



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Niveles de transcripción de genes marcadores de metabolismo xenobiótico, estrés oxidante y apoptosis en dos cepas de larvas de *Drosophila melanogaster* tratadas con zearalenona.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

TORRES GREGORIO JUAN TOMAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Elías Piedra Ibarra

2017

SINODALES:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Dr. Oswaldo Valdés López

M. C Irma Elena dueñas García

M. C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido

Trabajo financiado por DGAPA-PAPIIT-Proyecto IG200814

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017

IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi padre, porque a pesar de todas las adversidades nunca dejo de apoyarme y creer en mí, sé que en donde quiera que esté el nunca deja de cuidarnos. Gracias por todo, este logro se lo dedico con mucho cariño.

Agradecimiento

A mi madre, gracias por creer en mí, por su apoyo y su amor que me ha brindado a lo largo de esta etapa y en toda la vida, este logro también es de ella.

A mis hermanos, mis mejores amigos y confidentes.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra, gracias por todo su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y su dedicación.

Gracias a todos los que forman parte del laboratorio de Fisiología Vegetal por su apoyo y los buenos momentos.

A mi mejor amiga de la carrera, Ana Elenka, gracias por los buenos momentos y por todo tu apoyo.

Índice

Resumen	4
Introducción.....	5
Biotransformación o metabolismo xenobiótico	5
Fases del MX	5
Activación metabólica o bioactivación de xenobióticos	7
Zearalenona	7
Presencia de ZEN en cultivos y alimento para ganado en México.....	8
Metabolismo de la ZEN	9
Efecto citotóxico y genotóxico de la ZEN.....	11
D. melanogaster como modelo de estudio.....	14
Cepas mutantes de D. melanogaster	15
Cyp450s en D. melanogaster	16
Proteínas que salvaguardan la integridad celular: Proteínas de choque térmico (Heat shock proteins).....	17
Hsp70	17
Hsp60	18
Genes involucrados en la muerte celular programada.....	18
Genes inductores de apoptosis	18
DmP53	19
Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Hipótesis	21
Material y métodos.....	22
Prueba de toxicidad.....	22
Sincronización y colecta de huevos	22
Recuperación de larvas y tratamientos	22
Procesamiento de las muestras	23
Extracción de ARN	23
Tratamiento con DNAsa	24
Síntesis de ADNc.....	24
Diseño de primers	25
Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	26
PCR semi-cuantitativa	26
Normalización de las condiciones de amplificación.....	26

PCR cuantitativa tiempo real (qRT-PCR).....	26
Resultados.....	28
Especificidad de los primers diseñados	28
Determinación de niveles de expresión genética mediante PCR semi-cuantitativa	30
Determinación de niveles de expresión genética mediante PCR cuantitativo tiempo real	34
Nivel de expresión génica basal en las cepas.....	35
Niveles de expresión relativa inducidos por los tratamientos.....	36
Marcadores de MX	36
Marcadores de estrés oxidante	37
Marcadores de apoptosis	38
Comparación de los niveles de expresión en los tratamientos con ZEN.....	39
Discusión	42
Resultados de la PCR-semicuantitativa	42
PCR cuantitativa tiempo real (qPCR-RT).....	44
Nivel de expresión génica basal entre las cepas	44
Niveles de expresión relativa inducidos por tratamientos	46
Marcadores de MX	46
Marcadores de estrés oxidante	48
Marcadores de apoptosis	50
Comparación de los niveles de expresión en los tratamientos con ZEN.....	53
Conclusiones.....	56
Referencias	57
Anexo 1.....	72
Anexo 2.....	73
Anexo 3.....	75
Anexo 4.....	78
Anexo 5.....	82

Resumen

El principio básico del metabolismo xenobiótico es convertir estas sustancias lipófilas a metabolitos hidrófilos que pueden ser más fácilmente excretadas. Algunas veces durante este proceso de biotransformación, los xenobióticos con baja reactividad pueden ser activados a metabolitos más reactivos (bioactivación). Un ejemplo es la conversión de la zearalenona en metabolitos que constituyen una importante clase de disruptores endócrinos. Se ha reportado además una actividad citotóxica y genotóxica de la zearalenona que es independiente de su actividad estrogénica. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles relativos de transcripción de genes marcadores de metabolismo xenobiótico, estrés oxidante y apoptosis en larvas de dos cepas de *Drosophila melanogaster* tratadas con ZEN, para aproximarnos a los procesos celulares involucrados en su metabolismo y en sus efectos. Para esto se amplificaron los genes de interés usando ADNc como molde mediante PCR semi-cuantitativa y PCR tiempo real. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que en presencia de la ZEN existe un aumento en la expresión de genes Cyp450 particularmente Cyp6g1. En el caso de los marcadores de estrés oxidante, el gen *hsp60* elevó su expresión en ambas cepas. Los genes inductores de apoptosis presentaron diferencias en sus patrones de expresión en cada cepa, lo que puede indicar que las cepas respondieron de formas diferentes en presencia de la micotoxina. En base a estos resultados concluimos que la zearalenona es metabolizada por la enzima Cyp6g1 e induce un desbalance en las especies reactivas de oxígeno lo que desencadena un efecto citotóxico.

Introducción

Biotransformación o metabolismo xenobiótico

Los compuestos tóxicos en el ambiente plantean un constante cambio a la supervivencia de todos los organismos vivos. Estas toxinas, referidas como xenobióticos entran al cuerpo por el contacto físico, inhalación, o ingestión y pueden venir de varias fuentes, incluyendo medicinas, pesticidas, toxinas vegetales o fúngicas y contaminantes (Xu *et al.*, 2005). La disposición de un xenobiótico requiere de su absorción, distribución, biotransformación y excreción. La mayoría de los xenobióticos que entran al cuerpo son lipófilos. Esta propiedad les permite penetrar membranas lipídicas, ser transportadas por lipoproteínas en sangre y ser rápidamente absorbidas por el órgano blanco. Sin embargo, los mecanismos de excreción de los organismos requieren de cierto grado de hidrofobicidad en los compuestos. En ausencia de medios eficientes para la excreción, la constante exposición al compuesto lipófilo, podría resultar en la acumulación del xenobiótico dentro del organismo (Dekant, 2009).

Los animales tienen la capacidad de defenderse contra estos compuestos a través de numerosos procesos bioquímicos que convierten compuestos lipófilos a hidrófilos para que estos puedan ser fácilmente excretados. Este proceso enzimático es denominado biotransformación de xenobióticos o metabolismo xenobiótico (MX) (Misra *et al.*, 2012).

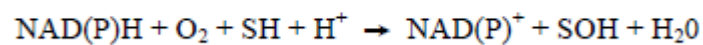
Fases del MX

El MX consta de tres fases: la fase I que consta de enzimas de desintoxicación, la fase II que consta de enzimas que actúan sobre los productos de la fase I o compuestos menos hidrofóbicos y la fase III que transporta y exporta las toxinas conjugadas fuera de la célula (Misra *et al.*, 2012).

Las enzimas de la fase I de desintoxicación representan las más abundantes clases de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Éstas consisten en los Cyp450, que constituyen una súper familia de hemo enzimas encontradas en casi todos los seres vivos (Nelson *et al.*, 1996). Los Cyp450 han sido tradicionalmente referidos como hidroxilasas, con funciones mezcladas de oxidasas y monooxigenasas. Su principal función es activar el oxígeno molecular para producir una especie reactiva que puede atacar sitios químicos relativamente inertes para introducir grupos hidroxilo

dentro de estructuras no reactivas como cadenas de hidrocarburos y anillos aromáticos. Esto sirve para facilitar la biotransformación de estos compuestos que de lo contrario carecerían de grupos funcionales sustituibles para la conjugación. Sin embargo, los Cyp450 también catalizan una amplia variedad de otras reacciones químicas, incluyendo desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones, epoxidaciones, *N*-oxidaciones, peroxidaciones y sulfoxidaciones.

En la reacción normal de hidroxilación catalizada por los Cyp450s, el oxígeno molecular es escindido en sus dos átomos. Uno de los átomos de oxígeno es incorporado dentro de una molécula blanco, mientras el átomo restante es liberado como parte de una molécula de agua. La estequiometría básica de la hidroxilación catalizada es representada en la siguiente ecuación:



El aspecto fundamental de esta reacción es aplicable a enzimas microsomales y mitocondriales encontradas en organismos eucariontes (De Montellano, 2005).

Las enzimas de la fase II también juegan un importante papel en la biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos a formas más fácilmente excretables, así como a la inactivación metabólica de sustancias activas farmacológicamente. El propósito de la fase II de biotransformación es lograr reacciones de conjugación; éstas incluyen glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación de aminoácidos y la unión a glutatión. En general los respectivos conjugados son más hidrofílicos que los compuestos originales. Las enzimas metabolizadoras de drogas de la fase II son principalmente transferasas e incluyen: UDP-glucotransferasas (UGTs), sulfotransferasas (SULTs), *N*-acetiltransferasas (NATs), glutatión s-transferasas (GSTs) y varias metiltransferasas.

Estas enzimas han atraído mucho menos atención en la farmacología clínica a los Cyp450 debido a que la interacción de drogas que involucran a estas enzimas son relativamente raras. Aunque las reacciones de la fase II son generalmente de desintoxicación, los conjugados formados pueden también mediar efectos adversos (Por ejemplo: conjugados que actúan como acarreadores de compuestos

potencialmente carcinógenos en la activación de alcoholes benzílicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitroalcanos y sulfurotransferasas (Jancova *et al.*, 2010).

Activación metabólica o bioactivación de xenobióticos

El principio básico del MX es convertir estas sustancias lipófilas a metabolitos hidrófilos que pueden ser más fácilmente excretadas del cuerpo. Algunas veces durante este proceso de biotransformación, los xenobióticos con baja reactividad química pueden ser activados a metabolitos químicamente más reactivos por enzimas del MX. Este proceso de biotransformación es comúnmente referido como activación metabólica o bioactivación y es conocido por ser el evento inicial en los procesos de toxicidad (Sabry, 2010).

Un ejemplo de la reacción de bioactivación es la conversión de la zearalenona (ZEN) en metabolitos hidroxilados, los cuales tienen una gran afinidad a los receptores estrogénicos de mamíferos y por lo tanto actúan como agonistas del 17 β -estradiol (Barug *et al.*, 2006).

Zearalenona

La ZEN también conocida como toxina F-2, es una micotoxina estrogénica no esteroidea, sintetizada por hongos del género *Fusarium*, en particular las especies *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cereales*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* y *F. semitectum* (Bennett y Klich, 2003). Es una molécula termoestable (temperatura de disociación: 164-165 °C) (EFSA, 2004) y es encontrada alrededor del mundo en cereales almacenados y en alimentos hechos con maíz, trigo, avena, cebada, arroz o sorgo (Tanaka *et al.*, 1988). La ZEN y sus metabolitos (Figura 1) constituyen una importante clase de disruptores endócrinos que actúan de manera similar al 17 β -estradiol. Estos interactúan con los receptores de estrógeno α y β e inhiben la liberación y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), alterando las funciones del sistema endócrino (Parveen *et al.*, 2009; Minervini y Dell, 2008), causando efectos adversos a la salud y cambios morfológicos y funcionales en el sistema reproductivo como: ninfomanía, pseudopreñado, atrofia ovárica, cambios en el endometrio, infertilidad, reducción del tamaño de la progenie, cambios en el peso de la glándula pituitaria, tiroides y adrenales, cambios en los niveles séricos de progesterona y estradiol entre otros (EFSA, 2004; Malekinejad *et al.*, 2006; Glenn, 2007; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

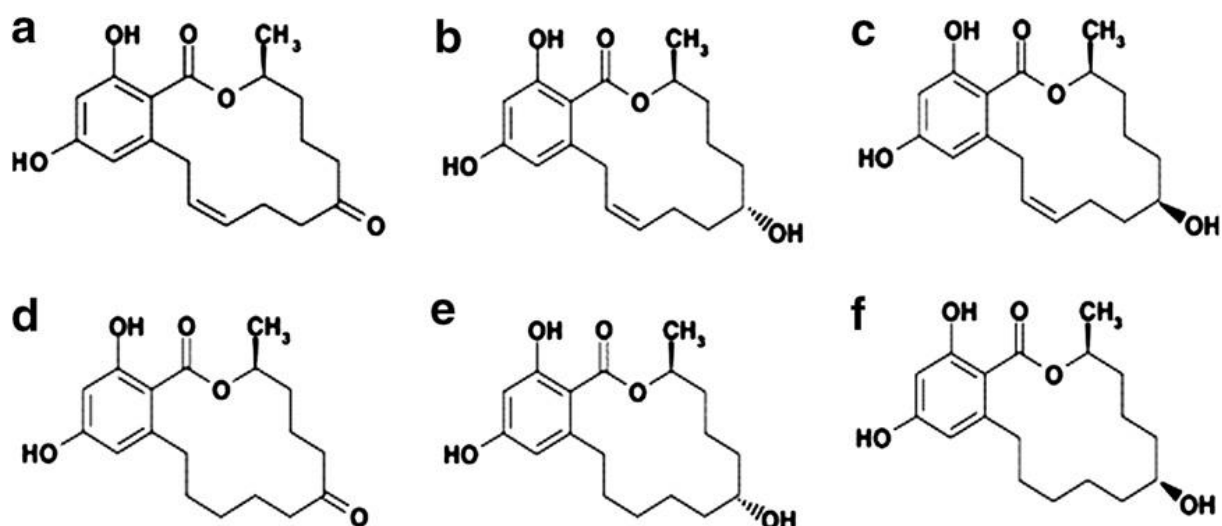


Figura 1: Estructura química de la ZEN y sus derivados: (a) Zearalenona, (b) α -zearalenol (α -ZEA), (c) β -zearalenol (β -ZEA), (d) α -zearalanal (α -ZAL), (e) β -zearalanol (β -ZAL), (f) zearalanone (ZAL) (Zinedine *et al.*, 2006)

Presencia de ZEN en cultivos y alimento para ganado en México

De acuerdo a lo mencionado en los apartados anteriores, la ZEN es por lo tanto una micotoxina frecuentemente estudiada y su análisis ha sido incluido en el control de calidad interno de la producción de maíz por varias compañías dedicadas a la producción de cereales (Milicevic, 2010). Con respecto a la exposición de la ZEN en la población mexicana, González y Farres, en 2011, hicieron una evaluación del riesgo basados en la comparación de la exposición de los consumidores a esta micotoxina presente en granos de trigo con las pautas de seguridad tales como la “dosis diaria tolerable”.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2011), la población mexicana consume 99.45 g por día de trigo correspondiendo a 36.3 Kg por persona por año. Por lo tanto, considerando un peso corporal promedio de 75 Kg y los niveles promedio de micotoxina analizados en las muestras de su estudio, la dosis diaria de ZEA por consumo de trigo en la ciudad de México fue estimada en 0.102 μ g por kilogramo de peso corporal por día. Sin embargo, dada la variedad de productos hechos con este cereal y el gran número de productos hechos con otros tipos de granos, es probable que la exposición a esta micotoxina esté por encima del máximo establecido por la FAO (Gonzalez-Osnaya y Farrés, 2011).

Un estudio de caso sobre micotoxinas en Nayarit, reportó que en muestras de maíz forrajero se detectó la presencia de fumonisina B1, toxina T-2 y ZEN. La ZEN se detectó en 15% de las muestras con un promedio de $1.610 \pm 375 \mu\text{g/Kg}$, señalando que el maíz forrajero en la entidad se usa principalmente para consumo animal, pero en algunos casos también se utiliza para el consumo humano (Robledo *et al.*, 2001).

Respecto a la legislación mexicana relacionada con micotoxinas, solo existen tres normas en donde se establece el límite máximo de aflatoxinas en maíz para consumo humano ($20 \mu\text{g/Kg}$) y animal (de 21 a $300 \mu\text{g/Kg}$) (NOM-188-SSA1-2002). Así mismo, para masa, tortillas, harinas y tostadas de maíz nixtamalizado, el nivel máximo de aflatoxinas es de $12 \mu\text{g/Kg}$, mientras que para tortillas de trigo, tortillas integrales y harinas de trigo es de $20 \mu\text{g/Kg}$ (NOM-187-SSA1/SCFI-2002). De igual manera se establece un máximo de $20 \mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas para el cacao y sus derivados (NOM-186-SSA1/SCFI-2002). No existe aún legislación para otras micotoxinas que ya han sido detectadas en otros alimentos para humanos y animales (Robledo *et al.*, 2012).

Metabolismo de la ZEN

En humanos se ha visto que la ZEN es absorbida rápidamente después de su ingesta y metabolizada principalmente en células del intestino y células hepáticas (Olsen *et al.*, 1985). Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que esta micotoxina es metabolizada vía reducción e hidroxilación por enzimas cyp450 de la fase I del MX (Malekinejad *et al.*, 2006) y es significativamente eliminada a través de la bilis y orina. La excreción biliar y el ciclo enterohepático son procesos importantes en el metabolismo de la ZEN (Biehl *et al.*, 1993). Estudios farmacocinéticos y del metabolismo indican que, en las células intestinales, la ZEN es degradada por hidroxilación del grupo ceto en el carbono 6 a α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) o taleranol y zearalanone (ZAN), que son subsecuentemente conjugados con ácido glucurónico o sulfónico (Figura 2) y eliminados en la orina (JECFA, 2000).

Los productos reducidos han sido encontrados en varias especies de mamíferos, en particular α y β -ZOL. La α -ZOL ha demostrado tener una mayor afinidad a los receptores estrogénicos, de 3 a 4 veces más alto que el potencial estrogénico de la

ZEN (Kuiper *et al.*, 1987), relacionando su toxicidad inevitablemente con su metabolismo (Shier *et al.*, 2001; Hildebrand *et al.*, 2012).

Estudios han demostrado que la ZEN está sujeta a la fase II del metabolismo xenobiótico de humanos. Su conjugación con ácido glucurónico y sulfato probó ser la principal vía metabólica en varias especies animales y humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos reportes también muestran que los metabolitos de la fase I de la ZEN son propensos a las reacciones de conjugación (Warth *et al.*, 2013). En ratas, la mayoría de la ZEN fue detectada en la orina como ZEN libre o como conjugado glucurónido (catalizado por UGT: uridin difosfoglucoronil transferasa) (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987), mientras solo la presencia de pequeñas cantidades de ZOLs α y β y sus conjugados son producidos por el metabolismo (FAO, 2000). De hecho, la glucuronidación facilita la eliminación pre sistémica de toxinas hidrofóbicas y drogas; por lo tanto, conjugados glucurínidos y las α -ZOL predominan en varias especies. No existe mucha información sobre la participación de la fase III en el metabolismo de ZEN; sin embargo, se tiene reportado que la principal vía de excreción de esta micotoxina como glucurónido en mamíferos es a través de la orina (JCFA, 2000).

Aunque varios estudios demuestran que ZEN es eficientemente metabolizado a compuestos con relativamente baja toxicidad, la biotransformación de la ZEN es considerada como solo una vía de desintoxicación parcial, pues la toxicidad del metabolito todavía existe (Tiemann *et al.*, 2003).

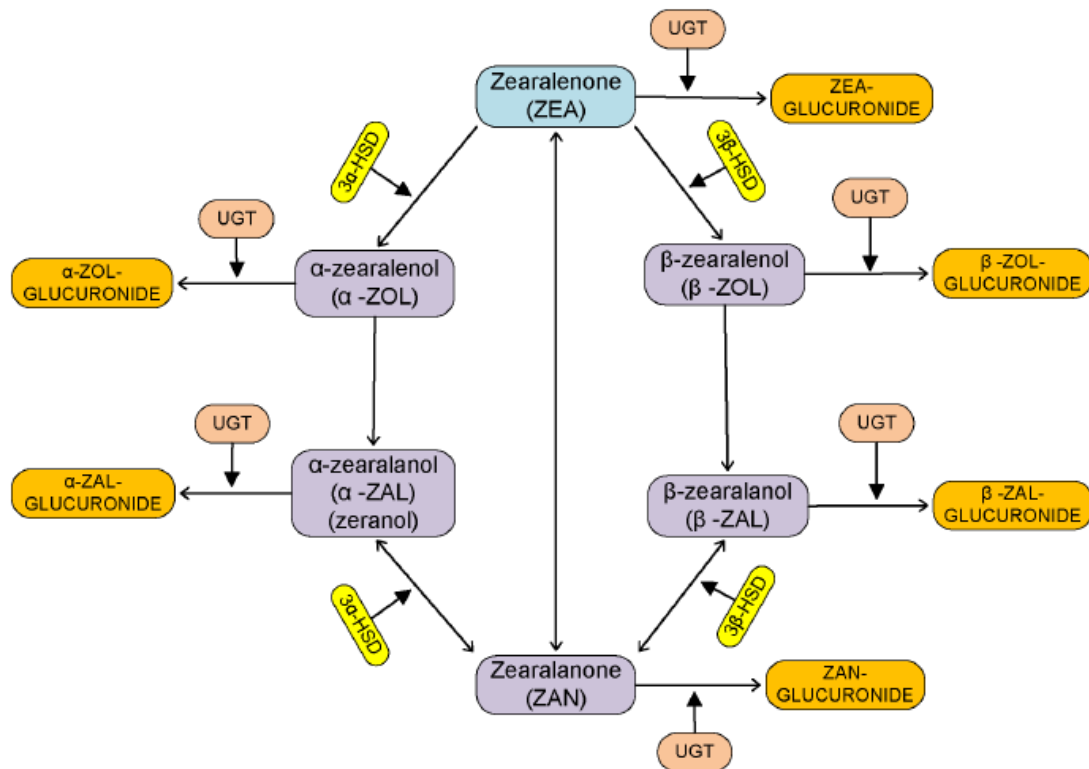


Figura 2: Metabolismo de la ZEN: principales vías de biotransformación de ZEN ZAN y en mamíferos llevada a cabo por enzimas hidroxil-esteroides deshidrogenasas y UGT (adaptado por Mukherjee *et al.*, 2014).

Efectos adversos de la ZEN

Se ha reportado una actividad citotóxica y genotóxica de la ZEN que es independiente de la afinidad a receptores de estrógenos (Chen *et al.*, 2015). Varios estudios la reportan como hepatotóxica, afectando algunos parámetros enzimáticos de la función hepática en ratas y conejos (Maaroufi *et al.*, 1996; Conkova *et al.*, 2001), esto es, induce lesiones adversas en el hígado con el subsecuente desarrollo de efectos cancerígenos (hepatocarcinomas) (NTP, 1982). Cabe resaltar que la ZEN es principalmente metabolizada en el hígado, el cual parece ser uno de sus principales blancos (Kiessling y Patterson, 1978). La ZEN también ha mostrado ser hematotóxica, induciendo modificaciones de los parámetros hematológicos y disfunciones en el proceso de la coagulación de la sangre en humanos (Maaroufi *et al.*, 1996; Ostry, 1998); varias alteraciones de los parámetros inmunológicos que fueron asociadas con diferentes concentraciones de la ZEN en humanos (Berek *et al.* 2001), en ratones (Marin *et al.*, 1996) e *in vitro* (inhibición de la proliferación de

linfocitos estimulada por mitógenos, incremento de la producción de IL-2 e IL-5 e inducción de efectos de inmunosupresión) (Murata *et al.*, 2003).

En cuanto a sus metabolitos α y β -ZOL, estos reducen la viabilidad de células Caco-2 y espermatozoides (Abid-Essefi *et al.*, 2009; Benzoni *et al.*, 2008); adicionalmente se ha establecido que las α y β -ZOL han sido citotóxicas en células Vero, por inhibición de la viabilidad celular, síntesis de proteínas y ADN (Othmen *et al.*, 2008).

Para determinar la genotoxicidad de la ZEN, desde 1976 se han realizado limitados estudios que han mostrado que causa efectos negativos sobre el ADN como por ejemplo: una deficiente recombinación en *Bacillus subtilis* (Ueno y Kubota, 1976), incremento del intercambio entre las cromátides hermanas (Thurst *et al.*, 1983) incremento de los aductos del ADN (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1995), así como la inducción de los procesos de reparación SOS en bacterias lisogénicas (Chekir-Ghedira *et al.*, 1998); adicionalmente se ha reportado que la ZEN produce aductos y fragmentación del ADN, así como fragmentación de micrónúcleos y aberraciones cromosómicas e induce apoptosis en hepatocitos humanos HepG2, vía la señalización mitocondrial dependiente de p53 (Ayed-Boussema *et al.*, 2008).

