



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Determinación de la genotoxicidad de la
Zearalenona en *D. melanogaster* y
patrones de expresión de algunos genes
Cyp450 involucrados en su degradación

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

GERARDO VÁZQUEZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. ELÍAS PIEDRA IBARRA

COMITÉ TUTOR: CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ



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.

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio del 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) VÁZQUEZ GÓMEZ GERARDO con número de cuenta 403021255 con la tesis titulada "Determinación de la genotoxicidad de la Zearalenona en *D. melanogaster* y patrones de expresión de algunos genes *Cyp450* involucrados en su degradación", realizada bajo la dirección del (la) DR. ELIAS PIEDRA IBARRA:

Presidente: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO
 Vocal: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
 Secretario: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
 Suplente: M. en C. MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO
 Suplente: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cd. Universitaria, D.F., a 29 de agosto de 2011.

M: del Coro Arizmendi

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por la beca otorgada No.233838.

Al programa PAPIIT No. IN219410-2.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra, por su tiempo y dedicación a este proyecto.

A los miembros del Comité Tutorial, Dr. César Mateo Flores y el Dr. Ernesto Ávila por el apoyo y las observaciones.

A los miembros del jurado: Dra. Magda Carvajal Moreno, Yolanda Irasema Chirino López, César Mateo Flores Ortiz, María Eugenia Isabel Heres y Pulido y José Guillermo Avila Acevedo

A los todos los miembros del laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO y Genética Toxicológica de la FES-I

A familiares y amigos

DEDICATORIAS

A mi abuelo Agustín: que jamás vio este trabajo, pero su estrella lo iluminó desde su concepción hasta su culminación, y desde el lugar donde él esté su estrella siempre iluminará mi camino.

A mi abuela Florentina: por ser más que una abuela, esa que te cuenta historias en una tarde lluviosa, o te prepara el clásico atole, te dedico éste trabajo por ser el cántaro donde deposito todas mis dolencias, que escucha todas mis penas y ser la cobija que calienta mi alma cuando ésta tiene frío.

A mi madre: “raíz fuerte” y a mi padre “duro como el roble, pero sensible como la ceniza al viento”, que a pesar de tener el mundo aplastándonos y asfixiándonos, nunca falta su fuerza y fortaleza para moverlo un poquito y permitir el paso del aire y poder respirar.

A mis hermanos: Rorro, Diana, Richi y Marco, que nunca hemos encontrado la forma de hablarnos y comprendernos, pero sé que en esas risas de sábado en la noche recordando al ritmo de la música nuestra infancia y bromeando a cerca del futuro y en ese abrazo sincero está todo el cariño que nunca nos hemos podido demostrar con palabras.

Abreviaturas

ABC: ATP binding cassette
ADN: ácido sesoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
ARN: ácido ribonucleico
BE: cruza bioactivación elevada
BSTFA: NO-bis(trimetil)sililtrifluoroacetamida
CAT: catalasa
Cit450: enzima citocromo p450
CL₅₀: concentración letal media
Cyp450: gen citocromo p450
Da: daltones
E: cruza estándar
GC-MS: cromatografía líquida de alta resolución
GP: glutatión peroxidasa
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
Hsp: heat shock protein
MIC: medio instantáneo carolina
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PM: peso molecular
REL: retículo endoplásmico liso
RH: producto hidroxilado
SH: sustrato reducido
SMART: somatic mutation and recombination test
SOD: superóxido dismutasa
SOH: sustrato hidroxilado

SOR: superóxido reductasa

TMCS: trimetilclorosilano

ZEA: zearalenona

ÍNDICE

Resumen.....	x
Abstract.....	xi
Introducción.....	1
Zearalenona (ZEA).....	1
Metabolismo xenobiótico.....	2
Función y regulación de los <i>Cyp450</i>	6
Metabolismo de la ZEA.....	7
Receptores de estrógenos en <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Capacidad genotóxica de ZEA.....	16
Objetivos	13
Hipótesis.....	14
Metodología.....	20
Resultados.....	25
Análisis de resultados y discusión.....	44
Conclusión.....	47
Propuestas.....	48
Anexos	49
Literatura citada.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Fig. 1. Estructura química de la zearalenona.....	2
Fig. 2. Estructura química del estradiol.....	2
Fig. 3. Citocromo p450 y su grupo hemo unido por puentes tiol (-SH) de cisteína.....	4
Fig. 4. Ciclo catalítico de los citocromos P450.....	5
Fig. 5. Estructura química y metabolismo de zearalenona y sus metabolitos.....	8
Fig. 6. Comparación esquemática del receptor de ácido retinoico de humano (RXR α) y los receptores de esteroides de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Fig. 7. Mancha grande <i>mwh</i>	11
Fig. 8. Mancha grande <i>flr</i> ³	11

Metodología

Fig. 9. Diseño experimental de los tratamientos tolueno, ZEA y amortiguador de fosfatos para las pruebas de parámetros reproductivos (P. Rep.) Cuantificación de transcritos de los genes <i>Hsp</i> concentración letal media (CL ₅₀) y cuantificación de ZEA incorporada mediante HPLC (HPLC).....	17
Fig. 10. Dimorfismo sexual entre machos y hembras de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
Fig. 11. Peine sexual de machos de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Fig. 12. Diseño experimental de los tratamientos de uretano, ZEA, amortiguados de fosfatos y agua en larvas de tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i> para las pruebas de genotoxicidad (SMART), cuantificación de transcritos de <i>Cyp450</i> (<i>Cyp450</i>) e identificación y cuantificación de ZEA y sus metabolitos para las cruces E y BE.....	21

Resultados

Fig. 13. Mortalidad de organismos de la línea <i>flare</i> ³ tratados con ZEA.....	26
Fig. 14. Mortalidad en organismos de la línea <i>Oregon-flare</i> ³ tratados con ZEA.....	26
Fig. 15. Emergencia de las líneas <i>Oregon-flare</i> ³ y <i>flare</i> ³ tratados con ZEA, tolueno (control positivo) y amortiguador de fosfatos (control negativo).....	28
Fig. 16. Puesta de huevos durante 10 días de organismos de la línea <i>Oregon-flare</i> ³ tratados con zearalenona (ZEA), tolueno y amortiguador de fosfatos (amortiguador).....	29
Fig. 17. Puesta de huevos durante 10 días de organismos de la línea <i>flare</i> ³ tratados con zearalenona (ZEA), tolueno y amortiguador de fosfatos (amortiguador).....	30
Fig. 18. Efecto de la ZEA, tolueno y amortiguador de fosfatos sobre el número total de huevos puestos por moscas de las líneas <i>Oregon-flare</i> ³ y <i>flare</i> ³	31
Fig. 19. Frecuencia de manchas en organismos de la crucea Bioactivación Elevada (BE) tratadas con Agua, amortiguador, uretano y ZEA.....	32
Fig. 20. Frecuencia de manchas en organismos de la crucea Estándar (E) tratados con Agua, amortiguador, uretano y ZEA.....	34
Fig. 21. Cromatograma de los extractos de larvas de las líneas <i>Oregon-flare</i> ³ y <i>flare</i> ³ tratadas con ZEA 260 µM y del estándar de ZEA.....	35
Fig. 22. Cuantificación de ZEA incorporada por larvas de líneas <i>Oregon-flare</i> ³ y <i>flare</i> ³ de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
Fig. 23. Cromatograma del extracto de larvas tratadas con ZEA.....	37
Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% desnaturalizante de ARN total de larvas de las cruces E tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA y de larvas de la crucea BE tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA.....	38
Fig. 25. Análisis semicuantitativo de los ARNm de <i>Cyp6a2</i> y <i>Cyp6g1</i> en larvas de las cruces E tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y de larvas de la crucea BE tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA.....	39

Fig. 26. Concentración relativa de transcritos de los genes <i>Cyp6a2</i> y <i>Cyp6g1</i> para las cruzas E (a) y BE (b).....	40
Fig. 27. Productos de PCR punto final a partir de ADNc.....	41
Fig. 28. Concentración de los ARNm de <i>Hsp60</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Hsp83</i> y de <i>actina</i> en la línea <i>flare</i> ³ (FB: amortiguador de fosfatos, FT: tolueno y FZ: ZEA) y en la línea <i>Oregon-flare</i> ³ (OB: amortiguador de fosfatos, OT: tolueno y OZ: ZEA).....	43
Fig. 29. Concentración de los ARNm de <i>Hsp60</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Hsp83</i> y en la línea <i>flare</i> ³ (FB: amortiguador de fosfatos, FT: tolueno y FZ: ZEA) y en la línea <i>Oregon-flare</i> ³ (OB: amortiguador de fosfatos, OT: tolueno y OZ: ZEA) expresado y medido cuantitativamente mediante análisis densitométrico.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.....	24
Cuadro 2. Concentraciones de ZEA para la prueba CL ₅₀	25
Cuadro 3. Concentraciones subtóxicas de ZEA para organismos de las líneas <i>Oregon-flare</i> ³ y <i>flare</i> ³	27
Cuadro 4. Tipo y número de manchas en alas en individuos de la craza BE tratados con distintos compuestos.....	32
Cuadro 5. Tipo y número de manchas en alas en individuos de la craza E.....	33
Cuadro 6. Concentración promedio de ZEA incorporada por larvas de la craza E y BE de <i>D. melanogaster</i> mediante GC-MS.....	36
Cuadro 7. Resultado de la comparación de las secuencias de <i>Hsp</i> con las depositadas en los bancos de información genética.....	42

RESUMEN

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esteroidea producida por hongos del género *Fusarium*. La ZEA y sus metabolitos compiten con el 17 β -estradiol por la unión a receptores de estrógenos de la membrana celular, causando efectos tóxicos y genotóxicos en animales de granja y de laboratorio e inclusive en humanos. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos efectos son inducidos no son conocidos en su totalidad. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto tóxico y genotóxico de la ZEA utilizando dos líneas de *Drosophila melanogaster* que difieren en la expresión de *Citocromos p450* (*Cyp450*), con la finalidad de aproximarnos a las vías de activación y/o degradación de esta micotoxina. Para esto, se midió la emergencia y fecundidad de larvas tratadas, expresión de marcadores moleculares de estrés y finalmente realizando la prueba SMART en ala y midiendo expresión de *Cyp450*. Los resultados en el presente trabajo indican que los efectos tóxicos de la ZEA no modifican la mortalidad de organismos tratados, sin embargo se manifiestan en la disminución de la emergencia y fecundidad. Adicionalmente, se obtuvieron evidencias de que el metabolismo de la ZEA indujo estrés oxidativo al encontrar un aumento en la transcripción del gen *Hsp60*. Por otro lado se incrementó la transcripción del gen *Cyp6g1* y la prueba SMART reveló que la ZEA es genotóxica. Bajo este contexto podemos sugerir que el sistema enzimático Cit450 está involucrado en el metabolismo de la ZEA induciendo su toxicidad y genotoxicidad en *Drosophila melanogaster* y que los metabolitos resultantes alteran su desarrollo.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEA) is a nonsteroidal estrogenic mycotoxin produced by the genera *Fusarium*. ZEA and its metabolites compete with 17 β -estradiol in the binding to cytosolic estrogen receptors causing toxic and genotoxic effect in laboratory and farm animals, even in humans. However, the mechanisms whereby all these effects are induced are still not totally understood. The aim of the present work was determined the toxic and genotoxic effect in two *Drosophila melanogaster* strains that differ in the expression of *Cytochromes p450* (*Cyp450*) in order to approach the possible pathways of activation or degradation of this mycotoxin. For this, we measured the emergence and fecundity of treated larvae, expression of molecular markers of stress and finally performing the SMART test and measuring *Cyp450* expression. The results indicate that the toxic effects of ZEA are not reflected in a high mortality, however, showed a decrease in reproductive performance (emergence and fecundity), additionally we suggested that the metabolism of ZEA produced oxidative stress, and transcriptional increment of *Cyp6g1* gen involved in the xenobiotic metabolism. On the other hand, SMART test revealed that ZEA is genotoxic. In this context, we suggested that CYP450 enzymatic system are involved in the reduction of the carbonyl moiety of ZEA and the metabolites formed bind to estrogen receptors present in *Drosophila melanogaster* inducing toxicity and genotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios con un peso molecular relativamente pequeño (PM<700 Da) producidas principalmente por tres géneros de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociados con la diferenciación y esporulación. La mayor parte de estos metabolitos se originan de la ruta de los policétidos. Estas micotoxinas tienen una estructura general tipo R-CO-CH₂-CO-CH₂-CO-CH₂-CO-CH₂-CO-SCoA, de la cual se derivan la mayoría (Del Castillo, 2007). Estos compuestos contaminan granos destinados al consumo humano y del ganado; su concentración se incrementa en granos con largos periodos de almacenamiento y se caracterizan por su elevada toxicidad en el hombre y otros animales. Sus efectos pueden variar, dependiendo de la micotoxina, desde desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor hasta actividades cancerígenas, teratógenas o mutágenas (Betina, 1989).

Zearalenona (ZEA)

La ZEA (Figura 1) es una micotoxina estrogénica no esteroidea (Bennett y Klich, 2003), producida por especies del género *Fusarium*, con una estructura química claramente flexible que le permite adoptar una conformación que posibilita su unión al receptor de estrógenos en mamíferos (Urry *et al.*, 1966), compitiendo con el 17 β -estradiol (Figura 2) por los receptores de estrógeno en el citosol (Shier *et al.*, 2001; Bennett and Klich, 2003; Olsen, 1989). La unión de la ZEA al receptor estrogénico tiene como consecuencia cambios funcionales y morfológicos en el tracto reproductivo de animales de granja y de laboratorio expuestos (Shier *et al.*, 2001). Aunado a esto, se ha sugerido que la ZEA tiene efectos genotóxicos ya que induce la formación de aductos (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1995), y la fragmentación del ADN, además de la producción de micronúcleos y aberraciones cromosómicas (Abid-Essefi *et al.*, 2003; Ouanes *et al.*, 2003; Ouanes *et al.*, 2005), así como muerte celular (Abid-Essefi *et al.*, 2004; Ayed-Boussema *et al.*, 2007), inhibición de proteínas y peroxidación de lípidos (Abid-Essefi *et al.*, 2004; Ayed-Boussema *et al.*, 2007). Así, se ha documentado abundantemente que la ZEA tiene efecto tóxico y genotóxico

además de alterar procesos celulares, sin embargo, no se han establecido en su totalidad los procesos por los cuales la ZEA tiene estos efectos.

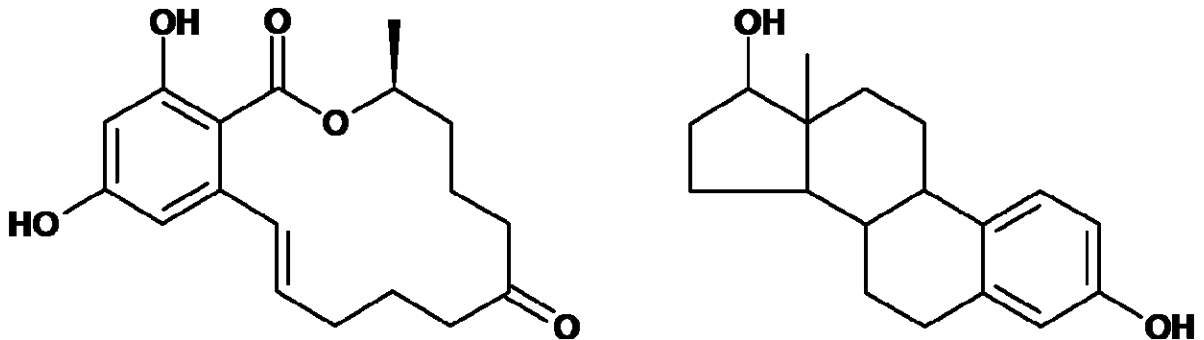


Fig. 1. Estructura química de la zearalenona **Fig. 2. Estructura química del estradiol**

Metabolismo Xenobiótico

El agua, el alimento, así como el aire, pueden contener compuestos que suelen ser tóxicos. La estructura química de estos compuestos y de sus metabolitos secundarios es muy variada, de modo que la maquinaria celular debe estar provista de numerosos catalizadores, para hacer frente a esta diversidad de químicos. Generalmente, los productos del metabolismo son solubles en agua, lo que facilita su eliminación y disminuye el riesgo de toxicidad. Sin embargo, en ocasiones se obtiene un producto intermedio que puede ser más reactivo incluso que el original y puede reaccionar con macromoléculas celulares, como proteínas, lípidos y ADN (Rodríguez Arnaiz, 2003).

Los seres vivos tienen capacidades metabólicas diferentes ya que los complejos enzimáticos detoxificadores difieren entre las especies, por ejemplo, el pesticida malatión que el hombre utiliza para combatir los insectos, se hidroliza en los seres humanos produciendo un compuesto estable que se conjuga y elimina a través de la orina, mientras que en insectos, este pesticida se oxida e inhibe a la enzima colinesterasa, necesaria para la neurotransmisión de los impulsos nerviosos mediados por la acetilcolina, provocando parálisis neuromuscular y la muerte del insecto (Rodríguez Arnaiz, 2003).

Existen también diferencias en la respuesta de los individuos de una misma especie. El sexo es otro elemento por considerar; en algunas especies, como el hombre, el macho excreta más eficientemente algunos tóxicos (Rodríguez Arnaiz, 2003). El balance entre la desintoxicación y activación determina si el daño provocado por la exposición a un compuesto químico se expresa o no en el organismo.

Como se esbozó, las células poseen estrategias que eliminan compuestos de naturaleza hidrofóbica, como el llamado metabolismo xenobiótico. Este metabolismo consta de tres fases (Xu *et al.*, 2005). La fase I incluye a todas las reacciones que introducen grupos funcionales o reactivos a las moléculas, e incluyen reacciones químicas, como la hidrólisis, oxidación y reducción. Esta fase es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los Citocromos P450 (Cit450). La fase II consiste en la conjugación de los metabolitos generados en la fase I con aminoácidos, ácido glutámico o glutatión. Estas conjugaciones facilitan el transporte y eliminación de los metabolitos; la fase es catalizada fundamentalmente por glutatión transferasas. Adicionalmente, se ha descrito un sistema de proteínas de membrana que forman canales llamado *ATP-binding cassette* (ABC) que es capaz de remover drogas y metabolitos de la célula (Oram, 2002)

Los Cit450 fueron descritos por Omura y Sato (1964) como un pigmento celular, reducido y unido a la membrana, con un pico de absorción inusual a los 450nm (que le dio su nombre). Demostraron su naturaleza hemoproteica y capacidad de unirse al monóxido de carbono tras ser reducido por NADPH o por la ditionita. Más adelante, se relacionó su función catalítica con el metabolismo de fármacos y compuestos tóxicos. Los Cit450 son oxidasas finales de un complejo multienzimático del tipo tiolasas, presente en la mayoría de los tejidos (Burke, 1971), pero particularmente activo en tejidos involucrados en el procesamiento de alimentos. Se han encontrado en prácticamente todas las membranas subcelulares, siendo la mitocondria y el retículo endoplásmico liso (REL) donde se encuentran en mayor concentración (Rodríguez Arnaiz, 2004).

Los Cit450 presentan una enorme versatilidad funcional, intervienen en reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (Plant, 2003), metabolizan compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminos biogénicos, prostaglandinas, vitaminas, xenobióticos, tales como los metabolitos de la dieta, drogas, pesticidas, contaminantes ambientales y metabolitos de plantas (González *et al.*, 1991; Gandhi *et al.*, 1992) por medio de

hidroxilación alifática, hidroxilaciones aromáticas, epoxidaciones de alquenos, O-dialquilaciones; N-hidroxilaciones, N-desalquilaciones o deshalogenación oxidante (Rockstein, 1978).

Como hemoproteínas, los Cit450 ligan el Fe^{2+} del grupo hemo por puentes tiolato (uniones cisteína-cisteína mediante sus grupos tiol o sulfhidrilo $-SH$) a un dominio cisteinil muy conservado de 26 residuos por medio de los aminoácidos 14 y 17 (Hobbs *et al.*, 1986; González y Gelboin, 1992) (Figura 3).

