



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO*



*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA*

***“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN DERIVADO DE  
QUINAZOLINA (D-1) EN SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster*  
MEIGEN (DIPTERA; DROSOPHILIDAE) CRUZA ESTÁNDAR”***

***T E S I S***

***QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE***

***B I Ó L O G A***

***PRESENTA***

***Bertha Guadalupe Ramírez Cruz***

***Directora de tesis:***

***Ma. en C. Ma. Eugenia Isabel Heresy Pulido***

***Los Reyes Iztacala, Edo. de México. 2018***





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“Hay una fuerza motriz  
más poderosa que el vapor  
la electricidad y la energía atómica:  
la voluntad”*

*Albert Einstein*

# ***Dedicatoria***

Estoy muy contenta con la realización de este escrito, la verdad, fue un poco difícil darle término, y es por ello, que me gustaría dedicarlo a todas las personas que confiaron en que podría lograrlo, y como dice la frase “**mejor tarde que nunca**”.

A mi familia, porque son el principal motivo de que haya logrado terminar este escrito:

- Para mi abuela Leonor Jiménez, por ser siempre un pilar en mi vida y confiar en que cumpliría mis metas, por no desanimarse ante los retos de la vida y sobre todo por el apoyo brindado en estos años de preparación.
- Para mis hermanos Jaime, Fany e Israel, por soportarme en los días buenos y sobre todo en los malos, por el apoyo mostrado todos estos años y porque nunca dejaron de preguntar “para cuando la tesis”.
- Para mi madre Ma. de los Ángeles, porque nunca me limitó y siempre aceptó las decisiones que tomé, y gracias a ello hoy estoy donde estoy.
- Para mis tíos Enrique y Petra, de igual forma por todo el apoyo que me brindaron durante mi formación académica, sé que no fue fácil pero creo que valió la pena.

A mi asesora de Tesis, profesora Maru por no dejar que me olvidara de terminar mi escrito, por su inmensa paciencia y todos los consejos que me brindó en estos años.

# ***Agradecimientos***

Ya sea a la suerte o el azar, que me ayudaron a encontrar una carrera tan hermosa, llena de vida, alegría y asombro, donde las preguntas nunca terminan, por el contrario, se hacen más grandes.

A mi familia: gracias a mi abuela por siempre apoyarme y cuidarme todo este tiempo; a mis hermanos porque siempre estamos juntos en los momentos difíciles; a mi madre por la paciencia y comprensión brindadas; a mis tíos gracias por todo el apoyo.

A mis amigos, saben que no los cambiaría por nada, los mencionaré por orden de aparición: Mayra por permanecer en mi vida después de tanto tiempo; Ángeles mi primer amiga universitaria, gracias por tantos momentos divertidos y porque a pesar de todo seguimos juntas; Jessica gracias por hacer de las prácticas de campo una aventura, y de la estancia en el grupo más divertida; Brenda por todos los recuerdos bonitos, graciosos y divertidos que compartimos en el laboratorio; Abraham porque siempre tienes tiempo de escuchar las dudas o preocupaciones de las personas (nunca cambies); Jesús a pesar de que eres un dolor de cabeza, gracias por el tiempo que hemos pasado juntos, y por recordarme continuamente que “no había terminado mi tesis”.

A mi asesora, profesora Maru muchas gracias por sus consejos, apoyo y sobre todo por su paciencia, porque de otra forma tal vez jamás hubiera logrado terminar; a las profesoras Irma Elena y Laura porque dedicaron su tiempo a resolver mis dudas, por sus recomendaciones y porque siempre me levantaban el ánimo cuando iba al laboratorio; al profesor Luis por hacer de la estancia en el laboratorio más placentera, por enseñarme todo el trabajo que se debe de realizar para cultivar a *Drosophila* y poder realizar el trabajo experimental, y por mantenerse al pendiente del proyecto. A mis revisores profesores Elías Piedra y Luis Barbo, gracias por el tiempo invertido, las sugerencias y correcciones

realizadas para la mejora del escrito. Al profesor Ángel Duran por el apoyo brindado en la parte estadística.

A todas las personas que conocí en el laboratorio, a Fanny, Jessica, Miguel, Rodolfo, Ximena, Rafa, Sonia, Sofi, gracias, por lograr que el ambiente en el laboratorio siempre fuera alegre, divertido, y lleno de vida, porque no sólo era un lugar para ir a trabajar, sino, también era un lugar donde se podían compartir opiniones, ideas y metas.

**GRACIAS A TODOS.**

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
ABREVIATURAS .....	8
Abstract .....	10
RESUMEN.....	11
<i>Tripanosomiasis americana</i> .....	13
<i>Tripanocidas</i> .....	14
<i>Pruebas de mutagenicidad</i> .....	17
<i>SMART en ala de D. melanogaster</i> .....	17
<i>Metabolismo xenobiótico</i> .....	20
<i>N-nitrosodimetilamina</i> .....	22
ANTECEDENTES .....	23
<i>Tripanocidas con efecto tóxico y genotóxico</i> .....	23
<i>Derivados de la quinazolina con efectos tóxicos</i> .....	24
<i>Derivados de quinazolina con efecto genotóxico</i> .....	26
<i>Derivados de quinazolina que no presentan efectos tóxicos</i> .....	27
JUSTIFICACIÓN .....	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
<i>Objetivo general</i> .....	29
<i>Objetivos particulares</i> .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
<i>Cultivo y propagación de D. melanogaster</i> .....	31
<i>Prueba de toxicidad CL<sub>50</sub></i> .....	31
<i>Análisis estadístico</i> .....	32
<i>SMART</i> .....	32
<i>Análisis estadístico</i> .....	33

<i>Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)</i> .....	34
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
<i>Prueba de toxicidad CL<sub>50</sub></i> .....	36
<i>SMART</i> .....	39
<i>Cromatografía de líquidos de alta presión</i> .....	44
<b>CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>REFERENCIAS CITADAS</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	54
<i>Anexo I: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i></i> .....	54
<i>Anexo II: Distribución de la tripanosomiasis americana</i> .....	54
<i>Anexo III: <i>Drosophila melanogaster</i></i> .....	56
<i>Anexo IV: Daño genético detectado por SMART en ala de</i> <i>D. melanogaster</i> .....	57
<i>Anexo V: Discos imaginales</i> .....	59
<i>Anexo VI: Resultados de la distribución acumulada del</i> <i>tamaño de clones mwh de la cruce estándar</i> .....	60
<i>Anexo VII: Espectros de los tratamientos que mostraron</i> <i>similitud a la curva de la muestra estándar en la HPLC</i> .....	62
<i>Anexo VIII: Principales tripanocidas utilizados para</i> <i>tratar la enfermedad</i> .....	64
<i>Anexo IX: Glosario</i> .....	65

## ***ABREVIATURAS***

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ANOVA	Análisis de varianza
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
<i>Bd</i> <sup>s</sup>	<i>Beaded Serratia</i>
BE	Bioactivación elevada
BMTQ	9-bromo-5-morpholono-tetrazol[1,5-c]quinazolina
BNZ	Benznidazol®, N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamid
CE	Cruza estándar
CHO	Prueba en Ovario de Hámster Chino
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
CP-31398	N-{2-[2-(4-metoxi-fenil)etenilo]-4-quinazolin}-N,N-dimetil-propano-1,3-diamina HCl
D-1	2,4-diacetoamina-6-amina 1,3 diazonaftaleno
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHFR-TS	Dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa
DMN	Dimetilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr.	Doctor (haciendo referencia al grado académico)
EtOH	Etanol
GHPM	N6-[4-(metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina)
GHPMF	N6-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión, por sus siglas en inglés
HR	Humedad relativa
MetOH	Metanol
MIC	Medio instantáneo Carolina
Min	Minutos
mL	Mililitros

MTX	Metotrexato, 4-amino-4 deoxi-10-metilpteroil-L-ácido glutámico.
<i>Mwh</i>	multiple wing hairs
N1	Nitrógeno 1 de la pirimidina
N3	Nitrógeno 3 de la pirimidina
N7	Nitrógeno 7 de la purina
NFX	Nifurtimox®, N-(3-methyl-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)1-1(5-nitro-2-furil
Nm	Nanómetros
O <sup>6</sup>	Oxígeno exocíclico en el carbono 6 del benceno
OIT	Organización Internacional del Trabajo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTR1	Pteridin reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S1-NQ2-1	2,4-diamina-6peroxi-1,3 diazonaftaleno
SMART	Prueba de mutación y recombinación somática
TS	Timidilato sintasa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UGT	Uridina difosfato glucuronil transferasa
WHO	Siglas de la Organización Mundial de la Salud, en inglés.

## ***Abstract***

Chagas evil is a Latin America's endemic disease caused by the *Trypanosoma cruzi* protist, but in the last year's contagion outside this zone had been increased. The medical problem lies in that drugs used to combat this parasite have harmful effects on health; this circumstance had increase the interest in the synthesis of new drugs for treat the disease. Dr. Hernández Luis and their collaborators, of the Department of Pharmacy, of the Chemistry Faculty of the UNAM, have developed structure derivatives of the trypanocidal drug 2,4,6-triaminquinazoline. The objective of the present work was evaluate the possible toxic and genotoxic effects of the trypanocidal D-1(2,4-diacetoamine-6-amine 1,3 diazonaftaleno) in *Drosophila melanogaster*. Previously, the CL<sub>50</sub> toxicity test was performed in the flare and Oregon R(R)-flare strains of *D. melanogaster* with concentrations 1.97, 3.95, 7.9, 15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 and 508 µM of D-1, using EtOH 2% as a dissolvent control. Results did not show meaningful differences between treatments, pairing against the dissolvent control, but we found meaningful differences between the strains. For the standard cross of the SMART bioassay in *D. melanogaster* or wing spot test, the D-1's concentrations used were 2, 4, 8 and 16 µM; EtOH 2% was used as a dissolvent and negative control and DMN 76 µM as a genotoxic positive control. Results indicated that the negative control EtOH 2% did not show genotoxic effects; as was expected, because DMN is a pro-carcinogen and a positive control, this compound was genotoxic; all D-1 concentrations were not genotoxic. On the other hand, EtOH 2%, DMN and D-1's 4, 8 and 16 µM concentrations altered the cumulative size distribution of the *mwh* clones and the HPLC test showed no traces of the D-1 in the treated organisms. We concluded that the D-1's concentrations: 4, 8 and 16 µM were cytotoxic, and any of them were genotoxic; because HPLC and CL<sub>50</sub> results, we assume that the D-1 should have been metabolized.

## ***RESUMEN***

El mal de Chagas, es una enfermedad endémica de América Latina causada por el protista *Trypanosoma cruzi*, pero en los últimos años el contagio fuera de esta zona ha ido en aumento. Su problemática médica radica en que los medicamentos utilizados para combatirla presentan efectos dañinos a la salud; esta circunstancia ha aumentado el interés en la síntesis de nuevos medicamentos para tratar la enfermedad. El Dr. Hernández Luis y sus colaboradores, del Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química de la UNAM, han desarrollado una serie de tripanocidas derivados de la estructura base 2,4,6-triaminquinazolina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles efectos tóxicos<sup>1</sup> y genotóxicos del tripanocida D-1 (2,4-diacetoamina-6-amina 1,3 diazonaftaleno) en *Drosophila melanogaster*. Previamente, se realizó la prueba de toxicidad CL<sub>50</sub> en las cepas flare y Oregon R(R)-flare de *D. melanogaster* con las concentraciones 1.97, 3.95, 7.9, 15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508  $\mu$ M del D-1, usando EtOH 2% como testigo disolvente, ; los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, pero sí entre las cepas. Para el bioensayo SMART en ala de *D. melanogaster* o prueba del ala, cruzas estándar, se utilizaron las concentraciones 2, 4, 8 y 16  $\mu$ M del D-1, EtOH 2% como testigo negativo y disolvente y la DMN a la concentración 76  $\mu$ M como testigo genotóxico positivo. Los resultados indicaron que el EtOH 2% no presentó efectos genotóxicos; como se esperaba, porque el DMN es un pro-cancerígeno y control positivo, este compuesto fue genotóxico; todas las concentraciones del D-1 no fueron genotóxicas. Por otro lado, el EtOH 2%, la DMN y las concentraciones 4, 8 y 16  $\mu$ M del D-1 alteraron la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* y la prueba de HPLC no mostró trazas del D-1 para los organismos tratados. Se concluye que a las concentraciones 4, 8 and 16  $\mu$ M el D-1 fue citotóxico, pero no

---

<sup>1</sup> Esta palabra y algunas otras se encuentra incluidas en el glosario (Anexo IX), teniendo como intención facilitar la lectura del presente trabajo.

fue genotóxico en ninguna de las concentraciones utilizadas; considerando los resultados del HPLC y de la CL<sub>50</sub>, se concluye que el D-1 debió haber sido metabolizado.

# ***INTRODUCCIÓN***

## ***Tripanosomiasis americana***

La tripanosomiasis americana es causada por el protista *Trypanosoma cruzi* (ciclo de vida vea Anexo I), esta enfermedad afecta alrededor de ocho millones de personas en todo el mundo y la mayoría de ellas se encuentra en zonas rurales de América Latina, donde la enfermedad es endémica (Carrada-Bravo, 2004; OMS, 2016). En los últimos años, el incremento de la migración poblacional alrededor del mundo ofreció un mayor riesgo de transmisión en zonas no endémicas (Días *et al.*, 2002), como es el caso de Estados Unidos, Canadá, Japón, Australia y países europeos, que han reportado un incremento en el porcentaje de personas infectadas (mapa de incidencia en Anexo II; Gascon *et al.*, 2009; Albajar-Viñas y Díaz, 2014; WHO, 2015).

En América Latina, se trasmite principalmente por triatóminos de la familia Reduviidae, comúnmente llamados chinches besuconas (OMS, 2016). Cuando el triatómino infectado pica al organismo (mamíferos) para alimentarse de su sangre, excreta heces con tripomastigotes metacíclicos (forma infectante del parásito), que entran a través de la herida provocada por la picadura y se esparcen por el torrente sanguíneo (Carrada-Bravo, 2004; Uribarren, 2013), pero también puede adquirirse por ingestión de alimentos o bebidas contaminadas (Yoshida *et al.*, 2011). En Europa, las principales fuentes de transmisión de esta enfermedad se dan a través de transfusiones de sangre, trasplante de órganos contaminados y por transmisión vertical (Carrada-Bravo, 2004; Gascon *et al.*, 2009; Uribarren, 2013; WHO, 2015).

La enfermedad presenta dos fases (aguda y crónica) y entre ellas hay un periodo donde no se presentan síntomas, que algunos llaman “crónico asintomático”; como su nombre lo indica, este periodo se caracteriza por la falta de síntomas y la desaparición de tripomastigotes metacíclicos en el torrente sanguíneo (Coura y Borgues-Pereira, 2010; Uribarren, 2013).

La fase aguda, se da entre los dos y cuatro meses posteriores al contagio, y a pesar de que durante este periodo los parásitos se encuentran circulando en gran cantidad por el torrente sanguíneo, en la mayoría de las personas la enfermedad suele ser asintomática o solo presenta alteraciones leves como el signo de romaña, fiebre, anorexia, náusea, vómito, diarrea, entre otros (Coura y Borgues-Pereira, 2010; Uribarren, 2013; Albajar-Viñas y Diaz, 2014).

La fase crónica, se presenta cinco años después de la infección, aunque en ocasiones puede tardar hasta 40 años en aparecer, debido a la formación de pseudoquistes denominados “nidios de amastigotes”, principalmente en el corazón que con el tiempo pueden llegar a provocar arritmias, insuficiencia cardiaca, aneurismas y embolias. También se encuentran en el tubo digestivo, causando pérdida de peso, ruptura de esófago, obstrucción intestinal, ulceración, y gastritis crónica, lo que deriva en megaesófago y megacolon chagásico (Coura y Borgues-Pereira, 2010; Uribarren, 2013; Albajar-Viñas y Diaz, 2014).

Esta enfermedad repercute en importantes pérdidas económicas para los países y las familias; por ejemplo, en Colombia el costo fue de \$267 millones de dólares para todos los pacientes registrados durante el 2008 (OMS, 2017); en México se estima una inversión de \$234 dólares por persona, si se trata en la fase aguda de la enfermedad, mientras que, si se detecta en la fase asintomática el costo asciende a \$11 558 dólares, el costo incluye días de incapacidad laboral, hospitalización, tratamiento, pruebas de laboratorio y seguimiento médico. Como se observa el monto puede cambiar dependiendo de la etapa en la que se detecte, siendo más favorable el tratamiento durante el estado agudo de la enfermedad (Lee *et al.*, 2013; Ramsey *et al.*, 2014).

### ***Tripanocidas***

Para combatir la tripanosomiasis se han sintetizado diferentes compuestos, basándose en las diferencias metabólicas entre el parásito y el humano. Mientras que el hombre tiene mecanismos eficientes para metabolizar las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), el tripanosoma carece de

enzimas como la catalasa y glutatión reductasa, y posee una baja actividad de superóxido dismutasa, que son claves en los procesos antioxidantes (Wilkinson y Kelly, 2003; Maya *et al.*, 2007).

Además, *T. cruzi* presenta enzimas que intervienen en la obtención de timina (esencial en el proceso de replicación y reparación del DNA) *vía de novo* diferentes a las de mamíferos como la Pteridin reductasa (PTR1), y la enzima bifuncional Dihidrofolato reductasa-Timidilato sintasa (DHFR-TS), esta última en mamíferos es monofuncional, es decir, por una parte, se encuentra la DHFR y por otra la TS (O'Neil *et al.*, 2003; Pérez-Brandan *et al.*, 2011). Por lo que se han desarrollado compuestos que generen ROS o que interfieran con la DHFR-TS (Carrada-Bravo, 2004; Maya *et al.*, 2007).

