UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE AVICULARINA (QUERCETINA 3-O-A- L ARABINOFURANOSIDO) MEDIANTE LA PRUEBA SMART EN ALA DE *D. melanogaster* CRUZA ESTÁNDAR (CE)

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

KARLA MONTOYA BALTAZAR

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

LOS REYES IZTACALA, EDO. MEX., 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala.

A mi asesora, la M. en C. Irma Elena Dueñas García. Muchísimas gracias por el apoyo y la paciencia que me ha brindado durante estos años que tardé en la realización de este trabajo.

A mis sinodales, el Mtro. Ángel Duran Díaz, la Mtra. María de Jesús Laura Castañeda Partida, la Mtra. María Eugenia Isabel Heres y Pulido, y el Mtro. Luis Felipe Santos Cruz,por brindarme su tiempo y sugerencias para mejorar en este proyecto.

A mi mamá por creer en mí y a su manera apoyarme a llegar a ser la persona que soy ahora.

A la Sra. Alejandra Salazar por acogerme en su casa y darme un lugar en su familia.

A Pablo Cano, mi pareja, por a pesar de todas las circunstancias que nos rodearon darme los ánimos paraseguir adelante con este proyecto y otros más.

A mi padre que pese a la distancia me apoyo en mis momentos de necesidad.

Índice de Contenido

ÍNDICE DE CONTENIDO ..... **Error! Bookmark not defined.**
ÍNDICE DE FIGURAS 2
RESUMEN 3
INTRODUCCIÓN 4
FLAVONOIDES 4
QUERCETINA 5
AVICULARINA 6
ANTECEDENTES 7
JUSTIFICACIÓN 10
HIPÓTESIS 10
OBJETIVO ..... **Error! Bookmark not defined.**
MATERIALES Y MÉTODOS MATERIALES 11
Químicos 11
Biológicos 11
MÉTODOS 12
Cultivo y propagación de las cepas mutantes de *D. melanogaster* 12
Cruza estándar (CE) 12
Colecta de huevos 12
Diseño experimental 13
Tratamientos 13
Disección, montaje y lectura de alas 14
ANÁLISIS ESTADÍSTICO 15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
CONCLUSIONES 23
LITERATURA CITADA 24
ANEXO 1 30
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS(SMART) 30

ÍNDICE DE FIGURAS

IMAGEN 1: ESTRUCTURA Y TIPOS DE FLAVONOIDES 4
IMAGEN 2. FORMAS DERIVADAS DE LA QUERCETINA DESPUÉS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN. 5
IMAGEN 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA AVICULARINA. 6
IMAGEN 4. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES EN INCUBADORA 13
IMAGEN 5. TIPOS DE MANCHAS.. 15
IMAGEN 6 FRECUENCIAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MANCHAS / MOSCA DE LOS TESTIGOS. 19
IMAGEN 7: DISTRIBUCIÓN DE LA FRECUENCIA DEL TAMAÑO DE CLONES MWH POR INDIVIDUO DE LOS TESTIGOS 20
IMAGEN 8.: FRECUENCIA DE MANCHAS PEQUEÑAS, GRANDES, GEMELAS Y TOTALES POR INDIVIDUO DESPUÉS DE LOS ETOH-C3H6 2% Y AVICULARINA 21
IMAGEN 9. DISTRIBUCIÓN DE LA FRECUENCIA DEL TAMAÑO DE CLONES MWH POR INDIVIDUO DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS ETOH-C3H6 2% Y AVICULARINA....22

RESUMEN

Los flavonoides que se encuentran mayormente en las plantas y se consumen diariamente son los flavonoles, la Avicularina es un flavonol glucorinado que se extrae de diferentes plantas y es, además, el componente principal de plantas medicinales como *Psidium guajava*; a pesar de pertenecer a un grupo de metabolitos ampliamente consumido sus propiedades biológicas no han sido tan ampliamente estudiadas como las de la Quercetina. Esta correlación es importante cuando se utilizan plantas cuya composición química y posibles efectos genotóxicos se desconocen, por lo que para este trabajo se evaluó in vivo el efecto de la Avicularina utilizando SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

Se cruzaron hembras vírgenes *flr*^{3}/TM3*, Bd*^{ser} con machos mwh/mwh para obtener la cruza estándar (CE). Larvas de 72±4 h fueron alimentadas con Avicularina [0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM] disuelta en Etanol + Acetona [2% v/v]; 4NQO [2 mM]; Vitamina C [5.6 mM] como testigos positivos; etanol + acetona [2% v/v] y agua miliQ como testigos disolventes. Los tratamientos se realizaron por triplicado en experimentos independientes. Se revisaron las alas transheterocigotas en microscopio óptico a 40X, se registró la frecuencia de los clones mutantes y los resultados se analizaron con el programa SMART PC- version 2.1.

El testigo disolvente etanol + acetona [2% v/v] tuvo una disminución significativa en la frecuencia de manchas pequeñas en comparación con el testigo agua. La Avicularina en todas las concentraciones utilizadas incrementó la frecuencia de manchas pequeñas con respecto a etanol + acetona [2% v/v] pero sin un efecto significativo; sin embargo, sí se vio alterada de manera significativa la distribución del tamaño de los clones mwh lo que indica una alteración durante la división celular. Se puede concluir que la Avicularina, en este ensayo y a estas concentraciones no provocó daño genotóxico, pero sí afectó en el ciclo celular provocando un daño citotóxico en CE.

INTRODUCCIÓN

FLAVONOIDES

Los flavonoides son una clase de productos químicos naturales polifenólicos que están ampliamente distribuidos en el mundo vegetal (Mlcek *et al*., 2016). Son de gran interés debido a sus efectos benéficos para la salud humana, entre los que se encuentran efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos y antimutagénicos. Se han identificado más de 6,000 variedades de flavonoides clasificados en seis clases según la estructura química: flavonoles, flavonas, flavononas, flavanoles, antocianidinas e isoflavonas (Figura 1) (Dias *et al*., 2021; Jaganathan y Mandal, 2009).

