



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación del efecto
genotóxico de la quercetina en la
prueba SMART en ala de
Drosophila melanogaster”**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

Magali Aimeé Valderrábano Franco

DIRECTOR DE TESIS

Mtro. Luis Felipe Santos Cruz

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



BIOLOGIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

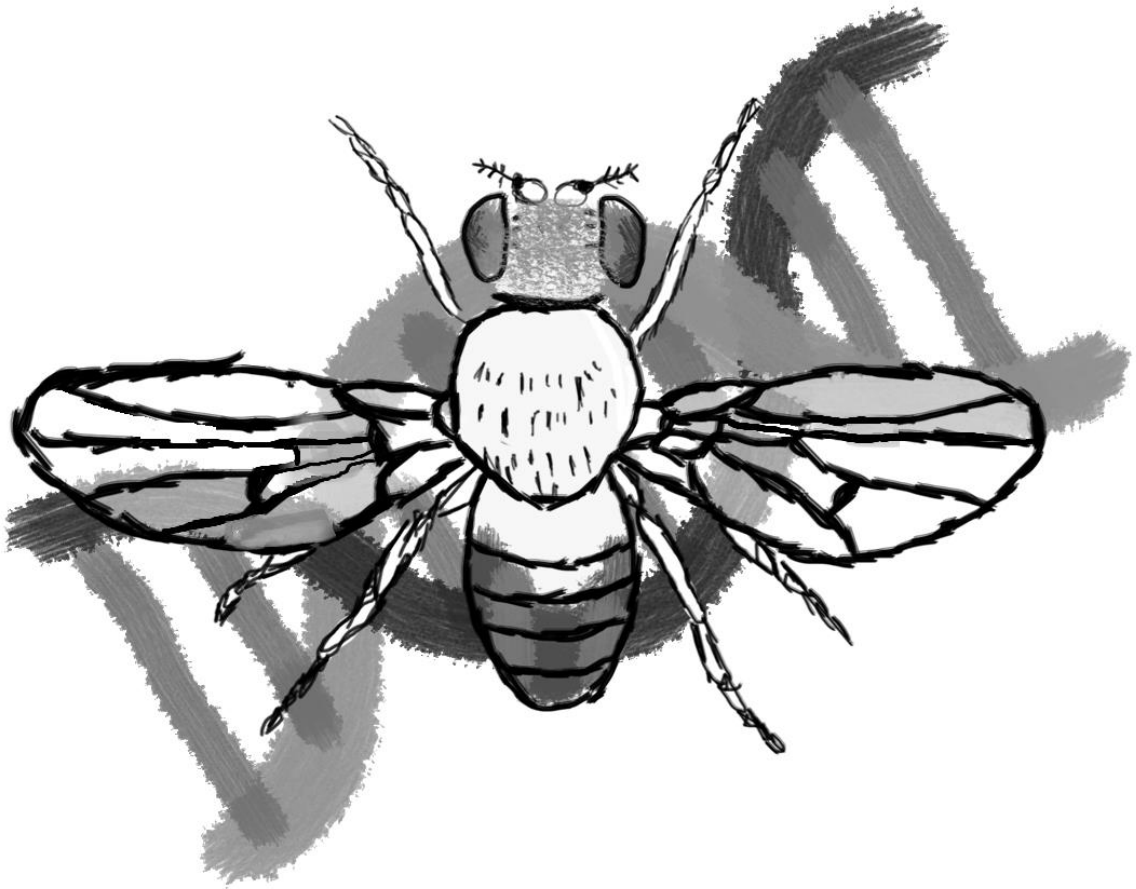


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Nuestra sociedad, en la que reina un urgente deseo de riquezas y lujos, no entiende el valor de la ciencia. No se da cuenta de que la ciencia es una de las partes más preciosas de su patrimonio moral. Ni ha asumido de modo suficiente, el hecho de que la ciencia está en la base de todo el progreso que aligera la carga de la vida y disminuye el sufrimiento.

Marie Curie

Dedicatoria

A mis padres y hermanos.
Sin ustedes, esto no habría sido posible.

Gracias.

Agradecimientos

A mis padres Jaime y Magali, por cuyo cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida. Este logro es suyo.

A mis hermanos Fernando, Armando y Valeria, quienes fueron la principal inspiración que me impulsó a llegar hasta aquí.

A mis abuelos, cuatro pilares importantes en mi vida y a quienes debo mi amor por la biología.

A mi primo Edgar, por su comprensión y afecto, que nos ha unido como hermanos.

Al resto de mi familia, que son tantos, que nunca terminaría de mencionarlos a todos. Gracias por su cariño y apoyo.

A mi novio Daniel, quien nunca dejó que me diera por vencida y a cada paso me recordaba lo orgulloso que estaba de mí.

A mis amigas, Pamela, Ximena, Andrea, Ana y Cristina, quienes se cruzaron en mi camino en diferentes épocas de mi vida, pero siempre me brindaron todo su apoyo, tanto profesional como personalmente.

Agradecimientos

A la Mtra. Ma. Eugenia Heres Pulido, por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio de genética toxicológica y por todos sus invaluable consejos.

A mis asesores, la Mtra. Irma Elena Dueñas García, la Mtra. Laura Castañeda Partida, el Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla y la Dra. Ana María García Bores por su valiosa contribución en este proyecto.

Al Mtro. Luis Felipe Santos Cruz, por aceptar ser mi tutor, por todos sus consejos y su tiempo. Mi respeto y admiración por siempre.

Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica PAPIIT , por concederme una beca para la conclusión de este proyecto (clave: IN227619).

Finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a quien le debo mi formación profesional

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Toxicología	2
2.2 Toxicología genética	2
2.3 Xenobióticos	2
2.4 Flavonoides	3
2.5 Quercetina	6
2.6 Estudios de genotoxicidad	7
2.7 SMART	7
3. ANTECEDENTES	
3.1 Efecto antigenotóxico de la quercetina	15
3.3 Efecto genotóxico de la quercetina	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Compuestos químicos	18
7.2 Material biológico	18
7.3 Cultivo y propagación de <i>D. melanogaster</i>	18
7.4 Cruzas y colecta de huevos para la prueba SMART	19
7.5 Diseño experimental	19
7.6 Prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	21
7.7 Análisis estadístico	21

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Efecto genotóxico de quercetina en cruza estándar (CE).....	23
8.2 Distribución del tamaño de clones mutantes en cruza estándar (CE)	29
8.3 Efecto genotóxico de quercetina en cruza de bioactivación elevada (CBE)	33
8.4 Distribución del tamaño de clones mutantes en cruza de bioactivación elevada (CBE)	40
8.5 Efecto genotóxico de quercetina en ambas cruzas	44
8.6 Distribución del tamaño de clones mutantes en ambas cruzas	52
9. CONCLUSIONES	58
10. LITERATURA CITADA	59
11. ANEXOS	
11.1 Metabolismo xenobiótico	72
11.2 Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	75
11.3 Colecta de huevos	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los flavonoides

Figura 2. Estructura de los diferentes tipos de flavonoides

Figura 3. Estructura molecular de la quercetina

Figura 4. Frutas y verduras con mayor concentración de quercetina

Figura 5. Expresión fenotípica de los marcadores *mwh* y *flr³*

Figura 6. Esquema de ala de *D. melanogaster* que expresa fenotípicamente el gen *Bd^{ser}*

Figura 7. Discos imagales y las estructuras a las que dan origen

Figura 8. Tipos de manchas

Figura 9. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde no ocurre ningún evento genotóxico

Figura 10. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una no disyunción

Figura 11. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una mutación puntual

Figura 12. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una delección

Figura 13. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una recombinación distal al centrómero

Figura 14. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una recombinación cercana al centrómero

Figura 15. Cultivos de las cepas multiple wing hairs, flare y Oregon R (R)-flare

Figura 16. Tubos de ensayo con organismos y tratamientos

Figura 17. Preparaciones permanentes

Figura 18. Falta de genotoxicidad de, Ac-OH y Vit-C en *D. melanogaster* CE

Figura 19. Genotoxicidad de 4NQO en *D. melanogaster* CE

Figura 20. Falta de genotoxicidad de cinco concentraciones diferentes de quercetina en *D. melanogaster* CE.

Figura 21. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua, comparado con los testigos Ac-OH y Vit-C en CE.

-
- Figura 22.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con el testigo positivo 4NQO en CE.
- Figura 23.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con cinco concentraciones diferentes de quercetina en CE.
- Figura 24.** Diagrama del metabolismo de etanol en *D. melanogaster*
- Figura 25.** Genotoxicidad de Ac-OH y Vit-C en *D. melanogaster* CBE
- Figura 26.** Genotoxicidad de 4NQO en *D. melanogaster* CBE.
- Figura 27.** Genotoxicidad de cinco concentraciones diferentes de quercetina en *D. melanogaster* CBE
- Figura 28.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua, comparado con los testigos Ac-OH y Vit-C en CBE.
- Figura 29.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con el testigo positivo 4NQO en CBE.
- Figura 30.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con cinco concentraciones diferentes de quercetina en CBE.
- Figura 31.** Genotoxicidad del testigo negativo agua en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 32.** Genotoxicidad del testigo disolvente Ac-OH en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 33.** Genotoxicidad del testigo prooxidante Vit-C en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 34.** Genotoxicidad del testigo positivo 4NQO en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 35.** Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.023 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 36.** Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.047 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*
- Figura 37.** Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.095 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 38.** Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.19 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 39.** Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.38 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
- Figura 40.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua en ambas cruzas de *D. melanogaster*
- Figura 41.** Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
-

Figura 42. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo prooxidante Vit-C en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Figura 43. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo positivo 4NQO en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Figura 44. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.023 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Figura 45. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.047 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Figura 46. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.095 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*

Figura 47. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.19 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Figura 48. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del tratamiento quercetina 0.38 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de algunos estudios donde se ha encontrado un efecto antigenotóxico de la quercetina.

Tabla 2. Resumen de algunos estudios donde se ha encontrado un efecto marcadamente genotóxico de la quercetina.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM, Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM, Q-0.38 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.047 mM, Q-0.023mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Tabla 4. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM/ Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM, Q-0.38 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.047 mM, Q-0.023mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Tabla 6. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CBE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM, Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Q-0.38 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.047 mM, Q-0.023mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Tabla 9. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CE y CBE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

LISTA DE ABREVIATURAS

4HAQO: 4-óxido de hidrolaminoquinolina	NADPH: cofactor Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato
4NQO: 4-óxido de nitroquinolina	O₂: Oxígeno diatómico
Ac-OH: mezcla de acetona-etanol 2%	O₂⁻: Aniones superóxidos
Acetil-CoA: Acetil coenzima A	OH: Grupo hidroxilo
ADH: Enzima alcohol deshidrogenasa	· OH: Radicales hidróxidos
ADME: ciclo intraórgánico	OR(R)/flr³: marcador recesivo Oregon-flare
ADN: Ácido desoxirribunocléico	Q-0.38: quercetina 0.38 mM
AhR: Receptor de hidrocarburos de arilos	Q-0.19: quercetina 0.19 mM
ALDH: Enzima aldehído deshidrogenasa	Q-0.095: quercetina 0.095 mM
Bd^{ser}: gen dominante Beaded-Serratia	Q-0.047: quercetina 0.047 mM
CBE: cruza de bioactivación elevada	Q-0.023: quercetina 0.023 mM
CE: Cruza estándar	Radiación UV: Radiación ultravioleta
CHO: Células de ovario de hámster chino	ROOH: hidroperóxidos
CYP450: Citocromo P450	ROS: Especies reactivas de oxígeno
<i>D. melagonaster.</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	SLRL: Análisis de letales recesivos ligados al sexo
DDT: pesticida diclorodifeniltricloroetano	SOD: enzima superóxido dismutasa
flr³: marcador recesivo "flare"	SMART: Somatic Mutation and Recombination Test (Prueba de mutación y recombinación somática)
GSH: Tripéptido glutatión reducido	TM3: Balanceador de la cepa flare que mantiene el marcador en heterocigosis
GST: Enzima glutatión S-transferasa	Vit-C: vitamina C
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno	
H₀: Hipótesis nula	
H_a: Hipótesis alternativa	
LOH: pérdida de heterocigosis	
MEOS: Sistema microsomal de oxidación del etanol	
mwh: marcador recesivo "multiple wing hair"	

RESUMEN

La quercetina es el flavonoide más consumido en el mundo debido a su abundancia en frutas, verduras y otros alimentos; es reconocido por su gran capacidad antioxidante, sin embargo, también existen reportes de que en ciertas condiciones puede volverse prooxidante pudiendo causar daños genéticos. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la genotoxicidad de la quercetina mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* que permite detectar agentes genotóxicos de forma rápida y económica. Para ello, se realizaron dos cruzas, estándar (CE) y de bioactivación elevada (CBE) que difieren en la expresión de los CYP450; las larvas de ambas cruzas fueron alimentadas con 5 concentraciones de quercetina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM), agua MiliQ, acetona-etanol (2%), vitamina C (5.6 mM) o 4NQO (2 mM). A los adultos procedentes de las larvas tratadas se les diseccionaron las alas y colocaron en preparaciones permanentes, para su observación en microscopio a 400x, donde se obtuvieron las frecuencias de cada tipo de mancha por tratamiento, y se compararon mediante el programa informático SMART PC-versión 2.1 basado en la prueba de Kastenbaum-Bowman ($p < 0.05$), la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.05$) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos mostraron que en la CE la quercetina no fue genotóxica a ninguna concentración, debido a su capacidad antioxidante. En cambio, en la CBE se encontró daño genotóxico, que pudo deberse a que la quercetina es capaz de auto-oxidarse en anión superóxido y de interferir con la actividad de los CYP450. Finalmente, en ambas cruzas se encontró efecto citotóxico probablemente provocado por la activación enzimática de quercetina que produce o-semiquinona y o-quinona, las cuales facilitan la formación de superóxidos y H_2O_2 . En conclusión, la quercetina sólo causó genotoxicidad en la CBE reconociendo así la participación de los CYP450 en dicho efecto; mientras que, en ambas cruzas provocó citotoxicidad.

Palabras clave: quercetina, citotoxicidad, *Drosophila melanogaster*, citocromo P450, genotoxicidad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Toxicología

Etimológicamente, la palabra Toxicología significa “ciencia que estudia los venenos”, ya que proviene del latín *toxicum* “veneno” y del griego *logia* “estudio o tratado” (Pérez-Barly *et al.*,2014); más apropiadamente, la toxicología es la ciencia que estudia todas aquellas sustancias químicas y agentes físicos capaces de producir alteraciones patológicas en los organismos, además, se encarga de evaluar los mecanismos de acción de tales variaciones, los medios para contrarrestarlos, los procedimientos para identificar los agentes tóxicos y valorar su grado de toxicidad (Giannuzzi, 2018).

2.2 Toxicología genética

Dentro de la Toxicología como ciencia, se encuentra la Toxicología genética, que es la disciplina que se encarga del estudio e identificación de todos aquellos agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos (genotóxicos), provocándoles diversos daños hereditarios desde mínimos hasta letales, tanto en células somáticas como germinales; es decir, analiza la relación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y las posibles alteraciones genéticas que dicha exposición puede provocar (Smart y Hodgson, 2008).

2.3 Xenobióticos

Los xenobióticos, son aquellos agentes químicos externos capaces de dañar a un organismo, y se llaman así, debido a que no forman parte de su metabolismo natural, sin embargo, sí son capaces de incorporarse a las rutas metabólicas en diferentes etapas para ser procesados gracias a que poseen propiedades lipofílicas que les permiten atravesar las membranas celulares con facilidad (Josephy, 2006).

Dentro de un organismo, el agente xenobiótico pasa por un proceso que se conoce como ciclo intraórganico (ADME) o metabolismo xenobiótico, el cual tiene cuatro etapas:

1. Absorción
2. Distribución
3. Metabolismo
4. Excreción

Cada una de las etapas del metabolismo xenobiótico posee diferentes rutas o variantes (Anexo 1), sin embargo, la finalidad es la misma: transformar el xenobiótico para que el organismo sea capaz de eliminarlo sin que provoque daño alguno (Roldán-Reyes, 2016).

En este sentido, es importante destacar la participación de los citocromos P450 (CYP450) (del griego *cit*os: “célula” y *croma*: “color”) dentro de la etapa tres metabolismo xenobiótico; que son una superfamilia de hemoproteínas monooxidasas del sistema oxidasa (Rodríguez-González y Rodeira-Guerra, 2014); descubiertos en las décadas de los 50's cuando el investigador alemán Martin Klingenberg, observó durante sus estudios con el citocromo b5, la presencia de un pigmento unido al monóxido de carbono con una banda de absorbancia máxima a 450nm de longitud de onda; por este motivo, se la denominó citocromo P450 (P por pigmento y 450 por su pico de absorbancia en el UV) (Gallego-Fernández, 2011). Su función principal es transformar los xenobióticos en moléculas más polares e hidrosolubles y, por tanto, más fáciles de excretar (Guengerich, 2012). Están presentes en una gran variedad de tejidos como, riñón, intestino, piel, pulmón, testículos, placenta y principalmente en el hígado (Ding y Kaminsky, 2003). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza: desde bacterias, protistas, plantas, insectos, aves y hasta mamíferos (Nelson, 2011). En la actualidad se conocen más de 18 000 secuencias de CYP450 agrupadas en diferentes familias, aunque estos datos están en constante evolución (Guengerich, 2013).

Si bien, los CYP450 se encuentran en prácticamente en todos los seres vivos; existen algunos tipos exclusivos para una sola especie como es el caso de CYP2A6 que metaboliza fármacos antiepilépticos y CYP3A4 que metaboliza fenobarbital, carbamazepin, dexametaxona y glucocorticoides; los cuales se localizan solamente en los seres humanos (Nelson, 2009). Aunque, también existen casos en que diferentes especies comparten citocromos análogos, como es el caso de la familia Cyp6 en *Drosophila melanogaster* y la familia CYP3 en vertebrados (Danielson *et al.*, 1998).

Existen una gran variedad de xenobióticos, como fármacos, cosméticos, aditivos alimenticios, pesticidas, contaminantes, etc., que son de origen industrial; sin embargo, también existen los denominados xenobióticos de origen natural que se encuentran en muchas plantas, frutos, hongos, etc., tales como las micotoxinas, alcaloides, saponinas, glucósidos, flavonoides, etc. (Josephy, 2006; Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000).

2.4 Flavonoides

Los flavonoides, son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas vasculares (Dixon y Pasinetti, 2010; Estrada-Reyes *et al.*, 2012;), ya que, se encuentran presentes en una gran variedad de frutas y vegetales tales como: uvas, manzanas, cerezas, fresas, moras, zarzamoras cebollas, coles, etc. (Escamilla-Jiménez *et al.*, 2009; Estrada-Reyes *et al.*, 2012), así como en alimentos preparados como: el chocolate, el té negro, el café, la cerveza y el vino rojo (Estrada-Reyes *et al.*, 2012).

En las plantas, estos compuestos químicos poseen diversas funciones como atraer polinizadores y simbiontes, proteger las hojas contra radiación UV, protegerlas contra

bacterias, proteger contra el ataque de herbívoros, e incluso participan en el crecimiento de la planta y transporte de hormonas (Dixon y Pasinetti, 2010; Estrada-Reyes *et al.*, 2012). Así mismo, poseen algunas propiedades benéficas a la salud humana, tales como antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas y antioxidantes (Prior y Cao, 1999; Pietta, 2000; Russo *et al.*, 2000).

Estructuralmente, los flavonoides poseen un esqueleto hidrocarbonado de tipo C6-C3-C6 (difeníl-propano) derivado del ácido shiquímico y de tres restos de acetato (Pérez-Trueba, 2003); este esqueleto está compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (C); los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran del 2 al 8 y los del anillo B del 2' al 6' (Figura 1.)(Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

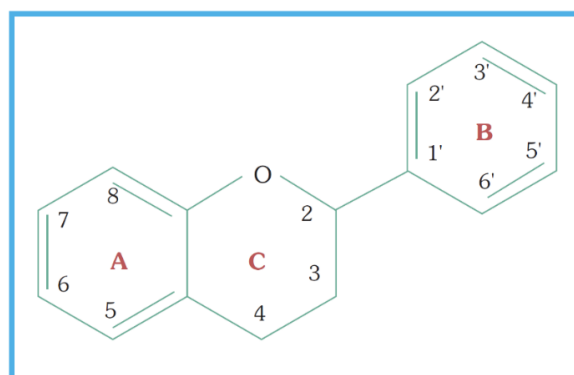


Figura 1. Estructura general de los flavonoides
Tomado de: Rivas-Gonzalo y García- Alonso (2002)

Esta estructura química es de suma importancia, ya que los grupos hidroxifenólicos que posee, le confieren propiedades redox y quelantes de hierro, que convierten a los flavonoides en buenos antioxidantes (Havsteen, 1983). También, son captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) como: oxígeno diatómico (O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en concentraciones micromolares (Ozgová *et al.*, 2003); además, son capaces de inhibir algunas enzimas generadoras de dichas especies reactivas, como: xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, o por el contrario, estimular otras enzimas con capacidad antioxidante: catalasa y superóxido dismutasa (Mierziak *et al.*, 2014).

Sin embargo, es importante mencionar que los flavonoides también pueden actuar como prooxidantes (Boots *et al.*, 2007); esto sucede cuando el consumo de flavonoides es alto, ya que puede saturar el sistema, provocando una sobreproducción de ROS, lo cual a su vez provoca daño al ADN y a sus procesos de replicación (Pérez-Trueba, 2003; Spencer, 2009; Williams *et al.*, 2004).

Tomando en cuenta su estructura química, los flavonoides se clasifican en base a la insaturación y sustituyentes del anillo C; por ejemplo, las flavonas, flavonoles,

dihidroflavonas y calconas poseen un radical cetónico, mientras que aquellos que no poseen dicho radical en el anillo C son los flavanoles y las antocianidinas (Figura 2.) (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002).

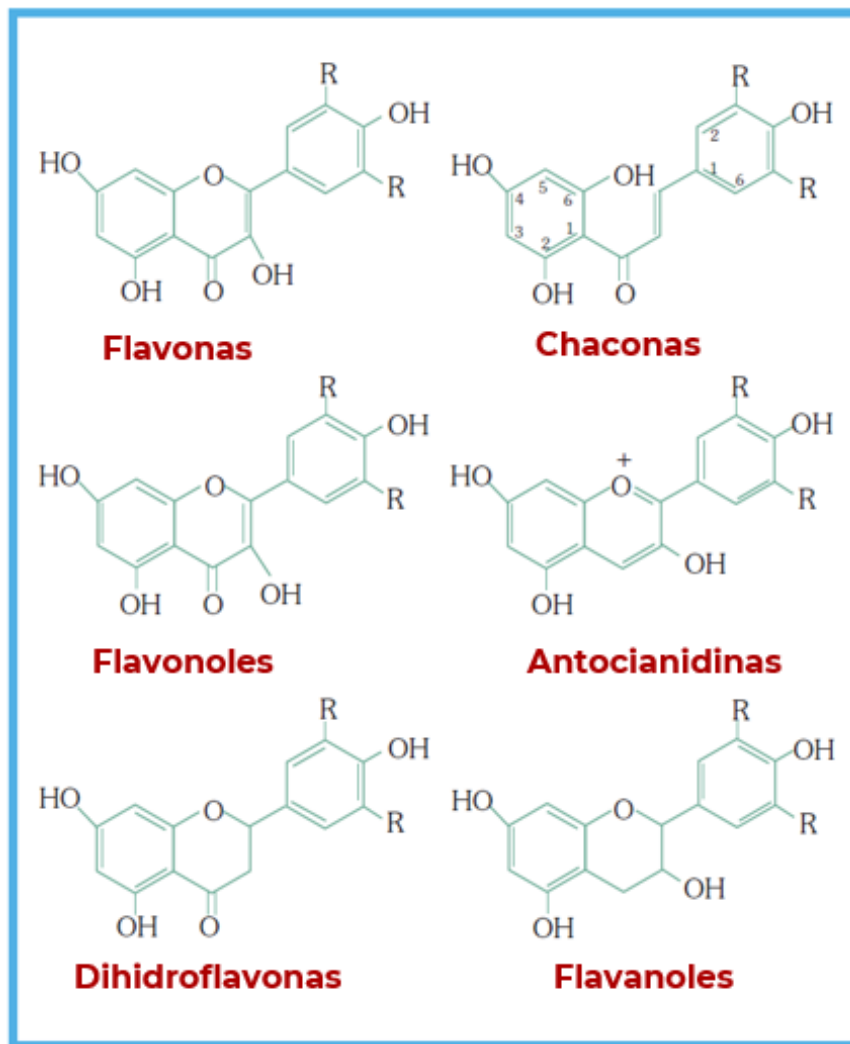


Figura 2. Estructura de los diferentes tipos de flavonoides
Tomado de: Rivas-Gonzalo y García-Alonso (2002).

Se estima que existen más de 9,000 tipos diferentes de flavonoides (Mierziak *et al.*, 2014), siendo la quercetina el más abundante representando el 60-75% del total de flavonoides consumidos por humanos (Escamilla-Jiménez *et al.*, 2009; Ross y Kasuman, 2002; Vicente-Vicente *et al.*, 2013).

2.5 Quercetina

La quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona) (Figura 3.), pertenece al subgrupo de los flavonoles, ya que posee un esqueleto de tipo 3-hidroxiflavona, el cual es característico de ese subgrupo; es de color verde-amarillento brillante y es totalmente insoluble en agua, pero muy soluble en alcohol y lípidos (Kelly, 2011). Como se mencionó antes, es el flavonoide más consumido en la dieta humana; se estima que el promedio de ingesta por día de quercetina es de 5-40 mg, pudiendo llegar hasta 500 mg cuando se tiene una dieta rica en frutas, vegetales, vino rojo y té (Hertog *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 2011). En las plantas, la quercetina se encuentra de manera predominante en forma glucosada, es decir, está unida a azúcares como glucosa, ramnosa o rutinosa (Hollman *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2000; Ross y Kasum, 2002; Shirai *et al.*, 2002; Jovanovic y Simic, 2000).

Las frutas y verduras con mayor concentración de quercetina son: cebollas (280-490 mg/kg), grosellas negras (37 mg/kg), uvas rojas (15-37 mg/kg) y cerezas (10-15 mg/kg) (García-Saura *et al.*, 2005) (Figura 4); aunque también podemos encontrarla en menor cantidad en manzanas, moras, coles, coles de Bruselas, coliflores, brócolis, alcaparras, chalotes, tomates y nueces (Kelly, 2011).

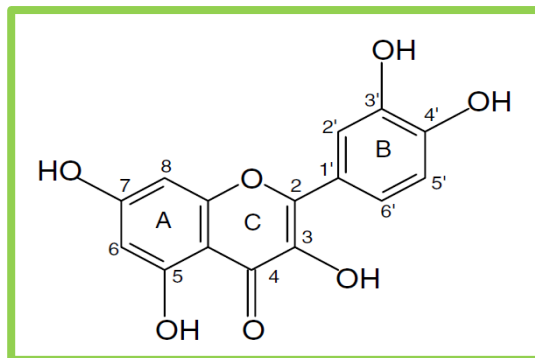


Figura 3. Estructura molecular de la quercetina
Tomado de: Van der Woude *et al.* (2005)

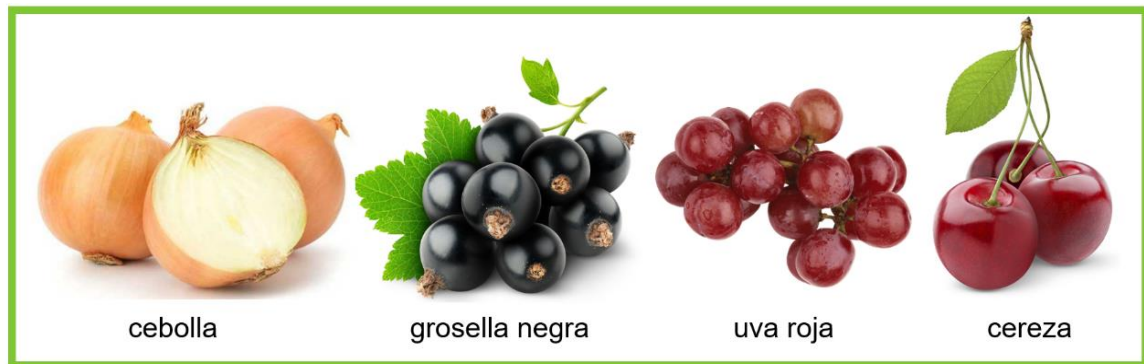


Figura 4. Frutas y verduras con mayor concentración de quercetina
Tomado de: <http://imagenes.4ever.e>

El consumo de quercetina, se ha relacionado con diversos efectos benéficos para la salud, como la protección contra enfermedades vasculares y cardiovasculares, enfermedades pulmonares crónicas, asma, alergias, cistitis intersticial, cataratas, efecto antiinflamatorio, vasodilatador y antiviral, protege contra el daño causado por el colesterol, mejora de la memoria y contribuye a la prevención de cáncer (Nijveldt *et al.*, 2001; Vicente-Vicente *et al.*, 2013). Además, se ha comprobado su efecto protector contra especies reactivas de oxígeno (aniones superóxidos ($\cdot O_2^-$)), radicales hidróxidos ($\cdot OH$) e hidroperóxidos (ROOH)) que pueden producir estrés oxidativo, mediante la neutralización de radicales libres (Kelly, 2011; Nijveldt *et al.*, 2001; Sankara, 1972).