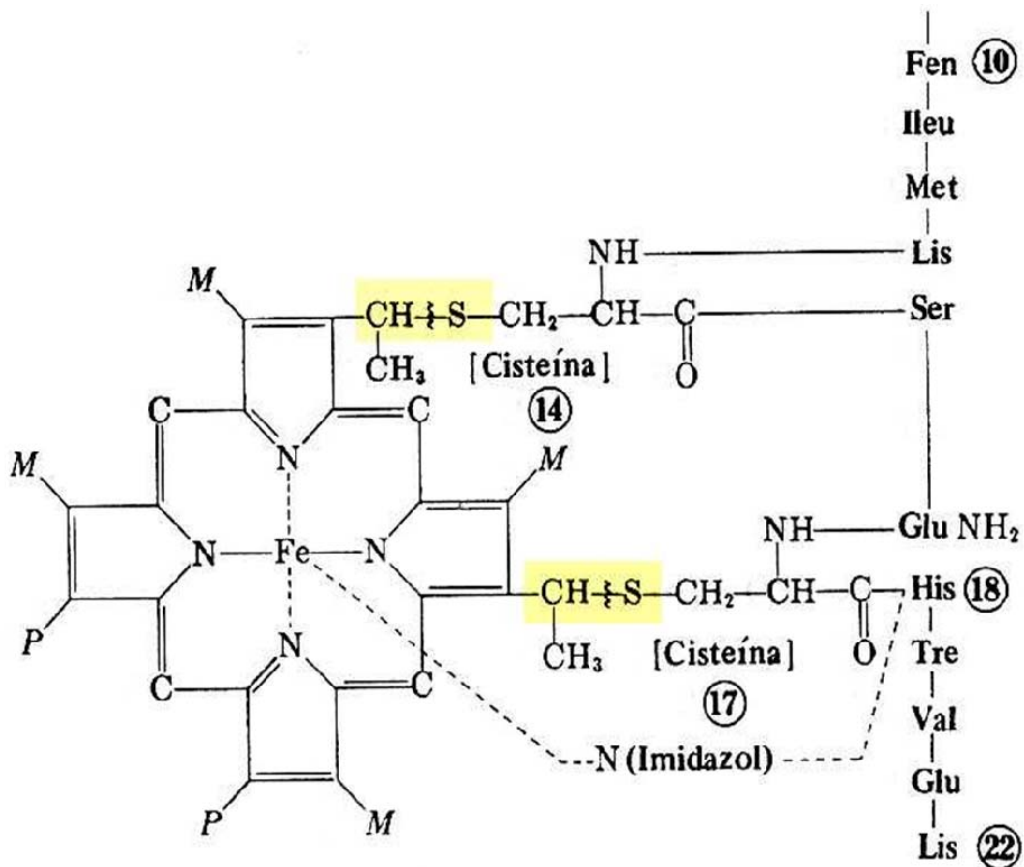


Fig. 3. Citocromo p450 y su grupo hemo unido por puentes tiol (-SH) de cisteína (tomado de Burke, 1971).

En el mecanismo de oxidación por los Cit450 participa el hierro (Fe^{3+}) presente en el grupo hemo del Cit450 oxidado, el xenobiótico o sustrato (SH), el o los productos hidroxilados (ROH), el NADH, el oxígeno molecular y el agua. En las reacciones enzimáticas de mono oxigenación interviene el oxígeno molecular y el NADPH, este mecanismo enzimático está

asociado con el estrés oxidativo, ya que en este ciclo de óxido-reducción se libera el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por medio de la peroxidasa se forma agua y el mecanismo de la hidroxilación de un sustrato orgánico SH (sustrato principal) al producto hidroxilado (SOH) se lleva a cabo a expensas de uno de los átomos de una molécula de oxígeno. El otro átomo es reducido a H_2O por los equivalentes de reducción proporcionados por el NADPH (co-sustrato), habitualmente transferidos al Cit450 (Halliwell y Gutteridge, 2007) (Figura 4).

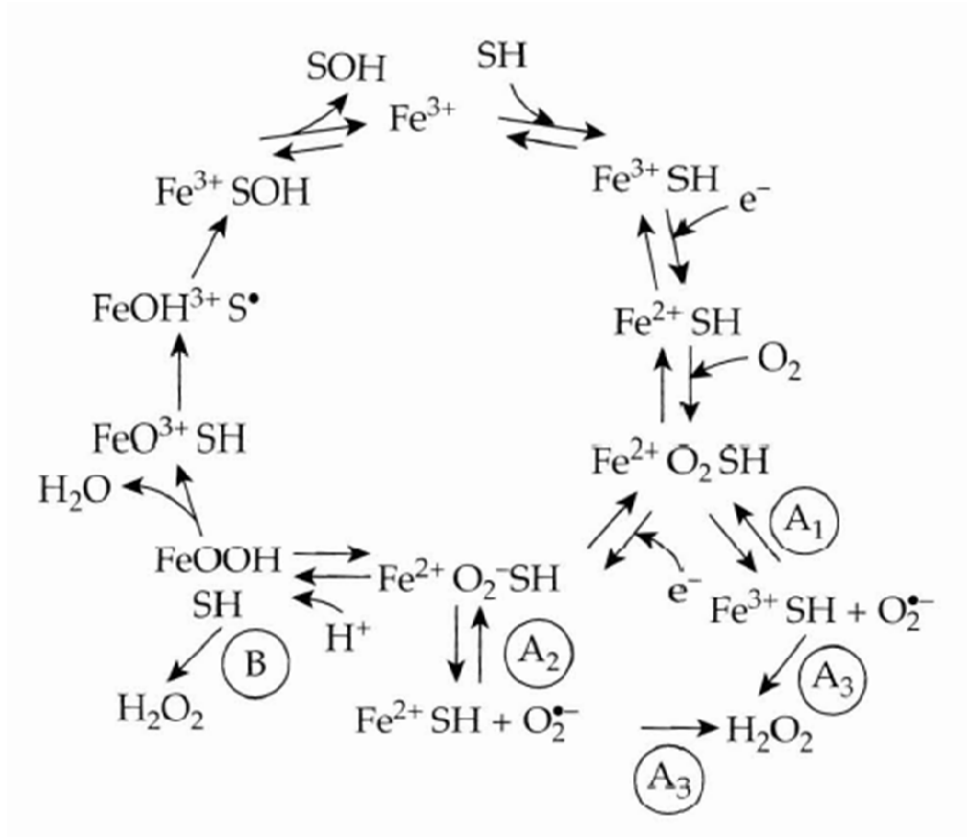


Fig. 4. Ciclo catalítico de los citocromos P450. Se muestran marcados dentro de un círculo los puntos donde se pueden generar especies reactivas de oxígeno y radicales libres, los cuales pueden ocasionar estrés oxidativo (Tomado de Halliwell y Gutteridge, 2007).

Por lo tanto, en el metabolismo xenobiótico mediado por el sistema enzimático de los Cit450 pueden producir especies reactivas de oxígeno (ERO) que son un subgrupo de moléculas oxidantes, que como su nombre lo indican, son altamente reactivas y radicales

libres que no solo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que adicionalmente pueden generar reacciones oxidativas en cadena y de esta manera generar estrés oxidativo, e inducir mecanismos de defensa antioxidante como las proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés) (Maeda, 2009). Adicionalmente, los metabolitos generados por los Cit450 pueden resultar más reactivos que los originales y dañar a la célula, proceso denominado bioactivación.

Bajo este contexto, el estrés oxidativo se define como un desbalance entre los agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que potencialmente puede ocasionar daño celular (Halliwell y Gutteridge, 2007). Se presenta bajo condiciones celulares adversas que sobrepasan los sistemas biológicos de defensa (Scandalios, 2005). Un oxidante es un compuesto electrofílico y que tienen la capacidad de reaccionar con macromoléculas, la mayoría de ellas de importancia biológica. Por otro lado los antioxidantes son aquellas moléculas capaces de evitar el daño potencial de los oxidantes. Los antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos, los enzimáticos son: superóxido dismutasa (SOD), superóxido reductasa (SOR), glutatión S transferasa, glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT) y peroxidasa. Los no enzimáticos son aquellos que llevan a cabo una función de quelantes o recolectores de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Un claro y rápido indicador de estrés oxidativo es un incremento endógeno de ERO y la inducción de la defensa antioxidante, este último incluye proteínas de estrés como las Hsp (Lindquist y Craig, 1988). Las Hsp originalmente descubiertas como proteínas de defensa ante estrés térmico desempeñan varias actividades entre las que destacan las de chaperonas durante la síntesis, enrollamiento, ensamble y degradación de proteínas (Morimoto, 1993).

Función y Regulación de los Cit450

En eucariontes los Cit450 se encuentran en el REL, así como, en las mitocondrias (Humphreys y Chapple 2004). En todos los insectos, los Cit450 están involucrados en su crecimiento y desarrollo a través del procesamiento de ácidos grasos, hormonas y feromonas. Los Cit450 catalizan un amplio rango de reacciones, tales como, la biotransformación de metabolitos secundarios de vegetales y de productos químicos

sintéticos (como insecticidas). En larvas de insectos los Cit450 están presentes en las células del tubo digestivo, en los cuerpos grasos y en el aparato reproductivo, mientras que en adultos se expresan en los tubos de Malpighi (Feyereisen, 1999). En vertebrados se encuentran en la mayoría de tejidos, pero las cantidades más elevadas están presentes en el hígado, intestino, pulmones, riñón, ovarios, testículos, glándulas suprarrenales y placenta (Rodríguez Arnáiz, 2004).

Metabolismo de la ZEA

Kiessling y Pettersson (1978) y Mirocha *et al.* (1980), proponen que la ZEA es metabolizada a través de su reducción a zearalenoles. En esta reducción se producen al menos cinco metabolitos, α y β zearalanona α y β zearalenol y zearalanol (Figura 5), que compiten por los receptores de estrógenos e inician una serie de vías y procesos celulares que alteran morfológica y funcionalmente los órganos sexuales de mamíferos (Miles *et al.*, 1996). Estudios *in vitro* indican que la ZEA se une y activa al receptor de estrógenos (Olsen, 1989), incrementa el riesgo al cáncer ya que puede alterar la respuesta inmune (Murata *et al.*, 2003), la diferenciación celular (Le y Pakdel 2001) y la expresión enzimática. Zengli *et al.* (2004) mencionan que la capacidad de la ZEA de afectar a las enzimas que metabolizan estrógenos especialmente a los Cit450, los cuales están involucrados en el metabolismo oxidativo de estrógenos puede resultar en un aumento en el riesgo de cáncer.

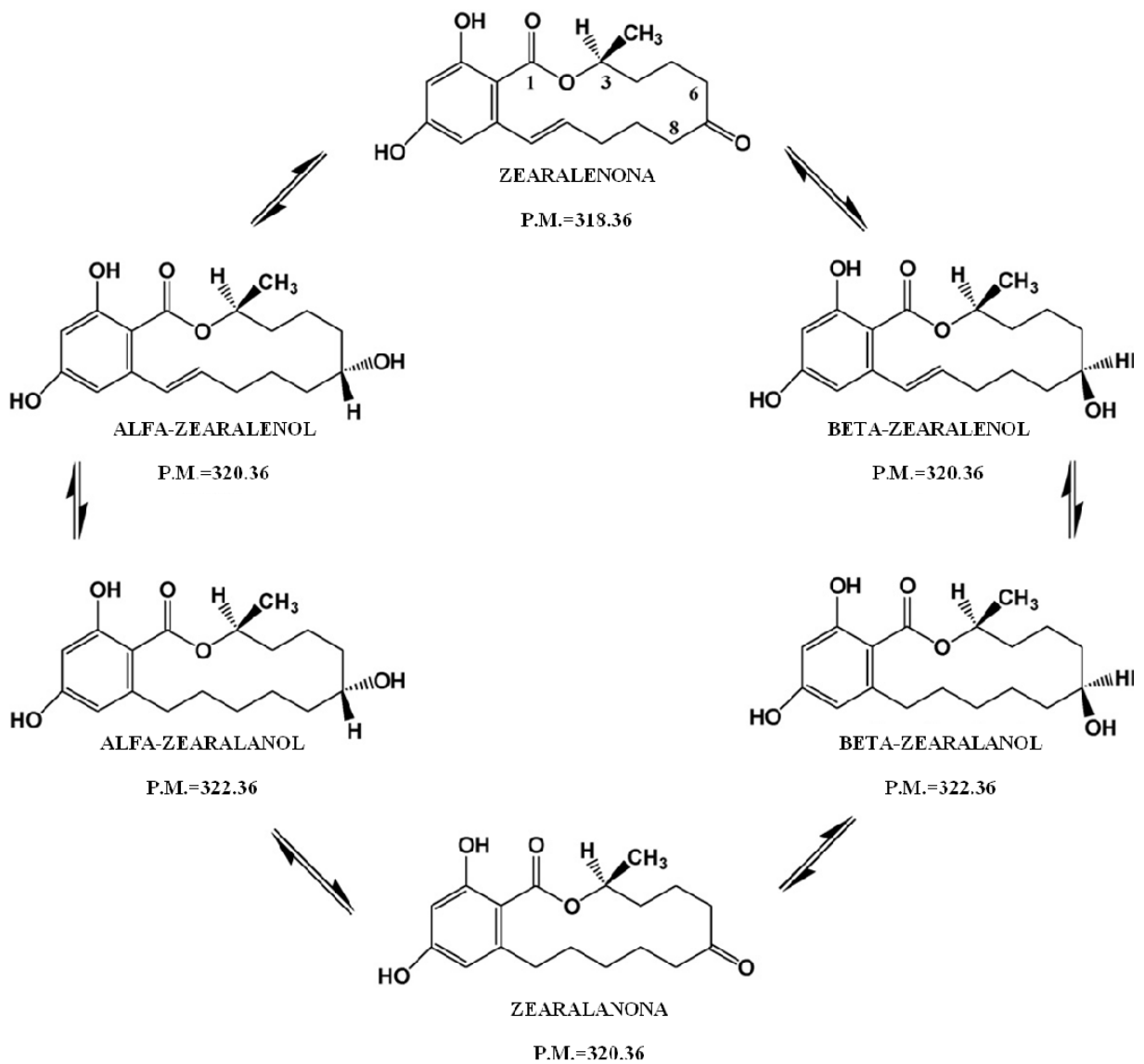


Fig. 5. Estructura química y metabolismo de zearalenona y sus metabolitos (Tomado de Kinani *et al.*, 2008)

Receptores de esteroides en *Drosophila melanogaster*

La superfamilia de los receptores de esteroides comprende a factores transcripcionales que incluyen al receptor de hormonas esteroideas y pequeñas hormonas hidrofóbicas a las que se conoce como receptores huérfanos (orphan receptors). La secuencia de esos receptores sugiere un origen común y es evidencia de una elevada conservación evolutiva de la estructura y de sus mecanismos moleculares (William, 1994). En la Figura 6 se comparan los receptores de *Drosophila melanogaster* con los de humano.

En *Drosophila*, los receptores de esteroides están implicados en numerosos aspectos del desarrollo embrionario y postembrionario. En particular, un gran número de receptores huérfanos están involucrados en la regulación de ecdiesteroides, los cuales regulan la muda y la metamorfosis (William, 1994).

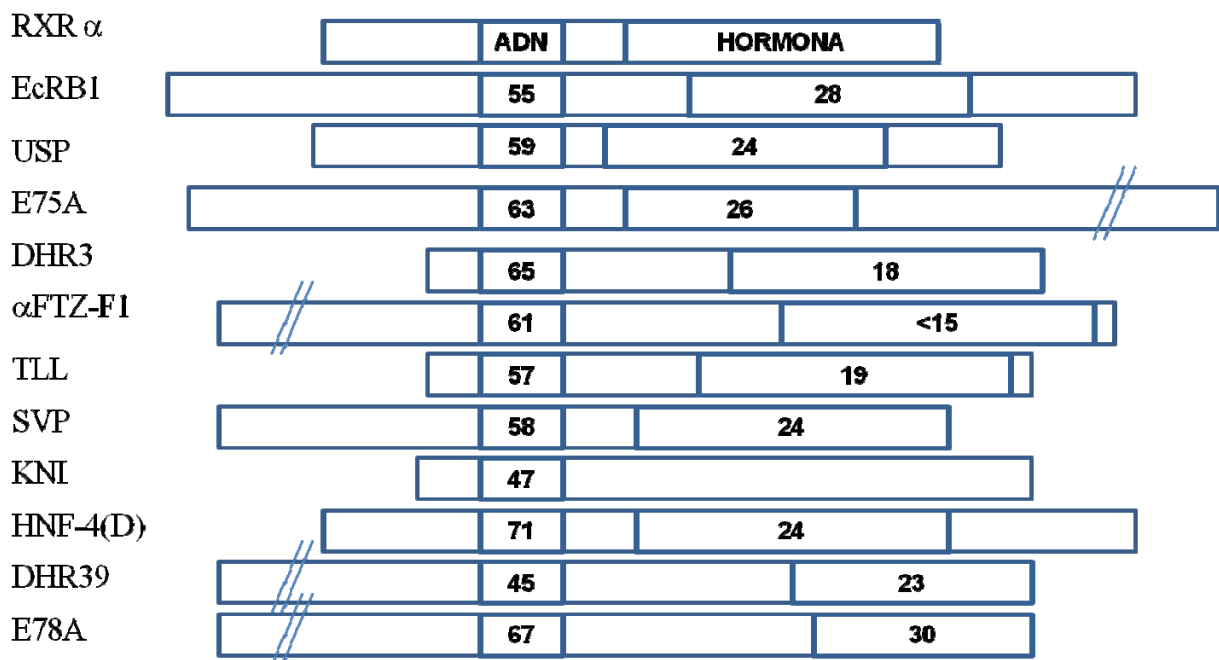


Fig. 6. Comparación esquemática del receptor de ácido retinoico de humano (RXR α) y los receptores de esteroides de *Drosophila melanogaster*. Se muestra la identidad en la secuencia de aminoácidos de las proteínas y la identidad de los sitios de unión al ADN (Tomado de William, 1994).

Capacidad Genotóxica de ZEA

La prueba SMART es un sistema *in vivo* que detecta genotóxicos y promutágenos que requieren ser bioactivados, como es el caso de productos de pirólisis, nitrosaminas, hidrazinas, dihaloalcanos, compuestos aromáticos policíclicos, alcaloides de pirrolizidina, aflatoxinas, entre otros (Graf *et al.*, 1984). La prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* también permite evaluar las relaciones entre la estructura y la actividad de grupos de compuestos y la genotoxicidad de mezclas complejas (Graf *et al.*, 1984; Graf *et al.*, 1996). Se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas de organismos transheterocigóticos debido a la pérdida de heterocigosis de marcadores genéticos que determinan manchas o clones de tricomas en las alas de organismos adultos (Graf *et al.*, 1984). Estas manchas se pueden observar, contabilizar y analizar estadísticamente, comparando el tipo y frecuencia con las alas de organismos no expuestos o testigos (Graf *et al.*, 1996). Las dimensiones de las manchas dependen del momento en que se provocó la mutación o la recombinación y de la edad la larva. Por ejemplo, cuando aparecen grandes clones o manchas multiple wing hairs (*mwh*) (Figura 7) significa que el daño fue en los primeros momentos de diferenciación larvaria, por lo tanto, el compuesto evaluado causó mutaciones de manera directa y temprana en el desarrollo; cuando la frecuencia de estos clones es elevado en manchas pequeñas quiere decir que el compuesto a prueba es un promutágeno que tuvo que ser metabolizado (bioactivado) para inducir mutación y por consiguiente el daño no fue al inicio del tercer estadio larvario (Graf, 1995) o que produjo aneuploidía, lo cual impediría que ocurrieran mitosis sucesivas.

Las manchas simples se observan como tricomas múltiples *mwh* o mal formados *flr*³ (Figura 8) que son resultado de eventos genotóxicos como la delección, mutación puntual, no disyunción o recombinación entre los marcadores. Las manchas gemelas indican recombinación en la zona cercana al centrómero del cromosoma 3, por lo que se expresan juntos los marcadores *flr*³ y *mwh* (Graf, 1995).

El sistema SMART emplea las líneas, *multiple wing hairs (mwh/mwh)*, *flare*³ (*flr*³/ *TM3*, *Bd*^S) y *Oregon-flare*³ (*ORR(1);ORR(2); flr*³/ *TM3*, *Bd*^S). Esta última presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon *R(R)* resistente al DDT. La mutación dominante en el cromosoma 2 determina la expresión elevada de los genes *Cyp450* mientras que la línea

*flare*³ es inducible para los *Cyp450* (Saner *et al.*, 1996), por lo tanto, esta condición permite valorar la activación *in vivo* de promutágenos.

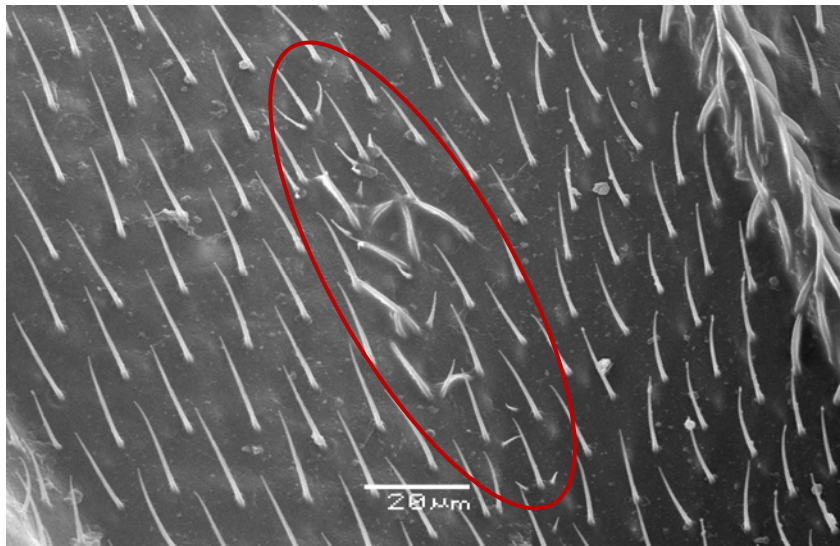


Fig. 7. Mancha grande *mwh*. Mutación homocigótica localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). En homocigosis, este marcador produce tricomas múltiples por célula en lugar de un tricoma único presente en la condición silvestre. Fotografía en microscopía electrónica de barrido, tomada por M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga en 2011.