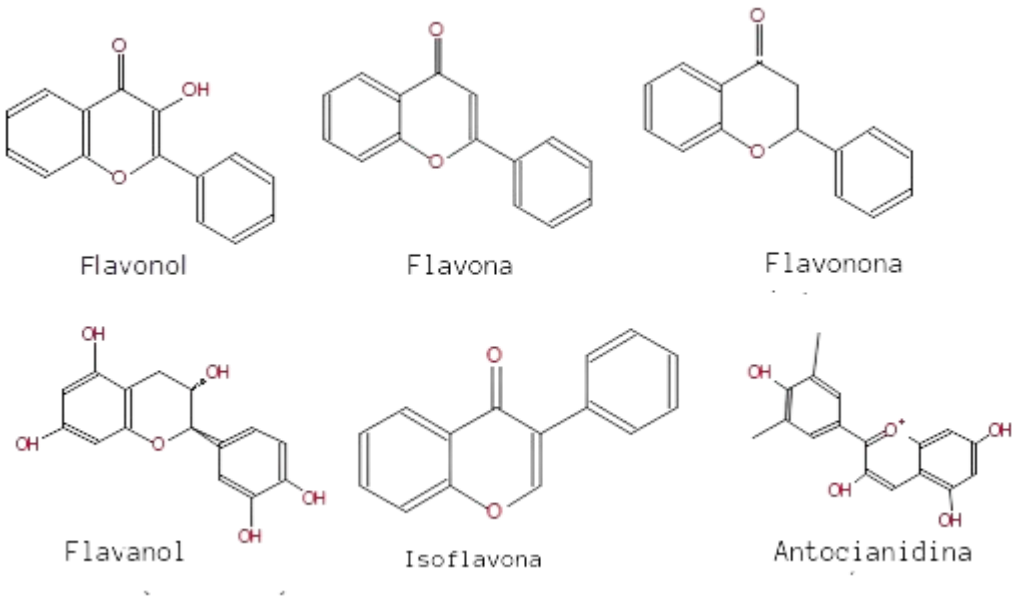

Imagen 1: Estructura y tipos de flavonoides (Lakhanpal y Rai, 2007)

La estructura principal de los flavonoides está compuesta por difenil-piranos (C6- C3-C6) con 2 anillos de benceno A, B unidos por un anillo C de pirano heterocíclico; sus tres anillos son muy versátiles ya que pueden someterse a hidroxilación, acilación y glicosilación con monosacáridos

u oligosacáridos sustituidos en diferentes posiciones de la molécula (Proshkina *et al*., 2016). Los flavonoides que se encuentran mayormente en las plantas y se consumen diariamente son los flavonoles, que poseen una estructura con un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C (Cartaya y Reynaldo, 2001).

QUERCETINA

El flavonol más abundante es la Quercetina (3,3´,4´,5,7-pentahidroxiflavona) que representa del 60 al 75% del consumo diario de flavonoides en la dieta humana, estos últimos estimados de 100 a 1000 mg/día (Vicente-Vicente *et al*., 2013; Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014). Se encuentra disponible en cebollas, brócoli, espárragos, pimientos verdes, tomates, manzanas, fresas, frambuesas rojas, arándanos, té verde, vino, entre otros, y se ha reportado como un agente anticancerígeno, antioxidante y citotóxico (Kang y Liang, 1997).

La Quercetina, al ser una molécula lipofílica, es absorbida con facilidad a través de las membranas celulares de los organismos que la consumen, dentro de sus células se somete a hidrólisis para posteriormente conjugarse a derivados glucoronidados, metilados y sulfatados (Figura 2) (Massi *et al*., 2017; Kobylińska y Janas, 2015).

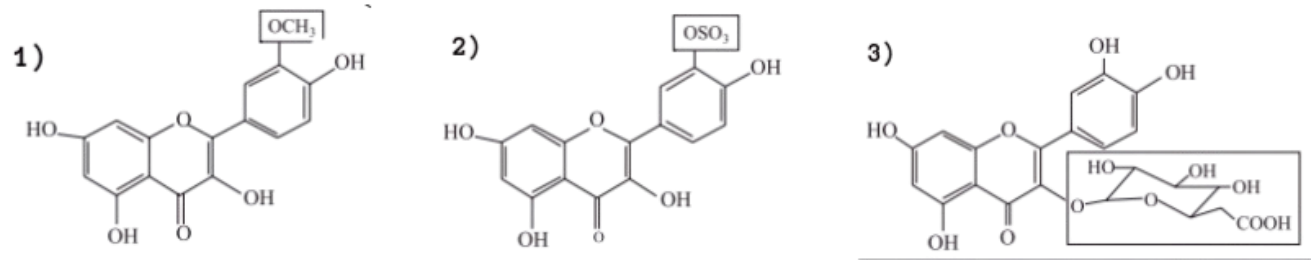

Imagen 2. Formas derivadas de la quercetina después de la biotransformación (1) = 3'O-metilquercetina; (2) quercetina-3'-O-sulfato; (3) quercetina-3'-glucuronida (de Costa et al., 2008).

AVICULARINA

La Avicularina (quercetina 3-O-α-L-arabinofuranosida) (Figura 3) es un compuesto glicorinado de la Quercetina, la cual se extrae de diferentes plantas y es además, el componente principal de plantas medicinales como Lespedeza cueneta (sericea), Lindera erythrocarpa (arbusto de frutos rojos) y Psidium guajava (guayabo), entre otras (Vo *et al*., 2012); a pesar de pertenecer a un grupo de metabolitos ampliamente consumido sus propiedades biológicas no han sido tan estudiadas como las de la Quercetina (Guo *et al*., 2018).

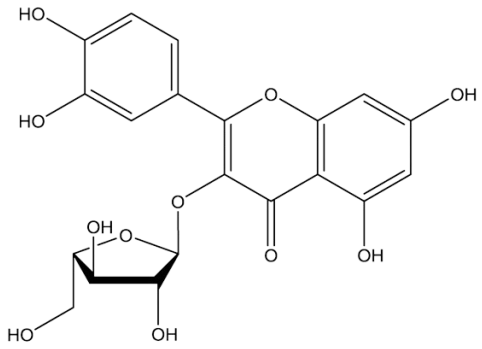

Imagen 3. Estructura química de la Avicularina (Zhou et al. 2016).

Muchos estudios han relacionado el potencial genotóxico que un compuesto químico puede tener sobre un organismo o sistema celular con su potencial mutagénico y/o carcinogénico. Esta correlación es importante cuando se utilizan plantas cuya composición química y posibles efectos se desconocen (Déciga- Campos *et al*., 2007). En medicina tradicional se han descrito algunas especies con "riesgo mutagénico" como Baccharis latifolia (chilca), Exostema caribaeum (casacara sagrada roja), Ligusticum porteriy (chuchupati), Poliomintha longiflora (orégano mexicano), Piper sanctum (hierva santa) (Muñoz-Chamba, 2019; Déciga- Campos *et al*., 2007). Por ello, es necesario generar datos que provean información sobre la eficacia,

calidad y seguridad de sus metabolitos secundarios al ser utilizadas tradicionalmente (Verschaeve y Van Staden 2008).

El ensayo de mutación y recombinación somática en ala de *Drosophila melanogaster* (anexo 1) (SMART por sus siglas en inglés) utilizado en este estudio, ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo,* permite detectar la capacidad de los agentes químicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático en alrededor de 48800 células por organismo, esto es importante pues existe una correlación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis (Ordaz, 1991), además es fácil de cultivar y su ciclo de generación es corto (aprox. 10 días a ±25°C) (Spanó y Graf, 2012).