Sin embargo, también existen reportes sobre los efectos adversos por el consumo de este antioxidante en altas concentraciones, ya que la quercetina puede auto-oxidarse y transformarse en una especie prooxidante por su capacidad de producir Fe^{2+} y promover la reacción de Fenton. Teniendo consecuencias graves como: toxicidad (Dunnick y Hailey, 1992; Sullivan *et al.*, 1951; Vicente-Vicente *et al.*, 2013), genotoxicidad (aberraciones cromosómicas, formación de micronúcleos, roturas de ADN) (Hardwood *et al.*, 2007), carcinogénesis (Pamukcu *et al.*, 1980) y deficiencia en la motilidad y viabilidad del espermatozoides (Rastogi y Levin, 1987).

2.6 Estudios de genotoxicidad

Para poner a prueba los posibles daños al ADN provocados por algún compuesto como la quercetina, que cuenta con la particularidad de poseer dos propiedades opuestas: antioxidante y prooxidante; se hace uso de diferentes estudios genotóxicos *in vivo* que utilizan diversos modelos biológicos tanto procariontes, como la prueba de Ames, que emplean cepas genéticamente modificadas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar histidina, para detectar mutaciones genéticas por dislocamiento del cuadro de lectura o por sustitución de pares de bases (Ames *et al.*, 1975); u organismos eucariontes como el ensayo de micronúcleos en mamíferos, que permite la observación de micronúcleos, los cuales pueden ser cromosomas completos o fragmentos de ellos independientes del núcleo, producidas por la fragmentación del ADN como resultado de un daño mutagénico (Hayashi *et al.*, 1994; Scarpato *et al.*, 1990), así como la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART, por sus siglas en inglés).

2.7 SMART

SMART es una prueba *in vivo* que permite detectar agentes genotóxicos de forma rápida y económica; utiliza como modelo biológico a *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), (Graf *et al.*, 1984), el cual es un insecto díptero, que posee un número de cromosomas reducido (cuatro pares) y un ciclo de vida corto de 10-12 días a 25° C (Anexo

2) (Amorós, 2001). Comparte con los humanos aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades conocidas (Cullinton, 2000) además, posee enzimas dependientes de CYP450 equivalentes a las de los humanos tales como hidroxilasas, dimetilasas y transferasas como el glutatión-transferasa (Hodgson y Randy, 199sa1), lo que lo hace un excelente modelo biológico para llevar a cabo bioensayos de genotoxicidad.

SMART en ala de *D. melanogaster* se fundamenta en la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores *multiple wing hairs (mwh)* y *flare (flr³)*; esta pérdida de heterocigosis (LOH por sus siglas en inglés), es un mecanismo genético por el cual una célula heterocigota (de tipo somática), pasa a un estado homocigoto debido a la pérdida del otro alelo del cromosoma homólogo (Happle, 1999); el LOH, puede suceder como resultado de una mutación génica, reordenamiento cromosómico, rotura cromosómica o pérdida cromosómica (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004).

El gen marcador *mwh*, es una mutación recesiva homocigota localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3) y se expresa en las alas como cerdas múltiples por célula en lugar de la cerda única de la condición silvestre (Figura 5.), la cepa que posee este marcador se llama "multiple wing hairs" (*mwh/mwh*). El marcador *flr³*, en cambio, es una mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-3.38) y en homocigosis se expresa hasta con tres fenotipos diferentes de cerdas malformadas (Figura 5.), la cepa que posee este marcador se llama "flare" (*flr³/TM3, Bd^s*) (Graf *et al.*, 1984). En condición homocigota, el marcador *flr³* es letal, por lo que la cepa flare posee el balanceador TM3 que le permite mantener el marcador en heterocigosis; este se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante *Bd^{ser}* (Beaded-Serratia) expresándose fenotípicamente con muescas en el borde de las alas del organismo adulto (Figura 6.) (Graf *et al.*, 1984; Graf y Van Schaik, 1992).

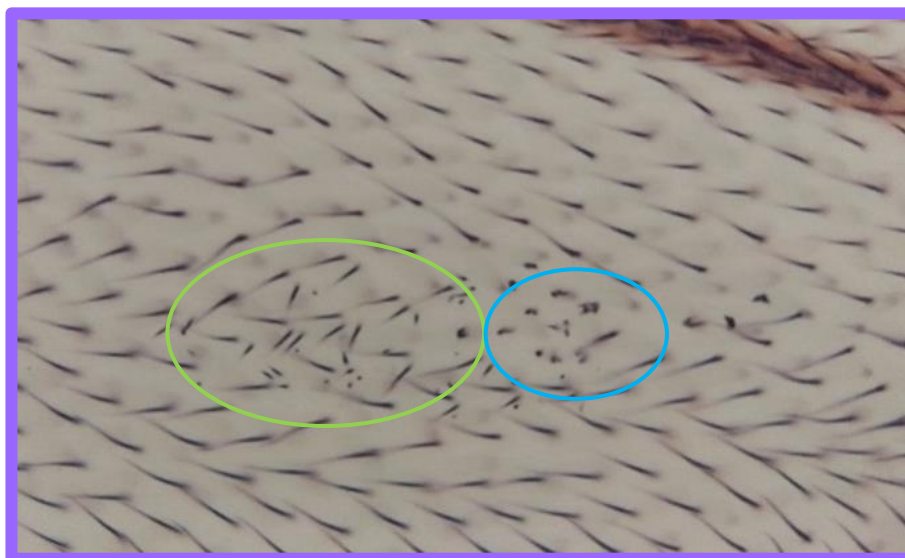


Figura 5. Expresión fenotípica de los marcadores *mwh* (en verde) y *flr³* (en azul)
Imagen: Aimeé Valderrábano

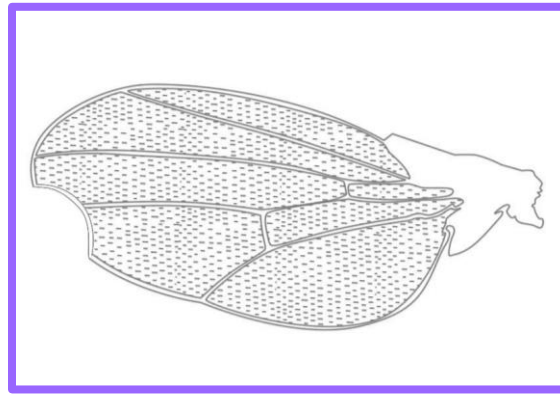


Figura 6. Esquema de ala de *D. melanogaster* que expresa fenotípicamente el gen Bd^{ser}
Imagen: Aimeé Valderrábano

La prueba consiste en exponer (en tratamiento crónico) larvas de *D. melanogaster* a un determinado compuesto; ya que estas larvas poseen poblaciones celulares denominadas: discos imagales (también llamados imaginales), los cuales dan origen a estructuras del organismo adulto (alas, ojos, antenas, piezas bucales, etc.) (Figura 7.) (Demerec, 1965; Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004), y si durante la división celular, algún compuesto logra dañar el ADN de las células imagales, dicho daño sería visible en las alas de los organismos a través de los marcadores *mwh* y *flr³* (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004). Por lo que es posible, con esta prueba detectar cuatro tipos de mutaciones: mutación puntual, delección, aneuploidía y recombinación en células somáticas (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

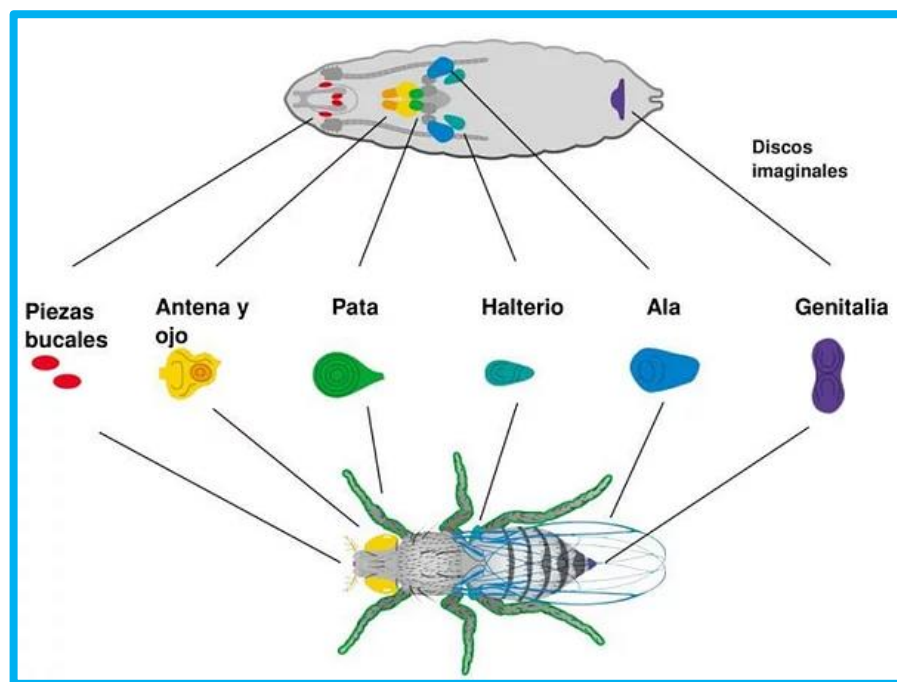


Figura 7. Discos imagales y las estructuras a las que da origen.
Tomado de: <https://angiesanchez3.wixsite.com/drosophila/genes-homeobox>

Es posible, cuantificar el tamaño de una mancha (clones de células que muestran fenotípicamente el marcador *mwh* o *flr³* o ambos) (Figura 8.) para conocer el momento y el tipo de evento genotóxico que ocurrió:

1. Si no se observa ninguna mancha, es porque no hay pérdida de heterocigosis y ningún evento genotóxico ocurrió (Figura 9).
2. Si se observan manchas pequeñas (de una a dos células), es porque ocurrió un evento de no disyunción tardío en la división mitótica de las células imaginales de las larvas (Figura 10).
3. Las manchas grandes (tres o más células) por otro lado, son producidas por un daño temprano en la división de las células, aunque es imposible saber que evento las generó, ya que puede darse como resultado de una mutación puntual (Figura 11), una delección o (Figura 12) recombinación distal al centrómero (Figura 13).
4. Finalmente, las manchas gemelas (aquellas en las que se observan juntos ambos marcadores) son producidas por un evento de recombinación cercana al centrómero (Figura 14.) (Graf *et al.*, 1984; Heres-Pulido *et al.*, 2010).

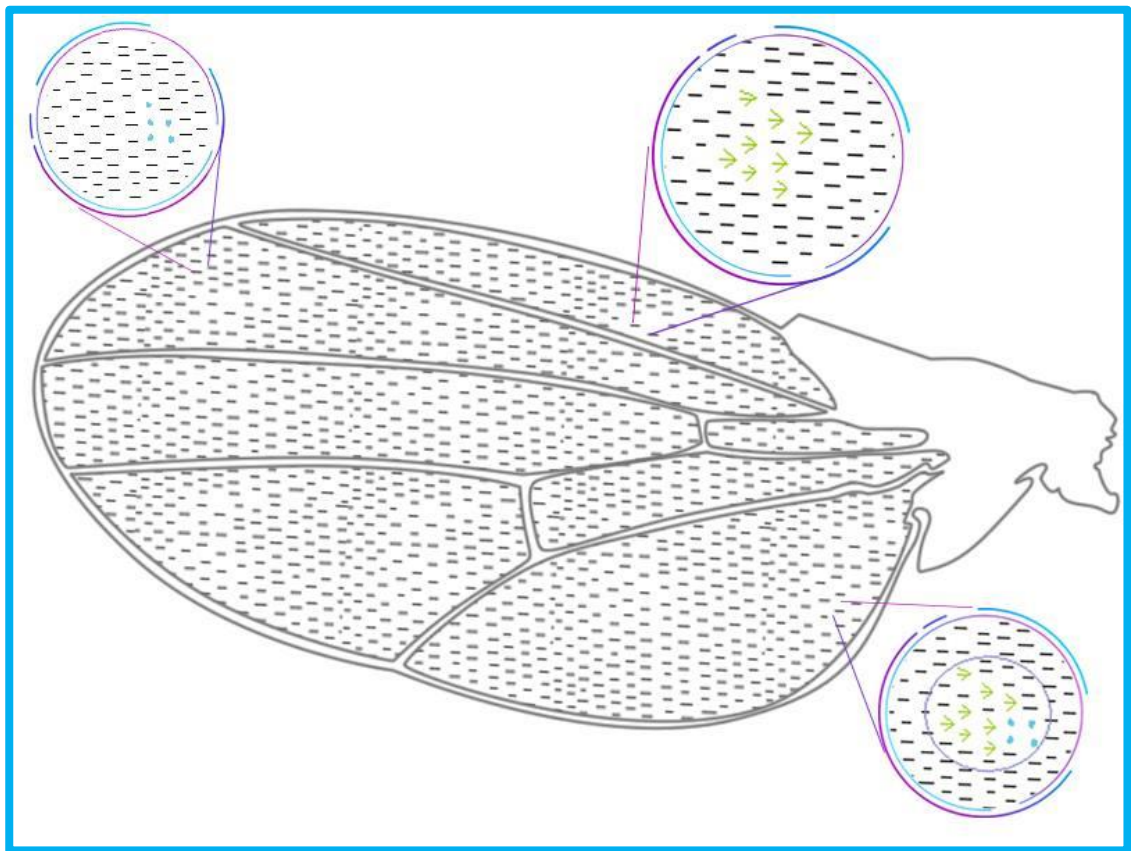


Figura 8. Tipos de manchas: *flr³* (círculo superior izquierdo), *mwh* (superior derecha) y gemela (círculo inferior).

Imagen: Aimeé Valderrábano

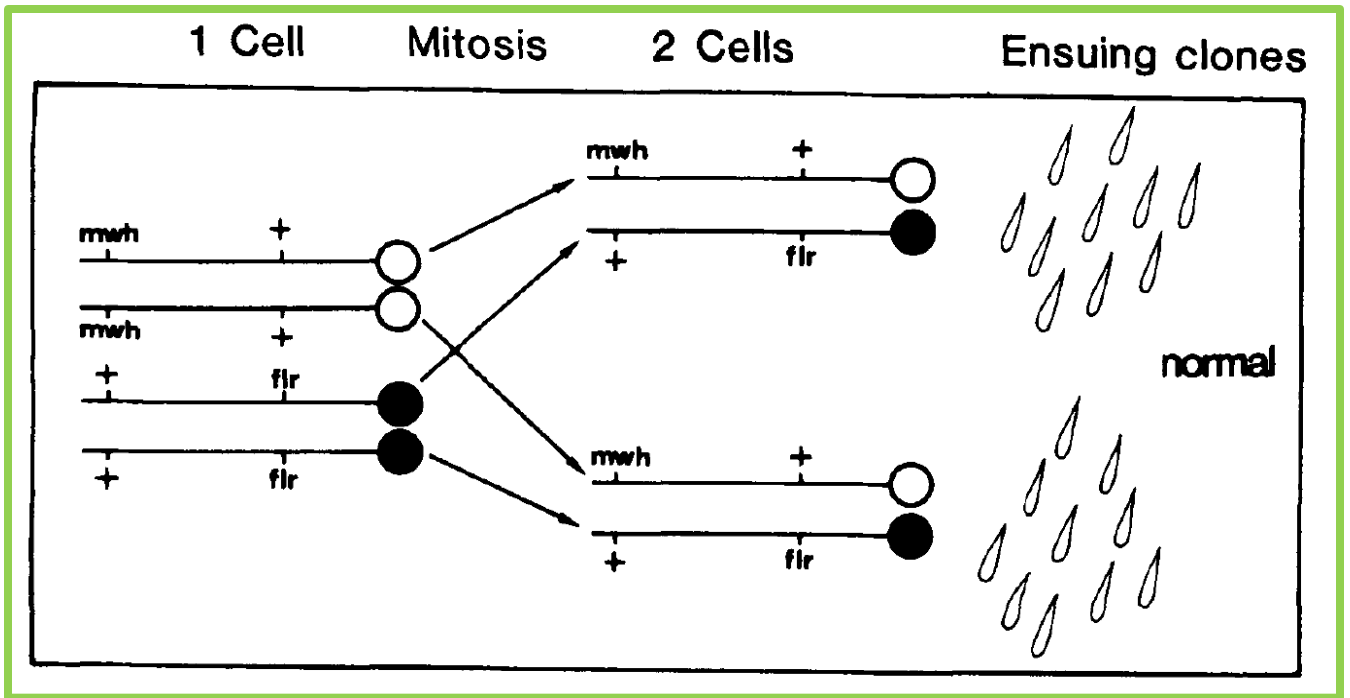


Figura 9. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde no ocurre ningún evento genotóxico.

Tomado de: Graf et al. (1984)

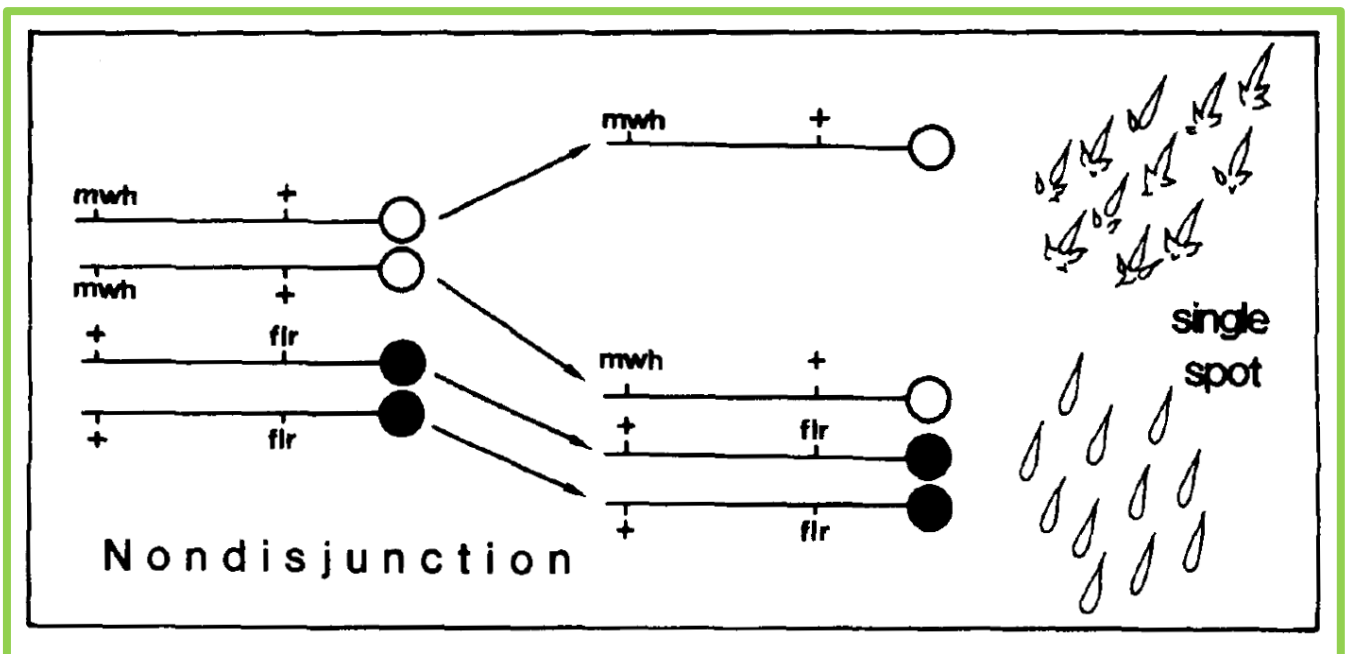


Figura 10. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una no disyunción.

Tomado de: Graf et al. (1984)

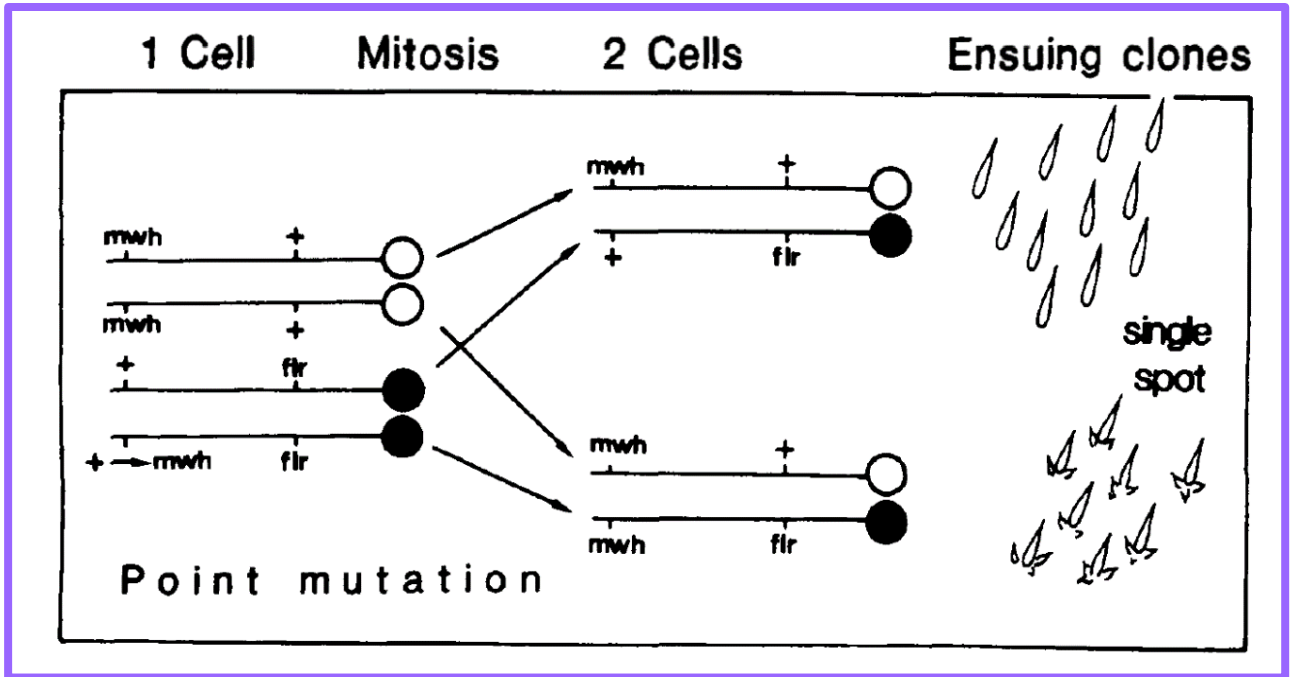


Figura 11. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una mutación puntual.

Tomado de: Graf et al. (1984)

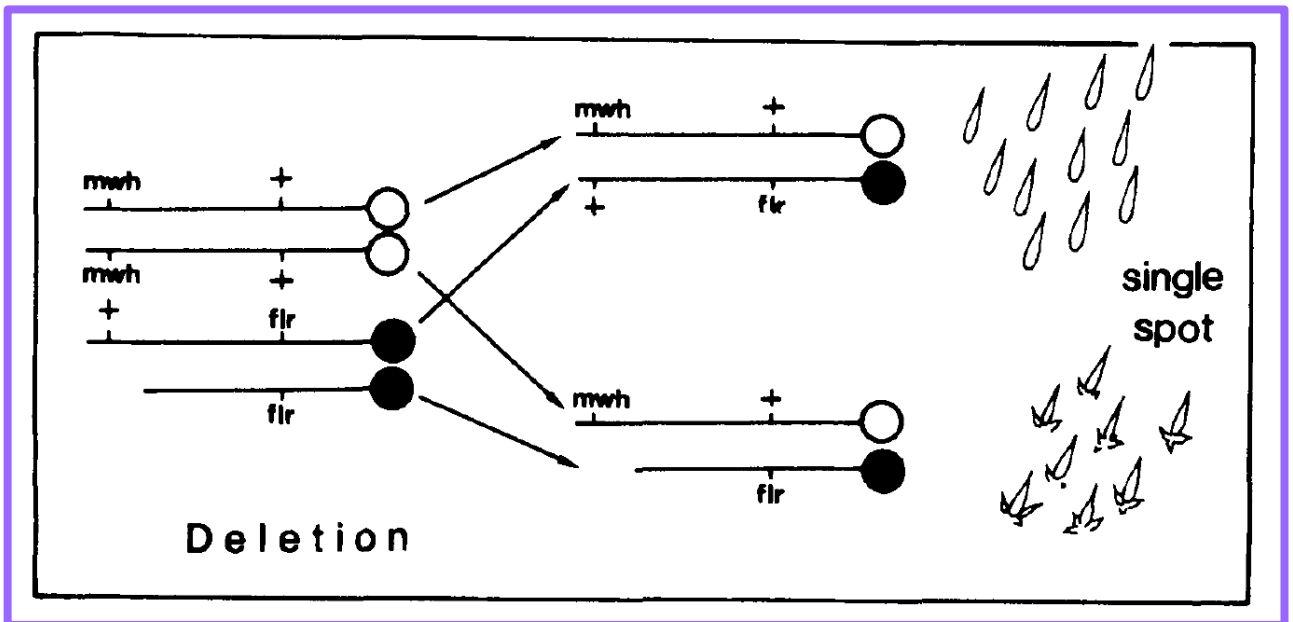


Figura 12. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una deleción.