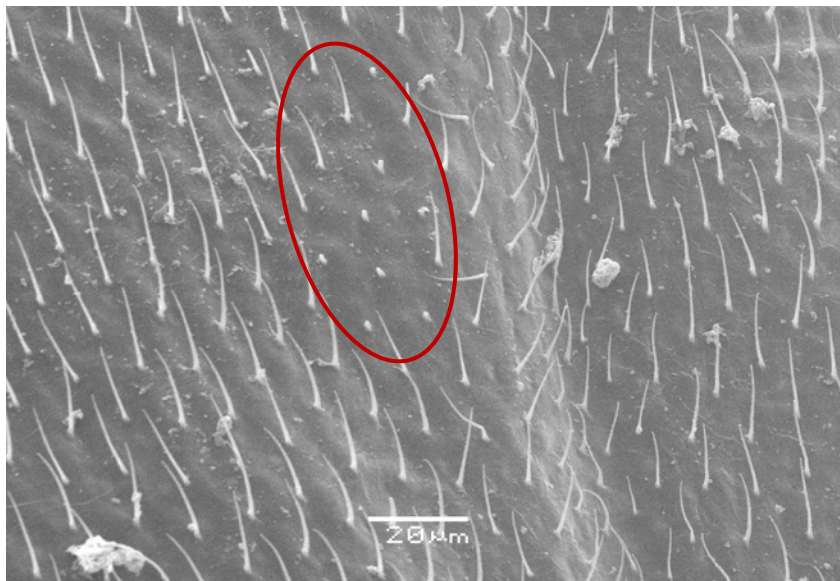


Fig. 8. Mancha grande *flr*³. Mutación que afecta la forma de los tricomas, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) que en homocigosis es letal para el organismo, pero no para las células del ala (Graf, 1995). Se mantiene la heterocigosis por efecto de un cromosoma balaceador (TM3). Fotografía en microscopía electrónica de barrido, tomada por M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga en 2011.

Como se mencionó anteriormente, la ZEA está presente en granos y semillas de todo el mundo destinados al consumo de animales de granja y de laboratorio inclusive para el consumo humano. Está ampliamente documentado en estudios in vitro que la ZEA tiene efecto tóxico y genotóxico además de alterar procesos celulares que incrementan el riesgo a cáncer, sin embargo, no se han establecido en su totalidad los procesos por los cuales la ZEA tiene estos efectos. Por lo cual el presente trabajo está enfocado a determinar si la ZEA es tóxica y/o genotóxica para *Drosophila melanogaster* y si dos *Cyp450* pertenecientes a la familia 6 de *Drosophila melanogaster* homóloga a la familia 3 de humanos están involucrados en el metabolismo de esta micotoxina.

OBJETIVOS

Generales

- Determinar la toxicidad de la ZEA y su efecto sobre parámetros reproductivos (emergencia y fecundidad) en larvas de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*.
- Determinar si la ZEA induce la transcripción de genes *Hsp* como una forma de respuesta celular ante el estrés.
- Determinar mediante el ensayo SMART en ala si la ZEA tiene efecto genotóxico en *D. melanogaster*
- Determinar si la ingesta de la ZEA modifica la tasa de transcripción de algunos *Cyp450* con la finalidad de aproximarnos a una posible explicación de la vía de activación o degradación.

Particulares

- Propagación de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*.
- Obtención de larvas de tercer estadio de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³.
- Determinar la concentración subtóxica de la ZEA para larvas de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³
- Determinación de la emergencia y fecundidad de organismos de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ tratadas con la ZEA.
- Determinar la concentración de la ZEA en larvas *Oregon-flare*³ y *flare*³ y en larvas de cruza Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).
- Determinar la concentración de transcritos de genes *Hsp60* *Hsp70* y *Hsp83*
- Obtención de hembras vírgenes de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*, así como de machos *mwh*, para la realización de las cruza E y BE.
- Realización de la prueba SMART.
- Determinación de la concentración de transcritos de *Cyp450*

HIPÓTESIS

El efecto genotóxico de la ZEA, se evidenciara al incrementar el número de manchas en las alas de moscas *Drosophila melanogaster* tratadas en el bioensayo SMART. Asimismo, la participación del sistema enzimático Cit450 y el sistema de protección de las HSP en el metabolismo de la ZEA se evidenciará después del tratamiento, mediante la modificación en la concentración de esos transcritos en larvas de la cruza E y BE comparándolas con las concentraciones en larvas no tratadas.

METODOLOGÍA

Pruebas de toxicidad

Se determinó una concentración de la ZEA (CAS-No. 17924-92-42. Sigma Aldrich, San Louis Missouri, USA) subtóxica para las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*, las cuales se utilizan en la prueba SMART en ala. Para ello, se realizó la prueba de toxicidad CL₅₀ (concentración letal media). La CL₅₀ es la concentración de un compuesto que estadísticamente es la causa (durante o después de la exposición en un plazo determinado) de la muerte del 50% de una población.

Cultivo y propagación de las líneas de *Drosophila melanogaster*

Las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ se cultivaron y se propagaron en frascos de vidrio de 250 mL con 5 g de hojuela de papa y 20 mL de solución conservadora [5mL de tegosept al 12%(OH) y 5 mL de ácido propiónico, aforados a 1 L de agua. (Dueñas *et al.*, 2001)]. Las líneas se mantuvieron a 25°C con humedad relativa de 65% y en total obscuridad hasta obtener la cantidad necesaria de organismos para los experimentos.

Sincronización y colecta de huevos

Como los organismos que se propagaron no tenían la misma edad, se eliminaron las moscas adultas. Al emerger los organismos restantes, los adultos se trasvasaron una última vez para colectar huevos durante 8 h, las larvas obtenidas de esta manera fueron utilizadas en los tratamientos con la seguridad que todas eran de tercer estadio y tenían 72 ± 4 h

Recuperación de larvas y tratamientos agudos

Se recuperaron larvas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de tercer estadio y se colocaron en un cuadro de organza sobre una caja de Petri. Con ayuda de una espátula de acero y un pincel se tomaron 10 larvas y se colocaron en viales de vidrio conteniendo 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina (MIC) y 2 mL de una solución con ZEA a la concentración establecida previamente para cada tratamiento (100, 200, 300 y 500 μ M). Se incubaron a 25°C con humedad relativa de 65% y completa oscuridad. Se verificó el estado de los tratamientos durante 10 días, registrando cualquier cambio en el ciclo de vida. Al término

de los 10 días se consideraron como vivos a los organismos que emergieron de la pupa y se desplazaban dentro del tubo. Se realizaron cuatro experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Análisis estadístico

Se elaboró un gráfico de dispersión con las concentraciones estudiadas, se observó la tendencia de los puntos, se ajustaron los puntos con el modelo matemático que ajustara al valor de R^2 más alto y finalmente, con base en la ecuación obtenida, se calculó una concentración subtóxica CL_{20} de la ZEA para *Drosophila melanogaster*. Los datos se expresan en μM y el número de individuos fue de 30 para cada tratamiento.

Eficiencia reproductiva (Emergencia y Fecundidad)

Emergencia

Se determinó la eficiencia reproductiva de moscas *Oregon-flare*³ y *flare*³ tratadas con la concentración subtóxica CL_{20} de ZEA (260 μM) haciendo ligeras modificaciones al método reportado por Gayathri y Krishnamurthy (1981).

Se recuperaron larvas de tercer estadio de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³, se colocaron 10 organismos en un vial conteniendo uno de los siguientes tratamientos: ZEA 260 μM , amortiguador de fosfatos 150 mM pH 7 o tolueno 50 mM (Figura 9) con 0.5 g de MIC. Se montaron cinco repeticiones de cada tratamiento y se incubaron durante 7 días a 25°C con humedad relativa de 65% y en completa obscuridad. Concluido este periodo, se consideró como emergencia el número de organismos adultos recuperados.

Fecundidad

Conforme emergían los organismos, se separaron hembras de machos para propagar la línea, para lo cual se colocaron aproximadamente 100 individuos de cada sexo en frascos de vidrio de 250 mL con MIC y solución conservadora. Los frascos fueron mantenidos a 25°C durante 24 h, al cabo se transfirió una hembra y un macho a un nuevo vial conteniendo la misma mezcla. Se montaron 5 viales de cada uno de los tres tratamientos

para cada línea y se mantuvieron en las condiciones descritas durante 10 días, cada día se registró el número de huevos puestos.

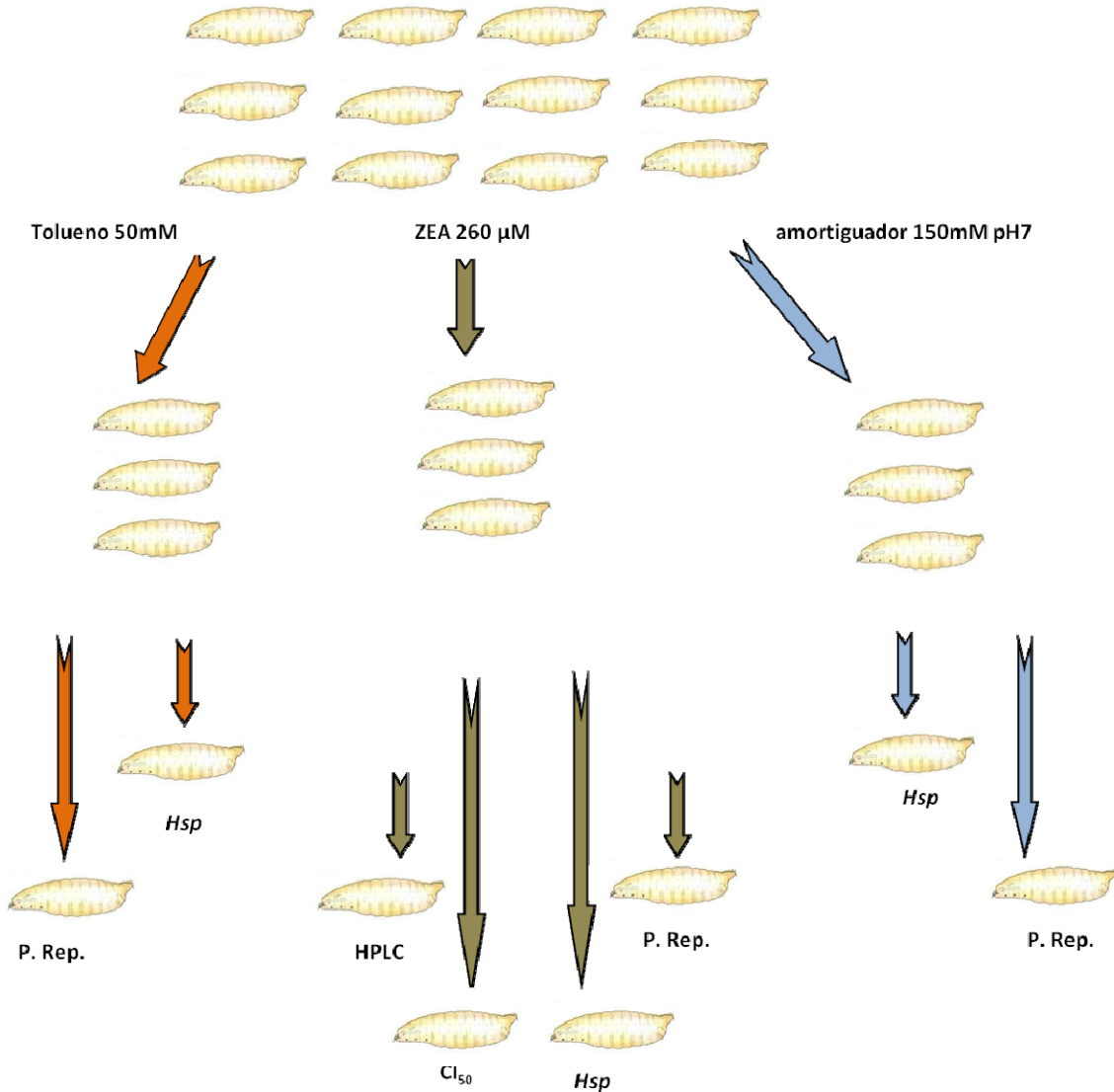


Fig. 9. Diseño experimental de los tratamientos tolueno, ZEA y amortiguador de fosfatos para las pruebas de parámetros reproductivos (P. Rep.) Cuantificación de transcritos de los genes *Hsp* concentración letal media (CL_{50}) y cuantificación de ZEA incorporada mediante HPLC (HPLC) en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*. Los tratamientos fueron similares para las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³.

Pruebas de Genotoxicidad

Se aislaron hembras vírgenes de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ y machos de la línea *multiple wing hairs*, con base en el dimorfismo sexual (Figura 10 y 11).

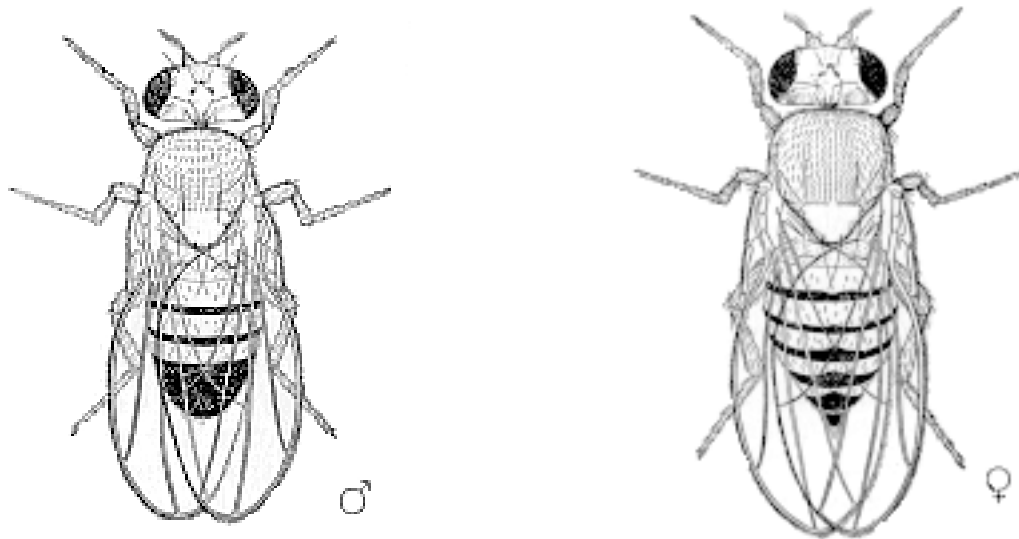


Fig. 10. Dimorfismo sexual entre machos y hembras de *Drosophila melanogaster*. Tomado de <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

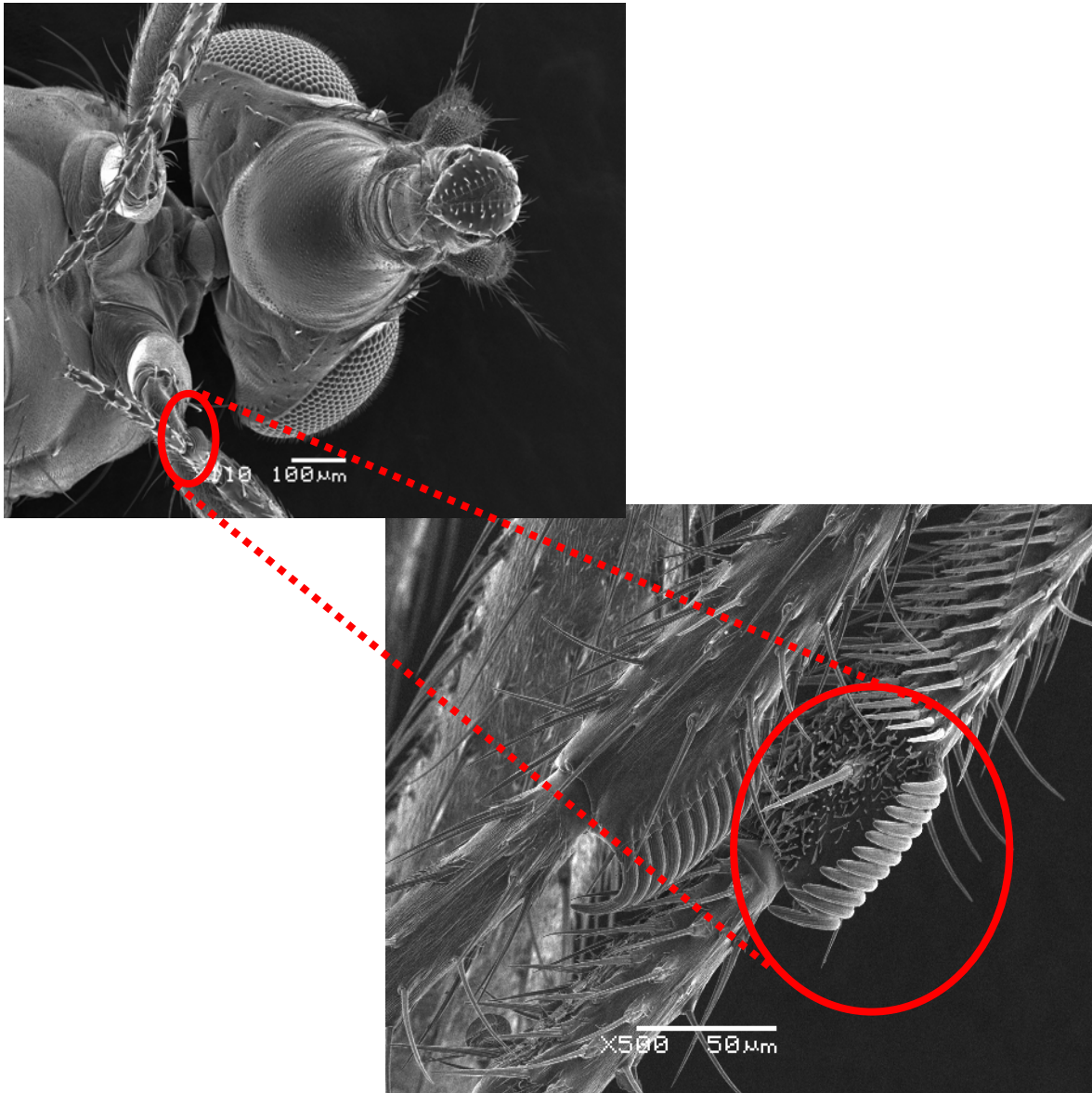


Fig. 11. Peine sexual de machos de *Drosophila melanogaster*. Fotografía en microscopía electrónica de barrido, tomada por M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga en 2011.

Realización de cruzas

La craza Estándar (E) se realizó con hembras vírgenes de la línea *flare*³ y machos de la línea *multiple wing hairs*, la craza Bioactivación Elevada (BE) con hembras vírgenes de la línea *Oregon-flare*³ y machos de la línea *multiple wing hairs*. Los frascos con los organismos se mantuvieron durante tres días a 25°C, con 65% de humedad en total oscuridad. Al término se transfirieron a frascos de vidrio de 250 mL con levadura fresca activada y suplementada con sacarosa y mantenidos en las mismas condiciones durante 8 h para que realizaran la ovoposición. Posteriormente, los adultos fueron retirados y los huevos continuaron en incubación durante 72 ± 4 h, al cabo de este periodo, se recuperaron larvas lavando el medio con agua corriente a temperatura ambiente en una coladera de malla fina.

Las larvas se dividieron en grupos para la administración de los tratamientos: uretano 20 mM, como control positivo de genotoxicidad, Agua, amortiguador de fosfatos 150 mM pH 7 y ZEA (260 μ M) como se muestra en la Figura 12. Los organismos permanecieron durante 48 h a 25°C, con 65% de humedad y en total oscuridad, posteriormente, las larvas de cada tratamiento se dividieron en tres grupos: uno se colocó en frascos con MIC hasta que las larvas alcanzaran la etapa adulta para contabilizar el número y tipo de manchas en alas. Los grupos restantes se congelaron inmediatamente a -70°C para ser utilizados en la determinación de los niveles de transcritos, cuantificación de toxina incorporada y metabolitos generados (Figura 12). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento para las dos cruzas.

Los organismos del grupo SMART permanecieron a 25° C con 65% de humedad en completa oscuridad. Al emerger los imagos se colocaron en frascos con etanol al 70%, se separaron las moscas con fenotipo silvestre (trans-heterocigotas) para disectar las alas y montarlas en preparaciones permanentes con solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 mL de agua destilada). Se analizaron en el microscopio óptico (40X) las superficies dorsal y ventral de las alas para registrar el tipo y número de manchas (Graf *et al.*, 1984).

