



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



PERFILES DE EXPRESIÓN DE ALGUNOS *Cyp450s*
EN LARVAS (ESTADIO III) DE *Drosophila*
melanogaster (ARTRÓPODA: DíPTERA)
TRATADAS CON 4-NQO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

RAMÍREZ PEREZ SONIA ARIZBETH

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Elías Piedra Ibarra



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2018



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.

*“En la investigación es incluso más importante
el proceso que el logro mismo”*

- Emilio Muñoz

Dedicada a la memoria de mi tío Fidel Pérez y mi abuela Ricarda Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría agradecer principalmente a mis padres **Guadalupe Pérez y Alfonso Ramírez** por todos sus esfuerzos para darme la oportunidad de concluir una carrera, por saberme guiar en cada paso que di; este logro es de ustedes. ¡Los quiero!*

También me gustaría expresar mi gratitud a una serie de personas que contribuyeron directa o indirectamente durante este proceso:

*A mi asesor, el **Dr. Elías Piedra** por haberme adoptado en el laboratorio, por concederme la posibilidad de aprender lo que ahora sé y por su apoyo en los malos momentos. A mis sinodales, los **Mtros. Irma Dueñas, Eugenia Heres, Laura Castañeda y Luis Santos** por sus valiosas críticas constructivas, por la realización de los seminarios y congresos. En general, gracias a los cinco porque se convirtieron en mi familia académica.*

*A los **Mtros. Rafael Quintanar y Josefina Vázquez** por siempre brindarnos recursos alimenticios para subsistir en el laboratorio. Hicieron amena mi estancia, "Cinthia" se los agradece también.*

*Reconozco el apoyo incondicional de **Rafael Ramírez** porque estuvo en las buenas y, más aún, en las malas. Gracias por el tratamiento agudo con cafeína y por todos los gratos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.*

*A mis compañeros, **Anabel Ruíz, Tomás Torres y Brenda Gómez** porque sin ustedes no hubiera sido tan, tan divertido, ya sean, los congresos o las horas en el laboratorio mientras corrían las PCR's.*

*Y por último, pero no menos importante, agradezco a la **CFB. Mariana Ruiz** y al **Mtro. Mauro López** por ser parte importante de mi formación y por alentarme.*

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Índice de gráficas	VI
Lista de abreviaturas	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Metabolismo xenobiótico	2
Citocromos P450	3
<i>Cyp450s</i> homólogos en <i>Homo sapiens</i> y <i>D. melanogaster</i>	5
<i>Drosophila melanogaster</i> . Un buen modelo en estudios de genotoxicidad	7
4-Nitroquinolina-1-Óxido (4-NQO)	8
Inductores clásicos de los <i>Cyp450s</i> de <i>D. melanogaster</i>	9
Fenobarbital (FBB)	9
Cafeína (CF)	9
ANTECEDENTES	11
<i>Cyp450s</i> en larvas de tercer estadio (L3) de <i>D. melanogaster</i> .	11
<i>Cyp450s</i> regulados por FBB y/o CF en <i>D. melanogaster</i>	11
Toxicidad del 4-NQO en <i>D. melanogaster</i>	12
Genotoxicidad del 4-NQO en <i>Homo sapiens</i>	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
General	13
Particulares	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Químicos	14
Biológicos	14
Verificación de las secuencias de <i>Cyp450s</i> en <i>D. melanogaster</i>	14
Cultivo y propagación de <i>D. melanogaster</i>	15
Diseño experimental	15
Diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos de <i>Cyp450s</i>	16
Normalización de las condiciones de amplificación semicuantitativa de los transcritos de <i>Cyp450s</i> por PCR acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)	16