Los tripanocidas más utilizados son Nifurtimox® (NFX®; N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)1-1(5-nitro-2-furil; número de CAS 23256-30-6) de Bayer; el Benznidazol® (BNZ; N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamid; número de CAS 22994-85-0) sintetizado por Roche, quien posteriormente vendió los derechos, y el Metotrexato (MTX; 4-amino-4 deoxi-10-metilpteroil-L-ácido glutámico; número de CAS 50-05-2). Los primeros dos generan ROS, a través de la reducción de sus grupos nitro por la acción de nitroreductasas (Repetto *et al.*, 1996; Buschini *et al.*, 2009; Hall y Wilkinson, 2012), mientras que, el metotrexato genera metabolitos que pueden competir con el folato reducido causando inhibición enzimática de la DHFR-TS, esenciales para la síntesis de timina, ácidos nucleicos y proteínas (Genestier *et al.*, 2000; Raether y Hänel, 2003; Smith y Nelson, 2008. Revise el Anexo VIII para más información).

Hasta el momento, los compuestos utilizados como tripanocidas presentan mayor efectividad contra el parásito en la fase aguda de la enfermedad, y además tienden a provocar efectos secundarios tóxicos (anorexia, pérdida de peso, alteraciones físicas, falta de sueño, manifestaciones digestivas) y genotóxicos (recombinación, apoptosis, clastogénesis) (Kaneshima y Castro-Prado, 2005; Dadhania *et al.*, 2010; Buschini *et al.*, 2009). Por el contrario, en la fase crónica el tratamiento depende de la susceptibilidad del paciente a los efectos de los

fármacos, debido a que requieren ser administrados durante periodos prolongados por lo cual se plantea la necesidad de sintetizar nuevos tripanocidas (Rodríguez y de Castro, 2002; Maya *et al.*, 2003).

El desarrollo de nuevos medicamentos comienza con la investigación del mecanismo de acción y actividad biológica de diferentes compuestos (Hernández *et al.*, 2010), eligiéndose aquellos que presenten buenos resultados. Como ejemplo tenemos a las quinazolininas, compuestos heterocíclicos formados por un anillo de benceno y uno de pirimidina, que han mostrado varias propiedades biológicas, entre las que se encuentran, diuréticas, antiinflamatorias, anticancerígenas y tripanocidas (Connolly *et al.*, 2005; Mohamed, 2012; Xi, *et al.*, 2013).

Lo anterior es motivo por el cual, cada vez más investigadores se interesen en sintetizar compuestos a partir de esta estructura, como el Dr. Francisco Hernández Luis y sus colaboradores, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, quienes retomaron la investigación de Davoll y colaboradores (1972) y sintetizaron varios derivados de la estructura base 2,4,6-triaminquinazolina; uno de ellos es el D-1 (2,4-diacetoamina-6-amina 1,3 diazonaftaleno) (Figura 1) que se sintetizó para evaluarlo como posible tripanocida.

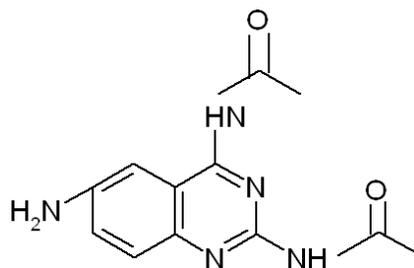


Fig. 1. Estructura del tripanocida D-1.

Los compuestos sintetizados a partir de la estructura 2,4,6-triaminquinazolina, presentan una mayor afinidad por la enzima DHFR de *T. cruzi* que por la de mamíferos, esta propiedad se debe a que la DHFR de *T. cruzi* presenta residuos más lipofílicos. En la región I la enzima del tripanosoma presenta aminoácidos aromáticos como Phe o Try, mientras que, la del humano contiene Asn que es un aminoácido polar y la vuelve más hidrofílica (Khabnadideh *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2015).

## ***Pruebas de mutagenicidad***

Actualmente, existen cerca de 140 millones de sustancias naturales y sintéticas registradas en la base de datos de *Chemical Abstracts Service*, número que aumenta continuamente. Algunas de ellas pueden presentar cierto grado de toxicidad, y daño genético; en células somáticas pueden ocasionar cáncer y en germinales afectar a la descendencia de los individuos (Rodríguez-Arnaiz, 1994). La toxicología es la encargada de estudiar las interacciones químicas y biológicas presentes entre los seres vivos y las sustancias a las que se encuentran expuestos, para conocer y comprender los efectos que éstas puedan provocar en el organismo. Con el tiempo la toxicología se ha dividido en ramas de acuerdo a lo que se quiera investigar, por ejemplo, se encuentran la toxicología clínica, la forense, la ambiental y la genética (OIT, 2012).

La toxicología genética, estudia la interacción de agentes físicos y químicos con el material genético, considerando cualquier cambio en el funcionamiento normal de la célula, y, por tanto, del organismo, como una respuesta tóxica a la exposición o consumo de sustancias (Peña *et al.*, 2001; Bello y López, 2001; Guachalla y Ascarrunz, 2003). Para evaluar el daño que puedan llegar a causar estos compuestos se utilizan diferentes pruebas, que pueden ser *in vivo* o *in vitro* (Hernández *et al.*, 2010) tales como la prueba de Ames, el intercambio de cromátides hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas, ensayo cometa y la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART, por sus siglas en inglés) (McCann y Ames, 1976; Ostling y Johanson, 1984; Fenech y Morley, 1985).

### ***SMART en ala de D. melanogaster***

La mosca de la fruta o *D. melanogaster*, es un organismo holometábolo muy utilizado en genética como modelo biológico, ya que presenta diferentes ventajas al compararla con otros modelos. Por ejemplo, debido a su pequeño tamaño, el espacio que se necesita en un laboratorio es pequeño; los costos para mantenerla

se reducen; las hembras ponen una gran cantidad de huevos que nos permiten realizar una mayor cantidad de réplicas experimentales, lo que asegura una representatividad estadística; ciclo de vida (Anexo III) corto, ayudando a realizar experimentos con mayor rapidez en comparación con otros modelos biológicos u otras pruebas en *D. melanogaster*; alrededor de 77% de secuencias de genes de enfermedades humanas presentan homología en *D. melanogaster* (Kaun *et al.*, 2012; Reiter *et al.*, 2001). Además, entre *Drosophila* y mamíferos, la identidad global de nucleótidos o aminoácidos es homóloga en aproximadamente 40%, sin embargo, para dominios funcionales puede ser de 80 a 90% (Pandey y Nichols, 2011).

SMART en ala de *D. melanogaster* es una prueba *in vivo*, que detecta cuatro tipos de daño genético: aneuploidía, recombinación, delección y mutación (Anexo IV), por la acción de agentes químicos y físicos. Se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas (Anexo V). El daño se expresa en las alas del adulto, como clones o manchas de células mutantes (se observan como cerdas múltiples o mal formadas en comparación con el fenotipo silvestre o normal (Graf *et al.*, 1984).

Las manchas pueden ser simples o gemelas, en el primer caso, sólo se expresará un marcador (*mwh* o *flr<sup>3</sup>*), y dependiendo del número de células afectadas, la mancha será pequeña (1-2 células) o grande (3 o más células), en el segundo se encontrarán presentes ambos marcadores *mwh* y *flr<sup>3</sup>* (Graf *et al.*, 1984). En este bioensayo se utilizan tres cepas mutantes “multiple wing hairs”, “flare”, y “Oregon R(R)-flare”.

#### multiple wing hairs (*mwh/mwh*):

Presenta el marcador genético *mwh*, mutación recesiva homocigota viable, se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 3, 0.3 cM expresándose fenotípicamente como cerdas múltiples, en lugar de la única cerda como en la condición silvestre del ala (Graf *et al.*, 1984).

🐛 flare (*flr<sup>3</sup>*):

Es un marcador genético recesivo, letal en homocigosis y se encuentra localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3, 38.8 cM. Su expresión fenotípica es de cerdas malformados o cortos, con apariencia de roseta de maíz. Para evitar la letalidad del marcador, esta cepa, posee el balanceador TM3 (*In(3LR)TM3* (inversión (3 *Left, Right*) *Third Multiple 3*) con tres inversiones (dos pericéntricas y una paracéntrica), que reduce la posibilidad de obtener recombinación entre los cromosomas manteniendo intacto el gen mutante de interés. Para reconocer fenotípicamente la presencia del marcador *flr<sup>3</sup>*, esta cepa también porta el gen dominante *Bd<sup>S</sup>* (*Beaded-Serratia*), que se expresa como muescas en el borde de las alas (Graf *et al.*, 1984).

🐛 Oregon R(R)-flare<sup>3</sup>(ORR (1); ORR (2); *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*):

Presenta las mismas características que la cepa flare, pero además posee los cromosomas 1 y 2 de la cepa mutante Oregon resistente a insecticidas. El cromosoma 2, tiene la mutación dominante *Rst (2) DDT/Cyp6g1* (48E7-48E7) que provoca la expresión de una proteína inductora de los genes Cyp450: *Cyp6a8* y *Cyp6a9* en 2R (51D1-51D1) y *Cyp6a2* en 2R (42D1-42D1) (FlyBase, 21/04/17) lo cual hace que tenga cantidades altas de algunos Cyp450s (Frölich y Würzler, 1989); la mutación le confiere resistencia al DDT, insecticidas organofosforados e incremento general en el metabolismo xenobiótico (Graf y Van Schaik, 1992; Saner *et al.*, 1996).

Con estas cepas se realizaron dos cruza, la estándar (hembras vírgenes flare y machos mwh) que posee niveles regulados de Cyp450s, y la de bioactivación elevada (hembras vírgenes Oregon R(R)-flare y machos mwh) con niveles altos de Cyp450, la comparación de estas dos cepas permite el estudio de compuestos promutágenos (Graf y Van Schaik, 1992).

## ***Metabolismo xenobiótico***

El término “xenobiótico” se utiliza para definir cualquier sustancia ajena al organismo, ya sea natural o sintética, la mayoría son de naturaleza lipofílica, lo que dificulta su eliminación, pero les permite entrar al interior celular, interactuar con moléculas e interferir en su funcionamiento. Por lo cual, necesitan ser transformados a compuestos más hidrosolubles para ser excretados y facilitar su eliminación, proceso que se conoce como metabolismo xenobiótico o biotransformación y comprende tres fases (Coutiño *et al.*, 2010; Chang-Hwei, 2012) descritas a continuación:

### Fase I

En la Fase I del metabolismo xenobiótico se incorporan grupos funcionales (-OH, -COOH, -SH, -O- o -NH<sub>2</sub>) mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, lo que provoca que los xenobióticos sean reconocidos por las enzimas que intervienen en la Fase II, además frecuentemente se aumenta su polaridad. Algunas de las enzimas encargadas de llevar a cabo estos procesos son carboxilesterasas, peroxidadasas, alcohol deshidrogenasa, nitrorreductasas, flavin monooxigenasas y citocromos P450 (Chang-Hwei, 2012; Chhabra, 1979).

Los citocromos P450 (CYP450s) se encuentran entre las enzimas de mayor importancia, debido a que se encargan de metabolizar una gran cantidad de xenobióticos (familias 1-3), además, se involucran en el metabolismo de compuestos endógenos como vitaminas, hormonas y ácidos biliares. Comprenden una superfamilia de hemoproteínas (formadas por complejos hierro-porfirina) presente en la mayoría de los organismos (Chung *et al.*, 2009; Coutiño *et al.*, 2010; Rodríguez y Rodeiro, 2014).

Los CYP450s pueden encontrarse en todas las células, sin embargo, en el caso del humano se localizan principalmente en el hígado y sistema digestivo, y en menor cantidad en el riñón y pulmones. Además, los genes de estas enzimas presentan polimorfismos genéticos, que ocasionan variaciones en el grado de

expresión de una persona a otra (Pitarque *et al.*, 2004). La mayoría de los xenobióticos que pasan por esta fase se vuelven más polares, posteriormente en la Fase II son conjugados y finalmente en la Fase III eliminados; sin embargo, algunos compuestos son denominados promutágenos, debido a que al pasar por la fase I del metabolismo xenobiótico son activados transformándose en compuestos con capacidad genotóxica (Ioannies, 2001; Coutiño *et al.*, 2010).

## Fase II

También es conocida como fase de conjugación, en ella, los compuestos provenientes de la Fase I se adhieren a moléculas altamente hidrosolubles lo que facilita que sean eliminados. En caso de que los xenobióticos ya contaran con grupos funcionales, podrían pasar directamente a la Fase II del metabolismo (Ioannies, 2001). Las reacciones en esta fase las realizan principalmente enzimas como la glutatión-S-transferasa, uridina difosfato glucuronosiltransferasa, sulfotransferasas, N-acetiltransferasas y metiltransferasas (Brunton *et al.*, 2007; Rodríguez y Rodeiro, 2014) provocando lo siguiente:

**Glucuronidación:** Reacción catalizada por UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) que adiciona un ácido glucurónico.

**Sulfatación:** Llevada a cabo por sulfotransferasas, enzimas que metabolizan compuestos endógenos y exógenos mediante la adición de un sulfato.

**Glutathionización:** La glutatión-S-transferasa es la responsable de esta reacción, que agrega un glutatión (tripéptido de cisteína, glutamato y glicina).

**N-acetilación:** Realizada por N-acetiltransferasas, adicionando un grupo acetilo.

**Metilación:** La metiltransferasa es la responsable y añade un grupo metilo.

## ***N-nitrosodimetilamina***

Los nitratos están presentes en diferentes compuestos y se reducen a nitritos, que pueden interactuar fácilmente con aminas y amidas, formando compuestos *N*-nitrosos, ya sea, nitrosaminas o nitrosamidas. Se sabe que éstos son agentes teratogénicos, mutagénicos y cancerígenos (Astiasarán *et al.*, 2003; Calvo y Mendoza, 2012; Repetto, 1995); están presentes en el tabaco, la cerveza, algunos alimentos (como la carne, principalmente si está curada, pescado, productos de soya, etc.), productos de hule, pesticidas, entre otros (ATSDR, 1989). La mayoría de los compuestos *N*-nitrosos son metabolizados en el hígado, por enzimas dependientes de los CYP450s (Carmeán y Reppeto, 2006).

La *N*-nitrosodimetilamina (DMN, por sus siglas en inglés) comenzó a utilizarse en la fabricación de combustible para cohetes, pero al hallar grandes cantidades en el agua, suelo y aire cercanos a las plantas de producción, su uso se discontinuó (ATSDR, 1989). Se ha demostrado que la DMN puede causar necrosis de hígado, y producir cáncer de hígado y pulmón en animales (ATSDR, 1989), hemorragias intestinales, daño al riñón (Calvo y Mendoza, 2012), y es un agente genotóxico (Magge y Barnes, 1956).

La DMN es un agente metilante, que se metaboliza a través de los CYP450s; en una primera fase se genera un radical libre y se forma *N*-hidroximetilnitrosamina, que se reordena (presenta un cambio en el arreglo de sus enlaces), y forma una monometilnitrosamina, posteriormente se produce el ión metildiazohidróxido, el ión metil diazonio y el metil carbonio. Este último, es altamente reactivo con los ácidos nucleicos. La mayoría de las metilaciones al DNA ocurren en el N7 de la guanina, aunque, también se dan en el O<sup>6</sup> y N3 de la guanina, y en el N1 y N7 de la adenina (Carmeán y Reppeto, 2006).

## ***ANTECEDENTES***

### ***Tripanocidas con efecto tóxico y genotóxico***

<b>Autor y año</b>	<b>Estudio</b>	<b>Resultados</b>
Buschini <i>et al.</i> , 2009.	Evaluaron la genotoxicidad y citotoxicidad de BNZ, NFX y MTX, en la prueba de <i>Salmonella</i> , el ensayo cometa y micronúcleos.	BNZ provoca daño por estrés oxidante.
		NFX Induce oxidación en las bases del DNA, aumenta la frecuencia de micronúcleos y provoca daño citotóxico
		MTX sólo aumenta la frecuencia de colonias revertantes en dosis altas.

## *Derivados de la quinazolina con efectos tóxicos*

Autor y año	Estudio	Resultados
Berest <i>et al.</i> , 2011.	Investigaron las propiedades citotóxicas en <i>Photobacterium leiognathi</i> , y antitumorales en 60 líneas cancerígenas, de 24 derivados del N-cicloalkil-(cicloalkilaril)-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2.3-c]quinazolin-6-yl)tio]acetamidas.	Ocho derivados mostraron citotoxicidad en tratamientos crónicos.  Cinco tuvieron efecto de hormesis en concentración crónica.
Moreno <i>et al.</i> , 2012	Valoraron la actividad biológica de 35 derivados de 2-tio-,2-seleno-4-amino,2,4-diseleno quinazolina y pirido[2,3-d] pirimidinas	Tres compuestos mostraron efecto citostático.  En dos se presentan efectos citotóxicos.
Spanò <i>et al.</i> , 2014.	Reportan la síntesis y las propiedades antitumorales de derivados de pirrolo[3,4-h]quinazolinas	Cinco derivados presentaron efectos citotóxicos.
Khoza <i>et al.</i> , 2015.	Sintetizaron y evaluaron la citotoxicidad de 22 derivados del imidazo[1,2-c]quinazolinas, sobre líneas de cáncer (MCF-7 y HeLa)	Variaciones en el grado de toxicidad.
Santos-Cruz, 2016.	Evaluó la genotoxicidad de N6-[4-(metoxibencil) quinazolina-2,4,6-triamina) (GHPM) y N6-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina-2,4,6-triamina (GHPMF) en <i>Drosophila melanogaster</i>	Ambos tripanocidas presentaron efectos subtóxicos.
Dadhania <i>et al.</i> , 2010.	Investigaron los efectos protectores del ácido $\alpha$ -lipoico en ratas previamente tratadas con MTX.	El MTX inhibe la DHFR e induce toxicidad intestinal.