ANTECEDENTES

Autor y año	**Ensayo**	**Resultados**
Zhang *et al.* (2020)	Ensayo MTT en células de osteosarcoma osteoblástico humano MG-63.	La Avicularina redujo la expresión de citosinasinflamatorias y los niveles de marcadores de estrés oxidante encélulas MG-63.
Wang *et al.* (2019)	Ensayo MTT en células carcinoma hepatocelular Huh7	La Avicularina regula la apoptosis celular y el ciclo celular de unamanera dependiente de la dosis.

Estrella-Parra *et al.* (2019)	Ensayo quimioprotector *in vivo* en ratón sin pelo SKH-1	El extracto metanólico de *Dyssodia tagetiflora* cuyos componentes principales son Hiperósido, Avicularina y acetato de Avicularina, disminuye el daño causado por la exposición aguda y crónica a los rayos UV en ratones SKH-1.
Duan *et al.* (2019)	Acoplamiento molecular inverso. Bioenriquecimiento Go y KEGG Pathway	La Avicularina está estrechamente relacionada con 16 *targets* asociados con el cáncer, y puede significativamente influir las señales pro-supervivencia en la vía de señalización de MAPK.
Guo *et al.* (2018)	Ensayo TUNEL	La Avicularina provoca sinergia en la citotoxicidad de 5-Fu o DDP en células de cáncer gástrico mediante la inducción de apoptosis *in vitro* e *in vivo* con pocos efectos secundarios.
An *et al.* (2005)	Ensayo de captación de radicales libres de DPPH y de hepatoprotección *in vitro*	El extracto de Avicularina (quercetina 3-O-α-L- arabinofuranosido) proveniente de *Juglans sinensis* es capaz de eliminar radicales libres y

		proteger contra citotóxicos en células hepáticas Hep G2.
Sortibran *Et al.* (2011)	Prueba de mutación somática y recombinación del ala (SMART)	Quercetina y quercetina 3--d-glucósido no son genotóxicos en el ensayo de alasde *D. melanogaster*
Robaszkiewicz *et al.* (2007)	Ensayo MTT en células A549 de cáncer humano Ensayo de actividades enzimáticas	La Quercetina en dosis de 1-20 μM produce citotoxicidad, aumenta la apoptosis y la necrosis, mientras que a concentraciones de 50-100 μM actúa como antioxidante.

JUSTIFICACIÓN

Existen pocos reportes sobre la genotoxicidad de la Quercetina y derivados como la Avicularina, siendo esta última un compuesto que hasta el momento nose le han realizado ensayos *in vivo* sobre genotóxicidad, por lo cual es de importancia estudiarlo debido a su alto consumo en la dieta humana y porque puede ser una alternativa a la Quercetina como antioxidante por su mayor tiempo de disponibilidad dentro del organismo.

HIPÓTESIS

La Avicularina tiene una estructura química con un grupo arabinósido unido al esqueleto de la Quercetina, lo cual le permitiría actuar con mayor efectividad que laQuercetina reduciendo el estrés oxidante provocado por EROs (especies reactivas de oxígeno) al pasar por el metabolismo, por esto se espera que la Avicularina no provoque daño genotóxico en las células de los discos imagales de las larvas de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVO

Evaluar el posible efecto genotóxico de la Avicularina (quercetina 3-O-α-L- arabinofuranosido) a concentraciones cercanas al promedio real de ingesta diaria de quercetina en el ensayo *in vivo* SMART en ala de *D. melanogaster* cruza estándar (CE).

MATERIALES Y MÉTODOS MATERIALES

Químicos

- Agua bidestilada (Milli-Q®)
- Avicularina. C20H18O11. CAS: 572-30-5
- Vitamina C. C6H8O6 (SIGMA-ALDRICH) CAS: 50-81-7
- Acetona. C3H6O. CAS No. 67-64-1, pureza 99.9%. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.).
- Etanol (EtOH). CAS No. 64-17-5. Sigma® St. Louis, MO, USA
- 4-Nitroquinolina 1-óxido (4-NQO). C9H6N2O3. CAS 56-57-5, pureza 97%. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU)
- Medio instantáneo Carolina (MIC). Carolina Biological Supply Company. Burlington, N.C. USA
- Solución conservadora: 5 mL de tegosept 12% disuelto en EtOH y 5 mL de ácido propiónico aforados a 1 L de agua a una proporción (1:10) (Dueñas et al. 2002)
- Entellan. CAS 1.07961. Merck® Darmstadt, Alemania
- Hojuela de papa Valle verde® (Walmart, MX) y Idahoan® (Costco, MX).

Biológicos

- Cepas mutantes de *D. melanogaster*: "flare" (flr^3/TM3, Bd ^{Ser}) y "multiple wing hairs" (mwh/mwh) del laboratorio de Genética Toxicológica de la FES–Iztacala, UNAM. Donadas

originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Swiss Federal Institute of Technology de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.

MÉTODOS

Cultivo y propagación de las cepas mutantes de *D. melanogaster*

Las cepas se propagaron en frascos de vidrio de 250 mL con un medio de cultivo de hojuelas de papas deshidratadas marca Idahoan® a los que se les agregaron 20 mL de solución conservadora (Dueñas *et al*., 2002). Las cepas se mantuvieron a temperatura y humedad ambientales (25 ± 2 ºC) con un ciclo de luz (11 h) / oscuridad (13 h) debido a que los cultivos se cuidaron en el periodo de diciembre – enero.

Cruza estándar (CE)

Se aislaron imagos de hembras "flare" en tubos con medio de hojuelas de papas por un periodo de cinco días, para verificar que fueran vírgenes y que ningún macho hubiese quedado entre éstas, después se realizó la cruza estándar (CE) con las hembras "flare" y machos "multiple wing hairs" en una proporción de 3:1, se incubaron por tres días a 25±2°C y 65% de humedad relativa en total oscuridad para asegurar que todas las hembras "flare" quedaran preñadas antes de la colecta de huevos.

Colecta de huevos

En frascos estériles de 250 mL se colocó levadura fresca activada marca La Florida® dejándola reposar durante 24 h. Tras lo anterior se colocaron en los frascos las moscas adultas procedentes de la cruza estándar y se incubaron durante 8 h. Posterior a ese periodo de tiempo, se retiraron las moscas adultas y los frascos con los huevos se regresaron a la incubadora. Después de 72 ±

4 h se recuperaron las larvas de tercer estadio diluyendo rápidamente el medio con agua corriente y haciéndola pasar a través de una coladera de acero inoxidable de malla fina.

Diseño experimental

Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento en tres experimentos independientes, agregando aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72±4 h de edad en tubos de base plana que previamente contenían 0.5 g de medio instantáneo Carolina (Drosophila Instant Medium) y 2 mL de los diferentes tratamientos (ver Cuadro 1), posteriormente se colocaron los tubos en la incubadora a 25°C y 65% de humedad relativa (HR) a completa oscuridad (Figura. 4) hasta que emergieron los imagos (tratamientos crónicos de 48h).