Tomado de: Graf et al. (1984)

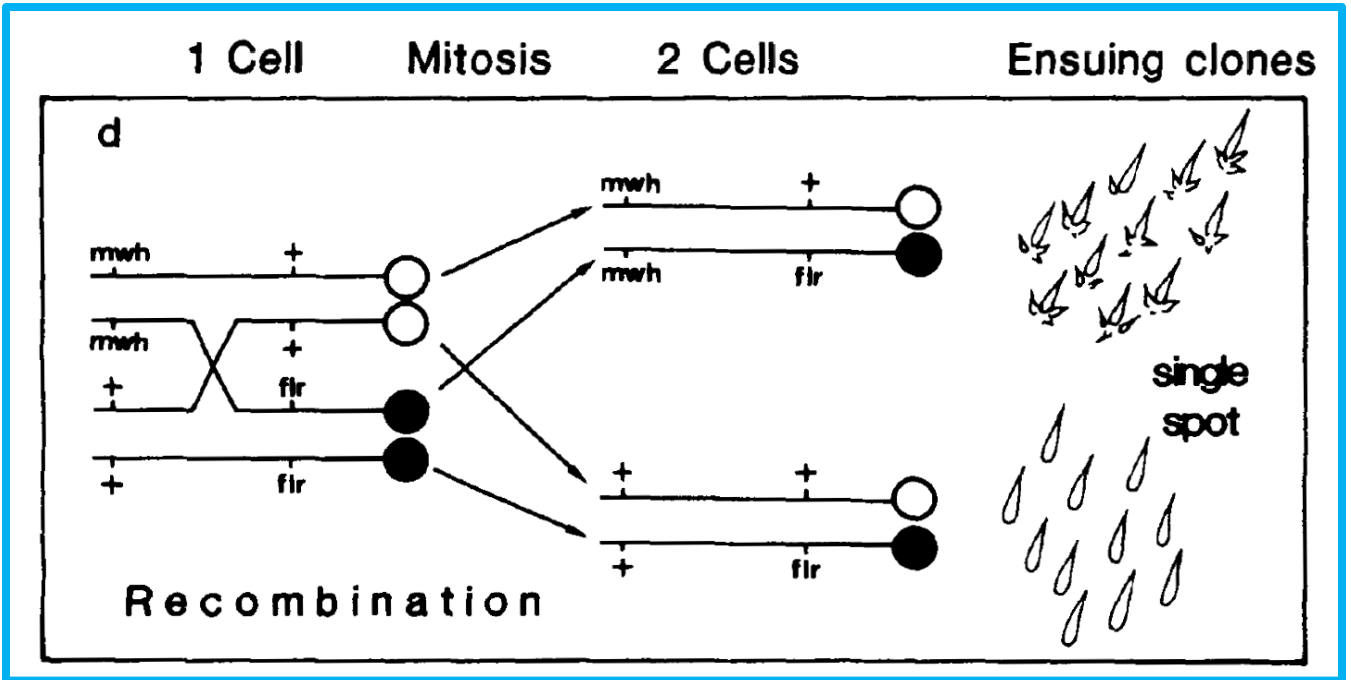


Figura 13. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una recombinación distal al centrómero.
Tomado de: Graf et al. (1984)

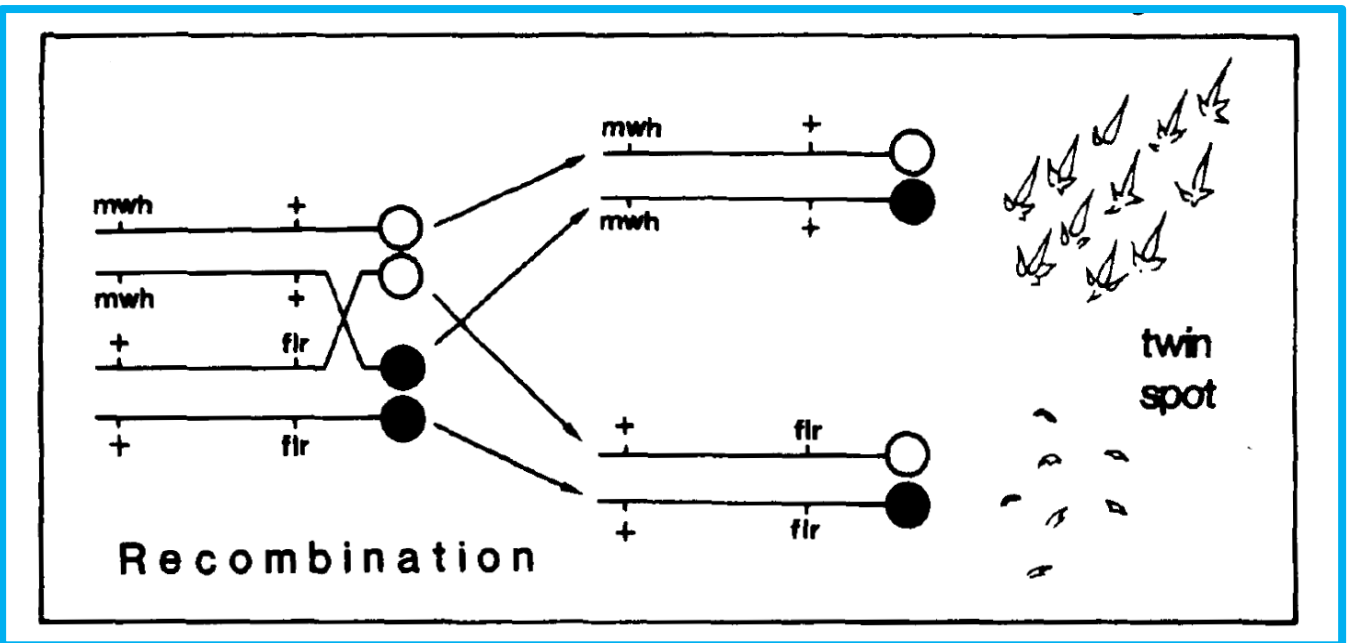


Figura 14. Esquema de mitosis celular en la prueba SMART donde ocurre una recombinación cercana al centrómero.
Tomado de: Graf et al (1984)

Finalmente, es importante mencionar que en SMART se utilizan tres cepas diferentes de *D. melanogaster*: multiple wing hairs, flare y Oregon-flare; con éstas se realizan las cruzas estándar (CE) cruzando hembras vírgenes flare con machos multiple wing hairs (Graf *et al.*, 1989), y la cruza de bioactivación elevada (CBE) cruzando hembras vírgenes Oregon-flare y machos multiple wing hairs (Graf y Van Schaik, 1992).

La cepa Oregon-flare (ORR (1); ORR (2); *flr³/TM3, Bd^s*), cuenta con la particularidad de poseer un marcador dominante Rst (2) DDT localizado en el cromosoma 2, lo que provoca la alta expresión de los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2 (Graf *et al.*, 1998), dando como resultado una elevada expresión de las enzimas CYP450; esto es de suma importancia, ya que, esta elevada expresión le confiera a esta cepa resistencia al diclorodifeniltricloroetano (DDT). (Castañeda *et al.*, 2001).

3. ANTECEDENTES

Existen diversos estudios en los cuales se han evaluado las diversas propiedades, tanto benéficas como dañinas de la quercetina, tanto de forma individual como en combinación de otros compuestos; dichos estudios, se han llevado a cabo utilizando diferentes pruebas genotóxicas, así como una gran variedad de modelos biológicos; algunos de estos estudios se encuentran resumidos en las siguientes tablas:

3.1 Efecto antígenotóxico de la quercetina

Tabla 1. Resumen de algunos estudios donde se ha encontrado un efecto antígenotóxico de la quercetina.

Autores	Año	Descripción
Abdallah et al.	2011	Probaron el poder antígenotóxico del ácido cafeico y la quercetina (10 μ M) usando el ensayo cometa en eritrocitos de rata; encontrando que la quercetina es capaz de reducir el daño genotóxico provocado por el insecticida lambda-cyhalotrina.
Singh et al.	2011	Concluyeron, usando el ensayo cometa en <i>D. melanogaster</i> , que la quercetina (100 μ g) es capaz de atenuar el efecto mutagénico provocado por el benceno, tolueno y xileno.
Kurzawa-Zegota et al.	2012	En su estudio, evaluaron el efecto protector de la rutina y la quercetina frente a dos mutagénicos: IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina) y PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina), usando el ensayo cometa con linfocitos de humanos sanos y con cáncer de colón. Encontrando que la quercetina (500 μ M) reduce el estrés oxidativo producido por IQ y PhIP que provoca daño génico en ambos tipos de linfocitos.
Nagpal y Abraham	2017	Usando un análisis de letales recesivos ligados al sexo (SLRL por sus siglas en inglés) en <i>D. melanogaster</i> (cepa Oregon-K), evaluaron el posible efecto antígenotóxico del ácido gálico, limonina y quercetina (solución acuosa 0.25%) contra el uretano, un genotóxico ampliamente conocido; encontrando que la quercetina es capaz de disminuir el número de mutaciones en células germinales producidas por el uretano.

3.2 Efecto genotóxico de la quercetina

Tabla 2. Resumen de algunos estudios donde se ha encontrado un efecto genotóxico de la quercetina.

Autores	Año	Descripción
Brown y Dietrich	1979	Midieron el efecto mutagénico de diferentes flavonoides por medio de la prueba de Ames en Salmonella y una fracción microsomal de hígado de rata; encontrando que el flavonoide con mayor poder mutagénico es la quercetina (200 µg) con 12 revertantes/nmol.
Carver et al.	1983	Usando células de ovario de hámster chino (CHO por sus siglas en inglés), evaluaron los efectos genéticos de tres flavonoides: kaempferol, galangina y quercetina (6 µg/ml); concluyendo que la quercetina incrementa la incidencia de aberraciones cromosomales.
Graf et al.	1994	Probaron cinco concentraciones diferentes de quercetina: 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 mM, mediante la prueba SMART en ala, cruza estándar. Encontrando que, dos concentraciones (0.05 y 1 mM) presentaron genotoxicidad.
Duthie et al.	1997	Concluyeron, por medio del ensayo cometa <i>in vitro</i> , que la quercetina es genotóxica en todas las concentraciones probadas: 200, 400, 6000, 8000, 1000 µM, ya que incrementó la frecuencia de las roturas de cadena del ADN.
Castañeda-Sotibrán et al.	2011	Evaluaron el efecto genotóxico por medio de la prueba SMART (cruza estándar) de diferentes flavonoides incluida la quercetina. Las concentraciones utilizadas fueron: 25, 50, 100 y 200 µM. Se encontró efecto genotóxico a 50 µM.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que, la quercetina, un flavonoide ampliamente distribuido en frutas, verduras y, por tanto, el más consumido en la dieta humana; presenta dos propiedades opuestas: antioxidante y prooxidante; es de suma importancia, evaluar todas las posibles consecuencias que pueda tener su consumo, mediante pruebas precisas y rápidas como SMART que utiliza un modelo biológico con muchas ventajas como la presencia de genes y rutas metabólicas homólogas a las de los humanos como lo es *D. melanogaster*. Pero, que además nos permite explorar los posibles efectos genotóxicos causados por quercetina utilizando concentraciones cercanas al promedio real de ingesta diaria; así como, inferir la participación de los CYP450 en el metabolismo de este flavonoide gracias a las diferentes cruza que se pueden crear, variables que no se han considerado en estudios anteriores, hasta ahora. Siendo así, el primer eslabón para la fabricación de suplementos alimenticios y medicamentos hechos a partir de este compuesto.

5. HIPÓTESIS

Debido a que, la quercetina ha sido reportada en diversos trabajos como un eficaz antioxidante a bajas concentraciones, pero prooxidante cuando son altas; se presume que en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* la quercetina pueda resultar genotóxica, y que esta genotoxicidad sea directamente proporcional a la concentración administrada de dicho flavonoide. Además, se espera observar discrepancias en los resultados de cada crusa debido a la diferencia de expresión de los CYP450 en cada una.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto genotóxico de la quercetina, mediante las cruza CE y CBE de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

Objetivos particulares

- Valorar la genotoxicidad de quercetina en la crusa estándar.
- Valorar la genotoxicidad de quercetina en la crusa de bioactivación elevada.
- Reconocer el efecto genotóxico del testigo positivo 4NQO.
- Reconocer el efecto del testigo prooxidante vitamina C.
- Inferir el efecto citotóxico de la quercetina a diferentes concentraciones mediante un análisis de distribución de clones mutantes.
- Inferir la participación de los CYP450 en el metabolismo de quercetina en *D. melanogaster*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Compuestos químicos

- 4-óxido de nitroquinolina, 4NQO (C₉H₆N₂O₃). CAS: 56-57-5. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Acetona (C₃H₆O) CAS: 67-64-1. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Entellan® (C₁₃H₂₂O₄). CAS: 107961. Merck KGaA, Darmstadt. Alemania.
- Etanol (C₂H₅OH) CAS 64-27-5, 99 % de pureza Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.
- Medio instantáneo especial para cultivo de *D. melanogaster* de Carolina Biological Supply Co. Burlington, North Carolina, EUA.
- Quercetina (C₁₅H₁₀O₇) · xH₂O. CAS: 849061-97-8. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Solución conservadora [5 mL de Tegosept (CAS: 94-13-3, Farmacia Paris, México) en 100 mL de etanol al 12%] y [5 mL de ácido propiónico (CAS: 79-09-4; Química Meyer, México): ácido ortofosfórico (JT Baker, México) en relación 1:1]; aforados a 1 L de agua.
- Vitamina C (C₆H₈O₆). CAS 66-27-3, 99% de pureza Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

7.2 Material biológico

Las cepas multiple wing hairs (*mwh/mwh*), flare (*flr³/TM3;Bd^s*) y Oregon-flare (*ORR (1)/ORR (2); flr³/TM3;Bd^s*) de *D. melanogaster* fueron donadas por el Laboratorio de Toxicológica Genética de la FES Iztacala, UNAM, México; a su vez, estas cepas fueron donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of technology) de la Universidad de Zurich, Suiza.

7.3 Cultivo y propagación de *D. melanogaster*

Se propagaron y cultivaron las cepas multiple wing hairs, flare y Oregon-flare en frascos de vidrio de 250 mL con 5 g de papa en hojuelas y 20 mL solución conservadora (medio de puré de papas), en una incubadora a 25 °C y 65% de humedad relativa, de acuerdo con lo descrito por Castañeda-Partida, et al. (2008) (Figura 15).



Figura 15. Cultivos de las cepas multiple wing hairs, flare y Oregon-flare
Foto: Aimeé Valderrábano

7.4 Cruzas y colecta de huevos para la prueba SMART

Se realizó la cruce CE con hembras vírgenes de la cepa flare y machos multiple wing hairs en medio de cultivo de puré de papas para asegurar el apareamiento; así mismo, la CBE con hembras vírgenes de la cepa Oregon-flare y machos multiple wing hairs. Después de tres días, se hizo la colecta de huevos de acuerdo con la técnica descrita por Castañeda-Partida, et al. (2008) (Anexo 3). Posterior a la colecta, los huevos se incubaron hasta llegar a la tercera etapa larval (72 ± 4 h).

7.5 Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos independientes con tres replicas por tratamiento, colocando la misma cantidad de larvas de 3^{er} estadio en tubos de ensayo con 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina y 2 mL de los tratamientos: quercetina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM), agua MiliQ como testigo negativo, acetona etanol 2% (1:1) como testigo disolvente de la quercetina, vitamina C (5.6 mM) como testigo de efecto prooxidante y 4NQO (2.0 mM) como testigo de genotoxicidad. El tratamiento fue crónico de 48 hrs y durante este tiempo las larvas permanecieron en una incubadora a 25 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad (Figura 16).

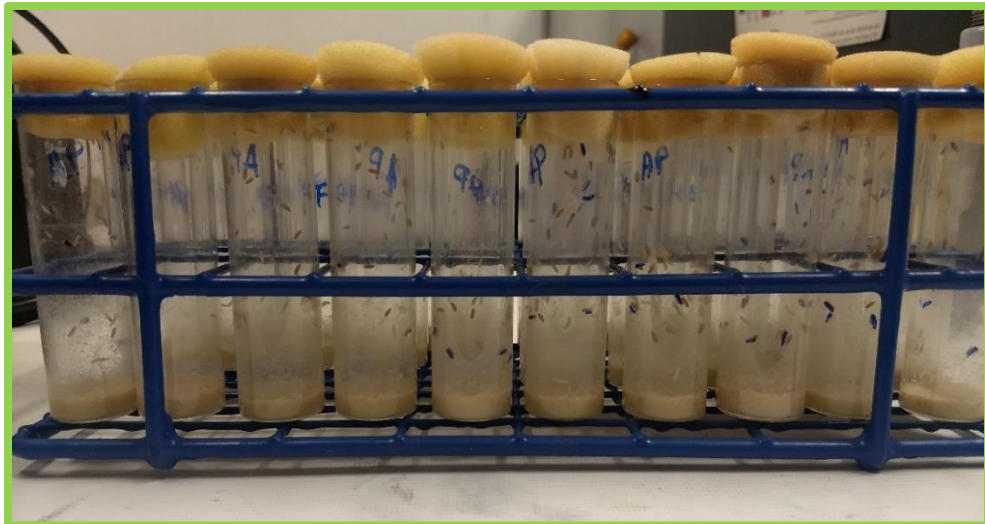


Figura 16. Tubos de ensayo con organismos y tratamientos.
Foto: Aimeé Valderrábano

Las moscas adultas, procedentes de las larvas tratadas, se recuperaron y se almacenaron en alcohol al 70%, posteriormente se disectaron las alas de los organismos con fenotipo silvestre y se montaron en preparaciones permanentes con la resina Entellan® para su observación en el microscopio óptico (Ortiz-Rodríguez, 2015) (Figura 17).

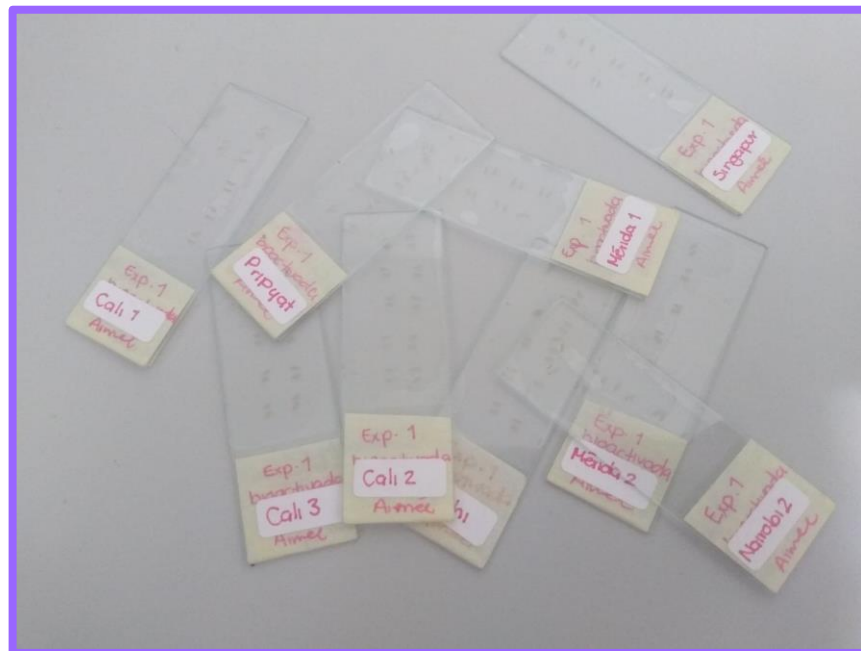


Figura 17. Preparaciones permanentes.
Foto: Aimeé Valderrábano

7.6 Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*

Se observaron la superficie dorsal y ventral de las alas de las moscas a 400X registrando el tipo y tamaño de mancha o clon encontrado de acuerdo con lo descrito por Graf et al. (1984) de la siguiente manera:

1. *mwh*: células que presentan tres o más tricomas
2. *flr*³: células que presentan tricomas cortos o amorfos
3. *gemelas*: manchas simples de fenotipo *mwh* contiguos a clones de tipo *flr*³

7.7 Análisis estadístico

La frecuencia de cada tipo de mancha o clon por tratamiento, se comparó con la frecuencia de manchas de los grupos controles mediante el programa informático SMART PC-versión 2.1 basado en la prueba de Kastenbaum-Bowman, la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.05$) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$).

El programa SMART PC-versión 2.1, permite saber si la frecuencia de las manchas en cada tratamiento tiene un resultado positivo, débil positivo, negativo o débil negativo respecto a los controles, basándose en las siguientes hipótesis:

1. Hipótesis nula (H_0): La frecuencia de mutación (espontánea/inducida) de los tratamientos no es significativamente mayor a la frecuencia observada en el testigo negativo.
2. Hipótesis alternativa (H_a): La frecuencia de mutación inducida de los tratamientos es mayor que la frecuencia de la mutación espontánea obtenida en el testigo negativo.

Es importante mencionar, que las manchas pequeñas (aquellas que comprenden de 1-2 células mutadas), son predominantes a las manchas grandes (de tres o más células mutadas); por tanto, para evitar una sobreestimación de la frecuencia de las manchas pequeñas, en la prueba se utiliza un factor de multiplicación $m=2$; mientras que para las manchas grandes y/o gemelas se utiliza $m=5$ (Frei y Würigler, 1988). Tomando en cuenta lo anterior, es posible obtener cuatro resultados diferentes:

1. Negativo: Aceptar H_0 y rechazar H_a
2. Positivo: Rechazar H_0 y aceptar H_a
3. Indeciso: Rechazar H_0 y rechazar H_a
4. Débil positivo: Aceptar H_0 y aceptar H_a

Por otro lado, la segunda prueba (U de Mann-Whitney), se utilizó para analizar aquellos resultados indecisos, ya que, al ser una prueba no paramétrica, es decir, que puede analizar datos que no presentan una distribución normal; nos permite conocer si las medianas de dos muestras independientes se comportan de manera similar a partir de dos hipótesis (Rivas-Ruíz *et al.*, 2013):

1. H_0 : ambas muestras tienen la misma mediana
2. H_a : las muestras tienen diferente mediana

Por tanto, se pueden obtener dos resultados diferentes:

1. Significativo (s): cuando se rechaza la H_0 y se acepta la H_a
2. No significativo (ns): cuando se acepta la H_0 y se rechaza la H_a

Finalmente, se hizo un análisis de la distribución de clones *mwh* mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov, para conocer si existen diferencias significativas entre las distribuciones de clones en los diferentes tratamientos, ya que, esta prueba permite medir el grado de concordancia existente entre la distribución de un conjunto de datos muestra y una distribución teórica específica (en este caso la distribución del testigo negativo). La prueba plantea dos hipótesis (Frei y Würigler, 1988):

1. H_0 : La distribución de la muestra es similar a la teórica
2. H_a : La distribución muestral no es consistente con la teórica

Por lo que es posible obtener dos resultados:

1. Positivo (+): se rechaza la H_0 y se acepta la H_a
2. Negativo (-): se acepta la H_0 y se rechaza la H_a

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Efecto genotóxico de quercetina en cruza estándar (CE)

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$), donde se compararon las frecuencias y el número de manchas por individuo. Se analizaron un total de 602 organismos de *D. melanogaster* CE correspondiente a 1204 alas de fenotipo silvestre en nueve tratamientos: agua, acetona-etanol 2% (Ac-OH), vitamina C 5.6 mM (Vit-C), 4NQO 2 mM y cinco concentraciones diferentes de quercetina (Q-0.023, Q-0.047, Q-0.095, Q-0.19, Q-0.38).

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM, Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM, Q-0.38 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.047 mM, Q-0.023mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Compuesto	No. de organismos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Gemelas m=5	Manchas totales	Clones <i>mwh</i>
Testigo negativo (agua) / Testigo disolvente (Ac-OH) / Testigo prooxidante (Vit-C)						
Agua	60	0.37 (22)	0.03 (2)	0.00 (0)	0.40 (24)	024
Ac-OH 2%	60	0.33 (20) -/ns	0.13 (8) -/ns	0.02 (1) i/ns	0.48 (29) -/ns	026
Vit-C 5.6 mM	60	0.24 (15) i/ns	0.06 (4) i/ns	0.02 (1) i/ns	0.32 (20) -/ns	019
Testigo disolvente (Ac-OH) / Testigo positivo (4NQO)						
Ac-OH 2%	60	0.33 (20)	0.13 (8)	0.02 (1)	0.48 (29)	026
4NQO 2 mM	62	0.81 (50) +/s	0.85 (53) +/s	0.15 (9) +/s	1.81 (112) +/s	106
Testigo disolvente (Ac-OH) / Tratamientos quercetina						
Ac-OH 2%	60	0.33 (20)	0.13 (8)	0.02 (1)	0.48 (29)	026
Q-0.023 mM	60	0.23 (14) -/ns	0.05 (3) -/ns	0.00 (0) i/ns	0.28 (17) i/ns	016
Q-0.047 mM	60	0.22 (13) -/ns	0.05 (3) -/ns	0.02 (1) i/ns	0.28 (17) i/ns	017
Q-0.095 mM	60	0.33 (20) -/ns	0.15 (9) -/ns	0.07 (4) i/ns	0.55 (33) -/ns	029
Q-0.19 mM	60	0.42 (25) i/ns	0.08 (5) -/ns	0.07 (4) i/ns	0.57 (34) -/ns	032
Q-0.38 mM	60	0.38 (23) i/ns	0.08 (5) -/ns	0.02 (1) i/ns	0.48 (29) -/ns	027

a) Diagnóstico estadístico de la prueba Kastenbaum-Bowman de acuerdo con Frei Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m= factor de multiplicación;

-
- positivo= +; negativo= -; indeciso= i. Prueba estadística de una cola con niveles de probabilidad α , β (0.05).
- b) Diagnóstico estadístico prueba de U de Mann-Whitney. Donde: ns= no significativo; significativo= s.

Al comparar específicamente, las frecuencias de manchas del testigo negativo agua, contra el testigo disolvente Ac-OH. No se encontró diferencia significativa en ningún tipo de mancha (Tabla 3 y Figura 18).

La falta de genotoxicidad para el testigo Ac-OH (Tabla 3 y Figura 18) concuerdan con lo publicado por Graf et al. (1994) y Kaya et al. (2002), quienes mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, no encontraron genotoxicidad del etanol al 12% y 5% respectivamente, para la CE. Mientras que, Vasiliki et al. (2017) tampoco encontraron genotoxicidad al utilizar acetona 0.06% (v/v) mediante la misma prueba y cruza de *D. melanogaster*. En tanto que, Dueñas-García et al. (2017), al utilizar una mezcla de acetona + etanol (2% + 1% v/v), tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo agua.

Estos datos (Tabla 3 y Figura 18), se pueden explicar tomando en cuenta que *D. melanogaster* posee resistencia al etanol, debido a que, su alimentación se compone principalmente de frutos dulces en descomposición que generan alcohol etílico (Pohl et al., 2012). En este organismo, el etanol es metabolizado en acetaldehído gracias a la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), después, la mayor parte de este acetaldehído, por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) se oxida en acetato, evitando su acumulación (Heinstra et al., 1983; Anderson y Barnett, 1991); finalmente, el acetato es convertido en acetil-CoA, el cual entra al ciclo de Krebs o es usado como precursor en la síntesis de ácidos grasos saturados (Guarnieri y Heberlein, 2002). Así mismo, es importante resaltar que la ADH también participa en la desintoxicación de cetonas, como lo es la acetona en *D. melanogaster* (Chambers, 1988), lo cual también puede explicar estos resultados.

Por otro lado, al cotejar las frecuencias de manchas del testigo negativo agua, contra el testigo prooxidante Vit-C., no se encontraron diferencias en ningún caso (Tabla 3 y Figura 18). Por lo que no se pudo observar un efecto prooxidante como era lo esperado y la razón por la que se seleccionó esta vitamina como testigo.

Los datos obtenidos para Vit-C (Tabla 3 y Figura 18), coinciden con lo reportado por Ferreiro-Costa y Nepomuceno (2006) quienes no encontraron genotoxicidad a tres diferentes concentraciones: 0.07, 0.14 y 0.28 mM de una mezcla de vitamina C, vitamina E y β -caroteno, en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* CE. De manera similar, Kaya et al. (2002), también utilizando la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* CE, no encontró diferencias significativas en las frecuencias de manchas en ninguna de las

tres concentraciones de vitamina C utilizadas: 25, 75 y 250 mM. Sin embargo, difieren un poco con lo reportado por Dueñas-García et al. (2017) quienes, utilizando la misma prueba y cruza, si encontraron un incremento de manchas pequeñas al alimentar larvas de *D. melanogaster* con vitamina C (5.6 mM).

Estos resultados (Tabla 3 y Figura 18), se pueden explicar tomando en cuenta que, la vitamina C o ácido ascórbico, ha sido mundialmente reconocido como un efectivo antioxidante, capaz de secuestrar radicales de oxígeno, hidroxilo y superóxido, agente quelante de metales y reductor de radicales antioxidantes primarios (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993).

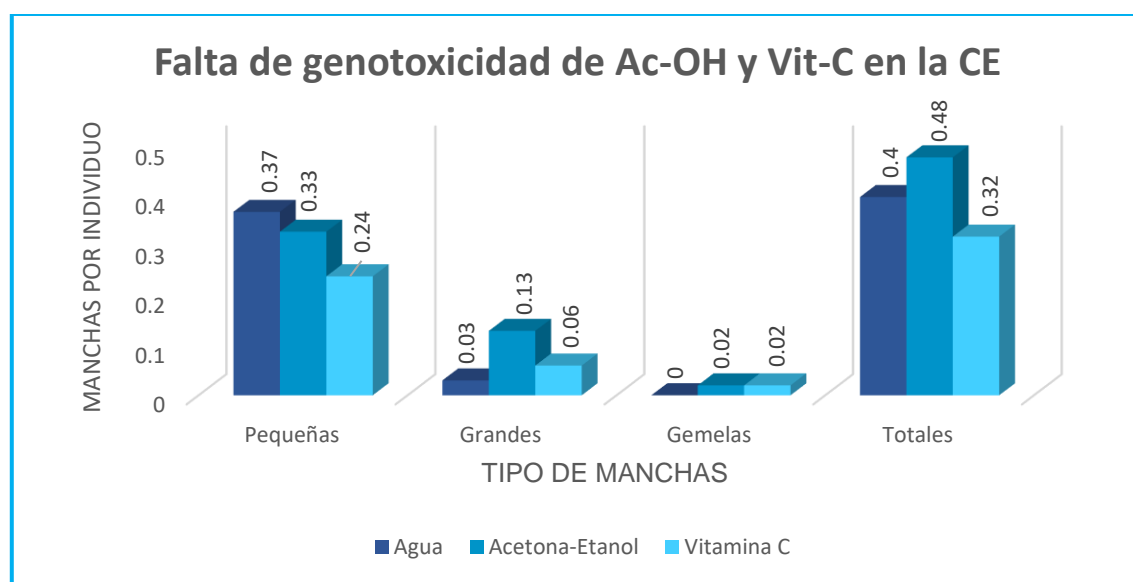


Figura 18. Falta de genotoxicidad para los testigos agua, Ac-OH y Vit-C en *D. melanogaster* CE.

El caso contrario ocurrió con el testigo positivo 4NQO, que mostró un aumento significativo de frecuencias en todos los tipos manchas, comprobando así, que este compuesto es genotóxico para la CE. Este comportamiento, era el esperado y fue el motivo por el que se seleccionó este compuesto como testigo positivo o de genotoxicidad (Tabla 3 y Figura 19).

Estos datos, concuerdan con lo publicado por Graf et al. (1989), Heres-Pulido et al. (2004) y Dueñas et al. (2017), quienes demostraron la genotoxicidad de 4NQO en concentraciones de 5 / 10 mM, 2.5 / 5 mM y 2 mM respectivamente, mediante la prueba SMART en ala, CE.