<p>Jantová <i>et al.</i>, 2004.</p>	<p>Estudiaron los efectos genotóxicos del 9-bromo-5-morpholono-tetrazol[1,5-c]quinazolina (BMTQ) en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>, con y sin activación metabólica, y los efectos citotóxicos de nueve derivados del tetrazol[1,5-c]quinazolinas sobre células B16.</p>	<p>Los compuestos 2 (9-bromo-5-morfolino-tetrazol[1,5-c]quinazolina) y 3 (9-cloro-5morfolino-tetrazol[1,5-c]quinazolina) presentaron los efectos citotóxicos más altos.</p>
-------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## *Derivados de quinazolina con efecto genotóxico*

Autor y año	Estudio	Resultados
Jantová <i>et al.</i> , 2004.	Estudiaron los efectos genotóxicos del 9-bromo-5-morpholono-tetrazol[1,5-c]quinazolina (BMTQ) en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> , con y sin activación metabólica, y los efectos citotóxicos de nueve derivados del tetrazol[1,5-c]quinazolinas sobre células B16.	El BMTQ es mutagénico.
Şekeroğlu y Şekeroğlu, 2012.	Valoraron los efectos de un extracto de <i>Viscum álbum</i> y quercetina sobre la citotoxicidad y genotoxicidad causada por MTX.	MTX incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos.
Santos-Cruz, 2016	Evaluó la genotoxicidad de GHPM y GHPMF en <i>Drosophila melanogaster</i>	El GHPM presentó efectos genotóxicos.

***Derivados de quinazolina que no presentan efectos tóxicos***

Autor y año	Estudio	Resultados
Doppalapudi <i>et al.</i> , 2012.	Evaluaron el potencial genotóxico del CP-31398 (N-{2-[2-(4-metoxifenil)vinilo]-quinazolina-4-il}-N,N-dimetil-propano-1,3-diamina), en la prueba de Ames, aberraciones cromosómicas en células de hámster chino y micronúcleos.	No se encontraron efectos en ninguna de las pruebas utilizadas.
Sinha <i>et al.</i> , 2013.	Evaluaron la actividad citotóxica de algunos derivados de 2-(3,5-diaril-4,5-dihidro-1H-prazil-1-il)quinazolin-4ona	Los derivados no presentaron toxicidad.
Mendoza-Martínez <i>et al.</i> , 2015.	Estudiaron el efecto tóxico de nueve compuestos derivados de quinazolin-2,3,6-triamina sobre células Vero.	Ningún compuesto presentó toxicidad a las concentraciones utilizadas.

## ***JUSTIFICACIÓN***

En ocasiones los medicamentos para tratar enfermedades provocan efectos adversos a la salud, como ejemplo tenemos al NFX, BNZ y MTX que llegan a presentar efectos tóxicos y genotóxicos (Buschini *et al.*, 2009; Dadhania *et al.*, 2010), sin embargo, se siguen utilizando para tratar el Mal de Chagas (WHO, 2015) que como se ha mencionado antes es una enfermedad parasitaria causada por el protista *Trypanosoma cruzi*, es endémica de América Latina, pero en los últimos años se ha extendido a regiones como Canadá, Japón, Australia y varios países europeos (Días *et al.*, 2002; WHO 2015). Aumentando el interés en sintetizar tripanocidas con mejores resultados, entre los compuestos que se han desarrollado, los derivados de la quinazolina representan una buena opción debido a sus propiedades biológicas (Connolly *et al.*, 2005; Mohamed, 2012; Xi *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario comprobar que no causen efectos adversos con pruebas de toxicidad y genotoxicidad, por lo cual, en el presente trabajo se evaluó el tripanocida D-1 con el modelo *D. melanogaster*.

## ***HIPÓTESIS***

En vista de que los compuestos derivados de la estructura 2,4,6-triaminquinazolina inhiben la enzima dihidrofolato reductasa, y éstos han mostrado una mayor afinidad por la enzima bifuncional de *T. cruzi* (*dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa*) que por la monofuncional (dihidrofolato reductasa, presente en mamíferos y en *D. melanogaster*), se esperaría que el D-1 no presente daño tóxico, ni genotóxico en las pruebas CL<sub>50</sub> y SMART.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

- 🐛 Evaluar el efecto tóxico y genotóxico del tripanocida D-1 en las pruebas CL<sub>50</sub> y SMART en ala de *D. melanogaster*, craza estándar.

### ***Objetivos particulares***

- 🐛 Determinar la toxicidad de D-1 en las cepas flare y Oregon R(R)-flare de *D. melanogaster* con la prueba CL<sub>50</sub>.
- 🐛 Determinar la genotoxicidad de D-1 mediante SMART en ala de *D. melanogaster* craza estándar.
- 🐛 Confirmar la eliminación del D-1 en las cepas flare y Oregon R(R)-flare mediante HPLC.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

- ✦ D-1, donado por el Dr. Francisco Hernández Luis del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.
- ✦ EtOH (CAS: 64-17-5) grado HPLC (Fermont® Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México).
- ✦ N-nitrosodimetilnitrosamina (CAS: 62-75-9) 76 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, Misuri, EUA).
- ✦ Solución conservadora (5 mL de Tegosept (CAS: 94-13-3; obtenido de Farmacia Paris, México) en 100 mL de EtOH al 12% y 5 mL de ácido propiónico (CAS: 79-09-4; adquirido de Química Meyer, México): ácido ortofosfórico (1:1; de JT Baker, México) aforados a 1L de agua).
- ✦ Entellan® (CAS: 109223-77-0; Marca Merck®, Darmstadt, Germany).
- ✦ Extran® (CAS: 68411-30-3).
- ✦ MetOH grado HPLC (CAS: 67-56-1; de JT Baker, México).
- ✦ Ácido fosfórico grado HPLC (CAS: 7664-38-2; de JT Baker, México).
- ✦ Acetonitrilo grado HPLC (CAS: 75-05-8; de JT Baker, México).
- ✦ Hojuelas de papa Maggi® (Walmart, México).
- ✦ Medio instantáneo Carolina (MIC; obtenido de Carolina Biological Supply Company, Burlington North, EUA).
- ✦ Cepas de *D. melanogaster* flare, Oregon R(R)-flare y multiple wing hairs, 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, mantenidas y propagadas en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM.

## ***Cultivo y propagación de D. melanogaster***

El cultivo y propagación de las cepas flare y Oregon R(R)-flare se llevó a cabo en frascos de 250 mL, con 5 g de hojuelas de papa Maggi® hidratada con 20 mL de solución conservadora, en una incubadora a 25 °C y 60 % de humedad relativa (HR) en total oscuridad. Al tener la cantidad adecuada de organismos se prosiguió a la sincronización de edades (con el propósito de que las hembras ovopositaran la mayor cantidad de huevos posibles), para ello, se pasaron a frascos con medio nuevo por tres días dejando que ovopositaran, posteriormente se retiraron los organismos adultos, dejándose únicamente a las larvas, para finalizar con el transvase de imagos a frascos con medio nuevo.

### ***Prueba de toxicidad $CL_{50}$ .***



Figura 2. Frascos con levadura donde se realizó la colecta.

Para la prueba de toxicidad, primero se realizó la colecta de huevos de las cepas flare y Oregon R(R)-flare, colocando a los adultos en un medio de levadura fresca (Figura 2), activada con sacarosa, durante 8 h, en una incubadora con las condiciones antes mencionadas. Al cabo de tres días se recuperaron larvas de tercer estadio ( $72 \pm 4$  h de edad), diluyendo la levadura con agua corriente y pasándola por una coladera de malla fina, posteriormente se colocaron 10 larvas en cada tubo de ensayo con 0.5 g de MIC y 2 mL de cada tratamiento. Como disolvente se usó EtOH al 2%, y el D-1 a las concentraciones de 1.97, 3.95, 7.9, 15.8, 31.75, 63.5, 127, 254 y 508  $\mu$ M. Las concentraciones se determinaron con base en el trabajo de Olvera-Romero (2014) y al grado de disolución del D-1 en EtOH 2%. Se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración. Los organismos recuperados se cuantificaron para el análisis de resultados.

## ***Análisis estadístico***

Se realizó un ANOVA factorial con el programa miniTab vs. 6 teniendo un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , mediante esta prueba se puede valorar el efecto de diferentes factores sobre una variable, y se debe determinar si se presentan o no interacciones entre ambos factores. Dicho lo anterior se tienen las siguientes hipótesis para este experimento:

- 1) Hipótesis nula ( $H_0$ ): no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Hipótesis alternativa ( $H_a$ ): al menos uno de los tratamientos presenta diferencias significativas.

- 2)  $H_0$ : no hay diferencias significativas entre las cepas.

$H_a$ : sí hay diferencias significativas entre las cepas.

- 3)  $H_0$ : no existe interacción entre los tratamientos y las cepas.

$H_a$ : sí existe interacción entre los tratamientos y las cepas.

## ***SMART***

Para realizar la Cruza Estándar (CE) se propagaron las cepas flare y multiple wing hairs en una incubadora a 25 °C y 60 % de HR, siguiendo con la sincronización de frascos. Posteriormente se aislaron ~500 hembras vírgenes de la cepa flare y se cruzaron con ~300 machos de la cepa multiple wing hairs, en frascos con 5 g de hojuelas de papa Maggi® hidratado con 20 mL de solución conservadora. La craza se dejó en el medio de cultivo durante tres días para asegurar el apareamiento. Posteriormente se realizó la colecta de huevos como se describe en párrafos anteriores, finalmente se colocó una cantidad aproximadamente igual de larvas en tubos de ensayo con 0.5 g de MIC y 2 mL de los tratamientos. El D-1 se utilizó a las concentraciones 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  disueltas en EtOH 2%. Las concentraciones

fueron determinadas a partir del trabajo de Olvera-Romero (2014), DMN a 76  $\mu\text{M}$  como testigo positivo, EtOH 2% como testigo disolvente y agua como testigo negativo, realizándose tres experimentos independientes con tres repeticiones por concentración. Al emerger, los imagos se recuperaron y se almacenaron en EtOH al 70 %, posteriormente se montaron las alas en laminillas permanentes (Figura 3) con Entellan® y se revisaron a doble ciego y a 40X, registrándose el número y el tipo de mancha o clones de células mutantes (Graf *et al.*, 1984).

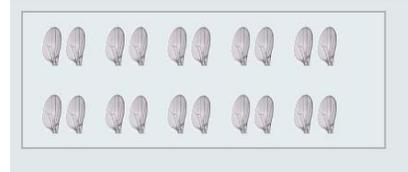


Figura 3. Preparación permanente de alas

### ***Análisis estadístico***

Se analizaron los datos con el programa estadístico SMART (basado en la prueba Kastenbaum-Bowman) no publicado (Frei y Würzler, 1988), que analiza estadísticamente las posibles diferencias entre los datos del testigo y los de los tratamientos, fundamentándose en la prueba de ji cuadrada para proporciones con una probabilidad de  $p < 0.05$ ; para el diagnóstico del efecto genotóxico con este programa se utiliza un factor de multiplicación, siendo  $m = 2$  para manchas pequeñas y totales por ser más comunes, y para manchas grandes y gemelas  $m = 5$  por ser menos frecuentes. Las hipótesis para decidir en la prueba son:

Ho: La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los organismos tratados, no es mayor que la frecuencia de mutación de los organismos no tratados.

Ha: La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los organismos tratados es mayor que la frecuencia de mutación de los organismos no tratados.

Teniendo cuatro posibles resultados:

- 🐝 Positivo (+): cuando se acepta Ha y se rechaza Ho
- 🐝 Negativo (-): cuando se acepta Ho y se rechaza Ha

🐞 Débil (w): cuando se rechazan ambas hipótesis

🐞 No concluyente (i): cuando se aceptan ambas hipótesis

Los resultados débiles y no concluyentes se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon (Frei y Würzler, 1995), que no requiere de una distribución normal de los datos (prueba no paramétrica) con modificación para dos colas  $p < 0.05$  y que considera la variabilidad entre los organismos, con el programa estadístico STAT GRAFICS versión 6.0 para PC.

Para analizar la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, es una prueba no paramétrica que mide el grado de concordancia existente entre dos distribuciones, comparando sus respectivas frecuencias acumuladas. Se presentan diferencias significativas entre las distribuciones al tener una  $p < 0.05$ , lo que nos indica que la división celular de los discos imaginales del ala de un tratamiento presentó alteraciones respecto a la del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984).

### ***Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)***

Esta prueba se realizó para confirmar que el D-1 no se hubiera acumulado en el organismo. Se utilizaron las cepas flare y Oregon R(R)-flare, que fueron propagadas hasta obtener larvas de  $72 \pm 4$  h de edad; posteriormente, se colocó una cantidad similar de larvas en tubos de ensayo con 0.5 g de MIC y 2 mL de los tratamientos EtOH 2% y D-1 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  (concentraciones utilizadas en la prueba SMART). Las larvas tratadas se mantuvieron en una incubadora a 25 °C y 60 % de HR hasta que emergieron como imagos, éstos se recuperaron en EtOH al 70 %, después se homogenizaron por separado 150 organismos de cada tratamiento, se colocaron en tubos Eppendorf con 500  $\mu\text{L}$  de MeOH grado HPLC, y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 min. Posteriormente se inyectaron volúmenes de 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada tratamiento y cepa, y de la solución estándar [D-1 disuelto en MeOH (1:9)] a una columna Allsphere ODS-1 de la marca Grace, con una longitud de 250 mm, un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y un

diámetro interno de 4.6 mm, con un detector de arreglo de diodos con barrido de 200-400 nm. La fase móvil estuvo compuesta por 50 % de MeOH, 25 % de acetonitrilo y 25 % de ácido fosfórico al 0.05 %, con un tiempo de corrida de 15 min y un flujo de 1.5 mL/min a una temperatura de 23 °C. Los resultados se obtuvieron con el software OPEN LAB CDS, Chemstation Edition versión C.01.05 [35], marca Agilent Technologies.

## ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

### ***Prueba de toxicidad CL<sub>50</sub>.***

El tripanocida D-1 fue subtóxico para la cepa flare, mostrando el porcentaje de mortalidad más alto a las concentraciones 1.9, 31.7, 63.5 y 127  $\mu\text{M}$ , con 25.33, 21.33, 23.33 y 22 %, respectivamente. Los resultados son similares a los reportados por Berest y colaboradores, quienes, en el 2011, sintetizaron y probaron la toxicidad de 14 derivados de quinazolina, en *Photobacterium legiognathi* cepa Sh1, de los cuales, cinco presentaron una toxicidad menor a 25% en todas las concentraciones. También Santos-Cruz, en el 2016, evaluó la toxicidad de dos derivados de la quinazolina en las cepas flare y Oregon R(R)-flare de *D. melanogaster*, reportando efectos subtóxicos similares para ambas cepas.

En el caso de la cepa Oregon R(R)-flare, que tiene niveles elevados de Cyp450s, tampoco se llegó a la CL<sub>50</sub>, presentó una mortalidad < CL<sub>20</sub> para todas las concentraciones, lo que concuerda con lo obtenido por Mendoza-Martínez y colaboradores, en el 2015, quienes sintetizaron y probaron la toxicidad de nueve derivados de la quinazolina sobre células Vero, sin encontrar un marcado efecto tóxico. También concuerda con lo reportado por Olvera-Romero, en el 2014, quien probó la toxicidad del GHPMF (compuesto derivado de la estructura 2,4,6-triaminquinazolina, con un grupo bencil en el N<sup>6</sup> que está unido a un trifluorometoxi), sin encontrar efectos tóxicos en la cepa Oregon R(R)-flare de *D. melanogaster*.

El tripanocida D-1 presentó una toxicidad menor a 25 %, sugiriendo que su estructura no provoca efectos tóxicos a las concentraciones probadas, ya que, al compararlo con otros derivados de la quinazolina como el BTQM y dos de sus derivados, podemos observar que estos últimos presentan un efecto citotóxico sobre células B16 y HeLa (Jantová *et al.*, 2004), y cinco derivados del N-cicloalkil-(cicloalkilaril)-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazinol [2,3-c]quinazolina-6-yl)tio]acetamida que presentaron toxicidad en la cepa Sh1 de *Photobacterium legiognathi* (Berest *et al.*, 2011).