Sin embargo, los trabajos anteriores contrastan con otros reportes en los que no se han encontrado efectos genotóxicos de la ZEN. De hecho, la ZEN fue negativa en la prueba Ames (prueba para evaluar el potencial mutagenico de un compuesto) con varias cepas de *Salmonella typhimurium*, con o sin activación por microsomas de hígado de rata (Kuczuck *et al.*, 1978; Stark, 1980; Tennant *et al.*, 1987). Resultados negativos fueron de igual forma obtenidos con ensayos de mutaciones puntuales en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usando el locus *ade2*, el cual en condición homocigota y privados de adenina acumulan pigmentos rojos (Kuczuck *et al.*, 1978). Esto también se aplica en pruebas de reparación de la síntesis de ADN no programada en hepatocitos de rata y la prueba de mutación directa con células de linfoma de ratón L5178YTK (Tennant *et al.*, 1987). En otros estudios *in vitro* los ensayos de aberración cromosómica, así como ensayos de intercambio de cromátides (fibroblastos humanos, células de hámster V79, linfocitos periféricos humanos, espermatozoides, y células de medula ósea) fueron en algunos casos débilmente positivas (Galloway *et al.*, 1987) (Makawy *et al.*, 2001) (Lioi *et al.*, 2004).

La carcinogenicidad de la ZEN es todavía cuestionable debido a su clasificación por la Agencia Internacional de Investigación Sobre el Cáncer como carcinógeno del grupo 3 (no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos) (IARC, 1993).

El posible potencial citotóxico y genotóxico podría estar conectado con el estrés oxidante intracelular generado por la ZEN, dado que algunos reportes han demostrado que la ZEN induce peroxidación de lípidos (Zourgui *et al.*, 2008) que podría resultar en la inducción de daño oxidante al ADN (Abbès *et al.*, 2007) y apoptosis a través de la vía mitocondrial (Abid-Essefi *et al.*, 2004) (Bouaziz *et al.*, 2008). Efectos negativos de la ZEN sobre enzimas de hígado y estrés oxidante en múltiples órganos fueron observados principalmente en estudios usando grandes concentraciones de ZEN (Salah-Abbès *et al.*, 2009). Sin embargo tales trabajos resultan controversiales debido a que altas concentraciones de la ZEN no son comunes en el alimento de los animales (Zinedine *et al.*, 2007). Adicionalmente, Zhu y colaboradores en el 2012 reportaron que la ZEN en altas concentraciones (30-120 μM) disminuyó la proliferación de células granulosa porcina, causando apoptosis y necrosis de manera dependiente de la dosis. El estudio reveló que la ZEN provoca la pérdida del potencial de membrana en la mitocondria e incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS) en la célula (Zhu *et al.*, 2012). Otros estudios *in vitro* reportan daño oxidante e inhibición de proteínas y síntesis de ADN en la línea celular Caco-2 de humano o en células epiteliales del intestino de cerdo; sin embargo, la información *in vivo* que soporte estas observaciones es limitada (Liu *et al.*, 2014).

Nuestro laboratorio determinó que en *D. melanogaster*, la ZEN no posee efecto genotóxico a través de la prueba SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) en ala, que detecta genotoxícos y promutágenos que requieren ser bioactivados, también permite evaluar las relaciones entre la estructura y la actividad de grupos de compuestos y la genotoxicidad de mezclas complejas. Esta prueba se basa en la expresión de mutaciones recesivas en células somáticas de organismos transheterocigotos debido a la pérdida de heterocigosis de marcadores genéticos que determinan manchas o clones e tricomas en las alas de organismos adultos (Graf *et al.*, 1984).

A pesar de que la prueba SMART en ala resulto negativa para la ZEN, se observó la alteración de algunos parámetros reproductivos; estas alteraciones no pueden ser explicadas por la actividad estrogénica de la micotoxina, dado que dentro del genoma de *D. melanogaster* no se han reportado genes ortólogos que codifiquen para receptores de estrógenos α y β ,(Sun *et al.*, 2015); por lo tanto, tales efectos podrían ser un indicativo de daños a nivel citotóxico o genotóxico que no pueden ser observados a través de la prueba SMART y causados posiblemente por un aumento en el nivel de EROS.

Para aproximarnos a los procesos celulares relacionados con esta micotoxina, se decidió evaluar la expresión de genes marcadores de procesos del MX, del estrés oxidante y de apoptosis en larvas de dos cepas de *D. melanogaster* con diferencias en la expresión de citocromos p450 (Cyp450).

***D. melanogaster* como modelo de estudio**

D. melanogaster provee algunas ventajas para la detección de daños causados por la ZEN *in vivo* e independientemente del potencial estrogénico de la micotoxina debido a la ausencia de receptores de estrógeno en este organismo. *D. melanogaster* posee la ventaja de tener una genética y biología del desarrollo bien documentadas, también implica menos objeciones éticas y está dentro de las recomendaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), además permite la evaluación de efectos a largo plazo en un corto periodo de tiempo dado su ciclo vital (Ahamed *et al.*, 2010). Uno de los factores más críticos para los estudios genéticos es el tiempo generacional. Un ciclo vital corto facilita la experimentación genética, de ahí que la mosca de fruta se haya convertido en uno de los favoritos de los genetistas. Un día después de haber sido fertilizado, el embrión de *D. melanogaster* se convierte en una larva en forma de gusano. Durante los siguientes cuatro días, la larva aumenta de tamaño hasta convertirse en pupa inmóvil en la que ocurre la metamorfosis. En los siguientes cuatro días el cuerpo tubular de la larva es completamente remodelado y da lugar a una mosca adulta. En total, el ciclo vital de *D. melanogaster* se completa en diez días bajo condiciones de temperatura constante.

También presenta numerosas ventajas prácticas al ser un organismo pequeño (2 mm. de largo), altamente fértil y de mantenimiento fácil y económico. En el aspecto

técnico, ofrece insuperable flexibilidad genética y múltiples procedimientos para manipular cualquier gen. Por último, las cepas mutantes para casi todos los genes de la mosca (mutados individualmente) están disponibles en centros de distribución alrededor del mundo (www.flybase.org) (Matthews *et al.*, 2005).

El genoma de *Drosophila* se secuenció por completo en el 2000 por un consorcio de más de 30 grupos de investigación privados y académicos dirigidos por Craig Venter en Celera Genomics. El genoma contiene aproximadamente 165 millones de nucleótidos y codifica para ~13,600 genes. Por comparación el genoma humano tiene 3,300 millones de nucleótidos y se calcula que codifican para ~25,000 genes. Curiosamente, las diferencias entre el hombre y las moscas están contenidas en poco más del doble de genes; además, 75% de los genes implicados en enfermedades humanas tienen su homólogo en *D. melanogaster*. Entre *D. melanogaster* y mamíferos, la identidad global para dominios funcionales a nivel de secuencias proteicas o nucleotídicas pueden ser de cerca del 80% (Bhan, 2011). Por otra parte, el MX, localizado en el cuerpo graso larval y en los túbulos de malpigi, lleva a cabo reacciones similares a aquellas del hígado y sistema inmune de mamíferos (Yang *et al.*, 2007). Por lo tanto, muchas patologías humanas se pueden estudiar con la mosca de la fruta como organismo modelo (Celeniker y Rubin, 2003).

Cepas mutantes de *D. melanogaster*

Entre las cepas mutantes desarrolladas para investigación en genotoxicidad hay dos de importancia: *Oregon-flare*³ (*ORR(1)/ORR(2);flr³/bd⁶*) y *flare* (*flr³/Bd⁶*). La cepa Oregón tiene en el cromosoma 2, una mutación dominante *Rt(2)DDT/Cyp6g1* y *Cyp6a2* (Daborn *et al.*, 2001) que afectan los niveles de expresión de los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2*, aumentándolos y confiriéndole a la cepa una resistencia a varios insecticidas (Daborn *et al.*, 2007). Ambas cepas cargan una mutación letal recesiva en condiciones homocigotas localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3, afectando, en homocigosis su fenotipo en los tricomas o cerdas de las alas. La cepa *flare* muestra niveles regulados de *Cyp6g1* y *Cyp6a2* (Graf y van Shaik, 1992) y ha sido ampliamente utilizada para la determinación de la capacidad genotóxica de una gran cantidad de compuestos (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010); como ejemplo Vázquez-Gómez y colaboradores en 2010 probaron al sulforafano como modulador de la expresión de *Cyp6a2* y *Cyp6g1* en larvas de cruce estándar y bio-activación elevada y su genotoxicidad en la cruce estándar. La expresión de ambos genes

(*Cyp6a2* y *Cyp6g1*) y su actividad fue mayor en la cruce de bio-activación elevada, teniendo que los niveles de *Cyp6g1* fueron mucho más altos en ambas cruces y disminuyendo en presencia de sulforafano en el caso de la cruce de bio-activación elevada.

Cyp450s en *D. melanogaster*

Dentro de la secuencia del genoma completo de *D. melanogaster*, 90 genes individuales P450 han sido identificados (Tijet *et al.*, 2001). En insectos, los Cyps son conocidos por conferir resistencia a insecticidas. En *D. melanogaster* diferentes Cyp450 han sido implicados en la resistencia al DDT y a un rango de otros insecticidas; estos Cyps son, por ejemplo, *Cyp6g1*, *Cyp6a2*, *Cyp12D1* y *Cyp12A4* (Bogwitz *et al.*, 2005) (Daborn *et al.*, 2002). En específico se ha visto que la sobreexpresión de *Cyp6g1* está asociada con tal resistencia al DDT y a la capacidad de metabolizar un amplio rango de estructuras de otros insecticidas (Daborn *et al.*, 2001).

En humanos se ha observado una función conservada en *CYP3A4*, un gen ortólogo humano de *Cyp6g1*. Existe una relación de la familia Cyp6 de *Drosophila* y los genes humanos de la familia CYP3. Los alineamientos entre los genes de estas familias arrojan como resultado una alta identidad entre *Cyp6g1* y los genes humanos *CYP3A4*, *CYP3A5* y *CYP3A7* (Rand *et al.*, 2012). Esto parece ser consistente con los estudios de modelaje de homología entre *Cyp6g1* y *CYP3A4*, que demuestran que la calidad del modelaje es extremadamente alta con aproximadamente 97% de los residuos de *Cyp6g1* dentro de las regiones de la estructura de *CYP3A4* (Jones *et al.*, 2010).

Otro de los genes que se sabe, tienen la capacidad de metabolizar promutágenos y se ha reportado por ser inducido por fenobarbital es *Cyp6a2* (Saner *et al.*, 1996). *Cyp6a2* también tiene una expresión alta y de manera constitutiva en cepas resistentes a DDT (Waters *et al.*, 1992). Sin embargo, pruebas *in vivo* han encontrado que la supervivencia de moscas que sobre expresan *Cyp6a2* y que fueron tratadas con insecticidas no se incrementó; ya sea que éste no metabolice a esos insecticidas o estos compuestos sean metabolizados a compuestos más tóxicos (Jones *et al.*, 2010).

Proteínas que salvaguardan la integridad celular: Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*)

La respuesta al estrés es una respuesta adaptativa celular que ayuda a mantener la homeostasis celular bajo estrés. Además de los muchos cambios en la actividad celular y fisiología, el más remarcable evento en células estresadas es la producción de un grupo de proteínas altamente conservadas: las proteínas de choque térmico (Hsps, por sus siglas en inglés) (Schlesinger *et al.*, 1982). Las Hsps pueden proteger contra numerosos factores de estrés, incluyendo altas temperaturas, estrés oxidante y una variedad de citotóxicos (Kregel, 2002). Muchos miembros de estas familias de Hsps están presentes constitutivamente en las células mientras algunas son inducidas después del estrés.

Los miembros de Hsps constitutivos o inducibles son bien conocidos por ser chaperonas moleculares que ayudan al plegamiento normal de varios polipéptidos, asisten a las proteínas mal plegadas a recuperar su estado nativo, regulan la degradación de proteínas y ayudan en la translocación de proteínas a diferentes compartimentos celulares (Hayer y Hartl, 2002). Las funciones anteriores implican una amplia variedad de proteínas celulares y por lo tanto son importantes componentes de redes celulares (Csermely, 2004). Aunque algunas clases de Hsps tienen claramente actividades distintas, estas también comparten funciones o cooperan en sus actividades (Haslbeck *et al.*, 2005).

Hsp70

Entre las Hsps, la Hsp70 está muy conservada en su secuencia proteica y características funcionales (Boorstein *et al.*, 1994). La función de chaperona de Hsp70 está bien establecida. Aunque Hsp70 no es propiamente una proteasa, es conocida como una chaperona que puede controlar su actividad desde dirigirse a su proteína blanco, hasta plegar o degradar (McDonough y Patterson, 2003). Otras actividades de la familia Hsp70 son la regulación de la apoptosis (como una proteína anti-apoptótica principalmente) (Mosser *et al.*, 1997) y una respuesta inmune adaptativa e innata (Gullo y Teoh, 2004). Muy interesante es que los diferentes tipos de Hsp70 están aumentando debido a su amplia variedad en los procesos celulares en los que están involucradas, así como su posible participación en el

envejecimiento, cáncer y varios desórdenes genéticos neurodegenerativos (Gong *et al.*, 2005).

Hsp60

La familia Hsp60, uno de los principales grupos de las Hsps, incluye miembros expresados constitutivamente e inducibles (McMullin y Hallber, 1988). Se cree que los miembros de Hsp60 son predominantes en la mitocondria, aunque algunos también son reportados en el citosol y en los compartimentos extracelulares (Sarkar *et al.*, 2006). Como una chaperona molecular, Hsp60 ayuda en el plegamiento de polipéptidos nacientes y en el transporte de proteínas desde el citoplasma hasta los organelos (Fink, 1999). En adición a la típica función de chaperona, la proteína esta también implicada en otras actividades como el transporte de aminoácidos, señales de traducción, presentación de péptidos, regulación del sistema inmune y apoptosis (Woodlock *et al.*, 1997). Hsp60 a diferencia de Hsp70, tiene tanto funciones anti-apoptóticas como pro-apoptóticas. Estudios realizados en *D. melanogaster* indican que Hsp60 es necesaria para desencadenar la apoptosis interactuando con los genes *hid*, *rpr* y *grim* (Arya, 2008).

Genes involucrados en la muerte celular programada

Genes inductores de apoptosis

La apoptosis es una específica forma de muerte celular que ayuda a eliminar células superfluas ayudando en el desarrollo o bien o eliminando células dañadas o peligrosas en tejidos animales (Ryoo y Baehrecke, 2010). En *Drosophila*, tres genes localizados en el locus H99 han sido identificados, *reaper*, (*rpr*), *grim* y *head involution defective (hid)* que codifican para las proteínas Rpr, Hid y Grim, colectivamente llamadas proteínas pro-apoptóticas. La expresión ectópica de cualquiera de estas proteínas es suficiente para inducir apoptosis dependiente de caspasas *in vivo* (Yin y Thummel, 2004).

Como en vertebrados, las señales de muerte celular convergen sobre la activación de caspasas. Estudios de expresión ectópica demostraron que las proteínas pro apoptóticas activaban la apoptosis por antagonismo de la proteína inhibidora de apoptosis de *Drosophila* 1 (DIAP1), permitiendo la liberación de caspasas activas, así como la disminución de los niveles de la proteína DIAP1 (Yokokura *et al.*, 2004).

Las proteínas Rpr, Hid y Grim contienen un motivo de unión a IAP amino terminal (IBM) que se une e inhibe a las DIAP1. Rpr y Grim también tienen una segunda región funcional: un dominio interno llamado GH3 (Claveria *et al.*, 2002).

El dominio GH3 dirige a Rpr y Grim a la mitocondria y esto es suficiente para inducir la muerte celular, sugiriendo que los dominios GH3 median un mecanismo para la muerte celular que es independiente de la antagonización a DIAP1 (Claveria *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque los miembros de la familia de Bcl-2 existen en la mosca de la fruta, en esta especie la apoptosis no parece requerir la liberación del citocromo *c* u otras moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria (Abdelwahid *et al.*, 2007); sin embargo, lo anterior aún se mantiene en controversia, debido a que aunque se ha visto que el citocromo *c* se mantiene localizado en la mitocondria, posiblemente asociado a la membrana externa, durante la apoptosis, también hay otros estudios donde se registra una rápida salida del citocromo *c* hacia el citosol en células apoptóticas (Clavier *et al.*, 2016).

Por otra parte, la actividad de Hid, cuya expresión está regulada por la señalización con EGRFR/RAS, vía supresora de tumor Hippo, microRNAs y la hormona Ecdisona (Bilak y Su, 2009), está más relacionada con la interacción de proteínas DIAP. De hecho, la expresión de *hid* resulta en una dramática disminución en los niveles de DIAP1 con un correspondiente aumento en la activación de caspasas. Esta actividad requiere la actividad de la ligasa proteína-ubiquitina y en ensayos *in vitro* ha demostrado que Hid promueve directamente la ubiquitinización y degradación de DIAP. La expresión de los otros dos inductores de apoptosis *reaper* y *grim*, también resulta en la pérdida de DIAP1. Cabe recalcar, que esta actividad no requiere la función de la ligasa proteína-ubiquitina, indicando que estas proteínas pueden regular los niveles de DIAP1 a través de diferentes mecanismos (Yoo *et al.*, 2002).

DmP53

P53 es un factor de transcripción regulado que induce la detención del ciclo celular o apoptosis en respuesta a un estrés celular como el daño al ADN o activación oncogénica (Ko y Prives, 1996). La pérdida o inactivación del gen *p53* es la mutación más común en cáncer humano (Hainaut *et al.*, 1998). En el caso de la detención del

ciclo celular dependiente de p53, ésta ocurre a través de la inducción transcripcional de *p21*, que previene la entrada dentro de la fase S por inhibición de la actividad cinasa dependiente de ciclina (el-Deiry-*et al.*, 1993). El homólogo del p53 humano es denominado *Dmp53* en *Drosophila*.

Dmp53 comparte una identidad de aminoácidos significativa con el dominio de unión al ADN de *p53* de humanos. Como en *p53*, la sobreexpresión de *Dmp53* induce apoptosis y la inhibición de las funciones de *Dmp53* genera células resistentes a la apoptosis inducida por rayos X. En contraste a la *p53* de mamíferos, la sobreexpresión de *Dmp53* no induce el bloqueo del ciclo celular en fase G1 ya que la inhibición de la actividad de *Dmp53* no afecta la detención del ciclo celular inducido por rayos X. Esto sugiere que la función ancestral de p53 podría haber estado restringida a la eliminación de células dañadas por apoptosis e identifica a *Drosophila* como un modelo ideal para la disección de las vías de apoptosis mediadas por p53 y provocadas como una respuesta al daño celular (Ol *et al.*, 2000).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los niveles relativos de transcripción de dos genes marcadores de metabolismo xenobiótico, dos de estrés oxidante y cuatro de apoptosis en larvas de tercer estadio de las cepas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster* tratadas con 260 µg/mL de ZEN

Objetivos particulares

Demostrar si existe una expresión diferencial en larvas de las cepas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de Cyp450 en un estado basal.

Comparar el patrón de expresión de los marcadores entre las dos cepas de larvas de *Drosophila melanogaster* con expresión diferencial de Cyp450 y tratadas con la ZEN.

Comparar los niveles de expresión de los marcadores en cada cepa tratada con la ZEN.

Hipótesis

Algunos estudios *in vitro* han reportado un efecto genotóxico de la ZEN mientras que otros solo la consideran como un disruptor estrogénico. Las alteraciones en algunos parámetros reproductivos que la ZEN ocasiona en *D. melanogaster* no pueden ser atribuidos mediante esa vía dado que este organismo carece de un receptor de hormonas homólogo al de mamíferos, por lo tanto, la ZEN administrada a larvas de tercer estadio podría interferir en procesos celulares involucrados en el metabolismo de xenobióticos, estrés oxidante y/o apoptosis.

Material y métodos

Las pruebas de toxicidad y de las concentraciones sub-tóxicas de las ZEN fueron realizadas en estudios previos en el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala siguiendo el siguiente protocolo de toxicidad:

Prueba de toxicidad

Previamente, Vázquez-Gómez (2011) determinó una concentración de la ZEN (CAS-No. 17924-92-42. Sigma Aldrich, San Louis Missouri, USA) sub-tóxica para las cepas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de *D. melanogaster*. Para ello, 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 la población.

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 el valor de R² más alto y finalmente, con base en la ecuación obtenida, se eligió una concentración de ~CL₂₀ [260 µg/mL] para realizar este trabajo (Vázquez-Gómez, 2010).

Sincronización y colecta de huevos

Las cepas *flare*³ y *Oregon-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 [(5 mL de tegosept al 12% (OH) y 5 mL de ácido propiónico, aforados a 1 L de agua. (Dueñas *et al.*, 2001)]. Las cepas se mantuvieron a 25°C con humedad relativa a 65% y en total obscuridad hasta obtener la cantidad necesaria para los experimentos. Para obtener organismos con la misma edad, se eliminaron a 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 certeza que todas eran de tercer estadio y tenían 72 ± 4h.

Recuperación de larvas y tratamientos

Se recuperaron larvas *flare*³ y *Oregon-flare*³ de tercer estadio y se colocaron en un cuadro de organza sobre una caja Petri. Con ayuda de una espátula y un pincel se tomaron 10 larvas y se colocaron en viales de plexiglass con organza conteniendo 0.5 g de medio instantáneo Carolina (MIC) pulverizado. Los tratamientos

consistieron en un tratamiento de ZEN a la concentración de 260 µg/mL previamente establecida (Vázquez-Gómez, 2011); 2 controles positivos: fenobarbital [12 mM] y peróxido de hidrógeno [20 mM]; un control negativo de agua y un control del disolvente (buffer de fosfato de sodio, pH 7). Se incubaron a 25 °C con humedad relativa de 65% y completa oscuridad por 24 h. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Procesamiento de las muestras

Una vez terminado el tratamiento las larvas fueron sacadas del medio y lavadas con agua corriente para eliminar el MIC. Aproximadamente 1 g de organismos completos de cada tratamiento fue congelado con nitrógeno líquido, macerado y almacenado a -70 °C en un ultracongelador (REVCO®)

Extracción de ARN

El ARN de las muestras se extrajo usando el reactivo trizol (CAT No. 15596-018 de Invitrogen, USA), usando 1 mL del reactivo por cada gramo de tejido. Las suspensiones en trizol fueron pasadas a través de una jeringa clínica de 10 mL alrededor de 20 veces para la disgregación del tejido. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo y se centrifugaron a 1300 rpm por 15 min. Se recuperó la fase acuosa (fase superior) de la clorofórmica y ésta se pasó a través de columnas de purificación Direct-zol RNA Mini-Prep (CAT No. R2051 de BioAdvanced Systems, USA) para reducir posibles residuos proteicos y de ADN.

Se hicieron dos lavados de las muestras con buffer de lavado (200 µL) y Direct-zol (400 µL) y finalmente el ARN se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas. Se verificó la integridad de cada ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 3). De cada muestra se tomaron aproximadamente 2 µL para cuantificar la concentración de ARN por microlitro usando un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific USA).

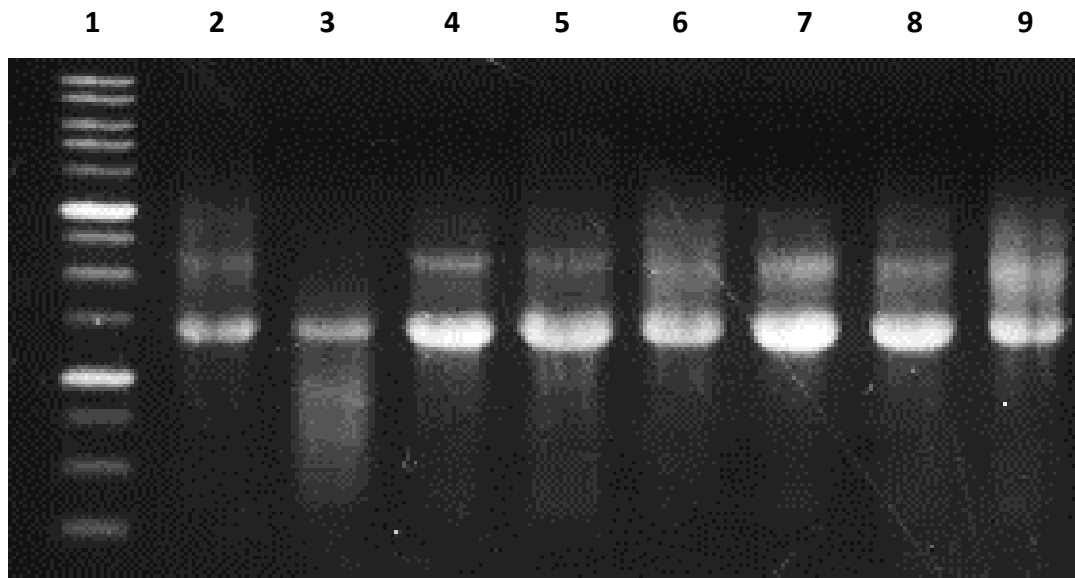


Fig. 3: Extracción de ARN de algunos tratamientos revelado en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador; carril 2: flare³+ ZEN; carril 3: flare³ + H₂O₂; carril 4: flare³ Agua; Carril 5: flare³ + Buffer; Carril 6: Oregon-flare³ + ZEN; carril 7: Oregon-flare³ + ZEN; carril 8: Oregon-flare³ + H₂O₂; Carril 9: Oregon-flare³ + Agua; Carril 10: Oregon-flare³ + Buffer.