Imagen 4. Tratamientos experimentales en incubadora a 25°C y 65% HR

Tratamientos

Las concentraciones de la Avicularina utilizadas para los tratamientos que semuestran en el Tabla 1 fueron determinadas basándose en Kelly (2011) que reporta que la cantidad mínima y máxima de la Quercetina hallada en plasma humano es 0.2 nM y 0.5 mM. Las concentraciones para Vitamina C (5.6 mM) como pro oxidante y 4NQO (2mM) como genotóxico fueron

determinadas con base en el trabajo de Dueñas-García *et al* (2017).

Cuadro 1. Tratamientos crónicos administrados a larvas de ± 48 h.		
Testigos solventes	Testigos positivos	Tratamientos Avicularina**
Agua Mili-Q Etanol + Acetona [2% v/v]	4NQO (2 mM)* Vitamina C (5.6 mM)*	0.023 mM 0.047 mM 0.095 mM 0.190 mM 0.380 mM
*Tomado de Dueñas-Garcia *et al.* (2017) **Tomado de Kelly (2011)		

Disección, montaje y lectura de alas

Se recuperaron los imagos y se fijaron en tubos con EtOH 70%; se separaron los individuos con alas de fenotipo silvestre (genotipo *mwh* + / + *flr*^{3}) y se disectaron las alas (cuidando mantener una proporción 1:1 entre hembras y machos (Frei y Würgler, 1995)) realizando preparaciones permanentes con Entellan®.

Las laminillas se etiquetaron con una clave para evitar prejuicio en la revisión de los tratamientos y se analizaron en microscopio óptico a 400X una cantidad de 55 individuos por tratamiento (Frei y Würgler, 1995). Se analizó la región ventral y dorsal de las alas registrando la

frecuencia y tipo manchas (pequeñas, grandes ygemelas) para los clones *mwh* y flr^3 (Graf *et al.*, 1984).

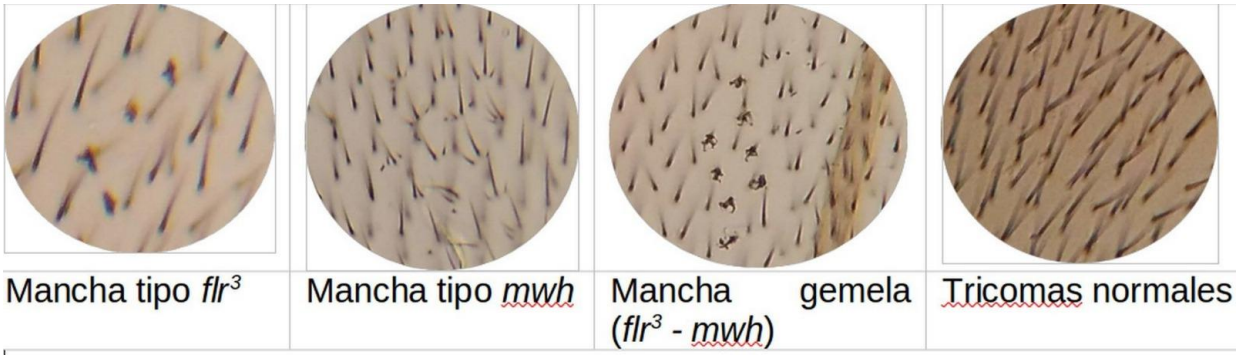

Imagen 5. Tipos de manchas. Las manchas que son contabilizadas para la prueba SMART pueden ser de tres tipos: La mancha tipo flr3 que se muestra en forma de "llama", el mwh el cual es más de un tricoma por célula simulando un "maguey", y la combinación de ambas flr3 – mwh. Fotografías tomadas por la autora de esta tesis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con el software SMART-PC versión 2.1 de Freiy Würgler (1988) que evalúa estadísticamente la frecuencia de las manchas inducidas en las alas mediante la prueba de Ji^2 para frecuencia de una cola con un grado de libertad y probabilidad de ($p < 0.05$). Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso con base en las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (Ho): No hay diferencia en la frecuencia de mutación entre los controles y tratamientos.

Hipótesis alternativa (Ha): El tratamiento da como resultado una frecuencia de mutación aumentada que es "m" veces la frecuencia espontánea. Donde "m" es el factor de multiplicación, utilizado para realizar este análisis estadístico, basado en los resultados que se obtendrían al usar como agente mutagénico radiación ionizante, y que indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventosde los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta

genotóxica positiva. Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes quelas grandes (>3 células) y gemelas (células *flr*^{3} y *mwh* en clones adyacentes), por lo que el programa los analiza por separado para evitar una sobreestimación delas manchas menos frecuentes. Para asignar resultados positivos se emplea un m=2 para las manchas totales y pequeñas, y m=5 para las manchas grandes y gemelas, con base en lo anterior pueden ser posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würgler, 1988):

No rechazar Ho: Negativo

Rechazar Ho: Positivo.

Para analizar la distribución de los clones *mwh* y determinar si la división celular fue afectada, se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov. Los resultados débiles positivos e indecisos fueron analizados con la prueba no paramétrica de U de Mann-Wilcoxon (significancia = 0.05) que compara dos muestras con STATgraphicsversión 6.0 (Frei y Würgler, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos después de revisar 531 individuos (1062 alas), de los ensayos con los diferentes tratamientos y sus testigos, se observaron datos no concluyentes para SMART, por lo que fueron sometidos a las pruebas de U de Mann-Wilcoxon y Kolmogorov–Smirnoff (K-S). En la tabla 2 se muestra el resumen de los resultados de SMART después de analizar la frecuencia de manchas por individuo.

Tabla 2.
Resultados completos obtenidos para la cruza estándar en el ensayo en ala de *Drosophila melanogaster* después de alimentar durante 48h a larvas de 72 +/- 4h con diferentes concentraciones de Avicularina y sus controles.

Tratamiento	Número de individuos	Número de manchas por individuo				
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones mwh
A. Agua vs testigos						
Agua mili Q	62	0.24 (15)	0.08 (5)	0 (0)	0.32 (20)	18
Etanol-Acetona [2% v/v]	58	0.24 (8) s	0.05 (3) ns	0 (0) ns	0.19 (11) ns	11
Vitamina C	56	0.52 (29) s	0.16 (9) ns	0.04 (2) ns	0.71 (40) s	39
B. Etanol-Acetona [2% v/v] / Tratamientos Avicularina / 4NQO						
Etanol-Acetona [2% v/v]	58	0.14 (8)	0.05 (3)	0 (0)	0.19 (11)	11
Avicularina [0.023 mM]	60	0.25 (15) ns	0.05 (3) ns	0.02 (1) ns	0.32 (19) ns	19
Avicularina [0.047 mM]	59	0.27 (16) ns	0.03 (2) ns	0.03 (3) ns	0.34 (20) ns	19
Avicularina [0.095 mM]	64	19 (12) ns	0.05 (3) ns	0.02 (1) ns	0.25 (16) ns	15
Avicularina [0.19 mM]	57	0.23 (13) ns	0.02 (1) ns	0 (0) ns	0.25 (14) ns	14
Avicularina [0.38 mM]	60	0.2 (12) ns	0.02 (1) ns	0.03 (2) ns	0.25 (15) ns	14
4NQO (*4-Nitroquinoline 1-oxide)*	55	0.67 (37) s	1.45 (80) s	0.64 (35) s	2.76 (152) s	134