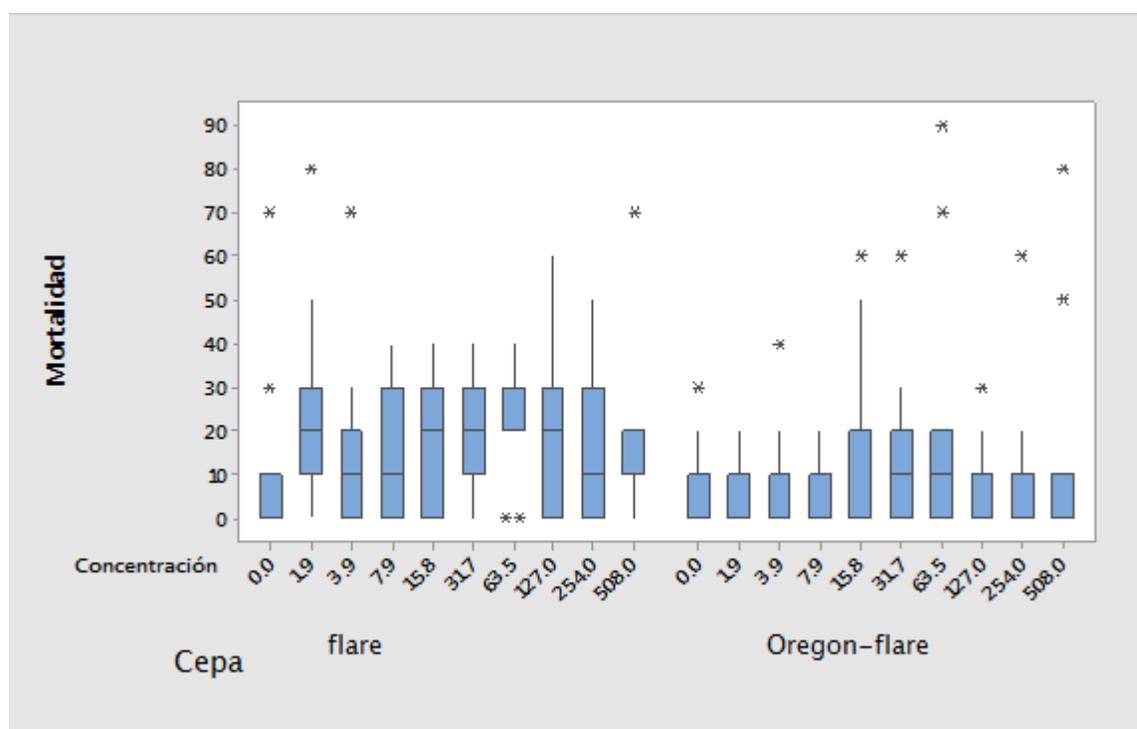


Fig. 4. Porcentaje de mortalidad de las cepas flare y Oregon-flare de *D. melanogaster* tratadas con D-1. Las cajas representan el 50% de los datos analizados con la mediana representada por la raya horizontal y con los valores mínimos y máximos en los extremos, representados como líneas verticales; los asteriscos muestran los datos fuera del rango.

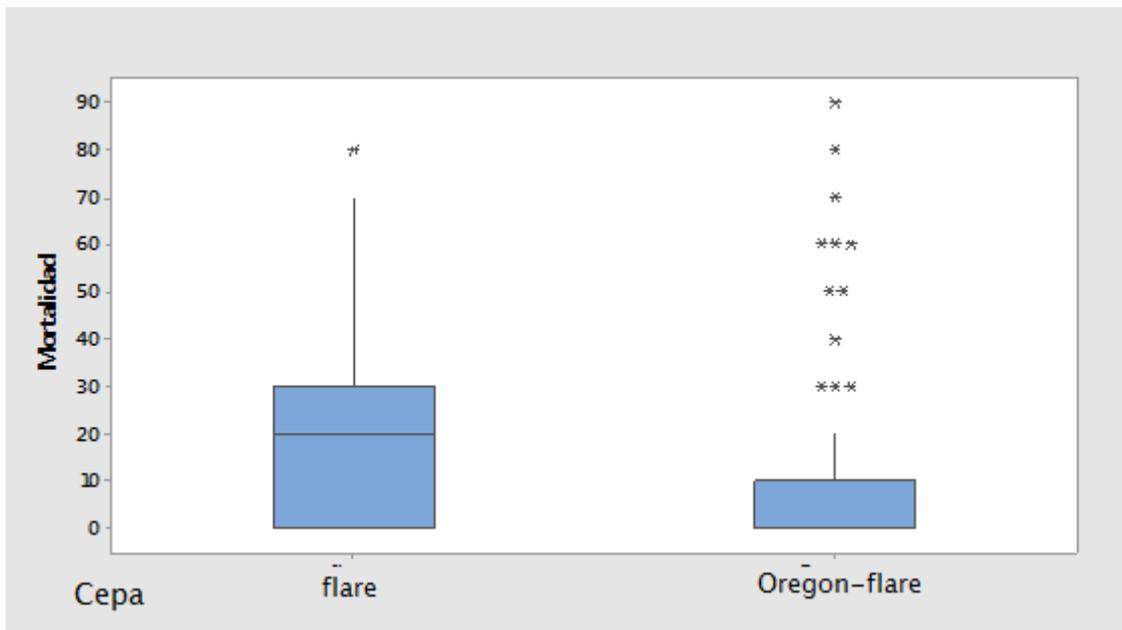


Fig. 5. Porcentaje de mortalidad en las cepas flare y Oregon R(R)-flare tratadas con D-1. Las cajas representan el 50 % de los datos analizados, con los valores mínimos y máximos en los extremos, los asteriscos muestran datos fuera del rango.

La Figura 4 representa los datos obtenidos por el ANOVA, el análisis indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo disolvente EtOH 2% (con  $p = 0.064$ ), tampoco muestra diferencias significativas entre las interacciones concentración-cepa al compararlas entre sí (con  $p = 0.715$ ). En la Figura 5 se representan los datos de la comparación de ambas cepas mediante el ANOVA, el análisis indicó diferencias significativas entre las cepas con un valor de  $p = 0.0$ . Lo que concuerda con lo obtenido por Santos-Cruz (2016), quien reportó diferencias de toxicidad entre las cepas flare y Oregon R(R)-flare, para otros dos derivados de la quinazolina (GHPM y GHPMF). Las diferencias de toxicidad presentes en las cepas indican que posiblemente los Cyp450s intervengan en el metabolismo del tripanocida.

## ***SMART***

Los datos obtenidos de la lectura de alas de la CE, fueron analizados mediante las herramientas estadísticas descritas en materiales y métodos. Hay que considerar que las manchas no aparecen únicamente como consecuencia del compuesto probado, sino que también pueden aparecer de forma espontánea, por lo cual, las generadas en el grupo testigo negativo (agua), se utilizan como referencia de las alteraciones en el desarrollo que pueden aparecer espontáneamente, y que, son tomadas como referencia para el factor de multiplicación en el caso de SMART que originalmente se obtuvo irradiando con rayos X (Graf *et al.*, 1984 y comunicación personal).

Al comparar los resultados de EtOH 2% con los del testigo agua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla I y Figura 6), por lo que este disolvente no se considera genotóxico a esta concentración, pero alteró la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* (Tabla II). Resultado que puede explicarse, al considerar que *D. melanogaster* presenta enzimas (alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa) que le proporcionan mayor capacidad para metabolizar EtOH, e incluso pueden llegar a utilizarlo como fuente de energía (Fry, 2014; Guarnieri y Heberlein, 2003). Sin embargo, un porcentaje pequeño puede transformarse a aldehído, y provocar alteraciones en la división celular que se reflejan en la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh*.

Por el contrario, y como se esperaba, la DMN resultó ser genotóxica al presentar diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo, en los tres tipos de manchas (Tabla I y Figura 6), éste es un compuesto promutágeno, es decir, que al pasar por el metabolismo xenobiótico forma metabolitos que tienen una alta afinidad por los ácidos nucleicos y llegan a formar aductos (Carmeán y Reppeto, 2006; Graf *et al.*, 1984). Además, la DMN presentó diferencias significativas en la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* (Tabla II), lo cual era esperado, debido a que se ha reportado que la DMN altera la división celular (Graf *et al.*, 1984; Castañeda-Partida *et al.*, 2011)

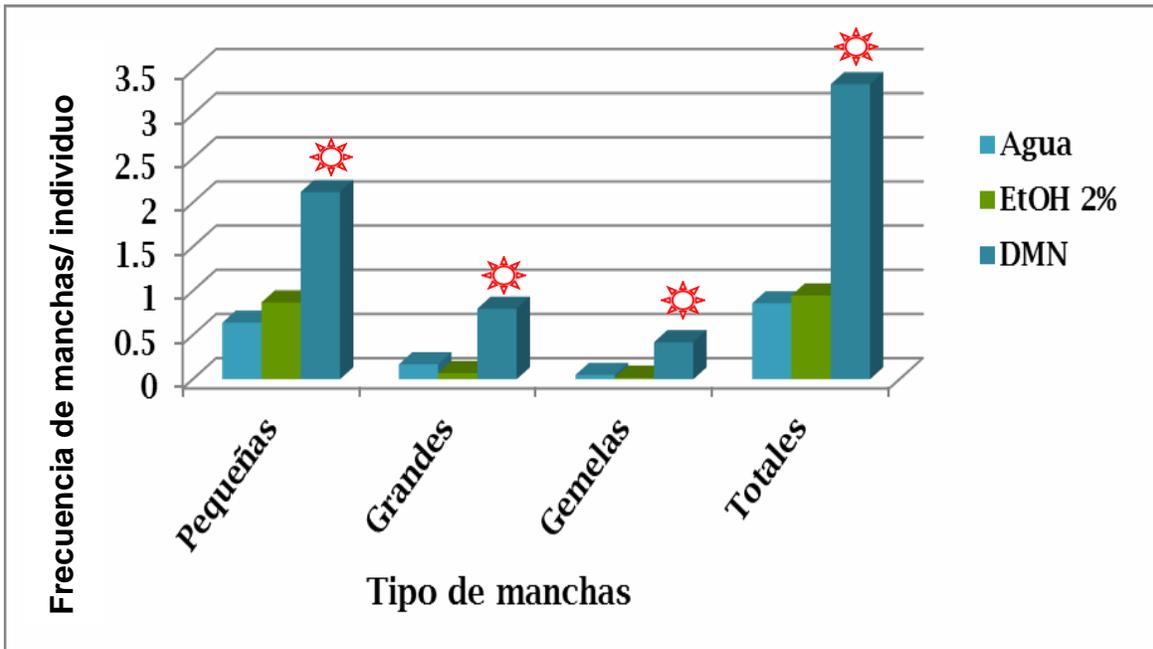


Figura 6. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas / individuo, del testigo agua y los testigos EtOH 2% y DMN 76  $\mu$ M. Las  representan diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0.05$ .

Tabla I. Resultados obtenidos del programa SMART, para los testigos agua, disolvente (EtOH 2%) y positivo (DMN 76  $\mu$ M), donde, m = factor de multiplicación; + = resultado positivo; - = resultado negativo.

Tratamiento	N° de organismos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Manchas gemelas m=2	Manchas totales m=2	Manchas con clon <i>mwh</i>
Agua	59	0.64 (38)	0.17 (10)	0.05 (3)	0.86 (51)	51
EtOH 2%	60	0.87 (52) -	0.07 (4)-	0.02 (1)-	0.95 (57)-	55
DMN	59	2.12 (125) +	0.80 (47)+	0.42 (25)+	3.34(197) +	184

Tabla II. Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* del testigo agua comparado con EtOH 2% y DMN 76  $\mu\text{M}$ . Las ☀ representan diferencias estadísticamente significativas obtenidas con Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.05$ .

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Nivel de significancia
Agua	42.85	7.01	
EtOH 2%	51	8.10	0.025 ☀
DMN	144.57	43.09	0.005 ☀

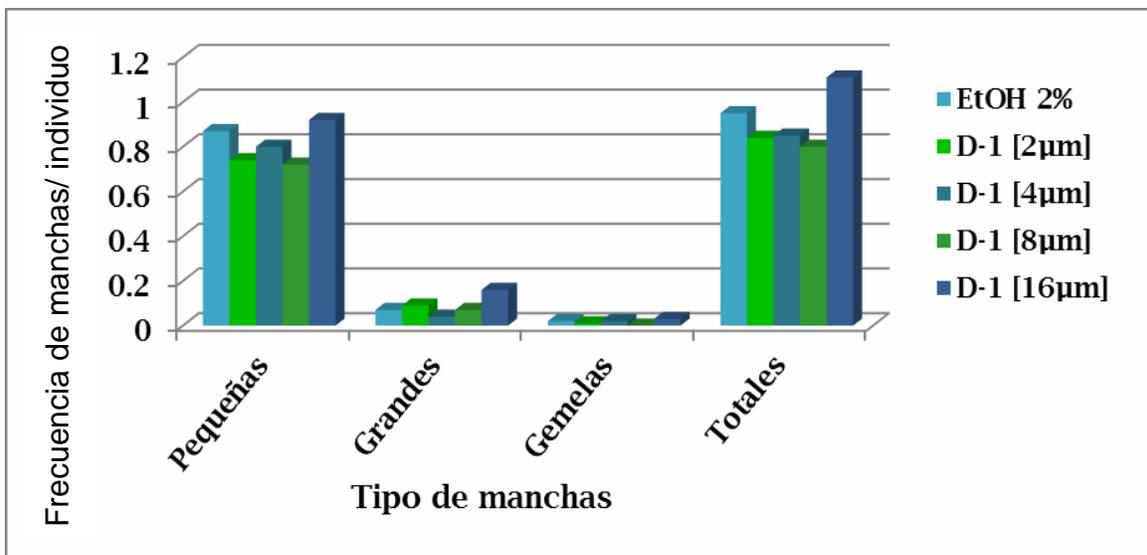


Figura 7. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/individuo para EtOH 2% y los tratamientos del D-1 a 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ .

Tabla III. Resultados obtenidos del programa SMART, para el testigo disolvente y los tratamientos del D1 [2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ ] del D-1, donde: m = factor de multiplicación; + = resultado positivo; - = resultado negativo; i = indeciso.

Tratamiento	N° de organismos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (>2 células) m=5	Manchas gemelas m=2	Manchas totales m=2	Manchas con clon <i>mwh</i>
EtOH 2%	60	0.87 (52)	0.07 (4)	0.02 (1)	0.95 (57)	55
D-1 [2] $\mu\text{M}$	68	0.74 (50)-	0.09 (6)i	0.01 (1)i	0.84 (57)-	57
D-1 [4] $\mu\text{M}$	55	0.80 (44)-	0.04 (2)-	0.02 (1)i	0.85 (47)-	47
D-1 [8] $\mu\text{M}$	54	0.72 (39)-	0.07 (4)-	0.00 (0)i	0.80 (43)-	43
D-1 [16] $\mu\text{M}$	61	0.92 (56)-	0.16 (10)i	0.03 (2)i	1.11 (68)-	68

Tabla IV. Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* del testigo agua comparado con los testigos EtOH 2% y D-1. Las  representan diferencias estadísticamente significativas obtenidas con Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.05$ .

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Nivel de significancia
EtOH 2%	52.5	7.04	
D-1 [2] $\mu\text{M}$	52.60	4.62	0.10
D-1 [4] $\mu\text{M}$	44.20	4.68	0.001 
D-1 [8] $\mu\text{M}$	40.50	4.24	0.001 
D-1 [16] $\mu\text{M}$	61.50	7.47	0.005 

Al comparar las concentraciones 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  del D-1 contra su testigo disolvente EtOH 2% (Tabla III y Figura 7), no se observaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que el tripanocida no es genotóxico. Resultado que concuerda con lo reportado por: Doppalapudi y colaboradores (2012), quienes no encontraron efectos genotóxicos al evaluar el CP-31398 (derivado de quinazolina), *in vitro* (en la prueba de Ames a concentraciones de 78.1 a 2500  $\mu\text{g/placa}$ , aberraciones cromosómicas en concentraciones de 1.95 a 5000  $\mu\text{g/ml}$  y micronúcleos en CHO a concentraciones de 50 a 2000  $\mu\text{g/kg}$ ), e *in vivo* (en ratones utilizándose concentraciones de 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/kg}$ ); Olvera-Romero (2014) evaluó los efectos genotóxicos del GHPMF a las concentraciones de 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  en *D. melanogaster* en la CE, sin encontrar efectos genotóxicos; Santos-Cruz (2016) estudio los efectos genotóxicos del GHPMF a las concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  en *D. melanogaster* (CE y BE), sin encontrar efectos genotóxicos.

La falta de genotoxicidad del D-1 podría deberse, a que los sustituyentes que posee en las posiciones 2 y 4 de la estructura 2,4,6-triaminquinazolina impiden que presente una baja afinidad por la DHFR de *D. melanogaster* (Senkovich *et al.*, 2009).

A pesar de que el D-1 no resultó genotóxico, sí alteró la división celular en los discos imaginales a las concentraciones 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  (ver Anexo VI) en la cruce estándar reflejándose en la alteración de la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* (Tabla IV). Şekeroğlu y Şekeroğlu (2011), reportaron algo similar para el MTX ya que alteraba el índice mitótico en células de médula ósea, Khoza y colaboradores (2015) encontraron efecto citotóxico en 22 derivados del imidazo[1,2-c]quinazolina sobre células MCF-7 y HELa; Moreno y colaboradores (2012) evaluaron 27 compuestos derivados del 2,4-diseleno quinazolina, encontrando efecto citotóxico en dos de ellos y citostático en tres.

## *Cromatografía de líquidos de alta presión*

Los resultados obtenidos con la HPLC para la cepa flare (Figura 8) muestran el pico de retención de la solución estándar del D-1 en el minuto 9.6 (línea azul), las concentraciones de 8 y 16  $\mu\text{M}$  del D-1, y de EtOH 2 %, muestran un comportamiento similar, sin embargo, al comparar sus respectivos espectros UV (Ver anexo VII), se descartó la presencia del tripanocida en los organismos de los tratamientos mencionados. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos con los adultos de la cepa Oregon R(R)-flare, en este caso, no se presentaron picos similares al de la solución estándar.