Determinación semicuantitativa de los transcritos de <i>Cyp450s</i> -----	17
Análisis densitométrico de los transcritos de <i>Cyp450s</i> (<i>GelQuant.NET</i>) -----	17
Análisis estadístico-----	17
RESULTADOS -----	19
Miembros de la familia Citocromo P450 de <i>D. melanogaster</i> -----	19
Secuencias e identidad de los oligonucleótidos diseñados para <i>Cyp450s</i> -----	21
Normalización de las condiciones de amplificación semicuantitativa de los transcritos de <i>Cyp450s</i> por RT-PCR-----	23
Determinación semicuantitativa de los transcritos de <i>Cyp450s</i> -----	25
Análisis densitométrico de los transcritos de <i>Cyp450s</i> (<i>GelQuant.NET</i>) -----	30
DISCUSIÓN -----	39
Miembros de la familia <i>Cyp450</i> de <i>D. melanogaster</i> -----	39
Oligonucleótidos diseñados para <i>Cyp450s</i> -----	39
Cambios en la expresión relativa de 15 <i>Cyp450s</i> en L3 (72 ±4h) de <i>D. melanogaster</i> después del tratamiento con cinco Xbs. -----	40
a) Determinación semicuantitativa de los transcritos de <i>Cyp450s</i> . -----	40
b) Análisis densitométrico de los transcritos de <i>Cyp450s</i> (<i>GelQuant.NET</i>) -----	40
4-NQO-----	40
Controles negativos -----	40
4-NQO contra controles negativos -----	41
Controles positivos -----	42
CONCLUSIONES -----	44
REFERENCIAS -----	45
ANEXOS -----	51
ANEXO I: Fase II del MX -----	51
ANEXO II: Matriz de distancia génica -----	52
ANEXO III: Productos de la secuenciación de los <i>Cyp450s</i> diseñados-----	53
ANEXO IV: Secuencias consenso -----	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Cyp450s</i> empleados en el presente estudio y algunos compuestos (Xbs y endógenos) que los regulan. Estudios realizados en L3 de <i>D. melanogaster</i> -----	10
Tabla 2. Identidad media (%) entre los miembros de cada familia de <i>Cyp450s</i> de <i>D. melanogaster</i> -----	19
Tabla 3. Relación de los 16 genes empleados (constitutivo y <i>Cyp450s</i>) de <i>D. melanogaster</i> . En todos los casos el tamaño de los amplicones fue verificado experimentalmente -----	21
Tabla 4. Porcentaje de identidad de los oligonucleótidos de <i>Cyp450s</i> diseñados. Parámetros obtenidos de la base de datos <i>NCBI</i> -----	22
Tabla 5. Concentración y pureza del RNA _t . Incluye los valores de ambas extracciones (A, superior y B, inferior) de RNA _t de L3 de <i>D. melanogaster</i> -----	23
Tabla 6. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> en <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ± 4h) tratadas con 4-NQO 2 mM. Intensidad del amplicón obtenida mediante <i>GelQuant.NET</i> -----	30
Tabla 7. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> en <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ±4 h) tratadas con acetona 2 %. Intensidad del amplicón obtenida mediante <i>GelQuant.NET</i> . -----	31
Tabla 8. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> en <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ± 4h) tratadas con agua miliQ. Intensidad del amplicón obtenida mediante <i>GelQuant.NET</i> -----	32
Tabla 9. Diferencias en el nivel de expresión (DNE) de los <i>Cyp450s</i> de <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ± 4h) tratadas con agua miliQ, acetona 2 % y 4-NQO 2 mM. Se indica con asterisco la media con diferencias significativas -----	34
Tabla 10. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> de <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ± 4h) tratadas con FBB 1 mM. Intensidad del amplicón obtenida mediante <i>GelQuant.NET</i> -----	35
Tabla 11. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> de <i>D. melanogaster</i> . L3 (72 ±4 h) tratadas con CF 7.7 mM. Intensidad del amplicón obtenida mediante <i>GelQuant.NET</i> -----	36
Tabla 12. Matriz de diferencias de medias (\bar{Y}) de los controles positivos contra agua miliQ. Prueba de Fisher o de la Diferencia Mínima Significativa ($\alpha= 0.025$)-----	37
Tabla 13. Relación de la expresión relativa de algunos <i>Cyp450s</i> (basada en la cantidad relativa media de transcritos) en L3 (72 ±4h) de <i>D. melanogaster</i> expuestas a cinco Xbs -----	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura 3D del <i>Cyp6g1</i> de <i>D. melanogaster</i> -----	3
Figura 2. Ciclo catalítico de los CYP450s -----	4
Figura 3. Cromosomas de <i>D. melanogaster</i> -----	5
Figura 4. Estructura de una L3 (72 ± 4 h) de <i>D. melanogaster</i> . En negritas los sitios donde se lleva a cabo el MX -----	7
Figura 5. Estructura del 4-NQO y sus metabolitos -----	8
Figura 6. Estructura de los últimos metabolitos del 4-NQO, generados por la acetilación del 4-HAQO -----	8
Figura 7. Reconstrucción filogenética de las familias Cyp4, Cyp6, Cyp9, Cyp12 y Cyp28 de <i>D. melanogaster</i> . Elaborada por el método UPGMA y distancia p (MEGA 5), en base a las secuencias de aminoácidos de 61 <i>Cyp450s</i> . Los 15 <i>Cyp450s</i> que fueron seleccionados para nuestro trabajo se indican con triángulo negro -----	20
Figura 8. Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos diseñados y DNAg de L3 de <i>D. melanogaster</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles M: Marcador de peso molecular; 1: <i>Actina 42A</i> ; 2: <i>Cyp4d1</i> ; 3: <i>Cyp4d2</i> ; 4: <i>Cyp4d14</i> ; 5: <i>Cyp4e2</i> ; 6: <i>Cyp6a2</i> ; 7: <i>Cyp6a8</i> ; 8: <i>Cyp6a17</i> ; 9: <i>Cyp623</i> ; 10: <i>Cyp6d5</i> ; 11: <i>Cyp6g1</i> ; 12: <i>Cyp6w1</i> ; 13: <i>Cyp9b2</i> ; 14: <i>Cyp9f2</i> ; 15: <i>Cyp12d1</i> ; 16: <i>Cyp28a5</i> . -----	22
Figura 9. Integridad del RNA ^t de <i>D. melanogaster</i> en gel de agarosa al 1.5 %. Obtenido de aproximadamente 50 L3 (72 ± 4 h) tratadas con 1: agua miliQ; 2: FBB 1 mM; 3: CF 7.7 mM; 4: 4-NQO 2 mM y 5: acetona 2 %. M: Marcador de peso molecular (Experimento A) -----	23
Figura 10. Normalización de las condiciones de amplificación por RT- PCR (15- 30 ciclos) usando gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 (72 ± 4 h) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con 4-NQO 2 mM del experimento A (ciclo óptimo 27) -----	24
Figura 11. Amplicones de transcritos de <i>Cyp450s</i> de L3 (72 ± 4 h) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con 4-NQO 2 mM. Dos experimentos independientes: A (27 ciclos) y B (30 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: <i>Actina 42A</i> ; 2: <i>Cyp4d1</i> ; 3: <i>Cyp4d2</i> ; 4: <i>Cyp4d14</i> ; 5: <i>Cyp4e2</i> ; 6: <i>Cyp6a2</i> ; 7: <i>Cyp6a8</i> ; 8: <i>Cyp6a17</i> ; 9: <i>Cyp6a23</i> ; 10: <i>Cyp6d5</i> ; 11: <i>Cyp6g1</i> ; 12: <i>Cyp6w1</i> ; 13: <i>Cyp9b2</i> ; 14: <i>Cyp9f2</i> ; 15: <i>Cyp12d1</i> y 16: <i>Cyp28a5</i> -----	25
Figura 12. Amplicones de transcritos de <i>Cyp450s</i> de L3 (72 ± 4 h) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con acetona 2%. Dos experimentos independientes: A (29 ciclos) y B (29 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: <i>Actina 42A</i> ; 2: <i>Cyp4d1</i> ; 3: <i>Cyp4d2</i> ; 4:	

Cyp4d14; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5*. -----26

Figura 13. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72±4h) de *D. melanogaster* tratadas con agua miliQ. Dos experimentos independientes: A (29 ciclos) y B (27 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5* -----27

Figura 14. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72±4h) de *D. melanogaster* tratadas con FBB 1 mM. Dos experimentos independientes: A (28 ciclos) y B (28 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5* -----28

Figura 15. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72±4h) de *D. melanogaster* tratadas con CF 7.7 mM. Dos experimentos independientes: A (26 ciclos) y B (29 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5* -----29