Tratamiento con DNAsa

Para la eliminación por completo del ADN, cada muestra de ARN fue tratada con DNAsa usando el kit Turbo DNA-free (CAT No. AM1907 de Invitrogen, USA). Se calcularon 6 µg de ARN suspendidos en 45 µL y se le agregaron 5 µL de buffer de reacción y 1.5 µL de la enzima. Se dejó incubar la reacción por 40 min a 37 C. Se volvió a verificar la integridad del ARN mediante electroforesis y se volvió a cuantificar.

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc de cada muestra se llevó a cabo a partir de las muestras de ARN purificadas y tratadas con DNAsa usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (CAT No. K1621 de Thermo Scientific, USA). Se tomaron 200 nM/µL de ARN y se le agrego 1 µL de oligo dT incubando a 65 °C por 10 min y a 4 °C por 5 min para la hibridación del oligo con la cola poliA del ARNm. Para un volumen de 20 µL se consideraron los siguientes volúmenes: 4 µL de buffer, 1 µL de enzima, 1 µL de inhibidor (RNA in), 2 µL de NTP's y agua libre de nucleasas. Se dejó incubar la reacción por 90 min a 42 °C. La calidad de la reacción se probó mediante PCR punto final usando *primers* o cebadores específicos para *actina42a* (Figura 4).

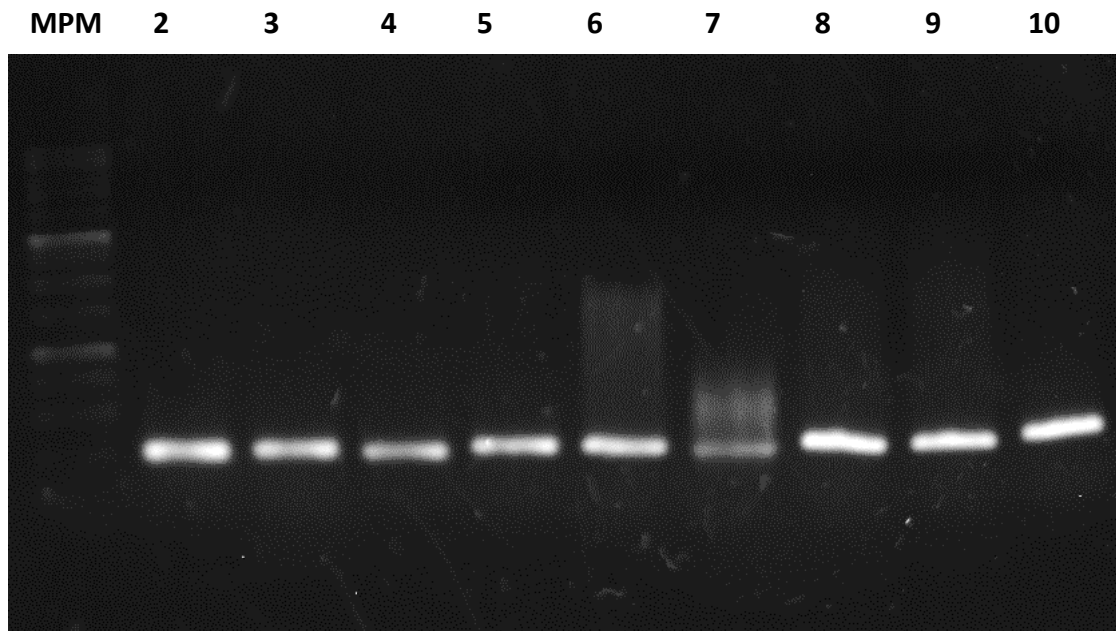


Fig. 4: Productos de PCR usando primers para *actina42a* y ADNc como molde. MPM 1: marcador de peso molecular; carril 1: flare³ + ZEN; carril 3: flare³ + H₂O₂; carril 4; flare³ + Agua; Carril 5: flare³ + Buffer; Carril 6: Oregon-flare³ + ZEN; carril 7: Oregon-flare³ + ZEN; carril 8: Oregon-flare³ + H₂O₂; Carril 9: Oregon-flare³ + Agua; Carril 10: Oregon-flare³ + Buffer.

Diseño de *primers*

Los *primers* usados para amplificar fragmentos de los genes de interés mediante PCR semi-cuantitativa y PCR tiempo real se diseñaron a partir de secuencias de ARN mensajero disponibles en la base de datos del NCBI y Flybase. Para su diseño se tomaron en cuenta valores de T_m de 58 a 60 °C, porcentajes de guanina/citosina mayores a 50 % y un tamaño del producto de 100-200 pb. También se consideraron parámetros termodinámicos para la estabilidad de los *primers* durante la reacción, los cuales fueron los siguientes: horquillas: $\Delta G > -4.5$; homo-dímeros $\Delta G > -4.5$ y max ΔG de -35.5 a -45.5; hetero-dímeros $\Delta G > -4.5$ y max ΔG de -35.5 a -45.5. Los *primers* diseñados se comprobaron mediante alineamiento local usando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y mediante alineamientos múltiples usando el programa ClustalW. La secuencia y los valores de cada *primer* se presentan en el anexo 2). Para comprobar la especificidad de cada *primer* se llevó a cabo una PCR punto final usando ADN genómico y corriendo los productos de la reacción en un gel de agarosa al 1 %. Una vez comprobada la amplificación de un solo producto, los productos de cada reacción se llevaron a secuenciar.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

El ADNc de cada tratamiento fue amplificado dentro de un volumen de reacción final de 24 μL considerando los siguientes volúmenes: 2.5 μL de PCR Buffer,-Mg 10X, 0.75 de MgCl_2 50 mM, 0.5 μL de dNTP mix 10 mM, 0.1 μL de Platinum Taq DNA polimerase, 1 μL de cada primer 5' y 3' 10 μM , 2 μL de ADNc y 10 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s (desnaturalización), 60 °C por 30 s (alineamiento) y 72 °C por 50 s (extensión) y un ciclo final de 72 °C por 5 min.

PCR semi-cuantitativa

Normalización de las condiciones de amplificación

Partiendo de 4 μL de ADNc, éstas se añadieron a un volumen de reacción para PCR de 50 μL y utilizando *primers* específicos para el gen de *actina42a* (las secuencias de los *primers* y de los productos que amplifican se muestran en el anexo 1 y 2). Se tomaron alícuotas de la reacción a partir de los ciclos 21 a 29 de 3 μL al final de cada ciclo de extensión. La definición del número de ciclos para la amplificación de los genes de interés se hizo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, tomando en cuenta el ciclo anterior al cual la intensidad de las bandas ya no aumentaba. Lo anterior se hizo para cada una de las muestras de ADNc obtenidos de los organismos tratados. Una vez definido el número de ciclos necesarios, se realizaron reacciones de PCR punto final con cada uno de los *primers* específicos para los genes de interés usando ADNc como templados de cada tratamiento. Los amplicones de cada reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se realizó un análisis densitométrico a partir de la intensidad de las bandas observadas en los geles usando el programa *ImageJ* para obtener niveles de expresión relativos, usando los datos de *actina42* para normalizar.

PCR cuantitativa tiempo real (qRT-PCR)

Para corroborar los datos de los niveles de expresión relativa obtenidos a partir de la PCR semicuantitativa, los ADNc fueron usados como molde para amplificaciones mediante qRT-PCR, por sus siglas en inglés. La monitorización de la qRT-PCR se realizó con el fluorocromo intercalante SYBRGreen con el equipo *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). Las reacciones se hicieron por

triplicado, bajo los siguientes parámetros: 7.5 μL de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (CAT No. K0221 de Thermo Scientific, USA), 0.5 μL del primer 3' y 5' a una concentración de 10 mM, 1 μL del templado de ADNc y 5.5 μL de agua libre de nucleasas. Las amplificaciones se realizaron por 40 ciclos usando el siguiente programa: un programa de desnaturalización (95 °C por 10 min) seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s y 60 °C por 1 min.

Se realizó un análisis de la curva de disociación al final de cada fase de amplificación con un mínimo de 60 °C a un máximo de 95 °C, con aumentos de 0.2 °C cada 15 s para probar la especificidad e identidad de los productos de la qRT-PCR. Para el análisis de la expresión relativa se usaron los datos de "ct" (*cycle threshold*). Como normalizadores se consideró al gen de *actina42a* debido a que se ha reportado como un gen constitutivo y a los controles negativos. Para la obtención de los valores de expresión relativa se usaron las siguientes formulas: $\Delta\text{ct}_{\text{referencia}} = 2^{-[(\text{ct control interno y gen problema-control interno y gen de referencia}) - (\text{ct control interno y gen de problema-ct control interno y gen de referencia})]}$; $\Delta\text{ct}_{\text{tratamiento}} = 2^{-[(\text{ct tratamiento y gen problema-control interno y gen de referencia}) - (\text{ct control interno y gen de problema-ct control interno y gen de referencia})]}$ (Applied Biosystem, 2001). Para poder llevar a cabo un análisis estadístico con tres datos, los promedios de los datos de ct se promediaron entre sí. Los valores resultantes se usaron para hacer un tercer cálculo de expresión relativa.

Los valores de $\Delta\Delta\text{ct}$ de los dos experimentos independientes se promediaron y se les sometió a un análisis de ANOVA de un factor por cada gen comparando los valores de los tratamientos contra el control; también se realizó una prueba de *t* entre el tratamiento de ZEN contra el control usando el software GraphPad Prism 6. El nivel de significancia estadística fue considerado a $p < 0.05$.

Resultados

Especificidad de los *primers* diseñados

Una vez diseñados los *primers*, éstos se mandaron sintetizar en Uniparts S. A. y se probaron mediante PCR estándar para comprobar el tamaño del fragmento y la amplificación de un solo producto (Figura 5). El producto amplificado de cada par de *primers* fue mandado secuenciar al laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala. Las secuencias obtenidas de cada producto fueron comparadas mediante un alineamiento múltiple y a un alineamiento local para corroborar su identidad usando el programa BLAST disponible en la plataforma del NCBI así como mediante un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustalw disponible en la GenomeNET (<http://www.genome.jp>) contra las secuencias de los genes de interés

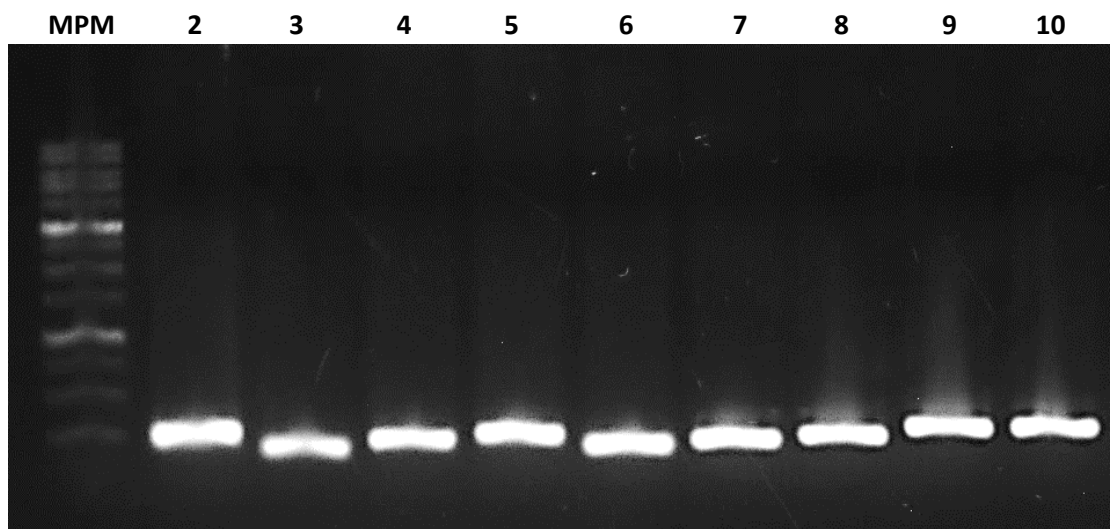


Fig. 5. Productos de PCR usando *primers* específicos para cada uno de los genes de interés y ADN genómico como molde. Carril 1: marcador; carril 2: *grim* ; carril 3: *hid*; carril 4: *reaper*; carril 5: *Dmp53*; carril 6: *hsp60*; carril 7: *hsp70*; carril 8: *Cyp6a2*; carril 9: *Cyp6g1*; carril 10: *actina42a*.

En el anexo 2 se muestran las secuencias consenso obtenidas a partir de un análisis de los alineamientos múltiples usando el programa Clustalw disponible en la GenomeNET (<http://www.genome.jp>); se compararon las secuencias de referencia de cada uno de los genes de interés contra la secuencia de los productos amplificados. Las secuencias consenso fueron sometidas a un alineamiento local usando el programa BLAST disponible en la plataforma del NCBI (Tabla 1). En cada uno de los alineamientos las secuencias cumplieron con el 100% del porcentaje de

similitud y de parecido respecto al tamaño del fragmento. El tamaño de cada producto amplificado resultó óptimo para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real (100-200 pb).

Tabla 1. Resultados de la comparación de las secuencias de los productos amplificados mediante PCR con las secuencias depositadas en las bases de datos, mediante alineamiento local (BLAST)

Descripción	Longitud del fragmento	Qc	Valor E	IM
<i>Drosophila melanogaster</i> cell death protein GRIM (<i>grim</i>) mRNA, complete cds	197	100%	3e-97	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> head involution defective protein (<i>hid</i>) mRNA, complete cds	166	100%	4e-80	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> reaper (<i>rpr</i>), mRNA	177	100%	4e-86	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> transcription factor p53 (<i>p53</i>) mRNA, complete cds	110	100%	3e-49	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> heat shock protein 60, transcript variant A (<i>Hsp60A</i>), mRNA	121	100%	3e-55	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> Heat-shock-protein-70Aa (<i>Hsp70Aa</i>), mRNA	168	100%	3e-81	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> Cyp6g1, transcript variant A (<i>Cyp6g1A</i>), mRNA	176	100%	1e-85	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> cytochrome P450-6a2 (<i>Cyp6a2</i>), mRNA	194	100%	1e-95	100%
<i>Drosophila melanogaster</i> actin 42A (<i>Act42A</i>), mRNA	194	100%	1e-95	100%

Donde **QC** es el porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con las reportadas en la base de datos del NCBI, el **valor E** indica la posibilidad de que la semejanza de las secuencias comparadas se deba al azar y **Im** indica el porcentaje de parecido respecto al tamaño del fragmento (NCBI, 2016).

Determinación de niveles de expresión genética mediante PCR semi-cuantitativa

La Figura 6 muestra un ejemplo de la estandarización de la PCR semicuantitativa utilizando como molde ADNc de larvas Oregon-flare³ sometidas al tratamiento de fenobarbital (control positivo). Cabe mencionar que lo anterior se hizo para cada una de las muestras de cada tratamiento y en ambas cepas. En todos los casos los ciclos en los que se decidió tomar una muestra del amplicón fueron desde el 21 hasta el 29. En la figura 6 se observa que a partir del ciclo 27 la intensidad de la banda ya no aumenta, por lo tanto, se considera al ciclo 26 como el adecuado para amplificar los demás genes y evidenciar las diferencias en la concentración de los transcritos. La Figura 7 muestra los productos de la amplificación de los genes de interés a los 26 ciclos establecidos previamente.

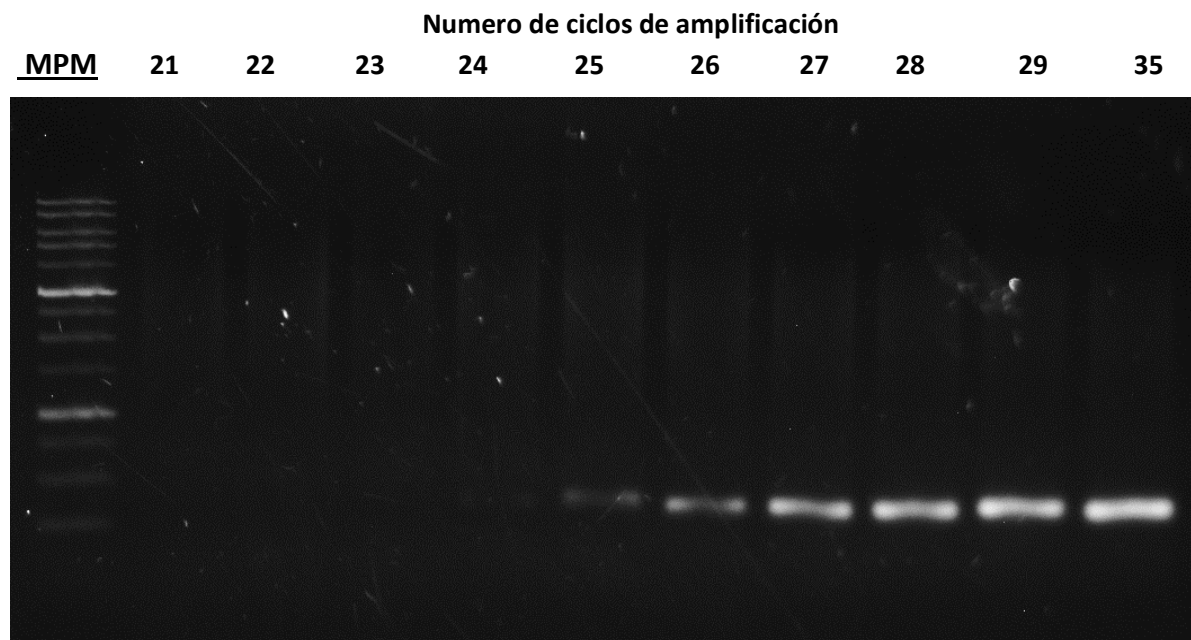


Fig. 6: Estandarización de la PCR semicuantitativa utilizando como molde ADNc de larvas Oregon-flare sometidas a tratamiento de fenobarbital (control positivo).

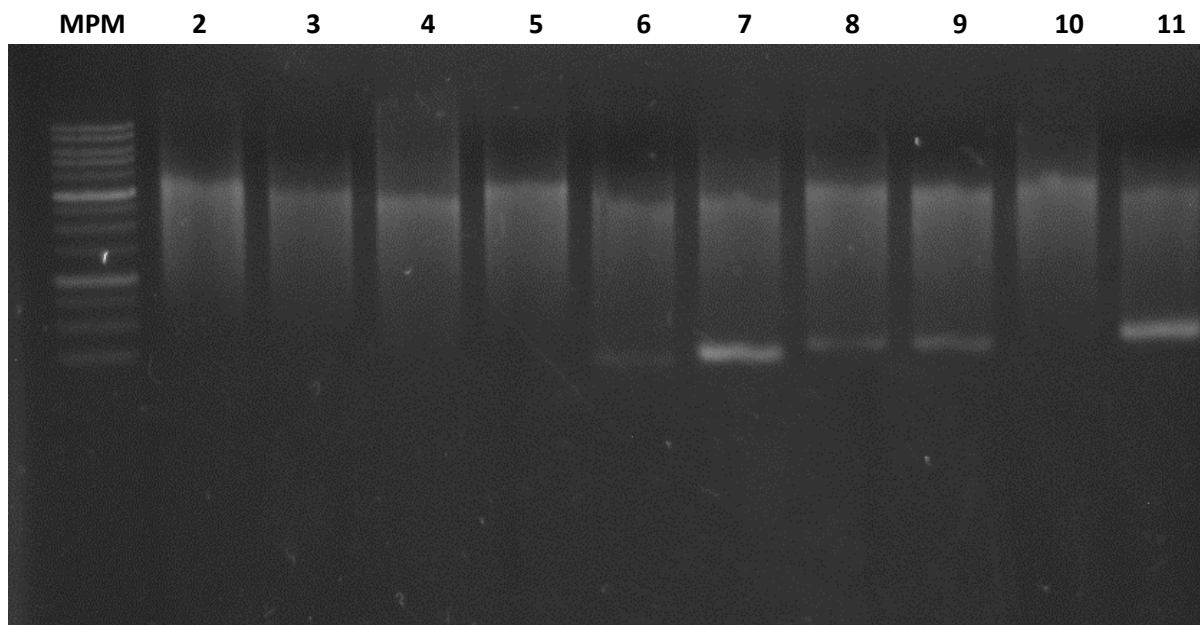


Fig. 7: Amplicones de los genes de interés a los 26 ciclos, usando como molde ADNc de larvas Oregon-flare sometidas a tratamiento con fenobarbital. Carriles 1: marcador de peso; carril 2: *grim*; carril 3: *hid*; carril 4: *reaper*; carril 5: *Dmp53*; carril 6: *hsp60*; carril 7: *hsp70*; carril 8: *Cyp6g1*; carril 9: *Cyp6a2*; carril 10: control negativo; carril 11: control positivo de *actina42a*.

Una vez que se sometió a PCR al ADNc de todos los tratamientos, se llevó a cabo el análisis densitométrico usando el software *ImageJ*, el cual mide el tamaño y el número de píxeles en la imagen de las bandas presentes en los geles. Estos valores son representados en una gráfica (Figura 8) donde cada pico representa una banda en la imagen original, tomando en cuenta solo bandas bien delimitadas y que estén dentro del tamaño esperado. Picos más altos representan bandas más intensas. Las etiquetas de cada pico indican un porcentaje del tamaño total de cada banda. Estos datos fueron normalizados usando los valores del gen constitutivo (*actina42a*) (carril 11) para calcular la intensidad relativa de cada banda. Dado que en la normalización se usaron los promedios para obtener un solo valor no fue posible calcular la desviación estándar y realizar un análisis estadístico.

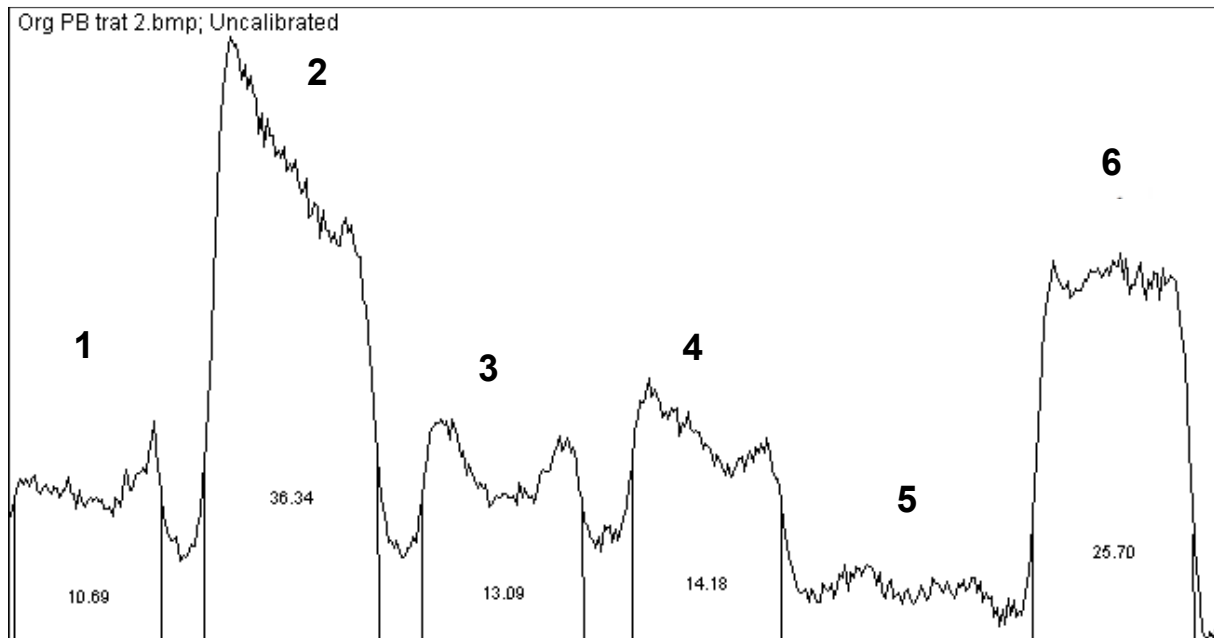


Fig. 8: Gráfica arrojada por el *Image J* y que corresponde al tratamiento de fenobarbital en la cepa Oregon-flare en la cual se representa la intensidad de las bandas presente en el gel de agarosa. Pico 1: *hsp60*; pico 2: *hsp70*; pico 3: *Cyp6g1*; pico 4: *Cyp6a2*; pico 5: control negativo; pico 6: *actina42a*

En la tabla 2 se observa que los transcritos de *hsp70*, estuvieron presentes en todos los tratamientos en la cepa flare³. En esta misma cepa se observa que el fenobarbital indujo la expresión de *Cyp6a2*. Se observa también que en la cepa Oregon-flare cuya principal característica es la sobre-expresión de los genes que codifican Cyp450s, el fenobarbital indujo la expresión de *hsp60*, *hsp70*, *Cyp6g1* y *Cyp6a2*, mientras que en el tratamiento con ZEN no se detectaron transcritos de los genes evaluados; para el caso del tratamiento con H₂O₂, el gen de *Cyp6g1* presentó un nivel de expresión cercano al control (0.96), mientras que el gen de *hsp70* mostró un nivel de expresión 0.28 mayor al control.