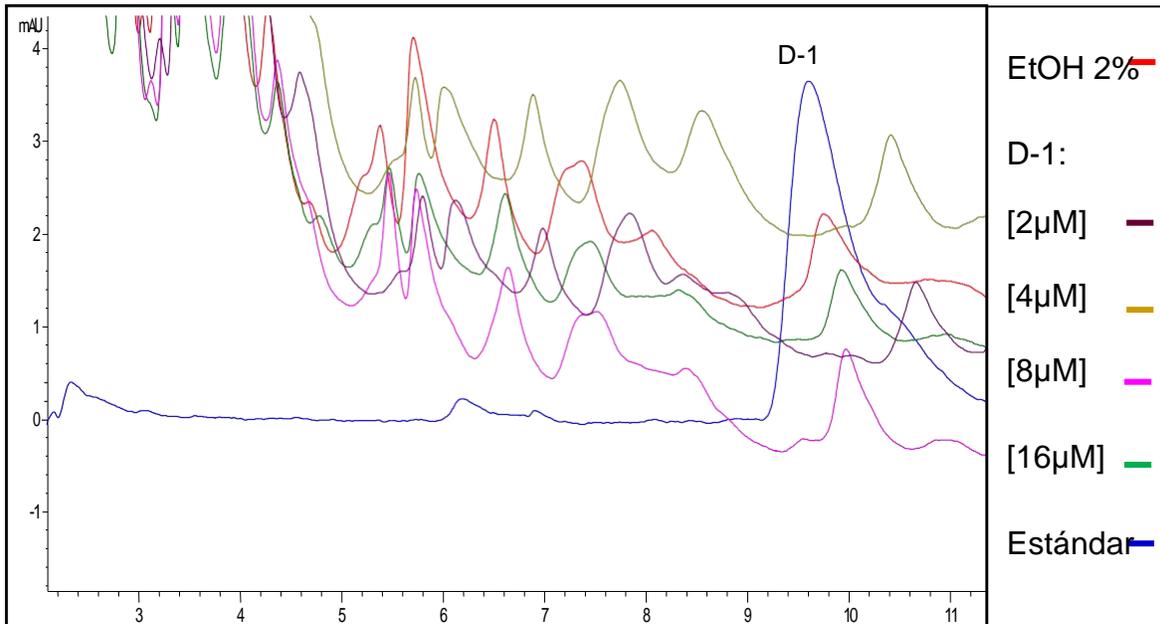


Fig. 8. Cromatograma del testigo disolvente EtOH 2 %, D-1 a las 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  y la solución estándar, en la cepa flare de *D. melanogaster*. El pico de retención del tripanocida aparece en azul al minuto 9.6.

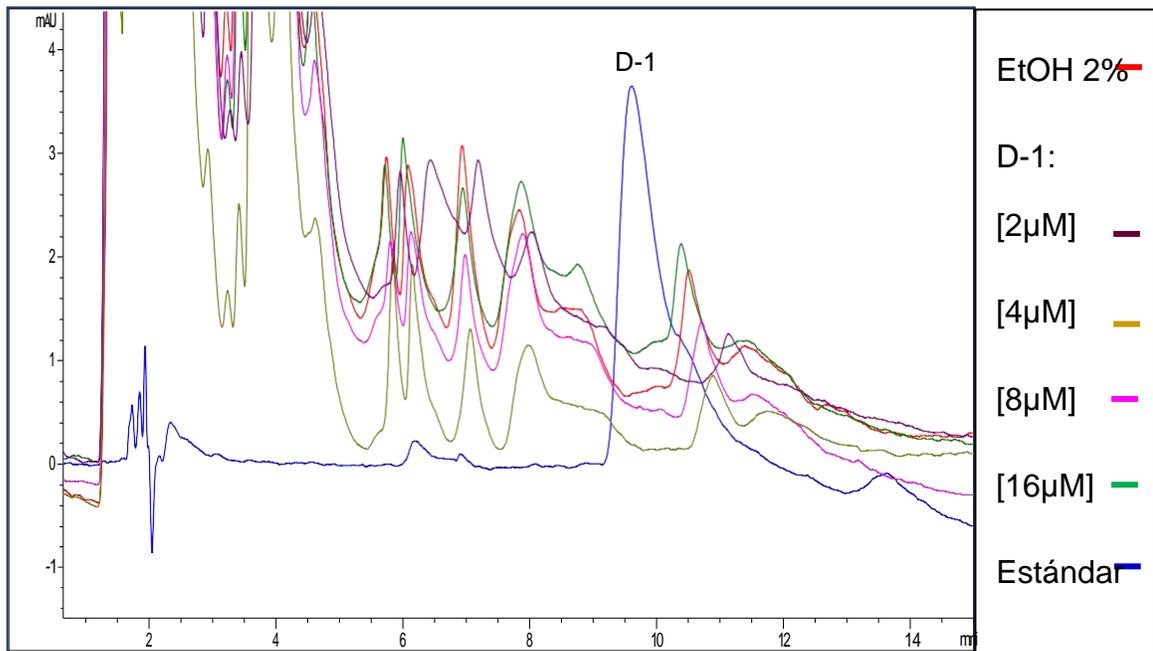


Fig. 9. Cromatograma del testigo disolvente EtOH 2 %, D-1 a las 2, 4 ,8 y 16µM y la solución estándar, en la cepa Oregon R(R)-flare de *D. melanogaster*. El pico de retención del tripanocida aparece en azul al minuto 9.

## ***CONCLUSIONES***

- Se considera que el D-1 fue subtóxico para las concentraciones 1.9, 31.7, 63.5 y 127  $\mu\text{M}$  en la cepa flare, al llegar a una  $\text{CL}_{20}$  en la prueba de toxicidad.
- El D-1 no fue genotóxico a las concentraciones utilizadas en la prueba SMART.
- El tripanocida produjo alteración de la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* en la cruce estándar lo cual indica que hubo una alteración de la división celular, mientras que la HPLC descarta la acumulación del tripanocida en el organismo.

## ***REFERENCIAS CITADAS***

- Albajar-Viñas, P., Diaz, J.C., 2014. Advancing in the treatment for Chagas disease. *N Engl J Med.* 20, 1942-1943.
- Astiasarán, A.I., Lasheras, A.B., Ariño, P.A.H., Martínez, H.J.A. (2003). *Alimentos y nutrición en la práctica alimentaria*. Madrid. Díaz de Santos. p 268-269.
- ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 1989. Resumen de salud pública N-Nitrosodimetilamina. [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts141.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts141.pdf) (Acceso 11/2018). (Acceso; 05.10.2015).
- Bate, M., Arias, A.M., 1991. The embryonic origin of imaginal disc in *Drosophila*. *Development.* 112, 755-761.
- Bebarta, V.S., Hensley, M.D., Borys, D.J., 2014. Acute methotrexate ingestion in adults: a report of serious clinical effects and treatments. *J. Toxicol.* 1-5.
- Beira, J.V., Paro, R., 2016. The legacy of *Drosophila* imaginal Discs. *Chromosoma.* 125, 573-592.
- Bello, G.J., López, de C.S.A. (2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Madrid. Días de Santos. p 3,18.
- Berest, G.G., Voskoboynik, O.Y., Kovalenko, S.I., Antypenko, O.M., Nosulenko, I.S., Katsev, A.M., Shandrovskaia, O.S., 2011. Synthesis and biological activity of novel N-cycloalkyl-(cycloalkylaryl)-2-[(3-R-2-oxo-2H-[1,2,4]triazino[2,3.c]quinazolina-6-yl)thio]acetamides. *Eur J Med Chem.* 46, 6066-6074.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (2007). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México. MacGraw-Hill. p 48-50.
- Buschini, A., Ferrarini, L., Franzoni, S., Galati, S., Lazzaretti, M., Mussi, F., Albuquerque, C.N., Zucchi, T.M.A., Poli, P., 2009. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole and metronidazole. *J Parasitol Res.* 2009, 1-11.
- Calvo, C.M.C., Mendoza, M.E. (2012). *Toxicología de los alimentos*. México. Ma Graw Hill. p 443, 211-213.
- Carneán A.M., Reppeto M. (2006). *Toxicología alimentaria*. Madrid. Diaz de Santos. p 508-513.
- Carrada-Bravo, T., 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol.* 5, 205-219.
- Castañeda-Partida, L, Heres-Pulido, M.E., Guzmán-Rincón, J., Hernández-Portilla, L.B., Dueñas-García, I.E., Durán-Díaz, A., Delfín-Alcalá, I., 2011.

Lead acetate does not inhibit dimethylnitrosamine activation and interacts with phenobarbital which is genotoxic in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem Toxicol.* 9, 2172-2179.

- 📖 Chang-Hwei, C. (2012). *Activation and Detoxification Enzymes, functions and implications*. New York. Springer.
- 📖 Chemical Abstracts Service (CAS). 2018. CAS REGISTRY- The gold standard for chemical substance information. <http://www.cas.org/content/chemical-substances> (Acceso 28.03.18).
- 📖 Chhabra, R.S., 1979. Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environ Health Persp.* 33, 61-69.
- 📖 Chung, H., Sztal, T., Pasdhar, S., Sridhar, M., Batterham, P., Daborn, P. J., 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *PNAS.* 14, 5731-5736.
- 📖 Connolly, D.J., Cusack, D., O'Sullivan, T.P., Guiry, P.J., 2005. Syntheses of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron.* 61, 10153-10202.
- 📖 Coura, J.R., Bores-Pereira, J., 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta tropical.* 115, 5-13.
- 📖 Coutiño, E.M.R., Purata, A., Hernández, P.C., 2010. Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico. *Rev.* 29, 39-52.
- 📖 Dadhania, V.P., Tripathi, D.N., Vikram, A., Jena, G.B., 2010. Intervention of  $\alpha$ -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. *Chem Biol Interact.* 183, 85-95.
- 📖 Davoll, J., Johnson, A.M., Davies, H.J., Bird, O.D., Clarke, J., Elslager, E.F., 1972. Folate antagonists. 2,2,4-Diamino-6-((aralkyl and (heterocyclic)methyl)amino)quinazolines, a novel class of antimetabolites of interest in drug-resistant malaria and Chagas' disease. *J Med Chem.* 8, 812-826.
- 📖 Días, J.C., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 5, 603-612.
- 📖 Diaz-Benjumea F.J., Cohen S.M., 1993. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell.* 4, 741-752.
- 📖 Doppalapudi, R.S., Riccio, E.S., Davis, Z., Menda, S., Wang, A., Du, N., Green, C., Kopelivivh, L., Rao, C.V., Brenbrook, D.M., Kapetanovic, I.M., 2012. Genotoxicity of the cancer chemopreventive drug candidates CP-31398, SHetA2, and phosphor-ibuprofen. *Mutat Res.* 746, 78-88.
- 📖 Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 147, 29-36.

-  Feria de las Ciencias, la tecnología y la innovación. 2013. Microensayo para evaluar toxinas de caracoles en *Drosophila melanogaster*. [https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria21/feria135\\_01\\_microensayo\\_para\\_evaluar\\_toxinas\\_de\\_caracoles\\_e.pdf](https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria21/feria135_01_microensayo_para_evaluar_toxinas_de_caracoles_e.pdf) (Acceso 05.03.17).
-  Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 225-308.
-  Frei, H., Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res.* 334, 247-258.
-  Frölich, A, Würgler, F.E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat Res.* 216, 179-187.
-  Fry, J.D., 2014. Mechanisms of naturally evolved ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 217, 3996-4003.
-  Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.J., 2009. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropicana.* 115, 22-27.
-  Genestier, L., Pallot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K., Revillard, J.P., 2000. Mechanisms of action of mehotrexate. *Immunopharmacology.* 47, 247-257.
-  Graf, U., Van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 271, 59-67.
-  Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen.* 6, 153-188.
-  Guachalla, L., Ascarrunz, M.E., 2003. La genética toxicológica: una ciencia en constante desarrollo. *Biofarbo.* 11, 75-82.
-  Guarnieri, D.J., Heberlein, U., 2003. *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *Int Rev Neurobiol.* 54: 199-228.
-  Hall, B.S., Wilkinson, S.R., 2012. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 115-123.
-  Hernández, G. H., Moreno, A. G., Zaragoza, F. G. y Porras, A. C. (2010). *Tratado de medicina farmacéutica*. Madrid. Médica Panamericana.
-  Ioannides, C., 2001. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotic*. Londres. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
-  Jantová, S., Theiszová, M., Mikulášová, M., 2004. Cytotoxic and genotoxic effects of some substituted tetrazolo[1,5-c]quinazolinas. *Neoplasma.* 51,436-441.

- ✿ Kaneshima, E.N., Castro-Prado, M.A.A., 2005. Benznidazole-induced genotoxicity in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 3, 325-330.
- ✿ Kaun K., Devineni A., Heberlein U., 2012. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Hum Genet*. 131, 959-975.
- ✿ Khoza, T.A., Makhafola, T.J., Mphahlele, M.J., 2015. Novel polycarbo-substituted imidazo[1,2-c]quinazolines: synthesis and cytotoxicity study. *Molecules*. 20, 22520-22533.
- ✿ Kose E., Irmak, H.S., Sarihan, E., Vardi, N., Turkoz, Y., Ekinci, N., 2012. Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. *Sci World J*. 1-6.
- ✿ Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 4, 342-348.
- ✿ Magge, P.N., Barnes, J.M., 1956. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer*. 10, 114-122.
- ✿ Maya, J.D., Bollo, S., Nulez-Vergara, L.J., Squella, J.A., Repetto, Y., Morello, A., Périé, J., Chauvière, G., 2003. *Trypanosoma cruzi*; effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem Pharmacol*. 65, 999-1006.
- ✿ Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A., 2007. Mode of action of natural and synthetic drug against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 601-620.
- ✿ McCann, J., Ames, B.N., 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73, 950-954.
- ✿ Mendoza-Martínez, C., Correa-Basurto, J., Nieto-Meneses, R., Márquez-Navarro, A., Aguilar-Suárez, R., Montero-Cortés, M.D., Noguera-Torres, B., Suárez-Contreras, E., Galindo-Sevilla, N., Rojas-Rojas, A., Rodríguez-Lezama, A., Hernández-Luis, N., 2015. Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents. *Eur J Med Chem*. 96, 296-307.
- ✿ Milan, M., Campuzano, S., Garcia-Bellido., 1996. Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 640-645.
- ✿ Mohamed, Z.A., 2012. Synthesis, Investigation of Mass Spectra and Antimicrobial Activity of 2,3-dihydro-1H-pyrazino[2,1-b]quinazoline-4,6-dione and its Derivatives. *J Am Sci*. 10, 213-220.

- Moreno, E., Plano, D., Lamberto, I., Font, M., Encío, I., Palop, J. A., Sanmartín, C., 2012. Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: Synthesis and study of their potencial cytotoxic activity *in vitro*. *Eur J Med Chem.* 47, 283-298.
- O'Neil, R.H., Lilien, R.H., Donald, B.R., Stroud, R.M., Anderson, A.C., 2003. Phylogenetic classification of protozoa based on the structure of the linker domain in the bifunctional enzyme, Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. *J Biol Chem.* 278, 52980-52987.
- Olivera-Romero, Z.Y., 2014. Evaluación genotóxica del tripanocida GHPMF en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza E). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 73 pag.
- OMS, 2017. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> (Acceso 28.03.18).
- Organización Internacional del Trabajo (OIT). 2012 Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.1f1a3bc79ab34c578c2e8884060961ca/?vgnnextoid=a981ceffc39a5110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD&vgnnextchannel=9f164a7f8a651110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD> (Acceso 20.09.15).
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. 1996. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.11.2.html> (Acceso 05.02.17).
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.*123, 291-298.
- Pandey, U.B., Nichols C.D., 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.* 63:411–436.
- Peña, C.E., Carter, D.E., Ayala-Fierro, F.F., 2001. Toxicología ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental. <https://superfund.arizona.edu/content/toxicologia-ambiental>. (Acceso 30.03.2018).
- Pérez-Brandan, C., Padilla, A.M., Xu, D., Tarleton, R.L., Basombrio, M.A., 2011. Knockout of the dhfr-ts gene in *Trypanosoma cruzi* Generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. *PLOS Negl Trop Dis.* 5, 1-10.

