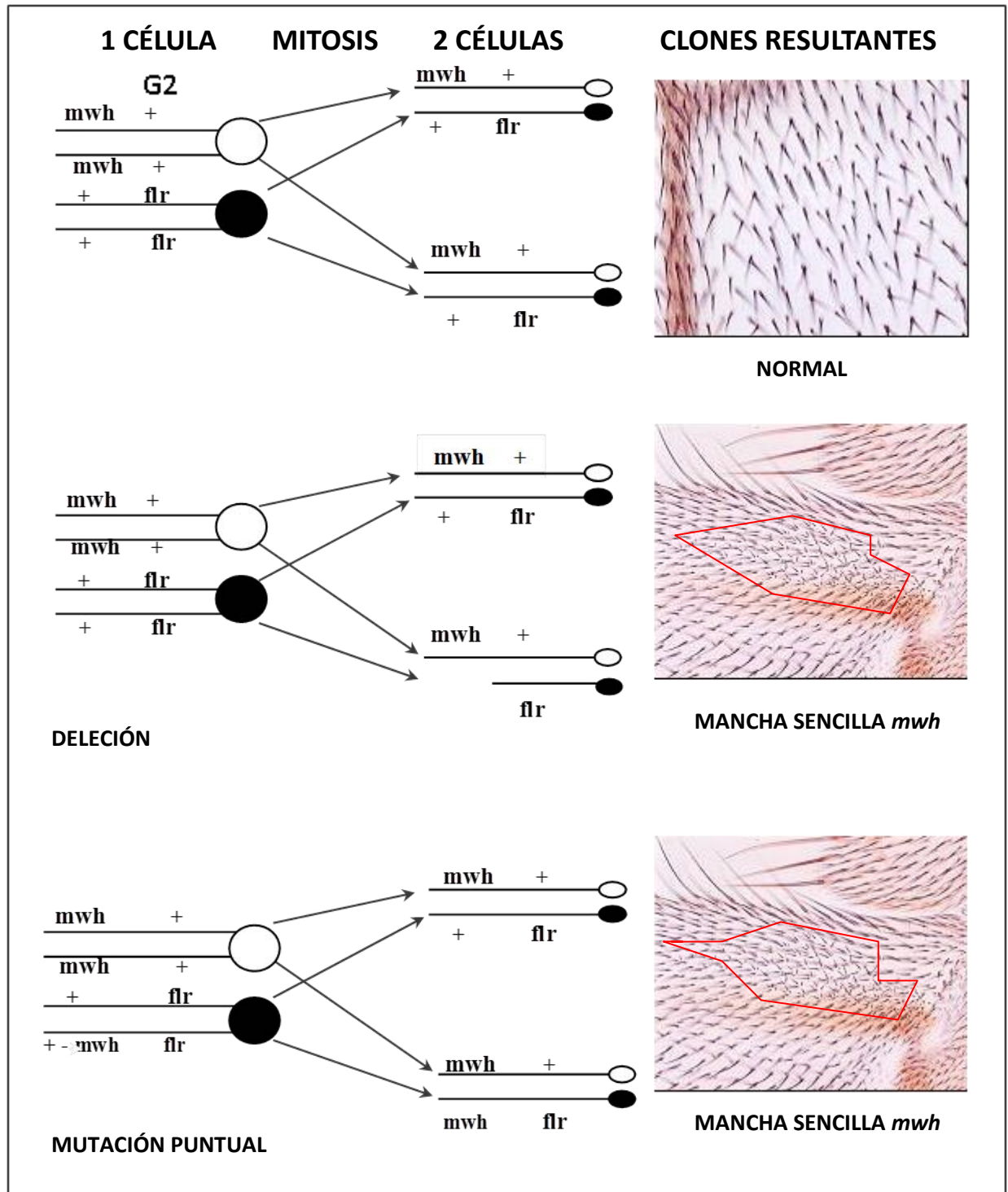
Workbook2*
Nonparametr
Wald-1
Wald-1
Nonparametr
Wald-1