Figura 16. Tipos de reacciones de conjugación (Fase II), según el mecanismo -----51

Figura 17. Esquema general del metabolismo xenobiótico-----51

Figura 18. Matriz de distancia génica. Elaborada mediante *MEGA 5* (distancia p) en base a las secuencias de aminoácidos de 61 *Cyp450s* (Familias *Cyp4*, *Cyp6*, *Cyp9*, *Cyp12* y *Cyp28*) de *D. melanogaster*-----52

Figura 19. Secuencia completa del *Cyp4d1* de *D. melanogaster*. Amplicón generado por el oligonucleótido directo (*Cyp4d1* Fw) -----53

Figura 20. Secuencia parcial del *Cyp4d1* de *D. melanogaster*. Amplicón generado por el oligonucleótido reverso (*Cyp4d1* Rv)-----53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450</i> en relación al gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 ($72 \pm 4h$) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con 4-NQO 2 mM-----	30
Gráfica 2. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450</i> en relación al gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 ($72 \pm 4h$) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con acetona 2 %-----	31
Gráfica 3. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450</i> en relación al gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 ($72 \pm 4h$) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con agua miliQ -----	32
Gráfica 4. Comparación de las cantidades relativas de los transcritos de <i>Cyp450s</i> . L3 tratadas con agua miliQ, acetona 2 % y 4-NQO 2 mM-----	33
Gráfica 5. Diferencias entre 4-NQO 2 mM y el control negativo agua miliQ. Se indica con asterisco la media que resultó significativa-----	33
Gráfica 6. Diferencias entre 4-NQO 2 mM y el control negativo acetona 2%. Sin diferencias significativas-----	33
Gráfica 7. Diferencias entre ambos controles negativos. Se indica con asterisco la media que resultó significativa -----	34
Gráfica 8. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> en relación al gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 ($72 \pm 4h$) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con FBB 1 mM -----	35
Gráfica 9. Cantidad relativa de transcritos de <i>Cyp450s</i> en relación al gen constitutivo <i>actina 42A</i> . L3 ($72 \pm 4h$) de <i>D. melanogaster</i> tratadas con CF 7.7 mM -----	36
Gráfica 10. Comparación de las cantidades relativas de los transcritos de <i>Cyp450s</i> . L3 ($72 \pm 4h$) tratadas con FBB 1 mM, CF 7.7 mM y 4-NQO 2 mM, contra las tratadas con agua miliQ -----	37

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Experimento independiente A	pb: Pares de bases
ANOVA: Análisis de varianza	PCF: Pentaclorofenol
B: Experimento independiente B	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CAS: <i>Chemical Abstract Service</i>	RNA: Ácido ribonucleico
cDNA: DNA complementario	RNA_m: RNA mensajero
CF: Cafeína	RNA_t: RNA total
CH₄O: Metanol	ROS: Especies reactivas de oxígeno
CR: Cantidad/expresión relativa	RT: Transcripción reversa
CYPs: Citocromos P450s	RT-PCR: PCR acoplada a RT
Cyp450: Citocromo P450 (superfamilia)	SMART: Prueba de mutación y recombinación somática
Cyp450s: Citocromos P450s (genes)	ST: Cruza estándar
DIM: Medio instantáneo <i>Drosophila</i>	T_m: Temperatura a la que la mitad de la hebra de DNA se encuentra como doble hélice
DNA: Ácido desoxirribonucleico	UpR: <i>Up regulated</i> , sobreexpresión
DNA_g: DNA genómico	UV: Ultravioleta
DownR: <i>Down regulated</i> , inhibición	Xbs: Xenobióticos
FBB: Fenobarbital	4-HAQO: 4-Hidroxiaminoquinolina-1-Óxido
HB: Cruza de bioactivación elevada	4-NQO: 4-Nitroquinolina-1-Óxido
IA/IB: Intensidad relativa A/B	ΔG: Cambio de la energía de Gibbs de desnaturalización
LC₅₀: Concentración letal media	
L3: Larvas de tercer estadio	
MFO: Oxidasas de función mixta	
MX: Metabolismo xenobiótico	

RESUMEN

En respuesta a condiciones cambiantes o estresantes, los organismos poseen mecanismos de defensa de tipo química como el metabolismo xenobiótico, el cual favorece la eliminación de los compuestos químicos extraños o xenobióticos (Xbs), que pueden ser directos o indirectos, éstos últimos requieren ser activados durante la Fase I, mediante reacciones provocadas por los citocromos P450 (CYPs), para provocar daños en ácidos nucleicos y proteínas, además de, mutaciones tanto en células somáticas como germinales; tal es el caso del 4-NQO, un potente mutágeno, cancerígeno y generador de ROS, que además ha sido reportado mediante la prueba SMART como recombinógeno en ala de *Drosophila melanogaster* (cruzas estándar, ST y bioactivación elevada, HB), y que involucra a los genes *Cyp450s*. *D. melanogaster* ha resultado ser un buen modelo biológico, ya que el 77% de su genoma es homólogo con el de *Homo sapiens*, y se han identificado algunos de los *Cyp450s* que son inducidos por Xbs, en particular por fenobarbital (FBB) y cafeína (CF). En el presente estudio se determinaron los perfiles de expresión de algunos *Cyp450s* de larvas de tercer estadio (L3) expuestas a 4-NQO 2 mM, validando los resultados con lo reportado para FBB 1 mM y CF 7.7 mM. Aproximadamente, 50 L3 de *D. melanogaster* fueron expuestas vía oral mediante medio instantáneo *Drosophila* (DIM) hidratado con 4-NQO 2 mM, y usando dos controles positivos: FBB 1 mM y CF 7.7 mM, y dos controles negativos: acetona 2 % y agua miliQ. Después de extraer el RNAt y diseñar oligonucleótidos específicos para 15 genes *Cyp450s* y para *actina 42A* empleado como gen constitutivo, se normalizaron las condiciones de RT-PCR y se obtuvo la expresión relativa de los mismos. Con 4-NQO 2mM las L3 aumentaron significativamente la expresión relativa de 13 de los 15 *Cyp450s* estudiados; con el control acetona 2 % el incremento también fue significativo para 12 *Cyp450s*, que a pesar de ser un buen disolvente de 4-NQO, éste también resultó un buen inductor de *Cyp450s*. Además, los resultados obtenidos para *Cyp4d1*, *Cyp4d2* y *Cyp9f2*, reportados como posibles genes con función desintoxicante, permitieron confirmar la importancia de éstos en la respuesta a Xbs.