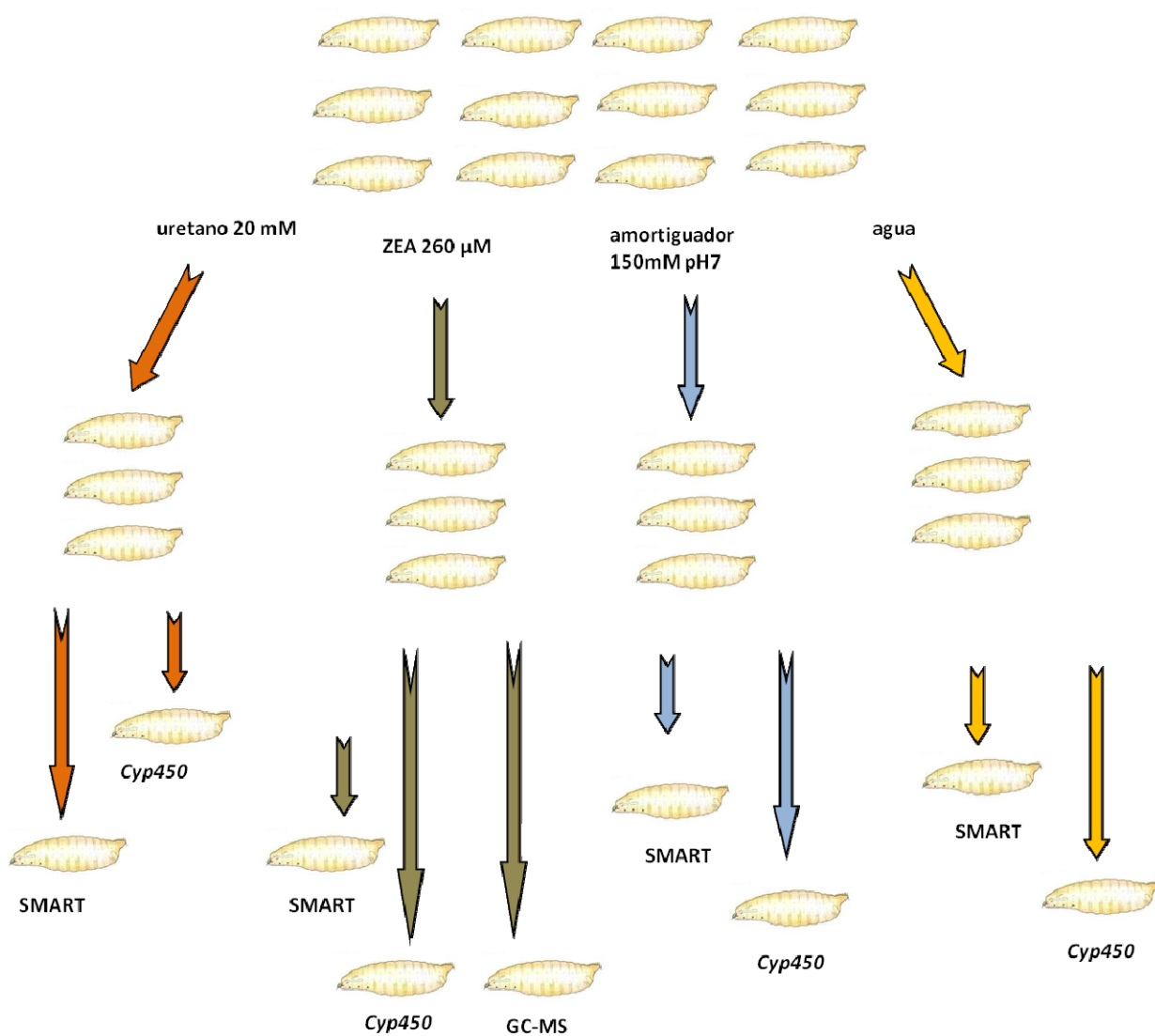


Fig. 12. Diseño experimental de los tratamientos de uretano, ZEA, amortiguados de fosfatos y agua en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* para las pruebas de genotoxicidad (SMART), cuantificación de transcritos de *Cyp450* (*Cyp450*) e identificación y cuantificación de ZEA y sus metabolitos para las cruces E y BE.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SMART para PC de Frei y Würzler (ETH, Suiza), para evaluar la frecuencia de las manchas en las alas, con ji cuadrada para proporciones. Los datos se expresan en frecuencias de las manchas y el número de individuos por tratamiento fue de 60

Determinación de la ZEA incorporada por larvas

La concentración de la ZEA incorporada por las larvas fue medida mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un fluorómetro. El modelo utilizado fue un sistema Agilent serie 1100 equipado con un inyector manual (Agilent) con un loop de 20 μ L, un degasificador de solventes en línea (Agilent), un bomba (Agilent), un fluorómetro (Perkin Elmer). El análisis cromatográfico se realizó siguiendo el método descrito por Visconti y Pascale (1998). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Fase móvil: metanol: ácido acético 1% (62:38 v/v), el flujo se mantuvo constante durante la corrida en 1 mL/min, la columna [Allsphere ods-1(250mm x 4.6mm)] se mantuvo a temperatura ambiente. La detección de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el método reportado por Visconti y Pascale (1998). La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la de emisión de 460 nm.

Identificación y cuantificación de metabolitos de la ZEA mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Derivatización

Se tomaron 15 larvas de cada repetición del tratamiento con la ZEA para cada cruza, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 0.5 mL metanol grado HPLC y se maceraron con un pistilo de teflón. Posteriormente, se centrifugaron durante dos minutos a 14,000 rpm, se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo, al cual se agregaron 100 μ L de cloroformo grado HPLC, se agitó en vórtex y se centrifugó durante 1min a 14,000 rpm, se recuperó la parte inferior y se colocó en un vial con tapa de teflón. Las muestras se evaporaron con nitrógeno hasta sequedad y se

adicionaron 60 μL de agente silanzante N,O-bis(trimetilsili) trifluoroacetamida con 1% trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS), se agitaron durante 30 segundos e incubaron a 70°C durante 0.5 h. Una vez transcurrido este tiempo se inyectaron 3.0 μL de muestra al equipo.

Condiciones del GC-MS

La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar Agilent HP-5MS con un grosor de película de 0.25 μm y una longitud de 30 m, con las siguientes condiciones de corrida: Temperatura del inyector de 300°C, el programa de temperatura del horno inició a 140°C por 0.5 min con una primera rampa a 20°C/ min hasta 300°C y se mantuvo 6.5 min acoplado a un espectómetro de masas 5975C VL MSD, *Agilent Technologies*.

De todos los extractos, incluido el estándar, se inyectaron 1.5 μL en el modo *splitless* (permite una mayor entrada de muestra y por lo tanto una mayor concentración de ésta) con una tasa de purga de 0.2 mL/min, se utilizó como gas acarreador Helio con una pureza de 99.98% con un flujo constante de 1.4 mL /min. El flujo de purga fue de 0.2 mL/min con un tiempo de 0.1 min, el espectro de masas tuvo un rango de barrido completo de 35 a 600 m/z, la energía de ionización electrónica fue de 70eV, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C y la temperatura del cuadrupolo de 150°C. Todos los productos fueron identificados con el software *Agilent Technologies* usando la biblioteca *NIST08*.

Ensayos moleculares.

Concentración de transcritos de los genes *Hsp* (en larvas de las líneas *Oregon-flare*³ and *flare*³) y *Cyp450* (en larvas de las cuzas E y BE)

Aislamiento de RNA total

Larvas tratadas durante 24 h fueron colectadas e inmediatamente congeladas a -70°C hasta su uso. El ARN total se obtuvo mediante el sistema de extracción de TRIzol (CAT No. 15596-018 de Invitrogen CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor y resuspendido en 50 μL de agua libre de RNAsas. Una alícuota de ese material fue utilizado para verificar su concentración y calidad mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% desnaturizante, el resto fue inmediatamente almacenado a -70°C hasta su uso.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc fue sintetizado por transcripción reversa usando oligo dT-GAGA y la reverso transcriptasa *Super Script III* (Invitrogen, California USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de esta reacción fue amplificado por PCR punto final y PCR semicuantitativo usando los cebadores (primers) para β -actina, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp83*, *Cyp6a2* y *Cyp6g1*. La mezcla de reacción para síntesis de ADNc consistió de ARN total, 3 μ L de oligo dT-GAGA, 6 μ L de 5x buffer *First strand*, 3 μ L dNTPs, 3 μ L de DTT y 1.5 μ L de reverso transcriptasa Super script II y agua estéril para tener un volumen final de 15 μ L. El producto de la reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADNc de los grupos testigo y con tratamiento fue amplificado mediante PCR. Las condiciones de amplificación fueron establecidas con el transcrito β -actina, el cual ha sido reportado como de expresión constitutiva. Las amplificaciones se realizaron con un termociclador (Corbet Palm Cycler USA) utilizando cebadores específicos (Sigma, MO, USA) para los genes de interés, Cuadro 1.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Gen	Secuencia	Ta (°C)	Longitud del fragmento (Pb)
<i>β-actina</i>	(F) 5' CAGGTCATCACCATTGGTCAAT 3'	58	420
	(R) 5' TAGAAGCACTTGCGGTGCACAATGGAG 3'		
<i>Hsp60</i>	(F) 5' CCTCCGGCGGCATTGTCTTC 3'	55	519
	(R) 5' AGCGCATCGTAGCCGTAGTCACC 3'		
<i>Hsp70</i>	(F) 5' GAACGGGCCAAGCGCACACTCTC 3'	55	320
	(R) 5' TCCTGGATCTTGCCGCTCTGGTCTC 3'		
<i>Hsp83</i>	(F) 5' CCCGTGGCTTCGAGGTGGTCT 3'	55	548
	(R) 5' TCTGGGCATCGTCCGTAGTCATAGG 3'		
<i>Cyp6g1</i>	(F) 5' CAAGATGTTACCTTCACCGTAG 3'	50	724
	(R) 5' CCAGATCCGAAGGGTTGATATGCCATG 3'		
<i>Cyp6a2</i>	(F) 5' ATGTTTGTCTAATATACTGTTGATC 3'	50	690
	(R) 5' CATGAAGAACTGGTGGACGTCTC 3'		

Ta: Temperatura de alineamiento utilizada en este trabajo

Pb: Pares de bases

El volumen total de la mezcla de PCR fue de 25 μL , considerando 2.5 μL de PCR Rxn Buffer 10 X, 1.25 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de mezcla de dNTPs 10 mM, 0.2 μL de Taq DNA polimerasa Platinim® (Invitrogen CAT No. 10966-030), 1 μL de cada cebador 5' y 3' 10 μM , 1 μL de DNAC y agua estéril. Las condiciones de la PCR consistieron de un ciclo inicial de 94°C por 3 min (desnaturalización) seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturalización) 50, 55 y 58°C (de acuerdo al gen) por 30 s (alineamiento), 72°C por 1 min (extensión) y un ciclo final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se cuantificó con el software Gene Tools V3.06 (d) (Syngene, USA.)

RESULTADOS

Prueba de toxicidad

Las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ y *multiple wing hairs* de *Drosophila melanogaster* fueron donadas por el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) y mantenidas en el laboratorio de Fisiología Vegetal perteneciente a la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-I.

En la prueba CL_{50} para de *Drosophila melanogaster* (líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³) se utilizó un intervalo de concentraciones de 0 a 500 μM de ZEA (Cuadro 2), se realizaron cuatro experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Con los datos obtenidos, se elaboró un gráfico de dispersión para cada una de las líneas (Figuras 13 y 14).

Cuadro 2. Concentraciones de ZEA para la prueba CL_{50}

Tratamiento	Concentración de ZEA	
	μM	ppb
1	500	158,750
2	300	95,250
3	200	63,500
4	100	31,750
testigo	----	----

ppb: Partes por billón = $\mu\text{g kg}^{-1}$

Mortalidad de la línea *flr*³

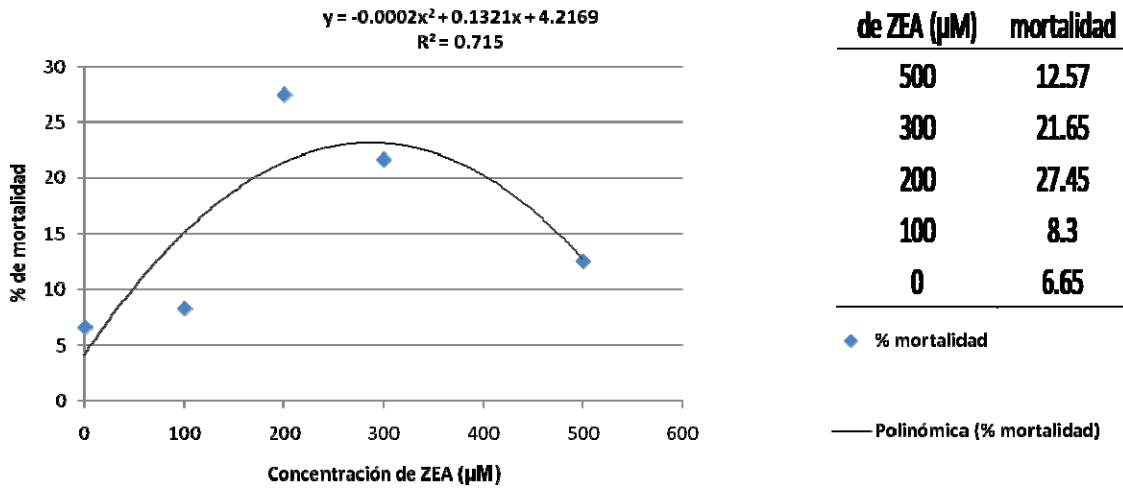


Fig. 13. Mortalidad de organismos de la línea *flare*³ tratados con ZEA. Se muestra el porcentaje de mortalidad para cada concentración, así como la ecuación de la gráfica

Mortalidad de línea *Oregon-flare*³

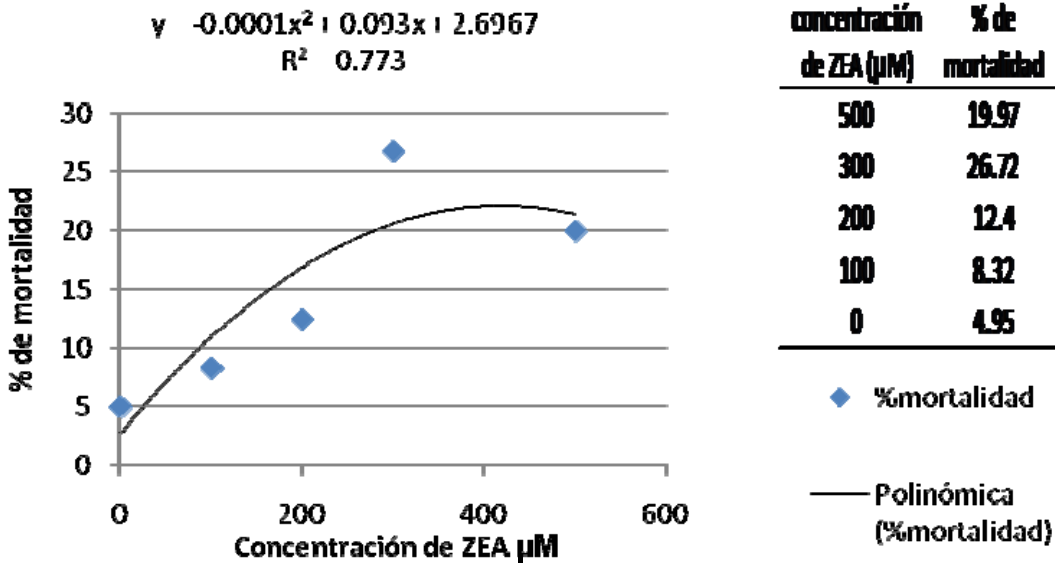


Fig. 14. Mortalidad en organismos de la línea *Oregon-flare*³ tratados con ZEA. Se muestra el porcentaje de mortalidad para cada concentración, así como la ecuación de la gráfica.

Los puntos en la gráficas muestran una tendencia polinómica, una $R^2 > 0.7$ y mortalidad máxima en ambas líneas poco mayor a los 20 puntos porcentuales. Las ecuaciones resultantes de los gráficos se resolvieron para establecer la concentración subtóxica (CL_{20}) para ambas líneas, determinando para la línea *Oregon-flare*³ 260 μ M y para *flare*³ 155.25 μ M (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones subtóxicas de ZEA para organismos de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³

*Diferencias estadísticamente significativas entre las líneas, ANOVA de dos factores con una significancia de 0.05

Línea	Ecuación	Concentración subtóxica
<i>Oregon-flare</i> ³	$Y = -0.0001x^2 + 0.093x + 2.6967$	260.00 μ M *
<i>flare</i> ³	$Y = -0.0002x^2 + 0.1321x + 4.2169$	155.25 μ M *

Eficiencia reproductiva

Se midieron parámetros reproductivos (Emergencia y Fecundidad) de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ tratadas con ZEA 260 μ M haciendo ligeras modificaciones al método reportado por Gayathri y Krishnamurthy (1981). Utilizando como testigo negativo el disolvente de la ZEA (amortiguador de fosfatos 150 mM pH 7) y tolueno 50 mM como testigo positivo.

La Figura 15 muestra el número y el porcentaje de individuos que emergieron de cada línea tratada. La emergencia de la línea *flare*³ tratados con la ZEA disminuyó 20.8% mientras que la línea *Oregon-flare*³ disminuyó 27.7% con respecto al testigo.

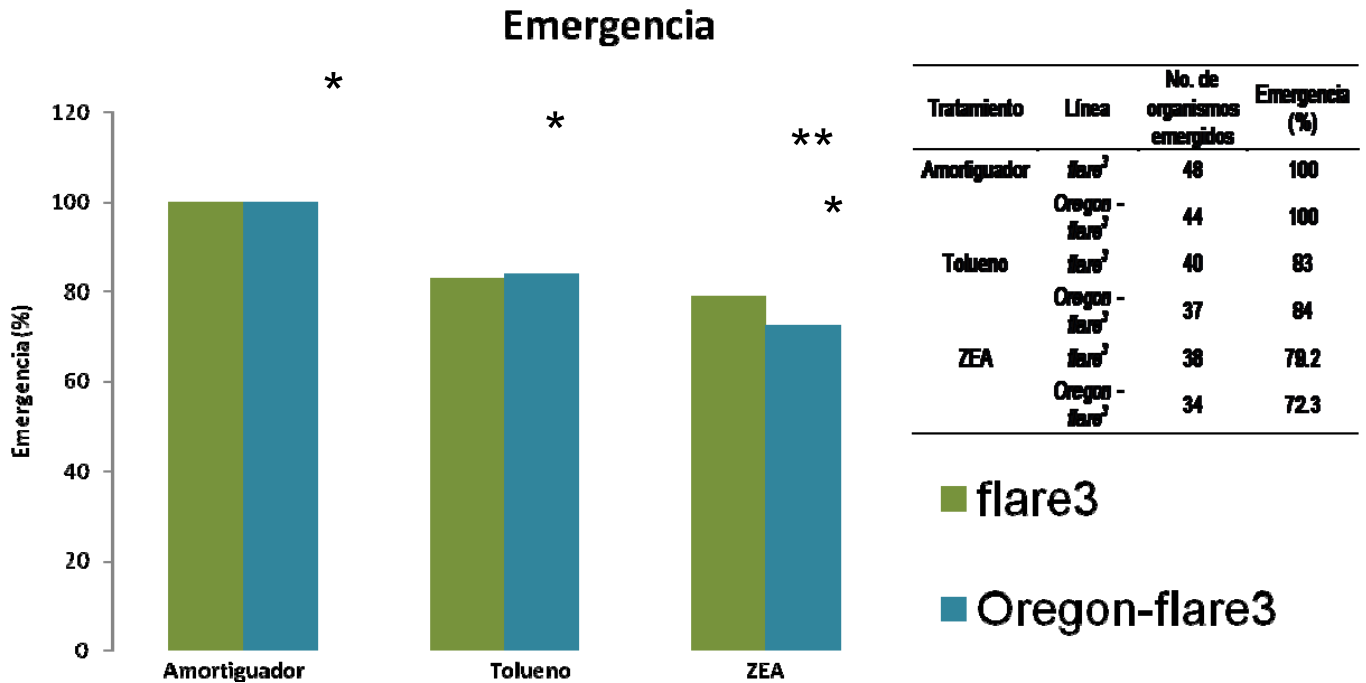


Fig. 15. Emergencia de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ tratados con ZEA, tolueno (control positivo) y amortiguador de fosfatos (control negativo).

* Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

** Diferencias estadísticamente significativas entre las líneas

ANOVA de dos factores con significancia $P \geq 0.05$ y prueba de Tukey para determinar dónde radicaba la diferencia entre los tratamientos

Fecundidad

De los organismos sobrevivientes de la prueba anterior se aislaron hembras y machos vírgenes con el objetivo de realizar cruza entre organismos de la misma línea. Una vez realizado lo anterior se colocó una hembra y un macho por vial, se registró durante 10 días el número de huevos puestos en 5 viales de cada tratamiento. Las gráficas de las puestas se muestran en las Figura 16 y 17. El número de huevos puestos durante los 10 días por organismos de la línea *flare*³ tratados con ZEA fue menor comparado con el testigo negativo. Con respecto al tratamiento con tolueno, la puesta fue menor en los días 5, 6 y 7. En la línea *Oregon-flare*³ los huevos puestos durante los 10 días por organismos tratados

con ZEA fue menor que los puestos por organismos tratados con amortiguador de fosfatos, incluso menor en los días 5, 6, 7, 8, 9 y 10 que los puestos por el grupo control positivo. La fecundidad fue considerada como el total de huevos al término de los 10 días (Figura 18), así la fecundidad de la línea *flare*³ tratados con ZEA 260 μ M disminuyó 39% con respecto al control, mientras que la línea *Oregon-flare*³ disminuyó 55%.