*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988, 1995) prueba de U de Mann-Wilcoxon comparados con su testigo correspondiente: ns. no significativo; s, significativo; m, factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo ($p < 0.05$)

En las figuras 6 y 7 se muestran los datos de la frecuencia de los diferentes tipos de manchas y la distribución de la frecuencia del tamaño de clones *mwh* respectivamente, después de exponerlos a los testigos disolventes (agua miliQ y EtOH-Ac [2% v/v]) y positivos (vitamina C y 4NQO) los cuales tuvieron un comportamiento esperado según lo reportado por Dueñas-García *et al.* (2017) donde los testigos positivos utilizados en este trabajo presentaron un mayor número de manchas que el agua miliQ y Etanol + Acetona [2% v/v].

La combinación de Etanol + Acetona [2% v/v] hizo más soluble el compuesto Avicularina, pero provocó daño al compararlo con el disolvente agua miliQ, esto se podría deber principalmente a que el etanol aumenta la producción de radicales libres y la frecuencia de roturas de cadenas de ADN, ya que la acetona tiene bajos niveles de toxicidad y solo produce aneuploidias a concentraciones mayores a 2500 mg/Kg (Dietz, 1991; Yanpar *et al.*, 2021; EPA, 2009).

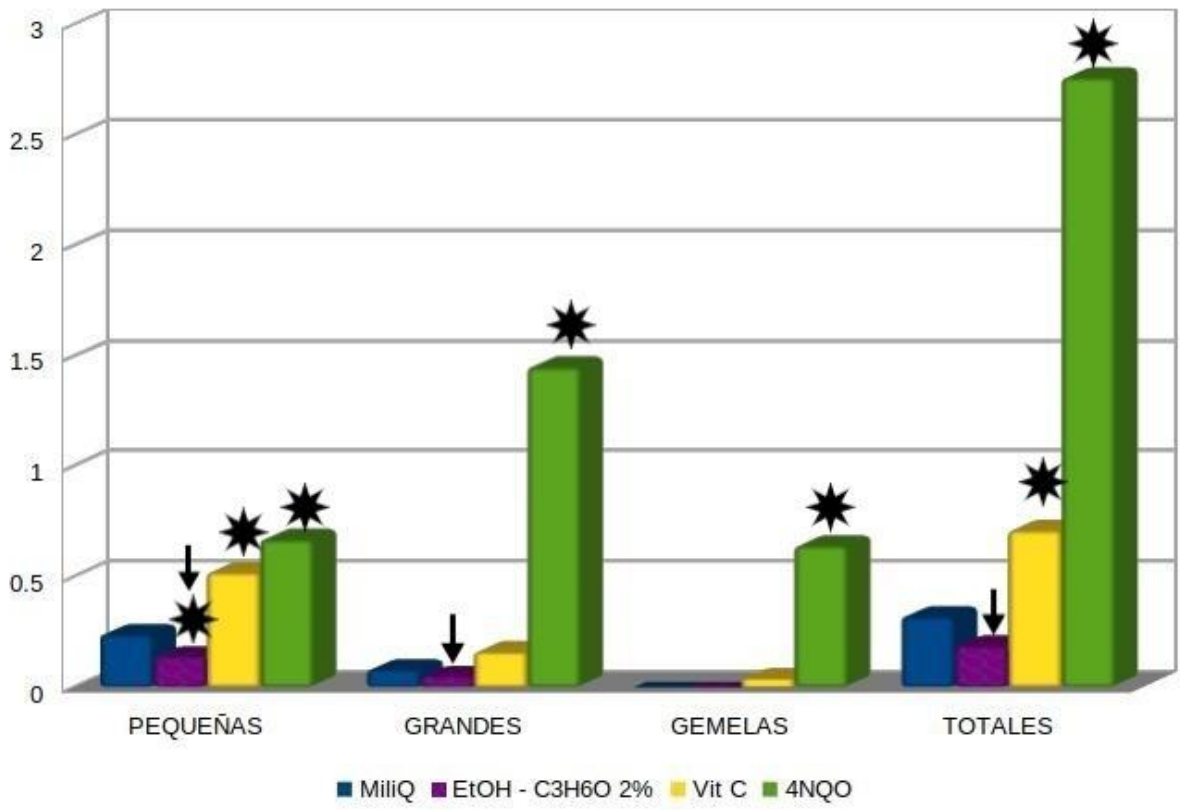

Imagen 6 Frecuencias de los diferentes tipos de manchas / mosca de los testigos. Agua miliQ (disolvente), vitamina C (pro oxidante), (EtOH-C3H6O) Etanol + Acetona [2% v/v] (disolvente) y 4NQO (genotóxico). ✶ Diferencias estadísticamente significativas con respecto al disolvente $p \leq 0.05$. ↓ Disminución en la frecuencia de mancha/mosca.