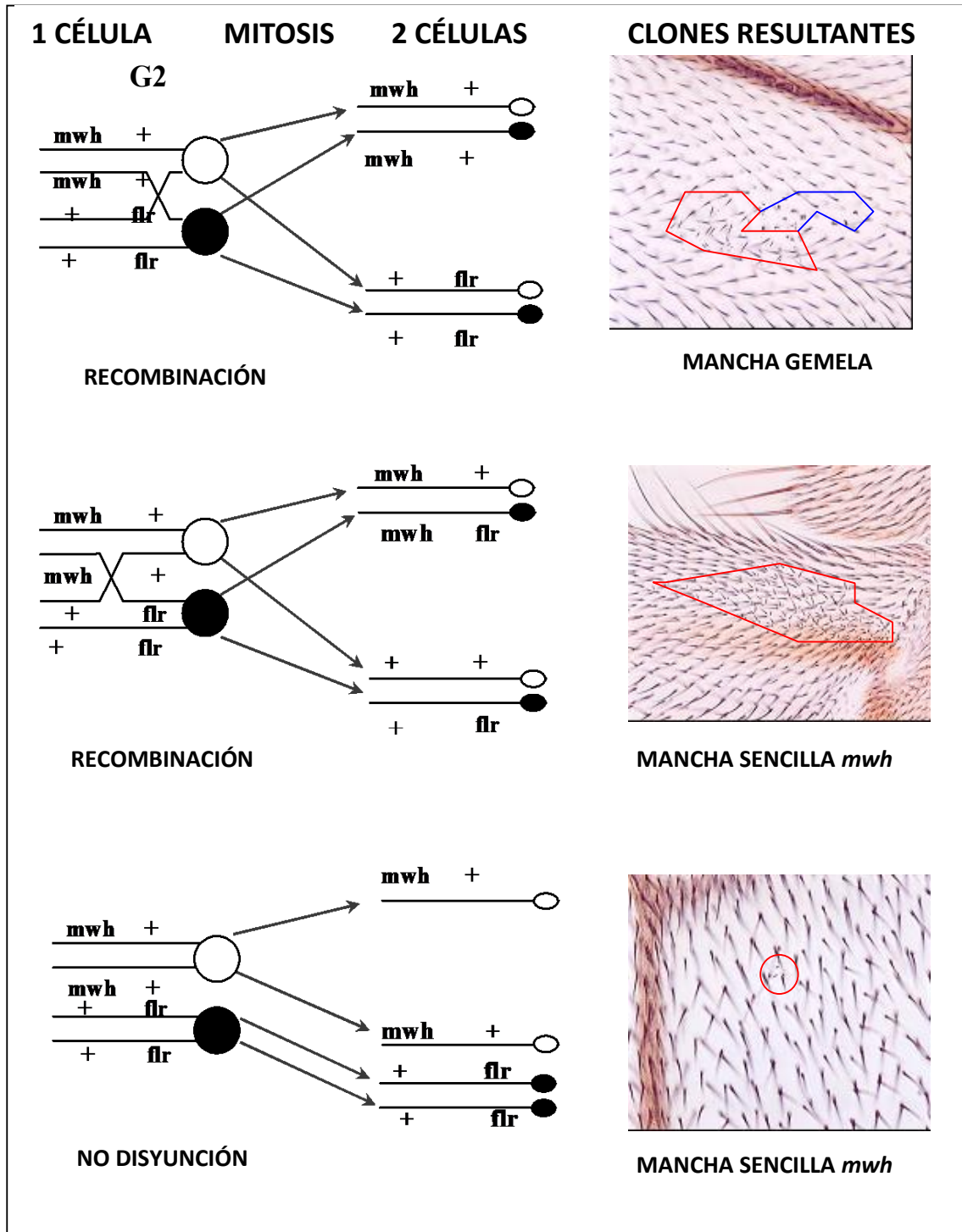
Wald-Wolfowitz Runs Test (Spreadsheet4)
By variable Tratamiento
Marked tests are significant at $p < .05000$

Variable	Valid N C1	Valid N E4	Mean C1	Mean E4	Z	p-level	Z adjstd	p-level	No. of Runs	No. of ties
frecuencias	8	8	38.37500	35.50000	-0.517549	0.604773	0.258775	0.795809	8	2



Anexo 9.5. Eventos genéticos que conducen a la pérdida de heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (Graf et al., 1984).