Los resultados obtenidos (Tabla 3 y Figura 19), se pueden explicar tomando en cuenta que, el 4NQO ha sido reportado como un potente mutagénico (Nagao y Sugimura, 1976) y carcinogénico (Nakahara et al., 1957), capaz incrementar las especies reactivas de

oxígeno, causar ruptura simple de cadena y formación de sitios álcali lábiles en el ADN, ya que, puede imitar los efectos de la radiación UV (Kohda *et al.*, 1991; Mirzayans, *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2016). Así mismo, al ser metabolizado en 4-óxido de hidrolaminoquinolina (4HAQO), es capaz de causar indirectamente sustituciones en el ADN de G→T y A→C (Cheng, *et al.*, 1992).

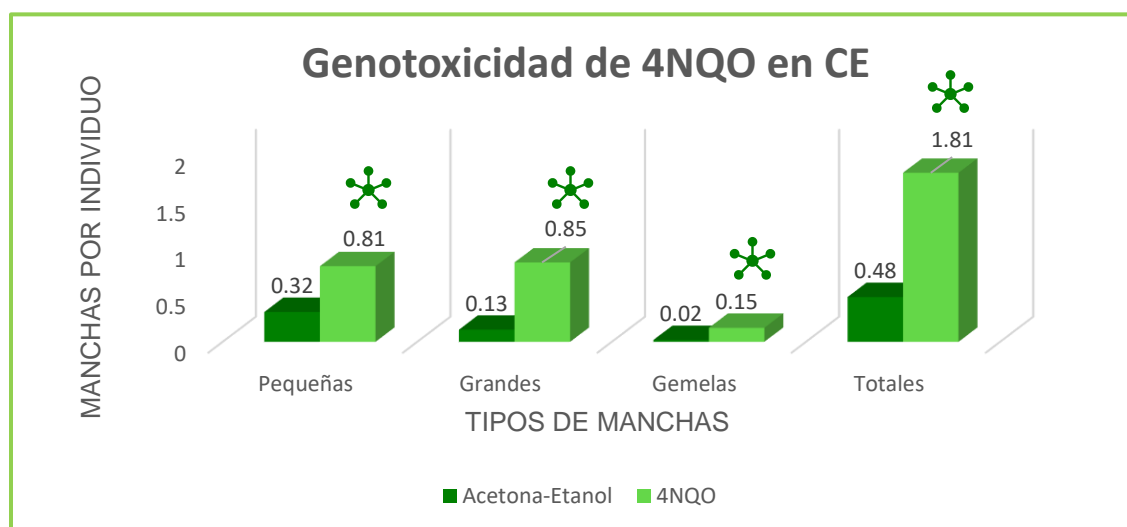


Figura 19. Genotoxicidad de 4NQO en *D. melanogaster* CE.
Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

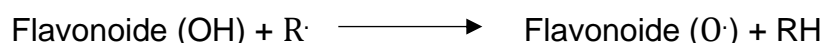
Finalmente, se comparó la frecuencia de manchas del testigo disolvente acetona-etanol contra cinco concentraciones de quercetina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.038 mM); encontrando que, no hay diferencia significativa en ningún caso (Tabla 3 y Figura 20).

Estos resultados, coinciden parcialmente con lo reportado por Graf *et al.* (1994) quienes probaron cinco concentraciones diferentes de quercetina: 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 mM, mediante la prueba SMART en ala, CE, aunque en este caso se utilizaron hembras clo wing hairs y machos de la cepa flare. Encontrando que, sólo dos concentraciones presentaron diferencias en las frecuencias de manchas: 0.05 mM que incrementó las frecuencias de todos los tipos de manchas a excepción de las grandes; y 1 mM que aumentó las manchas pequeñas. De manera similar, Castañeda-Sotibrán, *et al.* (2011) utilizando la misma prueba y cruce de *D. melanogaster* (CE), probaron la genotoxicidad de quercetina en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 μ M; encontrando que, sólo hubo incremento a la concentración de 50 μ M para las manchas pequeñas y totales.

La quercetina, es un flavonoide que ha probado en diferentes estudios (*in vitro* e *in vivo*) ser un potente antioxidante, capaz de proveer protección al cerebro, el hígado y otros tejidos frente a la isquemia-reperfusión, compuestos tóxicos y otros factores que pueden inducir estrés oxidativo (Huk *et al.*, 1998; Mojzis, *et al.*, 2001; Inal *et al.*, 2002; Kahraman *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2008; De Whalley *et al.*, 2008; Meyers *et al.*, 2008; Annapurna *et*

al., 2009; Hwang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). Dicha capacidad antioxidante, se debe principalmente a su estructura química, ya que, le permite neutralizar radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico, peroxinitritos, etc., Así mismo, puede inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, lo cual impide muerte celular. Pero, además, es capaz de incrementar la producción de antioxidantes endógenos (Nijveldt *et al.*, 2001).

Para neutralizar radicales libres, el grupo hidroxilo de los flavonoides, incluyendo la quercetina, reacciona con el compuesto reactivo del radical, de acuerdo a la siguiente ecuación:



Donde R· es el radical libre, (O·) representa al flavonoide oxidado después de reaccionar con el radical libre y RH es el radical estabilizado o inactivo (Middleton, 1998; Korkina y Afanas'ev, 1997). Dando como resultado que, el flavonoide es oxidado y el radical libre es reducido y, por tanto, menos reactivo (Nijveldt *et al.*, 2001).

Otra propiedad importante de la quercetina, que le permite actuar como antioxidante, es su capacidad quelante de hierro, el cual ocupa un papel central en la producción de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica. Esta propiedad quelante, se debe principalmente a su capacidad de ingresar a las células y unirse al hierro (Ferrali *et al.*, 1997).

Todo lo anterior, puede explicar que no se hayan encontrado diferencias significativas con respecto al testigo disolvente en ninguna concentración de quercetina (0.38, 0.19, 0.095, 0.047, 0.023 mM), es decir, que no haya causado un efecto genotóxico (Tabla 3 y Figura 20).

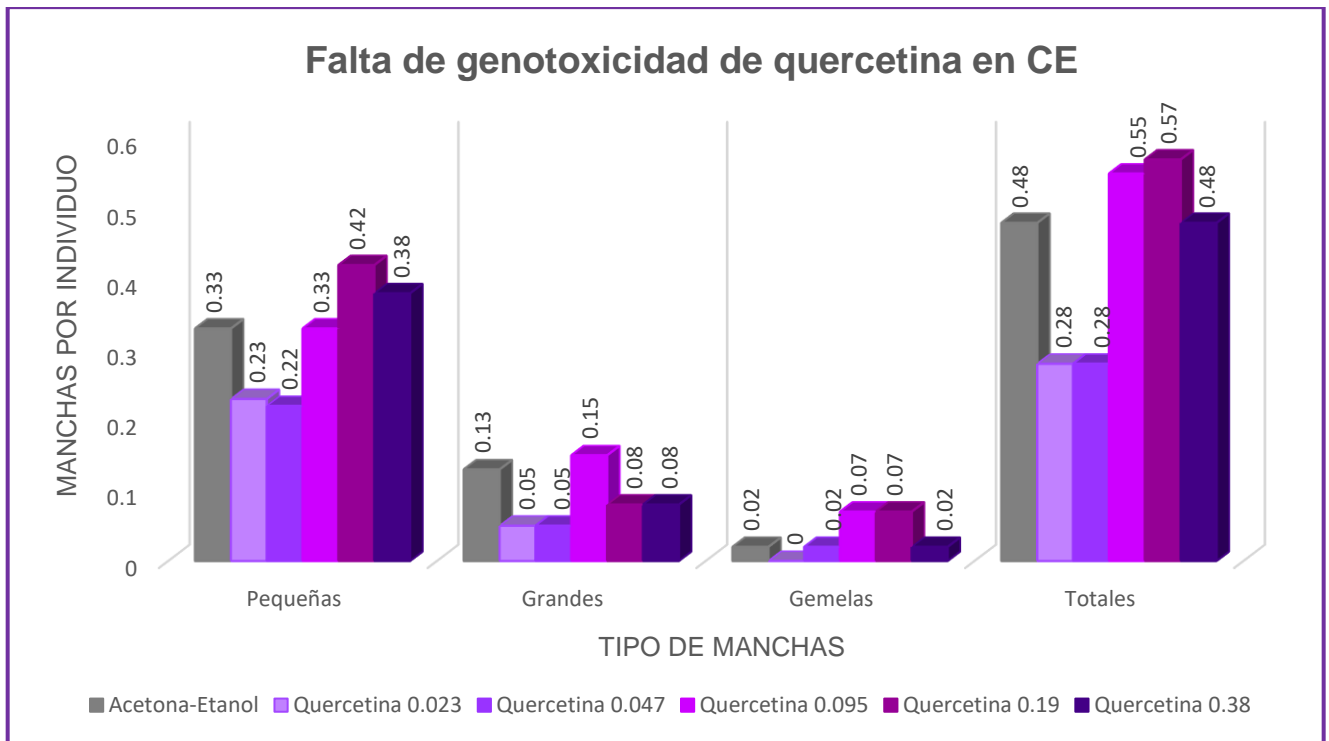


Figura 20. Falta de genotoxicidad de cinco concentraciones diferentes de quercetina en *D. melanogaster* CE.

8.2 Distribución del tamaño de clones mutantes en cruza estándar (CE)

Para el análisis de distribución de clones mutantes, se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov, la cual comparó las frecuencias acumuladas de clones *mwh* encontradas en las células de las alas de *D. melanogaster* CE en cada tratamiento.

Se encontró diferencia significativa con respecto al testigo negativo en todos los tratamientos, a excepción de quercetina en las concentraciones 0.19 y 0.38 mM (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

Testigo	Tratamiento	Nivel de significancia	Diagnóstico
Agua	Ac-OH	$p < 0.025$	+
Ac-OH	Vit-C	$p < 0.001$	+
Ac-OH	4NQO	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.023	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.047	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.095	$p > 0.10$	+
Ac-OH	Q-0.19	$p < 0.025$	-
Ac-OH	Q-0.38	$p > 0.10$	-

En el caso específico del testigo negativo agua, la frecuencia máxima que se obtuvo fue de 0.283, que corresponde a los clones de una célula, y las frecuencias llegaron hasta las 8 células; al compararla con el testigo Ac-OH, se encontró diferencia significativa ya que, esta última presentó clones de hasta 16 células, lo cual puede ser un indicativo de que la acetona-etanol influyó en la división celular (Tabla 4 y Figura 21).

Este aumento de clones en el testigo Ac-OH (Tabla 4 y Figura 21), puede explicarse tomando en cuenta que el acetaldehído (primer metabolito del alcohol) es capaz de provocar daños a nivel genético que traen como resultado modificaciones en las vías intracelulares, como la activación celular, el crecimiento y la proliferación (Timmons *et al.*, 2002); dicha propuesta, concuerda con los estudios de Simanowski *et al.* (1986), Homann

et al. (1997), Seitz et al. (1990) y Maito et al. (2003) quienes concluyeron que una ingesta prolongada de etanol provoca un aumento en proliferación celular en células epiteliales y de mucosa del tracto digestivo en ratas, ratones y humanos.

Para Vit-C, también se encontró diferencia significativa con respecto al testigo Ac-OH, ya que, la frecuencia más alta fue de 0.175 que corresponden a clones de una única célula y, además, se encontraron clones hasta la quinta división celular; lo cual, es un indicativo de una posible alteración en la división celular provocada por Vit-C (Tabla 4 y Figura 21).

Estos resultados (Tabla 4 y Figura 21), coinciden con lo reportado por Fang et al. (2021) quienes encontraron que la Vit-C es capaz de regular el ciclo celular y mejorar la proliferación celular en cultivos *ex vivo* de células madres musculares porcinas. Gracias a que, esta vitamina promueve la expresión de IGF-1 intracelular, que es un factor de crecimiento que participa en la vía de señalización PI3 K/AKT/mTOR encargada de la proliferación celular (Paling *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2015; Ascenzi *et al.*, 2019).

Distribución del tamaño de clones *mwh* en agua Vs Ac-OH y Vit-C en CE

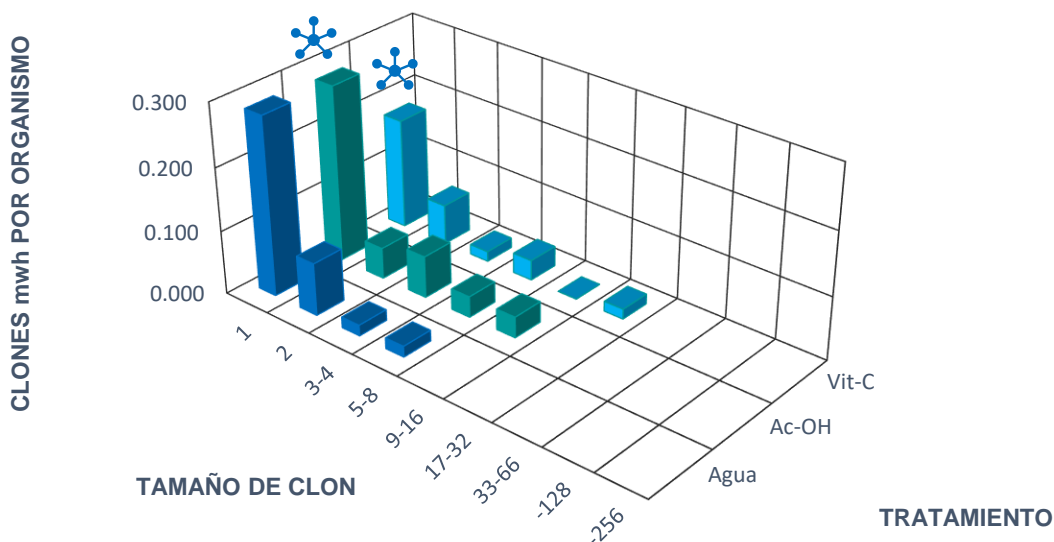


Figura 21. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua, comparado con los testigos Ac-OH y Vit-C. Donde: = diferencia significativa (p<0.05).

De manera similar, se encontró diferencia significativa en la distribución de clones al comparar Ac-OH y 4NQO; ya que, la frecuencia máxima encontrada para 4NQO fue 0.468

que corresponde a los clones de 3-4 células. También, para este tratamiento, se encontraron células hasta la quinta división, lo cual sugiere una alteración en el ciclo celular (Tabla 4 y Figura 22). Todos estos resultados, pueden deberse al alto poder mutagénico del 4NQO que provoca mutaciones puntuales (Ishizawa y Endo, 1972), deleciones (Yamamoto e Ishii, 1974), desplazamiento del marco de lectura (Nagao y Sugimura, 1976) y aberraciones cromosómicas (Yoshida *et al.*, 1995).

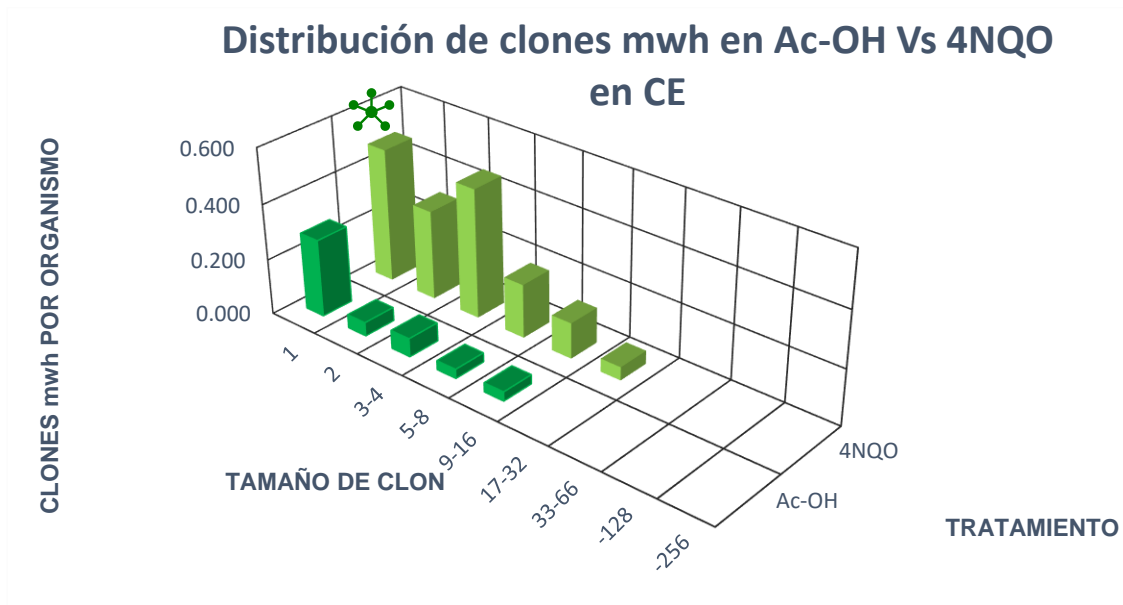


Figura 22. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con el testigo positivo 4NQO. Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, al comparar el testigo Ac-OH contra cinco concentraciones de quercetina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.038 mM); únicamente se encontraron diferencias significativas en las concentraciones 0.095, 0.047 y 0.023 mM (Tabla 4 y Figura 23).

Para las concentraciones 0.19 y 0.38 mM, los valores más altos se hallaron en los clones de una célula y fueron 0.317 y 0.283 respectivamente; Sin embargo, en estos casos no se encontró diferencia significativa en la distribución de clones acuerdo a la prueba Kolmogorov-Smirnov (Tabla 4 y Figura 23).

En el caso de 0.023 mM la frecuencia más alta corresponde a clones de una única célula con un valor de 0.2 y se encontraron clones hasta la tercera división celular; para 0.047 mM la frecuencia dominante fue 0.117, que corresponde a los clones de dos células (primera división celular); mientras que, en 0.095 mM, la frecuencia más alta fue 0.217 y corresponde a los clones de una célula. Estos resultados sugieren que, la quercetina en estas concentraciones alteró la división celular (Tabla 4 y Figura 23).

Estas diferencias significativas con respecto al testigo Ac-OH (Tabla 4 y Figura 23), se pueden explicar, si tomamos en cuenta que, en ciertas condiciones y concentraciones, la quercetina puede volverse prooxidante (Vicente-Vicente *et al.*, 2013); esto sucede a consecuencia de alteraciones en su estructura química, como es su transformación en o-quinona por oxidación catalítica, que incrementa la producción de radicales libres de oxígeno y produce agotamiento del glutatión reducido (GSH) (Boots *et al.*, 2008). Debido a este comportamiento prooxidante, en diferentes estudios *in vitro*, se ha observado daño genotóxico provocado por la quercetina; por ejemplo: en diferentes cepas de *S. typhimurium* y *Bacillus subtilis* se ha encontrado actividad mutagénica (Hardwood *et al.*, 2007); mientras que, en estudios con células de ratón o de humano se han observado aberraciones cromosómicas, formación de micronúcleos y roturas en la cadena de ADN (Hardwood *et al.*, 2007).

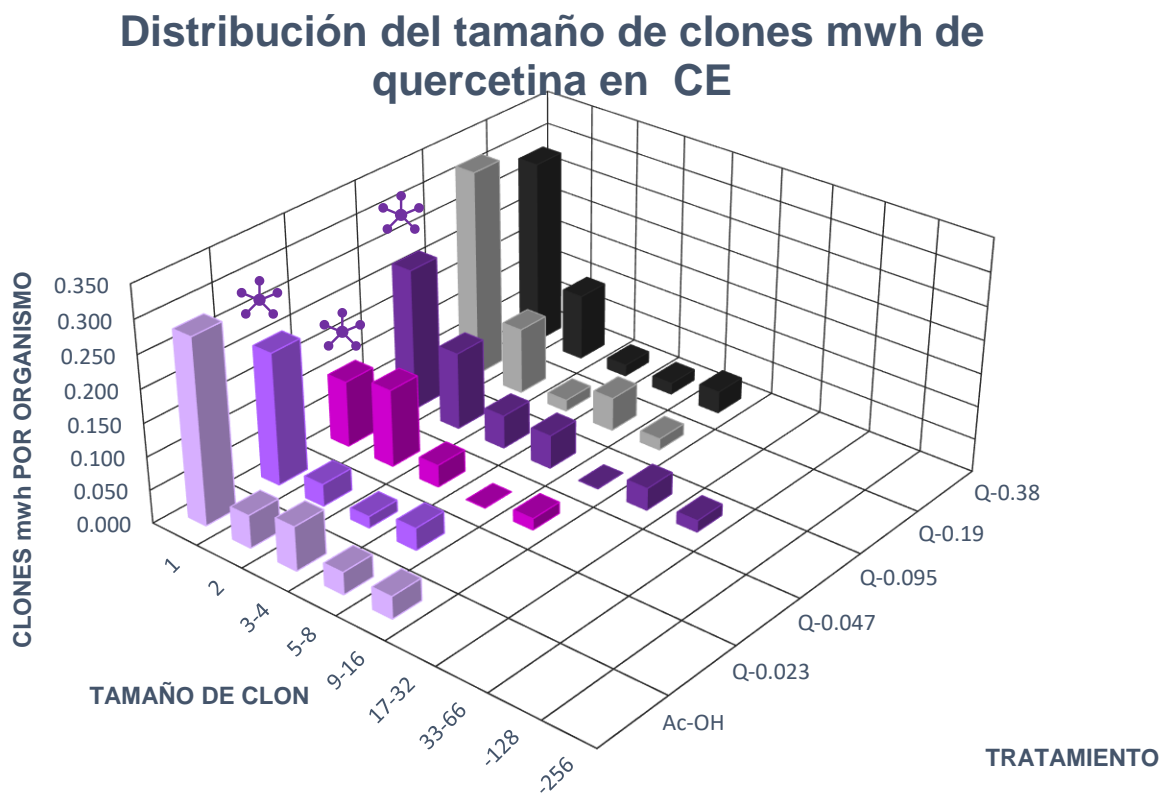


Figura 23. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con cinco concentraciones diferentes de quercetina.

Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.3 Efecto genotóxico de quercetina en cruza de bioactivación elevada (CBE)

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos con el programa SMART para PC (basado en la prueba Kastenbaum-Bowman) y la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Se analizaron un total de 513 organismos de *D. melanogaster* que corresponden a 1026 alas de fenotipo silvestre en nueve tratamientos: agua, acetona-etanol 2% (Ac-OH), vitamina C 5.6 mM (Vit-C), 4NQO 2 mM y cinco concentraciones diferentes de quercetina (Q-0.38, Q-0.19, Q-0.095, Q-0.047, Q-0.023mM).

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM/ Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM, Q-0.38 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.047 mM, Q-0.023mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Compuesto	No. de organismos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*					Clones <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Gemelas m=5	Manchas totales		
Testigo negativo (agua) / Testigo disolvente (Ac-OH) / Testigo antioxidante (Vit-C)							
Agua	63	0.35 (22)	0.06 (4)	0.02 (1)	0.43 (27)	024	
Ac-OH 2%	62	0.32 (20) -/ns	0.00 (0) -/s	0.00 (0) i/ns	0.32 (20) -/ns	020	
Vit-C 5.6 mM	60	0.38 (23) -/ns	0.13 (8) i/s	0.00 (0) i/ns	0.52 (20) -/ns	028	
Testigo disolvente (Ac-OH) / Testigo positivo (4NQO)							
Ac-OH 2%	62	0.32 (20)	0.0 (0)	0.00 (0)	0.32 (20)	020	
4NQO 2 mM	56	2.45 (137) +/s	3.02 (169) +/s	1.07 (60) +/s	6.54 (366) +/s	106	
Testigo disolvente (Ac-OH) / Tratamientos quercetina							
Ac-OH 2%	62	0.32 (20)	0.0 (0)	0.00 (0)	0.32 (20)	020	
Q-0.023 mM	57	0.30 (17) -/ns	0.04 (2) i/ns	0.02 (1) i/ns	0.35 (20) -/ns	019	
Q-0.047 mM	42	0.36 (15) i/ns	0.07 (3) i/s	0.00 (0) i/ns	0.43 (18) -/ns	017	
Q-0.095 mM	50	0.30 (15) -/ns	0.08 (4) +/s	0.02 (1) i/ns	0.40 (20) -/ns	019	
Q-0.19 mM	61	0.41 (25) i/ns	0.05 (3) i/ns	0.00 (0) i/ns	0.46 (28) -/ns	028	
Q-0.38 mM	62	0.23 (14) -/ns	0.08 (5) +/s	0.03 (2) i/ns	0.34 (21) -/ns	020	

a) Diagnóstico estadístico de la prueba Kastenbaum-Bowman de acuerdo con Frei Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde m= factor de multiplicación; positivo= +; negativo= -; indeciso= i. Prueba estadística de una cola con niveles de probabilidad α , β (0.05).

-
- b) Diagnóstico estadístico prueba de U de Mann-Whitney. Donde: ns= no significativo; s= significativo

Al comparar específicamente, las frecuencias de manchas del testigo negativo agua, contra los testigos Ac-OH y Vit-C no se encontró diferencia significativa en manchas pequeñas, gemelas y totales; sin embargo, si existe diferencia en el caso de las manchas grandes en ambos testigos, cuyos valores son: 0.00 para Ac-OH y 0.13 para Vit-C (Tabla 5 y Figura 25).

Particularmente, los resultados obtenidos para el testigo negativo Ac-OH, difieren con lo informado por, Sánchez-López (2015) y Santos-Cruz (2016), quienes utilizando una concentración de etanol al 1% y 2% respectivamente, no encontraron diferencias significativas en ningún tipo de mancha mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, CBE. De manera similar, Vasiliki et al. (2017) utilizando la misma prueba y cruza (CBE), no encontraron genotoxicidad al utilizar acetona 0.06% (v/v). Sin embargo, si hay una concordancia con lo reportado por, Dueñas-García (2017), quienes usando la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, CBE encontraron una reducción en las manchas pequeñas, grandes y totales utilizando una mezcla de Ac-OH (2% v/v +1% v/v).

Se sabe que, en *D. melanogaster* el etanol es metabolizado en un primer paso por la enzima ADH en acetaldehído, el cual, después es oxidado en acetato por la misma enzima (ADH) en el caso de las larvas o por la enzima ALDH en moscas adultas, y finalmente, es transformado en Acetil-CoA el cual se usa como precursor en el ciclo de Krebs y en la síntesis de ácidos grasos (Figura 24) (Geer et al., 1985; Geer et al., 1993; Heinstra et al., 1987); de manera similar, la acetona también es metabolizada por la enzima ADH en este díptero (Chambers, 1988). Sin embargo, es importante destacar que, si bien esta enzima procesa el 90% de etanol que consume *D. melanogaster* en acetaldehído, existen otros dos mecanismos que metabolizan el resto del etanol, que son la enzima catalasa y el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS por sus siglas en inglés) en el cual participan los CYP450 (Figura 24) (Gaviria et al., 2016). Esto último, puede explicar lo resultados obtenidos (Tabla 5 y Figura 25) ya que, la CBE cuenta con una alta expresión de los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2 que traen como resultado una elevada expresión de las enzimas CYP450 (Graf et al., 1998), lo cual pudo provocar que no se hayan encontrado diferencias significativas en las manchas pequeñas, gemelas, totales, y que incluso se haya encontrado una disminución de las manchas grandes (Tabla 5 y Figura 25).

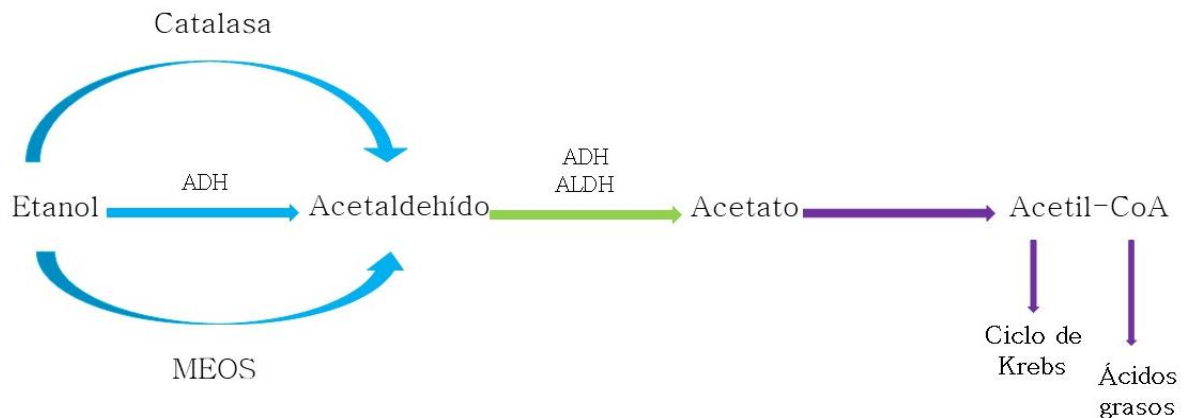


Figura 24. Diagrama del metabolismo de etanol en *D. melanogaster*
Modificado de: Geer et al., 1993

Además, la actividad de la enzima ADH es de vital importancia en la utilización del etanol como nutriente en *D. melanogaster* y para la tolerancia de este a lo largo de su desarrollo (Geer *et al.*, 1993). Algunos estudios como el de McKechnie y Geer (1984) han demostrado que la actividad de la ADH se incrementa tanto en el cuerpo gordo como en el tracto digestivo de las larvas de *D. melanogaster* cuando son alimentadas con una concentración moderada de 2.5% de este alcohol. Este parece ser el método de adaptación que utilizan las larvas frente al etanol ambiental, ya que, incluso el flujo de transformación o degradación de este líquido a compuestos no tóxicos como los lípidos también aumenta (Geer *et al.*, 1988), logrando así una efectiva desintoxicación. Lo cual, también puede explicar los resultados hallados (Tabla 5 y Figura 25).