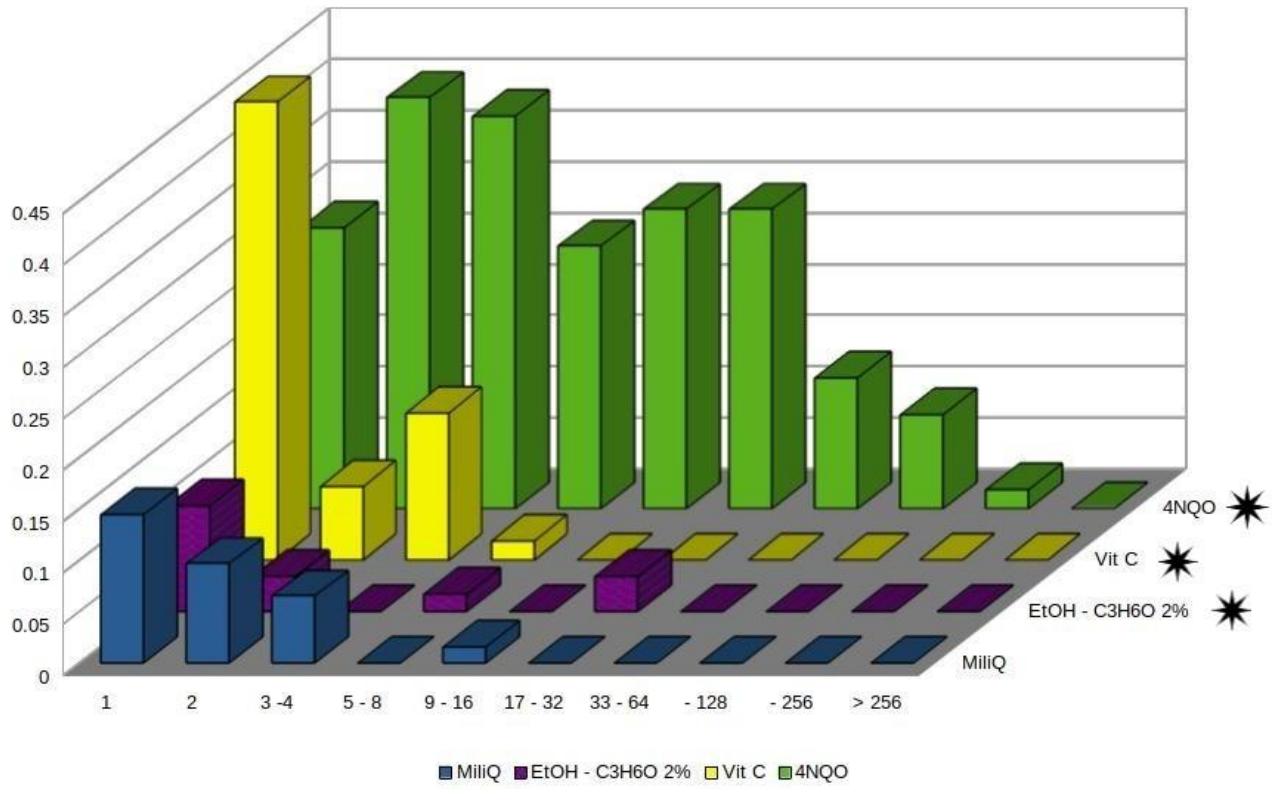

Imagen 7: Distribución de la frecuencia del tamaño de clones mwh por individuo de los testigos: Agua miliQ (disolvente), vitamina C (pro oxidante), (EtOH-C3H6O) Etanol + Acetona [2% v/v] (disolvente) y 4NQO (genotóxico). Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y 256 es el número de células somáticas mutantes. ✶ Diferencias estadísticamente significativas. $p \leq 0.05$

En la figura 8 se observa que existe una diferencia en el tamaño de manchas pequeñas entre los tratamientos de Avicularina y el testigo Etanol + Acetona [2% v/v, esto puede interpretarse como que la Avicularina causó una disminución del daño provocado por el disolvente Etanol + Acetona [2% v/v], sin embargo al revisar los tratamientos de Avicularina (0.023, 0,047, 0.095, 0.19, 0.38 mM) contra etanol + acetona [2% v/v] con la prueba U estos datos no resultaron significativos en ninguno de los casos, esto concuerda con lo observado por Sortibran *et al* (2011) donde isoquercetina (quercetin 3-β-D-glucoside) otro glucosido de quercetina no fue genotóxico en la prueba SMART en ala.

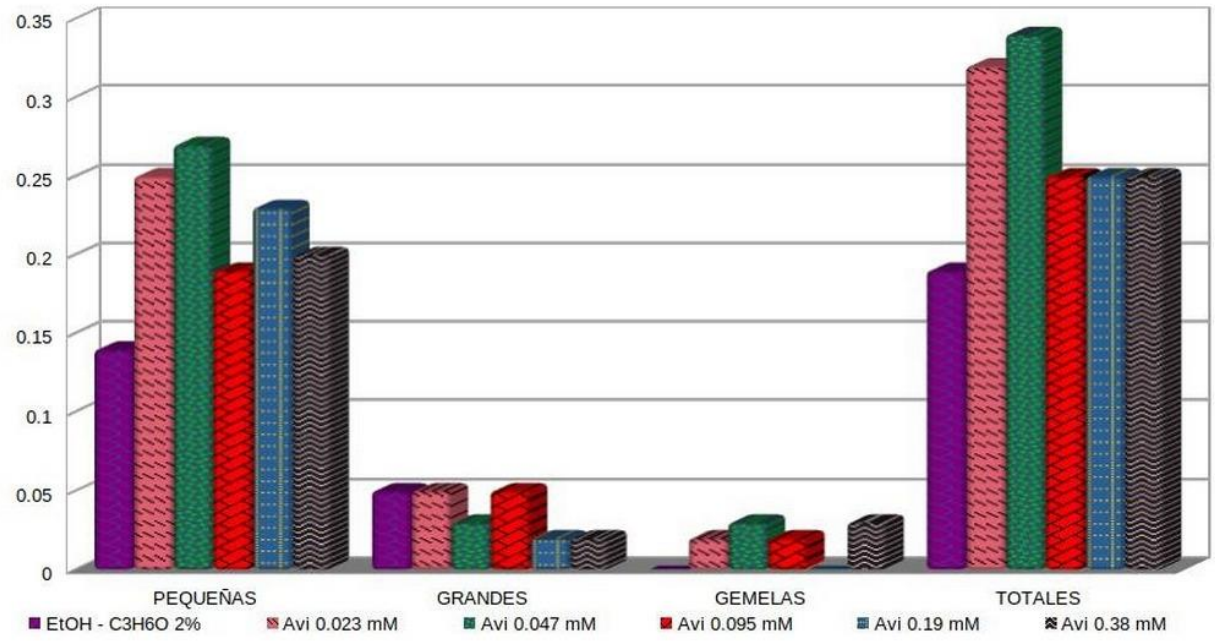

Imagen 8.: Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos EtOH-C3H6 2% y Avicularina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM).

Al comparar los datos obtenidos de la distribución acumulada de los clones mwh en tratamientos de Avicularina (Avi) (0.023, 0,047, 0.095, 0.19, 0.38 mM) contra Etanol + Acetona [2% v/v] y revisado bajo la prueba K-S todos los tratamientos fueron significativos $P \leq 0.05$ (Figura 9), por lo tanto a pesar de ser negativos para la prueba SMART, estos alteraron la distribución del tamaño de los clones mwh del disolvente por lo que podemos suponer que la Avicularina alteró la división celular induciendo citotoxicidad de los discos imagales que originan las alas, se puede llegar a esta suposición puesto que Wang *et al* (2019) reportaron que la Avicularina inhibió la viabilidad celular e indujo la apoptosis provocando citotóxicidad en carcinoma cutáneo de células escamosas. Este comportamiento puede explicarse con lo reportado por Duan *et al.* (2019) donde mencionan que la Avicularina influye sobre la vía de señalización MAPK del ciclo celular, que puede activar una serie de actividades celulares y participa en la regulación de la proliferación celular y apoptosis.