Palabras clave: Metabolismo xenobiótico, xenobióticos, *Cyp450s*, 4-NQO, cafeína, fenobarbital.

INTRODUCCIÓN

Los organismos poseen mecanismos de defensa, de tipo inmune y química, para responder a condiciones cambiantes o estresantes; ambos son inducibles y tienen como resultado la regulación de la expresión génica y/o la síntesis de proteínas (Coutiño, 2011).

Siendo de igual importancia que la inmune pero menos conocida, la defensa química se da mediante el sistema enzimático complejo constituido por tres fases, es decir, el metabolismo xenobiótico (MX) (fuera del metabolismo energético y de síntesis tradicional), que es capaz de favorecer la eliminación de los compuestos químicos extraños, también conocidos como xenobióticos (Xbs), a los cuales los seres vivos están expuestos, se estima que de 1 a 3 millones a lo largo de su vida, y que van desde productos de uso cotidiano hasta contaminantes ambientales, ya sean: fármacos, aditivos de alimentos, cosméticos, detergentes, pesticidas, derivados de la combustión de carburantes, residuos industriales, entre otros (Idle y González, 2007; Coutiño, *op cit*).

Metabolismo xenobiótico

En general, los Xbs son compuestos lipofílicos, no polares, por tanto pueden atravesar membranas biológicas de manera relativamente fácil, su absorción se da por vía de la ingestión, inhalación y ruta epitelial. Pueden ser mutágenos/cancerígenos directos o ser promutágenos/procancerígenos indirectos, éstos últimos requieren ser activados durante la denominada Fase I o de funcionalización, seguida de la Fase II o de conjugación (ANEXO I) del MX, lo que aumenta su solubilidad y favorece la excreción rápida mediante la bilis y la orina (Donato, 2004; Heres y Castañeda, 2009; Rodríguez *et al.*, 2006).

Fase I del MX: Tiene lugar principalmente en el retículo endoplásmico liso, y durante esta fase los Xbs indirectos son modificados por la adición de grupos funcionales polares (hidroxilo, amino, carboxilo, etc.), mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, siendo más frecuentes las de oxidación que, junto con las de reducción, involucran a las oxidasas de función mixta (MFO) o monooxigenasas dependientes de los citocromos P450 (CYP450s) (Donato, *op cit*; Ruíz y Cano, 2013).

Citocromos P450

Identificados y definidos como pigmentos celulares reducidos, unidos a membrana, con un pico de absorbancia a 450 nm (1968) bajo una atmósfera de monóxido de carbono, y masa molecular de entre 45 a 62 kD; constituyen una gran familia de hemoproteínas encontradas en todas las especies, cuyos productos génicos están unidos preferentemente a la región citoplasmática del retículo endoplásmico liso, además de, a la membrana interna de la mitocondria en donde intervienen en la síntesis de colesterol en humanos. Estructuralmente, están conformados por regiones α -hélice y hojas- β que rodean a un grupo hemo (centro catalítico de la enzima) (Figura 1); el extremo C-terminal se encuentra más conservado que el extremo N-terminal y el menor grado de conservación corresponde a las secuencias intermedias, por lo que un 30% de identidad en estas últimas es significativo (Jezequel, 2009; Donato, 2004).

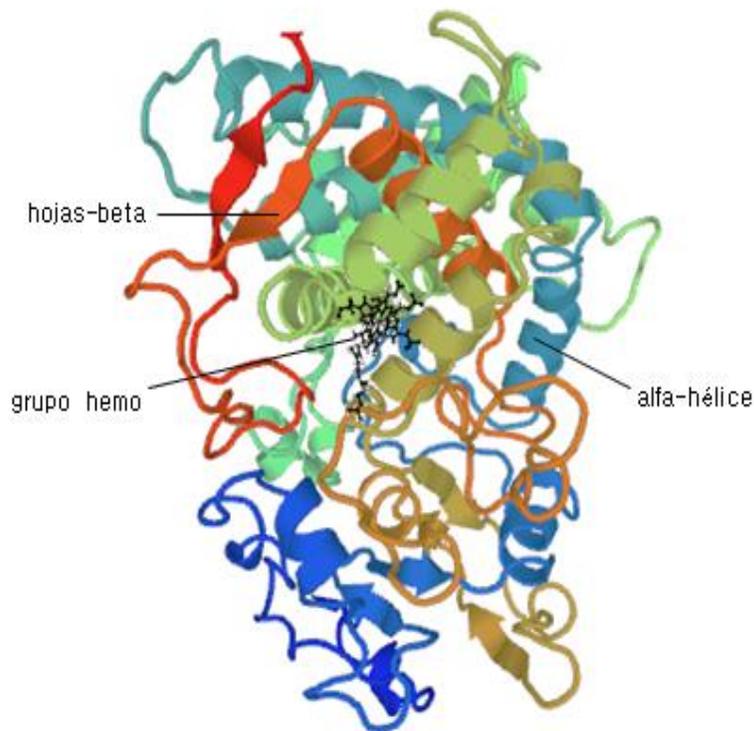


Figura 1. Estructura 3D del *Cyp6g1* de *D. melanogaster*
(Tomada de la base de datos *STRING*)

La nomenclatura de los CYP450s está determinada a partir de la homología estructural: el símbolo CYP (Cyp en *Drosophila* spp) se refiere a la abreviatura de citocromo P450 (en itálica si se trata de un gen), seguido de un número que designa la familia (cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de >40%), una letra que refiere a la subfamilia (>55% de identidad) y por último, otro número que corresponde al gen/proteína en particular (p. e. *CYP3A4* de *Homo sapiens* y *Cyp6g1* de *D. melanogaster*) (Nelson *et al.*, 1993; González-Mendoza, 2007)