Tabla 2. Presencia y concentración relativa de transcritos de los genes de interés mediante la PCR semi-cuantitativa y cuantificación densitométrica.

Genes	flare ³				Oregon-flare ³			
	Control Agua	FB	ZEN	H ₂ O ₂	Control Agua	FB	ZEN	H ₂ O ₂
<i>Cyp6g1</i>	0.91							0.96
<i>Cyp6a2</i>		0.58				0.67		
<i>hsp60</i>						0.35		
<i>Hsp70</i>	1.14	0.55	0.68	0.34		1.13		1.28
<i>Dmp53</i>								
<i>Grim</i>								
<i>Hid</i>								
<i>Reaper</i>								
<i>actina42a</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tratamientos: control agua; FB (fenobarbital 12 mM); ZEN (ZEN 260 µg/mL) y H₂O₂ (peróxido de hidrogeno 20 mM). En los rectángulos se anotan los niveles de expresión relativa (promedio de dos experimentos independientes) a los del gen constitutivo utilizado como normalizador. Las casillas en blanco indican que no hubo amplificación de estos genes en el tratamiento.

Dado que esta técnica presenta una poca sensibilidad para detectar transcritos que se encuentran en cantidades muy bajas y al depender de la perspectiva del investigador tiende a ser poco objetiva, se decidió amplificar y cuantificar las muestras de ADNc de cada tratamiento y cepa mediante PCR cuantitativo tiempo real (qRT-PCR).

Determinación de niveles de expresión genética mediante PCR cuantitativo tiempo real

Para confirmar los patrones de expresión determinados por PCR semicuantitativa mostrados anteriormente, se usó qRT-PCR usando los mismos *primers*, además de que en algunos casos se podría determinar la presencia de transcritos que el protocolo anterior no evidenció. Los ADNc se amplificaron por triplicado y se analizó la curva de disociación después de terminados los ciclos de amplificación para verificar la generación de un solo producto. Una vez obtenidos los datos de ct (“threshold cycle”), se usaron los correspondientes al gen constitutivo de *actina42a* y al control negativo para normalizar los datos y expresar los valores de manera relativa..

En el anexo 3 se muestran las curvas de disociación correspondientes a cada reacción usando los *primers* anotados; en la mayoría de las disociaciones se observan algunos picos a temperaturas previas a la T_m , lo cual podría indicar la presencia de dímeros. La formación de dímeros se da por la hibridación entre *primer* y es muy frecuente en las reacciones de PCR (Costa, 2004). Para mejorar su especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección y revisión más exhaustiva en cuanto a su diseño para disminuir el riesgo de formación de dímeros en futuros trabajos.

Los valores ct usados para calcular la expresión relativa de los niveles de expresión basal, así como los que se obtuvieron en cada tratamiento son presentados en el anexo 4.

Los valores promedios de la expresión relativa que se usaron para el diseño de las gráficas son presentados en el anexo 5

Nivel de expresión génica basal en las cepas

Los niveles basales de la expresión de *flare*³ y *Oregon-flare*³ en el control negativo permiten observar el comportamiento de los genes de interés en “condiciones normales” (Figura 9). Para calcular los valores de expresión relativa se tomaron como referencia a los controles negativos de *flare*³, al ser ésta la cepa con expresión moderada de los Cyp450s. Al comparar los resultados se observan niveles más altos de expresión en *Cyp6g1* y *Cyp6a2*, con valores de 3.19 y 4.39 respectivamente, en la cepa *Oregon-flare*³ en comparación con *flare*³ cuyos valores fueron de 1.17 y 1.02, así como de *hsp60* y *hsp70* (relacionados con estrés oxidante) los cuales se elevan a 3.0 y 2.36 en *Oregon-flare*³ con respecto a *flare*³ con valores de 2.40 y 1.03. De manera interesante, la expresión de algunos de los genes marcadores de apoptosis fue significativamente menor ($p < 0.05$) en la cepa *Oregon-flare*³, como en el caso de *grim* (0.10) y *reaper* (0.46) mientras que *hid* (0.35) y *p53* (0.72) solo mantuvieron una tendencia a sub-expresarse en *Oregon-flare*³ con respecto a *flare*³ que presentó los siguientes valores: *grim* 1.80; *hid* 2.1; *reaper* 1.0; *Dmp53* 2.84.

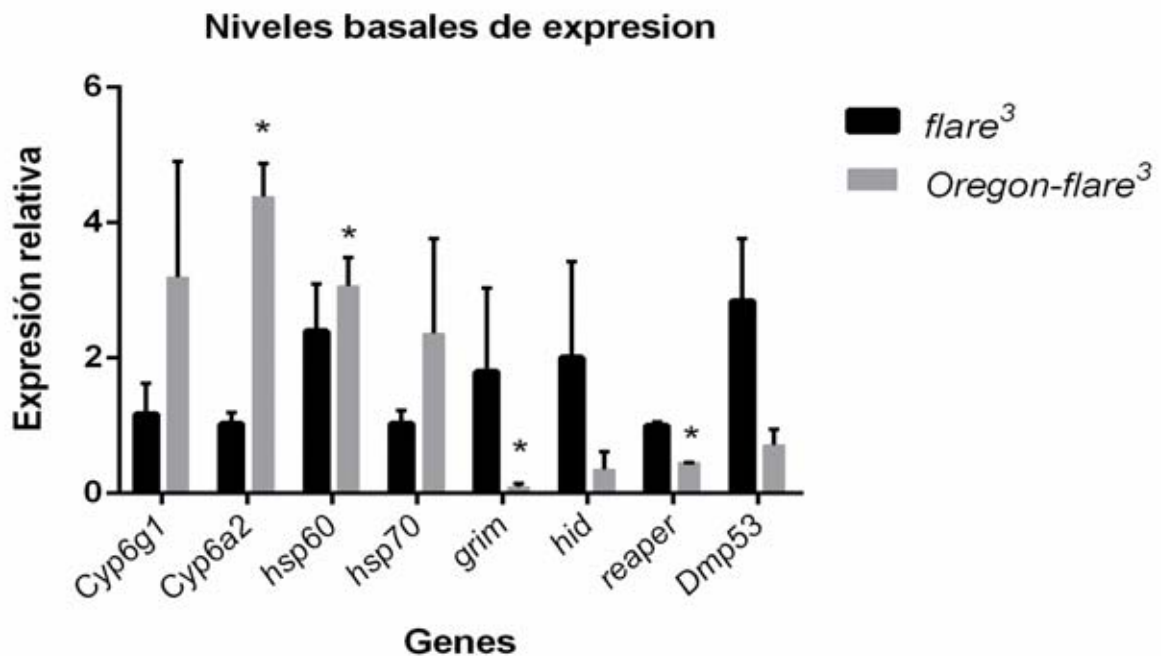


Fig. 9: Niveles basales de expresión relativa de los marcadores de MX, estrés oxidante y apoptosis de las cepas *flare*³ y *Oregon-flare*³. La expresión relativa se calculó usando la ct del gen *actina42a* y a la muestra control de la cepa *flare*³. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$).

Niveles de expresión relativa inducidos por los tratamientos

Las expresiones relativas de los genes marcadores en larvas, de cada tratamiento, fueron comparadas para determinar si existen diferencias significativas. Los niveles de expresión de *Cyp6g1* no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, existe una tendencia a elevarse con el tratamiento con ZEN en las dos cepas; por otra parte, *Cyp6a2* no modificó su expresión en *flare*³, sin embargo, aumentó en *Oregon-flare*³ (Figura 10).

Marcadores de MX

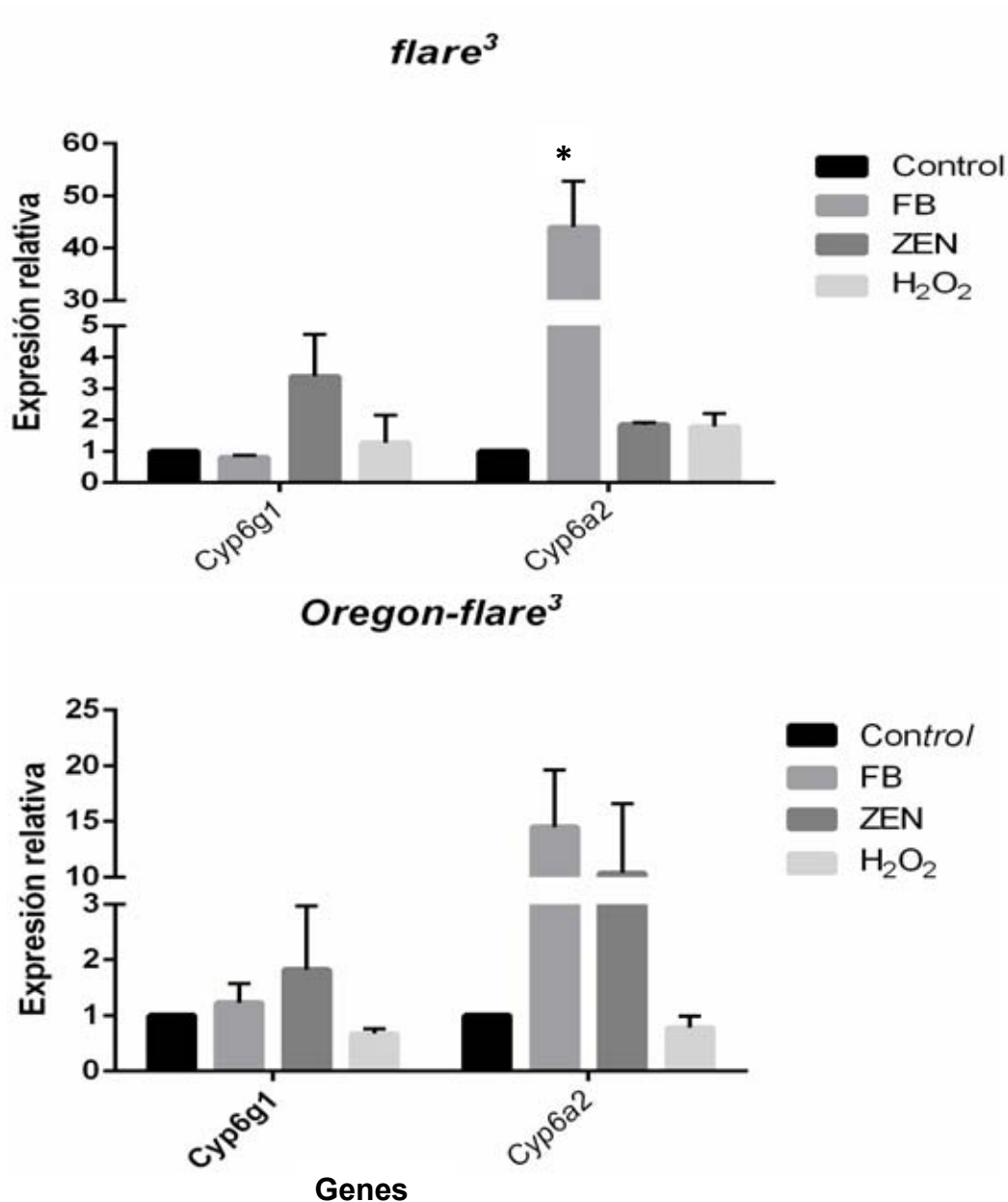


Fig. 10: Niveles de expresión relativa de los genes marcadores de MX en cada uno de los tratamientos de ambas cepas. La expresión relativa fue calculada con respecto al gen *actina42a* y a las muestras control sin tratamiento en cada cepa. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$).

Marcadores de estrés oxidante

En el tratamiento ZEN el gen *hsp60* muestra una expresión significativamente más alta tanto en *flare*³ (2.96) como Oregon-*flare*³ (1.68), mientras que los valores de *hsp70* fueron significativamente bajos en la cepa Oregon-*flare*³ tratada con ZEN cuyo valor de expresión fue 0.50 y en *flare*³ fueron estadísticamente altos con valor de 1.71 (Figura 11).

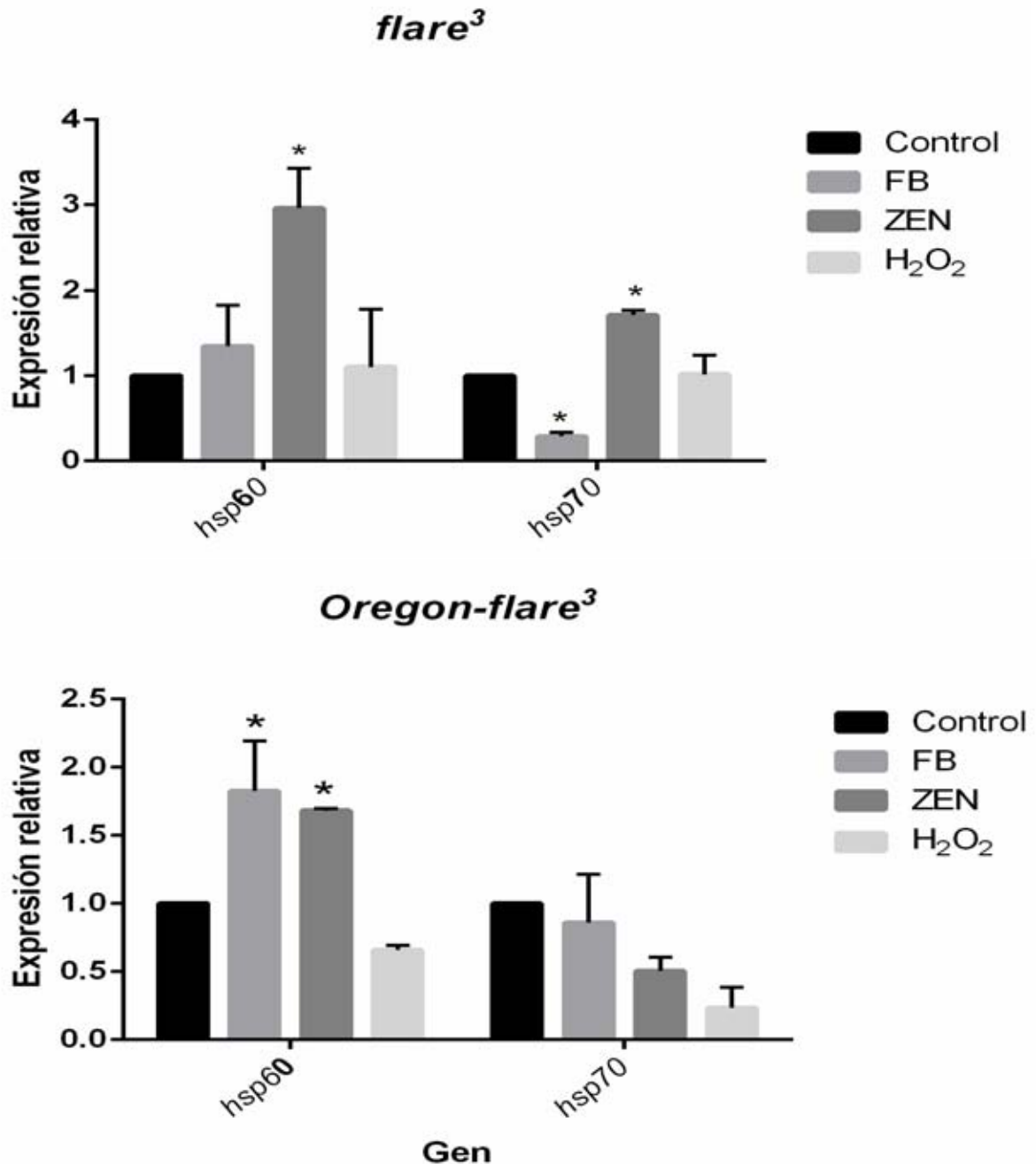


Fig. 11: Niveles de expresión relativa de los marcadores de estrés oxidante de ambas cepas en cada tratamiento. La expresión relativa fue calculada con respecto al gen *actina42a* y a las muestras control sin tratamiento. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$)

Marcadores de apoptosis

En cuanto a los marcadores de apoptosis, se observan niveles de expresión altos de los genes *reaper* (5.91) y *Dmp53* (1.95) en larvas de la cepa *flare*³ tratadas con ZEN (figura 12), mientras en el caso de *Oregon-flare*³ los genes que se sobre expresan en los tratamientos con la ZEN son *grim* (1.99) cuyo valor fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y *Dmp53* (1.82) (Figura 13).

Cepa *flare*³

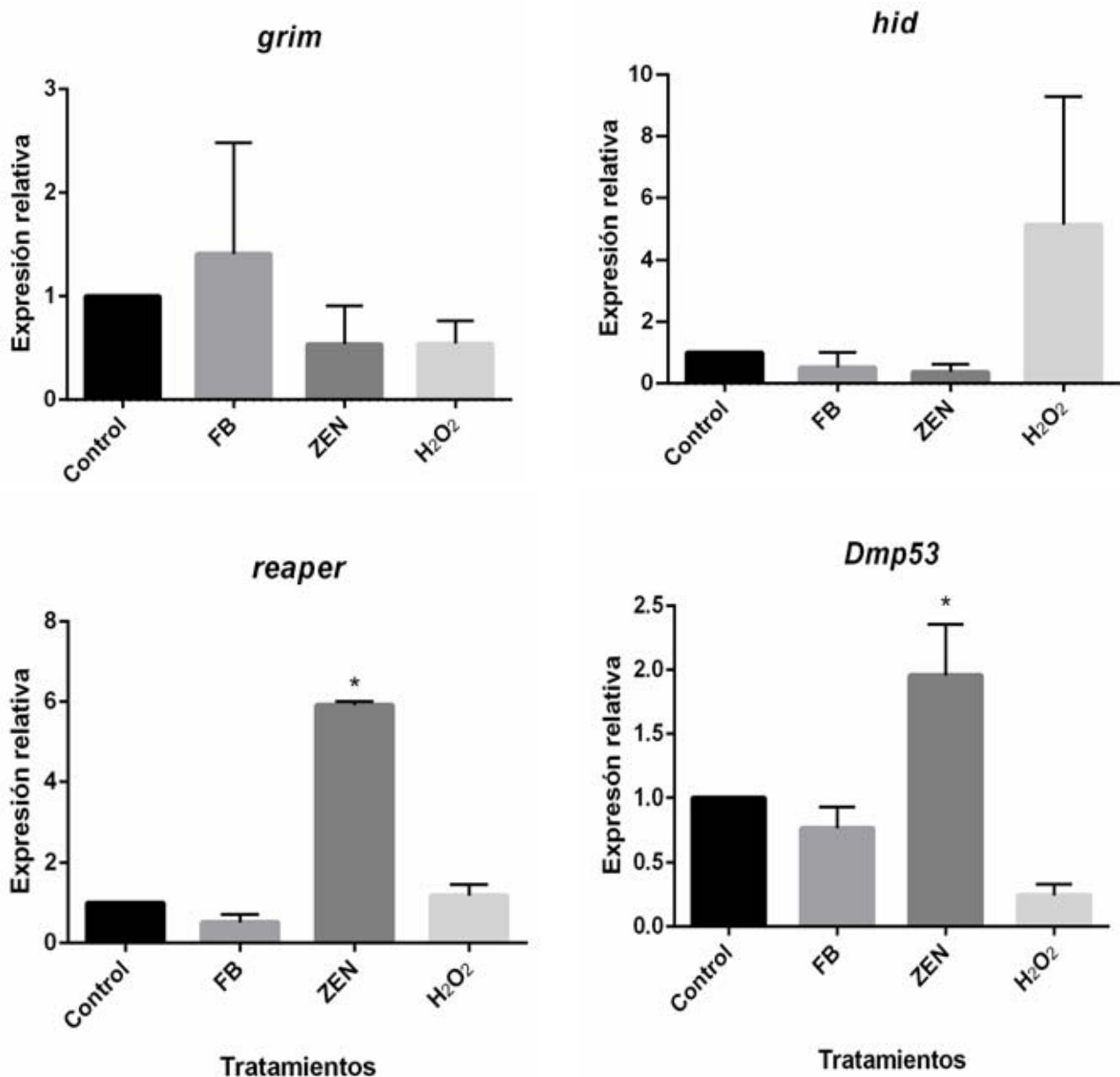


Fig. 12: Niveles de expresión relativa de los marcadores de apoptosis inducidos en la cepa *flare* por tratamiento. La expresión relativa fue calculada con respecto al gen *actina42a* y a las muestras control sin tratamiento. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias

Cepa Oregon-flare³

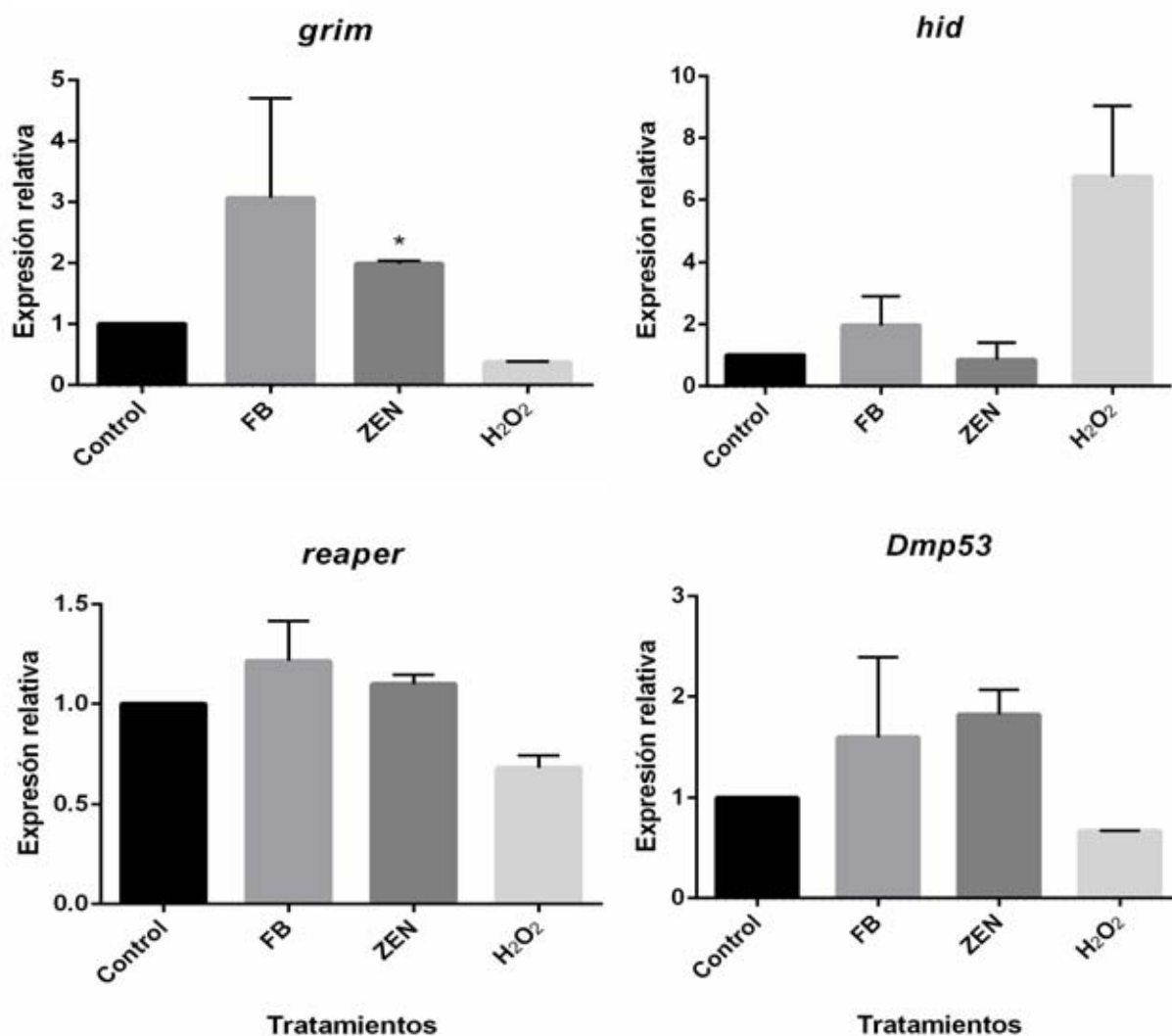


Fig. 13: Niveles de expresión relativa de los marcadores de apoptosis inducidos en la cepa *Oregon-flare* por tratamiento. La expresión relativa fue calculada con respecto al gen *actina42a* y a las muestras control sin tratamiento. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$).