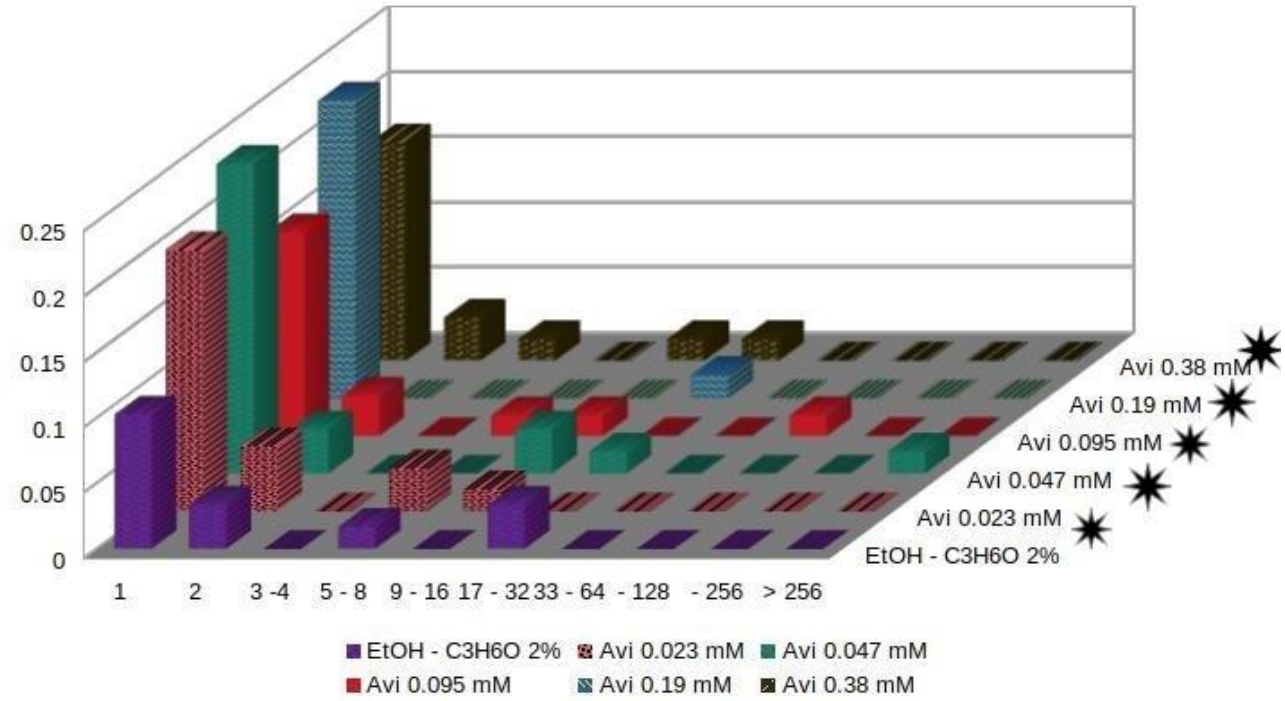

Imagen 9. Distribución de la frecuencia del tamaño de clones mwh por individuo después de los tratamientos EtOH-C3H6 2% y Avicularina (0.023, 0.047, 0.095, 0.19 y 0.38 mM). Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y 256 es el número de células somáticas mutantes. ✶ Diferencias estadísticamente significativa. p≤0.05

CONCLUSIONES

- La Avicularina no provocó daño genotóxico en la CE con las concentraciones empleadas.

- Todas las concentraciones de Avicularina alteraron la división celular de los discos imagales de las alas, probablemente a consecuencia de un efecto citotóxico que confirma lo reportado para este compuesto en pruebas *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- An RB, Kim HC, Tian YH, Kim YC. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. Arch Pharm Res. 2005; 28(5):529-33. doi: 10.1007/BF02977753. PMID: 15974437.

- Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales [Internet]. 2001; 22 (2):5-14. Recuperado de: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001

- de M B Costa EM, Pimenta FC, Luz WC, de Oliveira V. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria genus* able to metabolize quercetin like mammalian cells. Braz J Microbiol. 2008; 39(2):405-8. doi: 10.1590/S1517- 838220080002000036. Epub 2008 Jun 1. PMID: 24031237; PMCID: PMC3768382.

- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. c. J Ethnopharmacol. 2007; 110(2):334-42. doi: 10.1016/j.jep.2006.10.001. Epub 2006 Oct 13. PMID: 17101253.

- Dias, M.C.; Pinto, D.C.G.A.; Silva, A.M.S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. Molecules. 2021; 26(17), 5377; https://doi.org/10.3390/molecules26175377

- Dietz DD, Leininger JR, Rauckman EJ. Toxicity studies of acetone administered in the drinking water of rodents. Fundam Appl Toxicol. 1991;17(2):347-360. doi:10.1016/0272-0590(91)90224-r

- Duan C, Li Y, Dong X, Xu W, Ma Y. Network Pharmacology and Reverse Molecular Docking-Based Prediction of the Molecular Targets and Pathways for Avicularin Against

Cancer. Comb Chem High Throughput Screen. 2019; 22(1):4-12. doi: 10.2174/1386207322666190206163409. PMID: 30727880.

- Dueñas I.E., M.E. Heres, P.L. Castañeda, U. Graf. 2002. Easy raising *of Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. Dros. Inf. Serv. 2002; 84: 166. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/314104187_Easy_raising_of_*Drosophila_melanogaster*_on_a_medium_consisting_of_mashed_potato_flakes_and_a_preservative_solution

- Dueñas-García IE, Heres-Pulido ME, Arellano-Llamas MR, De la Cruz- Núñez J, Cisneros-Carrillo V, Palacios-López CS, Acosta-Anaya L, Santos- Cruz LF, Castañeda-Partida L, Durán-Díaz A. Lycopene, resveratrol, vitamin C and $FeSO_4$ increase damage produced by pro-oxidant carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in *Drosophila melanogaster*: Xenobiotic metabolism implications. Food Chem Toxicol. 2017; 103:233-245. doi: 10.1016/j.fct.2017.02.007. Epub 2017 Feb 12. PMID: 28202360.

- Estrella-Parra EA, Espinosa-González AM, García-Bores AM, Zamora- Salas SX, Benítez-Flores JC, González-Valle MR, Hernández-Delgado CT, Peñalosa-Castro I, Avila-Acevedo JG. Flavonol glycosides in *Dyssodia tagetiflora* and its temporal variation, chemoprotective and ameliorating activities. Food Chem Toxicol. 2019; 124:411-422. doi: 10.1016/j.fct.2018.12.024. Epub 2018 Dec 18. PMID: 30576709.

- Frei H, Würgler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutat Res. 1988; 203(4):297-308. doi: 10.1016/0165- 1161(88)90019-2. PMID: 3136327.

- Frei H, Würgler FE. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in Drosophila. Mutat Res. 1995; 334(2):247-258. doi:10.1016/0165-1161(95)90018-7

- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen. 1984; 6(2):153-88. doi: 10.1002/em.2860060206. PMID: 6423380.

- Guo XF, Liu JP, Ma SQ, Zhang P, Sun WD. Avicularin reversed multidrug- resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions. Biomed Pharmacother. 2018; 103:67-74. doi: 0.1016/j.biopha.2018.03.110. Epub 2018 Apr 7. PMID: 29635130.

- Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. Biochem Pharmacol. 1997; 54(9):1013-8. doi: 10.1016/s0006-2952(97)00260-8. PMID: 9374422.