Los CYP450s catalizan principalmente reacciones de mono-oxidación, es decir, en presencia de dos electrones y dos protones insertan un átomo de oxígeno en el xenobiótico o sustrato (S): 1) se lleva a cabo la unión hemoproteína-sustrato ($P450^S$), con ello se originan cambios en el estado de spin, en el potencial redox y en el máximo de absorbancia; 2) reducción del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso, donde el Fe^{3+} del grupo prostético hemo pasa a Fe^{2+} por ganancia de un electrón cedido por el cofactor NADPH; 3) unión del oxígeno molecular para formar oxicitocromo P450 ($P450^S Fe^{3+} O_2^-$), que acepta un segundo electrón donado por el citocromo b_5 ; 4) liberación de un átomo de oxígeno en forma de una molécula de agua; 5) el otro átomo de oxígeno, aún unido al centro catalítico, oxida al xenobiótico; y finalmente 6) el xenobiótico hidroxilado (SOH) es liberado del complejo (Figura 2) (Molina-Ortiz *et al.*, 2012).

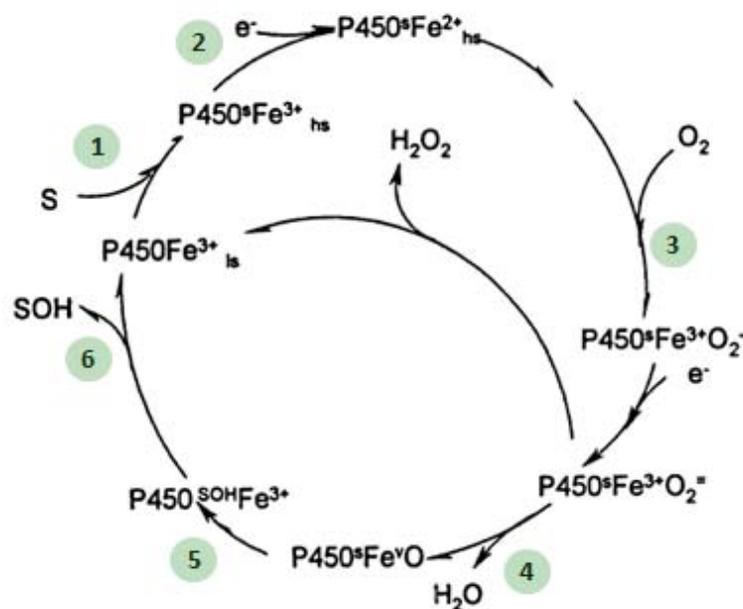


Figura 2. Ciclo catalítico de los CYP450s

Cyp450s* homólogos en *Homo sapiens* y *D. melanogaster

Además de lo ya reportado a cerca del 77 % que comparte el genoma de *D. melanogaster* con *Homo sapiens*, la base de datos del genoma humano GRCh38.p6 (*Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 6*) actualizado en el 2015, incluye 57 genes y 58 pseudogenes (genes que no producen proteínas funcionales) de *Cyp450s* agrupados en 18 familias y 43 subfamilias. Las familias CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4 humanas son las de mayor importancia en el metabolismo oxidativo de la mayoría de los Xbs; *CYP3A4* ha sido el más estudiado porque es responsable de la oxidación metabólica del 44 % de los 110 fármacos analizados, es inducido por barbitúricos y silenciado por antibióticos como la eritromicina, seguido de *CYP2D6* (41 %), *CYP2C19* (26 %), *CYP1A2* (9 %), y *CYP2C9* (4 %) (Coutiño, 2011; Pan *et al.*, 2016). Para el caso de *D. melanogaster*, se reportan 90 genes y 4 pseudogenes en la base de datos *Flybase* (2017) de los cuales se han identificado los esenciales para llevar a cabo procesos endógenos (Familia *Cyp300*), reproductivos (Familias *Cyp4*, *Cyp6*), y sólo algunos *Cyp450s* que participan en el metabolismo de Xbs (Familias *Cyp4*, *Cyp6*, *Cyp9*, *Cyp12*, *Cyp28*). Más de la mitad de estas secuencias de *Cyp450s* se agrupan en sólo dos familias: la *Cyp4* que incluye secuencias homólogas con vertebrados y la *Cyp6* que es específica de insectos. La mayoría de las secuencias están localizadas en el cromosoma 2, y ausentes en los cromosomas Y y 4 de *D. melanogaster* (Figura 3) (Tijet *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2009).

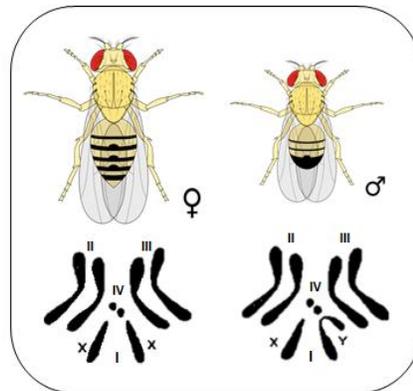


Figura 3. Cromosomas de *D. melanogaster*.

En la base de datos *FlyAtlas* y *Homophila* se encuentran registrados los *Cyp450s* de *D. melanogaster* que presentan alineamientos cercanos (valor e) con *CYPs* de *Homo sapiens*, entre ellos: *Cyp4d1* (9e-11) con *CYP11B1*; *Cyp4d2* (6e-12), *Cyp4d14* (1e-12) y *Cyp12d1* (6e-11) con *CYP2C8*; *Cyp4e2* (4e-11), *Cyp6a8* (5e-12) y *Cyp6g1* (8e-11) con *CYP11A*; *Cyp6w1* (9e-11) con *CYP27B1*; *Cyp6a17* (2e-11) y *Cyp6d5* (8e-11) con *CYP2D6*; *Cyp6a2* (1e-11) y *Cyp6a23* (2e-11) con *CYP11B2*; *Cyp9b2* (9e-12) con *CYP17A1*; *Cyp9f2* (3e-11) con *CYP2E1*; y *Cyp28a5* (2e-11) con *CYP2C9*. En *NCBI HomoloGene* se reporta al *Cyp9b2* con un 32 % de identidad con *CYP3A5* y al *Cyp9f2* con un 33 % de identidad con *CYP3A4* de *Homo sapiens*.