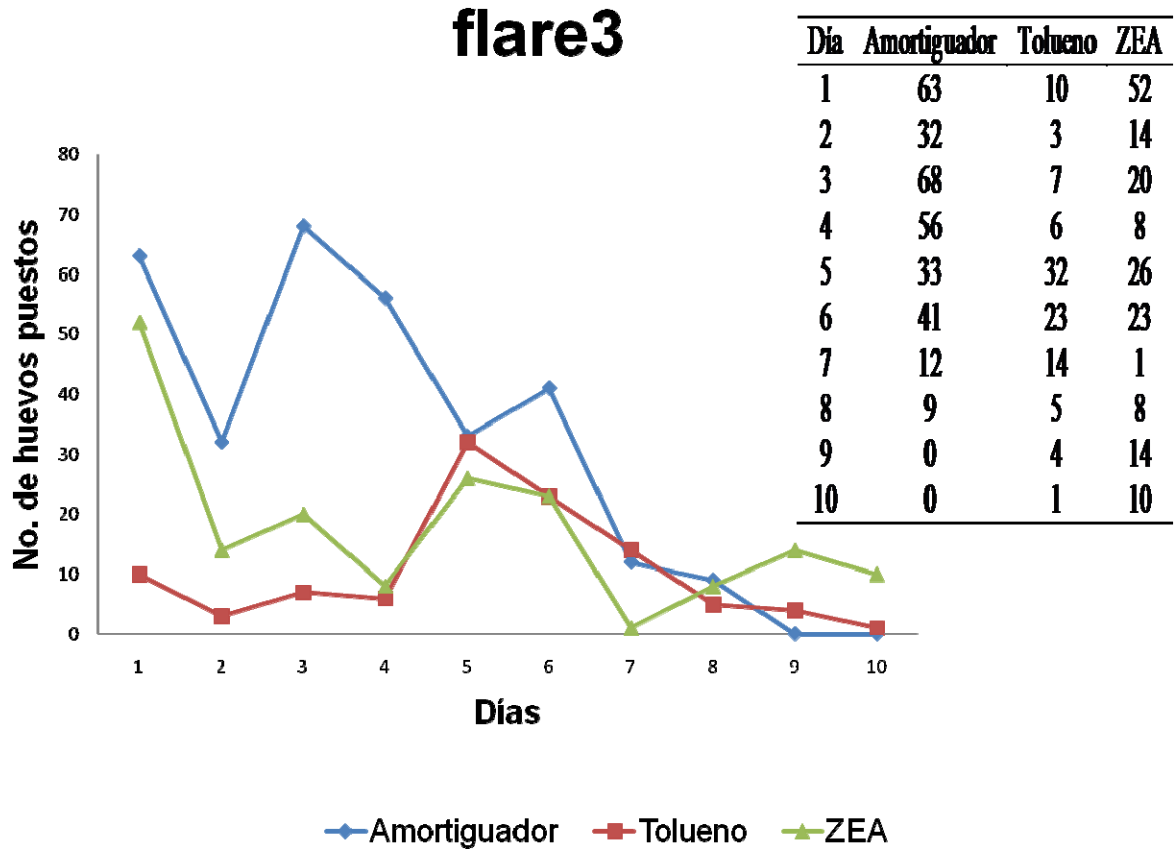


Fig. 16. Puesta de huevos durante 10 días de organismos de la línea *flare*³ tratados con zearalenona (ZEA), tolueno y amortiguador de fosfatos (amortiguador).

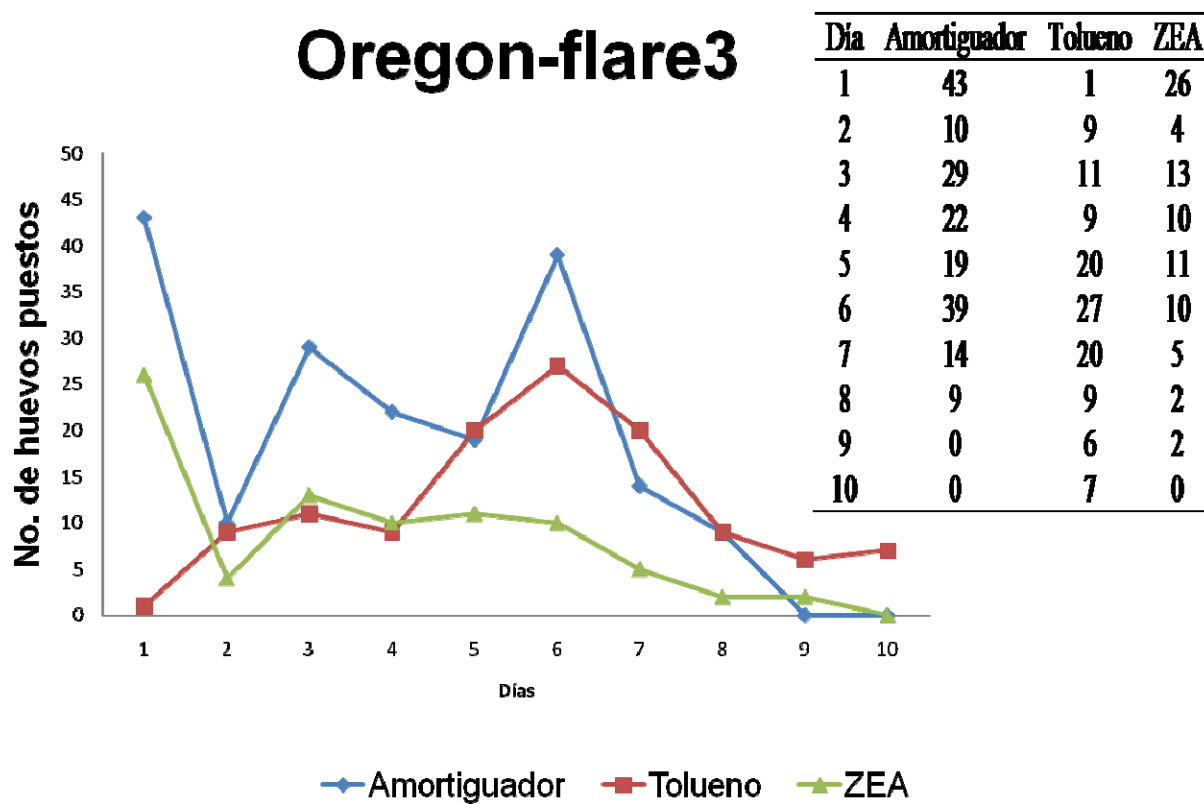


Fig. 17. Puesta de huevos durante 10 días de organismos de la línea *Oregon-flare*³ tratados con zearalenona (ZEA), tolueno y amortiguador de fosfatos (amortiguador).

Porcentaje de puesta de huevos

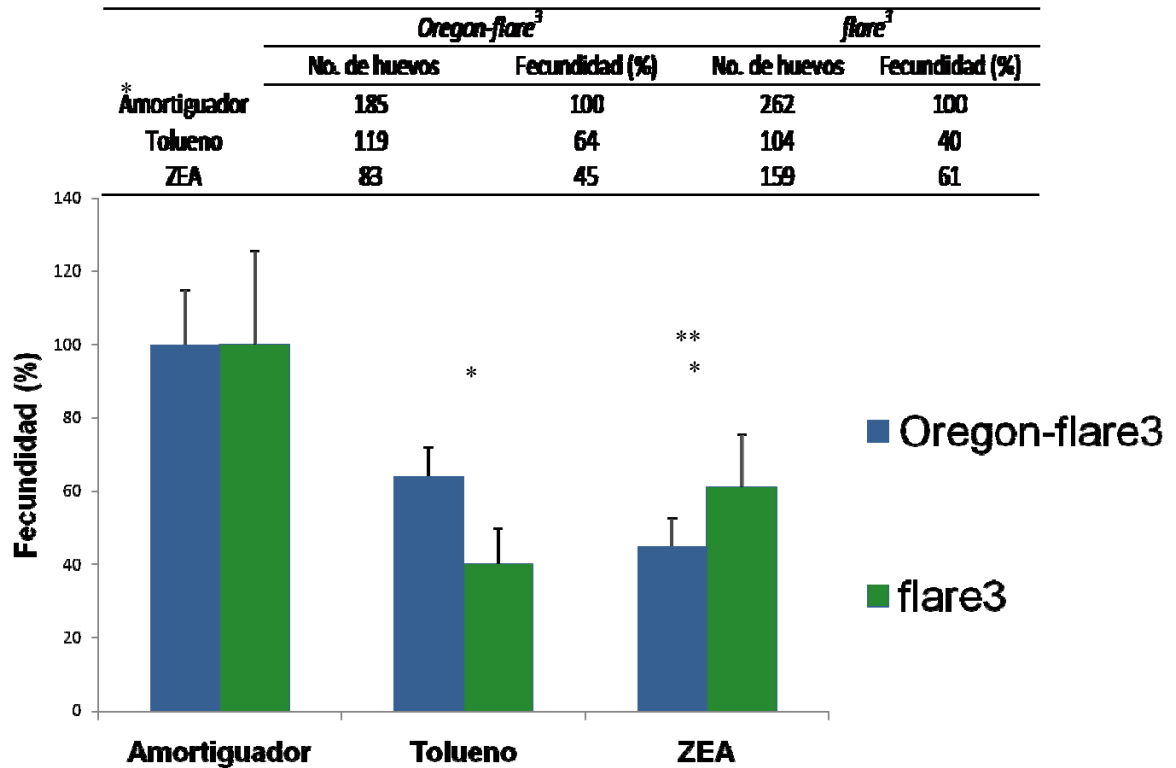


Fig. 18. Efecto de la ZEA, tolueno y amortiguador de fosfatos sobre el número total de huevos puestos por moscas de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³

* Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

** Diferencias estadísticamente significativas entre las líneas

ANOVA de dos factores con significancia de $P < 0.05$.

Efecto genotóxico de la ZEA (260 μ M) mediante ensayo de mutación y recombinación somática (SMART)

El Cuadro 4 muestra que en la cruce BE se incrementaron las manchas pequeñas y grandes en los grupos ZEA y uretano, el incremento de manchas pequeñas es de 4.4 y 29.8 veces aproximadamente, el incremento de las manchas grandes oscila entre 4 y 27.5 veces, respectivamente. El grupo tratado con amortiguador de fosfatos no presentó aumento significativo con respecto al testigo agua.

El análisis estadístico de la frecuencia de manchas totales encontradas en la cruza BE indica que la diferencia entre el grupo ZEA y el testigo agua es significativo (Figura 19).

Cuadro 4. Tipo y número de manchas en alas en individuos de la cruza BE tratados con distintos compuestos. Para mayor detalle ver anexo IV

Compuesto	Manchas pequeñas		Manchas grandes		Manchas gemelas		Totales	
	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número
agua	0.40	16	0.08	3	0.00	0	0.47	19
amortiguador	0.40	24	0.03	2	0.00	0	0.43	26
ZEA	1.77	106	0.32	19	0.00	0	2.08	125
uretano	11.90	595	2.20	110	0.00	0	14.10	705

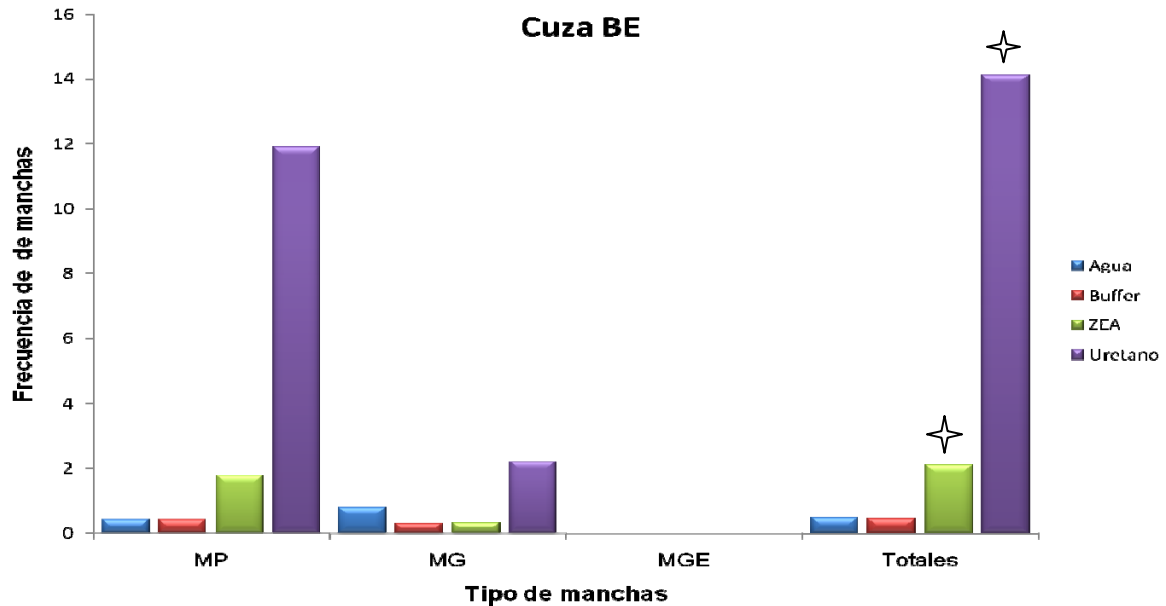


Fig. 19. Frecuencia de manchas en organismos de la cruza Bioactivación Elevada (BE) tratadas con agua, amortiguador, uretano y ZEA. La estrella señala diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.05$

El cuadro 5 muestra el número de manchas de tipo *mwh* pequeñas y grandes encontradas en organismos de la cruza E. En la figura 20 se muestra que en la cruza E el grupo amortiguador de fosfatos no presentó aumento estadísticamente significativo en el número de manchas con respecto al testigo agua, sin embargo, como se esperaba, el número de manchas presentes en alas de los organismos tratados con uretano sí presentó aumento estadísticamente significativo. El grupo ZEA mostró un aumento estadísticamente significativo en manchas pequeñas con relación al testigo negativo (85 y 7 respectivamente). Finalmente, en esta cruza el tratamiento con la micotoxina no produjo diferencias significativas en las manchas grandes, sin embargo, al comparar las frecuencias totales del grupo ZEA 260 μ M se encontró una relación significativa estadísticamente (Figura 20).

Cuadro 5. Tipo y número de manchas en alas en individuos de la cruza E tratados con distintos compuestos. Para mayor detalle ver anexo V

Compuesto	Manchas pequeñas		Manchas grandes		Manchas gemelas		Totales	
	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número	Frecuencia	Número
agua	0.17	7	0.15	6	0.00	0	0.32	13
amortiguador	0.25	15	0.12	7	0.00	0	0.37	22
ZEA	1.38	83	0.08	5	0.00	0	1.47	88
uretano	6.48	389	0.95	57	0.00	0	7.43	446

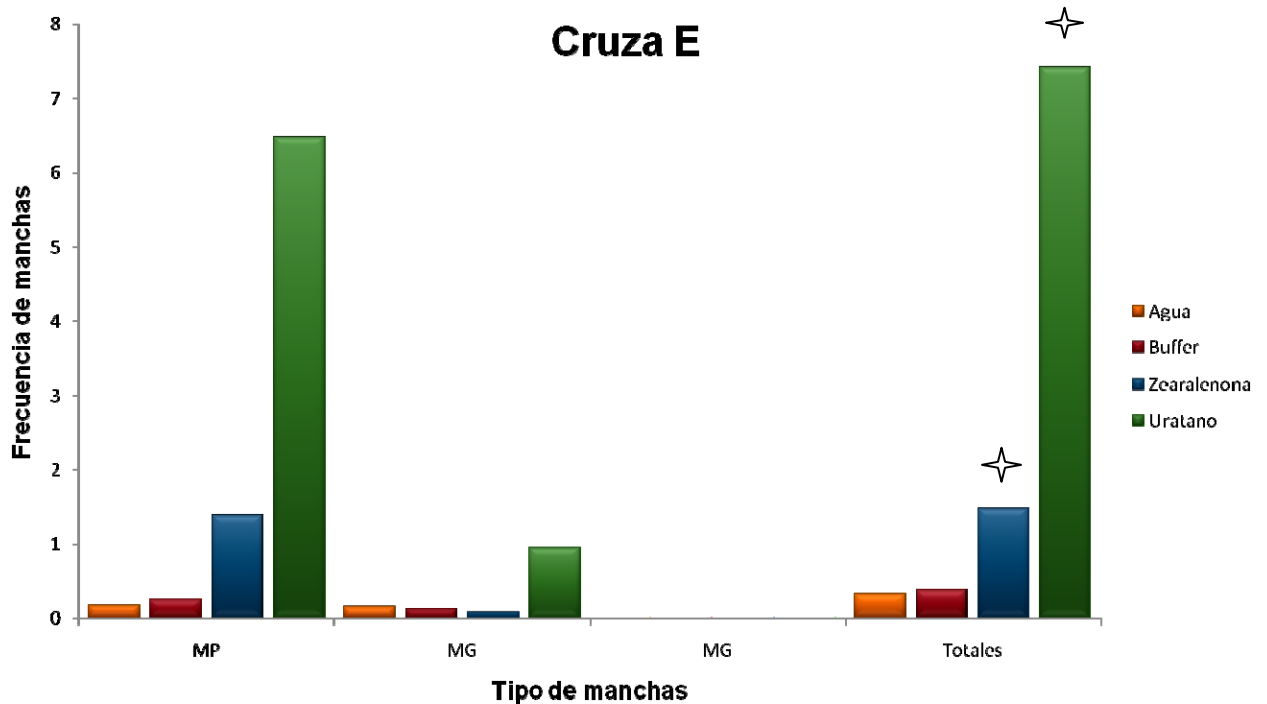


Fig. 20. Frecuencia de manchas en organismos de la craza Estándar (E) tratados con agua, amortiguador, uretano y ZEA. La estrella señala diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.05$.

Cuantificación de ZEA incorporada por larvas de *Drosophila melanogaster*

Se cuantificó la ZEA incorporada por larvas de ambas líneas en tres experimentos independientes mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En los cromatogramas se encontró un pico con un tiempo de retención de 7.8 minutos, que coincide con el estándar de ZEA (Figura 21). Adicionalmente, se cuantificó la concentración de ZEA para cada una de las repeticiones de ambas cruza. Para la craza E la concentración promedio fue de 3.77 ppm, mientras que en la craza BE se cuantificaron 5.86 ppm. (Figura 22).

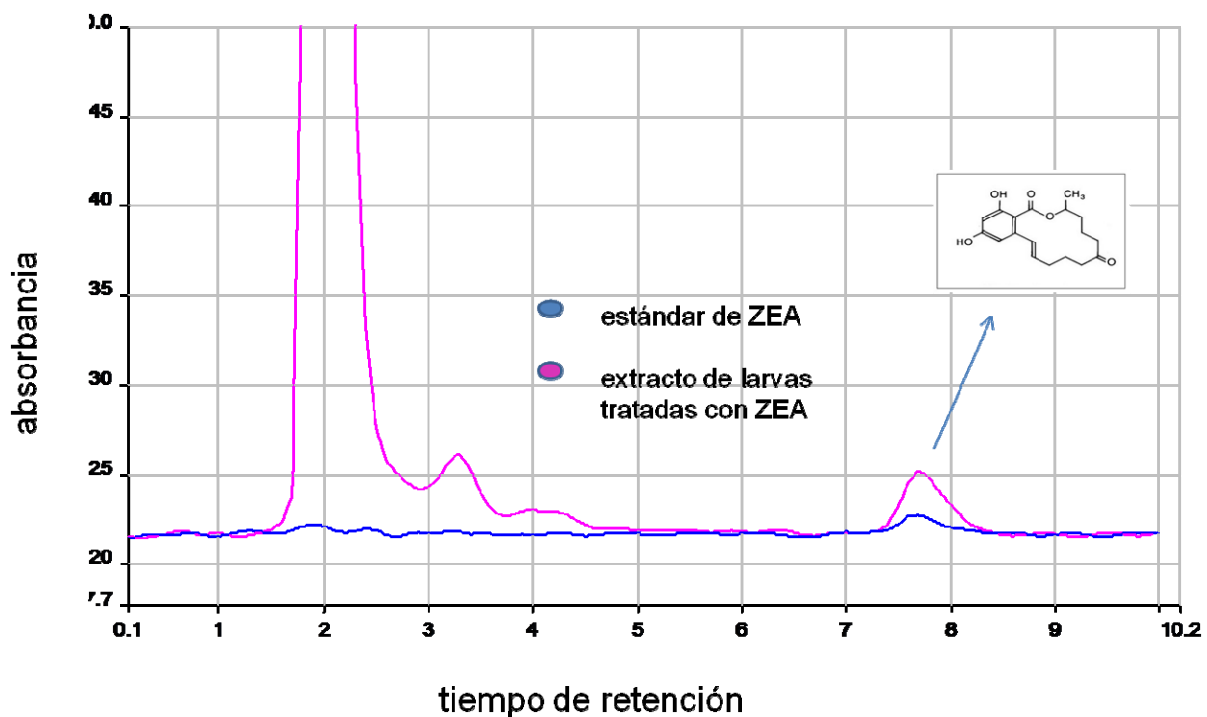


Fig. 21. Cromatograma de los extractos de larvas de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ tratadas con ZEA 260 μ M y del estándar de ZEA con un tiempo de retención para ambos de 7.8 min

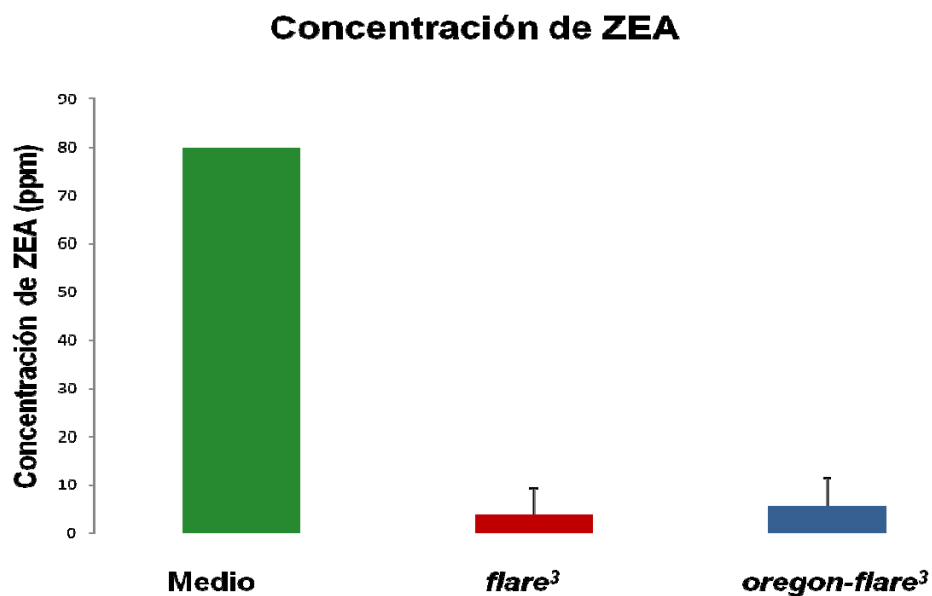


Fig. 22. Cuantificación de ZEA incorporada por larvas de líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*.