-  Pérez-Molina, J.A., Sojo-Dorado, J., Norman, F., Monge-Maillo, M., Albajar-Viñas, P., López-Vélez, R., 2013. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benzimidazole treatment. *Acta Trop.* 2, 101-104.
-  Pitarque, M., Von Richer, O., Rodríguez-Antona, C., Wang, J., Oscarson, M., Ingelman-Sundberg, M., 2004. A nicotine C-oxidase gene (CYP2A6) polymorphism important for promoter activity. *Hum Mutat.* 23, 258-266.
-  Raether, W., Hänel, H., 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res.* 91, 412.
-  Ramsey, J.M., Elizondo-Cano, M., Sanchez-González, G., Peña-Nieves, A., Figueroa-Lara, A., 2014. Opportunity Cost for Early Treatment of Chagas disease in Mexico. *PLOS Neglect Trop. D.* 8, 1-8.
-  Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M, Bier, E., 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 6, 1114-25.
-  Repetto, M., 1995. *Toxicología avanzada*. Madrid. Ed. Fondo de cultura económica. p 168.
-  Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J.D., Agosin, M., Morello, A., 1996. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 115, 281-285.
-  Rodríguez, C.J., De Castro, S.L., 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 97, 3-24.
-  Rodríguez, J.C.G. y Rodeiro, I.G., 2014. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cubana Farm.* 48, 495-507.
-  Rodríguez-Arnaiz, R., 1994. *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos*. México. Fondo de cultura económica. (Acceso: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>, 16-02-17).
-  Saner, C., Weibwl, B., Wüurgler, F.E., Sengstag, C., 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen.* 27, 46-58.
-  Santos-Cruz, L.F., 2016. Evaluación de los posibles efectos tóxicos y genotóxicos de los tripanocidas GHPM y GHPMF con las pruebas CL<sub>50</sub> y SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES Iztacala UNAM, México. 123 pag.
-  Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu V., 2012. Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutat Res.* 746, 56-59.
-  Senkovich, O., Schirmann, N., Chatyopadhyay, D., 2009. Structure of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Trypanosoma cruzi* in the

- folate-free state and in complex with two antifolate drugs, trimetrexate and methotrexate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 65, 704-716.
- 📖 Sinha, N.K., Asnani, A.J., Dravyakar, B.R., 2013. A novel approach towards development of quinazolina derivates in pain management. *Asian J Pharm Clin Res.* 6, 200-204.
  - 📖 Smith, S.W., Nelson, L.S., 2008. Case files of New York city poison control center: antidotal strategies for the management of methotrexate toxicity. *J Mr. Toxicol.* 2, 132-140.
  - 📖 Spanò, V., Montalbano, A., Carbone, A., Parrino, B., Diana, P., Cirrincione, G., Castagliuolo, I., Brun, P., Issinger, O.G., Tisi, S., Primac, I., Vedaldi, D., Salvador, A., 2014. Synthesis of new class of pyrrolo[3,4-h]quinazolines with antimetabolic activity. *Eur J Med Chem.* 74, 340-357.
  - 📖 Uribarren, T.B., 2013. Enfermedad de Chagas. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html> (Acceso 28. 03 .2018).
  - 📖 Wangler, M.F., Yamamoto, S., Bellen, H.J., 2015. Fruit flies in biomedical research. *Genetics.* 199, 639-653.
  - 📖 WHO, 2015. Investing to overcome of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. 2015. Switzerland, pp 75-80.
  - 📖 Wilkinson, S.R., Kelly, J.M., 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem.* 384, 517-525.
  - 📖 Xi, L., Zhang, J.Q., Liu, Z.C., Zhang, J.H., Yan, J.F., Jin, Y., Lin, J., 2013. Novel 5-anilinoquinazoline-8-nitro derivatives as inhibitors of VEGFR-2 tyrosine kinase; synthesis, biological evaluation and molecular docking. *Org Biomol Chem.* 11, 4367-4378.
  - 📖 Yoshida, N., Tyler, K.M., Llewellyn, M.S. 2011. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 27, 459-466.

# ANEXOS

## Anexo I: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo comienza cuando una chinche infectada pica al mamífero y deja heces con tripomastigotes metacíclicos; éstos penetran al torrente sanguíneo por la herida y se transforman en amastigotes (forma replicativa en mamíferos) que infectan diferentes células y se dividen hasta lissarlas, posteriormente regresan al torrente y cambian a tripomastigotes; en la chinche, el ciclo comienza cuando se alimenta de un mamífero infectado, ingiriendo los tripomastigotes que en el intestino medio pasan a epimastigotes (forma replicativa en triatóminos), los cuales se reproducen y al llegar al intestino posterior cambian nuevamente a tripomastigotes para reanudar el ciclo (Figura 10. Uribarren, 2013).

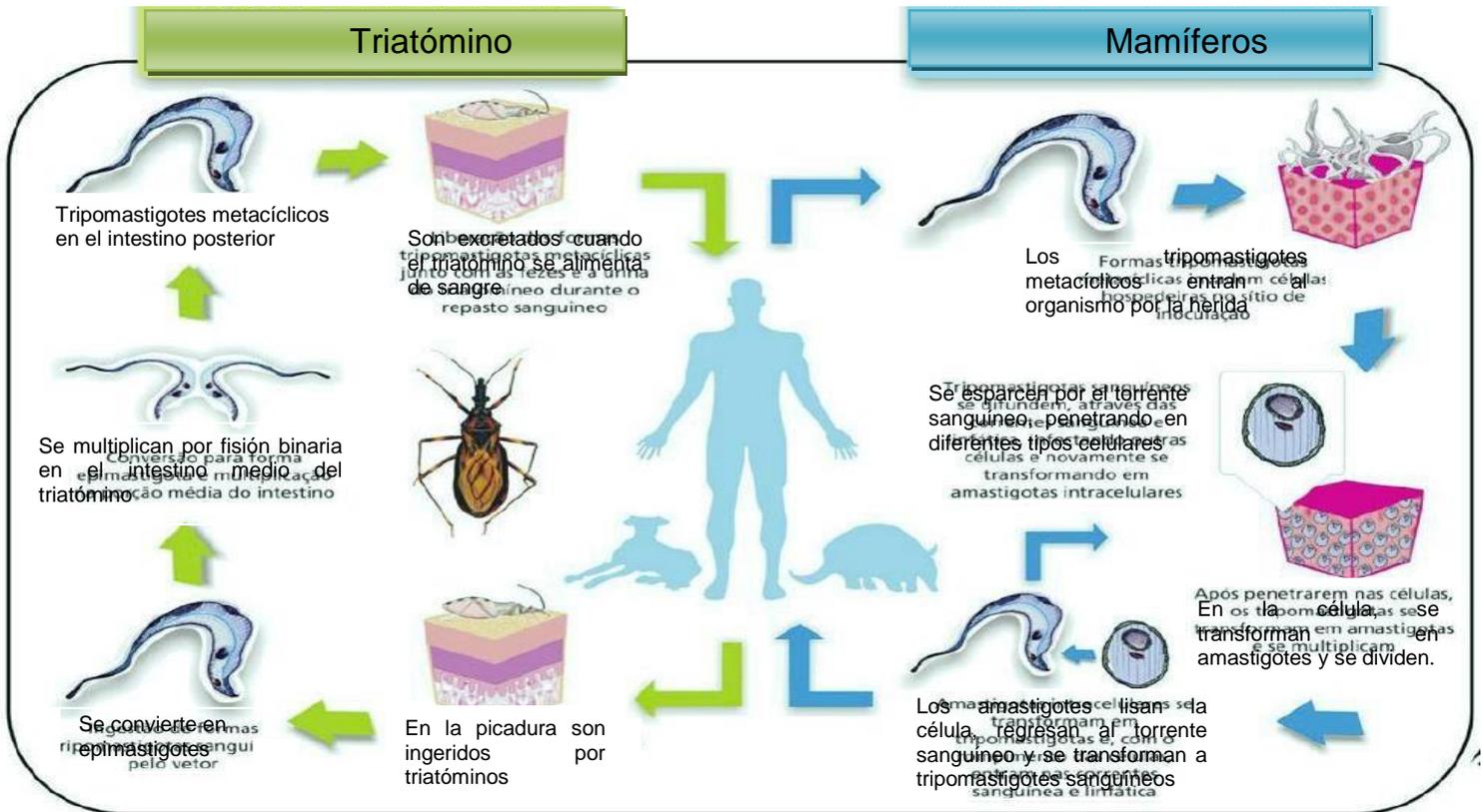


Fig.10. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, Tomado de <http://www.cectrad.net/chagas.pdf>, infográfico Venício Ribeiro

## Anexo II: Distribución de la tripanosomiasis americana

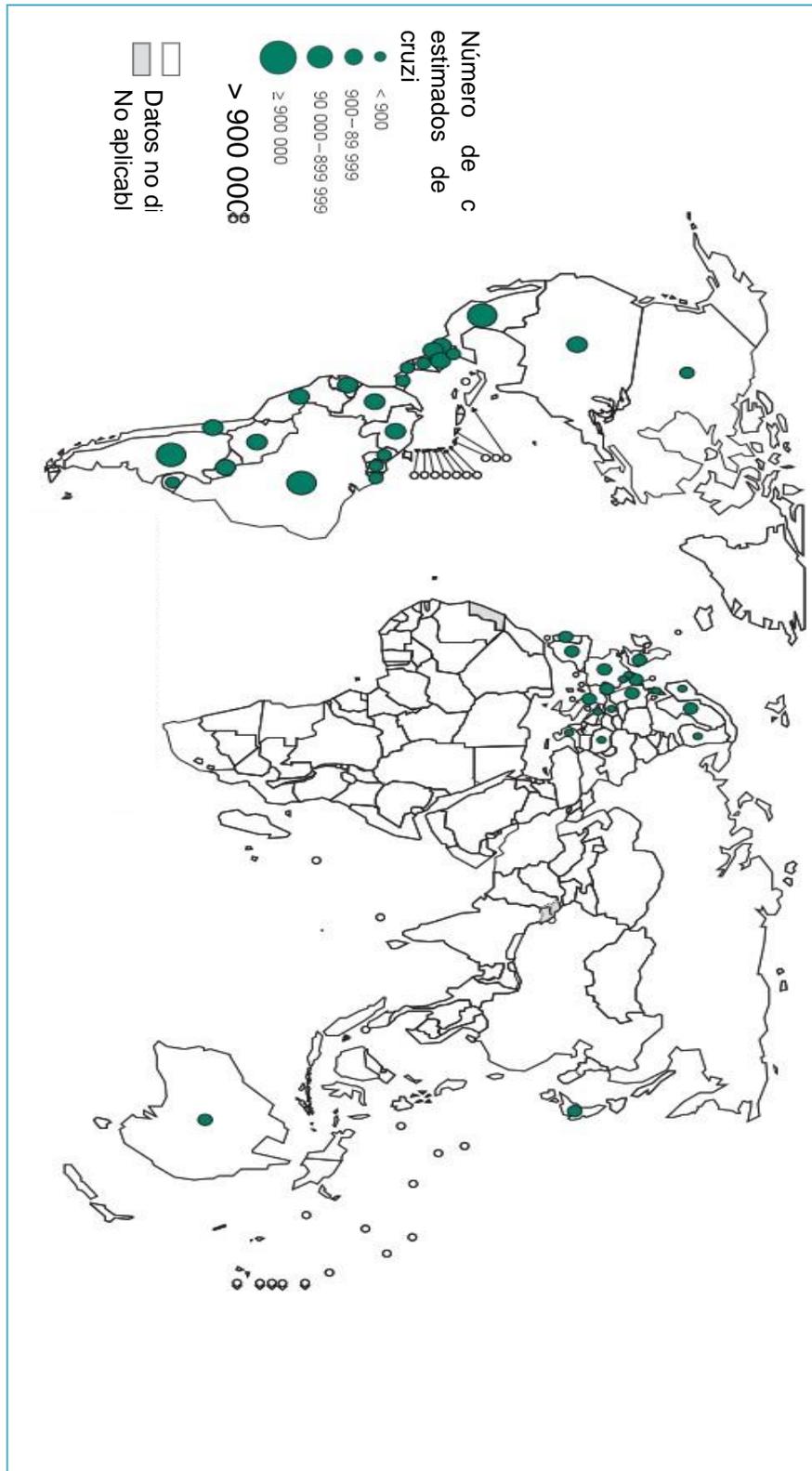


Fig. 11. Mapa con la distribución de casos registrados durante el periodo 2010-2013 por la OMS

### ***Anexo III: Drosophila melanogaster***

*D. melanogaster* es un organismo holometábolo, es decir, presenta una metamorfosis completa (Figura 12), pasando por huevo, larva (distinguiéndose tres estadios, el primero a las 24 h, el segundo a las 48 h y tercero a las 72 h; el último generalmente es el más utilizado para realizar experimentos, debido a que las larvas son menos lábiles y más voraces), posteriormente (48 h después) se convierte en pupa y aproximadamente cinco días después emerge el imago (organismo adulto). En una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 60 % el ciclo de vida de *D. melanogaster* dura entre 10 y 14 días (Guarnieri y Heberlein, 2003; Kaun *et al.*, 2012).

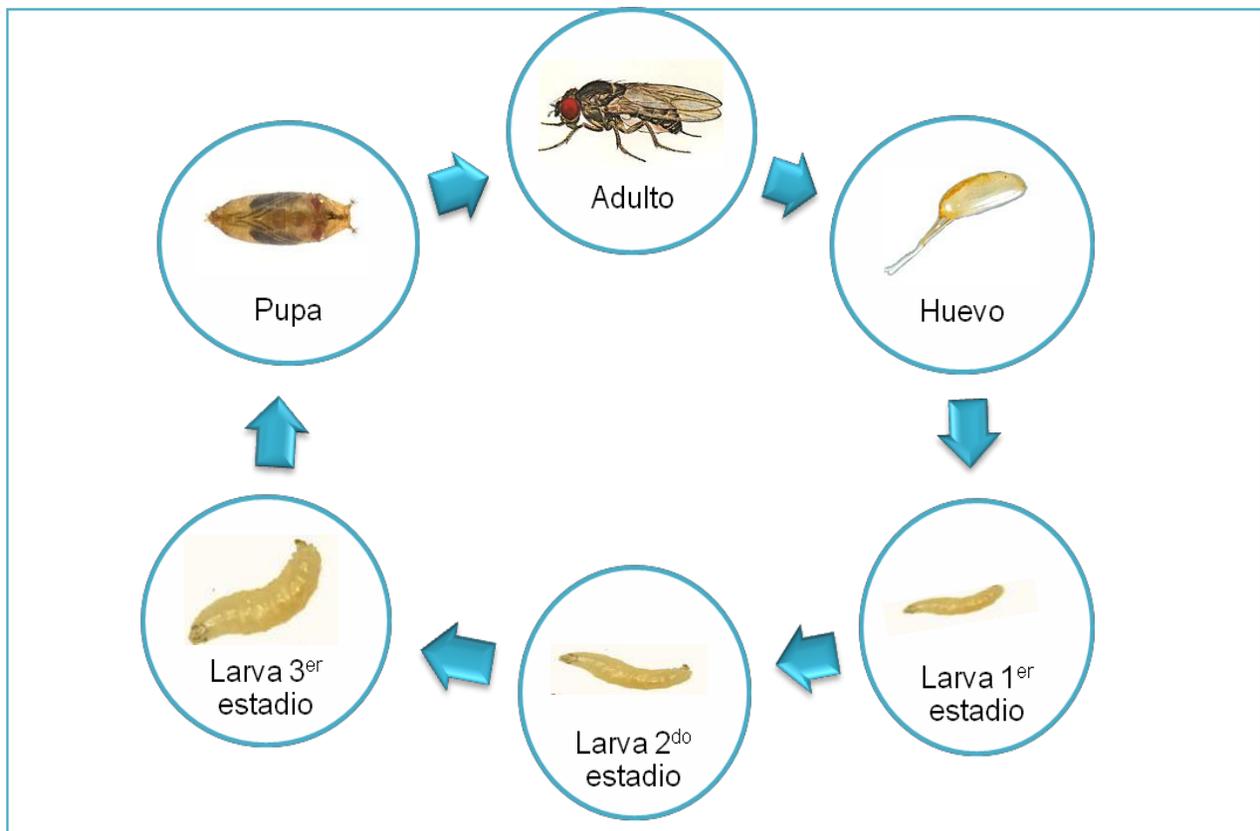
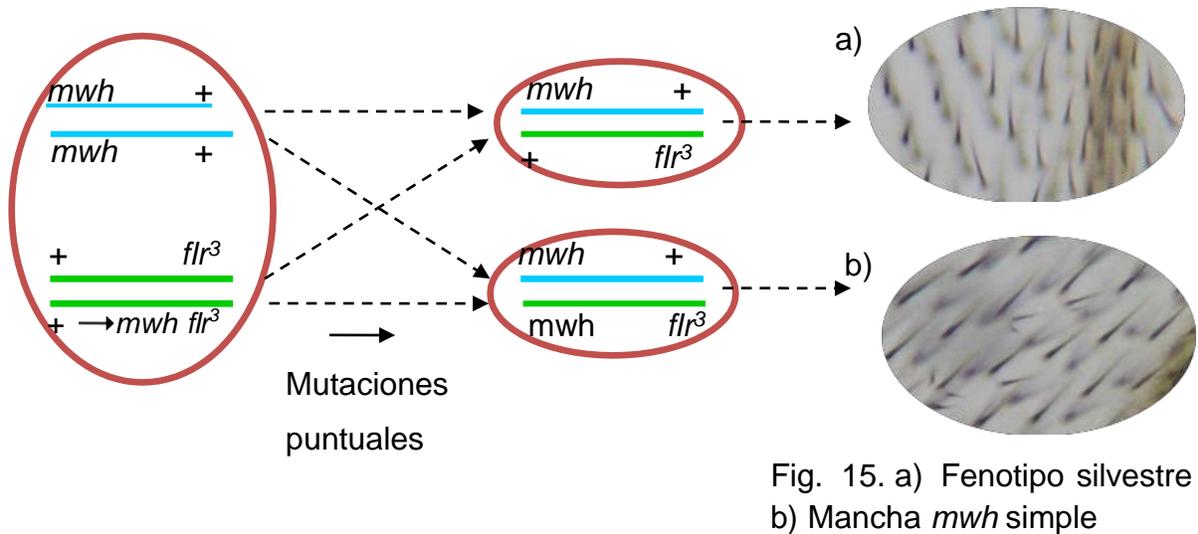
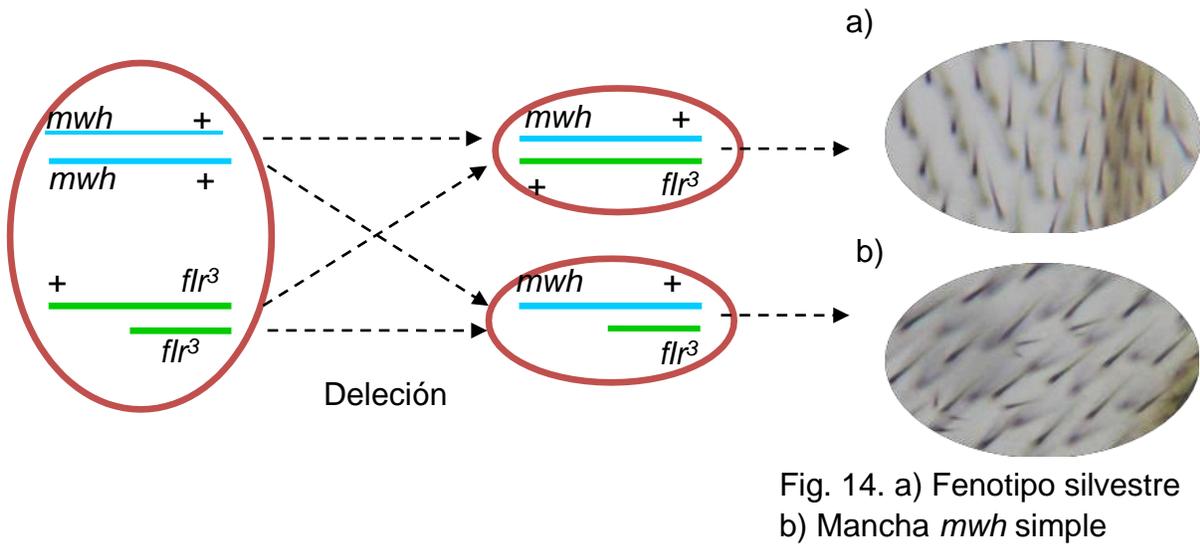
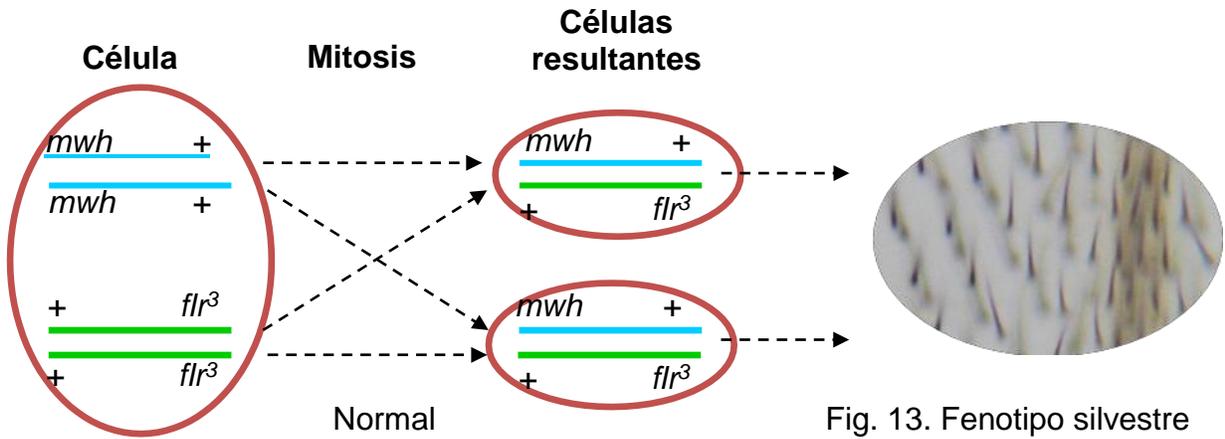