- Kelly GS. Quercetin. Monograph. Altern Med Rev. 2011; 16(2):172-94. PMID: 21649459.

- Kobylińska A, Janas KM. Prozdrowotna rola kwercetyny obecnej w diecie czSowieka [Health--promoting effect of quercetin in human diet]. Postepy Hig Med Dosw (Online Translated from polish to spanish.). 2015 Jan 9;69:51-62. doi: 10.5604/17322693.1135423. PMID: 25589713.

- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids--food sources and health benefits. Rocz Panstw Zakl Hig. 2014;65(2):79-85. PMID: 25272572.

- Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. J Biomed Biotechnol. 2009; 2009:830616. doi: 10.1155/2009/830616. PMID: 19636435; PMCID: PMC2712839.

- Lakhanpal P,. Rai DK. Quercetin: a versatile flavonoid. Internet Journal of Medical Update Vol. 2 (2) 2007: pp. 20-35

- Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, De Risi C. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. Molecules. 2017; 22(8):1270. doi: 10.3390/molecules22081270. PMID: 28758919; PMCID: PMC6152094.

- Mlcek J., T. Jurikova, S. Skrovankova, J. Sochor. Quercetin and Its Anti- Allergic Immune Response. Molecules. 2016; 21(623): doi: 10.3390/molecules21050623. PMID: 27187333; PMCID: PMC6273625.

- Ordaz T. M. G. Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de *Drosophila melanogaster* (Tesis de grado; Universidad Nacional Autónoma de México). 1991. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000171562

- Proshkina E, Lashmanova E, Dobrovolskaya E, Zemskaya N, Kudryavtseva A, Shaposhnikov M, Moskalev A. Geroprotective and Radioprotective Activity of Quercetin, (-)-Epicatechin, and Ibuprofen in *Drosophila melanogaster*. Front Pharmacol. 2016; 23(7):505. doi: 10.3389/fphar.2016.00505. PMID: 28066251; PMCID: PMC5179547.

- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 2001; 11(6):1114-25. doi: 10.1101/gr.169101. PMID: 11381037; PMCID: PMC311089

● Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. Cell Biol Int. 2007; 31(10):1245-50. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.04.009. Epub 2007 May 10. PMID: 17583542.

● Sotibrán AN, Ordaz-Téllez MG, Rodríguez-Arnaiz R. Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res. 2011 Nov 27; 726 (1): 60 - 5. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.08.005. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21907306.

● Spanó MA., U. Graf. Second workshop at the federal university of uberlandia (mg)-(Brazil): SMART: a method for the detection of mutagenic and recombinagenic activity in somatic cells of *Drosophila*. Rev.Int. Contam. Ambient. 1998; 14 (12): 111 14. Recuperado de https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/viewFile/ 32988/30228.

● Spanó M. A.; Graf, U. Segundo taller sobre SMART: un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*» en la universidad federal de uberlandia (MG), Brasil. Rev int contam ambienT. 2012; 14: 111-114

● EPA (Environmental Protection Agency United States). Toxicological review of acetone. 2009 (CAS No. 67-64-1). EPA/635/R-03/004 www.epa.gov/iris

● Verschaeve L, Van Staden J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2008; 119(3):575-87. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.007. Epub 2008 Jun 18. PMID: 18602977.

● Vicente-Vicente L; Prieto M; Morales AI.. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. Rev. Toxicol., 2013; 30 (2): 171- 181

● Vo VA, Lee JW, Chang JE, Kim JY, Kim NH, Lee HJ, Kim SS, Chun W, Kwon YS. Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264.7 Macrophages. Biomol Ther (Seoul). 2012; 20 (6): 532 - 7. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.6.532. PMID: 24009846; PMCID: PMC3762284.

● Wang Y, Liu M, Chen S, Wu Q. Avicularin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in cutaneous squamous cell carcinoma. Exp Ther Med. 2020; 19(2):1065-1071. doi: 10.3892/etm.2019.8303. Epub 2019 De 9. PMID: 32010270; PMCID: PMC6966122.

● Wang Z, Li F, Quan Y, Shen J. Avicularin ameliorates human hepatocellular carcinoma via the regulation of NF-κB/COX-2/PPAR-γ activities. Mol Med Rep. 2019; 19(6):5417-5423. doi: 10.3892/mmr.2019.10198. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31059053; PMCID: PMC6522888.

● Zhou Y, Chen V, Chen J, Dong Y, Wang S, Wen C, Wang X, Yu X. Determination and Pharmacokinetic Study of Jaceosidin in Rat Plasma by UPLC–MS/MS. Act Chromat. 2016. 30(2):131–135 doi: https://doi.org/10.1556/1326.2017.00104

● Yanpar E, Yildimir M, Akkapulu M, Değİrmencİ U, Könen Adigüzel S, Yalin S, Yalin A. Possible protective role of punicalagin on oxidative stress, inflammation and genotoxicity in ethanol-induced liver toxicity. Journal of Research in Pharmacy. 2021; 25(5):600-608 doi: https://dx.doi.org/10.29228/jrp.51; ISSN: 2630-6344

● Zhang Z, Lv G, Du L. Avicularin Reduces the Expression of Mediators of Inflammation and Oxidative Stress in Bradykinin-Treated MG-63 Human Osteoblastic Osteosarcoma Cells. Med Sci Monit. 2020; 26:e921957. doi: 10.12659/MSM.92195

ANEXO 1

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS(SMART)

Drosophila melanogaster es un excelente modelo para evaluar genotóxicos, ya quecomparte alrededor del 77% de los genes implicados con enfermedades humanas (Reiter *et al*, 2001), sirve como una gran alternativa de modelo animal puesto que solo requiere material de laboratorio básico y su alimento es de bajo costo, además su ciclo de vida es rápido (aprox. 10 días a 25ºC) y solo se necesita de una generación para obtener resultados. Este bioensayo utiliza marcadores letales recesivos que se expresan en la superficie de los ojos y las alas, estas últimas tienen la ventaja de poder ser preservadas por largos periodos de tiempo en lamillas con resina.

Permite utilizar dos cruzas de *D. melanogaster* adulta: la cruza estándar (CE) donde se utilizan las cepas flare (flr^3, fenotipo alar Serratia) y mwh, y la cruza de bioactivación elevada (CBE) que utiliza las cepas Oregon R(R)-flare (resistente a insecticidas, fenotipo alar Serratia y con metabolismo xenobiótico alto) y *multiple wing hair* (mwh, fenotipo alar silvestre).

La SMART en ala de *D. melanogaster* se basa en la pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh y* flr^3 en las células de los discos imagales que, tras la metamorfosis, se expresan como clones mutantes o manchas en las alas siendo posible evaluar la actividad recombinógena contra la mutagénica detectando mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinaciones somáticas provocadas por la exposición a distintas concentraciones de algún agente químico o físico (Spanó y Graf, 1998).