Identificación y cuantificación de ZEA y/o sus metabolitos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Se realizó un extracto de larvas de las cruza E y BE tratadas con ZEA 260 μ M (bajo las condiciones antes señaladas) de cada una de las repeticiones, el producto de la extracción se derivatizó y se inyectaron en el GC-MS. En los cromatogramas hay un pico con un tiempo de retención de 9.95 minutos (Figura 23) el cual coincide con el estándar de ZEA (Anexo III). Asimismo, se cuantificó la concentración de ZEA incorporada. Los resultados se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración promedio de ZEA incorporada por larvas de la cruza E y BE de *D. melanogaster* mediante GC-MS.

Cruza	Concentración promedio de ZEA ng/mg
E	8.45
BE	5.01

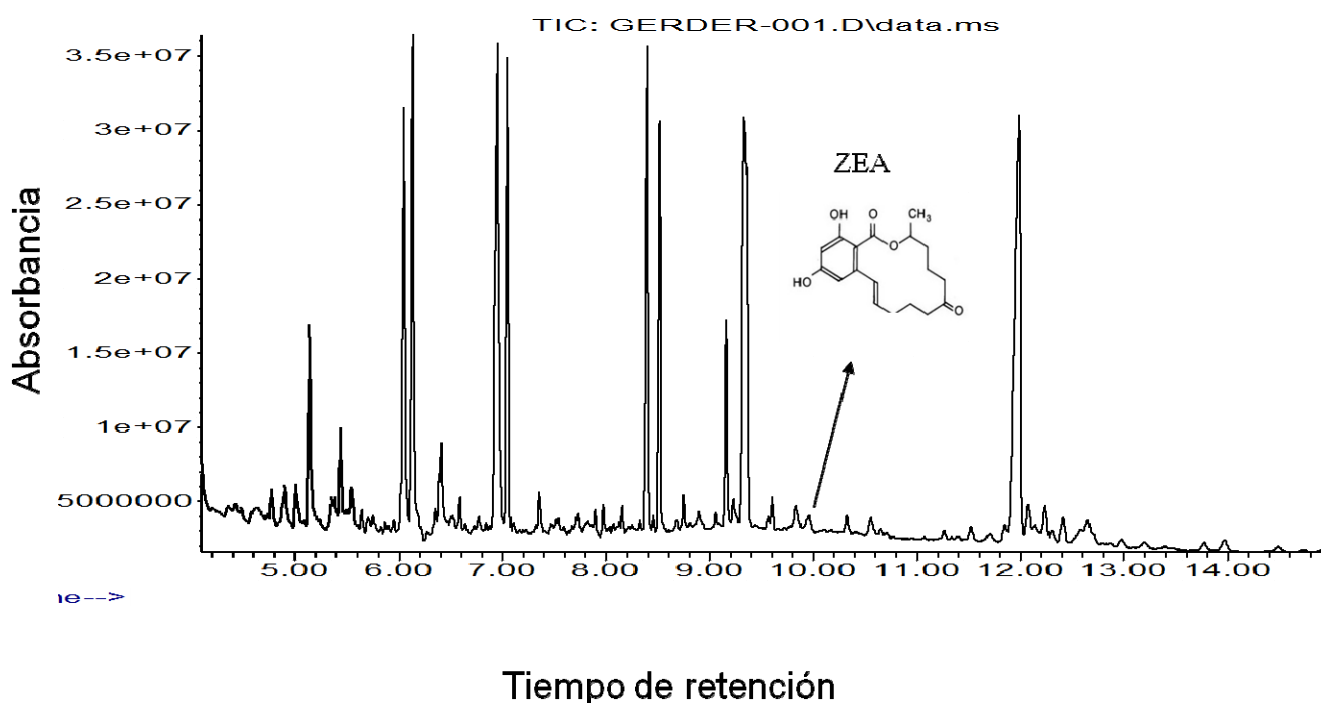


Fig. 23. Cromatograma del extracto de larvas tratadas con ZEA indicando el pico y el tiempo de retención de ZEA.

Es importante mencionar que no se logró identificar a ninguno de los cinco metabolitos intermedios de ZEA en forma libre usando la biblioteca *NIST 08* ni por medio de los patrones de fragmentación.

Concentración de los transcritos *Cyp450 a2* y *g1* pertenecientes a la familia 6.

Los fragmentos obtenidos con los oligos se clonaron y se secuenciaron¹. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Blast dando un porcentaje de identidad superior al 90%, corroborando que se tenían las secuencias de interés (Anexo II).

En la Figura 24 se muestra el ARN total de las larvas de la cruce E y BE con los diferentes tratamientos.

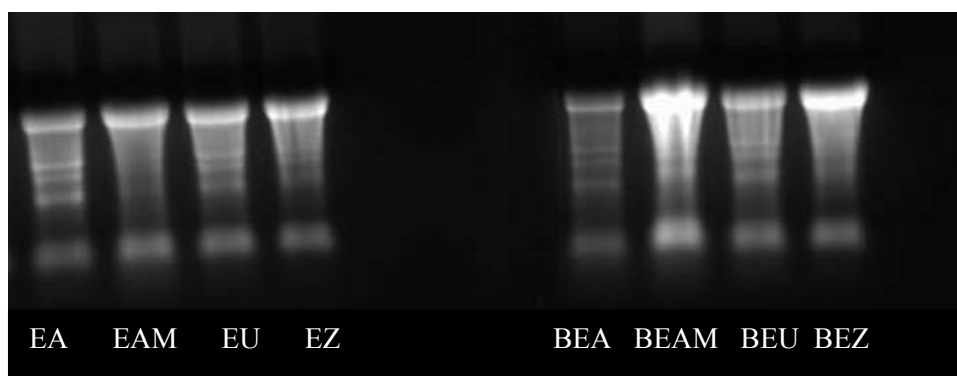


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% desnaturalizante de ARN total de larvas de las cruza E tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA (EA, EAM, EU y EZ, respectivamente) y de larvas de la cruz BE tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA (BEA, BEAM, BEU y BEZ, respectivamente).

Con el conjunto de ARNm se sintetizó el ADNc y se amplificaron mediante PCR semicuantitativo los genes *Cyp6a2* y *Cyp6g1* utilizando el gen de expresión constitutiva *actina* como testigo. En la Figura 25 se muestran los productos de estas reacciones.

En organismos de la cruz E tratados con uretano, amortiguador y ZEA, la concentración de transcritos *Cyp6a2* se mantuvo prácticamente sin modificaciones respecto a las larvas tratadas con agua. Por el contrario, los transcritos *Cyp6g1* se incrementaron en larvas tratadas con ZEA en relación con el testigo negativo.

En organismos de la cruz BE tratados con uretano y ZEA, los transcritos *Cyp6a2* fueron ligeramente más concentrados, siendo mayor el aumento en el tratamiento con uretano. De la misma manera, el transcrito *Cyp6g1* se incrementó en organismos tratados con uretano y ZEA.

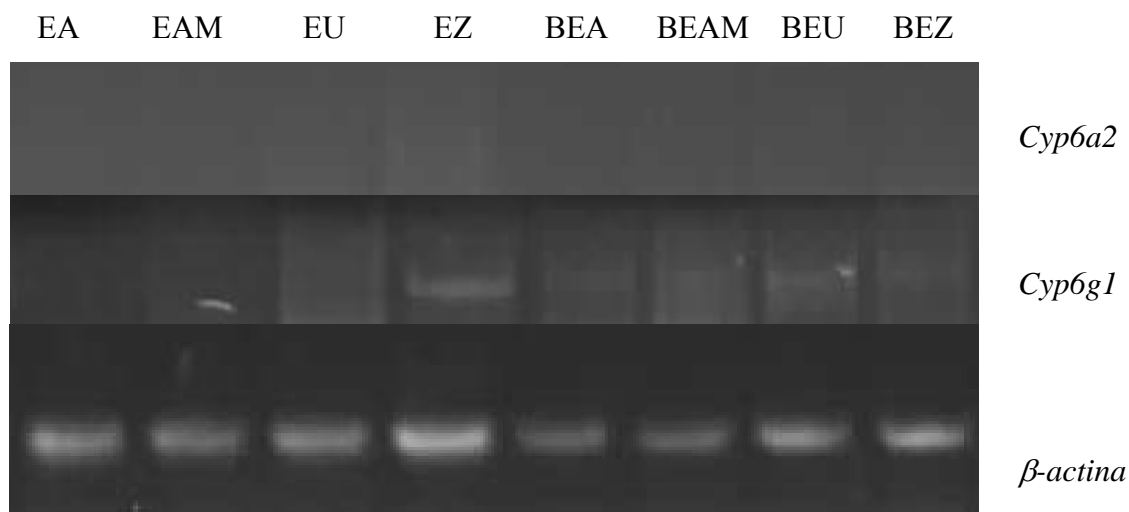


Fig. 25. Análisis semicuantitativo de los ARNm de *Cyp6a2* y *Cyp6g1* en larvas de las cruza E tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA (EA, EAM, EU y EZ, respectivamente) y de larvas de la cruza BE tratadas con agua, amortiguador de fosfatos, uretano y ZEA (BEA, BEAM, BEU y BEZ, respectivamente).

Las fotografías de los productos de PCR semicuantitativo fueron sometidas a un análisis densitométrico con el software *Gene Tools* de SYNGENE V.3.06 (Figura 26). En la cruza E, la concentración de transcritos *Cyp6a2* en todos los tratamientos se mantuvo prácticamente sin cambio. Por el contrario, los transcritos del gen *Cyp6g1* en organismos tratados con ZEA aumentaron 13.35 veces con respecto al testigo agua, siendo incluso mayor que la concentración de transcritos presentes en el tratamiento con uretano, el cual aumentó 6.23 veces.

Tratamiento	Cruza E		Cruza BE	
	<i>Cyp6a2</i>	<i>Cyp6g1</i>	<i>Cyp6a2</i>	<i>Cyp6g1</i>
Agua	100	100	100	100
Amortiguador	98.25	180	147.22	84
Uretano	82.79	623	319.44	160.18
ZEA	95.33	1335	169.44	166.72

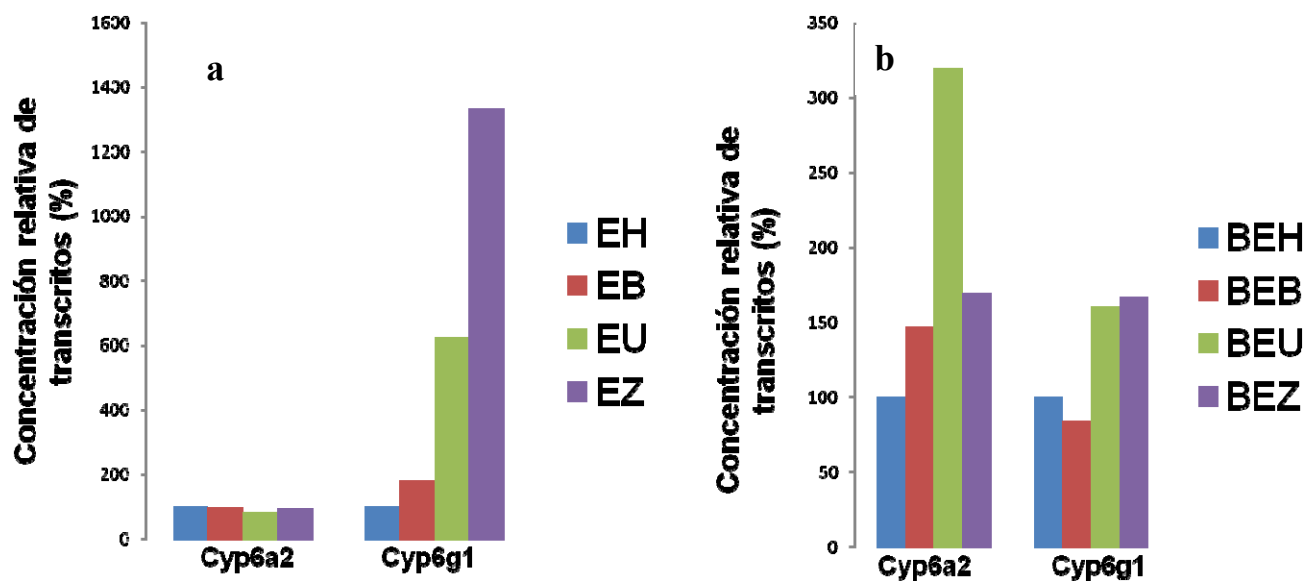


Fig. 26. Concentración relativa de transcritos de los genes *Cyp6a2* y *Cyp6g1* para las cruza E (a) y BE (b).

En la cruza BE tratados con uretano la concentración del transcrito *Cyp6a2* aumentó 3.19 veces con respecto al testigo agua, mientras que en los organismos tratados con ZEA aumentó 1.47. Por otro lado, los niveles del transcrito *Cyp6g1* en el tratamiento con uretano aumentó 1.6 veces mientras que en el tratamiento con ZEA el aumento fue de 1.66 veces (Figura 26).

Concentración de transcritos de marcadores moleculares de estrés oxidativo (*Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*).

Mediante RT-PCR semicuantitativo, se comparó, la expresión de genes reportados como marcadores de estrés oxidativo y térmico (*Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*) en larvas de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster*, tratadas con la micotoxina. En la Figura 27 se presenta el producto de la reacción de amplificación (PCR punto final) usado ADNc de estos marcadores.

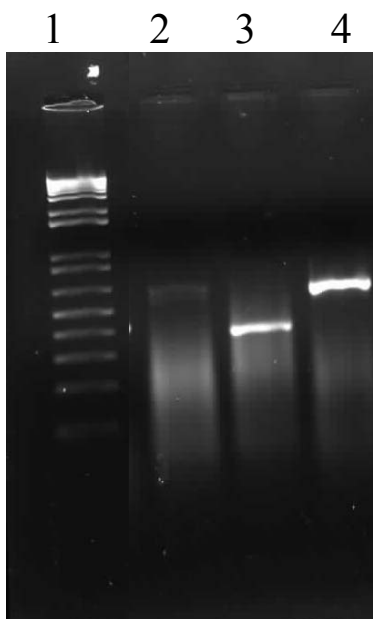


Fig. 27. Productos de PCR punto final a partir de ADNc: marcador de peso molecular de 1 Kb, *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83* carril 1, 2, 3, y 4 respectivamente separados en gel de agarosa 1%.

Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron¹, el resultado (Anexo I) se comparó (BLAST²) con las secuencias depositadas en las bancos de genes. El Cuadro 7, muestra la identidad máxima reportada para cada secuencia.

¹ M. en C. Alejandro Monsalo R. Laboratorio de Bioquímica Molecular UBIPRO, FES.I UNAM

² (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Cuadro 7. Resultado de la comparación de las secuencias de *Hsp* con las depositadas en los bancos de información genética.

Nº de acceso	Descripción	Cobertura	Identidad
NM_167266.1	<i>Drosophila melanogaster</i> Heat shock protein 60 (<i>Hsp60</i>), transcript	44%	84%
NM_080188.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Heat-shock-protein-70Bb (<i>Hsp70Bb</i>), mRNA	97%	97%
NM_079175.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Heat shock protein 83 (<i>Hsp83</i>), mRNA	97%	91%

Este resultado confirmó que los amplicones corresponden con los genes de interés, y por lo tanto se procedió a comparar los niveles de los transcritos. En la Figura 28 se muestran los productos de amplificación por PCR semicuantitativo utilizando como control de expresión constitutiva al transcrito de β -actina. La concentración de transcritos *Hsp60* en ambas líneas tratadas con ZEA aumentó con respecto a su control. Mientras que *Hsp70* y *Hsp83* disminuyó.

El análisis densitométrico de esos geles se realizó con el software *Gene Tools* de SYNGENE V.3.06 (Figura 29). Los transcritos del gen *Hsp60* en la línea *flare*³ se incrementaron 15.72 veces con respecto al control, mientras que los correspondientes a *Hsp70* y *Hsp83* disminuyeron 0.244 y 0.535 veces, respectivamente. En la línea *Oregon-flare*³ el transcrito *Hsp60* se incrementó 0.7612 veces con respecto al control. Por su parte, los transcritos *Hsp70* y *Hsp83* disminuyeron su concentración 0.53 y 0.71 veces respectivamente.

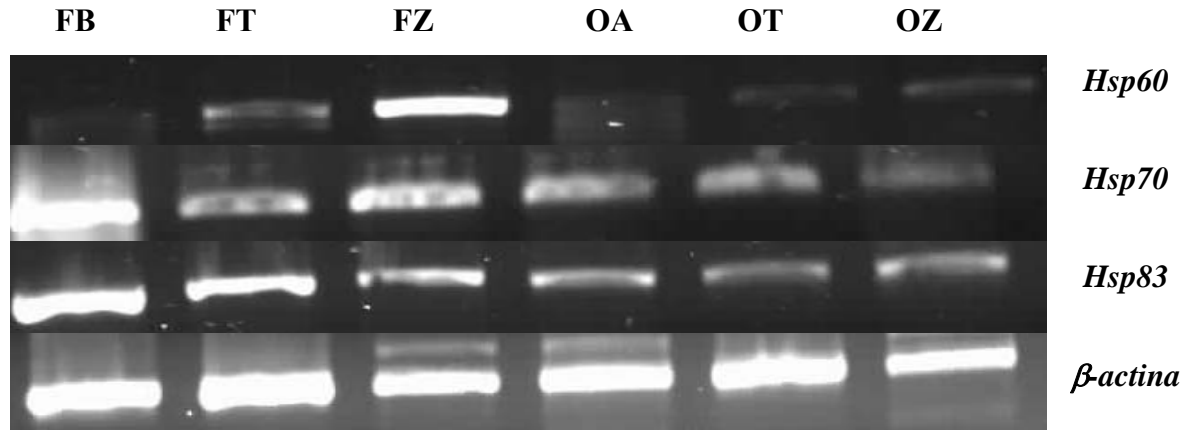


Fig. 28. Concentración de los ARNm de *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp83* y de β actina en la línea *flare*³ (FA: amortiguador de fosfatos, FT: tolueno y FZ: ZEA) y en la línea *Oregon-flare*³ (OB: amortiguador de fosfatos, OT: tolueno y OZ: ZEA).