La prueba SMART se basa en la pérdida de heterocigosis de los marcadores genéticos *mwh* y *flr*³. Si no existe alteración genética ocasionada por compuestos genotóxicos la expresión fenotípica de los tricomas o cerdas en las alas se da en



su condición silvestre; sin embargo, si los genotoxícos provocan eventos tales como delección, mutación puntual, recombinación distal al centrómero o no disyunción, se genera la expresión fenotípica de alguno de los dos marcadores genéticos (*mwh* como cerdas múltiples en las alas, y *flr³* como cerdas cortas, deformes o en forma de flama). Además también es posible reconocer la aparición de eventos de recombinación cercana al centrómero, por la expresión fenotípica de ambos marcadores en zonas aledañas.



10. GLOSARIO

Alquilación: transferencia de un grupo alquilo de una molécula a otra. El alquilo suele transferirse a modo de carbatión alquilo, o también como un radical libre, carbanión, entre otros. La alquilación con un solo átomo de carbono se denomina metilación.

Aneuploidía: pérdida o ganancia de cromosomas en uno o pocos pares cromosómicos, esta condición se asocia con alteraciones fenotípicas por ejemplo en humanos como deficiencia física, mental o ambas. La aneuploidía se puede observar frecuentemente en las células cancerosas.

Antineoplástico: sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas. Su uso es común en quimioterapia.

Apoptosis: también llamada “muerte celular programada”, es el proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares. La apoptosis es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis del número de células y en la defensa frente a patógenos.

La apoptosis se inicia con la disminución del volumen celular y pérdida de las características de adhesión, seguida de la degradación de proteínas y fragmentación del DNA, condensación cromatínica, aparición de burbujas en superficie, fragmentación del núcleo, formación de cuerpos apoptóticos y finalmente, fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos por macrófagos.

BALB/cJ: Subcepa de ratón albino usado en la investigación del cáncer, debido a que son susceptibles de desarrollar cáncer de pulmón, riñón y neoplasia reticular.

Carcinogenicidad: capacidad de los agentes físicos, químicos o biológicos para producir tejido tumoral, o crecimiento por proliferación celular descontrolada y que continúa aún después de haber cesado el estímulo inicial que lo desencadenó.



Caspasas: familia de proteasas involucradas principalmente en la apoptosis y en la activación de citoquinas proinflamatorias. Son cisteín proteasas específicas de ácido aspártico que tienen una cisteína en su sitio activo y producen proteólisis en residuos de ácido aspártico de sus sustratos. Además de la activación de la apoptosis, las caspasas actúan sobre enzimas encargadas de la reparación del DNA y sobre proteínas estructurales como las de la lámina nuclear y la actina a las que degradan, y sobre endonucleasas a las que activan.

Células Vero: linaje celular aislado a partir de células epiteliales del riñón obtenidas del mono verde africano (*Chlorocebus* sp). El linaje de las células Vero es continuo y aneuploidogénico, es decir, puede dividirse a través de ciclos continuos de replicación y presenta un número anormal de cromosomas.

Citotóxico: sustancia, fármaco o cualquier otro agente que destruye o tiene efectos tóxicos sobre la célula.

Citocromos P450 (Cyp450s): familia de hemoproteínas, responsables del metabolismo oxidante de sustancias endógenas y exógenas como los xenobióticos. Los Cyp450s están presentes en numerosas especies, desde bacterias hasta mamíferos, y se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. Una de las características más importantes de estas enzimas es su baja especificidad, lo que les permite metabolizar muchos sustratos, a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Las reacciones catalizadas por los Cyp450s son reacciones de monooxidación dependientes de NADPH y para las que usan oxígeno molecular. Los Cyp450s adicionan grupos funcionales a sus sustratos haciéndolos más hidrosolubles para facilitar su eliminación, pero también en algunos casos este proceso activa ciertos xenobióticos (promutagenos).

Clastogénico: adjetivo aplicado a cualquier sustancia o proceso que causa rupturas cromosómicas.



Concentración letal media (CL₅₀): concentración de un compuesto a la que muere 50% de una población estudiada.