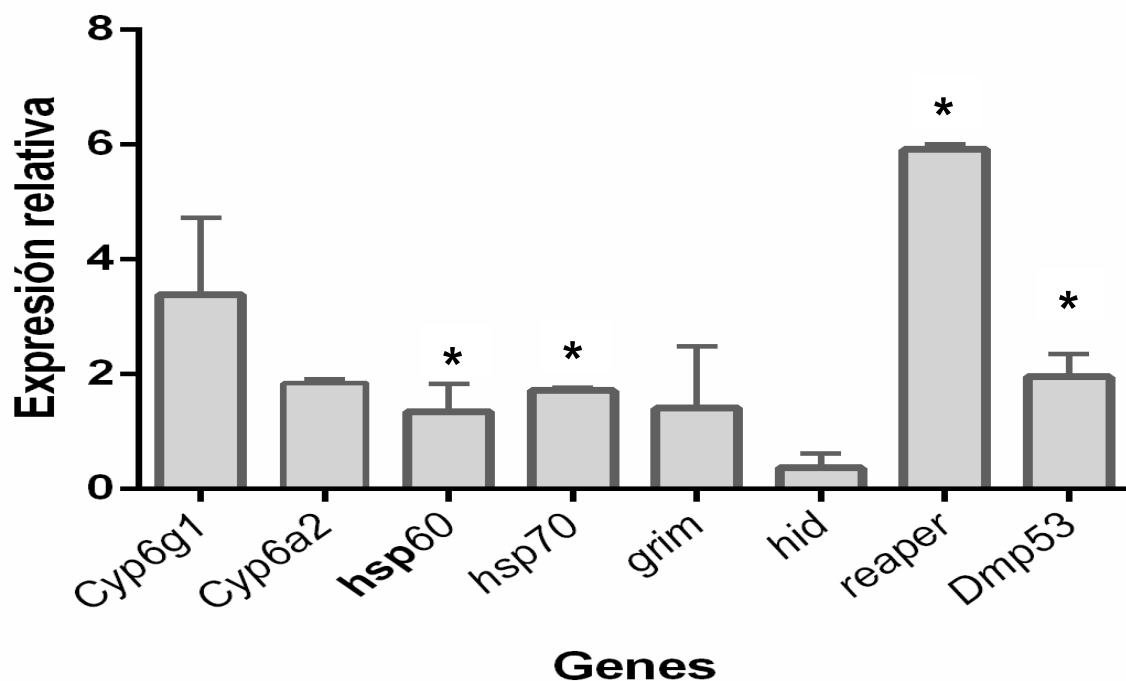
Comparación de los niveles de expresión en los tratamientos con ZEN

Para hacer una comparación de la expresión relativa de los marcadores inducida por la ZEN, los datos fueron analizados en una sola gráfica por cada cepa. Entre los marcadores de MX se observa que tanto en la cepa *flare*³ como *Oregon-flare*³, el gen que mostró una mayor expresión en comparación con su control fue *Cyp6g1* con valores de 3.39 en *flare*³ y 1.82 en *Oregon-flare*³ contra 1.85 y 1.65 que mostró *Cyp6a2* en el mismo orden.

En el caso de los marcadores de estrés oxidante, en flare³ se observa que el gen que mostró valores más altos fue *hsp70* con 1.71, mientras *hsp60* tuvo un valor de 2.96. En Oregon-flare³ la expresión de los marcadores de estrés oxidante fueron diferentes, siendo *hsp60* el que registró el valor más alto con 1.68 mientras *hsp70* solo registró un valor de 0.50.

Para los marcadores de apoptosis (*grim*, *hid* y *reaper*), en flare³ el que registró el valor más alto en la expresión fue *reaper* con un valor de 5.91, seguido de *grim* con un valor de 0.53 y finalmente *hid* con un valor de 0.37; *Dmp53* también registró valores altos en esta cepa (1.95). En Oregon-flare³ el patrón de expresión fue diferente, siendo *grim* el que tuvo la expresión más alta con 1.99, seguido de *reaper* con 1.1 y finalmente *hid* con un valor de 0.85; para el factor de transcripción para proteínas inductoras de apoptosis *Dmp53* el valor fue de 1.82.

Cepa flare³



Oregon-flare³

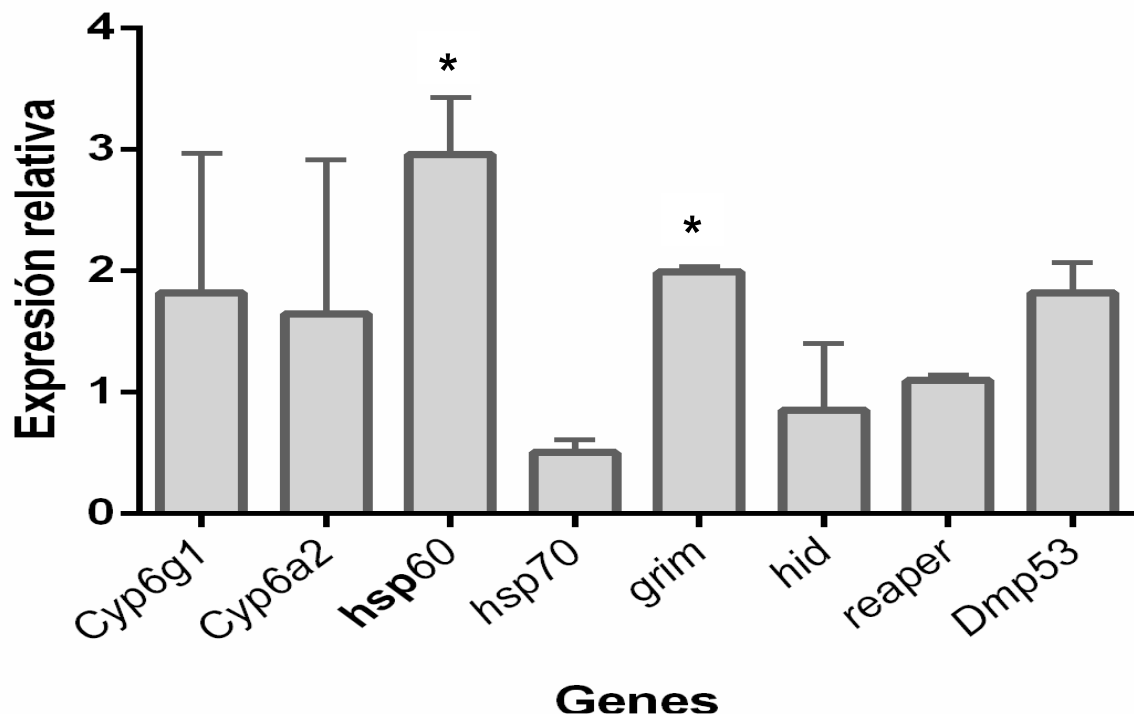


Fig. 14: Comparación de los niveles de expresión relativa de los genes marcadores de MX, estrés oxidante y apoptosis en larvas de ambas cepas de *D. melanogaster* tratadas con ZEN. La expresión relativa fue calculada con respecto al gen *actina42a* y a la muestra control en cada cepa. Los asteriscos sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$)

Discusión

Resultados de la PCR-semicuantitativa

Los resultados de la PCR semi-cuantitativa mostraron que no hubo un aumento en la expresión de los genes de interés con respecto al control. En la cepa flare³ la expresión de *hsp70* se observó en todos los tratamientos con valores cercanos o debajo del tratamiento control (Tabla 2). Hsp 70 es la proteína más extensamente estudiada de todas las HSPs, es de particular interés por su abundancia celular y por su papel en la protección celular frente a eventos nocivos. En el tratamiento con ZEN, *hsp70* mostró un valor de 0.68. En el caso de la cepa Oregon-flare³ tratada con la ZEN, no se observó su expresión.

Los resultados anteriores indicarían que la micotoxina no afecta la expresión del marcador de estrés oxidante, lo que podría contradecir a algunos autores. Hassen y colaboradores en 2007 demostraron que en células Hep G2 la ZEN induce la expresión de *hsp70* y *hsp90* en una manera dosis-dependiente arriba de los 160 μM . Otro estudio realizado por Lee y colaboradores demostró que en células de hígado Chang tratadas con ZEN la expresión de *hsp70* se inducía con concentraciones de 10, 20 50 y 100 μM . Ellos observaron que la expresión aumentaba de 300 a 690% después del tratamiento con ZEN.

Una diferencia importante con estos trabajos y el que se presenta aquí, es que en el presente estudio, la ZEN se administró *in vivo* en larvas de *D. melanogaster* a una concentración de 260 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual la ZEN podría actuar de manera diferente que en células cultivadas (estudios *in vitro*). Se ha reportado, sin embargo, en un estudio realizado por Pfiffer y colaboradores en 2009 que el metabolismo de la ZEN es igual tanto *in vitro* como *in vivo*, al comparar los productos metabólicos de microsomas hepáticos (*in vitro*) de ratas y de hígado (*In vivo*) tratados con 200 μM de ZEN. Encontrando, en ambos casos, la formación de una cantidad significativa de catecoles metilados de ZEN y α -ZEL, asociados a los efectos tóxicos de la micotoxina y a la formación de EROS, sugiriendo que la formación de catecoles a través de la hidroxilación aromática de la ZEN también toma lugar bajo condiciones *in vivo*.

Para los tratamientos con fenobarbital (control positivo), la presencia de *hsp60* (0.35) y *hsp70* (1.13) en la cepa Oregon-flare³ podría estar relacionada con los procesos de

desintoxicación del fenobarbital lo que es evidenciado por la mayor presencia de *Cyp6a2*. En los tratamientos con fenobarbital se observó una expresión de *Cyp6a2* de 1.58 y 1.67 en la cepa flare³ y Oregon-flare³, respectivamente. El fenobarbital está reportado como inductor de la expresión de Cyp450, particularmente *Cyp6a2* (Brun, *et al* 1996), lo cual explica su presencia en ambas cepas.

Otro estudio realizado por Castañeda-Partida y colaboradores en 2011 reportó que en larvas de la cruce de Bioactivación elevada de la prueba en ala de *D. melanogaster*, con expresión elevada de Cyp450s, el fenobarbital 12 mM no presenta efectos genotóxicos, mientras que en la cruce estándar, con niveles basales, el efecto genotóxico fue de más del doble en comparación con el control negativo. En nuestros resultados, si bien el fenobarbital estimula notablemente la expresión del citocromo *Cyp6a2* en ambas cepas, la expresión de los otros marcadores no se vio afectada.

En el control positivo de peróxido se observó una expresión de *hsp70* de 0.34 y 1.28 en la cepa flare³ y Oregon-flare³ con respecto al control de actina. El H₂O₂ ha sido reportado como inductor de la expresión de las HSPs, así como de otras proteínas relacionadas con la eliminación de EROS (Pomatto *et al.*, 2017; Courgeon *et al.*, 1988), por lo tanto, la tendencia de *hsp70* a aumentar más en la cepa Oregon-flare³ tratada con peróxido podría indicar un aumento de las EROs generadas por este compuesto.

La expresión de *Cyp6g1* también está presente pero solo en la cepa Oregon-flare³ tratada con peróxido; sin embargo en la literatura no está reportada la relación entre el peróxido y la expresión de *Cyp6g1*, por lo tanto su presencia en esta cepa se podría atribuir a un proceso normal del desarrollo de los organismos, ya que además de estar relacionado con la desintoxicación, *Cyp6g1* también está involucrado en la metabolización de la 20-hidroecdisona, una hormona importante para llevar a cabo la metamorfosis (Chung *et al.*, 2009). Algo importante de mencionar es que en la cepa flare³ no se observa la expresión de *Cyp6g1* en éste u otro tratamiento a pesar de que el estadio larval es el mismo; esto se debe a que como se mencionó antes la cepa Oregon-flare³ mantiene una expresión alta de citocromos porque tiene al gen regulador *Cyp6g1* y a la baja sensibilidad que posee la técnica de RT-PCR semicuantitativa para detectar transcritos que estén presentes en bajas cantidades.

Si bien la técnica de la RT-PCR semicuantitativa ha sido ampliamente usada por varios investigadores por casi tres décadas para la cuantificación relativa de la expresión génica, también mantiene una serie de desventajas, entre las cuales se encuentran: su pobre rango dinámico de cuantificación ($< 2 \log$), baja sensibilidad, baja precisión, el bromuro de etidio usado para la tinción no es cuantificable, las condiciones y los resultados basados en la discriminación por el tamaño de bandas no llega a ser muy preciso y es subjetivo; al no ser un proceso automatizado la obtención de resultados puede tardar varios días si se maneja un gran número de muestras y genes y finalmente por la naturaleza de la técnica en ocasiones los resultados no son reproducibles (Al-Khatib y Carr, 2003).

Tomando esto en cuenta se decidió realizar una medición de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los *primers* usados para esta técnica fueron los mismos que los usados para PCR semi-cuantitativa. Al final de los ciclos de amplificación en cada reacción se hizo un análisis de la curva de disociación en los que se observó un solo pico en cada gráfica (Figura 10), lo que representa una sola temperatura en la cual la mayoría de los productos se disociaron del fluoróforo (SYBER Green), demostrando la amplificación de un solo producto. Una vez hecho lo anterior, para calcular los valores de expresión relativa, se hizo un análisis del valor CT (*Cycle-Threshold*) (Tabla 5), que es el nivel de detección o el punto al cual la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia sobre el ruido de fondo. Se asume que el valor CT se correlaciona con el número de copias o secuencias blanco dentro de la muestra (Al-Khatib y Carr, 2003).

PCR cuantitativa tiempo real (qPCR-RT)

Nivel de expresión génica basal entre las cepas

Para acercarnos al comportamiento de la expresión de los genes de interés en condiciones normales, se comparó la expresión basal entre las cepas, usando a los datos de *actina42a* del grupo control negativo de la cepa flare³ para normalizar los datos y compararlos con los del control negativo de la cepa Oregon-flare³. Asumiendo que este gen se expresa de manera constitutiva y es útil para la cuantificación relativa de la expresión de genes problema (Qiagen 2017). Entre lo más relevante se observa que los marcadores de MX: *Cyp6g1* y *Cyp6a2* tienen en la cepa *Oregon-flare* una expresión de alrededor de 3.19 y 4.39 respectivamente, lo

que es mayor que en *flare* (Figura 9). Lo anterior concuerda con la información que se tiene sobre la cepa Oregon-flare³ (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010).

La cepa mutante Oregon-flare³ tiene en el cromosoma 2 una mutación dominante *Rst(2)DDT/Cyp6g1* (Daborn *et al.*, 2001) y *Cyp6a2* de la cepa Oregon que le confiere resistencia a varios insecticidas (Pyke *et al.*, 2004) (Daborn *et al.*, 2007). La expresión de *Cyp6g1* y *Cyp6a2* es más alta en *D. melanogaster* resistente a insecticida que en otras cepas susceptibles como la cepa *flare*³ y la cepa silvestre Canton^s (Bergé *et al.*, 1998; Daborn *et al.*, 2001). Los datos también concuerdan con lo propuesto por algunos autores acerca de la sobreexpresión constitutiva de estos Cyp450 en cepas resistentes a DDT (Brun *et al.*, 1996; Daborn *et al.*, 2002).

En el caso de los marcadores de estrés oxidante, se observó una expresión mayor de éstos en la cepa Oregon-flare³, de 3.07 (estadísticamente significativo) en *hsp60* y 2.36 en *hsp70* con respecto a los valores de *flare*³ de 2.40 y 1.03. Esta tendencia podría deberse a la sobreexpresión de genes relacionados con el MX en Oregon-flare³. En *Drosophila*, así como en varias especies animales las Hsps son importantes chaperonas que participan en la mediación de efectores claves de la apoptosis a nivel mitocondrial y en la degradación de proteínas bajo condiciones de estrés. Dada sus funciones, estas proteínas forman parte de la respuesta a condiciones de estrés y a EROs (Feder *et al.*, 1992). Se ha visto en algunos estudios sobre tolerancia y respuesta al estrés en insectos, que una sobreexpresión de genes Cyp450 en presencia de agentes estresantes o compuestos tóxicos va acompañada de la expresión de genes de combate a EROS como las Hsps (Sang, 2011; Esther *et al.*, 2015). Con base en lo anterior, la sobreexpresión de Cyp450s en Oregon-flare³ podría ir acompañada de la sobreexpresión de otros genes, como los relacionados con el estrés oxidante como las Hsps, lo cual les brindaría una mayor protección frente a compuestos tóxicos.

En *D. melanogaster* la presencia o ausencia de Hsp60 tiene influencia sobre la expresión de genes reguladores de la muerte celular como *reaper*, *hid* y *grim* (Hawkins *et al.*, 2000). Los marcadores de apoptosis mostraron niveles de expresión inferiores en Oregon-flare³ comparada con *flare*³. En Oregon-flare³ los valores de expresión en *grim*, *hid*, *reaper* y *Dmp53* fueron respectivamente de 0.10, 0.35, 0.46 y 0.72, siendo los valores de *grim* y *reaper* estadísticamente significativos con

respecto al control negativo. Llama la atención que los valores de expresión de *hsp60* fueron estadísticamente mayores en Oregon-flare³. Lo anterior podría estar relacionado con la expresión alta de genes involucrados con el balance de EROs, como son las Hsps (Figura 9) que son importantes componentes de las vías de señalización (Csermely, 2004). Muchos estudios han mostrado que las Hsps juegan un papel crítico en la modulación de la cascada apoptótica (Didelot *et al.*, 2006). Como ejemplo, se ha reportado que Hsp70 tiene una función principalmente anti-apoptótica. Ésta interactúa con vías intrínsecas y extrínsecas de apoptosis en numerosos pasos e inhibe la muerte celular a través de su actividad como chaperona, así como otras actividades independientes (Mosser *et al.*, 1997). Por otro lado, también existe evidencia de la importancia de Hsp60 como anti o pro-apoptótico (Sarkar *et al.*, 2006). Por lo anterior, podría suponerse que la baja expresión de los marcadores de apoptosis en Oregon-flare³ en comparación con flare³ tiene relación con los niveles altos del gen *hsp60* presente en la cepa Oregon-flare³, por lo que la presencia de éste y posiblemente de otras Hsps podrían estar protegiendo a las células del estrés oxidante y del daño celular y en consecuencia disminuye la expresión de los genes de apoptosis.

Niveles de expresión relativa inducidos por tratamientos

Marcadores de MX

Se observa en la Figura 10 que tanto en Oregon-flare³ como en flare³ la expresión de Cyp450s se mantuvo alta en los tratamientos de ZEN comparados con el control. Esto coincide con estudios *in vitro* e *in vivo* en mamíferos en los que se reporta que la ZEN induce la expresión de Cyp450s, para la hidroxilación o la conjugación (Bravin *et al.*, 2009). En los tratamientos con ZEN el gen *Cyp6g1* reportó un valor de 3.39 en la cepa flare³ y de 1.82 en la cepa Oregon-flare³ con respecto a sus respectivos controles. *Cyp6a2* también presenta una sobreexpresión en ambas cepas tratadas con ZEN. En flare³ el valor es de 1.82 y en Oregon-flare³ es de 10.36. Lo anterior podría indicar que estas enzimas están encargadas de metabolizar la ZEN en *D. melanogaster*. La sobreexpresión de *Cyp6g1* al igual que *Cyp6a2* en *D. melanogaster* está relacionada con resistencia a DDT y a varios compuestos tóxicos en éste y otros insectos; se ha reportado que esta sobreexpresión también va acompañada de una mayor expresión de glutatiónS-transferasas (Daborn *et al.*, 2002), lo que ayuda a aumentar la resistencia. No existen estudios previos que

reporten los efectos de la ZEN sobre la expresión de *Cyp450* en *D. melanogaster*, sin embargo, se sabe que *Cyp6g1* es el homólogo de *Cyp3a4* de humanos (Jones *et al.*, 2010), cuya familia (CYP3A) ha sido inducible con ZEN y otras micotoxinas (Kuehl, 2001) por lo que estos resultados validan el uso de este insecto para estudiar la toxicidad de la micotoxina.

Duca y colaboradores, en 2012, demostraron la inducibilidad de genes CYP3A en ratas tratadas con 25 mg/Kg de ZEN en solución de aceite de maíz por tres días encontrando que hay una relación entre la expresión de estos genes y el tiempo de exposición a la ZEN, siendo el tercer día donde se registró un porcentaje de cerca de dos veces más con respecto al control. De igual forma Ding y colaboradores, en 2006, realizaron un estudio en células HepG2 tratadas con 10 μ M de ZEN por 24 h y encontraron que dicho tratamiento aumentó la expresión del gen *Cyp3a4* alrededor de cuatro veces con respecto al control

A pesar de que *Cyp6a2* también presenta una sobreexpresión en ambas cepas, sus valores son relativamente menores en comparación con los resultados en el control positivo de fenobarbital, los cuales son de 44 en *flare*³ y de 14.50 en *Oregon-flare*³. La sobreexpresión de *Cyp6a2* en los tratamientos con fenobarbital coincide con estudios previos sobre la relación de este gen con el fenobarbital. Brun y colaboradores en 1996 realizaron por primera vez un estudio sobre la inducibilidad de *Cyp6a2* por fenobarbital en cepas resistentes y susceptibles a insecticidas mediante Northern blots, encontrando que, este gen es transcrito en el intestino medio, el cuerpo graso y los túbulos de Malpighi, tanto en cepa silvestre como en resistente a DDT, sin embargo, en esta última se observó que tal expresión es constitutiva en los mismos tejidos.

En el banco de información de Flybase se encontró que *Cyp6a2* responde también a la cafeína y al DDT. Sin embargo hace falta más información para determinar si esta enzima está relacionada con el metabolismo de micotoxinas como la ZEN, ya que, si bien en ambas cepas se observa una expresión superior al control, estos valores no fueron significativos estadísticamente y no se acercan a los que se presentan en fenobarbital, compuesto que se sabe induce la expresión de *Cyp6a2*.

Marcadores de estrés oxidante

La citotoxicidad y la generación de EROs son consecuencias de la toxicidad mediada por las micotoxinas. Las EROs son moléculas reactivas químicamente que contienen oxígeno. Éstas son altamente reactivas debido a la presencia de electrones no apareados; son formados como productos naturales del metabolismo y tienen un papel importante en la señalización celular y la homeostasis. Sin embargo, durante la exposición a ambientes estresantes, los niveles de EROs pueden incrementarse dramáticamente como resultado de un estrés oxidante (Devasagayam *et al.*, 2004). El estrés oxidante ocurre cuando la concentración de EROs generados excede la capacidad antioxidante de la célula. Las Hsps han sido usadas ampliamente como marcadores de estrés oxidante ya que su expresión es inducida por la perturbación en los niveles del estatus redox (Sies, 1991).