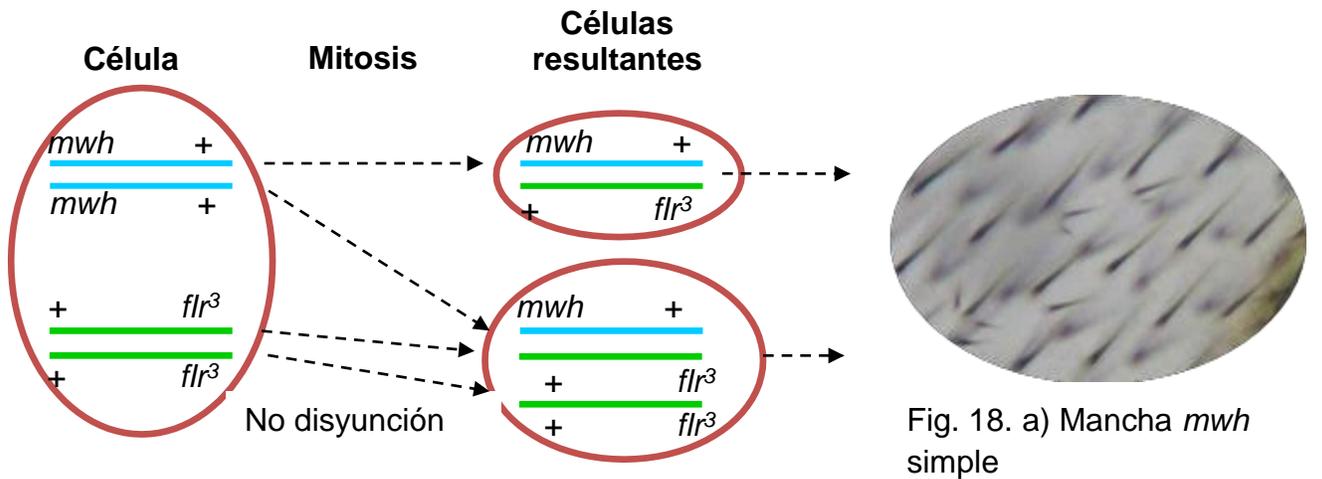
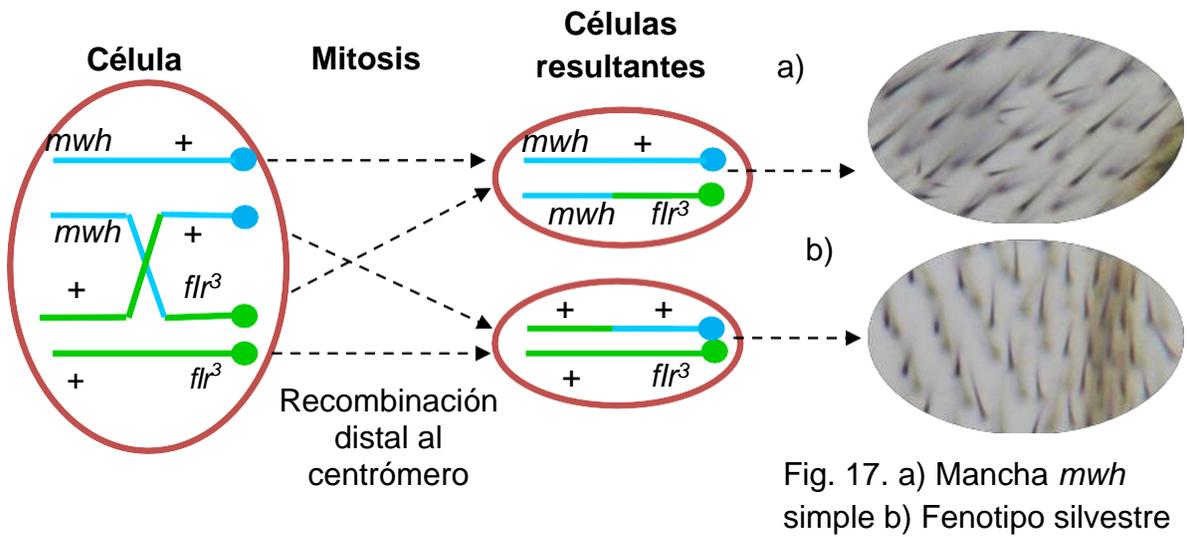
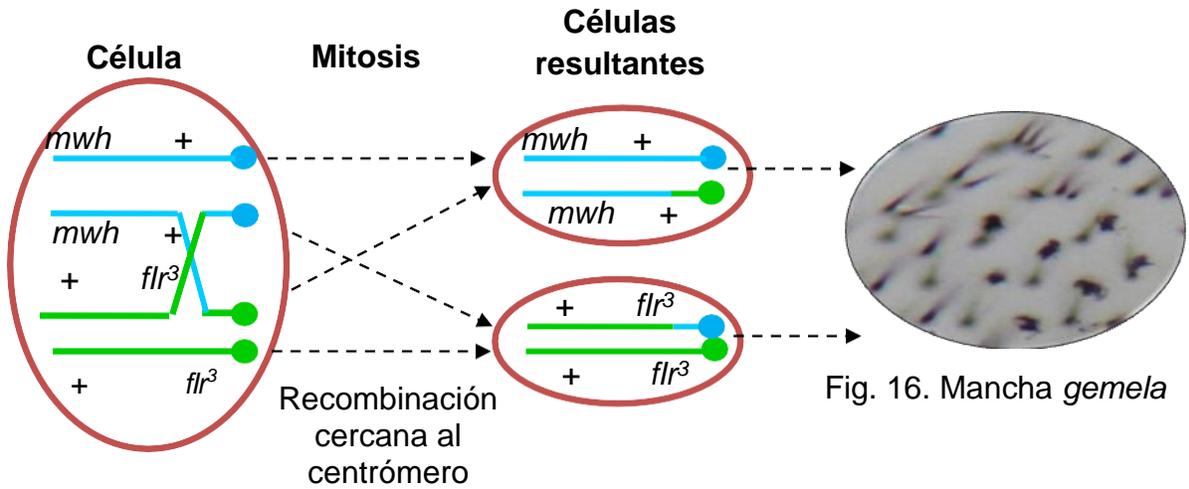
Fig. 12. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Tomado de:

[https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria21/feria135\\_01\\_microbioensayo\\_para\\_evaluar\\_toxinas\\_de\\_caracoles\\_e.pdf](https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria21/feria135_01_microbioensayo_para_evaluar_toxinas_de_caracoles_e.pdf), Con ligeras comunicaciones.

**Anexo IV: Daño genético detectado por SMART en ala de *D. melanogaster***





## ***Anexo V: Discos imaginales***

Los insectos holometábolos, presentan durante el desarrollo larvario sacos formados por células epiteliales que continúan dividiéndose, conocidos como discos imaginales (Figura 19); durante la metamorfosis cada saco dará lugar a una estructura diferente en el organismo adulto (cabeza, genitales, apéndices, ojos, alas etc.). El estudio de los discos comenzó a realizarse en *D. melanogaster* debido a las ventajas que presenta el modelo, las investigaciones realizadas, mostraron que las células de los discos presentan similitudes metabólicas a las del humano, aumentando el interés en utilizarlas para investigación (Bate y Arias, 1991; Milan *et al.*, 1996; Wangler *et al.*, 2015).

Al desarrollar métodos para manipular el contenido genético de la población de células de los discos imaginales, se diseñaron pruebas para estudiar diferentes temas de interés. SMART en ala de *D. melanogaster*, utiliza tres cepas que contienen dos marcadores genéticos en las células de los discos del ala, los cuales, modifican la expresión fenotípica de las cerdas en el imago a causa de mutaciones y recombinaciones que eliminan la heterocigosis. La prueba cuenta con alta representatividad estadística, debido a que, las células de los discos van de ~50 al inicio del desarrollo a 24,400 células por ala al final del desarrollo (Bate y Arias, 1991; Diaz-Benjumea y Cohen, 1993).

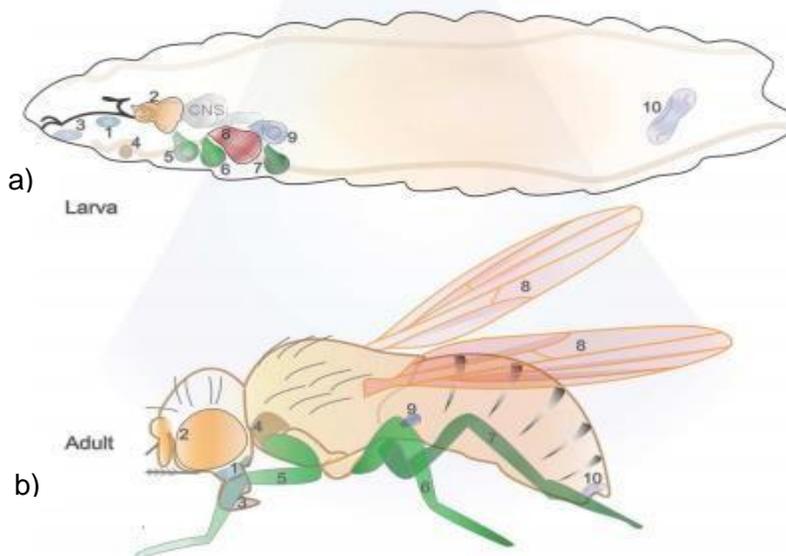


Fig. 19. a) Discos imaginales numerados dentro de la larva. b) El imago muestra las estructuras que dan lugar a los discos imaginales, detectándose por el número (Beira y Paro, 2016).

Imagen tomada del artículo The legacy of *Drosophila* imaginal Discs (Beira y Paro, 2016).

**Anexo VI: Resultados de la distribución acumulada del tamaño de clones mwh de la cruz estándar**

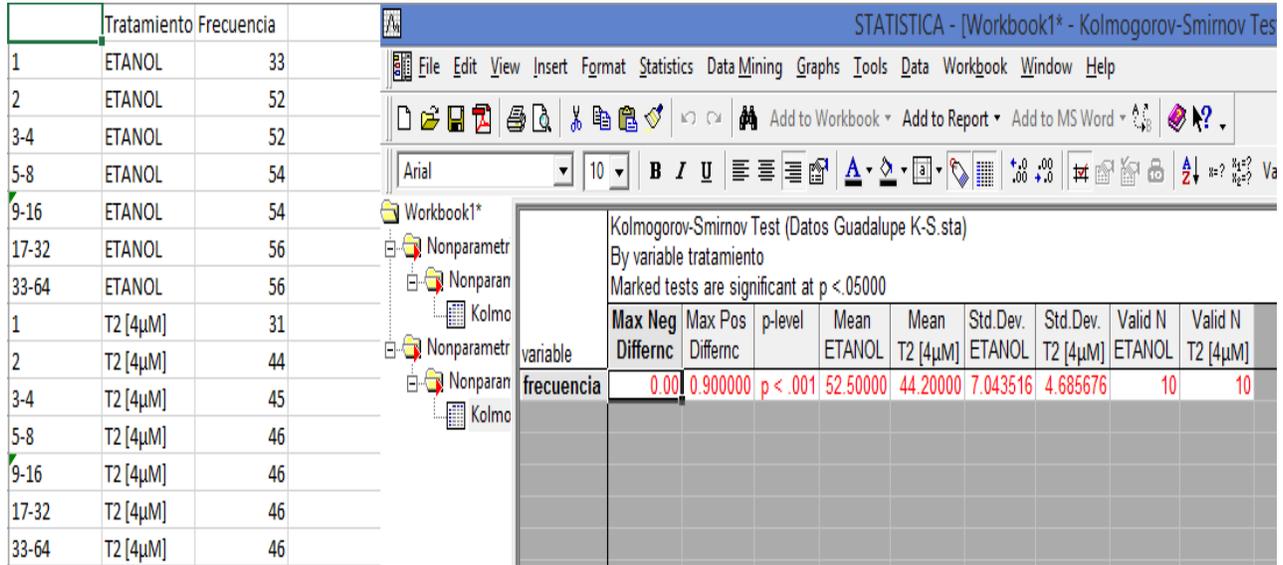


Figura 20. Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la comparación se realizó entre EtOH 2% y D-1 [4 µM].

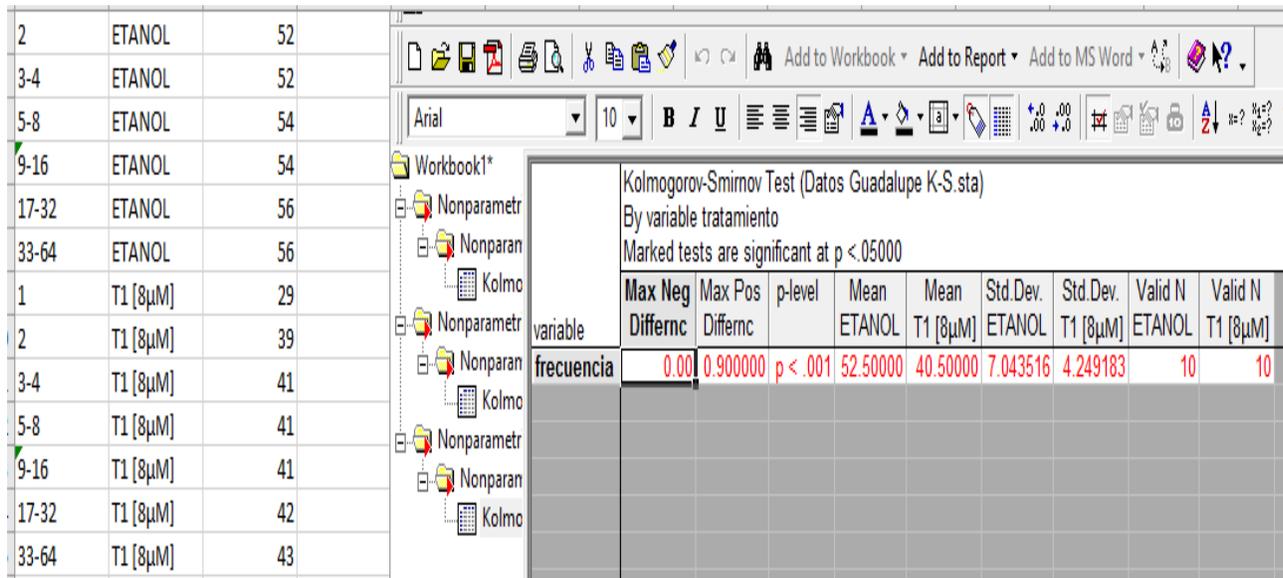


Figura 21. Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la comparación se realizó entre EtOH 2% y D-1 [8 µM].