Deleción cromosómica: pérdida de segmentos de un cromosoma o de una cantidad muy pequeña de material genético, puede ser un solo gen.

Discos imaginales: sacos de células epiteliales encontrados en las larvas de los insectos holometábolos, representan los primordios de estructuras cuticulares del adulto que se formarán durante la transformación pupal y que formarán las alas, patas, antenas, ojos, torax, cabeza y genitales; están compuestos por grupos de células imaginales pero indiferenciadas.

Distribución de frecuencias acumuladas: agrupación de datos en categorías mutuamente excluyentes que indican el número de observaciones en cada categoría. Esta agrupación se hace con base en la suma de las frecuencias absolutas de todos los valores inferiores o iguales al valor considerado. Entonces la frecuencia acumulada es la frecuencia estadística con que el valor de una variable aleatoria es menor que o igual a un valor de referencia.

Ergosterol: esterol que es precursor biológico de la vitamina D2. También es componente de la membrana celular de los hongos y de algunos protozoos (tales como *Trypanosoma*), cumple la función que el colesterol realiza en la células animales. Razón por la cual son blanco para el estudio de drogas antifúngicas y tripanocidas.

Estrés oxidante: ocurre cuando hay un desequilibrio en las células debido a un aumento en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o los radicales libres y/o una disminución en los antioxidantes. Con el tiempo este desajuste puede dañar los tejidos.



Genotóxico: adjetivo aplicado a cualquier sustancia capaz de causar daños al DNA.

Heterocigosis: que tiene dos genes diferentes en el *locus* correspondiente de cromosomas homólogos. Un individuo heterocigoto para un rasgo particular ha heredado un gen para ese rasgo de un progenitor y el gen alternativo del otro progenitor.

Homocigosis: que tiene los dos genes similares en el *locus* correspondiente de cromosomas homólogos. Un individuo homocigoto para un rasgo particular ha heredado un gen para ese rasgo de un progenitor y el mismo gen del otro progenitor.

Hormesis: proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, induce un efecto benéfico en la célula u organismo.

Inversión cromosómica: se origina cuando un segmento de un cromosoma cambia de orientación. Para ello deben producirse dos rupturas dentro del mismo cromosoma, posteriormente el segmento gira 180° y finalmente se vuelve a unir.

Metoxilo: en química orgánica, es un grupo funcional o radical consistente en un grupo metilo unido a un oxígeno.

MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio): Ensayo colorimétrico de proliferación celular basado en la transformación de tetrazolium a formazan.

Mutación puntual: cualquier cambio en un nucleótido o la secuencia de bases nitrogenadas del DNA un ser vivo, la mutación se produce de manera espontánea o inducida y que puede o no ser heredada.



No-disyunción: fallo en la correcta separación de cromosomas homólogos durante la división celular, la consecuencia es que produce aneuploidías.

Proteína citotóxica (Tc-TOX) de *T. cruzi*: Proteína segregada por la forma tripomastigote para perforar las células del hospedero.

Quinazolina: es un compuesto formado por dos anillos aromáticos simples enlazados; un anillo de benceno y otro de pirimidina. En medicina empleado como agente anticáncer y antimalarial.

Teratogenicidad: es una manifestación de toxicidad en la reproducción, caso particular de la embrio-fetotoxicidad, demostrada por la producción o incremento de la frecuencia de malformaciones estructurales, congénitas, no hereditarias, en la progenie, visualmente detectables al nacimiento.

Timidilato-sintasa: es una enzima metiltransferasa homodimérica que cataliza la reacción de síntesis de timidilato (dTMP). Esta reacción es un paso fundamental en la formación de desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP); metabolito necesario para la correcta síntesis y reparación del DNA.

Toxicidad: Capacidad de los agentes físicos, químicos o biológicos de causar daño en los organismos.

Xenobiótico: se deriva del vocablo griego “xeno”: extraño y “bio”: vida, se refiere a compuestos cuya estructura química es extraña al organismo, pero que tiene la propiedad de ingresar a éste. Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son sintéticos, pero otros tienen origen natural. Por ejemplo: micotoxinas, pesticidas, medicamentos, alimentos, entre otros.