En la Figura 11 se observa el efecto de cada tratamiento en la expresión de los genes marcadores de estrés oxidante *hsp70* y *hsp60*. El gen *hsp70* tuvo un valor significativamente alto de 1.71 en los tratamientos de ZEN en la cepa flare³ en comparación al control. Lo anterior, podría indicar que existe un efecto sobre el balance de las EROs. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado que la ZEN estimula la formación de EROs causando daño oxidante. Además de los estudios de Hassen y Lee anteriormente mencionados, otros estudios realizados por Salem y colaboradores, en 2015, sobre el efecto protector de la crocina y la quercetina en células HCT116 y HEK293 tratadas con ZEN demostraron un efecto sobre la viabilidad celular dosis-dependiente en concentraciones que fueron de 25 a 200 μM ; a concentraciones de 100 μM se indujo estrés del retículo endoplásmico verificado a través de la sobreexpresión de GRP78, ATF4, GAD34, PDIA y CHOP. Chen y colaboradores, en 2015, exploraron los efectos de la ZEN en la proliferación y apoptosis de macrófagos RAW264.7 demostrando que el estrés en el retículo endoplásmico juega un papel clave en la muerte celular inducida por la ZEN, al observar una reducción en la viabilidad celular en concentraciones que fueron de 10 a 100 μM .

En los resultados con qRT-PCR *hsp70* solo se encuentra sobre-expresada en flare³. El incremento en los niveles de expresión podría ser atribuido al efecto oxidante de la ZEN, el cual estimula su expresión para la defensa celular. El mecanismo de protección de las Hsps contra el daño oxidante es a través de su habilidad de

incrementar la concentración de enzimas como glutatión transferasa dentro de la célula (Mehlen *et al.*, 1996).

En el caso de *hsp60* el cual fue estadísticamente significativo en ambas cepas con valores de 1.68 y 2.96 en *flare*³ y *Oregon-flare*³ respectivamente. En *D. melanogaster*, este gen actúa en colaboración con *hsp70* y está involucrado en procesos anti y pro-apoptóticos (Young *et al.*, 2004). Los miembros de Hsp60 son predominantes en mitocondria, aunque algunos lo reportan también en citosol y en compartimentos extracelulares (Sarkar *et al.*, 2006). Las chaperonas Hsp60 mitocondriales han sido asociadas a una respuesta de proteínas mitocondriales mal plegadas, por lo tanto, su regulación podría estar ligada a la acumulación de EROs en la mitocondria (Morrow *et al.*, 2016).

Lo anterior es de importancia debido a que si bien no hay muchos reportes que relacionen esta proteína con la ZEN si hay estudios que indican que la ZEN estimula la producción de EROs en la mitocondria, lo que trae como consecuencia efectos sobre la permeabilidad de membrana y una pérdida en el potencial de membrana que finaliza en procesos de apoptosis. Bouaziz y colaboradores, en 2008, trataron células de hepatoma humanas con 120 µM de ZEN, encontrando un incremento en la producción de EROs como consecuencia de alteraciones mitocondriales (permeabilidad de la membrana y de poros de transición). Pérdida en el potencial de membrana debido a una rápida producción de EROs y daños en la vía mitocondrial por la ZEN han sido también observadas en células CHO-K1 (Ayed-Boussema *et al.*, 2008) (Ferrer *et al.*, 2009).

En los resultados con qRT-PCR, en la cepa *flare*³ tratada con ZEN, *hsp60* tuvo un valor de 2.96, mientras que en *Oregon-flare*³ fue de 1.68. Con base en la información anterior, creemos que la expresión de *hsp60* en ambas cepas se debe a un aumento en la producción de EROs en el citoplasma mitocondrial. La sobreexpresión de *hsp60* se presenta tanto en larvas con sobreexpresión de Cyp450 como en larvas de expresión basal, lo que indicaría que el metabolismo de la ZEN a través de los citocromos P450 no tiene afectan la capacidad de esta micotoxina de producir un estrés oxidante en larvas de *D. melanogaster*.

Marcadores de apoptosis

Se han demostrado varios efectos tóxicos producidos por la ZEN, induciendo un proceso de apoptosis, fragmentación del ADN (Kim *et al.*, 2003), producción de micronúcleos (Ouanes *et al.*, 2003), aberraciones cromosómicas (IARC, 1993) y formación de aductos del ADN (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1995). Todos estos efectos tóxicos no pueden ser explicados por su actividad estrogénica. Varios estudios indican que los efectos de la ZEN podrían estar siendo desencadenados por estrés oxidante (Abid-Essefi, 2004).

Como se muestra en la Figura 11 en ambas cepas hay un aumento significativo en la expresión de *la hsp60* lo que es un indicativo de estrés oxidante, ahora bien, para probar un posible proceso de muerte celular se decidió medir la expresión de cuatro marcadores de apoptosis *grim*, *hid*, *reaper* y *Dmp53*; este último actúa como un factor de transcripción para los tres primeros y en *D. melanogaster* está ligado directamente a un proceso de apoptosis cuando existe un daño al ADN, a diferencia del gen *p53* de mamíferos, el cual está involucrado también en la detención del ciclo celular para la reparación de ADN dañado (Ollmann, 2000). Los genes *grim*, *hid* y *reaper* son inductores de apoptosis al inhibir directamente a las DIAP y activar a las caspasas (Steller, 2008).

En la Figura 12 se observa que *reaper* tiene un aumento significativo de la expresión en la cepa flare³ tratada con la ZEN con un valor de 5.91, mientras que en la cepa Oregon-flare³ tratada con la ZEN el gen que mostró el valor significativamente más alto fue *grim* con 1.99. El gen *hid* no mostró valores superiores al control en ninguna de la cepa tratada con la ZEN. Como se puede observar existe una diferencia en el patrón de expresión de los genes pro-apoptóticos.

La diferencia en el patrón de expresión podría explicarse debido a que, a pesar de las similitudes en su estructura y motivos, en las proteínas que codifican estos genes, su transcripción se activa en respuesta a señales pro-apoptóticas diferentes, incluyendo hormonas, una variedad de señales de desarrollo, y varias formas de estrés celular o daño (Steller, 2008).

Algo que es importante mencionar es que existen diferencias en la forma de inducir apoptosis. Por ejemplo, la expresión de *hid* resulta en una dramática disminución en los niveles de DIAP1, asociada con un correspondiente aumento en la activación de

caspasas; esto requiere de la actividad de la ubiquitina-proteína ligasa, y se ha demostrado que Hid promueve directamente la ubiquitinización y degradación de DIAP1. La expresión de los otros dos inductores de apoptosis *reaper* y *grim* también resulta en la pérdida de DIAP1, pero esta actividad no requiere de la función de la ubiquitina-proteína ligasa, indicando que estas proteínas pueden regular los niveles de DIAP a través de diferentes mecanismos. Las observaciones *in vitro* de Grim y Reaper muestran que éstas pueden suprimir la traducción de ciertas proteínas (Yoo, 2003).

Otra diferencia importante está en sus dominios funcionales. Grim, Hid y reaper contienen un motivo de unión a IAP amino-terminal (IBM) que se une e inhibe a las DIAP1. Sin embargo, grim y reaper tienen una segunda región funcionalmente definida; un dominio interno llamado dominio GH3. El dominio GH3 dirige a reaper y grim a la mitocondria y es suficiente para inducir la apoptosis, sugiriendo que el dominio GH3 media un mecanismo para la muerte celular que es independiente de la inhibición de las DIAP1 (Chen *et al.*, 2004; Claveria *et al.*, 2002). Según estudios previos, la actividad de reaper y grim sobre la mitocondria no parece involucrar la liberación de Citocromo c como ocurre en mamíferos (Abdelwahid *et al.*, 2007).

En el caso de reaper estas vías son inter-dependientes, en la que la degradación de las DIAP1 es significativamente más eficiente en la mitocondria (Freel *et al.*, 2008). Sin embargo, este no parece ser el caso de grim, en el que mantiene su actividad apoptótica inclusive al no poder unirse a DIAP1, mientras mantenga libre el dominio GH3 (Abdelwahid *et al.*, 2007). Un posible mecanismo por el que grim podría inducir la apoptosis al situarse en la mitocondria es a través de una interacción con la proteína Buffy, esto es soportado por interacciones físicas y genéticas (Wu *et al.*, 2010). Una vía mitocondrial activada por grim podría involucrar permeabilización, fragmentación o disyunción mitocondrial, culminando en la muerte celular por activación de caspasas (Koto *et al.*, 2009).

Con base en la información anterior y a nuestros resultados en los que hay una sobreexpresión significativa de *grim* en flare³ y *reaper* en Oregon-flare³ en los tratamientos de ZEN, se demuestra un posible proceso de apoptosis en los organismos tratados a una concentración de 260 µg/mL. Este proceso podría

involucrar a la vía mitocondrial como sugiere la sobreexpresión de *hsp60* en ambas cepas principalmente localizada en este compartimento (Arya y Lakhotia, 2008).

Lo anterior coincide con estudios *in vitro* en los que también se sugiere a este organelo como blanco de la micotoxina para la inducción de apoptosis. Bouaziz y colaboradores, en 2008, estudiaron las diferentes vías apoptóticas inducidas por la ZEN, toxina T-2 y ocratoxina A en células humanas de hepatoma. Las tres micotoxinas indujeron apoptosis a través de la vía mitocondrial dependiente de la actividad de *p53*. En ese trabajo, las alteraciones mitocondriales incluyeron la relocalización de la proteína Bax en la membrana externa de la mitocondria, la pérdida del potencial de membrana, la apertura del poro de transición mitocondrial y la liberación del citocromo c. En presencia de ZEN (120 μ M) y toxina T-2 los niveles de EROs se incrementaron en etapas tempranas, inclusive antes de las alteraciones mitocondriales. Otro estudio realizado por Banjerdpongchai y colaboradores, en 2010, acerca de los mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por la ZEN, se encontró un efecto citotóxico, causando detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis por la vía mitocondrial (liberación de citocromo c) a través de la reducción del potencial transmembranal, la activación de caspasas 3 y 8, la producción de EROs y la inducción de estrés en el retículo endoplásmico.

En nuestro resultado se midió la actividad de *Dmp53* el cual es homólogo de *p53* de humanos, cuya función en esa especie es la detención del ciclo celular en caso de daño al ADN para su reparación o en casos más severos la inducción de apoptosis. En la Figura 12 se observa un aumento en la expresión de *Dmp53* en ambas cepas tratadas con ZEN, en *flare*³ hay un aumento significativo de 1.95, mientras en la cepa *Oregon-flare*³ hay un valor significativamente alto de 1.82. La expresión de este gen podría indicarnos un posible efecto genotóxico de la ZEN en las larvas tratadas.

Lo anterior también coincide con estudios *in vitro* en los que se evaluó además de la actividad de *p53*, el efecto sobre el material genético. Yu y colaboradores, en 2011, mostraron que la ZEN redujo la viabilidad de macrófagos RAW264.7 de manera dosis dependiente. Los tratamientos con ZEN generaron muerte celular por necrosis o apoptosis tardía, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cambios en las proteínas mitocondriales Bcl-2 y Bax y la liberación citoplasmática del citocromo c y del factor inductor de apoptosis (AIF). De manera interesante, al aplicar un inhibidor

de p53 estos cambios, incluyendo el aumento de EROs y la apoptosis fueron prevenidos. Estos autores dedujeron que la activación de p53 juega un papel importante en el daño provocado por la ZEN

En otro estudio, Abid-Essefi y colaboradores, en 2004, analizaron la citotoxicidad de la ZEN, registrando la inhibición de la síntesis de ADN y de proteínas y daño oxidante en células Caco-2 y observaron una pérdida en la viabilidad celular correlacionada con la perturbación del ciclo celular, inhibición de la síntesis de proteínas y ADN e incremento de la formación de malondialdehído (MDA) en una manera dosis dependiente en concentraciones de ZEN que fueron de 1 a 60 μM .

Ayed-Boussema y colaboradores, en 2008, estudiaron el potencial de la ZEN sobre el daño al ADN, apoptosis y respuestas al estrés y las vías que eran desencadenadas en células HepG2, encontrando una disminución en la viabilidad celular de manera dosis dependiente (IC50%, 100 μM) y reportando a la apoptosis como la principal causa de muerte celular. Se encontró también una sobre-expresión de genes de la familia *ATM* y *p53*, involucrados en la ruptura del ADN y su reparación.

Comparación de los niveles de expresión en los tratamientos con ZEN

En la Figura 14 se observa una comparación de la expresión de todos los marcadores en los tratamientos de ZEN después de compararlas contra el control negativo correspondiente a cada cepa. En ambas se observa una expresión alta de los Cyp450, lo que podría indicar que éstos están implicados en el metabolismo de la ZEN, como ya se ha demostrado en estudios en células de mamífero *in vitro*. Debido a la expresión mayor de los Cyp450, se observa un posible aumento en las EROs por el aumento significativo de *hsp70* y *60* en la cepa *flare*³ y de *hsp60* en la cepa *Oregon-flare*³; también se pone en evidencia un posible evento de apoptosis dado el significativo aumento de *Dmp53* y *grim* en *flare*³ y de *reaper* y *Dmp53* en la cepa *Oregon-flare*³. Como ya se ha mencionado ambas cepas difieren en cuanto a la expresión de Cyp450, siendo *Oregon-flare*³ la que presenta los niveles más altos, confiriéndole resistencia a insecticidas organofosforados como el DDT. Sin embargo, nuestros resultados muestran que ambas cepas son susceptibles al daño causado por la ZEN.

La biotransformación de la ZEN difiere significativamente entre especies: es absorbida rápidamente después de su ingesta y metabolizada principalmente en células del intestino y células hepáticas (Olsen *et al.*, 1985). Estudios farmacocinéticos y del metabolismo indican que en las células intestinales de mamíferos, la ZEN es degradada por hidroxilación del grupo ceto en el carbono 6 a α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α zearalanol (α -ZAL) o zearanol, β -zearalanol (β -ZAL) o taleranol y zearalanone (ZAN), que son subsecuentemente conjugados con ácido glucurónico o sulfónico y eliminados en la orina (JECFA, 2000).

Los productos reducidos han sido encontrados en varias especies de animales vertebrados y humanos, en particular α y β -ZOL. La α -ZOL ha demostrado tener una mayor afinidad a los receptores estrogénicos 3 a 4 veces más alto que el potencial estrogénico de la ZEN (Kuiper *et al.*, 1987), relacionando su toxicidad inevitablemente con su metabolismo (Shier *et al.*, 2001; Hildebrand *et al.*, 2012). Aunque varios estudios demuestran que ZEN es eficientemente metabolizado a compuestos con relativamente baja toxicidad, la biotransformación de la ZEN es considerada solo como una vía de desintoxicación parcial, pues la toxicidad del metabolito todavía existe (Tiemann *et al.*, 2003)

En *D. melanogaster* no se tiene reportada la presencia de receptores homólogos a los receptores de estrógeno α y β presentes en mamíferos, por lo tanto, el efecto de la ZEN que se muestran en nuestros resultados, deben ser causados por otros mecanismos diferentes de la actividad estrogénica de la micotoxina. Un estudio realizado por Pietsch y colaboradores, en 2014, reportó también que en células cerebrales de carpa, sin expresión identificable de receptores de estrógenos, éstas aun eran altamente sensibles a la micotoxina reflejándose en la pérdida de la viabilidad celular y en cambios en la expresión de la enzima glutatión transferasa.

Nuestros resultados también apoyan un posible aumento de EROs ocasionado por la ZEN, lo que varios autores han relacionado con el efecto genotóxico y citotóxico de la ZEN. La metabolización de la ZEN a catecoles y posibles intermediarios quinona y semiquinona son probablemente los responsables de promover la producción de EROs. Estudios recientes han mostrado la formación de productos de hidroxilación mediados por los Cyp450. Los dos principales metabolitos oxidantes

(ZEN y α -ZOL) generados por microsomas hepáticos de humanos y varias otras especies son hidroxilados en el anillo aromático en la posición C-13 y C-15 y representan catecoles. La subsecuente metilación de catecoles por la catcol-O-metiltransferasa es generalmente considerada como una vía de desintoxicación. Imbalances entre las reacciones de activación e inactivación pueden permitir la formación de reactivas semiquinonas y quinonas que pueden alquilar el ADN o producir EROs por el ciclo REDOX (Fleck *et al.*, 2012). Sin embargo, a la concentración de 256 μ M utilizada en este trabajo, nuestro grupo no encontró que la ZEN fuera genotóxica en ninguna de las cruas de la prueba en ala de *D. melanogaster*. Los trabajos reportados en los que la ZEN ha mostrado ser genotóxica derivan de pruebas *in vivo* e *in vitro*. Se sabe que las concentraciones que se aplican *in vitro* son generalmente altas y que difícilmente se alcanzarían *in vivo*. Dado que este trabajo se hizo con una concentración que equivale a la CL₂₀ y que las concentraciones de 100, 200 y 400 μ M no son genotóxicas en este insecto,

Además de la explicación anterior sobre el posible efecto de la ZEN independiente de la unión a receptores de estrógenos, también existe la posibilidad que esta micotoxina sea un antagonista ecdiesterioide en *D. melanogaster*. Esto se ha reportado anteriormente en un estudio hecho por Dinan y colaboradores, en 2001, en el que probaron la capacidad agonista o antagonista sobre los receptores de ecdisona de diferentes compuestos naturales en células cultivadas de *D. melangaster*, encontrando una débil actividad antagonista de la ZEN a una concentración de $\geq 10^{-5}$ M; sin embargo, harían falta otras pruebas para probar esta hipótesis.

Conclusiones

La ZEN tiene un efecto sobre los niveles de expresión de los genes marcadores de MX, principalmente *Cyp6g1*, lo cual indica que al menos este Cyp450 está involucrado en el metabolismo de la ZEN en estos organismos.

La ZEN aumento significativamente los niveles de expresión de *hsp60* en la cepa *flare*³ y *Oregon-flare*³ lo que indica un posible desbalance de EROs en ambas cepas o una afectación en la conformación de las chaperonas.

Los niveles de expresión de los genes marcadores de apoptosis *reaper* en *flare*³ y *grim* en *Oregon-flare*³ en ambas cepas fueron significativamente altos en presencia de la ZEN, lo que indica que la micotoxina tiene un efecto citotóxico sobre las células de estos organismos.

La comparación de los niveles de expresión en las dos cepas sin tratamiento comprueba que existe una mayor expresión de los Cyp450s en la cepa *Oregon-flare*³ en comparación con la cepa *flare*³

Los efectos de la ZEN afectaron tanto a larvas con expresión basal de Cyp450s como aquellas con una expresión alta de estas enzimas, lo que podría indicar que el metabolismo de la ZEN a través de los Cyp450s no afecta la toxicidad de la micotoxina.

Dado que en *D. melanogaster* no se tiene reportada la presencia de genes homólogos a los receptores α y β de estrógenos de mamíferos, los efectos de la ZEN en este organismo deben darse por un mecanismo distinto al de la estimulación estrogénica.

Referencias

- Abbès, S., Ouanes, Z., Salah-Abbès, J. B., Abdel-Wahhab, M. A., Oueslati, R., & Bacha, H. 2007. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631 (2), 85-92.
- Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R. J., Balasundaram, S., Fowle, W. H & White, K. 2007. Mitochondrial disruption in *Drosophila* apoptosis. *Developmental cell*, 12 (5), 793-806.
- Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Golli-Bennour, E. E., Ouanes, Z & Bacha, H. 2009. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites α -zearalenol and β -zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 23 (4), 233-243.
- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., & Bacha, H. 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in vitro*, 18 (4), 467-474.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M & Rowe, J. J. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and applied pharmacology*, 242 (3), 263-269.
- Al-Khatib, K y Carr, r J. J. D. 2003. Relative quantitation of mRNA: real-time PCR vs. end point PCR. *BIO-RAD life science group*. Bulletin 2915.
- Arya, R & Lakhotia, S. C. 2008. Hsp60D is essential for caspase-mediated induced apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones*, 13 (4), 509-526.
- Ayed-Boussema, I., Bouaziz, C., Rjiba, K., Valenti, K., Laporte, F., Bacha, H & Hassen, W. 2008. The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology in Vitro*, 22 (7), 1671-1680.
- Banjerdpongchai, R., Kongtawelert, P., Khantamat, O., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Subhasitanont, P., & Svasti, J. 2010. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *Journal of hematology & oncology*, 3 (1), 50.

- Bennett, J.W & Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497–516.
- Berek, L., Petri, I. B., Mesterhazy, A., Téren, J & Molnár, J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in vitro*, 15 (1), 25-30.
- Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 353 (1376), 1701-1705.
- Biehl, M.L.; Prelusky, D.B.; Koritz, G.D.; Hartin, K.E.; Buck, W.B.; Trenholm, H.L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, 121, 152-159.
- Bilak, A & Su, T. T. 2009. Regulation of *Drosophila melanogaster* pro-apoptotic gene hid. *Apoptosis*, 14 (8), 943-949.
- Bogwitz, M. R., Chung, H., Magoc, L., Rigby, S., Wong, W., O'Keefe, M & Daborn, P. J. 2005. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (36), 12807-12812.
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T & Craig, E. A. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of molecular evolution*, 38 (1), 1-17.
- Bouaziz, C., El Golli, E., Abid-Essefi, S., Brenner, C., Lemaire, C., & Bacha, H. 2008. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, 254 (1), 19-28.
- Bravin, F., Duca, R. C., Balaguer, P., & Delaforge, M. 2009. In vitro cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. *International journal of molecular sciences*, 10 (4), 1824-1837.
- Brun, A., Cuany, A., Le Mouel, T., Berge, J., & Amichot, M. 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26 (7), 697-703.

- Celniker S.E., Rubin G.M. 2003. The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu Rev genomics Hum Genet* 4: 89-117.
- Chen, F., Li, Q., Zhang, Z., Lin, P., Lei, L., Wang, A., & Jin, Y. 2015. Endoplasmic reticulum stress cooperates in zearalenone-induced cell death of RAW 264.7 macrophages. *International journal of molecular sciences*, 16 (8), 19780-19795.
- Chen, P., Ho, S. I., Shi, Z & Abrams, J. M. 2004. Bifunctional killing activity encoded by conserved reaper proteins. *Cell Death & Differentiation*, 11 (7), 704-713.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., & Daborn, P. J. 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (14), 5731-5736.
- Clavería, C., Caminero, E., Martínez-A, C., Campuzano, S & Torres, M. 2002. GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. *The EMBO Journal*, 21(13), 3327-3336.
- Conková, E., Laciaková, A., Pástorová, B., Seidel, H & Kováč, G. 2001. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology letters*, 121 (3), 145-149.
- Courgeon, A. M., Rollet, E., Becker, J., Maisonhaute, C., & Best-Belpomme, M. 1988. Hydrogen peroxide (H₂O₂) induces actin and some heat-shock proteins in *Drosophila* cells. *European journal of biochemistry*, 171 (1-2), 163-170.
- Csermely, P. 2004. Strong links are important, but weak links stabilize them. *Trends in biochemical sciences*, 29 (7), 331-334.
- Daborn, P., Boundy, S., Yen, J., & Pittendrigh, B. 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Molecular Genetics and Genomics*, 266 (4), 556-563.
- Daborn, P. J., Lumb, C., Boey, A., Wong, W & Batterham, P. 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37 (5), 512-519

- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S & Feyereisen, R. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297 (5590), 2253-2256.
- De Montellano, P. R. O. (2005). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52 (10), 794-804.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M & Gore, A. C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30 (4), 293-342.
- Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., & Garrido, C. 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. In *Molecular Chaperones in Health and Disease* (pp. 171-198). Springer Berlin Heidelberg.
- Dinan*, L., Bourne, P. C., Meng, Y., Sarker**, S. D., Tolentino, R. B., & Whiting, P. 2001. Assessment of natural products in the *Drosophila melanogaster* B II cell bioassay for ecdysteroid agonist and antagonist activities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (2), 321-342.
- Ding, X., Lichti, K., & Staudinger, J. L. 2006. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicological Sciences*, 91 (2), 448-455.
- Dinis, A. M. P., Lino, C. M & Pena, A. S. 2007. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44 (2), 553-557.
- Domijan, A. M., Peraica, M., Miletić-Medved, M., Lucić, A & Fuchs, R. 2003. Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. *Journal of Chromatography B*, 798 (2), 317-321.
- Duca, R. C., Mabondzo, A., Bravin, F., & Delaforge, M. 2012. In vivo effects of zearalenone on the expression of proteins involved in the detoxification of rat xenobiotics. *Environmental toxicology*, 27 (2), 98-108.

Dueñas, G. I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. y Graf U. 2001. Easys raising of *Drosophila melanogaster* on a médium consisting of mashed potato flakes and preservative solution. *DIS*. 88: 166.