Para el caso de Vit-C, los resultados encontrados coinciden parcialmente, con lo reportado por Ferreiro-Costa y Nepomuceno (2006) quienes mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* CBE probaron la genotoxicidad de una mezcla de vitamina C, vitamina E y β -caroteno (0.07, 0.14 y 0.28 mM), encontrando que, no hubo una diferencia significativa en la frecuencia de manchas respecto al control en ninguna dosis. De forma similar, Singh y Patnaik (2010) no encontraron diferencias significativas en las frecuencias de todos los tipos de manchas, utilizando vitamina C a una concentración de 50, 100 y 200 mM en prueba SMART, CBE. Mientras que, Dueñas-García et al. (2017) utilizando la misma prueba y la misma cruce, tampoco encontraron diferencias significativas en las frecuencias de manchas al probar vitamina C a una concentración de 5.6 mM.

Esta falta de genotoxicidad de Vit-C en la CBE en manchas pequeñas, gemelas y totales, pueden explicarse de dos maneras: 1) tomando en cuenta la característica principal de esta cruz, (alta expresión de CYP450); ya que, precisamente esta alta expresión pudo promover que la Vit-C se oxidara causando citotoxicidad (Csala *et al.*, 1999; Valko *et al.*, 2006) evitando así, que se encontraran frecuencias altas de manchas; o la opción 2) que la vitamina C jugara un papel antioxidante, participando en la segunda fase del metabolismo xenobiótico, provocando una desintoxicación (Arranz *et al.*, 2007) lo que trajo como resultado que no hubiera una diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo negativo agua en estos tipos de manchas (Tabla 5 y Figura 25). Sin embargo, en el caso de las manchas grandes, si se encontró un aumento significativo (Tabla 5 y Figura 25).

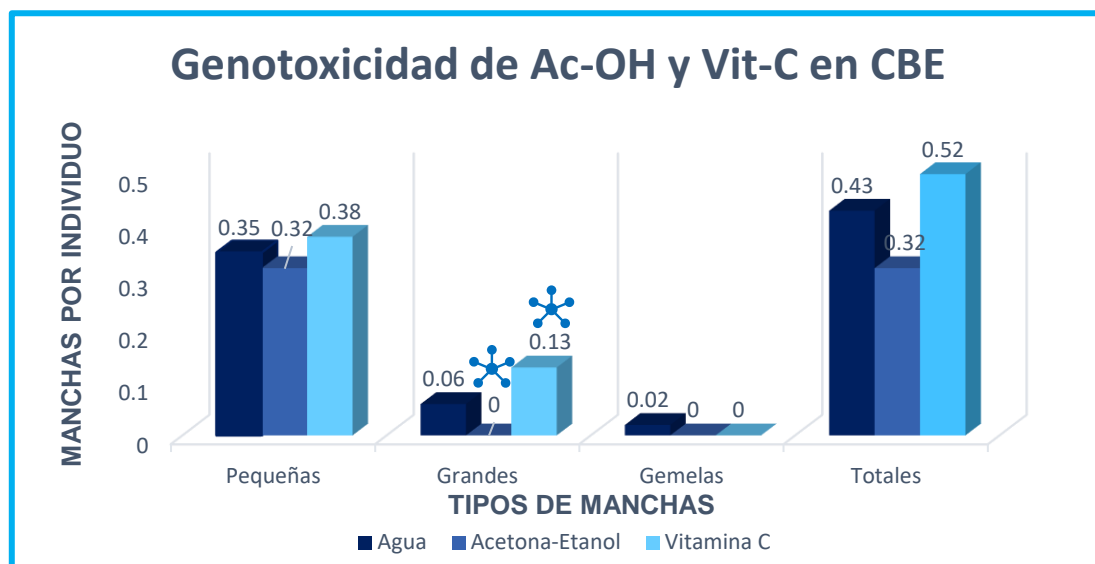



Figura 25 Genotoxicidad de Ac-OH y Vit-C en *D. melanogaster* CBE.
Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, cuando se compararon estadísticamente las frecuencias del testigo positivo 4NQO con respecto al testigo disolvente Ac-OH; se observó un aumento significativo de frecuencias en todos los tipos de manchas, cuyos valores son: 2.45, 3.02, 1.07 y 6.54. Lo cual, es un claro indicador de que este compuesto es genotóxico en la CBE (Tabla 5 y Figura 26).

Estos datos, asemejan lo reportado por Heres-Pulido (2004), quienes utilizando concentraciones de 2.5 y 5.0 mM de 4NQO; encontraron un aumento en todos los tipos de manchas con respecto al control en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, CBE. De manera similar, Dueñas-García (2012) y Dueñas-García (2017) reportan que, 4NQO

(2 mM) incrementó la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales; utilizando la misma prueba y cruza.

Como se mencionó antes, este aumento de frecuencias en todos los tipos de manchas (Tabla 5 y Figura 26), pueden deberse a la naturaleza mutagénica (Nagao y Sugimura, 1976) y carcinogénica (Nakahara *et al.*, 1957) del 4NQO, que le confieren la capacidad de incrementar las especies reactivas de oxígeno, causar ruptura simple de cadena y formación de sitios álcali lábiles en el ADN (Kohda *et al.*, 1991; Mirzayans *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2016). Así mismo, al ser metabolizado en 4HAQO, es capaz de causar indirectamente sustituciones en el ADN de G→T y A→C (Biaglow *et al.*, 1977; Cheng *et al.*, 1992).

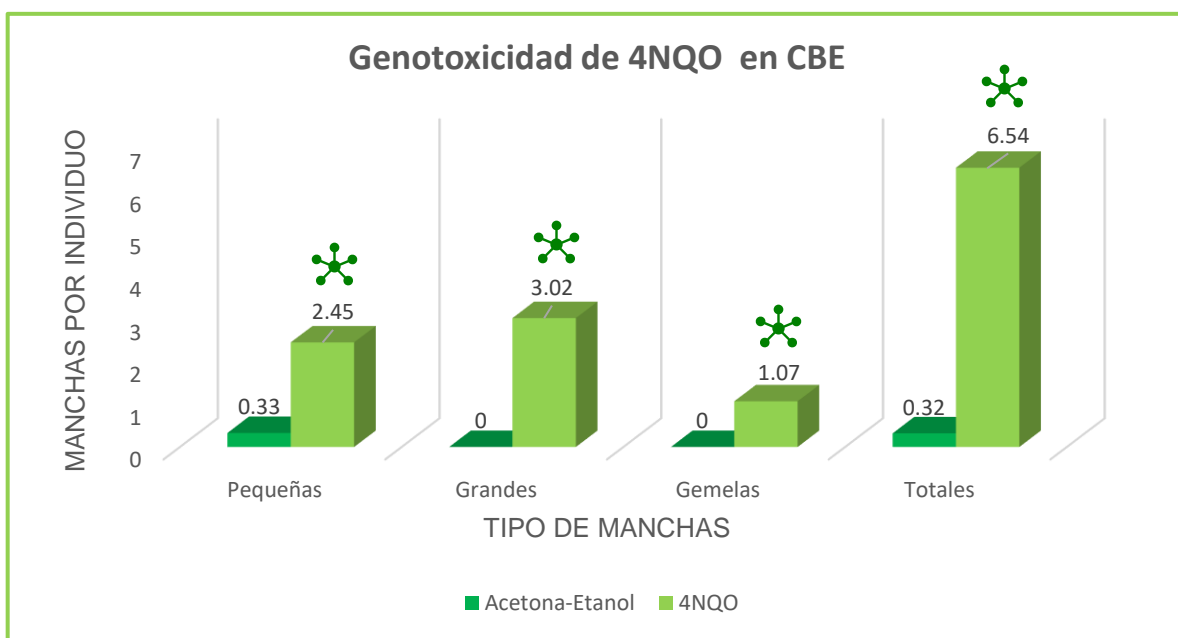


Figura 26. Genotoxicidad de 4NQO en *D. melanogaster* CBE.
Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$)

En cuanto a la comparación del testigo disolvente Ac-OH contra quercetina (0.23, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM), se encontró que no existe diferencia significativa de frecuencias de manchas en ninguna de las concentraciones analizadas; a excepción de las manchas grandes en las concentraciones 0.047 mM (0.07), 0.095 mM (0.08) y 0.38 mM (0.08) (Tabla 5 y Figura 27).

Estos resultados coinciden con lo publicado por, Bjeldanes y Chang (1997), quienes probaron el efecto de la quercetina a diferentes concentraciones: 50 μg , 250 μg , 1 mg, y 2.5 mg, usando la prueba de Ames y encontraron un efecto mutagénico en todos los tratamientos (sustitución de pares de bases y cambio del marco de lectura), el cual es directamente proporcional a la concentración de quercetina. De manera similar, Brown y

Dietrich (1979), al probar diferentes flavonoides con la misma prueba, reportaron que el flavonoide con mayor poder mutagénico es la quercetina (200 µg) con 12 revertantes/nmol. Por otro lado, Carver et al., (1983), usando células de ovario de hámster chino (CHO por sus siglas en inglés), encontraron que la quercetina (6 µg/ml) incrementa la incidencia de aberraciones cromosómicas. Mientras que, Duthie et al., (1997), concluyeron, por medio del ensayo cometa *in vitro*, que la quercetina es genotóxica en todas las concentraciones probadas: 200, 400, 6000, 8000, 1000 µM, ya que, incrementó la frecuencia de las roturas de cadena del ADN.

A pesar de ser un eficaz antioxidante, se ha probado en diversos estudios, que la quercetina también es capaz de provocar daños genéticos como mutaciones inversas, sustitución de pares de bases, cambio del marco de lectura, intercambio de cromátides hermanas, aberraciones cromosómicas y respuestas SOS en bacterias (Brown y Dietrich, 1979; Caria *et al.*, 1995; Carver *et al.*, 1983; Bjeldanes y Chang, 1997; Da Silva *et al.*, 2002; Duthie *et al.*, 1997; Gaspar *et al.*, 1994). Esto puede deberse a que, la quercetina es capaz de auto-oxidarse en anión superóxido y puede como última instancia, inducir la producción de hidróxidos altamente reactivos (Ochiai *et al.*, 1984; Rueff *et al.*, 1989); esto es importante ya que, en *D. melanogaster*, este anión superóxido puede producir daño oxidativo bajo dos formas: convirtiéndose en H₂O₂, formado por la acción reductora de la enzima superóxido dismutasa (SOD); y la segunda forma, reduciendo completamente los complejos metálicos que interaccionan con el H₂O₂ (Carton y Nappi, 1992). Todo esto puede explicar los resultados obtenidos con quercetina 0.047, 0.095 y 0.38 mM (Tabla 5 y Figura 27).

Otro aspecto interesante, es que, se tiene conocimiento de que algunos flavonoides son capaces de interferir con la actividad del CYP450, que en esta craza (CBE) tienen un nivel alto de expresión (Buening *et al.*, 1981; Cermak y Wolfram, 2006). Particularmente, para la quercetina se ha comprobado que es un potente inhibidor de algunas enzimas CYP450 como CYP2C8 (Toda *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2007), CYP2C9 (Si *et al.*, 2009) y CYP3A4 (Choi *et al.*, 2001) en concentraciones inferiores a 50 M. Lo cual, también puede explicar, que se hayan encontrado un aumento en las frecuencias de manchas grandes, las cuales aparecen como resultado de mutaciones puntuales, alteraciones cromosómicas o recombinación mitótica durante la etapa larvaria en *D. melanogaster* (Peremartí, 2012) (Tabla 5 y Figura 27).

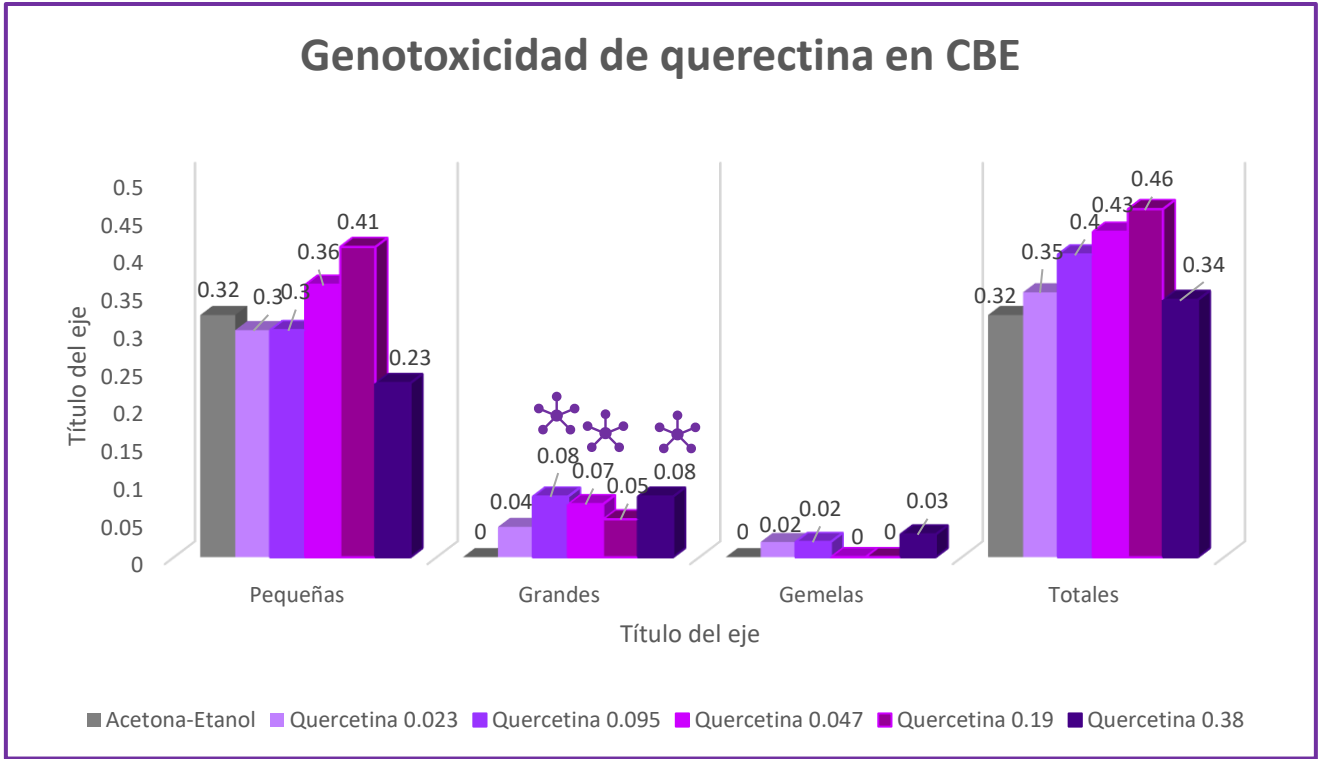


Figura 27. Genotoxicidad de cinco concentraciones diferentes de quercetina en *D. melanogaster* CBE

Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$)

8.4 Distribución del tamaño de clones mutantes en cruza de bioactivación elevada (CBE)

Para el análisis de distribución de clones mutantes, se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov, la cual comparó las frecuencias acumuladas de clones *mwh* encontradas en las células de las alas de *D. melanogaster* CBE en cada tratamiento.

Se encontró diferencia significativa con respecto al testigo negativo, en cada caso (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CBE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

Testigo	Tratamiento	Nivel de significancia	Diagnóstico
Agua	Ac-OH	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Vit-C	$p < 0.001$	+
Ac-OH	4NQO	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.023	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.047	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.095	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.19	$p < 0.001$	+
Ac-OH	Q-0.38	$p < 0.001$	+

En el caso del testigo negativo agua, se encontraron clones de hasta cuatro células, mientras que, para la mezcla de Ac-OH, los clones no superaron dos células, lo cual pudiera sugerir una alteración en el proceso de división celular, relacionada con una disminución de clones o células mutadas (Tabla 6 y Figura 28). Estos resultados se pueden explicar, tomando en cuenta que el etanol posee un efecto citotóxico, comprobado en algunos estudios; por ejemplo, Wu y Cederbaum, (1996) encontraron que, el etanol es capaz de dañar células HepG2 que expresan CYP231 humano, un gen relacionado con CYP450.

De manera similar, al comparar la distribución de clones *mwh* de Ac-OH, contra vit-C, se encontró una diferencia significativa, ya que, esta última, presentó clones hasta la sexta división celular (Tabla 6 y Figura 28). Esto puede deberse a un efecto citotóxico de la Vit-

C, ya que, en estudios *in vitro*, se ha encontrado que esta vitamina tiene poder antiproliferativo e induce apoptosis a células de adenocarcinoma colorrectal, como resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno (Mamede *et al.*, 2012).

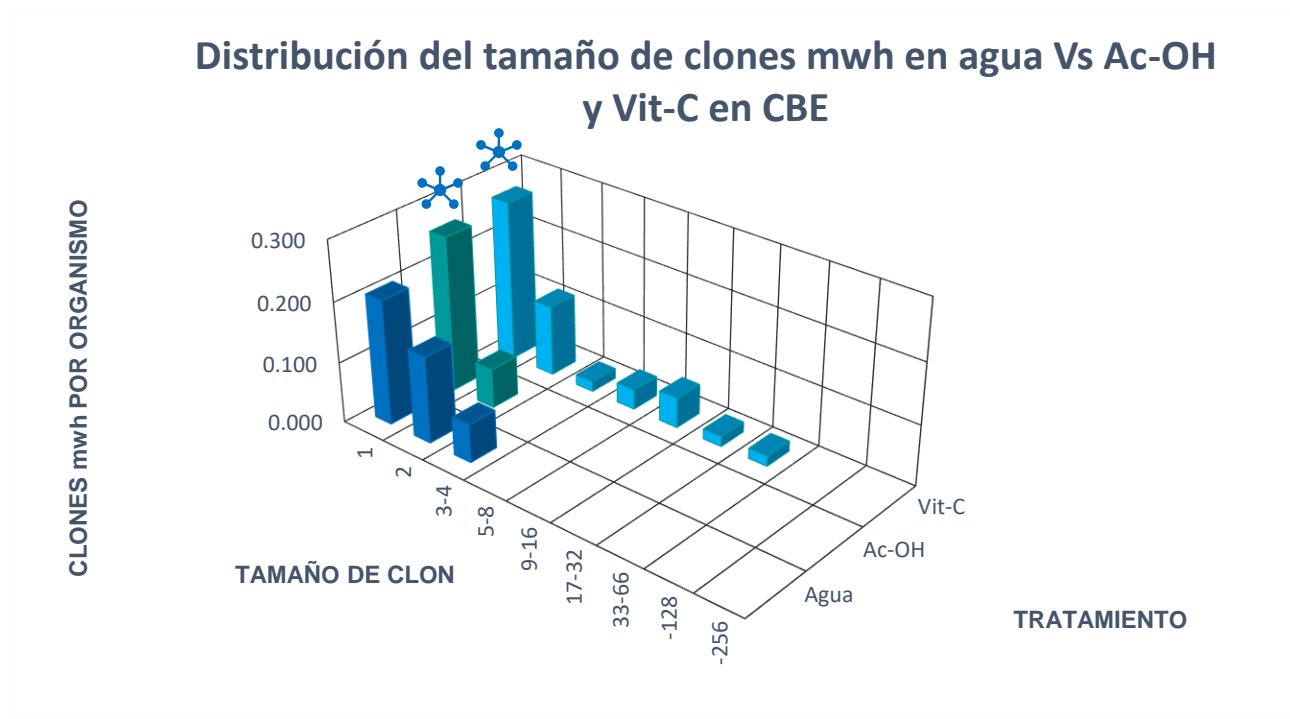


Figura 28. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua, comparado con los testigos Ac-OH y Vit-C.

Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$).

En cuanto al testigo positivo 4NQO, se observó una diferencia significativa con respecto a Ac-OH, ya que, presentó clones hasta la sexta división celular (33 a 66 células). Presentando la mayor frecuencia (1.250) los clones de dos células (Tabla 6 y Figura 29). Estos resultados, sugieren una alteración en la división celular provocada por este compuesto.

El 4NQO es un derivado de la quinolina, hidrosoluble y capaz de provocar daños similares a la radiación UV (Nagao y Sigimura, 1976) como una gran cantidad de aductos en el ADN y aberraciones cromosómicas en las células expuestas (Darroudi *et al.*, 1989). Lo cual, puede explicar que se hayan encontrado diferencias significativas en cuanto a la distribución de clones *mwh* con respecto al testigo disolvente Ac-OH (Tabla 6 y Figura 29).

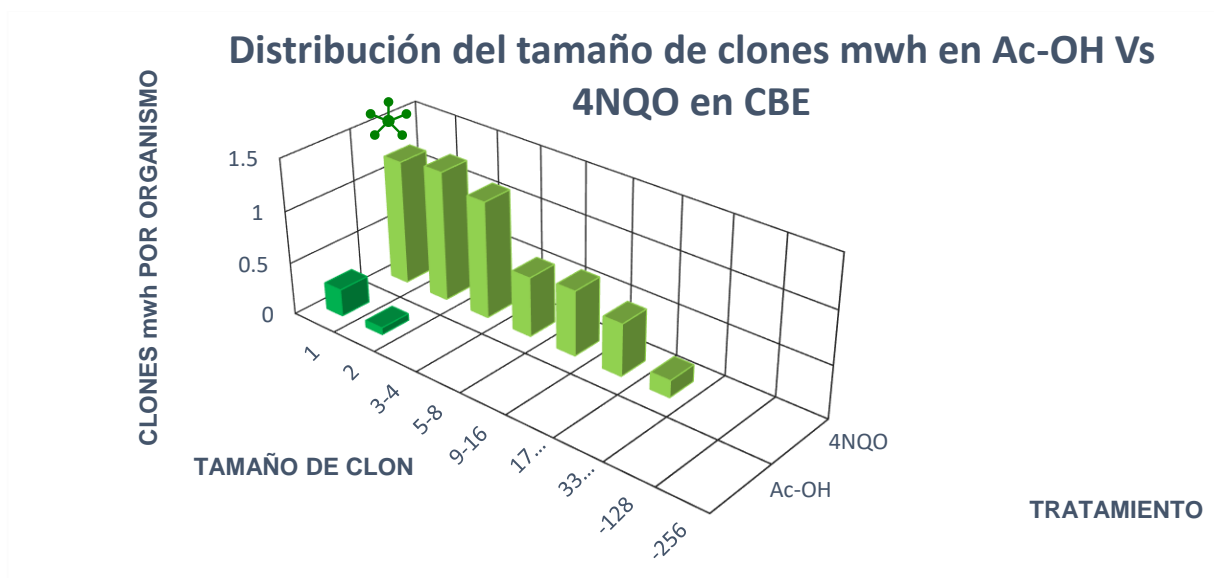



Figura 29. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con el testigo positivo 4NQO. Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, al comparar la distribución acumulada de Ac-OH, contra cinco diferentes concentraciones de quercetina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19, 0.38 mM); se encontró diferencia significativa en cada caso. Para la concentración 0.023 mM, los clones de una única célula tuvieron la mayor frecuencia con 0.175; en el caso de 0.047 mM, 0.214 fue la frecuencia dominante, e igualmente, pertenece a los clones de una célula; en la concentración 0.095 mM, la frecuencia más alta fue de 0.2 que pertenecen a clones de una única célula; en cuanto a 0.19 mM, dominaron los clones de una célula con 0.262, sin embargo, se encontraron clones de hasta 128 células (séptima división celular); finalmente, para 0.38 mM, el valor máximo de frecuencia fue 0.129 en la primera división celular (2 células). De acuerdo a todos estos resultados, se puede inferir, que todas las concentraciones de quercetina tuvieron un impacto en la división celular (Tabla 6 y Figura 30).

Como se ha mencionado anteriormente, la quercetina es un potente antioxidante que ha demostrado en diferentes estudios protección frente a un gran número de padecimientos y enfermedades (Huk *et al.*, 1998; Mojzis *et al.*, 2001; Ina *et al.*, 2002; Kahraman *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2008; De Whalley *et al.*, 2008; Meyers *et al.*, 2008; Annapurna *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). Sin embargo, y como contraparte a su efecto antioxidante, también se ha comprobado que la quercetina puede producir efectos dañinos a nivel celular, por ejemplo, utilizando células CHO, se descubrió que este flavonoide afecta la viabilidad de dichas células, mediante un comportamiento dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración, el efecto citotóxico encontrado se incrementó (Metodiewa *et al.*, 1999).

Metodiewa et al. (1999). Proponen que, este efecto citotóxico es provocado cuando la quercetina se activa enzimáticamente mediante un proceso de oxido-reducción reversible, que da como resultado dos productos, la o-semiquinona y la o-quinona, las cuales facilitan la formación de superóxidos, H_2O_2 y el agotamiento de glutatión reducido (GSH). La formación de esta o-semiquinona a partir de quercetina, se da durante una reacción de oxidación (LPO-catalyzed oxidation) de la siguiente manera:



Donde Q representa a la quercetina y $Q^{\cdot-}$ a la o-semiquinona. Todo esto, puede explicar que, se hayan encontrado diferencias significativas en la distribución de clones *mwh* en todas las concentraciones de quercetina (Tabla 6 y Figura 30).

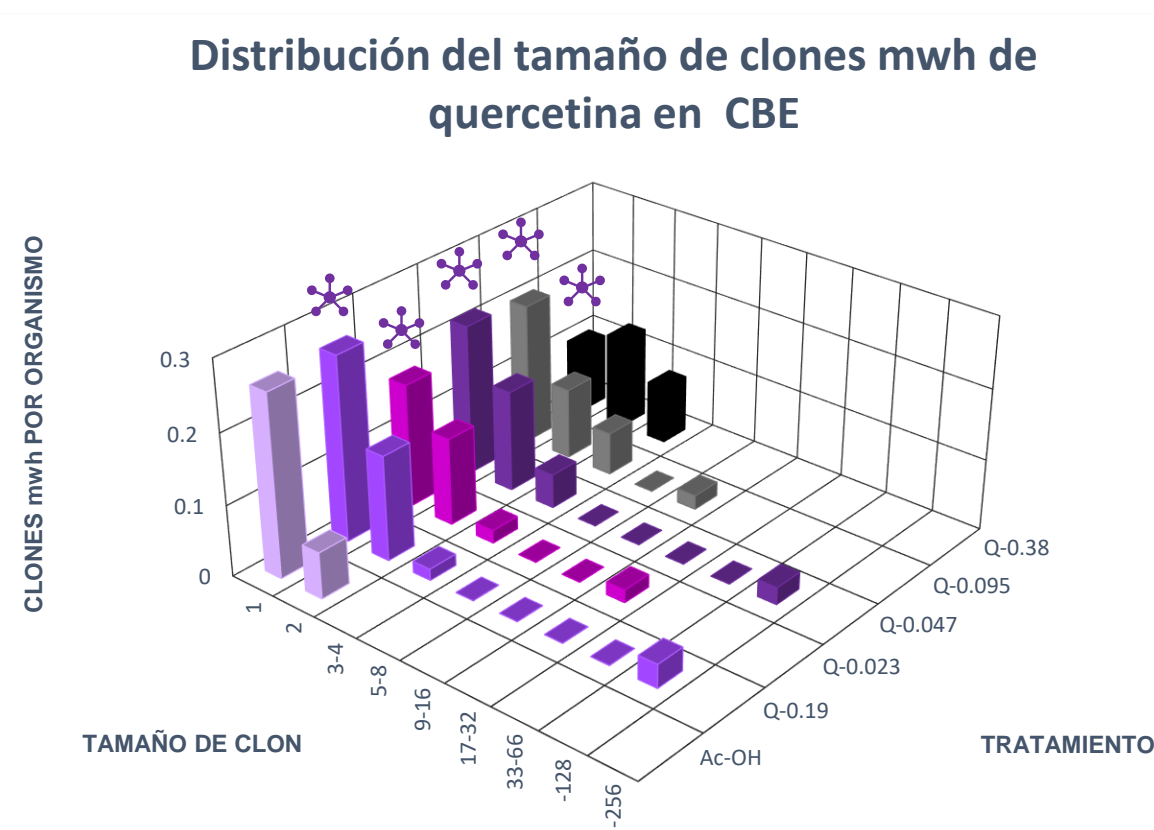


Figura 30. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH, comparado con cinco concentraciones diferentes de quercetina.

Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$)

8.5 Efecto genotóxico de quercetina en ambas cruzas

En la tabla 7, se observan los resultados obtenidos a partir de las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$), donde se compararon las frecuencias y el número de manchas por individuo de ambas cruzas (CE y CBE), del testigo negativo agua, testigo disolvente Ac-OH, testigo positivo: 4NQO y testigo prooxidante Vit-C, con su respectivo par.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Agua, 4-NQO 2 mM, Ac-OH 2%, Vit-C 5.6 mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Cruza	No. de organismos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Gemelas m=5	Manchas totales	Clones <i>mwh</i>
Testigo negativo (Agua)						
CE	60	0.37 (22)	0.03 (2)	0.00 (0)	0.40 (24)	024
CBE	63	0.35 (22) -/ns	0.06 (4) i/ns	0.02 (1) i/ns	0.43 (27) -/ns	024
Testigo disolvente (Ac-OH)						
CE	60	0.33 (20)	0.13 (8)	0.02 (1)	0.48 (29)	026
CBE	62	0.32 (20) -/ns	0.00 (0) +/s	0.00 (0) i/ns	0.32 (20) i/ns	020
Testigo antioxidante (Vit-C)						
CE	60	0.24 (15)	0.06 (4)	0.02 (1)	0.32 (20)	019
CBE	60	0.38 (23) i/ns	0.13 (8) i/ns	0.00 (0) i/ns	0.52 (20) i/ns	028
Testigo positivo (4NQO)						
CE	62	0.81 (50)	0.85 (53)	0.15 (9)	1.81 (112)	106
CBE	56	2.45 (137) +/s	3.02 (169) +/s	1.07 (60) +/s	6.54 (366) +/s	330

- a) Diagnóstico estadístico Kastenbaum-Bowman de acuerdo con Frei Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m= factor de multiplicación; positivos= +; negativos= -; indeciso = i. Prueba estadística de una cola con niveles de probabilidad α , β (0.05).
- b) Diagnóstico estadístico prueba de U de Mann-Whitney. Donde: ns= no significativo; significativo= s.

En el caso del testigo negativo agua, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la CE y CBE, en ningún tipo de manchas cuyos valores son: manchas pequeñas 0.37 y 0.35, manchas grandes 0.03 y 0.06, manchas gemelas, 0 y 0.02, manchas totales 0.40 y 0.43 respectivamente (Tabla 7 y Figura 31). Esto es un claro indicativo de que la diferencia de expresión de CYP450 en cada cruza no tiene participación en los resultados del testigo agua en *D. melanogaster*.

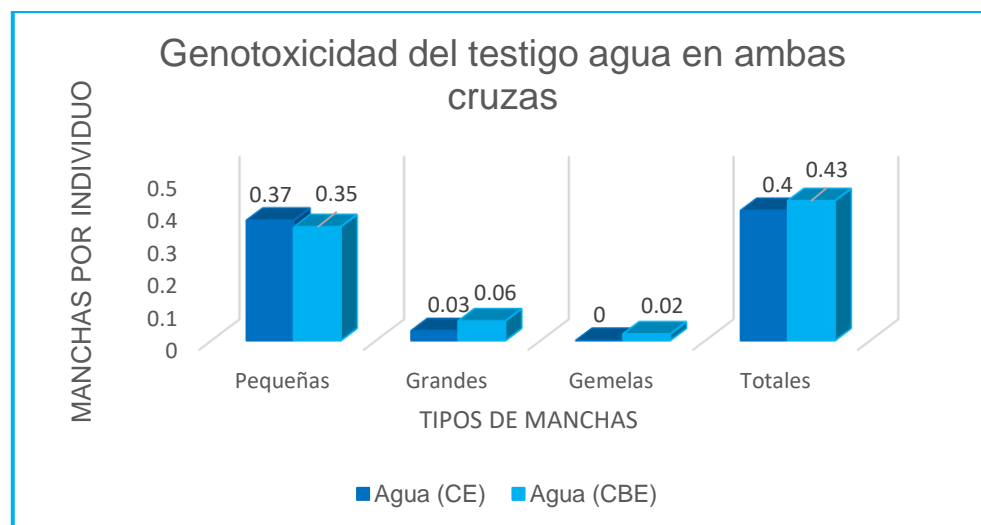


Figura 31. Genotoxicidad del testigo negativo agua en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

El caso contrario ocurrió con el testigo disolvente Ac-OH, donde se encontró una diferencia significativa en las frecuencias de manchas grandes, cuyos valores fueron: 0.13 para la CE y 0 para la CBE (Tabla 7 y Figura 32).

El proceso de metabolización del alcohol, comprende tres pasos principales; primero, por medio de la enzima ADH y el sistema MEOS (en el cual participa CYP450), se transforma en acetaldehído, que más tarde en el segundo paso, se convierte en acetato por acción de la enzima ALDH en moscas adultas y en larvas por la enzima ADH, y finalmente, durante el tercer paso, este acetato se incorpora al ciclo de Krebs como Acetil-CoA (Gaviria, 2016). Esto es de suma importancia, debido a que, la CBE tiene niveles de expresión de CYP450 más altos que la CE, y la participación de estos durante el metabolismo del etanol, pueden explicar las diferencias encontradas al comparar ambas cruzas, en el sentido de que hubo una disminución de frecuencias de manchas grandes en la CBE (Tabla 7 y Figura 32).

Sin embargo, estos resultados (Tabla 7 y Figura 32) también se pueden explicar por el proceso contrario; y es que, cuando el acetaldehído (metabolito del alcohol) se acumula, es capaz de provocar aductos en el ADN tanto en sitios apúrinicos como apirimidínicos, dañar la membrana mitocondrial y causar muerte celular por disminución de la actividad enzimática de algunas proteínas como la glutatión transferasa (GST) capaces de degradar ROS (Baraona y Lieber, 1979; Crouse *et al.*, 1968; Korsten *et al.*, 1975; Lefevre *et al.*, 1972; Lundquist *et al.*, 1965; Minana *et al.*, 2002). Además, durante el metabolismo del alcohol por la enzima CYP2E1, se generan algunas ROS tales como, H_2O_2 , superóxidos y radical hidroxilo, que también pueden provocar daño genético como resultado de estrés oxidativo (Gaviria, 2016, Wang *et al.*, 2009). Por lo que, al tener la CBE mayor expresión

de CYP450, el daño citotóxico pudo ser superior y, por tanto, las frecuencias de manchas encontradas fueron menores (Tabla 7 y Figura 32).

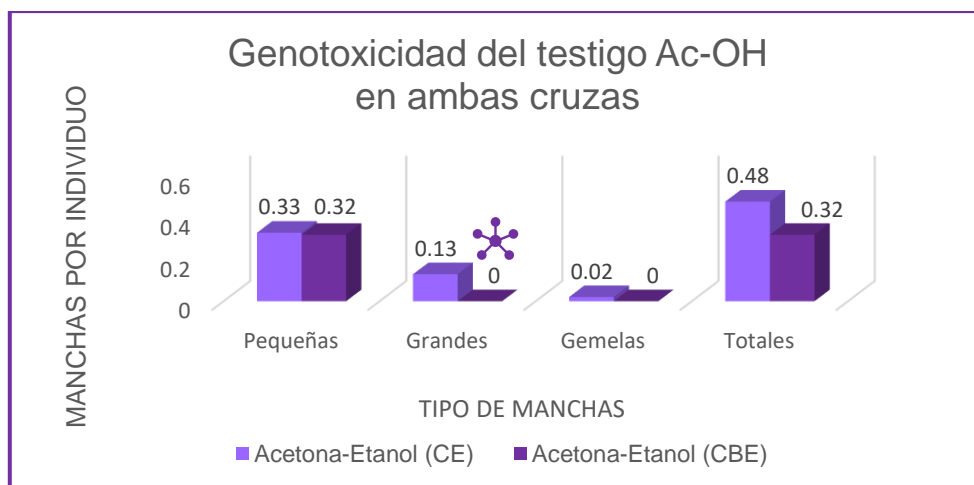



Figura 32. Genotoxicidad del testigo disolvente Ac-OH en ambas cruces de *D. melanogaster*. Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

En el caso particular del testigo prooxidante Vit-C, no se encontró diferencia significativa en ningún tipo de manchas cuyos valores son, manchas pequeñas: 0.24 y 0.38, manchas grandes: 0.06 y 0.13, manchas gemelas: 0.02 y 0.0, totales: 0.32 y 0.52 respectivamente (Tabla 7 y Figura 33). Estos resultados muestran que, los diferentes niveles de expresión de CYP450 de cada cruz, no influyeron en el efecto genotóxico de Vit-C.

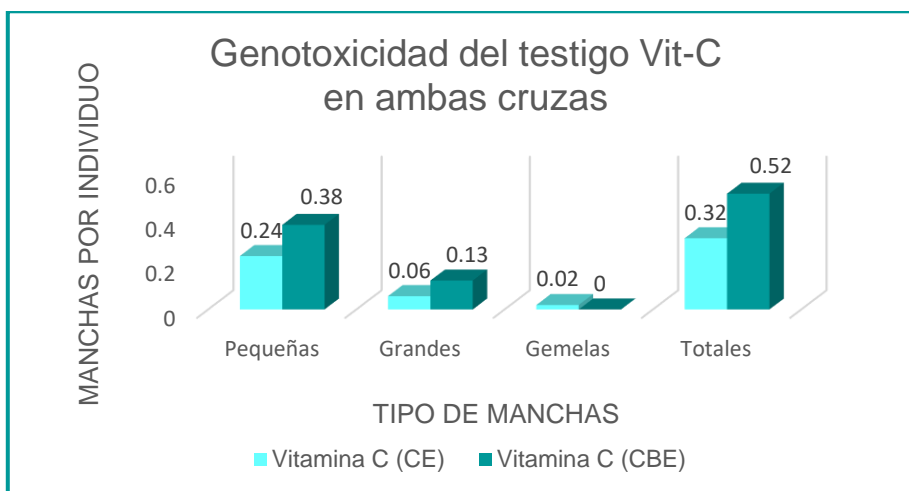


Figura 33. Genotoxicidad del testigo prooxidante Vit-C en ambas cruces de *D. melanogaster*.

En cuanto al testigo positivo 4NQO, se encontraron diferencias significativas en todos los tipos de manchas cuyos valores son, pequeñas: 0.81y 2.45, grandes: 0.85 y 3.02, gemelas: 0.15 y 1.07, totales: 1.81 y 6.54 respectivamente (Tabla 7 y Figura 34).

Estos resultados (Tabla 7 y Figura 34) eran los esperados y coinciden con lo reportado por Heres-Pulido et al. (2004), Heres-Pulido et al. (2010), Dueñas-García et al. (2012) y Dueñas-García et al. (2017), quienes mediante la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* compararon las frecuencias de manchas de las CE y CBE provocadas por 4NQO y en todos los casos encontraron un aumento en la CBE con respecto a la CE. Esto se puede explicar tomando en cuenta que, para provocar daño al ADN, especialmente mediante la formación de aductos, el 4NQO debe ser activado durante el metabolismo xenobiótico en el que participan los CYP450, donde se obtiene su metabolito 4HAQO que es el principal responsable de dichos aductos en el ADN (Arellano-Llamas, 2008; Gaivao et al., 1999; Kohda et al., 1991; Nagao y Sugimura, 1976).

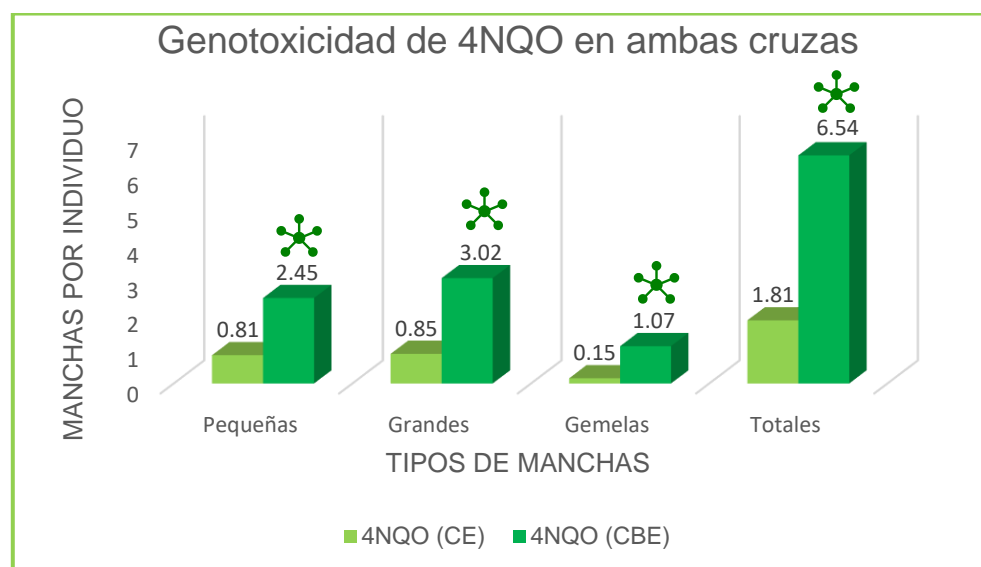


Figura 34. Genotoxicidad del testigo positivo 4NQO en ambas cruzas de *D. melanogaster*.
 Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, en la Tabla 8, se pueden observar los resultados recolectados a partir de las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$), donde se compararon las frecuencias y el número de manchas por individuo de ambas cruzas (CE y CBE) con su par, de cinco diferentes concentraciones de quercetina: 0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM.

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos, después de alimentar larvas con Q-0.023mM, Q-0.047 mM, Q-0.19 mM, Q-0.095 mM, Q-0.38 mM y analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE y CBE mediante las pruebas Kastenbaum-Bowman y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Cruza	No. de organismos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*				
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Gemelas m=5	Manchas totales	Clones <i>mwh</i>
Tratamiento quercetina (Q-0.023 mM)						
CE	60	0.23 (14)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.28 (17)	016
CBE	57	0.30 (17) i/ns	0.04 (2) -/ns	0.02 (1) i/ns	0.35 (20) i/ns	019
Tratamiento quercetina (Q-0.047 mM)						
CE	60	0.22 (13)	0.05 (3)	0.02 (1)	0.28 (17)	017
CBE	42	0.36 (15) i/ns	0.07 (3) i/ns	0.00 (0) i/ns	0.43 (18) i/ns	017
Tratamiento quercetina (Q-0.095 mM)						
CE	60	0.33 (20)	0.15 (9)	0.07 (4)	0.55 (33)	029
CBE	50	0.30 (15) i/ns	0.08 (4) i/ns	0.02 (1) i/ns	0.40 (20) i/ns	019
Tratamiento quercetina (Q-0.19mM)						
CE	60	0.42 (25)	0.08 (5)	0.07 (4)	0.57 (34)	032
CBE	61	0.41 (25) -/ns	0.05 (3) i/ns	0.00 (0) i/s	0.46 (28) -/ns	028
Tratamiento quercetina (Q-0.38 mM)						
CE	60	0.38 (23)	0.08 (5)	0.02 (1)	0.48 (29)	027
CBE	62	0.23 (14) i/ns	0.08 (5) -/ns	0.03 (2) i/ns	0.34 (21) i/ns	020

- a) Diagnóstico estadístico Kastenbaum-Bowman de acuerdo con Frei Würigler (1988) comparado con su testigo correspondiente. Donde: m= factor de multiplicación; positivos= +; negativos= -; Indeciso= i. Prueba estadística de una cola con niveles de probabilidad α , β (0.05).
- b) Diagnóstico estadístico prueba de U de Mann-Whitney. Donde: ns= no significativo; significativo= s.

Al comparar las frecuencias de manchas de quercetina 0.023 mM, no se encontró diferencia significativa en ningún caso, cuyos valores son, manchas pequeñas: 0.23 y 0.3, grandes: 0.05 y 0.04, gemelas: 0 y 0.02, totales: 0.28 y 0.35, para la CE y CBE respectivamente. Estos resultados son un claro indicativo de que la alta expresión de CYP450 en CBE no afectó la genotoxicidad de quercetina 0.023 mM (Tabla 8 y Figura 35).

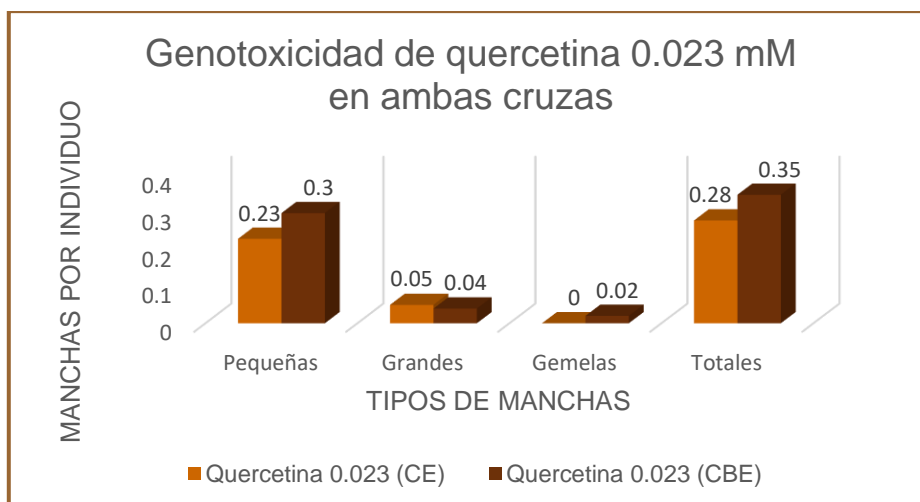


Figura 35. Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.023 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

De manera similar, en quercetina 0.047 mM, no se encontraron diferencias significativas en ningún caso. Los valores obtenidos para CE y CBE respectivamente son, manchas pequeñas: 0.22 y 0.36, grandes: 0.05 y 0.07, gemelas: 0.02 y 0, totales: 0.28 y 0.43 (Tabla 8 y Figura 36). Estos datos, reflejan que el posible efecto genotóxico de quercetina 0.047 mM no se vio afectado por los diferentes niveles de expresión de CYP450 de cada craza (CE y CBE).

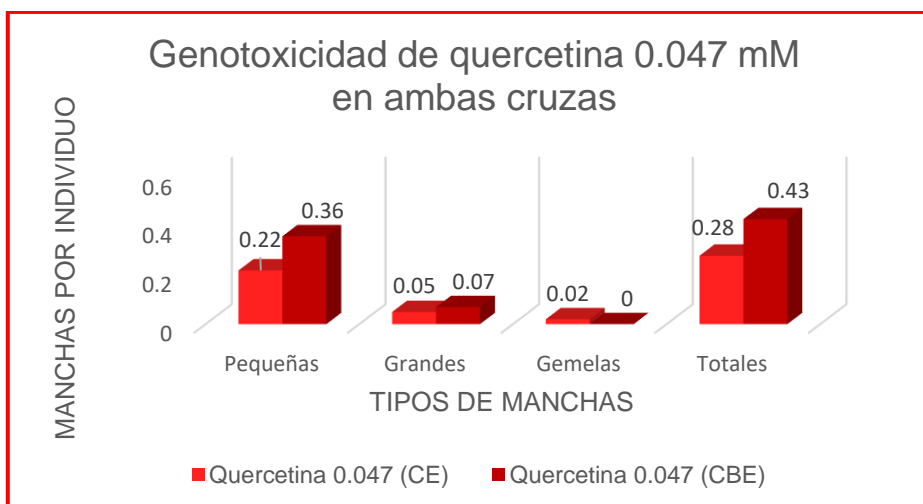


Figura 36. Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.047 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

Para el tratamiento quercetina 0.095 mM, tampoco se encontraron diferencias significativas en ningún tipo de manchas, cuyos valores son, manchas pequeñas: 0.33 y 0.3, grandes: 0.15 y 0.08, gemelas: 0.07 y 0.02, totales: 0.55 y 0.4, para la CE y CBE respectivamente (Tabla 8 y Figura 37). Lo cual, es un indicativo de que la diferencia de expresión de CYP450 en cada craza no afecta la genotoxicidad de quercetina 0.095 mM.

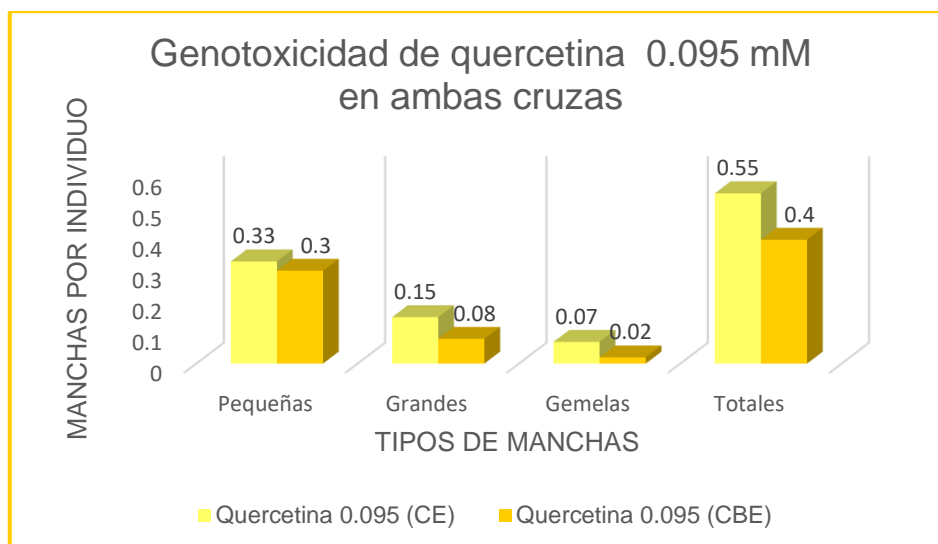


Figura 37. Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.095 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*.

El caso contrario ocurrió al comparar las frecuencias quercetina 0.19 mM de ambas cruzas, ya que, se encontró una diferencia significativa en las machas gemelas, cuyos valores son, CE: 0.07 y CBE: 0.0 (Tabla 8 y Figura 38). Esto, es un indicativo de que la quercetina (0.19 mM) influyó en la actividad de los CYP450 durante el metabolismo xenobiótico; y es que, como se ha mencionado antes, se ha comprobado que en algunos insectos incluyendo a *D. melanogaster*, la quercetina es capaz de interferir con la actividad de los CYP450 (Liu *et al.*, 2015; Ramos y Sultatos, 1998; Sing *et al.*, 2011) dicha influencia o interferencia pudo ser de tres maneras: la primera opción es que, la quercetina consiguió bloquear directamente las enzimas de CYP450 actuando como un inhibidor competitivo (Appiah-Opong *et al.*, 2007); el segundo escenario posible, es que, la quercetina haya interferido con el receptor de hidrocarburos de arilos (AhR, por sus siglas en inglés), lo que a su vez causó la inducción de las enzimas de CYP450 (Rinaldi *et al.*, 2002); o la tercera posible forma en la que la quercetina intervino, es actuando al nivel de las enzimas glutatión s-transferasa (GST por sus siglas en inglés), quiénes juegan un papel importante en la segunda fase del metabolismo xenobiótico (Oetari *et al.*, 1996). Estas tres posibles opciones pueden explicar los resultados obtenidos en el caso de las machas gemelas, sin embargo, en ningún otro tipo de manchas se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar quercetina 0.19 mM en ambas cruzas (Tabla 8 y Figura 38).

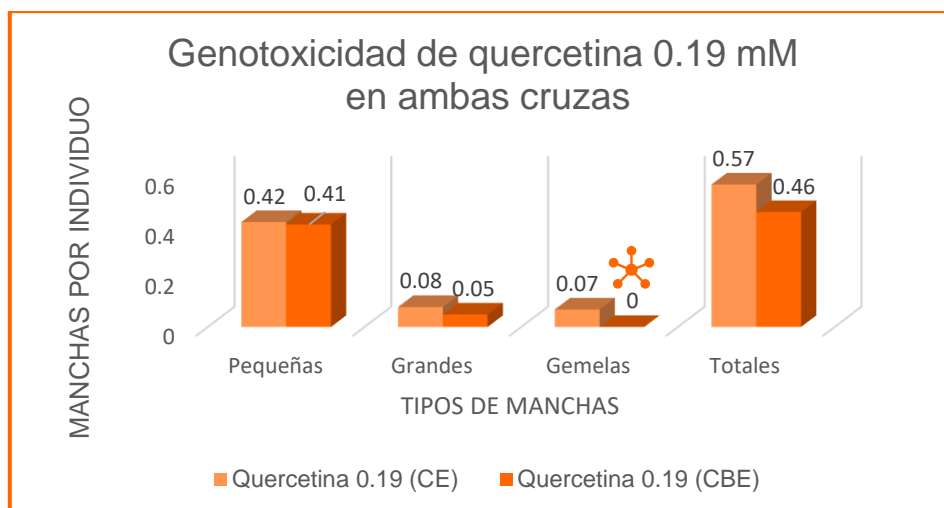


Figura 38. Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.19 mM en ambas cruas de *D. melanogaster*.

Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$)

Finalmente, para el tratamiento quercetina 0.38 mM, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún tipo de manchas: pequeñas: 0.38 y 0.23, grandes: 0.08 y 0.08, gemelas: 0.02 y 0.03, totales: 0.48 y 0.34 en CE y CBE respectivamente (Tabla 8 y Figura 39). Estos resultados muestran que, los diferentes niveles de expresión de CYP450 de cada crua, no influyeron en el efecto genotóxico de quercetina a una concentración de 0.38 mM.

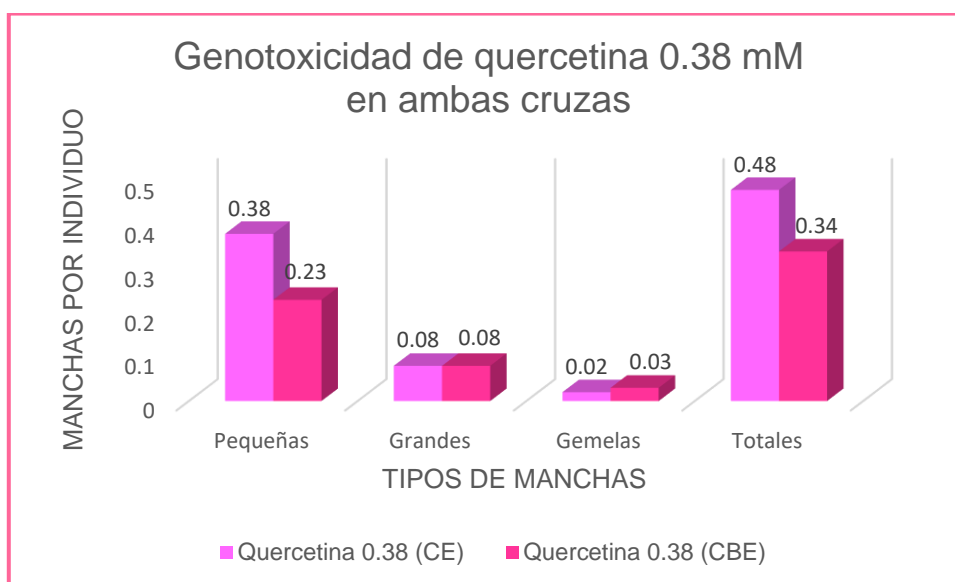


Figura 39. Genotoxicidad del tratamiento quercetina 0.38 mM en ambas cruas de *D. melanogaster*.

8.6 Distribución del tamaño de clones mutantes en ambas cruzas

Finalmente, se realizó el análisis de distribución de clones mutantes, mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov, la cual comparó las frecuencias acumuladas de clones *mwh* encontradas en las células de las alas de *D. melanogaster* CE y CBE en cada tratamiento.

Se encontró diferencia significativa en todos los casos (testigos negativos, positivos y tratamientos) para ambas cruzas (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de la distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* en CE y CBE de *D. melanogaster*, realizado a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Donde, no significativo = - y significativo = +.