Experimentalmente se ha determinado que *Cyp6g1* es homólogo a *CYP3A4*, que confiere resistencia a insecticidas, tolerancia al metilmercurio, y que es inducido por barbitúricos (p. e. fenobarbital) y/o cafeína (Rand, 2012). En contraste, se han generado modelos homólogos para los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* y *Cyp12d1* de *D. melanogaster* basados en la estructura cristalina del *CYP3A4* de *Homo sapiens*, con el fin de predecir el metabolismo de diferentes insecticidas o de otros compuestos que pueden ser sustratos o inhibidores de estas importantes enzimas (Jones *et al.*, 2010)

***Drosophila melanogaster*: Un buen modelo en estudios de genotoxicidad**

Utilizado desde 1900 en estudios de genética, este modelo biológico ofrece ventajas como un breve ciclo de vida a 25 °C, genera un gran número de organismos, brinda unidades experimentales representativas, su mantenimiento requiere de poco espacio y un medio de cultivo de bajo costo. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, el 77 % de los genes de enfermedades humanas están representados en *D. melanogaster*, para ser exactos, 548 genes según la base de datos *Homophila* (Adams *et al.*, 2000; Abolaji *et al.*, 2013). Además, *D. melanogaster* tiene sitios análogos donde se lleva a cabo el MX: el intestino medio, el cuerpo graso y los túbulos de Malpighi que son equivalentes al hígado y al sistema inmune de vertebrados (Figura 4) (Yang *et al.*, 2007; Good *et al.*, 2014). El empleo de dicho modelo ha permitido identificar compuestos quimiopreventivos, establecer concentraciones subtóxicas, y estudiar compuestos promutágenos o procarcinógenos (Dueñas-García *et al.*, 2005) de importancia médica y experimental como el 4- Nitroquinolina-1-Óxido (4-NQO), fenobarbital y cafeína, entre otros (Heres-Pulido *et al.*, 2004; Willoughby *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006).

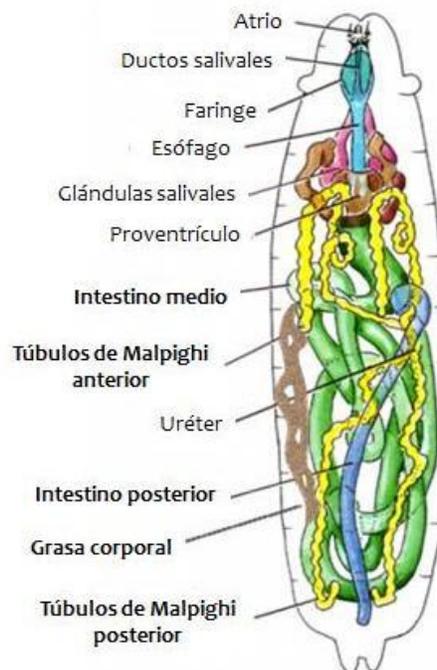


Figura 4. Estructura de una L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster*. En negritas los sitios donde se lleva a cabo el MX.

4-Nitroquinolina-1-Óxido (4-NQO)

El 4-NQO es un compuesto heterocíclico aromático, cuyo efecto mutágeno y cancerígeno se conoce desde 1958, tanto el grupo NO_2 en la posición 4 como el óxido en la posición 1 del anillo de quinolina son necesarios para que los derivados de 4-NQO sean precursores o inductores de cáncer (Nakahara *et al.*, 1957) (Figura 5). Este compuesto fue introducido desde 1973 como modelo de estudio para cáncer escamoso oral (OSCC) (Wallenius y Lekholm, 1973), por generar daño similar al producido por otros cancerígenos presentes en el tabaco, entonces, su importancia radica en estudios de antimutagénesis y desarrollo de terapias para este tipo de cáncer.

Es un xenobiótico indirecto, es decir, durante la Fase I del MX el 4-NQO es reducido en su grupo nitro, lo cual da lugar a tres principales metabolitos: 4-hidroxiaminoquinolina-1-óxido (4-HAQO), 4-aminoquinolina-1-óxido (4-AQO) y 4-aminoquinolina (4-AQ). El 4-HAQO es acetilado, formando así: acetil-4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido o diacetil-4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido (Ac-4HAQO, diAc-4HAQO) (Figura 6), estos últimos metabolitos reaccionan con el DNA formando tres monoadductos covalentes, dos en guanina y uno en adenina: N^2G (dGuo-N2-AQO) > C^8G (dGuo-C8-AQO) > N^6A (dAdo-N6-AQO). Actúa como UV mimético, ya que activa el mismo sistema de reparación del DNA (NER) y genera ROS (Bailleul, 1984; Fronza *et al.*, 1992; Gama, 2010).

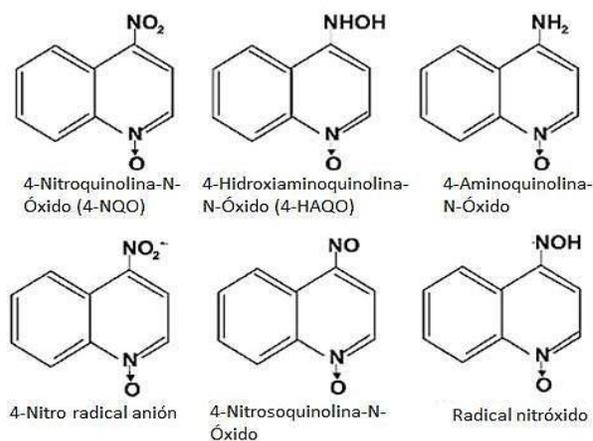


Figura 5. Estructura del 4-NQO y sus metabolitos

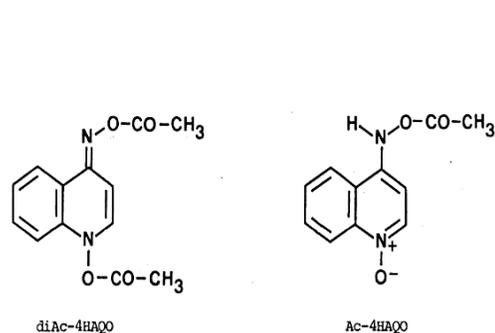


Figura 6. Estructura de los últimos metabolitos del 4-NQO, generados por la acetilación del 4-HAQO.