EFSA (European Food Safety Authority. 2009. Annual Report of European Food Safety Authority, ISBN: 978-92-9199-211-9 doi:10.2805/3682.

EFSA (European Food Safety Authority). 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J* 89:1–35.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M & Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75 (4), 817-825.

El-Makawy, A., Hassanane, M. S & Alla, E. S. A. A. 2001. Genotoxic evaluation for the estrogenic mycotoxin zearalenone. *Reproduction Nutrition Development*, 41 (1), 79-89.

Esther, E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W., & Nicolson, S. W. 2015. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific reports*, 5, 11779.

Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N., & Lindquist, S. 1992. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes & development*, 6 (8), 1402-1413.

Ferrer, E., Juan-García, A., Font, G., & Ruiz, M. J. 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, 23 (8), 1504-1509.

Fink-Grenmels, J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21 (4), 115-120.

Fink, A. L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological reviews*, 79 (2), 425-449.

Fleck, S. C., Hildebrand, A. A., Müller, E., Pfeiffer, E., & Metzler, M. 2012. Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Mycotoxin research*, 28 (4), 267-273.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2000. *The Fifty-third Meeting of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Geneva.

Freel, C. D., Richardson, D. A., Thomenius, M. J., Gan, E. C., Horn, S. R., Olson, M. R., & Kornbluth, S. 2008. Mitochondrial localization of Reaper to promote inhibitors of apoptosis protein degradation conferred by GH3 domain-lipid interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (1), 367-379.

Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C & Rimpou, J. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environmental and molecular mutagenesis*, 10 (S10), 1-35.

Ghedira-Chekir, L., Maaroufi, K., Zakhama, A., Ellouz, F., Dhouib, S., Creppy, E. E & Bacha, H. 1998. Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chemico-biological interactions*, 113 (1), 15-25.

Gong, W. J & Golic, K. G. 2006. Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics*, 172 (1), 275-286.

González-Osnaya, L & Farrés, A. 2011. Deoxynivalenol and zearalenone in *Fusarium*-contaminated wheat in Mexico City. *Food Additives and Contaminants*, 4 (1), 71-78.

Graf, U & van Schaik, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271 (1), 59-67.

Gullo, C. A & Teoh, G. 2004. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunology letters*, 94 (1), 1-10.

Hainaut, P., Hernández, T., Robinson, A., Rodríguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M & Montesano, R. 1998. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic acids research*, 26 (1), 205-213.

Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S & Buchner, J. 2005. Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol the cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (25), 23861-23868.

Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A. A., Lopez, A. D. C., & Bacha, H. 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 (3), 294-302.

Hartl, F. U & Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295 (5561), 1852-1858.

Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Peterson, E. P., Wang, S. L., Vernooy, S. Y., & Hay, B. A. 2000. The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (35), 27084-27093.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: IARC editor. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Lyon, France: IARC. Vol 56, pp 397–444.

Jancova, P., Anzenbacher, P & Anzenbacherova, E. 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*, 154 (2), 103-116.

JECFA. 2000. Joint FAO /WHO Expert Committee on Food Additives, 53rd Report. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 44. Rome: World Health Organisation.

Jones, R. T., Bakker, S. E., Stone, D., Shuttleworth, S. N., Boundy, S., McCart, C & van den Elsen, J. M. 2010. Homology modelling of Drosophila cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. *Pest management science*, 66 (10), 1106-1115.

Kiessling, K.H.; Pettersson, H. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.(Copenh)* 1978, 43, 285-920.

Kim, I. H., Son, H. Y., Cho, S. W., Ha, C. S., & Kang, B. H. 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicology letters*, 138 (3), 185-192.

- Ko, L. J & Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development*, 10 (9), 1054-1072.
- Koto, A., Kuranaga, E., & Miura, M. 2009. Temporal regulation of Drosophila IAP1 determines caspase functions in sensory organ development. *The Journal of cell biology*, 187 (2), 219-231.
- Kregel, K. C. 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology*, 92 (5), 2177-2186.
- Kuczuk, M. H., Benson, P. M., Heath, H & Hayes, A. W. 1978. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 53 (1), 11-20.
- Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., ... & Maurel, P. 2001. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature genetics*, 27 (4), 383-391.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P & Watanabe, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 7 (3), 253-306.
- Lee, H., Kang, C., Yoo, Y. S., Hah, D. Y., Kim, C. H., Kim, E., & Kim, J. S. 2013. Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36 (2), 732-740.
- Lioi, M. B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S & Ursini, M. V. 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557 (1), 19-27.
- Liu, M., Gao, R., Meng, Q., Zhang, Y., Bi, C & Shan, A. 2014. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats. *PloS one*, 9 (9), e106412.
- Logrieco, A & Visconti, A. 2004 An Overview of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. *Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands*. p. 259.

- Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E. E., Ellouz, F & Bacha, H. 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol*, 34 (5), 535-540.
- Malekinejad, H., Colenbrander, B & Fink-Gremmels, J. 2006. Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites α -zearalenol and β -zearalenol. *Veterinary research communications*, 30 (4), 445-453.
- Marin, M. L., Murtha, J., Dong, W & Pestka, J. J. 1996. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. *Journal of toxicology and environmental health*, 48 (4), 379-396.
- Matthews K.A., Kaufman T.C., Gelbart, W.M. 2005. Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat Rev Genet* 6: 179-193
- McDonough, H & Patterson, C. 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell stress & chaperones*, 8 (4), 303-308.
- McMullin, T. W & Hallberg, R. L. 1988. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the Escherichia coli groEL gene. *Molecular and cellular biology*, 8 (1), 371-380.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., & Arrigo, A. P. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1-and staurosporine-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (28), 16510-16514.
- Milićević, D. R., Škrinjar, M & Baltić, T. 2010. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins*, 2 (4), 572-592.
- Minervini, F & Dell'Aquila, M. E. 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International journal of molecular sciences*, 9 (12), 2570-2584.
- Misra, J. R., Horner, M. A., Lam, G & Thummel, C. S. 2012. Transcriptional Regulation of Xenobiotic Detoxification in *Drosophila*. *The FASEB Journal*, 26 (1 Supplement), 931-2.

- Morrow, G., Le Pécheur, M., & Tanguay, R. M. 2016. Drosophila melanogaster mitochondrial Hsp22: a role in resistance to oxidative stress, aging and the mitochondrial unfolding protein response. *Biogerontology*, 17 (1), 61-70.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C & Massie, B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 17 (9), 5317-5327.
- Murata, H., Sultana, P., Shimada, N & Yoshioka, M. 2003. Structure-activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence. *Veterinary and human toxicology*, 45 (1), 18-20.
- National Toxicology Program. 1982. Carcinogenesis Bioassay of Zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). *National Toxicology Program technical report series*, 235, 1.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J & Gunsalus, I. C. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics*, 6 (1), 1-42.
- Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S & Duyk, G. 2000. Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*, 101 (1), 91-101.
- Olsen, M., Malmjöf, K., Pettersson, H., Sandholm, K., & Kiessling, K. H. 1985. Plasma and Urinary Levels of Zearalenone and α -Zearalenol in a Prepubertal Gilt Fed Zearalenone. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 56 (3), 239-243.
- Othmen, Z. O. B., El Golli, E., Abid-Essefi, S., & Bacha, H. 2008. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α Zearalenol and β Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology*, 252(1), 72-77.
- Ostry, V. 1998. Filamentous Microscopic Fungi (moulds), Mycotoxins and Human Health. *SZU, Praha*. p. 20.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E. E., & 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538 (1), 63-70.

Overy, D. P., Seifert, K. A., Savard, M. E & Frisvad, J. C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (1), 69-77.

Pfohl-Leszkowicz, A., Chekir-Ghedira, L & Bacha, H. 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16 (10), 2315-2320.

Pietsch, C., Noser, J., Wettstein, F. E., & Burkhardt-Holm, P. 2014. Unraveling the mechanisms involved in zearalenone-mediated toxicity in permanent fish cell cultures. *Toxicol*, 88, 44-61.

Pomatto, L.C.D., Carney, C., Shen, B., Wong, S., Halaszynski, K., Salomon, M.P., Davies, K.J.A., and Tower, J. 2017. The mitochondrial lon protease is required for age specific and sex-specific adaptation to oxidative stress. *Curr. Biol.* **27**, 1-15.

Pyke, F. M., Bogwitz, M. R., Perry, T., Monk, A., Batterham, P., & McKenzie, J. A. 2004. The genetic basis of resistance to diazinon in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 121 (1), 13-24.

Rand, M. D., Lowe, J. A & Mahapatra, C. T. 2012. *Drosophila* CYP6g1 and its human homolog CYP3A4 confer tolerance to methylmercury during development. *Toxicology*, 300 (1), 75-82.

Robledo, M. L., Marin, S & Ramos, A. J. 2001. [Natural contamination with mycotoxins in forage maize and green coffee in Nayarit State (Mexico)]. *Revista iberoamericana de micología*, 18(3), 141-144.

Robledo-Marengo ML., Rojas-García AE., Medina-Díaz IM., Barrón-Vivanco BS., Romero-Bañuelos CA., Rodríguez-Cervantes CH & Girón-Pérez MI. 2012. Micotoxinas en Nayarit, México: Estudio de caso. *Bio ciencias* 1 (2). 92-98.

Salah-Abbès, J. B., Abbès, S., Haous, Z & Oueslati, R. 2009. *Raphanus sativus* extract prevents and ameliorates zearalenone-induced peroxidative hepatic damage in Balb/c mice. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 61 (11), 1545-1554.

- Salem, I. B., Prola, A., Boussabbeh, M., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. 2015. Crocin and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress and Chaperones*, 20 (6), 927-938.
- Saner, C., Weibel, B., Würgler, F. E & Sengstag, C. 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 27 (1), 46-58.
- Sang, W., Ma, W. H., Qiu, L., Zhu, Z. H., & Lei, C. L. 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of insect physiology*, 58 (6), 830-836.
- Sarkar, S., Arya R & Lakhota, S. C. 2006 Chaperonins: in life and death. In: Sreedhar AS, Srinivas UK (eds) Stress responses: a molecular biology approach. Signpost, Trivandrum, India. 43–60.
- Schlesinger, M. J., Ashburner, M & Tissieres, A. 1982. *Heat shock, from bacteria to man*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shapira, R & Paster, N. 2004. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. Pess, Woodhead Publishing Limited: Abington Hall, Abington, MA, USA. P. 190–223.
- Shier, W. T., Shier, A. C., Xie, W & Mirocha, C. J. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol*, 39 (9), 1435-1438.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91 (3), S31-S38.
- Stark, A. A. 1980. Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. *Annual Reviews in Microbiology*, 34 (1), 235-262.
- Steller, H. 2008. Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death & Differentiation*, 15 (7), 1132-1138.
- Sun, W., Valero, M. C., Seong, K. M., Steele, L. D., Huang, I. T., Lee, C. H & Pittendrigh, B. R. 2015. A glycine insertion in the estrogen-related receptor (ERR) is

associated with enhanced expression of three cytochrome P450 genes in transgenic *Drosophila melanogaster*. *PLoS one*, 10 (3), ffe0118779.

Surai, P. F., Mezes, M., Melnichuk, S. D & Fotina, T. I. 2008. Mycotoxins and animal health: From oxidative stress to gene expression. *Krmiva*, 50 (1), 35-43.

Tanaka, T., Kato, K., Taniguchi, T., Takagi, D., Takeyama, N & Kitazawa, Y. 1988. A case of ruptured duodenal varices and review of the literature. *The Japanese journal of surgery*, 18 (5), 595-600.

Thust, R., Kneist, S & Hühne, V. 1982. Genotoxicity of *Fusarium* mycotoxins (nivalenol, fusarenon-X, T-2 toxin, and zearalenone) in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Archiv fur Geschwulstforschung*, 53 (1), 9-15.

Tiemann, U., Viergutz, T., Jonas, L & Schneider, F. 2003. Influence of the mycotoxins α -and β -zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. *Reproductive Toxicology*, 17 (2), 209-218.

Tijet, N., Helvig, C & Feyereisen, R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262 (1), 189-198.

Turner, P. C., Nikiema, P & Wild, C. P. 1999. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443 (1), 81-93.

Ueno, Y., & Kubota, K. 1976. DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Research*, 36, 445-451.

Warth, B., Sulyok, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R & Krska, R. 2013. New insights into the human metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicology Letters*, 220(1), 88-94.

Waters, L. C., Zelhof, A. C., Shaw, B. J & Ch'ang, L. Y. 1992. Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (11), 4855-4859.

- Woodlock, T. J., Chen, X., Young, D. A., Bethlenny, G., Lichtman, M. A & Segel, G. B. 1997. Association of HSP60-like proteins with the L-system amino acid transporter. *Archives of biochemistry and biophysics*, 338 (1), 50-56.
- Wu, J. N., Nguyen, N., Aghazarian, M., Tan, Y., Sevrioukov, E. A., Mabuchi, M., ... & Brachmann, C. B. 2010. grim promotes programmed cell death of Drosophila microchaete glial cells. *Mechanisms of development*, 127 (9), 407-417.
- Xu, C., Li, C. Y. T & Kong, A. N. T. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, 28 (3), 249-268.
- Yin, V. P., & Thummel, C. S. 2004. A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (21), 8022-8027.
- Yokokura, T., Dresnek, D., Huseinovic, N., Lisi, S., Abdelwahid, E., Bangs, P & White, K. 2004. Dissection of DIAP1 functional domains via a mutant replacement strategy. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (50), 52603-52612.
- Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., ... & Hay, B. A. 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature cell biology*, 4 (6), 416-424.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., & Hartl, F. U. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5 (10), 781-791.
- Yu, J. Y., Zheng, Z. H., Son, Y. O., Shi, X., Jang, Y. O., & Lee, J. C. 2011. Mycotoxin zearalenone induces AIF-and ROS-mediated cell death through p53-and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264. 7 macrophages. *Toxicology in Vitro*, 25 (8), 1654-1663.
- Zeiger, E., Margolin, B. H., Shelby, M. D., Zeiger, E., Haseman, J. K., Spalding, J & Anderson, B. 1987. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, 236, 933-941.

Zhu, L., Yuan, H., Guo, C., Lu, Y., Deng, S., Yang, Y & He, Z. 2012. Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3-and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 227 (5), 1814-1820.

Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C & Manes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, 45 (1), 1-18.

Zourgui, L., El Golli, E., Bouaziz, C., Bacha, H., & Hassen, W. 2008. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food and chemical toxicology*, 46 (5), 1817-1824.

Anexo 1

Valores promedio de la expresión relativa del primero y segundo experimento

Valores usados para el diseño de los primers usados para PCR semi-cuantitativa y PCR tiempo real.

Gen	Primer	A	T	G	C	# Bases	Tm	C+G	A+T	% CG	Hairpin		Homo dímeros		Hetero dímeros	
											ΔG	ΔG Máxima	ΔG	ΔG Máxima	ΔG	ΔG Máxima
<i>reuper</i>	CTACAT ACCCGATCAGGCG	5	3	4	7	20	60	11	8	55	-0.31	-37.38	-4.62	-41.54	-3.61	-3.61
	CGATGGCTTCCGATATTTGC	3	7	6	4	20	60	10	10	50	-0.65	-41.54	-3.91	-41.54	-3.61	-3.61
<i>hid</i>	GAGTGGGTCAGGATGTACC	4	4	8	3	19	60	11	8	57.8947	-0.31	-33.86	-4.41	-39.86	-3.07	-3.07
	GAGTCCGGATTCGGATGGC	3	5	8	3	19	60	11	8	57.8947	-0.67	-39.18	-3.61	-38.26	-3.07	-3.07
<i>grim</i>	GGGAAGTCAACAGGGATCG	6	2	8	3	19	60	11	8	57.8947	0.88	-37.34	-4.62	-39.07	-4.67	-4.67
	CCTGGAGGTTGGCATCGG	2	4	8	4	18	60	12	6	66.6667	-0.11	-39.07	-4.67	-39.07	-4.67	-4.67
<i>Dmp53</i>	GCAGTTCAGCCAGCAATCC	5	3	4	7	19	60	11	8	57.8947	1.27	-39.11	-3.54	-39.51	-1.60	-1.60
	CCACCGAIGTTGTGATTCTC	3	7	4	6	20	60	10	10	50	-0.94	-39.33	-4.62	-39.33	-1.60	-1.60
<i>hsp60</i>	GAGACCGTCAAGGACAACC	7	1	5	6	19	60	11	8	57.8947	-1.54	-35.48	-3.61	-37.88	-4.67	-4.67
	CCTCGCTGATGAGATTGCC	3	5	5	6	19	60	11	8	57.8947	-0.98	-37.88	-3.61	-37.88	-4.67	-4.67
<i>hsp70</i>	CGAGATTGACCGCACTGTTTG	4	6	6	4	20	60	10	10	50	0.37	-37.43	-3.61	-37.49	-3.61	-3.61
	GCCGACGAGCACGATGTC	4	2	6	6	18	60	12	6	66.6667	-1.80	-37.49	-3.61	-37.49	-3.61	-3.61
<i>Cyp6a2</i>	ACGAAAGAAGTGGGAAGGAC	9	1	8	2	20	60	10	10	50	1.35	-37.67	-3.61	-37.67	-4.67	-4.67
	CACATCGGTGTTGAACCTG	4	4	6	5	19	60	11	8	57.8947	-1.46	-36.12	-4.41	-37.67	-4.67	-4.67
<i>Cyp6g1</i>	GAGCCTGAAGCCGTTCTAC	4	4	5	6	19	60	11	8	57.8947	-0.66	-36.64	-3.61	-39.87	-4.67	-4.67
	ATCCGAAGGGTTGATATGCC	5	5	6	4	20	60	10	10	50	-1.34	-39.87	-3.91	-39.87	-4.67	-4.67

Anexo 2

Secuencias de los genes de interés obtenidas a partir de la secuenciación de los productos de PCR punto final usando los *primers* diseñados para el presente trabajo.

Secuencias consenso

Grim

GGGAAGTCAACAGGGATCGATGACCATGTCGGAGTTTGGATGCTGGGATCTTTT
GGCCCAGATCTTCTGCTACGCTCTGCGAATCTACAGCTACAGTTTCGAGCCAGCG
TCAACCGACGGTCATTCAGATATCCTTCGAGATCAGCAGCGGCGGTCAGAACAA
CGATGAGGACGACGTGACTGATGCCACCTCCAAGG

Hid

TCCGGCGAGGAGTACAACCTTCTTCCGGCAGCAGCAGCCGCAACCACATCCGTC
ATATCCGGCGCCATCAACACCGCAGCCAATGCCACCGCAGTCAGCGCCGCCGA
TGCACTGCAGCCACAGCTACCCGCAGCAGTCGGCGCACATGATGCCACACCAT
TCCGCTC

rpr

TACATACCCGATCAGGCGACTCTGTTGCGGGAGGCGGAGCAGAAGGAGCAGCA
GATCCTTCGCTTGCGGGAGTCACAGTGGAGATTCCTGGCCACCGTCGTCCTGG
AAACCCTGCGCCAGTACACTTCATGTCATCCGAAGACCGGAAGAAAGTCCGGC
AAATATCGCAAGCCATCG

Dmp53

CTTCCTTAGTCTTCTGCCTGGAGAAAGCATGGTAAGGTGACAGCAAACTCTAG
ATGGCTAGAACAAGCTTAACGTGTTTTCTTTCTTGCAGCGGCGATATCGTGGG
ACAGCATGTTATACATGTTAAAATATGTACGTGCCCAAGCGGGATCGCATCCA
AGACGAACGCGAGACCGTCAAGGACAACCTTAAGACCATGTCGCGCCCCGTTA
GCACGCCCGAGGAGATCGCCCAGGTGGCCACCATCTCGGCCAACGGTGATCA
GGCCATCGGCAATCTCATCAGCGAGG

Hsp70

GAGATTGACGCACTGTTTTGAGGGCCAAGACTTCTACACCAAAGTGAGCCGCGC
CAGGTTTGAGGAGCTGTGCGCGGACCTCTTCCGCAACACCCTGCAGCCTGTGG
AGAAGGCCCTCAACGATGCCAAGATGGATAAGGGTCAGATCCACGACATCGTG
CTCGTCGGC

Cyp6g1

GAGCCTGAAGCCGTTCTACGACTACACTCTCGAGAACGGAACCCCTGTGTTTCAT
ACCCATCTATGCACTGCATCATGATCCAAAGGTATTCCATCACATTGAGAAGTTC
ATAAGCCCCCTCCTCTAACTATCTGGTTATTCCTAGTACTGGACCAATCCCAGCC
AATTCGATCCGGAGCGTTTCTCACCCGCGAACCGCAAGAACATAGTGGCCATG
GCATATCAACCCTTCGGAT

Cyp6a2

ACGGAAAGAAGTGGAAGGACATGCGCCAGAGGCTGACGCCGACTTTTACCTCG
GGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTGTCTGAGGAGTTCGTC

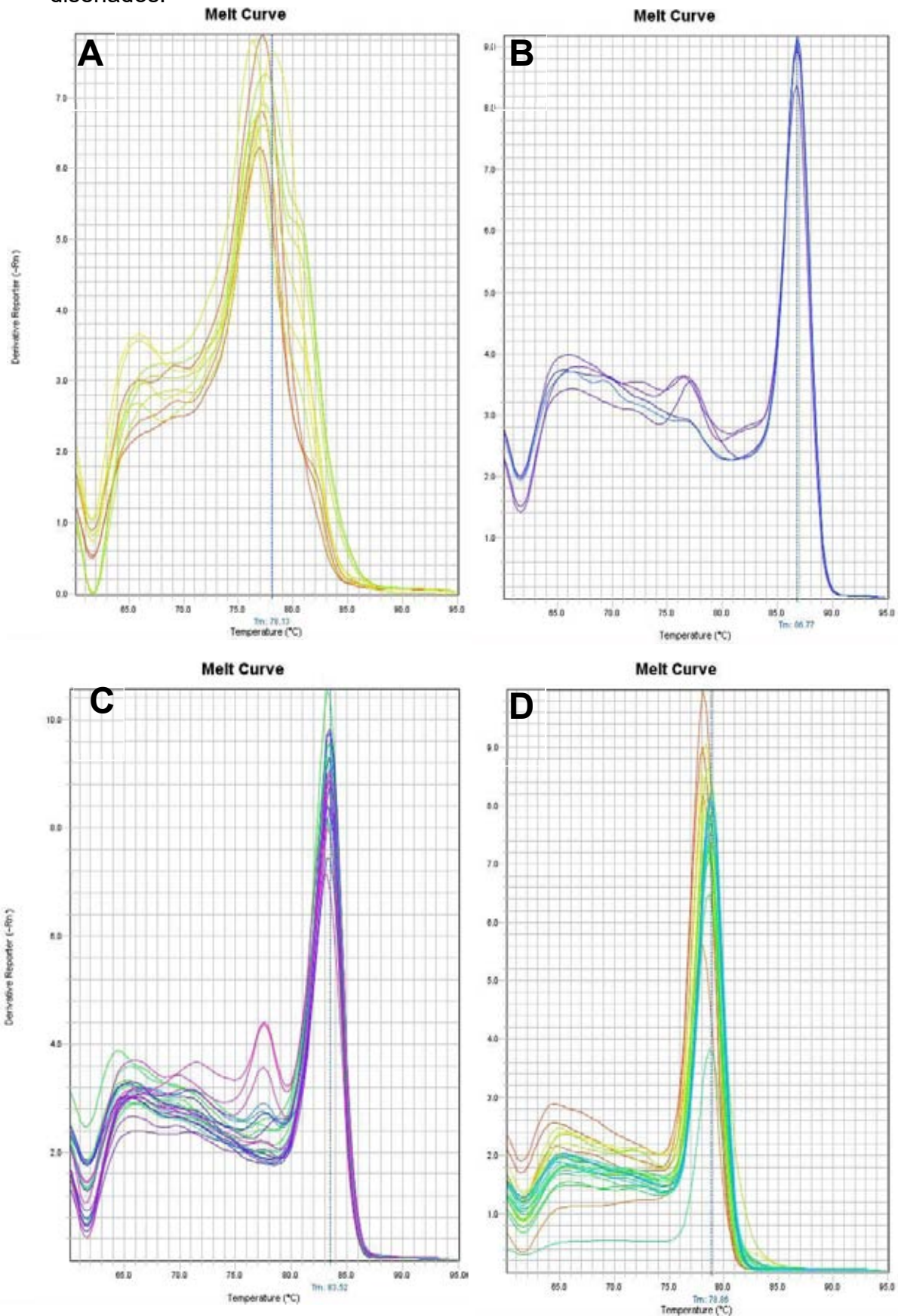
AAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTGCTCGAGA
TCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTG

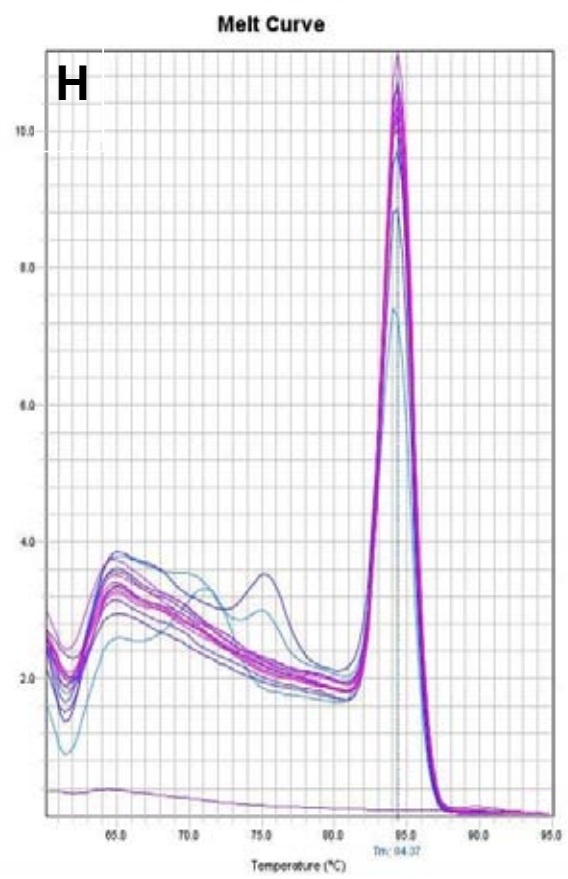
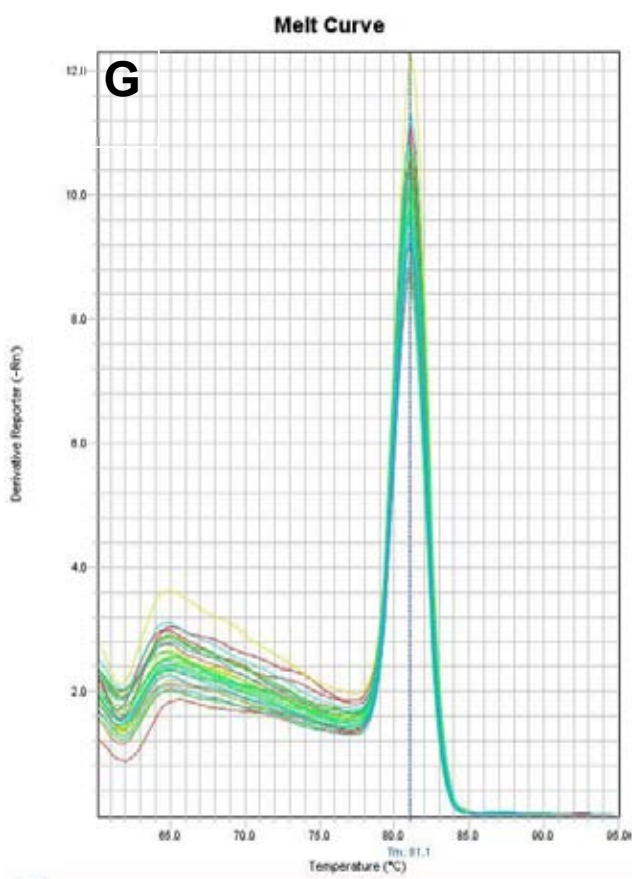
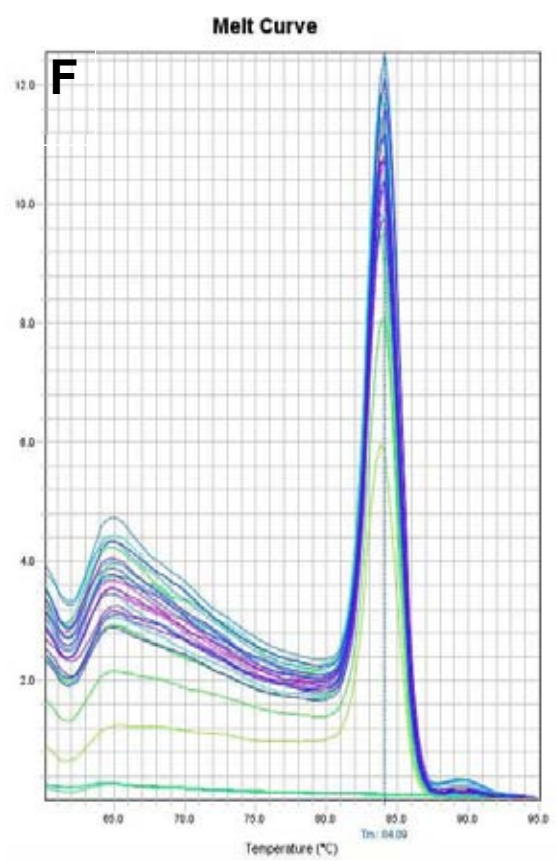
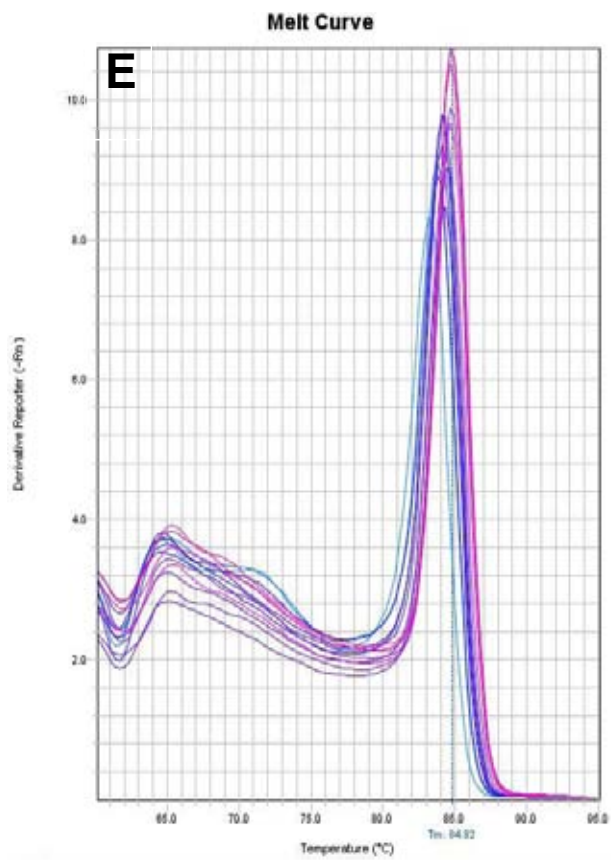
Actina42a

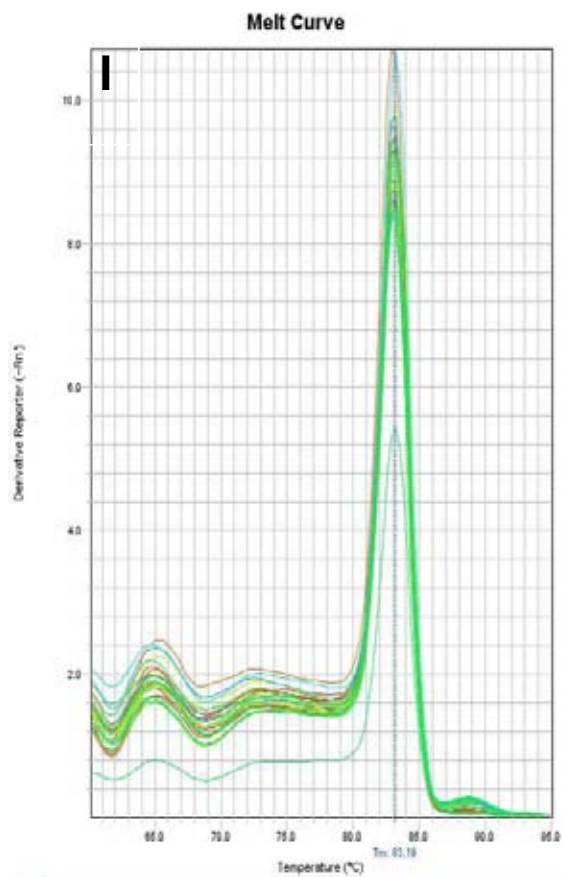
GTCCCTGGAGAAGTCGTACGAGTTGCCCGATGGACAGGTCATCACCATCGGAA
ATGAGCGATTCCGTTGCCCGAATCGCTGTTCCAGCCGTCGTTCCCTCGGCATG
GAGGCCTGTGGCATTACGAGACCACCTACAACCTCAATCATGAAGTGTGACGTC
GACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACACTGTGC

Anexo 3

Curvas de disociación de los productos de la qRT-PCR usando los primers diseñados.







Anexo 4

Valores promedio de los ct, Δ ct y $\Delta\Delta$ ct de las reacciones qRT-PCR correspondientes a la cepa flare³ en cada uno de los tratamientos.

Primer experimento

Tratamiento	Gen	promedio de los valores ct	Promedio de los valores ct de <i>actina42a</i>	Δ ct (Gen de interes-gen control)	$\Delta\Delta$ ct (Δ ct- Δ ct _{control})	Niveles de expresion relativo a <i>actina42a</i> ($2^{\Delta\Delta$ ct)
Control	<i>Cyp6g1</i>	26.58	21.03	5.55	0.00	1
	<i>Cyp6a2</i>	28.86	21.03	7.83	0.00	1
	<i>hsp60</i>	29.15	21.03	8.12	0.00	1
	<i>hsp70</i>	23.76	21.03	2.73	0.00	1
	<i>grim</i>	21.95	17.16	4.78	0.00	1
	<i>hid</i>	20.51	17.16	3.35	0.00	1
	<i>reaper</i>	25.52	17.16	8.36	0.00	1
	<i>Dmp53</i>	28.38	21.03	7.35	0.00	1
Fenobarbital	<i>Cyp6g1</i>	26.44	21.99	4.45	-1.10	2.14
	<i>Cyp6a2</i>	24.65	21.99	2.66	-5.17	35.90
	<i>hsp60</i>	28.19	21.99	6.20	-1.92	3.78
	<i>hsp70</i>	25.47	21.99	3.48	0.75	0.60
	<i>grim</i>	18.92	20.08	-1.16	-5.95	61.65
	<i>hid</i>	21.90	20.08	1.81	-1.53	2.90
	<i>reaper</i>	26.64	20.08	6.56	-1.80	3.49
	<i>Dmp53</i>	27.28	21.99	5.29	-2.06	4.16
Zearalenona	<i>Cyp6g1</i>	25.85	20.77	5.08	-0.47	1.39
	<i>Cyp6a2</i>	27.62	20.77	6.85	-0.98	1.97
	<i>hsp60</i>	25.25	20.77	4.48	-3.65	12.51
	<i>hsp70</i>	22.81	20.77	2.03	-0.70	1.62
	<i>grim</i>	18.71	16.25	2.46	-2.33	5.01
	<i>hid</i>	24.96	16.25	8.70	5.36	0.02
	<i>reaper</i>	22.03	16.25	5.77	-2.59	6.00
	<i>Dmp53</i>	27.74	20.77	6.97	-0.39	1.31
H ₂ O ₂	<i>Cyp6g1</i>	24.69	21.94	2.75	-2.80	6.97
	<i>Cyp6a2</i>	29.16	21.94	7.23	-0.60	1.52
	<i>hsp60</i>	26.15	21.94	4.21	-3.91	15.05
	<i>hsp70</i>	23.47	21.94	1.53	-1.20	2.30
	<i>grim</i>	19.62	17.45	2.17	-2.62	6.13
	<i>hid</i>	17.91	17.45	0.46	-2.88	7.38
	<i>reaper</i>	23.66	17.45	6.21	-2.15	4.43
	<i>Dmp53</i>	28.62	21.94	6.68	-0.67	1.59

Segundo experimento

Tratamiento	Gen	promedio de los valores ct	Promedio de los valores ct de <i>actina42a</i>	Δ ct (Gen de interes-gen control)	$\Delta\Delta$ ct (Δ ct- Δ ct _{control})	Niveles de expresion relativo a <i>actina42a</i> ($2^{-\Delta\Delta$ ct)
Control	<i>Cyp6g1</i>	27.84	22.44	5.40	0.00	1
	<i>Cyp6a2</i>	30.07	22.44	7.63	0.00	1
	<i>hsp60</i>	28.22	22.44	5.78	0.00	1
	<i>hsp70</i>	25.92	22.44	3.48	0.00	1
	<i>grim</i>	20.46	20.10	0.35	0.00	1
	<i>hid</i>	23.57	20.10	3.46	0.00	1
	<i>reaper</i>	27.75	20.10	7.64	0.00	1
	<i>Dmp53</i>	29.62	22.44	7.18	0.00	1
Fenobarbital	<i>Cyp6g1</i>	25.79	22.97	2.82	-2.58	5.97
	<i>Cyp6a2</i>	25.82	22.97	2.85	-4.77	27.32
	<i>hsp60</i>	25.87	22.97	2.90	-2.87	7.32
	<i>hsp70</i>	26.29	22.97	3.33	-0.15	1.11
	<i>grim</i>	17.86	17.40	0.46	0.11	0.93
	<i>hid</i>	24.76	17.40	7.36	3.90	0.07
	<i>reaper</i>	24.85	17.40	7.45	-0.19	1.14
	<i>Dmp53</i>	29.26	22.97	6.29	-0.89	1.85
Zearalenona	<i>Cyp6g1</i>	23.57	20.74	2.83	-2.57	5.92
	<i>Cyp6a2</i>	27.57	20.74	6.83	-0.80	1.74
	<i>hsp60</i>	24.59	20.74	3.85	-1.93	3.80
	<i>hsp70</i>	23.36	20.74	2.62	-0.85	1.81
	<i>grim</i>	19.30	16.35	2.96	2.60	0.16
	<i>hid</i>	20.50	16.35	4.15	0.69	0.62
	<i>reaper</i>	21.66	16.35	5.31	-2.33	5.04
	<i>Dmp53</i>	26.49	20.74	5.75	-1.43	2.69
H ₂ O ₂	<i>Cyp6g1</i>	26.26	21.13	5.13	-0.27	1.21
	<i>Cyp6a2</i>	28.70	21.13	7.57	-0.06	1.04
	<i>hsp60</i>	27.56	21.13	6.43	0.65	0.64
	<i>hsp70</i>	22.85	21.13	1.72	-1.76	3.38
	<i>grim</i>	20.47	18.70	1.78	1.43	0.37
	<i>hid</i>	22.25	18.70	3.56	0.09	0.94
	<i>reaper</i>	25.19	18.70	6.50	-1.15	2.22
	<i>Dmp53</i>	29.61	19.94	9.67	2.49	0.18

Tabla 5. Valores promedio de los ct, Δ ct y $\Delta\Delta$ ct de las reacciones qRT-PCR correspondientes a la cepa Oregon-flare³ en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Gen	promedio de los valores ct	Promedio de los valores ct de <i>actina42a</i>	Δ ct (Gen de interes-gen control)	$\Delta\Delta$ ct (Δ ct- Δ ct _{control})	Niveles de expresion relativo a <i>actina42a</i> ($2^{\Delta\Delta$ ct)
Control	<i>Cyp6g1</i>	20.81	19.06	1.75	0.00	1
	<i>Cyp6a2</i>	28.11	19.06	9.05	0.00	1
	<i>hsp60</i>	23.96	19.08	4.87	0.00	1
	<i>hsp70</i>	19.51	19.06	0.45	0.00	1
	<i>grim</i>	23.56	19.08	4.48	0.00	1
	<i>hid</i>	20.18	19.08	1.10	0.00	1
	<i>reaper</i>	25.02	19.08	5.94	0.00	1
	<i>Dmp53</i>	25.52	19.08	6.44	0.00	1
Fenobarbital	<i>Cyp6g1</i>	22.61	20.39	2.22	0.47	0.72
	<i>Cyp6a2</i>	22.58	20.79	1.79	-7.26	153.47
	<i>hsp60</i>	23.66	20.39	3.27	-1.60	3.03
	<i>hsp70</i>	21.74	20.39	1.34	0.89	0.54
	<i>grim</i>	23.80	20.39	3.41	-1.07	2.10
	<i>hid</i>	28.15	20.39	7.75	6.66	0.01
	<i>reaper</i>	27.75	20.39	7.36	1.42	0.37
	<i>Dmp53</i>	25.17	20.39	4.78	-1.66	3.17
Zearalenona	<i>Cyp6g1</i>	23.49	19.99	3.50	1.75	0.30
	<i>Cyp6a2</i>	24.54	19.99	4.55	-4.51	22.74
	<i>hsp60</i>	23.88	19.74	4.15	-0.73	1.66
	<i>hsp70</i>	22.00	19.99	2.00	1.55	0.34
	<i>grim</i>	23.17	19.74	3.43	-1.05	2.07
	<i>hid</i>	23.77	19.74	4.04	2.94	0.13
	<i>reaper</i>	25.43	19.74	5.70	-0.24	1.18
	<i>Dmp53</i>	25.68	19.74	5.94	-0.50	1.41
H ₂ O ₂	<i>Cyp6g1</i>	18.41	16.38	2.03	0.28	0.82
	<i>Cyp6a2</i>	23.13	16.38	6.75	-2.31	4.95
	<i>hsp60</i>	20.69	16.65	4.05	-0.83	1.77
	<i>hsp70</i>	20.92	16.38	4.54	4.08	0.06
	<i>grim</i>	24.24	16.65	7.59	3.11	0.12
	<i>hid</i>	22.01	16.65	5.36	4.26	0.05
	<i>reaper</i>	24.17	16.65	7.53	1.59	0.33
	<i>Dmp53</i>	23.67	16.65	7.03	0.59	0.67

Segundo experimento

Tratamiento	Gen	promedio de los valores ct	Promedio de los valores ct de <i>actina42a</i>	Δ ct (Gen de interes-gen control)	$\Delta\Delta$ ct (Δ ct- Δ ct _{control})	Niveles de expresion relativo a <i>actina42a</i> ($2^{\Delta\Delta$ ct)
Control	<i>Cyp6g1</i>	21.82	19.03	2.79	0.00	1
	<i>Cyp6a2</i>	24.07	19.03	5.04	0.00	1
	<i>hsp60</i>	24.66	19.21	5.44	0.00	1
	<i>hsp70</i>	20.52	19.03	1.49	0.00	1
	<i>grim</i>	24.97	19.21	5.76	0.00	1
	<i>hid</i>	21.25	19.21	2.03	0.00	1
	<i>reaper</i>	26.56	19.21	7.35	0.00	1
	<i>Dmp53</i>	26.51	19.21	7.30	0.00	1
Fenobarbital	<i>Cyp6g1</i>	22.89	21.15	1.74	-1.05	2.07
	<i>Cyp6a2</i>	23.75	21.15	2.60	-2.44	5.42
	<i>hsp60</i>	24.06	20.83	3.23	-2.21	4.63
	<i>hsp70</i>	22.75	21.15	1.60	0.10	0.93
	<i>grim</i>	24.88	20.83	4.04	-1.72	3.28
	<i>hid</i>	26.51	20.83	5.68	3.65	0.08
	<i>reaper</i>	27.13	20.83	6.30	-1.05	2.07
	<i>Dmp53</i>	27.36	20.83	6.53	-0.77	1.71
Zearalenona	<i>Cyp6g1</i>	21.03	20.27	0.76	-2.03	4.07
	<i>Cyp6a2</i>	26.73	20.27	6.46	1.42	5.42
	<i>hsp60</i>	24.67	20.00	4.67	-0.77	1.71
	<i>hsp70</i>	22.30	20.27	2.03	0.53	0.69
	<i>grim</i>	24.82	20.00	4.82	-0.94	1.92
	<i>hid</i>	21.08	20.00	1.08	-0.95	1.93
	<i>reaper</i>	27.32	20.00	7.32	-0.03	1.02
	<i>Dmp53</i>	26.12	20.00	6.12	-1.18	2.27
H ₂ O ₂	<i>Cyp6g1</i>	23.99	20.59	3.40	0.61	0.66
	<i>Cyp6a2</i>	26.73	20.59	6.14	1.09	0.47
	<i>hsp60</i>	26.65	21.36	5.29	-0.16	1.11
	<i>hsp70</i>	23.72	20.59	3.13	1.64	0.32
	<i>grim</i>	26.36	21.36	5.01	-0.75	1.68
	<i>hid</i>	25.48	21.36	4.12	2.09	0.23
	<i>reaper</i>	29.12	21.36	7.76	0.41	0.75
	<i>Dmp53</i>	27.31	21.36	5.95	-1.34	2.54

Anexo 5

Valores promedio del de la expresión relativa

Nivel de expresión génica basal en las cepas

valores de expresión relativa de los genes de interés en ambas cepas de *Drosophila*. Se usaron los datos de larvas de *flare*³ tratadas con agua para normalizar los datos, al ser esta la cepa en la que se reportan niveles moderados de expresión de Cyp450s.

Marcadores	<i>flare</i> ³			<i>Oregon-flare</i> ³		
	Promedio	Error medio estándar	Numero de datos	Promedio	Error medio estándar	Numero de datos
<i>Cyp6g1</i>	1.17	0.45	3	3.19	1.71	3
<i>Cyp6a2</i>	1.03	0.17	3	4.39	0.49	3
<i>hsp60</i>	2.40	0.70	3	3.07	0.41	3
<i>hsp70</i>	1.03	0.19	3	2.36	1.40	3
<i>grim</i>	1.80	1.24	3	0.10	0.05	3
<i>hid</i>	2.01	1.42	3	0.35	0.27	3
<i>reaper</i>	1.00	0.06	3	0.46	0.00	3
<i>Dmp53</i>	2.84	0.92	3	0.72	0.23	2

Nivel de expresión génica entre tratamientos

Promedios y valores del error medio estándar de la expresión relativa de los genes de interés en la cepa *flare*³ y *Oregon-flare*³ en cada uno de los tratamientos

Cepa *flare*³

Marcadores	Fenobarbital			zearalenona			Peróxido		
	Promedio	Error medio estándar	numero de datos	Promedio	Error medio estándar	numero de datos	Promedio	Error medio estándar	numero de datos
<i>Cyp6g1</i>	0.8117	0.06584	3	3.39	1.335	3	1.271	0.8855	3
<i>Cyp6a2</i>	44.02	8.834	3	1.853	0.06734	3	1.792	0.4107	3
<i>hsp60</i>	1.347	0.4842	3	2.961	0.4675	3	1.104	0.6758	3
<i>hsp70</i>	0.2894	0.04397	3	1.714	0.05396	3	1.019	0.2218	3
<i>grim</i>	1.408	1.074	3	0.5364	0.3718	3	0.5413	0.2233	3
<i>hid</i>	0.5207	0.49	3	0.3723	0.2492	3	5.152	4.135	3
<i>reaper</i>	0.5173	0.199	3	5.914	0.09069	3	1.185	0.2755	3
<i>Dmp53</i>	0.7708	0.1629	3	1.956	0.4013	3	0.244	0.08675	3

Cepa Oregon-flare³

Marcadores	Fenobarbital			Zearalenona			Peróxido		
	Promedio	Error medio estándar	numero de datos	Promedio	Error medio estándar	numero de datos	Promedio	Error medio estándar	numero de datos
<i>Cyp6g1</i>	1.228	0.3429	3	1.823	1.147	3	0.6753	0.05012	3
<i>Cyp6a2</i>	14.51	5.11	3	10.36	6.233	3	0.7787	0.1211	3
<i>hsp60</i>	1.826	0.3663	3	1.682	0.01458	3	0.6585	0.03472	3
<i>hsp70</i>	0.8585	0.3571	3	0.5062	0.1015	3	0.2341	0.1515	3
<i>Grim</i>	3.07	1.632	3	1.991	0.04388	3	0.3712	0.01619	3
<i>Hid</i>	1.966	0.9345	3	0.8554	0.5497	3	6.749	2.286	3
<i>Reaper</i>	1.216	0.2	3	1.1	0.04636	3	0.6788	0.06259	3
<i>Dmp53</i>	1.594	0.7986	3	1.822	0.247	3	0.6676	0.005177	3