Testigo	Tratamiento	Nivel de significancia	Diagnóstico
Agua	Agua	$p < 0.005$	+
Ac-OH	Ac-OH	$p < 0.005$	+
Vit-C	Vit-C	$p < 0.001$	+
4NQO	4NQO	$p < 0.025$	+
Q-0.023	Q-0.023	$p < 0.005$	+
Q-0.047	Q-0.047	$p < 0.005$	+
Q-0.095	Q-0.095	$p < 0.001$	+
Q-0.19	Q-0.19	$p < 0.025$	+
Q-0.38	Q-0.38	$p < 0.001$	+

En el caso particular del testigo negativo agua, para la CE se encontraron clones de hasta 5-8 células, cuyo valor más alto fue 0.283 y corresponde a clones de una sola célula; mientras que, para la CBE se encontraron clones de 3-4 células cuyo valor dominante fue 0.206 correspondiente a los clones de una única célula (Tabla 9 y Figura 40). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

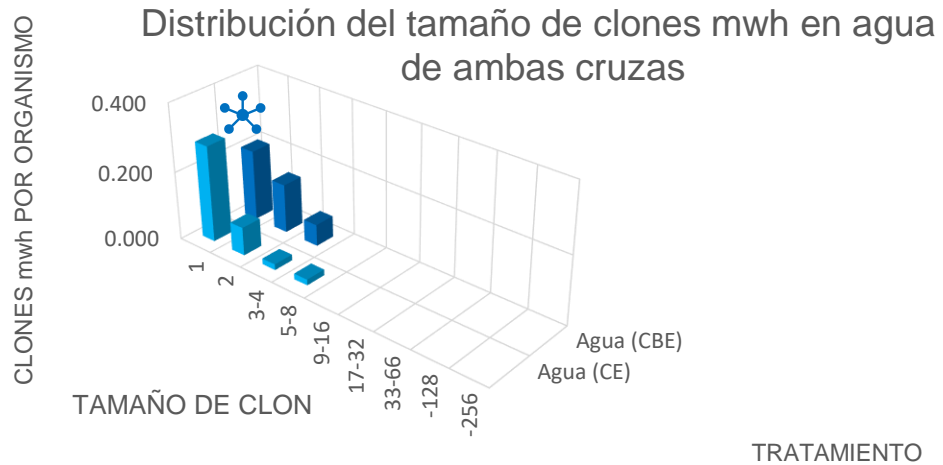


Figura 40. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo negativo agua en ambas cruces de *D. melanogaster*.

Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

De manera similar, para el testigo disolvente Ac-OH se encontraron diferencias significativas en la distribución de clones, ya que, en la CE se encontraron clones de hasta 9-16 células, mientras que en la CBE se encontraron clones hasta la primera división celular (Tabla 9 y Figura 41). Estos resultados, reflejan que la diferencias entre ambas cruces (nivel de expresión de CYP50) influyó en la distribución de clones *mwh* provocada por etanol; y es que, como se ha mencionado antes, se sabe que el etanol es capaz de causar daño citotóxico *in vitro* en algunas células que expresan *CYP231* humano, un gen relacionado con *CYP450* (Wu y Cederbaum, 1996), lo cual puede explicar que en la CBE a diferencia de la CE, el tamaño de clon más grande fuera de únicamente dos células (Tabla 9 y Figura 41).

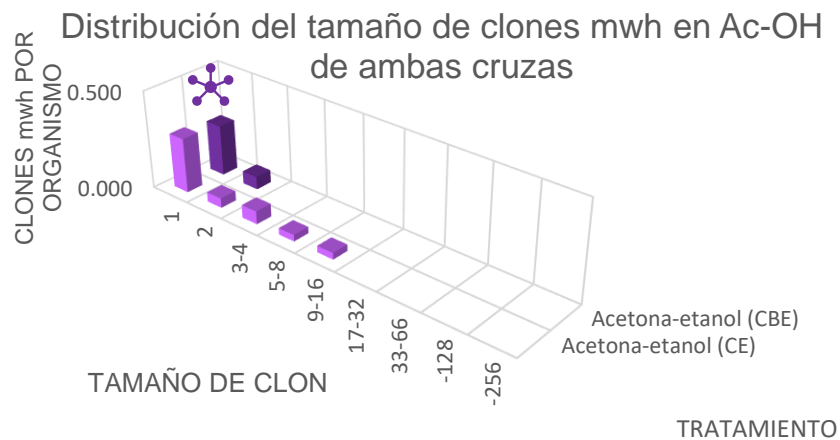



Figura 41. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo disolvente Ac-OH en ambas cruces de *D. melanogaster*.

Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

En cuanto al testigo prooxidante Vit-C, se encontró que la mayor frecuencia pertenece a la CBE con un valor de 0.267 para clones de una célula, mientras que, para la CE la frecuencia más alta fue de 0.175 para clones del mismo tamaño. Estas diferencias fueron significativas estadísticamente (Tabla 9 y Figura 42).

La Vit-C, de acuerdo a estos datos obtenidos, influyó en la distribución de clones de *mwh* de cada crua de forma diferente; en la CBE la alta expresión de CYP450 pudo causar que esta vitamina C se oxidara causando citotoxicidad (Csala *et al.*, 1999; Valko *et al.*, 2006) (Tabla 9 y Figura 42).

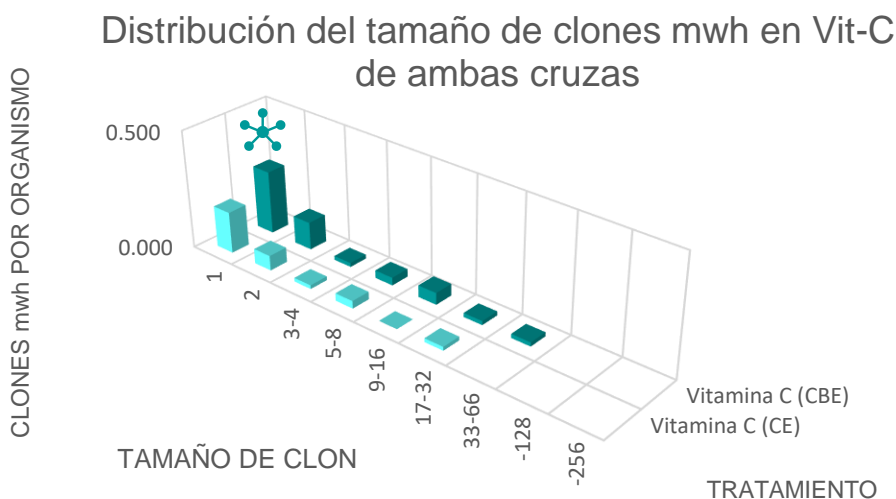


Figura 42. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo prooxidante Vit-C en ambas cruas de *D. melanogaster*.

Donde: = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Para el testigo positivo 4NQO, en la CBE se encontraron clones hasta la sexta división celular (de 33 a 66 células), siendo la frecuencia más alta 1.250 que corresponde a clones de dos células; mientras que, para la CE se encontraron clones hasta la quinta división celular (17-32 células) y una frecuencia máxima de 0.484 en clones de una única célula; todo lo anterior, muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de clones de ambas cruas (Tabla 9 y Figura 43).

Como se ha mencionado antes, el 4NQO debe ser activado metabólicamente para que obtenga su poder mutagénico, citotóxico y carcinogénico a través de su metabolito 4HAQO; por lo cual, puede explicarse que en la CBE se hayan encontrado frecuencias más altas y tamaños de clones más grandes, debido al alto nivel de expresión de CYP450 que posee, los cuales participan en el metabolismo xenobiótico (Arellano-Llamas, 2008; Gaivao *et al.*, 1999; Kohda *et al.*, 1991; Nagao y Sugimura, 1976).

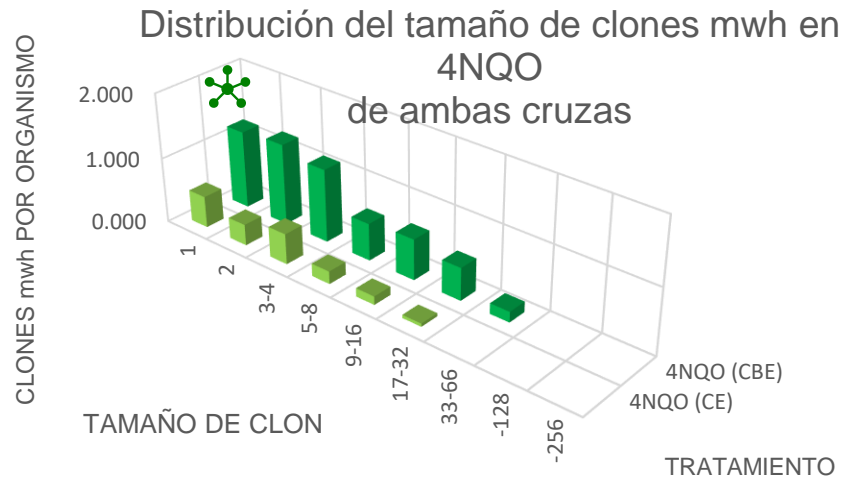


Figura 43. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del testigo positivo 4NQO en ambas cruces de *D. melanogaster*.
 Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Al comparar la distribución del tamaño de clones *mwh* de quercetina 0.023, se encontró diferencia estadísticamente significativa. En el caso de la CE los clones llegaron hasta la tercera división celular, mientras que, para la CBE se encontraron clones hasta la quinta división (Tabla 9 y Figura 44).

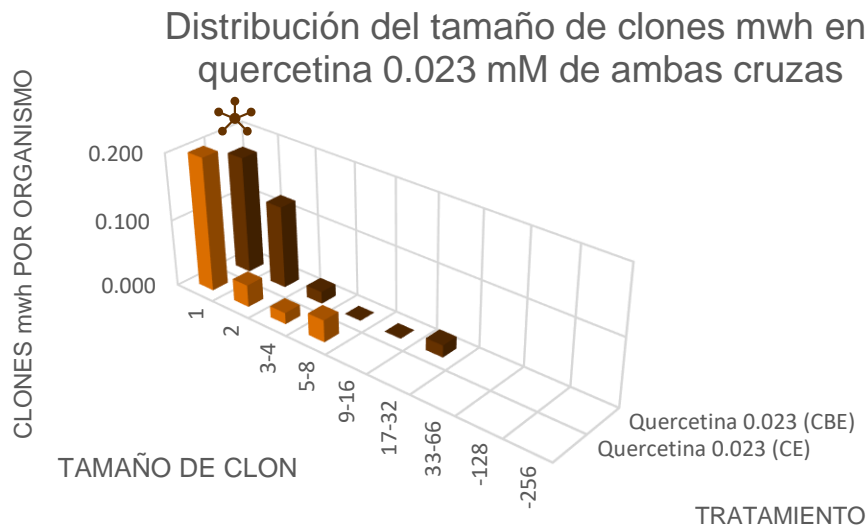


Figura 44. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.023 mM en ambas cruces de *D. melanogaster*.
 Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

En cuanto al tratamiento quercetina 0.047, para la CBE se encontraron clones hasta la séptima división celular, mientras que en la CE se encontraron clones hasta la cuarta división. Estos resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 9 y Figura 45).

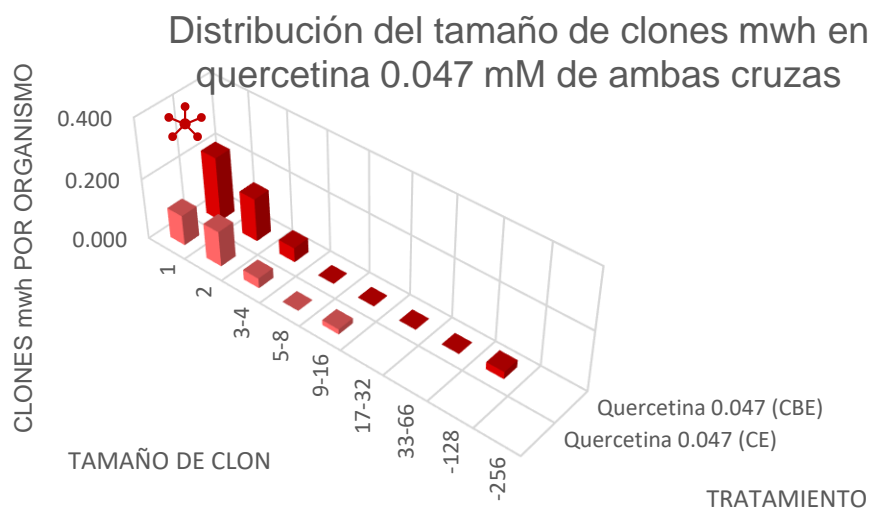


Figura 45. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.047 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*. Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

De manera similar, se encontró diferencia significativa entre cruzas en el tratamiento quercetina 0.095, debido a que para la CBE se encontraron clones de hasta 9-16 células y para la CE clones de 33-66 células (Tabla 9 y Figura 46).

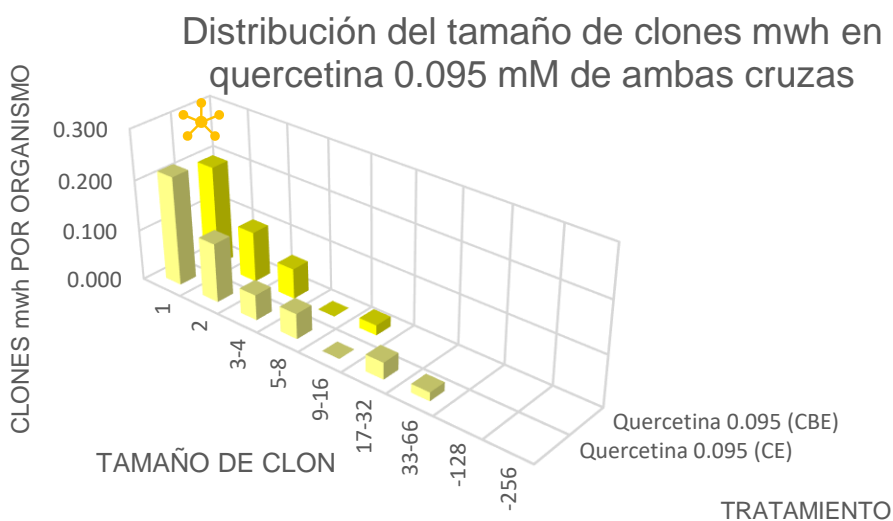


Figura 46. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.095 mM en ambas cruzas de *D. melanogaster*. Donde: * = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Para el tratamiento quercetina 0.19 mM, también se encontró diferencia significativa en cuanto a la distribución de clones *mwh*, ya que, en el caso de la CBE se encontraron células hasta la séptima división celular, mientras que en la CE solo hasta la cuarta división (Tabla 9 y Figura 47).

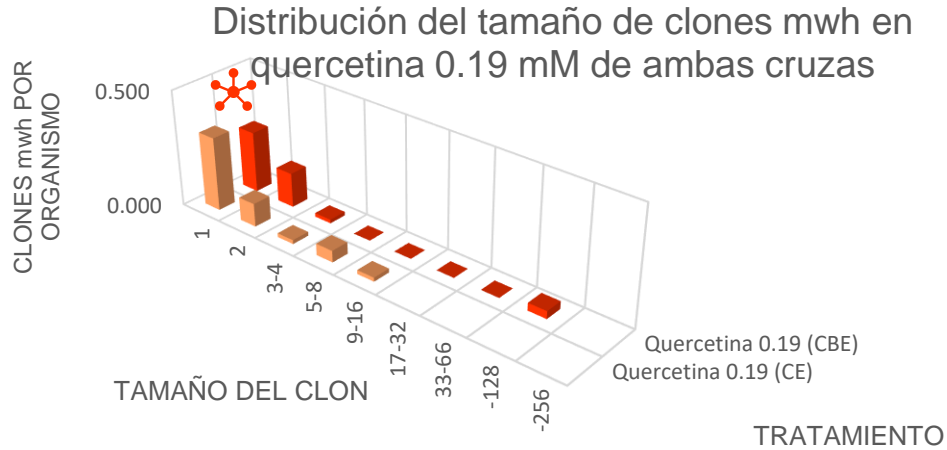



Figura 47. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del del tratamiento quercetina 0.19 mM en ambas cruza de *D. melanogaster*. Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Finalmente, para quercetina 0.38 mM, al igual que en los casos anteriores, se encontró diferencia estadísticamente significativa, ya que en la CBE se encontraron clones de hasta 3-4 células; mientras que para la CE se encontraron clones de 9-16 células (Tabla 9 y Figura 48).

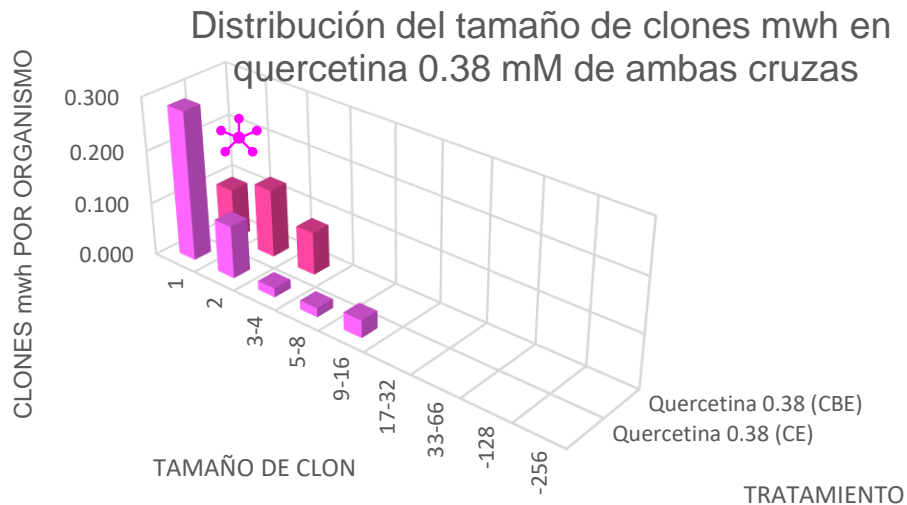



Figura 48. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* del tratamiento quercetina 0.38 mM en ambas cruza de *D. melanogaster*. Donde:  = diferencia significativa ($p < 0.05$).

Todos estos resultados (Tabla 9 y Figuras 44, 45, 46, 47 y 48) muestran que, la quercetina en todas las concentraciones (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM) tuvo un impacto diferente para cada cruce en cuanto a la distribución del tamaño clones *mwh*. Esta diferencia, se atribuye al alto nivel expresión de CYP450 en la CBE, de la cual se sabe que la quercetina es capaz de interferir con su actividad en diferentes insectos incluida la *D. melanogaster* (Liu *et al.*, 2015; Ramos y Sultatos, 1998; Sing *et al.*, 2011).

9. CONCLUSIONES

No se encontró genotoxicidad en la CE provocada por quercetina en ninguna de las concentraciones utilizadas.

Se encontró genotoxicidad en la CBE en tres diferentes concentraciones de quercetina: 0.38, 0.095 y 0.047 mM.

En el caso del testigo positivo 4NQO, se encontró genotoxicidad en ambas cruces (CE y CBE) en todas las concentraciones. Esto era lo esperado, ya que, 4NQO es un potente mutagénico y carcinogénico.

En la CE no se encontró genotoxicidad en ninguna de las concentraciones utilizadas de Vit-C, seguramente debido a su poder antioxidante, capaz de secuestrar radicales de oxígeno, hidroxilo y superóxido, agente quelante de metales y reductor de radicales antioxidantes primarios. En cambio, en la CBE si se encontró genotoxicidad.

En ambas cruces, la quercetina provocó daños citotóxicos.

Durante el metabolismo de la quercetina, se distinguió la participación de los CYP450, ya que, los datos de cada cruce fueron diferentes tanto en genotoxicidad como citotoxicidad.

10. LITERATURA CITADA

- Abdallah, F. B., Fetoui, H., Fakhfakh, F. y Keskes, L. (2011). Caffeic acid and quercetin protect erythrocytes against the oxidative stress and the genotoxic effects of lambda-cyhalothrin in vitro. *Hum Exp Toxicol*, 31(1), 92-100.
- Ames, B. N., McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutat Res*, 31, 347-364.
- Amorós, M. (2001). *Estudio de mutantes del cromosoma III en Drosophila melanogaster: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular*. (Tesis Doctoral), Universidad de Barcelona, España. 153 pp.
- Anderson, S.M. y Barnett, S.E. (1991). The involvement of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in alcohol/aldehyde metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 83, 99–106.
- Annapurna, A., Reddy, C. S., Akondi, R. B. y Rao, S. R. (2009). Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*, 61, 1365-1374.
- Appiah-Opong, R., Commandeur, J. N., van Vugt-Lussenburg, B. y Vermeulen, N. P., (2007). Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. *Toxicology* 235, 83–91.
- Arellano-Llamas, M. R. (2008). *Modulación del daño producido por el 4NQO por parte de la Vit/FeSO4 en función de los niveles de CYP450 en Drosophila melanogaster* (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlanepantla, México.
- Ascenzi, F., Barberi, L., Dobrowolny, G., Bacurau, A. V. N., Nicoletti, C., Rizzuto, E., Rosenthal, N., Scicchitano, B. M. y Musarò, A. (2019). Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia, *Aging Cell*, 18, 12954.
- Baraona, E. y Lieber, C. S. (1979). Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res*, 20(3), 289-315.
- Biaglow, J. E., Jacobson, B. E. y Nygaard, O. F. (1977). Metabolic reaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and other radical-producing drugs to oxygenreactive intermediates. *Cancer Res*, 37, 3306–3313.
- Bjeldanes, L. F. y Chang, G. W. (1997). Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, 197(4303), 577-578.
- Boots, A. W., Li, H., Schins, R. P., Duffin, R., Heemskerk, J. W., Bast, A., y Haenen. G. R. (2007). The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(1), 89-96.

-
- Boots, A. W., Haenen, G. R. y Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585, 325-337.
- Brown, J. P. y Dietrich, P. S. (1979). Mutagenicity of plant flavonols in the salmonella/mammalian microsome test. *Mutat Res*, 66, 223-240.
- Buening, M. K., Chang, R. L., Huang, M. T., Fortner, J. G., Wood, A. W., Conney, A. H. (1981). Activation and inhibition of benzo(a) pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res*, 41, 67-72.
- Caria, H., Chaveca, T., Laires, A. y Rueff, J. (1995). Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*, 343, 85-94.
- Carton, Y. y Nappi, A. J. (1992). Inheritance of cellular immune resistance in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 69, 393-399.
- Carver, J. H., Carrano, A. V. y MacGregor, J. T. (1983). Genetic affects of the flavonols quercetin, kaempferol and galagin on Chinese hámster ovary cells in vitro. *Mutat Res*, 113, 45-60.
- Castañeda-Sotibrán, A. N., Ordaz-Téllez, M. G. y Rodríguez-Arnaiz, R. (2011). Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 726, 60-65.
- Castañeda-Partida, L., Heres-Pulido, M. E. I. y Dueñas-García, I. E. (2008). *Drosophila melanogaster. Un modelo experimental*. Estado de México, México: UNAM, FES Iztacala.
- Castañeda, P.L., Muñoz, G.L.E., Durán, D.A., Heres, P.M.E. & Dueñas, G.I.E. (2001). LD₅₀ in *Drosophila melanogaster* fed on lead nitrate and lead acetate, *Dros. Inf. Serv*, 84,44-48.
- Cermak, R. y Wolffram, S. (2006). The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Curr Drug Metab*, 7, 729-44.
- Chambers, G. K. (1988). The *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase Gene–Enzyme System. *Academic Press*, 25, 39-107.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. y Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G–T and A–C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267, 166–172.
- Choi JS, Piao YJ, Kang KW. (2011). Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res*, 34(4): 607-13
-

Crouse, J. R., Gerson, C. D., DeCarli, L. M. y Lieber, C. S. (1968). Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. *J Lipid Res*, 9(4), 509-512.

Cullinton, B. J. (2000). *The complete genome sequence of Drosophila melanogaster will be a powerful tool using fly biology to study human medicine*. Recuperado de http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03_00/article_fly_3_24.shtml

Da Silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Marroni, N. P., González-Gallego, J. y Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 40, 941-947.

Danielson, P. B., Foster, J. L. M., McMahill, M. M., Smith, M. K. y Fogleman, J. C. (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.

Darroudi, F., Natarajan, A. T. y Lohman, P. H. (1989). Cytogenetical characterization of UVsensitive repair-deficient CHO cell line 43-3B. II. Induction of cell killing, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by 4NQO, monoand bifunctional alkylating agents. *Mutat Res*, 212,103–112.

Das, S., Mandal, A. K., Ghosh, A., Panda, S., Das, N. y Sarkar, S. (2008). Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. *Curr Aging Sci*, 1, 169-174.

De Whalley, C. V., Rankin, S. M., Houtt, J. R., Jessup, W. y Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol*, 39 (11), 1743-1750.

Demerec, M. (1965). *Biology of Drosophila*. Nueva York, EUA: Carnegie Institution of Washington. 633 pp.

Ding, X. y Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes p450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 149-173.

Dixon, R. A. y Pasinetti, G. M. (2010). Flavonoids and isoflavonoids from plant biology to agricultura and neuroscience. *Plant Physiology*, 154(2), 453-457.

Dueñas-García, I. E., Santos-Cruz, L. F., Castañeda-Partida, L., Castañeda-Sortibrán, A. N., Ordaz-Téllez, M. G., Sánchez-Santos, A., Durán-Díaz, A., Rodríguez-Arnaiz, R. y Heres-Pulido, M. E. (2012). Interactions of sulforaphane and dimethyl sulfoxide with methyl methanesulfonate, urethane, 4-nitroquinoline-1-oxide and hydrogen peroxide in the *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Food Chem Toxicol*, 50, 4479-4486.

-
- Dueñas-García, I.E., Heres-Pulido, M.E., Arellano-Llamas, M.R., De la Cruz-Núñez, J., Cisneros-Carrillo, V., Palacios-López, C.S., Acosta-Anaya, L., Santos-Cruz, L.F., Castañeda-Partida, L. y Durán-Díaz, A. (2017). Lycopene, resveratrol, vitamin C and FeSO₄ increase damage produced by pro-oxidant carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in *Drosophila melanogaster*. Xenobiotic metabolism implications. *Food Chem Toxicol*, 103, 233-245.
- Dunnick, J. K., Hailey, J. R. (1992). Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam Appl Toxicol*, 19, 423-431.
- Duthie, S. J., Johnson, W., Dobson, V. L. (1997). The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res*, 390, 141-151.
- Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. y Guevara-Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-75.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D. y Aurajo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35, 375-384.
- Ferreiro-Costa, W., y Nepomuceno, J. C. (2006). Protective Effects of a Mixture of Antioxidant Vitamins and Minerals on the Genotoxicity of Doxorubicin in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen*, 47, 18-24.
- Frei, H. & Würzler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*, 203, 297-308.
- Gaivao, I., Sierra, L. M., Comendador, M. A. (1999). The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutat Res*, 440, 139-145.
- Gallego-Fernández, A. (2011). Generalidades del citocromo P450. En F. Bandrés-Moya (Ed), *Aspectos fundamentales del citocromo P450* (pp. 7-32). Madrid, España: Editorial Comunicación gráfica, s.l.
- García-Saura, M. F., Galisteo, M., Villar, I. C., Bermejo, A., Zarzuelo, A., Vargas, F. y Duarte, J. (2005). Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem*, 270, 147-155.
- Gaspar, J., Rodrigues, A., Laires, A., Silva, F., Costa, S., Monteiro, M. J., Monteiro, C. y Rueff, J. (1994). On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. *Mutagenesis*, 9(5), 445-449.
- Gaviria, M. M., Correa-Arango, G. y Navas, M. C. (2016). Alcohol, cirrosis y predisposición genética. *Rev Col Gastroenterol*, 31(1), 27-35.
-

-
- Geer, B. W., Langevin, M. L. y McKechnie, S. W. (1985). Dietary ethanol and lipid synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet*, 23, 607-622.
- Geer, B. W., McKechnie, S. W., Bentley, M. M., Oakeshott, J. G., Quinn, E. M. y Langevin, M. L. (1988). Induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster*. *J Nutr*, 118, 398-407.
- Geer, B. W., Heinstra, P. W. H. y McKechnie, S. W. (1993). The biological basis of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Comp Biochem Physiol*, 105(2), 203-229.
- Giannuzzi, L. (2018). *Pincipios generales de la toxicología*. En L. Giannuzzi. (Ed.), *Toxicología general y aplicada* (pp.5-27). Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. & Kale, G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 6,153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A. J., & Würgler F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 222(4), 359-373.
- Graf, U. y Van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 271(1):59-67.
- Graf, U., Moraga, A., Castro, R. y Díaz-Carrillo, E. (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test, *Food Chem Toxicol*, 32(5), 423-430.
- Graf, U., Abraham, S.K., Gúzman-Rincón, J. & Würgler F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 402, 203-209.
- Guarnieri, D. J. y Heberlein, U. (2002). *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *Elsevier*, 54, 199-228.
- Guengerich, F. R. (2012). Cytochromes P450. En: Azenbacher, P., Zanger, U. M. (Ed.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. (pp.27-66). Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA Weinheim.
- Guengerich, F. P. (2013), New trends in cytochrome P450 research at the half-century mark. *J Biol Chem*, 288, 17063-17064.
- Guzmán-Rincón, J. y Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as biomonito. En I. M. Butterworth, L. D. Corkum y J. Guzmán-Rincón. (Ed.), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a handbook* (pp 169-181). New York, United States: Plenum Publishing Corp.
-

Happle, R. (1999). Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol*, 41(2), 143-164.

Hardwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M. y Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*, 45, 2179-2205.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 32(11), 1141-1148.

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T. y Anderson, D. (1994). In vivo, rodent Erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*, 312(2), 293-304.