	FA	FT	FZ	OA	OT	OZ
<i>Hsp60</i>	100	364.36	1572.98	100	96.2	176.12
<i>HSP70</i>	100	47.85	75.6	100	69.02	46.91
<i>Hsp83</i>	100	67.82	46.43	100	61.57	92.82

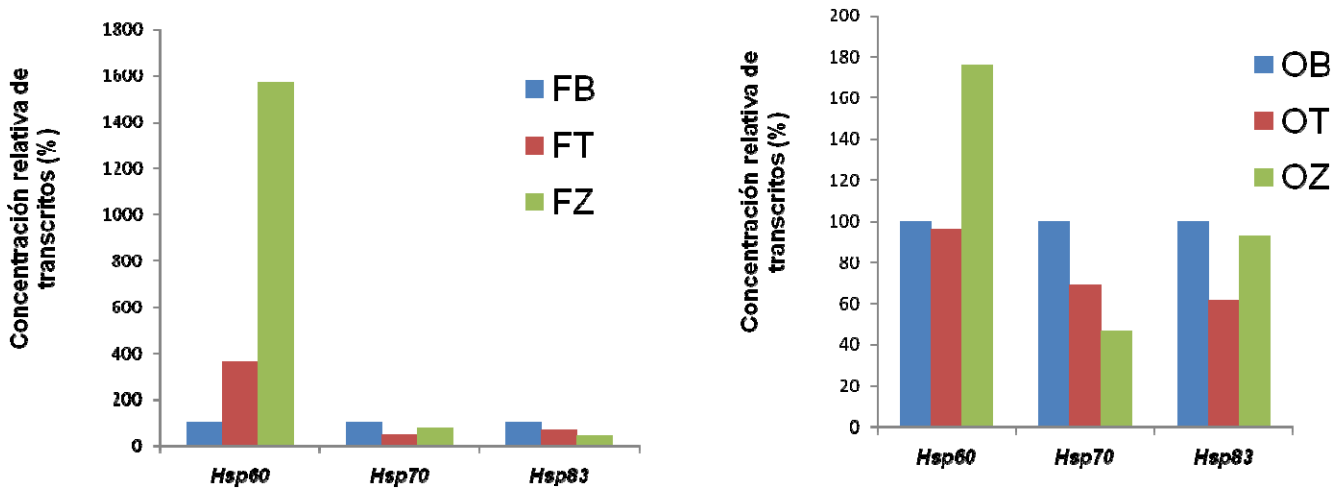


Fig. 29. Concentración de los ARNm de *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp83* y en la línea *flare*³ (FB: amortiguador de fosfatos, FT: tolueno y FZ: ZEA) y en la línea *Oregon-flare*³ (OB: amortiguador de fosfatos, OT: tolueno y OZ: ZEA) expresado y medido cuantitativamente mediante análisis densitométrico.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de toxicidad de la ZEA muestra que la mortalidad de las líneas *Oregon-flare*³ y *flare*³ de *Drosophila melanogaster* no es dependiente de la concentración, no rebasó los 30 puntos porcentuales en ambas líneas a pesar del incremento en la concentración de la micotoxina, por este motivo se trabajó con una concentración subtóxica correspondiente a CL₂₀. Atendiendo a la regresión lineal de la polinómica, la CL₂₀ de ZEA para la línea *Oregon-flare*³ fue de 260 μ M mientras que para la línea *flare*³ fue 155.25 μ M, respectivamente. Esta diferencia puede ser explicada por la diferencia en el metabolismo de xenobióticos entre las líneas, ya que la línea *Oregon-flare*³ expresa de manera elevada los genes que codifican las proteínas del sistema enzimático P450, involucrado en el metabolismo de xenobióticos mientras que en la línea *flare*³ éstos son inducibles (Saner *et al.*, 1996). Así el que la mortalidad no se incremente con la concentración nos sugiere la participación de un sistema enzimático que metaboliza ZEA en *Drosophila melanogaster*, de esta manera, la línea *Oregon-flare*³ al presentar una mayor cantidad de enzimas metabolizadoras será más eficiente en la eliminación de xenobióticos, por tanto, necesitará más de ese compuesto para generar daño. En los experimentos sucesivos, se utilizó 260 μ M de ZEA ya que con esa concentración no se observó un aumento en la mortalidad en ninguna de las dos líneas.

La toxicidad de ZEA se manifestó en la disminución de parámetros reproductivos (emergencia y fecundidad). Organismos de la línea *Oregon-flare*³ presentaron una disminución en la emergencia de 27.7% y de 55% en la fecundidad, con respecto al testigo, mientras que la línea *flare*³ presentó una disminución en la emergencia de 20.8% y 39% en la fecundidad con respecto al testigo. Este resultado junto con las evidencias de la degradación de ZEA y la generación de un análogo de estradiol (Shier *et al.*, 2001; Bennett and Klich, 2003; Olsen, 1989) sugiere que los metabolitos resultantes de ZEA alteran el desarrollo de las larvas. Esta alteración probablemente se debió a la unión con los receptores homólogos a los de estrógenos presentes en *Drosophila melanogaster* involucrados en el desarrollo embrionario (William, 1994), haciéndose más evidentes en la línea *Oregon-flare*³ ya que al presentar una mayor expresión de *Cyp450* se dio una mayor

transformación y probablemente una mayor unión de metabolitos de la ZEA a los receptores homólogos.

Por otro lado, el sistema de proteínas de choque térmico y oxidativo (HSP) es inducido como protección contra estrés que involucran generación de proteínas anormales y alteración de la función celular (Mahendra *et al.*, 2009). Para determinar, indirectamente si la ZEA induce estrés oxidativo se midió la concentración de los transcritos de tres genes (*Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*), que algunos autores han utilizado como indicadores de estrés oxidativo (Wafa *et al.*, 2007, 2004; Mahendra *et al.*, 2009). Los resultados indican que los niveles del transcrito *Hsp60* aumentó 15.72 veces en la línea *Oregon-flare*³ y 1.76 veces en la *flare*³, mientras que los transcritos *Hsp70* y *Hsp83* mostraron ligera disminución. De Pomerai, (1996), Kohler *et al.*, (2005) y Croute *et al.* (2002) mencionan que diferentes compuestos inducen con eficiencia diferencial distintos genes *Hsp*. Bajo este contexto y atendiendo a las observaciones de Mahendra *et al.*, 2009 y Ashraf *et al.*, 2011, el aumento en la concentración del transcrito *Hsp60* pudo deberse al metabolismo de la ZEA por los *Cyp450*, los cuales en la línea *Oregon-flare*³ son más abundantes que en *flare*³ y que activó mecanismos de defensa como el sistema de proteínas de choque térmico. Con la finalidad de confirmar que los metabolitos de la ZEA inducen estrés oxidativo como lo sugieren nuestros resultados y los de Mahendra *et al.*, 2009 y Ashraf *et al.*, 2011 consideramos que será importante, además de medir la concentración de ERO directamente, monitorear otros marcadores genéticos de estrés específicos y medir la actividad de enzimas involucradas en este proceso como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa (Mahendra *et al.*, 2009; Abid Essefi *et al.*, 2011) en organismos tratados con ZEA.

Dado que los efectos antes mencionados son atribuidos a la acumulación de la ZEA y/o sus metabolitos, se procedió a cuantificarlos en las larvas tratadas con ZEA. Los resultados muestran que ZEA fue incorporada por ambas líneas y que su concentración es menor a la dispuesta en los tratamientos (80 ppm Figura 21). El análisis GC-MS mostró que los organismos incorporaron ZEA (Cuadro 6) aunque no se logró identificar a los metabolitos que resultan de la degradación de ZEA. Pfeiffer *et al.*, (2007) mencionan que *in Vivo* no se pueden identificar los metabolitos intermedios de ZEA en su forma libre debido a que éstos son rápidamente metabolizados. Así, los productos del metabolismo de la ZEA pudieron ser rápidamente conjugados en la segunda fase del metabolismo xenobiótico. Plant (2003)

reporta que las reacciones de glucoronidación son las más frecuentes durante la fase II del metabolismo xenobiotico, adicionalmente Pfeiffer *et al.* (2007) establecen que estos productos se conjugan con otras moléculas, como el ácido glucorónico o glutatión. Por esta razón en el patrón de fragmentación se buscaron evidencias de un compuesto con peso similar al del ácido glucorónico más la ZEA (891).

La cuantificación de transcritos *Cyp450* mostró que de los dos genes monitoreados, sólo *Cyp6g1* incrementó su concentración en las larvas de la craza E tratadas con la ZEA y el uretano (13.35 y 6.23 veces, respectivamente). Este resultado es consistente con lo obtenido por Saner *et al.* (1996) quien reporta que *Cyp6g1* está involucrado en el metabolismo de xenobióticos haciendo más eficiente su eliminación o biotransformación. En la craza BE, como se esperaba, se encontró un aumento en la concentración de los transcritos de *Cyp6g1* y *Cyp6a2* (Figura 25) dado que la craza BE expresa de manera elevada los *Cyp450* (Saner *et al.*, 1996). Dado que solo se midió la concentración de transcritos de dos miembros de la familia *Cyp6* (*g1* y *a2*), consideramos necesario determinar el perfil transcripcional de otros miembros pertenecientes a otras familias de los *Cyp450s*, incluso medir la actividad enzimática para tener una visión general del papel que desempeñan estas familias en el metabolismo de esta micotoxina.

En la prueba de genotoxicidad se encontró que en la craza BE hay un mayor efecto genotóxico con una frecuencia significativa de manchas totales de 2.08 con respecto al testigo negativo con una frecuencia de 0.47 e incluso superior a la frecuencia de manchas en la craza E de 1.47. Estos resultados muestran que los *Cit450* al metabolizar a la ZEA aumentan su efecto genotóxico. Esta evidencia sumada a la relación directa entre el efecto tóxico y la expresión elevada de *Cyp450* (en la línea *Oregon-flare*³) sugiere que la ZEA fue metabolizada por los *Cit450* y los metabolitos pudieron pasar a la Fase II uniéndose a los glucósidos como el ácido glucorónico, posteriormente este complejo ZEA/glucorónico o los metabolitos serían capaces de interferir en procesos celulares, probablemente es capaz de al unirse al receptor homólogo de estrógeno (dERR) presente en *Drosophila melanogaster* (Tennessee *et al.*, 2011) alterando la metamorfosis evidenciada en una disminución de la emergencia y fecundidad en ambas líneas.

CONCLUSIONES

La mortalidad de *Drosophila melanogaster* líneas *flare*³ y *Oregon-flare*³ no fue directamente dependiente de la concentración de la ZEA, evidenciando la activación de procesos celulares que disminuyen su efecto tóxico. Dado que la diferencia entre estas dos líneas es el nivel de expresión de los *Cyp450*, los cuales están involucrados en el metabolismo de los xenobióticos, estas evidencias indican que al metabolizar los Cit450 la ZEA disminuyen sus efectos tóxicos.

La emergencia y fecundidad de las líneas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *Drosophila melanogaster* se vieron afectadas por la administración de la ZEA, la afectación fue mayor en la línea *Oregon-flare*³ que sobre expresa los *Cyp450* indicando que esas enzimas modifican a la micotoxina generando compuestos, que alteran los parámetros reproductivos.

El metabolismo de la ZEA provocó estrés induciendo respuesta celular revelada por el incremento en los niveles del transcrito *Hps60*.

El ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* indicó que la ZEA es un compuesto genotóxico en las cruzas E y BE de *Drosophila melanogaster*.

El aumento en el transcrito *Cyp6g1*, en la craza E aunado a la mayor toxicidad encontrada en organismos que presentan elevada expresión de *Cyp450* sugiere fuertemente que el sistema enzimático Cit450 está involucrado en el metabolismo de la ZEA por *Drosophila melanogaster*, transformando a la ZEA en compuesto intermedio que resulta en una disminución de parámetros reproductivos y con actividad genotóxica.

PROPUESTAS

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hacen las siguientes propuestas:

Realizar pruebas para corroborar mediante la medición directa de especies reactivas de oxígeno, la actividad de catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa y la inclusión de otros marcadores moleculares *Hsp* si la ingesta de la ZEA genera estrés oxidativo.

Medir la concentración de transcritos de genes pertenecientes a otras familias de *Cyp450* a fin de aproximarnos a los genes *Cyp450* que podrían estar involucrados en el metabolismo de ZEA.

Anexos

Anexo I. Secuencias de los genes *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp83*, *Cyp6g1*, *Cyp6a2* y β -actina de *Drosophila melanogaster*.

>Hsp-60_hsp83R sequence exported from Hsp-60_hsp83R_2010-04-13_E07_009.ab1
 GGGCTTGAATCTCACCTTGACACCACCATGGCGCCATCACGCGGCTTCTTGGCATCGTC
 ATGCATGGATGCGCGGACACGACGCACATCTCCACGCCGAGTCTCTGTGATGAGATGCAT
 AGACATTATACACGATGCAGCAGAGAGATAGACATCGTACATGATCCTCGTTGGTGGTCT
 CGACACCCTCGAGCTTCTCAGTGCACGAGCAGAGCGGTGCGCCTCCGGGAACGATTCCCT
 CTGCGACGGAAGCACGAGTGGAGTTCAGGGCATCATGCACGCAATCCATCTGCTCGTTGA
 CTCAACGTCGCTGGAGCCGAACCCGACGAGCAACGCGTAGACTAAGGAGCCAGAGCTC
 TCGAGACTTCCCTTTGGTATGGAGAGTGGTTCCCTCACCTGGCCCTTGTCCGGATGGAC
 GGAAGAACAATTCATCTTTTGCCTTGGCGTAGAAGGGGGTGTGCCCTGGGTGCACGATC
 CGCTACCTGGCAAATGCTATACTTGGCCTTCTAAGTTGCAAAGTCAACTCCGGCGGGAAA
 TTCCCCAAGAAATA

>Hsp-70_hsp83R sequence exported from Hsp-70_hsp83R_2010-04-13_D07_007.ab1
 GCTGGTAGGAGTAGCGGTGCCAGCAGCTCGTATGCCACTGCCTCGTCTGGGTTGATGGA
 TAGGTTGAGGTTCTTGCCGTGGAGACTCCTGCAGCAGACTTTGCACCTTGGATGCGAGTG
 GATCCGCCGACGAGCAGATGTCGTGGATCTGACCTTGTCCATCTTGGCATCGTTGAGG
 GCCTTCTCCACAGGCTGCAGGGTGTTCGGAAGAGGTCCGCGCACAGCTCCTCAAACCTG
 GCACGGCTCACTTTGGTGTAGAAGTCTTGGCCCTCAAACAATGCGTCGATCTCGATGGTG
 GCCTCCGTGCTAGAGGAGAGTGTGCGCTTTGGCCCTTAC

>Hsp-83_hsp83R sequence exported from Hsp-83_hsp83R_2010-04-13_C07_005.ab1
 GGCTTGGTTTGGTTTCGATTCCAGCCAGCTTGATCATGCGGTAGATGCGGCTGGCGTGCAC
 CTGGCGGCTGTCCAGCGAGTTCCAGAGTACAGCAGAGAGGTCTCGAACAGCAGGATGACC
 AGATCCTTGACGGCCTTATCGTTCTTGTTCGGCATCGGGCTTCTGGCGGAGAGTCTCCACA
 ATTGGGTGATCGGGTTGATCTCCAGCTGCTTCTTGGCGCATGTAGCCATTGTGGCG
 GTATCACGCACAGCCTGGCCCTTTCATGATGCGCTCCATGTTAGCGGACCAGCCGAAGTGC
 GAAGTGACAATGCAGCAGGGCGAATCCACCAGGCGGTTGAGATCCACCACCATCTCCACC
 TTGTTGTCCAGGATGGACTTAATCAGCTTGCACAGACTCACGAAAATGCTTGTCTCT
 TCGCGCTTCTTCTTCTCGCTCTCATCTGATGTAGCTTACAGCCCCCTTGGATGACCCAGAG
 AGCTGCTTGGCCTTGTATCCGTCAAGTGTAGGATAACTTGTCTCATCGATGGGCTCGAGCC
 TATAAACACCTCGAAGCCACGA

>Actina-B_Sp6 sequence exported from 20070615_C11_Act-B_Sp6_05.ab1
 GGGCCCCACACGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTGACGAATTCA
 GATTAGGTCATACCATTTGGCAATGAGCGGTTCCGTTGTCCGGAGGCACTTCTCCAGCCT
 TCCTTCTGGGCATGGAGTCTGTGGTATCCATGAGACCACTTCAACTCCATCATGAAG
 TGTGATGTGGATATCTGCAAAGACCTGTATGCCAATACAGTGTCTGTGGTGGTACCACC
 ATGTACCAGGATTTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTAGCACCTAGCACC
 ATGAAGATTAAGATCATTGCTCCCCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCC
 ATCCTGGCCTCGCTGTCCGCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGATGAG
 TCGGGCCCTCCATCGTCCACCGBAAATGCTTCTAGGGATCCACCAGGATCTAGAATCAG
 AATTCTGGATCCGATACGTAACGCGTCTGCAGCATGCGTGGTACCGAGCTTTCCCTATAG
 TGAGTCTGATTAGANCTTGGCGTAATCATGGATCATANCTGTTTNCCTGTGTGAAATTTGT
 ATCCGCTACAATCCACACAACATAACGANGCCGAAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGG
 NGCCTTATGAGTGAGCTAGCTCACATTAATTGCGTTGCGNNTCACTGACNNCTTTCCNN
 NCAGGAAACTGGTTCATGCCAACTGCATTAATGAAANGGCCAACCCGGGAAAGGGGGTT
 TGNATAANNCGNNTTTTCGGGNTCNCAATAANNAATNGTNGNNCAGNNCGTACGNNNGNC
 AAGCGNANANTTATNAAGAGGNAATNTTTACAAACNGGGATATNANNAAAATTTAAAGC
 AGAATNGAACTAANNANNNNGGNTTATAGCNCCGNAAAAAATAANAGANTGGANCT
 AGANTAAATGTTTNCNTNAGATCTTCTTACGNNNTTAAATGGNATTAANCNAGGAAGTAAAG

Cyp6g1

>G1-3_T7 sequence exported from 20070615_A11_G1-3_T7_01.ab1
 GTTNACCTTCACCGTAGCGCGTGCCAAAGGACTTTTTTGTGGCCTTCTTCCTGCCCAAGCT
 GGTGTGCTGATGCGCATCCAGTTCTTCACGGCGGACTTTTCCACTTTATGCGCAGCAC
 CATTGGTACGTTATGGAGGAGCGAGAGCGATCGGACCTGCTCCGCAATGATCTCATAGA
 TGTCTTGGTGTGCTGCGCAAAGAGGGCGCTGCCGAGCCTTCGAAGCCTCACTATGCCAA
 GAACCAGGACTTCCTGGTGGCTCAGGCGGGCGTGTTTTTTACGGCGGGTTTCGAGACCTC
 CTCCTCGACCATGTCTTTGCCCCTGTACGAGATGGCCAAGCATCCAGAGATGCAGAAACG
 CCTGCGCGACGAGATCAACGAAGCTTTGGTGGAGGGCGGTGGGTTCATTGAGCTACNAGAA
 AATCCAGTCCCTGGAGTATCTGGCCATGGTGGTGGACGAGGTGCTGCGCATGTATCCGGT
 GCTGCCGTTCTCGACCCGAGTACGAGAGCGTGGAGGGACAGCCAGACTTGAGCCTGAA
 GCCGTTCTACGACTACACTCTCGAGAACGGAACCCCTGTGTTTCATACCCATCTATGCACTG
 CANTATGAACAAAGGTATTCATCCATGGAAAAGTTCATAAGCCCTCCTCTAACTAT
 CTGATTATTCCTAGTACTGGANCTATCCAGCCAATNGNNTCCGAGCGTTTCTCANC CGGA
 ACCGCAAGACANANGGNCATGACANNCAACCNCTCGGATTGGATCTAATTCNAAAAGTTN
 NCGACTAGCANTTNAACCNNNTGCGCCNACCCCGCCTTATTTNATGCCCAATGGC
 CAAATNCGGCGNTTNAACCNNGATGGAACNCGGTTCNATTTCTCGGANAACCNCTCCNN
 GGNNAAAAAGCCNANCTCCAANTNCGCGNGNAGNAATANNATTTAACNNTATTTAAC
 CT