Inductores clásicos de los *Cyp450s* de *D. melanogaster*

Fenobarbital (FBB). Es un barbitúrico de acción prolongada, hipnótico, antiepiléptico y sedante, y un potente inductor enzimático según el Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría (201). En mamíferos produce cáncer de hígado, donde se ha observado que inhibe la proliferación celular y la síntesis de DNA, produce ROS, provoca la acumulación de 8- hidroxil- 2- deoxiguanosina (8-OHdG) que es un marcador de daño a DNA y causa apoptosis (Kakehashi *et al.*, 2013). En *D. melanogaster*, se han caracterizado los *Cyp450s* que induce el tratamiento por fenobarbital, incluyendo a los genes involucrados en la resistencia al DDT: *Cyp6a2*, *Cyp6a8* y *Cyp6g1*, entre otros *Cyp450s* (Tabla 1).

Cafeína (CF). Es una droga comúnmente utilizada en estudios de desintoxicación ya que es un natural y efectivo pesticida producido por varias especies de plantas. A concentraciones milimolares (mM), de 0.5 mM a 10 mM, tiene efectos citotóxicos, es capaz de inhibir la actividad de la proteína quinasa al anular la respuesta de *checkpoints* durante el ciclo celular, e incrementa la producción de ROS. Es considerada como modelo de vías de desintoxicación, se ha empleado para caracterizar los genes *Cyp450s* que son inducidos en *D. melanogaster*, induce a *Cyp6a8* y sobreexpresa (UpR) a *Cyp6g1*, entre otros *Cyp450s* (Zhuo, 2014) (Tabla 1).

Ambos Xbs producen daños similares y son frecuentemente utilizados como inductores de los *Cyp450s* en *D. melanogaster*.

Tabla 1. Cyp450s empleados en el presente estudio y algunos compuestos (Xbs y endógenos) que los regulan. Estudios realizados en L3 de *D. melanogaster*.

Gen	Compuesto	Referencia
<i>Cyp4d1</i>*	Ecdisona	<i>Flybase</i> (2017); Yang <i>et al.</i> , 2007.*
<i>Cyp4d2</i>*	CH ₄ O	Wang <i>et al.</i> , 2012; Yang <i>et al.</i> , 2007.*
<i>Cyp4d14</i>	FBB CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009. Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Zhuo, 2014.
<i>Cyp4e2</i>	FBB CF CH ₄ O	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009; Giraudo <i>et al.</i> , 2010. Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Giraudo <i>et al.</i> , 2010. Wang <i>et al.</i> , 2012.
<i>Cyp6a2</i>	FBB CF	Chung <i>et al.</i> , 2009; Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Giraudo <i>et al.</i> , 2010. Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Zhuo, 2014.
<i>Cyp6a8</i>	FBB CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009. Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Zhuo, 2014.
<i>Cyp6a17</i>**	FBB PCF	Boey, 2011. Monti, 2014.**
<i>Cyp6a23</i>	FBB	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009.
<i>Cyp6d5</i>	FBB CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009. Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Giraudo <i>et al.</i> , 2010; Zhuo, 2014.
<i>Cyp6g1</i>	FBB y CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009; Giraudo <i>et al.</i> , 2010; Zhuo, 2014.
<i>Cyp6w1</i>	FBB y CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009; Giraudo <i>et al.</i> , 2010; Zhuo, 2014.
<i>Cyp9b2</i>	FBB CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009. Zhuo, 2014.
<i>Cyp9f2</i>*	CH ₄ O	Wang <i>et al.</i> , 2012; Yang <i>et al.</i> , 2007.*
<i>Cyp12d1</i>	FBB y CF	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009; Giraudo <i>et al.</i> , 2010.
<i>Cyp28a5</i>	FBB CF CH ₄ O	Willoughby <i>et al.</i> , 2006; Chung <i>et al.</i> , 2009. Zhuo, 2014. Wang <i>et al.</i> , 2012.

* Posible función desintoxicante ** *Cyp450* poco estudiado

ANTECEDENTES

***Cyp450s* en larvas de tercer estadio (L3) de *D. melanogaster*.**

Los perfiles de expresión del MX en *D. melanogaster*, fueron establecidos en el 2007, Yang y colaboradores confirmaron que el principal sitio de defensa contra DDT corresponde al intestino medio, y mencionan que el cuerpo graso es más extenso en larvas que en adultos, por lo tanto, los genes que son abundantes en dichos tejidos, tales como: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp6g1*, *Cyp28a5*, entre otros, podrían tener un rol significativo en estudios de toxicidad larval.

Chung y colaboradores (2009), establecieron los perfiles de expresión larval de *D. melanogaster* en condiciones normales, obteniendo la expresión en intestino medio, cuerpo graso y/o túbulos de Malpighi de 81 de los 90 *Cyp450s* reportados.

***Cyp450s* regulados por FBB y/o CF en *D. melanogaster*.**

En el 2006, Willoughby y colaboradores reportaron los *Cyp450s* que son regulados por el tratamiento con FBB 1 mM y 10 mM: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*, además de los regulados por CF 7.7 mM en L3 de *D. melanogaster*: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1* y *Cyp12d1*.

De igual manera en el 2006, Kuruganti, determinó mediante PCR tiempo real, los *Cyp450s* que se expresan en adultos de *D. melanogaster*, Canton S al ser expuesta a FBB 4 mM y CF 16 mM. Obtuvo que con ambos se sobreexpresan los mismos *Cyp450s*: *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1* y *Cyp6w1*.

Otro estudio realizado en el 2006, corresponde al trabajo de Sun et al. mediante PCR tiempo real evaluaron la expresión diferencial de 17 genes, entre ellos algunos *Cyp450s*, trabajaron con L3 y adultos de *D. melanogaster*, después de tratar a las L3 con FBB 0.1% por 24 h, fueron inducidos siete *Cyp450s*: *Cyp4d14*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6d5* y *Cyp12d1*.