Heinstra, P. W. H., Eisses, K. Th., Schoonen, W. G. E. J., Aben, W., de Winter, A. J., van der Horst, D. J., van Marrewijk W. J. A., Beenackers, A. M. Th., Scharloo, W. y Törig, G. E. W. (1983). A dual function of alcohol dehydrogenase in Drosophila. *Genetica*, 60, 129-137.

Heinstra, P. W. H., Scharloo W. y Thörig G. E. W. (1987). Physiological significance of the alcohol dehydrogenase polymorphism in larvae of Drosophila. *Genetics*, 117, 75-84.

Heres-Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Sánchez-García, A., Contreras-Sousa, M., Durán-Díaz, A., y Graf, U. (2004). Genotoxicity of tamoxifencitrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of Drosophila melanogaster. *Mutagenesis* 19, 187–193.

Heres-Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Santos-Cruz L. F., Vega-Contreras, V., Rebollar-Vega, R., Gómez-Luna, J. C. y A. Durán-Díaz. (2010). Genotoxicity studies of organically broccoli (Brassica oleracea var. italica) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of Drosophila melanogaster. *Elsevier*, 48, 120-128.

Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A. y Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 155(4), 381-386.

Hodgson, E., y Randy, R. (1991). Insect cytochromo P-450. En E. Arinç, J. B. Schenkman y E. Hodgson. (Ed.), *Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds* (pp. 75-91) Switzerland: NATO ASI Series.

Hollman, P. C., Bijlsman, M. N., Van Gameren, Y., Cossen, E. P., De Vries, J. H. y Katan, M. B. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*, 31(6), 569-573.

Homann, N., Kaärkkaäinen, P., Koivisto, T., Nosova, T., Jokelainen, K., & Salaspuro, M. (1997). Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1692–1697.

Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., Patton, S. y Malinski, T. (1998). Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*, 85(8),1080-1085.

Hwang, I. K., Lee, C. H., Yoo, K.Y., Choi, J. H., Park, O. K., Lim, S. S., Kang, I. J., Kwon, D. Y., Park, J., Yi, J. S., Bae, Y. S. y Won, M. H. (2009). Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *J Med Food*, 12(5), 990-995.

Inal, M., Altinişik, M. y Bilgin, M. D. (2002). The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *Cell Biochem Funct*, 20, 291-296.

Ishizawa, M. y Endo, H. (1972). Suppressor mutations induced by 4-Nitroquinoline 1-oxide and 4-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*. *Gann*, 63, 511-515.

Josephy, P. (2006). *Molecular Toxicology*. New York, United States of America: Oxford.

Jovanovic, S. V. y Simic, M. G. (2000). Antioxidant in nutrition. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 326-334.

Kelly, G. S. (2011). Quercetin. *Monograph Altern Med Rev*,16(2), 172-194.

Kohda, K., Kawazoe, Y., Minoura, Y. y Tada, M. (1991). Separation and identification of N4-(guanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, a novel nucleic acid adduct of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 12, 1523–1525.

Korkina, L. G. y Afanas'ev, I. B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol*, 38, 151–63.

Korsten, M. A., Matsuzaki, S., Feinman, L. y Lieber, C. S. (1975). High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Difference between alcoholic and nonalcoholic subjects. *N Engl J Med*, 292(8), 386-389.

Kurzawa-Zegota, M. Najafzadeh, M., Baumgartner, A. y Anderson, D. (2012). The protective efecto of flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. *Food Chem Toxicol*, 50, 124-129.

Lefevre, A. F., DeCarli, L. M.y Lieber, C. S. (1972). Effect of ethanol on cholesterol and bile acid metabolism. *J Lipid Res*,13(1), 48-55.

-
- Liu, D., Yuan, Y., Li, M. y Qiu, X. (2015). Effects of dietary quercetin on performance and cytochrome P450 expresión of the cotton bollworm, *Helicoverpa armígera*. *Bull Entomol Res*, 105, 771-777.
- Lu, J., Wu, D. M., Zheng, Y.L., Hu, B., Zhang, Z. F., Shan, Q., Zheng, Z. H., Liu, C. M. y Wang, Y. J. (2010). Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *J Pathol*, 222(2), 199-212.
- Lundquist, F., Tygstrup, N., Winkler, K. y Jensen, K. B. (1965). Glycerol metabolism in the human liver: Inhibition by ethanol. *Science*, 150(3696), 616-617.
- Maestro-Durán, R., y Borja-Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 44(2), 107-111.
- Maito, F. L., Rados, P. V., Filho, M. S., Barbachan, J. J. y Quadros, O. (2003). Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol*, 1(2), 25-30.
- Mamede, A. C., Pires, A. S., Abrantes, A. M., Tavares, S.D., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J. E., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Maia, J. M. y Botelho, M. F. (2012). Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutr Cancer*, 64(7), 1049-1057.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- McKechnie, S. W. y Geer, B. W. (1984). Regulation of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* by dietary alcohol and carbohydrate. *Insect Biochem*. 14, 231-242.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaité, E. y Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol Med*, 26,107-116.
- Meyers, K. J., Rudolf, J. L. y Mitchell, A. E. (2008). Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. *J Agric Food Chem*, 56, 830-836.
- Middleton, E. J. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*, 439, 175-82.
- Mierziak, J., Kostyn, K. y Kylma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19, 16240-1625.
- Minana, J. B., Gomez-Cambronero, L., Lloret, A., Pallardo, F. V., Del Olmo, J. y Escudero, A. (2002). Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual
-

mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*, 35(5), 1205-1214.

Mirzayans, R., Bashir, S., Murray, D. y Paterson, M. C., (1999). Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. *Carcinogenesis* 20, 941–946.

Mojzis, J., Hviscová, K., Germanova, D., Bukovicová, D. y Mirossay, L. (2001) Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res*, 50(5), 501-506.

Moon, J. H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T. y Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestión of onion by women. *Am J Physiol Regulatory Interactive Comp Physiol*, 279, 461-467.

Nagao, M. y Sugimura, T. (1976). Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv. Cancer Res*, 23, 131–169.

Nagpal, I. y Abraham, S. K. (2017). Ameliorative effects of gallic acid, quercetin and limonene on urethane-induced genotoxicity and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Mech Methods*, 27(4), 286-292.

Nakahara, W., Fukuoka, F. y Sugimura, T. (1957). Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gann*, 48, 129–137.

Nelson, D. R (2009). The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics*, 4, 59-65.

Nelson, D. R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom*, 1814, 14-18.

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn D.E., Boelens, P.G., van Norren K. & van Leeuwen P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Clin Nutr*, 74,418-425.

Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J. N., Samhoedi, R. y Vermeulen, N. P. (1996). Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol*, 51, 39–45.

Ochiai, M., Nagao, M., Wakabayashi, K. y Sugimura, T. (1984). Superoxide dismutase acts as an enhancing factor for quercetin mutagenesis in rat-liver cytosols by preventing its decomposition. *Mutat. Res*, 129, 19-24.

Ortiz-Rodriguez, C. L. (2015). *Evaluación de la actividad mutagénica de la interacción del MMS, FeSO₄ y Vitamina C con la prueba SMART en ala de Drosophila melanogaster (progenie Serratia)*. (Tesis de Licenciatura). UNAM, FES Iztacala, Estado de México, México.

Ozgová, S., Hermánek, J. y Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-Fe-ascorbate-and-Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol*, 66(7), 1127-1137.

Paling, N. R. D., Wheadon, H., Bone, H. K. y Welham, M. J. (2004). Regulation of Embryonic Stem Cell Selfrenewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling, *J. Biol. Chem*, 279, 48063–48070.

Pamukcu, A. M., Yalciner, S., Hatcher, J. F. y Bryan, G. T. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res*, 40, 3468-3472.

Peremartí, J. (2012). Observación de mutaciones alares en *Drosophila melanogaster*. Departamento de Genética y Microbiología. Recuperado de: http://biologia.uab.es/base/documents%5Cgenetica_gen%5CGuiones%20Observación%20mutaciones%20alares-cromosomas%20humanos_JANA2013518-129.pdf

Pérez-Barly, L., Guirola-Fuentes, J., Fleites-Mestres, P., Pérez-García, Y., Millán-Pérez, T. y López-García, D. (2014). Origen e historia de la Toxicología. *Rev Cuba Med Mil*, 43(4), 499-514.

Pérez-Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 22(1), 48-57.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63, 1035-1042.

Pohl, J. B., Baldwin, B. A., Dinh, B. L., Rahman, P., Smerek D, Prado, F. J., Sherazee, N. y Atkinson, N.S. (2012). Ethanol preference in *Drosophila melanogaster* is driven by its caloric value. *Alcohol Clin Exp Res*, 36 (11),1903-1192.

Prior, R. L. y Cao, C. (1999). Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exper Biol Med*, 220, 255-261.

Ramos, S. y Sultatos, L. (1998). Flavonoid-induced alterations in cytochrome P450-dependent biotransformation of the organophosphorus insecticide parathion in the mouse. *Toxicology*, 131, 155-167.

Rinaldi, A. L., Morse, M. A., Fields, H. W., Rothas, D. A., Pei, P., Rodrigo, K. A., Renner, R. J. y Mallery, S. R. (2002). Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res*, 62, 5451–5456.

Rivas-Gonzalo, J. C. y García-Alonso, M. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alim Nutri Salud*, 9(2), 31-38.4

Rivas-Ruiz, R., Moreno-Palacios, J. y Talavera, J. O. (2013). Investigación clínica XVI. Diferencias de medianas con la U de Mann-Whitney. *Rev Enfer IMSS*, 51(4), 414-419.

Rodrigues de Andrade, H. H., Reguly, M. L. y Lehman, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. En D. S. Henderson (Ed.), *Methods in molecular biology* (pp. 389-412) Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Rodríguez-González, J. C. y Rodeiro-Guerra, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cubana Farm*, 48(3), 495-507.

Roldán-Reyes, E. (2016). *Introducción a la Toxicología*. Estado de México, México: UNAM, FES Zaragoza.

Ross, J. A. y Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 22, 19-34.

Rueff, J., Laires, A., Bras, A., Borba, H., Chaveca, T., Gaspar, J., Rodrigues, A., Cristovao, L. y Monteiro, M. (1989) DNA damage and oxygen species. En Lambert, M. W. y Lava, J. (Ed.), *DNA Repair Mechanisms and Their Biological Implications in Mammalian Cells*. (pp. 171-181). New York, United States of America: Plenum Press.

Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L. y Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16, 91-98.

Sánchez-López, J. M. (2015). Evaluación de la posible actividad moduladora del resveratrol hacia el MMS con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza bioactivación elevada (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, México.

Sankara, S. (1972). Flavonoids of eight bignoniaceous plants. *Phytochemistry*, 11, 1499.

Santos-Cruz, L. F. (2016). Evaluación de los posibles efectos tóxicos y genotóxicos de los tripanocidas GHPM y GHPMF con las pruebas CL50 y SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Tesis de maestría). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, México.

Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G. y Barale, R. (1990). Induction of micronuclei in gill tissue of *Myllitus galloprovincialis* exposed to polluted marine Waters. *Mar Pollut Bull*, 21(2), 74-80.

Seitz, H. K., Simanowski, U. A., Garzon, F. T., Rideout, J. M., Peters, T. J., Koch, A., Berger, M. R., Einecke, H., & Maiwald, M. (1990). Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*, 98, 406–413.

Shirai, M., Yamanishi, R., Moon, J. H., Murota, K. y Terao, J. (2002). Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(5), 1015-1021.

Si, D., Wang, Y., Zhou, Y. H., Guo, Y., Wang, J., Zhou, H., Li, Z. S. y Fawcett, J. P. (2009). Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab Dispos*, 37(3), 629-34.

Simanowski, U. A., Seitz, H. K., Baier, B., Kommerell, B., Schmidt-Gayk, H., & Wright, N. A. (1986). Chronic ethanol consumption selectively stimulates rectal cell proliferation in the rat. *Gut*, 27, 278–282.

Singh, K. y Patnaik, S. C. (2010). Modulatory action of Vitamin C on the genotoxicity of anti cancer drug (Etoposide) tested in wing spot of *Drosophila*. *Nat Environ Pollut Technol* 9 (3), 473-479.

Singh, M. P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Mudiam, M. K. R., Patel, D. K., Ravi-Ram, K. y Kar-Chowdhuri, D. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 253, 14-30.

Smart, C. y Hodgson, E. (2008). *Molecular and biochemical toxicology*. New Jersey, United States of America: Willey.

Spencer, J. P. E. (2009). Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanism. *Genes Nutr*, 4, 243-250.

Sullivan, M., Follis, R. H. y Hilgartner, M. (1951). Toxicology of podophyllin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 77, 269-272.

Timmons, S. R., Nwankwo, J. O., y Domann, F. E. (2002). Acetaldehyde activates Jun/AP-1 expression and DNA binding activity in human oral keratinocytes. *Oral Oncology* 38, 281–290.

Toda, T., Eliasson, E., Ask, B., Inotsume, N., Rane, A. (2009). Roles of Different CYP Enzymes in the Formation of Specific Fluvastatin Metabolites by Human Liver Microsomes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 105(5), 327-32.

Valle-Vega, P. y Lucas-Florentino, B. (2000). *Toxicología de alimentos*. Ciudad de México, México: INSP, Centro Nacional de Salud Ambiental.

Van der Woude, H., Alink, G. M., Van Rossum, B. E. J., Walle, K., Van Steeg, H., Walle, H. y Rietjens, M. C. M. I. (2005). Formation of transient covalent protein and DNA adducts by quercetin in cells with and without oxidative enzyme activity. *Chem Res Toxicol*, 18, 1907-1916.

Vargas, A. J., Sittadjody, S., Thangasamy, T., Mendoza, E. E., Limesand, K.H. y Burd, R. (2011). Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integr Cancer Ther*, 10(4), 328-340.

Vasiliki, T., Goutas, A., Karyda, A., Efthimioum I., Antonopoulou, M., Drosopoulou, E., Vlastos, D., Konstantinou, I., Mavragani-Tsipidou, P. y Dailianis, S. (2017). The role of acetone in the [omim][BF₄]-mediated adverse effects on tissues of mussels, human lymphocytes and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Hazard Mater*, 333, 339-347.

Vicente-Vicente, L., Prieto, M. y Morales, A. I. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev Toxicol*, 30, 171-181.

Wang, Y., Millonig, G., Nair, J., Patsenker, E., Stickel, F. y Mueller, S. Ethanol-induced cytochrome P450E1 causes car-cinogenic etheno-DNA lesions in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 50(2), 453-61.

Wang, L. E., Li, C., Xiong, P., Gershenwald, J. E., Prieto, V. G., Duvic, M., Lee, J. E., Grimm, E. A., Hsu, T. C. y Wei, Q. (2016). 4-nitroquinoline-1-oxide-induced mutagen sensitivity and risk of cutaneous melanoma: a case-control analysis. *Melanoma Res*, 26(2), 181-187.

Williams, R. J., Spencer, J. P. E. y Rice-Evans, C (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Rad Biol Med*, 36(7), 838-849.

Wu, D. y Cederbaum, A. I. (1996). Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P450E1. *J Biol Chem*, 271(39), 23914-23919.

Yamamoto, K., e Ishii, Y. (1974). 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced deletion mutations in *Escherichia coli* strains with different DNA repair capacities. *Mutat Res*, 22, 81-83.

Yoshida, T. H., Kurita, Y. y Moriwaki, K. (1965). Chromosomal Aberrations in Yoshida Sarcoma cells treated with 4-Nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 56, 523-528.

Yu, M., Wang, H., Xu, Y., Yu, D., Li, D., Liu, X. y Du, W. (2015). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signalling pathway, *Cell Biol Int*, 39, 910-922.

Zhou, J., Su, P., Wang, L., Chen, J., Zimmermann, M., Genbacev, O., Afonja, O., Horne, M. C., Tanaka, T., Duan, E., Fisher, S. J., Liao, J., Chen J., y Wang, F. (2009). mTOR supports long-term self-renewal and suppresses mesoderm and endoderm activities of human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 7840.

11. ANEXOS

11.1 Metabolismo xenobiótico

Como se mencionó antes, el metabolismo xenobiótico comprende las cuatro fases por las que pasa un xenobiótico dentro de un organismo:

1. Absorción

La absorción, hace referencia al mecanismo por el cual el xenobiótico atraviesa las barreras corporales del organismo, para posteriormente entrar en el flujo sanguíneo. Las vías de absorción más comunes son: vía oral (ingesta), vía respiratoria (inhalación) y dérmica (Repetto y Repetto, 2009).

La absorción está condicionada por las características del xenobiótico, tales como: tamaño, pH, grado de ionización, liposubilidad, concentración, etc., incluso, la absorción puede verse afectada por barreras del propio organismo tales como la barrera hematoencefálica, placentaria o hematotesticular (Roldán-Reyes, 2016).

Los xenobióticos, ingresan al organismo usando dos tipos de transporte: activo y pasivo. El primero de ellos requiere el gasto de energía, ya que se da contra un gradiente de concentración; en cambio, el transporte pasivo puede ocurrir de dos formas: por difusión simple a través de la membrana debido al gradiente de concentración (la mayoría de los xenobióticos utilizan esta vía) o por difusión facilitada a través de canales proteicos cuando no cuentan con la suficiente concentración para formar un gradiente adecuado (Flanagan *et al.*, 2007; Plant, 2003).

2. Distribución

La distribución es la disposición o arreglo que adquiere el xenobiótico en los diferentes tejidos del organismo; esta disposición es diferente en cada tejido dependiendo de su flujo sanguíneo y de la capacidad del xenobiótico para penetrar sus células; así mismo, el tiempo de permanencia es particular a cada tejido (Plant, 2003; Wallace 2001).

3. Metabolismo

Debido a que, la mayoría de los xenobióticos son liposolubles y esto les permite atravesar las membranas de las células con suma facilidad; es necesario, convertir dichos xenobióticos en metabolitos polares e hidrosolubles capaces de ser excretados. Este proceso de transformación que ocurre dentro del metabolismo de los xenobióticos se denomina biotransformación y se divide en Fase I y Fase II (Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000).

La Fase I tiene como objetivo modificar la estructura química del xenobiótico a través de reacciones de oxidación o reducción en donde se agregan grupos funcionales polares (hidroxilo, amino, carboxilo, etc.), o mediante hidrólisis donde

lo que ocurre es la exposición de grupos funcionales para obtener una mayor polaridad del xenobiótico (Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000).

En otras palabras, la finalidad de la Fase I es aumentar la hidrosolubilidad de los xenobióticos para que sean capaces de reaccionar con los procesos que ocurren en la Fase II (Roldán-Reyes, 2016).

Las enzimas que participan en esta fase, son las dependientes de citocromos P450 (CYP450) y las monooxigenasas de flavín (MOF) que poseen actividad monooxigenasa y oxidasa de función mixta (Roldán-Reyes, 2016).

Por otro lado, en la Fase II, ocurren lo que se denominan como reacciones de conjugación, ya que a los xenobióticos se le adicionan moléculas polares y de alta disponibilidad en el organismo para disminuir su carácter lipofílico y así, facilitar su excreción (ácido glucurónico, ésteres de sulfato, acetatos, glutatión, algunos aminoácidos, etc.). Este tipo de reacciones requieren el gasto de energía (ATP) ya que se forman diferentes enlaces químicos (Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000). Sin embargo, en algunas ocasiones, cuando se modifica la estructura química de algunos xenobióticos, en lugar de volverse inocuos, se vuelven aún más tóxicos; ejemplo de ello son los llamados procarcinogénicos que necesitan pasar por un proceso de biotransformación para manifestar su efecto cancerígeno. A este proceso se le conoce como bioactivación (Anders, 1985; Loomis, 1978).

4. Excreción

Las principales vías de excreción son: urinaria y biliar, debido a que son las vías por las que mayormente se eliminan los xenobióticos; sin embargo, existen otras de eliminación parcial como: sudor, saliva, leche, aire espirado y secreciones gastrointestinales (Wallace, 2001).

Referencias

- Anders, M. W. (1985). *Biochemical Pharmacology and Toxicology*. New York, United States of America: Academic Press.
- Flanagan, R. Taylor, A., Watson, I. y Whelpton, R. (2007). *Fundamentals of analytical toxicology*. Great Britain: Wiley.
- Loomis, T. A. (1978). *Essentials of Toxicology*. Philadelphia, United States of America: Lea y Febiger.
- Plant, N. (2003). *Molecular Toxicology*. United States of America: BIOS Scientific.
- Repetto, M. y Repetto, G. (2009). *Toxicología fundamental*. Sevilla, España: Díaz de Santos.

-
- Roldán-Reyes, E. (2016). *Introducción a la Toxicología*. Estado de México, México: UNAM, FES Zaragoza.
 - Valle-Vega, P. y Lucas-Florentino, B. (2000). *Toxicología de alimentos*. Ciudad de México, México: INSP, Centro Nacional de Salud Ambiental.
 - Wallace, A. (2001). *Principles and methods of toxicology*. Boston, United States of America: Taylor y Francis

11.2 Ciclo de vida de *D. melanogaster*

D. melanogaster, es un insecto díptero holometábolo, lo que significa que presenta diferentes estadios o fases dentro de su ciclo de vida (Ramos-Morales *et al.*, 1993), dichos estadios son: huevo, larva, pupa e imago o adulto (Demerec, 1965). Todo el ciclo completo dura aproximadamente 10 días en condiciones óptimas, 25°C y 65% humedad relativa (Ramos-Morales *et al.*, 1993).

El ciclo comienza con la fecundación, ésta se da gracias a que el espermatozoide penetra el óvulo dentro del útero de la hembra (las hembras pueden almacenar los espermatozoides después de la cópula); luego, como resultado de la fecundación, se forma un huevo que es depositado en una superficie donde haya abundante alimento, es de color blanco, mide 1µ y está rodeado por dos membranas que le proveen protección y nutrientes (Ramos-Morales *et al.*, 1993). Posteriormente, del huevo eclosiona una larva (el desarrollo dentro del huevo dura aproximadamente 24 horas), dicha larva también es de color blanquecino traslúcido y pasa por tres estadios: primero, segundo y tercero; los dos primeros tienen una duración de 24 horas, mientras que el tercero dura 48 horas (Demerec, 1965). Cada larva está formada por doce segmentos: uno que corresponde a la cabeza, tres torácicos y ocho abdominales, además, presenta dos linajes celulares, las que forman el cuerpo de la larva llamadas células larvarias y las células imagales las cuales dan origen a antenas, genitales, ojos, alas, etc., que son estructuras funcionales hasta que el organismo alcanza el estadio de adulto; otra característica importante de ésta fase es que las larvas son muy voraces y cuando están listas para convertirse en pupa, se retiran del medio con alimento para migrar a sitios menos húmedos (Ramos-Morales *et al.*, 1993). El estadio de pupa dura alrededor de cinco días, durante ese tiempo se lleva a cabo la metamorfosis en la que se destruyen la mayor parte de las células de la larva, de igual manera se forman las estructuras externas del adulto a partir de los discos imagales (las células imagales se encuentran dentro de estos discos) (Demerec, 1965). Finalmente, el adulto emerge de la pupa; el cual, en un principio no tiene pigmento, es de cuerpo alargado y sus alas están plegadas, sin embargo, después de una hora sus alas quedan totalmente desplegadas gracias al bombeo de hemolinfa y a las ocho horas alcanza la madurez sexual (Ramos-Morales *et al.*, 1993) (Figura 1.).



Figura 1. _Ciclo de vida de *D. melanogaster*

Tomado de: <https://dendrotierra.jimdofree.com/articulos/drosophila-alimento-vivo/>

Referencias

- Demerec, M. (1965). *Biology of Drosophila*. Nueva York, EUA: Carnegie Institution of Washington. 633 pp.
- Ramos-Morales, P., Abundis-Manzano, H. M., Gaytán-Oyarzun, J. C., Ordaz-Téllez, M. G., Orozco, P. G., Maldonado-Luis, J., Hernández-Aranda, J., González-César, E., Reyes-Martínez, P., Galicia-Mendieta, E. M. y Muñoz-Moya, J. A. (1993). *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*. Estado de México, México: McGraw-Hill Interamericana de México

11.3 Colecta de huevos

Para realizar la colecta de huevos de las cruzas CE y CBE, se necesita preparar un medio hecho de levadura fresca de la siguiente manera:

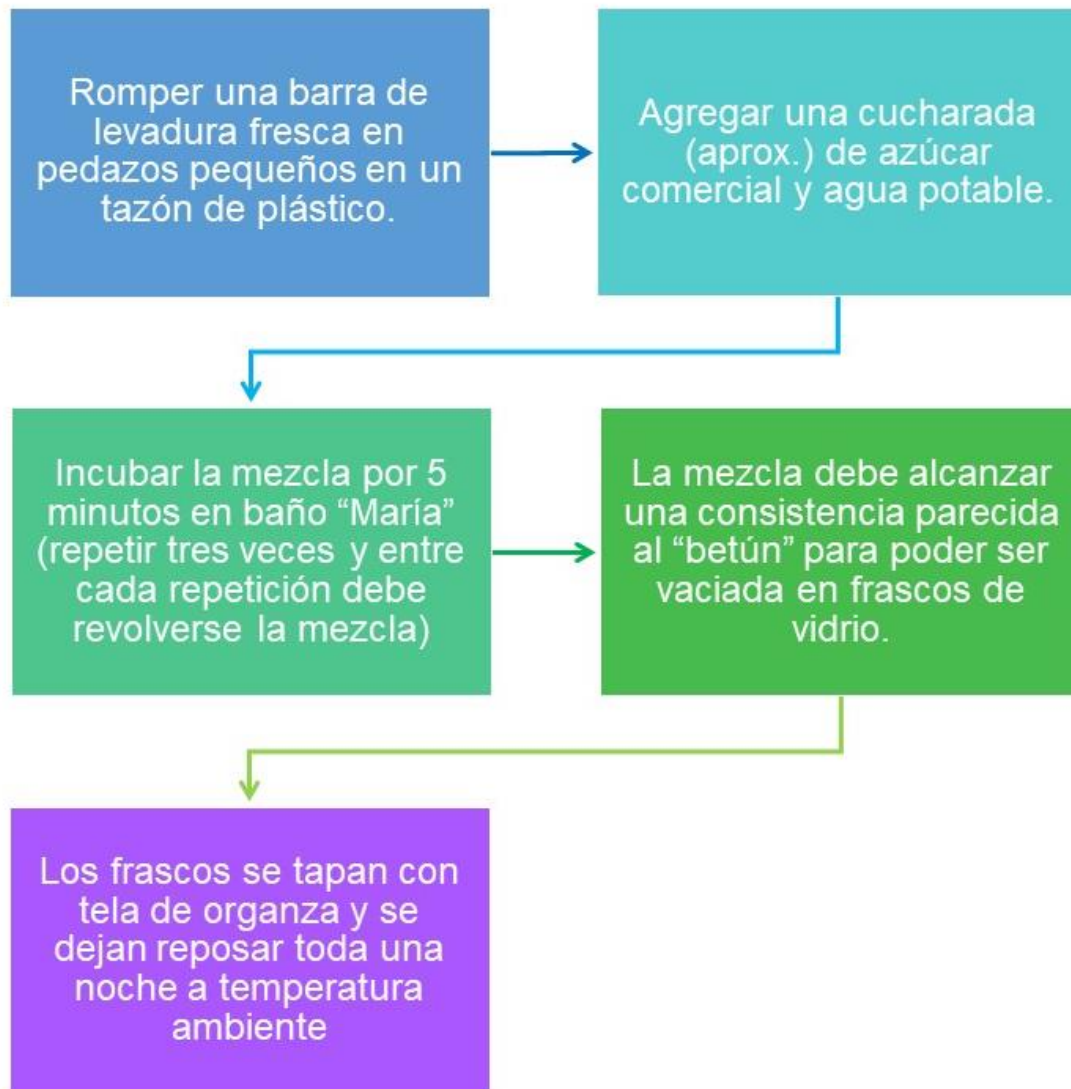


Figura 1. Esquema del procedimiento a seguir para preparar un medio de levadura fresca para colectar huevos de acuerdo a Castañeda-Partida et al. (2008).

Después de tener preparados en frascos el medio de levadura fresca y dejar reposar durante una noche; se trasvasan por separado, las moscas de ambas cruzas para que las hembras ovopositen por un periodo de 8 horas a 25°C, 60% humedad y en oscuridad.

Transcurridas las ocho horas, se devuelven todas a las moscas a sus frascos originales, y los frascos con levadura se incuban (25°C) hasta que los huevos ahí depositados alcancen el estado larval de tercer estadio (72±4 h).

Finalmente, se recuperan las larvas (para ser utilizadas en los experimentos), lavando la levadura con agua a temperatura ambiente.

Referencias

- Castañeda-Partida, L., Heres-Pulido, M. E. I. y Dueñas-García, I. E. (2008). *Drosophila melanogaster. Un modelo experimental.* Estado de México, México: UNAM, FES Iztacala