Cyp6a2

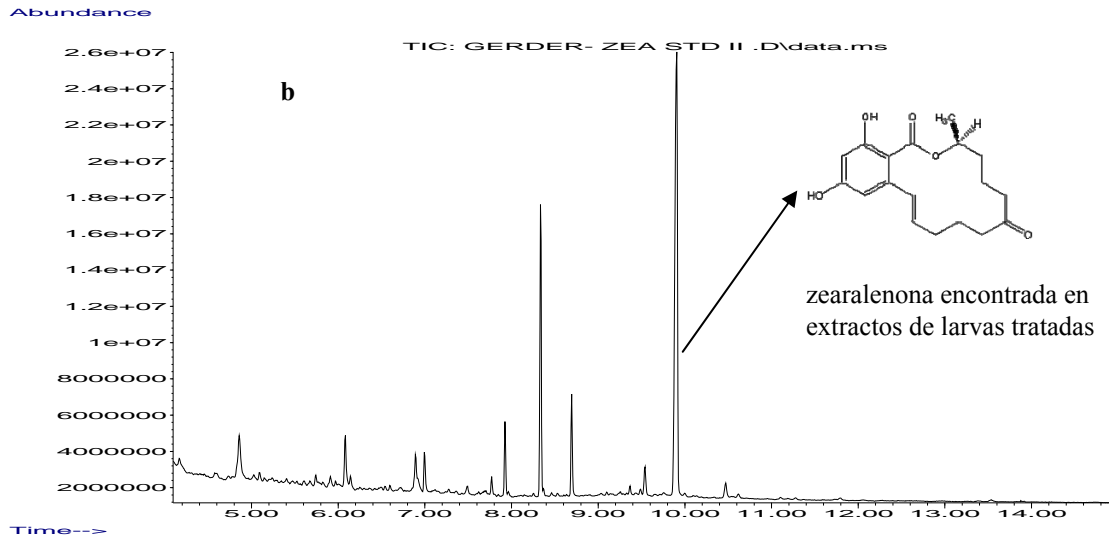
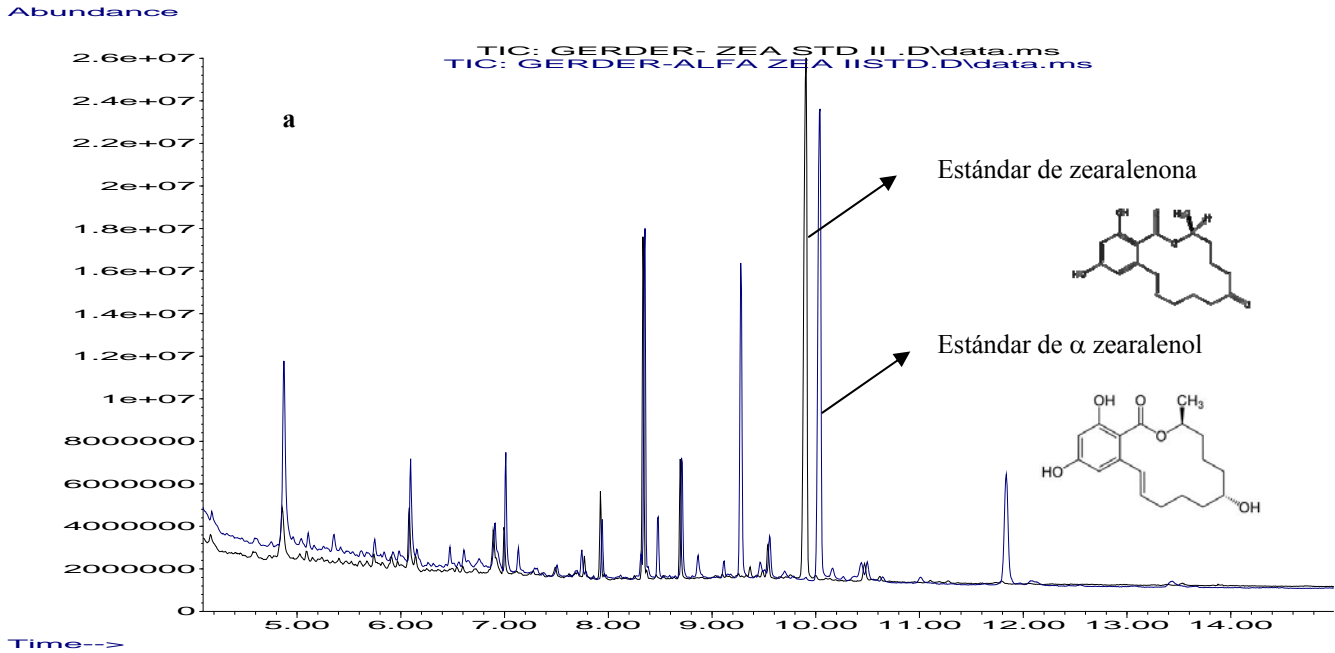
>A2-5_Sp6 sequence exported from 20070615_B11_A2-5_Sp6_03.ab1
 GCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTGCGAGCAATTCAGATTATACCTGTTGATCGCGATCTCCTC
 GCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCACA
 CGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCCGGTTCGGAAGAACCGGGTGTGCA
 CGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTTCCTTCGTGGGCTT
 TTACTTTCTGCACAAGCCGCGCCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAACATCCT
 GATCAAGGATTTCTCGAACTTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCAACAACGGGCGCGACGACCC
 GCTCACGCGACACCTGTTCAACCTGGACGGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGGCT
 GACGCCGACTTTACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGTCAAGGTGTC
 TGAGGAGTTCTCAAGGTGATCACGGANCAGGTGCCCGCCGCCCAGAACGGCGCTGTGCT
 CGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTGCCTTCGG
 CATTGAATTGTAACACGCTGCGCCACCCCTGNTCAGTGNATTTCCGCACCATGGGACAG
 AAGGGTTTACCGAATATGCGNCACGGGAAACTGCTGAACNATGTTTCGTGTTTCANCTTTT
 CCAAGCTGGCCAGCAGGTTGAGAATGNCCATGATGCCNAGANGTANCNAGTTNTTCATG
 NANNCGAATTTGGATCNAANNATACCTTTGCANNTGCGNGGTACGAGNTTTCNNNTGA
 GNCGAATTAAGCTTGGGAANCAGGNATATTTTTCNNGTGGAAATNNNCGCCANTCCCA
 ANTAGAACC GAANTAAAGNAAGCGGGNGCAAGNGNNAAAAATTTGNTNNTNAGCCC
 NTTNCGGAANTANGCNTTATAAAAAGCNCCCAGAGATTTTAANGNCTCCCCCCAA
 NGAGGCAGGN

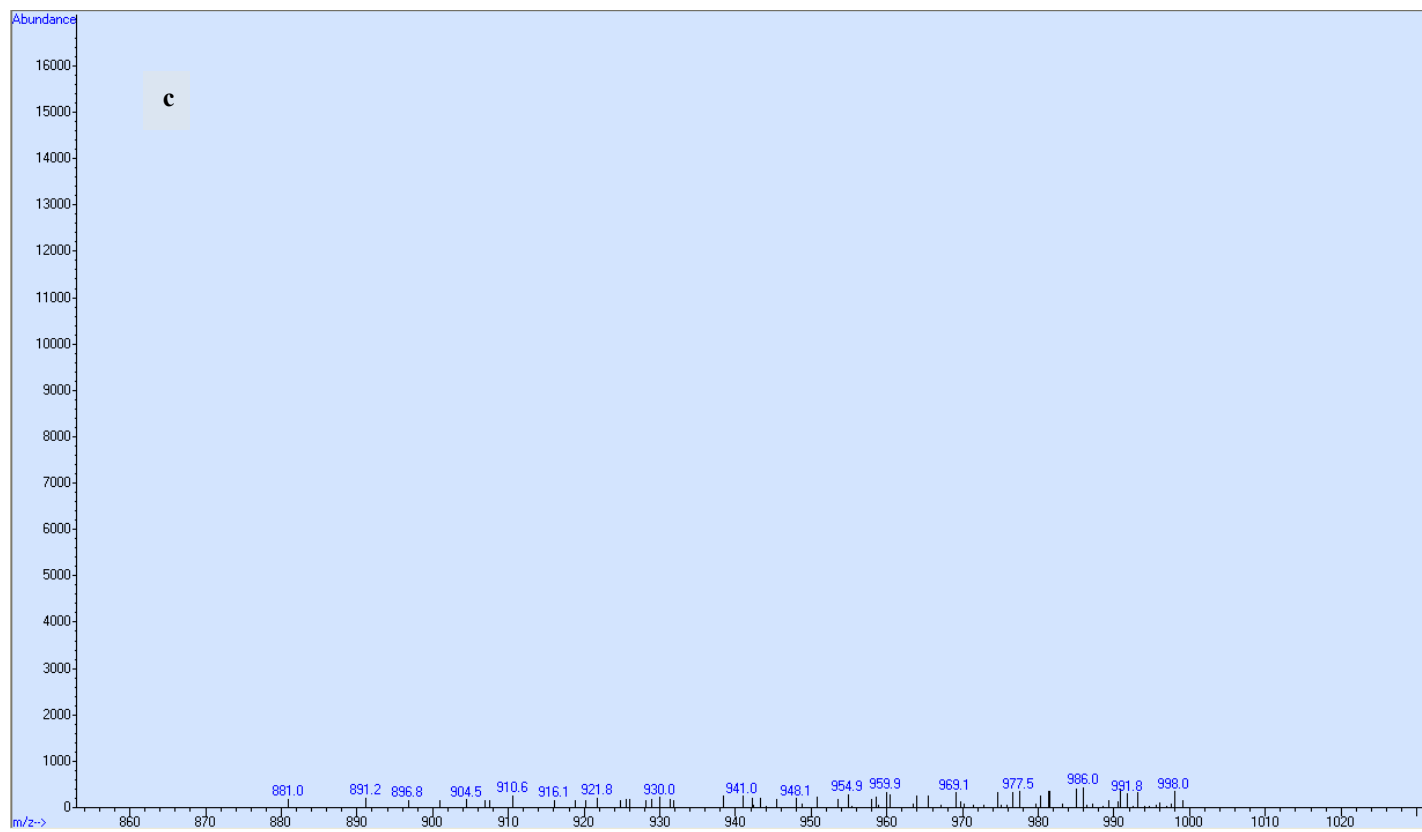
Anexo II. Análisis BLAST para los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2*

Acceso	Descripción	QC	Valor E	Im
XR_0338873.1	RNAm proteína actina de <i>Mus musculus</i> (LOC666979)	93%	0.0	98%
AC154824.2	Secuencia completa del cromosoma 13 de <i>Mus musculus</i>	93%	0.0	98%
NM_001097810.1	RNAm de la proteína LOC100037088 de <i>Xenopus laevis</i>	93%	0.0	98%
BC021796.1	RNAm de actina, cDNA clona MGC:228612 IMAGE:4218945 de <i>Mus musculus</i>	93%	0.0	98%
AE013599.4	Secuencia completa del cromosoma 2R de <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>D. m</i>)	98%	0.0	99%
BT015971.1	Inserto completo RHO9818, cDNA de <i>D. m</i>	98%	0.0	99%
NM_078904.1	RNAm del Citocromo P450-6a2 CG9438-R (<i>Cyp6a2</i>) de <i>D.m</i>	98%	0.0	99%
AC008340.5	Secuencia completa de la clona BACR07J20, región 42D-42E, cromosoma 2R de <i>D. m</i>	98%	0.0	99%
AY081960.1	RNAm de la proteína CYP6G1 de <i>D. m</i>	85%	0.0	95%
AY060770.1	cDNA (<i>GH23342</i>) <i>D. m</i>	85%	0.0	95%
NM_136899.2	RNAm (<i>Cyp6g1</i>) de <i>D. m</i> <i>Cyp6g1</i> CG8453-RA	85%	0.0	95%
BT023908.1	Inserto de cDNA de <i>D. m</i> <i>GH17321</i>	85%	0.0	95%

Donde, QC es el porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con las reportadas, el valor E nos indica la posibilidad de que la semejanza de las secuencias comparadas se deba al azar y Im nos indica el porcentaje de parecido con respecto al tamaño del fragmento.

Anexo III. Cromatogramas de GS-MC de estándares de zearalenona y α zearalenol (a), extractos de larvas de las cruas BE y E tratadas con ZEA (b) y detalle de patrón de fragmentación del posible complejo α zearalenol y ácido glucorónico (c)





Anexo IV. Resultados en el ensayo SMART para la cruza BE

0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000													
1SUMMARY OF RESULTS OBTAINED IN THE DROSOPHILA WING SPOT TEST													
Com- pound	Num- ber of wings	Spots per wing (Number of Spots)				Stat. Diagn. *	Spots with mwh clone	Mean number of cell divi- sion ser- ved cycles	Frequency of clone formation x10(-5)				
		Small single spots (1-2 cells cells) m = 2.00	Large single spots (>2 cells cells) m = 5.00	Twin spots m = 5.00	Total spots m = 2.00				ob- ser- ved	control correc- ted			
control	agua												
	40	0.40 (16)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.47 (19)		19	1.58	1.9				
buffer	0												
	60	0.40 (24)-	0.03 (2)-	0.00 (0)i	0.43 (26)-		26	1.42	1.8	-0.2			
zearalenona	0												
	60	1.77 (106)+	0.32 (19)+	0.00 (0)i	2.08 (125)+		125	1.60	8.5	6.6			
uretano	0												
	50	11.90 (595)+	2.20 (110)+	0.00 (0)i	14.10 (705)+		705	1.62	57.8	55.9			
0* Statistical diagnoses according to Frei and wuergler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308) : + = positive; - = negative; w = weak positive; i = inconclusive. m = multiplication factor. Probability levels : alpha = beta = 0.05. One-sided statistical tests													
1TABLE WITH CORRECTED SPOT INDUCTION FREQUENCIES													
Size class (i): Cells:	mwh clone size distribution							Total mwh clones	Mean clone size class(a)	Total wings	Spots per wing	Clone induction frequency (per 10**5 cells per cell division)	
	1	2	3	4	5	6	=>7					without size- correction(a)	with clone-size correction(a)
	1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	>33					(n/NC)	(2**^i/2**2)*(n/NC)
Conc.								(n)	(^i)	(N)	(n/N)	(n/NC)	(2**^i/2**2)*(n/NC)
control	agua												
	0.00	12	4	2	1	0	0	19	1.58 (0.00)	40	0.47	1.95 (0.00)	1.45 (0.00)
buffer	0.00												
	0.00	17	7	2	0	0	0	26	1.42 (0.00)	60	0.43	1.78 (0.00)	1.19 (0.00)
zearalenona	0.00												
	0.00	88	18	8	6	2	3	125	1.60 (0.00)	60	2.08	8.54 (0.00)	6.47 (0.00)
uretano	0.00												
	0.00	423	172	75	27	7	1	705	1.62 (0.00)	50	14.10	57.79 (0.00)	44.36 (0.00)
(a) values in brackets are control corrected													

Anexo V. Resultados del ensayo SMART para la cruz E

0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000

1 SUMMARY OF RESULTS OBTAINED IN THE DROSOPHILA WING SPOT TEST

Com- pound	Num- ber of wings	Spots per wing (Number of Spots)			Stat. Diagn. *	Spots with mwh clone	Mean number of cell divi- sion ser- cycles	Frequency of clone formation x10(-5)		
		Small single spots (1-2 cells cells) m = 2.00	Large single spots (>2 cells cells) m = 5.00	Twin spots m = 5.00				Total spots m = 2.00	ob- ser- ved	control correc- ted
control	agua	40	0.17 (7)	0.15 (6)	0.00 (0)	0.32 (13)	13	2.69	1.3	
buffer	0	60	0.25 (15)i	0.12 (7)-	0.00 (0)i	0.37 (22)i	22	2.18	1.5	0.2
zearalenona	0	60	1.38 (83)+	0.08 (5)-	0.00 (0)i	1.47 (88)+	88	1.30	6.0	4.7
uretano	0	60	6.48 (389)+	0.95 (57)+	0.00 (0)i	7.43 (446)+	446	1.56	30.5	29.2

0* Statistical diagnoses according to Frei and Wuergler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308) :
 + = positive; - = negative; w = weak positive; i = inconclusive. m = multiplication factor.
 Probability levels : alpha = beta = 0.05.
 One-sided statistical tests

1 TABLE WITH CORRECTED SPOT INDUCTION FREQUENCIES

Size class (i): cells:	mwh clone size distribution							Total mwh clones	Mean clone size class(a)	Total wings	Spots per wing	Clone induction frequency (per 10**5 cells per cell division)			
	1	2	3	4	5	6	=>7					without size- correction(a)	with clone-size correction(a)		
Conc.								(n)	(^i)	(N)	(n/N)	(n/NC)	(2**^i/2**2)*(n/NC)		
control	agua	0.00	3	4	3	2	0	0	1	13	2.69 (0.00)	40	0.32	1.33 (0.00)	2.15 (0.00)
buffer	0.00	11	4	1	5	0	1	0	0	22	2.18 (0.00)	60	0.37	1.50 (0.00)	1.70 (0.00)
zearalenona	0.00	71	12	1	4	0	0	0	0	88	1.30 (0.00)	60	1.47	6.01 (0.00)	3.69 (0.00)
uretano	0.00	271	118	45	8	2	2	0	0	446	1.56 (0.00)	60	7.43	30.46 (0.00)	22.46 (0.00)

(a) values in brackets are control corrected

Literatura citada

- Abid-Essefi, S., Zaied, C., Bouaziz, C., BenSalem, I., Kaderi, R y H.Bacha. 2011. Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*. (En prensa)
- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E.E. y Bacha, H. 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. in vitro* 18(4): 467–474.
- Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T.A., Anane, R., Creppy, E.E. y Bacha, H. 2003. DNA Fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicol.* 192: 237–248.
- Ashraf, A., Khalil, N., Kabapy, S, F y Christopher, S. 2011. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim. Biophys. Acta* 1816: 89–104.
- Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z., Bacha, H. y Abid, S. 2007. Toxicities induced in cultured cells exposed to Zearalenone: apoptosis or mutagenesis? *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21: 136–144.
- Bennett, J.W. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16: 497–516.
- Betina, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier. Amsterdam, Holanda. Pp: 437.
- Burke, J. D. 1971. *Biología celular*. Nueva editorial Interamericana, S. A. de C.V. 1ª ed. D.F, México. Pp: 298.
- Croute, F., Poinot, J., Gaubin, Y., Beau, B., Simon, V., Murat, J.C. y Soleilhavoup, J.P. 2002. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1591:147–155.
- De Pomerai, D.I. 1996. Transgenesis in animal systems: a view from within. *Sci. Christ. Belief* 1:39–60.
- Del Castillo, J. M. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. España Pp: 382.
- Dueñas, G. I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. y Graf U. 2001. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *DIS.* 88: 166.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 507-533.

Gandhi, R., Varak, E. y Goldberg, M.L. 1992. Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA Cell Biol.* 11:397-404.

Gayathri, M.V. y Krishnamurthy, N.B., 1981. Studies on the toxicity of mercurial fungicide Agalol3 in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Res.* 24: 89–95.

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

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

Graf, U., Spanó, M. A., Rincón, J. G., Abraham, S. K. y Andrade, H. H. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Environ. Mutagen. Carcinogenesis.* 16: 1-7.

González, F., Crespi, Ch. y Gelboin, H. 1991. cDNA-expressed human cytochrome P450's: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.* 247: 113-127.

González, F. J. y Gelboin, H. V. 1992. Human cytochromes P450: Evolution and cDNA-directed expression. *Ann. Rev. Biochem.* 98:81-85.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* 4th edition. Oxford University press. USA. Pp: 851.

Hobbs, A. A., Mattschoss, L. A., May, B. K., Williams, K. E. y Elliott, W. H. 1986. The cDNA and protein sequence of a phenobarbital-induced chicken cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 261: 9444-9449.

Humphreys, J.M., y Chapple, C. 2004. Immunodetection and quantification of cytochromes P450 using epitope tagging: immunological, spectroscopic, and kinetic analysis of cinnamate 4-hydroxylase. *J. Immunol. Method.* 292: 97–107.

Kiessling, K.H. y Pettersson, H. 1978. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43: 285–290.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Porcher, J. M. y Aït-Aïssa, S. 2008. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples. *J Chromatogr. A.* 1190: 307-315.

Kohler, H.R., Alberti, G. y Seniezak, A. 2005. Lead induced hsp70 and hsp60 pattern transformation and leg malformation during postembryonic development in

- orbatid mite, *Archeogozetes longisetosus* Aoki. *Comp. Biochem. Physiol.* 141: 398–405.
- Le, G. y Pakdel, F. 2001. Streamlined beta-galactosidase assay for analysis of recombinant yeast response to estrogens, *BioTechniques* 30(5): 1000–1004.
- Lindquist, S. y Craig, E.A., 1988. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 22: 631–677.
- Mahendra, P. S., Krishna, M. M., Mathur, N., Saxena, D.K. y Chowdhuri, D. 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: Role of ROS generation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235: 226–243.
- Miles, C.O., Erasmuson, A.F., Wilkins, A.L., Towers, N.R., Smith, B.L., Garthwaite, I., Scahili, B.G. y Hansen, R.P. 1996. Ovine metabolism of zearalenone to zearalanol (zeranol). *J. Agricul. Food Chem.* 44: 3244–3250.
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V. y Christensen, S.M., 1980. *Advances in cereal chemistry.* American 8. St. Paul, MN, USA. 317-353.
- Morimoto, R.I., 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409–1410.
- Murata, H., Sultana, P., Shimada, N. y Yashioka, M. 2003. Structure activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence. *Vet. Hum. Toxicol.* 45: 18–20.
- Olsen, M. 1989. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. Pp: 167–177.
- Omura, T. y Sato, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239(7): 2370-2378.
- Oram, J. F. 2002. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* 13:373–381.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E.E. y Bacha, H. 2003. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutat. Res.* 538(1–2): 63–70.
- Ouanes, Z., Ayed-Boussema, I., Baati, T., Creppy, E.E. y Bacha, H. 2005. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17 beta estradiol, progesterone and Vitamin E. *Mutat. Res.* 565(2): 139–149.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Chekir-Ghedira, L. y Bacha, H. 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16(10): 2315–2320.

- Plant, N. 2003. Molecular toxicology. BIOS Scientific Publishers. 1st. Ed. USA. Pp: 150.
- Rockstein, M. 1978. Biochemistry of insects. 2nd. Ed., Vol. 1. Academic Press. New York. USA. Pp: 649.
- Rodríguez-Arnaiz, R. 2003. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. 3^a ed. Serie La Ciencia para Todos, Vol. 124. FCE, SEP, CONACYT. D.F, México Pp: 93.
- Rodríguez-Arnaiz, R. 2004. Metabolismo de las toxinas ambientales. 1^a ed. Serie La Ciencia para Todos, Vol. 199. FCE, SEP, CONACYT. D.F. México Pp: 112.
- Saner, C., Weibel, B., Würzler, F. y Senggstag, C. 1996 Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. Environ. Mol. Mutag. 27: 46-58.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz. J. Med. Biol. Res. 38: 995-1014
- Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W. y Mirocha, C. J. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. Toxicol 39 (9):1435–1438.
- Tennessee, J.M., Baker, K.D., Lam, G., Evans, J., Thummel, C.S. 2011. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. Cell Metab. 2;13(2):139-48.
- Urry, W.H., Wehrmeister, H.L., Hodge, E.B. y Hidy, P.H. 1966. The structure of zearalenone. Tetrahedron Lett. 27: 3109-3114.
- Visconti, A. y Pascale, M. 1998. Determination of Zearalenone in corn by means immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr A. 815: 133-140.
- Wafa, H., Emna, E., Isabelle, A., Théophile, M., Moncef, L., Edmond, C. y Hassen. 2004 Cytotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. Toxicology 207: 293–301.
- Wafa, H., Imen, A., Amaia, A., Adela, De C., y Hassen, B. 2007. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. Toxicology 232: 294–302.
- William, A. 1994. Steroid receptors and orphan receptors in *Drosophila melanogaster*. Semin. Cell Biol. 5: 105-113.
- Xu, C., Li. y C.Y. y Kong, A.N. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch Pharm Res. 28(3):249-68.

Zengli, Yu., Dongsheng, Hu. y Yin, Li. 2004. Effects of Zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58: 187-193.