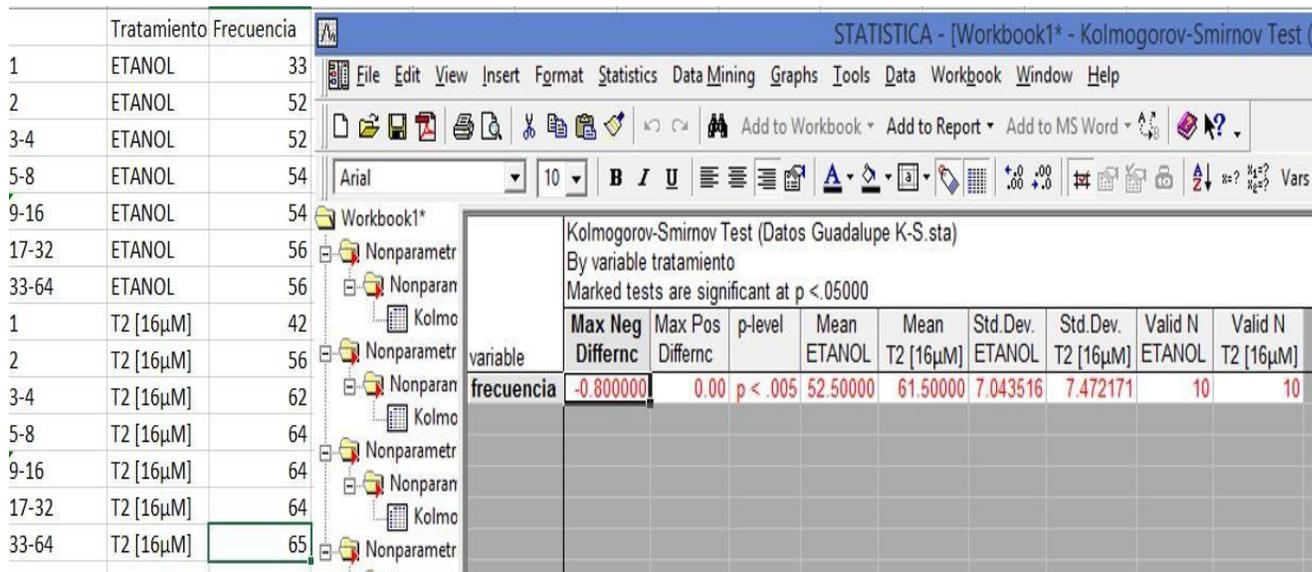


Figura 22. Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la comparación se realizó entre EtOH 2% y D-1 [16 µM].

***Anexo VII: Espectros de los tratamientos que mostraron similitud a la curva de la muestra estándar en la HPLC***

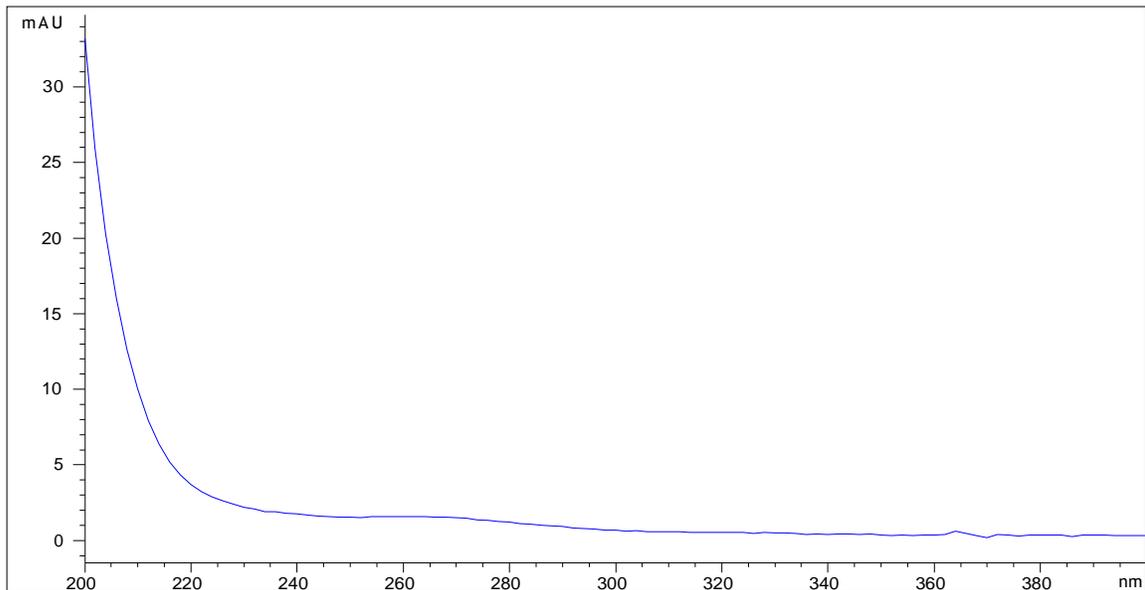


Figura 23. Comportamiento del espectro de la curva de solución estándar del D-1.

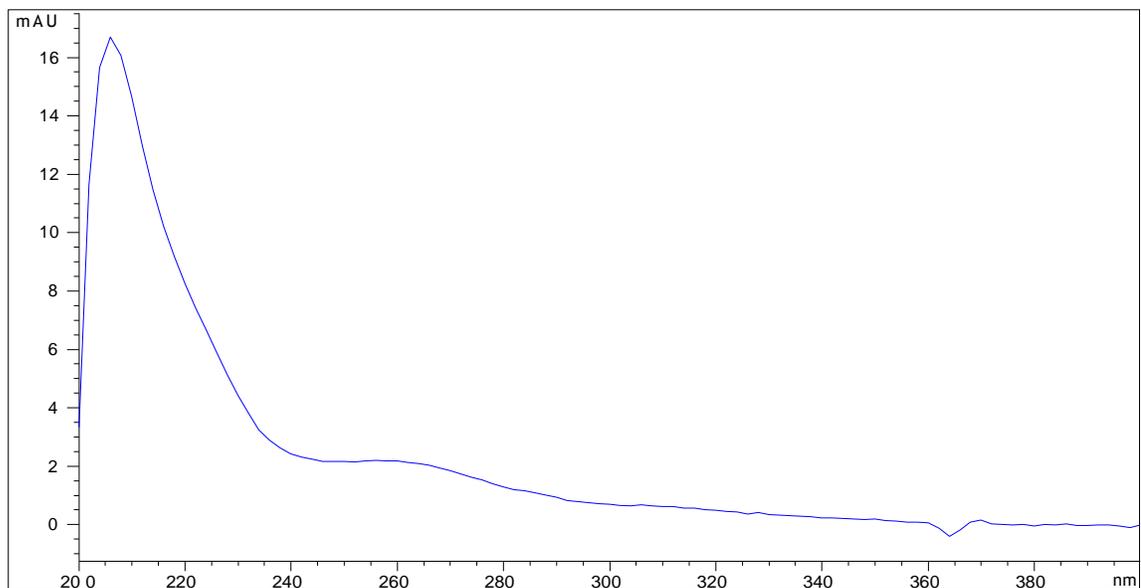


Figura 24. Comportamiento del espectro del tratamiento de EtOH 2%

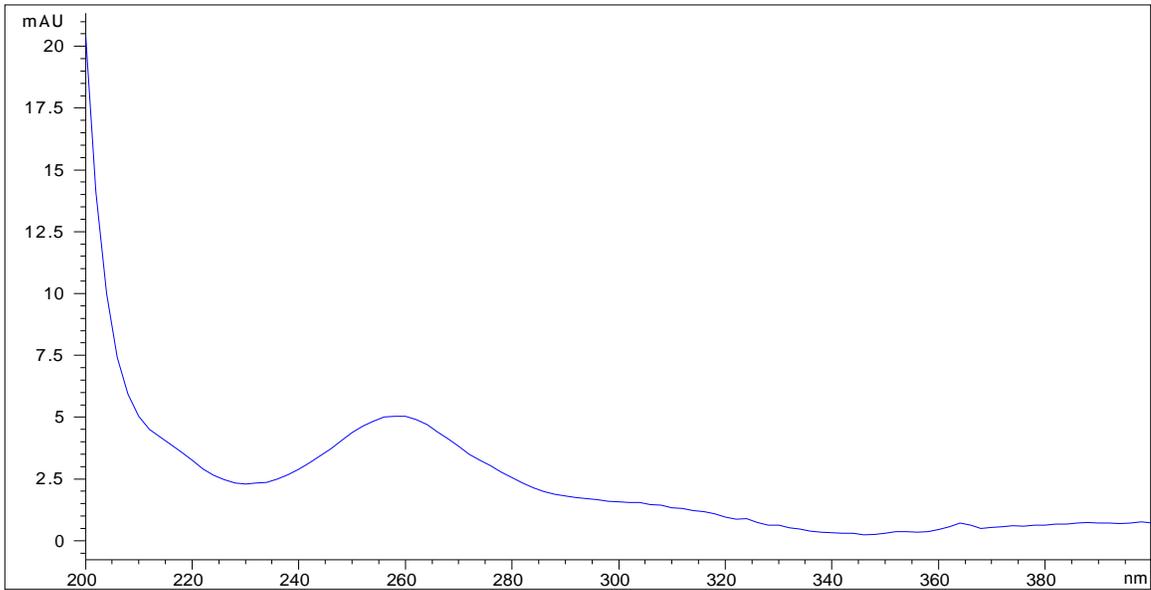


Figura 25. Comportamiento del espectro de la concentración 16  $\mu\text{M}$  del D-1

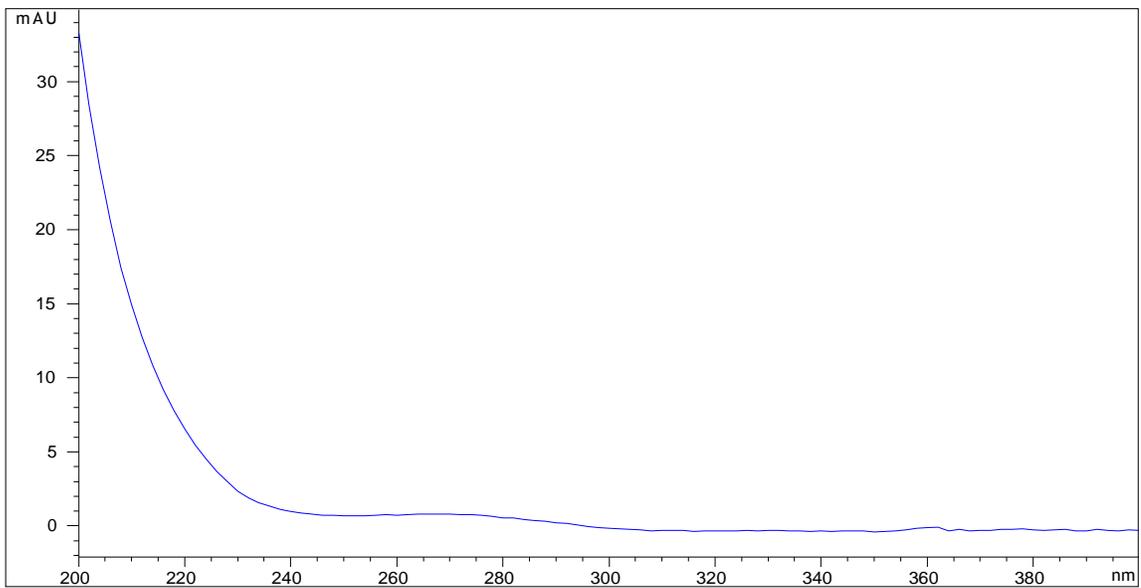


Figura 26. Comportamiento del espectro de la concentración 8  $\mu\text{M}$  del D-1.

## ***Anexo VIII: Principales tripanocidas utilizados para tratar la enfermedad***

### **☪ Nifurtimox® (NFX)**

Compuesto nitrofurano, con efecto dosis-dependiente, a concentraciones bajas el daño se da principalmente por estrés oxidante y a dosis altas mediante la oxidación de las bases del DNA (Buschini *et al.*, 2009). Teniendo como efectos secundarios anorexia, náuseas, vómito, dolor abdominal y de cabeza, convulsiones (OMS-Ginebra, 1996)

### **☪ Benznidazol® (BNZ)**

Es un profármaco derivado de los nitroimidazoles, su mecanismo de acción es mediante la formación de radicales libres a través de la reducción de su grupo nitro, los cuales pueden provocar daños al unirse a proteínas, lípidos y al DNA (Maya *et al.*, 2007; Hall y Wilkinson, 2012). Induce segregación mitótica, cruzamientos mitóticos (pérdida de heterocigosis), es recombinogénico y tiene efectos citotóxicos en *Aspergillus nidulans* (Kaneshima y Castro-Prado, 2005), causa anorexia, náusea, vómito, toxicidad de sistema nervioso (Pérez-Molina *et al.*, 2013).

### **☪ Metotrexato (MTX).**

Antagonista del folato (vitamina necesaria para la síntesis de timina), que inhibe enzimas como la amido fosforibosiltransferasa, la 5-aminoimidazol1-carboxamida ribonucleótido transformilasa y la dihidrofolato reductasa. Afecta la proliferación celular (Smith y Nelson, 2008), disminuye el índice mitótico, incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas mediante rompimiento de las cromátidas, (Şekeroğlu y Şekeroğlu, 2012), induce estrés oxidante, y aumenta la expresión del gen *p53*, el cual se expresa ante daño genético, (Dadhania *et al.*, 2010), provocando efectos como dolor abdominal y de cabeza, náuseas, vértigo, taquicardia, etc. (Bebarta *et al.*, 2014) y daño hepático (Kose *et al.*, 2012).

## *Anexo IX: Glosario*

- 📖 **Aneuploidía:** Mutación que altera el número de cromosomas, ocasionando en algunas células la presencia de más o menos cromosomas de los que deberían tener.
- 📖 **Apoptosis:** Proceso “programado de muerte” que presentan las células de organismos, durante el desarrollo o por un daño irreparable.
- 📖 **Carcinogénica o cancerígena:** Cualquier sustancia capaz de producir cáncer.
- 📖 **CAS (por sus siglas en inglés):** Número internacional que se asigna a los compuestos químicos naturales o sintéticos existentes en una base de datos.
- 📖 **Citostático:** Compuesto que inhibe el crecimiento y altera el ciclo celular.
- 📖 **Citotóxico:** Cualquier sustancia que causa daño y/o muerte celular.
- 📖 **Clastogénesis:** Rompimiento del cromosoma.
- 📖 **Compuesto:** Elemento formado a partir de la suma de distintos elementos químicos.
- 📖 **Delección:** Pérdida de material genético, ya sea, parte del cromosoma o bases del DNA.
- 📖 **Endémico:** Especies que suelen estar en regiones geográficas específicas.
- 📖 **Enzima:** Proteína que cataliza una reacción, haciendo que la energía de aceleración sea menor y la función sea más rápida.
- 📖 **Gen:** Fragmento del material genético que codifica para una función.
- 📖 **Genotóxico:** Compuesto capaz de afectar la integridad del material genético afectando la heredabilidad de los genes.
- 📖 **Holometábolo:** Insectos que presentan cuatro fases dentro de su desarrollo, pasando por huevo, larva, pupa e imago.
- 📖 **Homeostasis:** Capacidad de autorregular el medio interno con el externo.
- 📖 **Homología:** En este caso, es la similitud que presentan entre sí partes de organismos diferentes o secuencias de pares de bases o de aminoácidos de nucleicos o proteínas, respectivamente.

- 🐛 **Hormesis:** Relación dosis-efecto que provocan ciertas sustancias, generalmente el efecto a dosis bajas y altas es contrario.
- 🐛 **Micronúcleos:** Material genético que debido a factores externos queda fuera del núcleo pero tiene envoltura nuclear.
- 🐛 **Mutaciones puntuales:** Alteraciones en la secuencia de un par de nucleótidos en el DNA.
- 🐛 **Parásito:** Organismo que vive dentro o sobre el hospedero, y adquiere nutrientes de él durante toda o una parte de su vida causándole daño.
- 🐛 **Recombinación:** Resultado del entrecruzamiento o intercambio de material genético entre dos cromosomas y que aumenta la variabilidad genética.
- 🐛 **ROS:** Moléculas pequeñas, poco estables, con uno o más átomos de oxígeno cuya capa externa de electrones no está apareada.
- 🐛 **Sustancia:** Material homogéneo constituido por un solo componente y posee propiedades constantes a una temperatura y presión determinadas.
- 🐛 **Tóxico:** Sustancia química capaz de provocar efectos adversos sobre uno o más organismos.
- 🐛 **Cerda:** Se hace referencia a las hebras o “tricomias” que cubren el ala en *D. melanogaster*.
- 🐛 **Tripanocida:** Sustancia química que mata a organismos del género *Trypanosoma spp.*
- 🐛 **Xenobiótico:** Sustancia natural o sintética ajena al organismo.