Toxicidad del 4-NQO en *D. melanogaster*

Mediante la prueba SMART, que permite la detección de pérdida de heterocigosidad, se ha demostrado que el 4-NQO es un potente mutágeno y recombinógeno en larvas de *D. melanogaster* (cruzas estándar, ST y de bioactivación elevada, HB), ya que produce los tres tipos de manchas en ala: manchas individuales pequeñas, manchas individuales grandes y manchas gemelas, lo cual sugiere un daño directo por estrés oxidante, formación de aductos mediante MX, que inducen los sistemas de reparación y conllevan a eventos de recombinación somática, por tanto, que involucra a los *Cyp450s* (Heres-Pulido *et al.*, 2004).

La LC₅₀ de 4-NQO fue 2.10 mM en la cepa *flare* y 3.05 mM en la cepa *Oregon-flare*, las concentraciones fueron probadas en el laboratorio de Toxicología Genética de la FESI, UNAM (Dueñas-García *et al.*, 2005). 4-NQO a 2.10 mM mostró una tasa de mortalidad del 8.95 % y a 3.05 mM fue del 8.82 %, sin diferencias estadísticamente significativas en las cepas de *D. melanogaster*.

Genotoxicidad del 4-NQO en *Homo sapiens*.

Kranendonk y colaboradores (2016), trabajaron con dos cepas derivadas de *E. coli* y dos cepas derivadas de *S. typhimurium* (con expresión de *CYP1A2* de *Homo sapiens*). Emplearon el test de Ames para probar tres agentes de daño directo al DNA, entre ellos: 4-NQO 0.000123 mM; realizaron lecturas de fluorescencia (485 nm a 510 nm) a 90, 120, 150, 180 y 240 minutos de incubación y obtuvieron, en todas las cepas, respuestas máximas de inducción del sistema de reparación de emergencia (SOS) a los 120 min con 4-NQO 0.000123 mM.

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios realizados con *Cyp450s* se enfocan en los inductores clásicos, tales como FBB y CF, de los que se tienen bien establecidos los *Cyp450s* que regulan; otros autores sólo reportan la posible participación de algunos *Cyp450s* en el MX, por lo tanto, considerando dichos *Cyp450s*, en el presente trabajo se determinó la respuesta molecular al tratamiento por 4-NQO 2 mM, cuya importancia radica en estudios de antimutagénesis y desarrollo de terapias para OSCC, y que además ha sido reportado como posible inductor de *Cyp450s* en larvas de *D. melanogaster*.

HIPÓTESIS

D. melanogaster presenta mecanismos de respuesta a inductores clásicos de *Cyp450s*, como FBB y CF; si dichos Xbs producen daños similares y regulan de manera afín los *Cyp450s*, entonces con 4-NQO, que tiene en común la generación de ROS, se obtendrán resultados semejantes en cuanto a los perfiles de expresión de los *Cyp450s* estudiados.

OBJETIVOS

General

- Determinar los perfiles de expresión de algunos *Cyp450s* cuando las larvas de tercer estadio (L3) (72 ± 4 h) son expuestas a 4-NQO 2 mM.

Particulares

- Determinar al 4-NQO como inductor de *Cyp450s* en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster*.
- Validar los oligonucleótidos diseñados, mediante lo reportado en la literatura para los *Cyp450s* regulados por FBB 1 mM y CF 7.7 mM.
- Correlacionar la inducción de los *Cyp450s* reportados con posibles roles de desintoxicación en *D. melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

-  **4-nitroquinolina-1-óxido:** $C_9H_6N_2O_3$, CAS No.56-57-5, 97% de pureza. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
-  **Acetona:** C_3H_6O , CAS No. 67-64-1, 99.9% de pureza. Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).
-  **Fenobarbital:** $C_{12}H_{12}N_2O_3$, CAS No. 50-06-6. Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA)
-  **Cafeína:** $C_8H_{10}N_4O_2$, CAS No. 58-08-2. Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).
-  **Solución conservadora:** 5 mL de Tegosept 12% (EtOH), 5 mL de ácido propiónico: ácido ortofosfórico (1:10) aforados a 1L de agua (Dueñas *et al*, 2002)

Biológicos

-  **Cepa Canton-S de *D. melanogaster*.** Donada por el laboratorio de Toxicología Genética, FES Iztacala, UNAM, obtenida originalmente del Laboratorio de la Dra. Norma Velázquez Ulloa, de Lewis & Clark University, Portland, USA.
-  **Medio instantáneo *Drosophila* (DIM),** obtenido de Carolina Biological Supply Co.
-  **Hojuelas de papa deshidratada Maggie®** (medio de cultivo estándar).
-  **Levadura fresca activada La Florida®,** sacarosa y agua.

Verificación de las secuencias de *Cyp450s* en *D. melanogaster*

De la base de datos para *Drosophila spp.* (*FlyBase*), se recuperaron las secuencias de todos los genes etiquetados como miembros de las familias *Cyp4*, *Cyp6*, *Cyp9*, *Cyp12* y *Cyp28*, y se compararon *in silico* (*BLASTn*) con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

De dichas secuencias se llevó a cabo la reconstrucción filogenética mediante el método UPGMA (*Unweighet Pair Group Method with Arithmetic mean*) y distancia p, usando la versión 5 de *MEGA* (Tamura *et al.*, 2011), al mismo tiempo se obtuvo la matriz de distancia génica para determinar la identidad (%) entre los miembros de cada familia.

Cultivo y propagación de *D. melanogaster*

Se propagó y sincronizó la cepa Canton-S de *D. melanogaster* en frascos de vidrio de 250 mL con 5 g de medio de cultivo estándar y 20 mL de solución conservadora en una incubadora a 25 °C y 65 % de humedad relativa. Las moscas adultas, sexualmente maduras, obtenidos de la sincronización fueron trasvasados a frascos de vidrio de 250 mL con levadura fresca y se mantuvieron durante 8 h a total oscuridad, para colecta de huevos a 25°C y 65% de humedad relativa; posteriormente las moscas adultas se retiraron de los frascos y la colecta de huevos siguió en incubación. Finalmente, al tercer día, se realizó una segunda colecta para recuperar L3 (72 ± 4 h).

Diseño experimental

Controles positivos: FBB 1 mM, CF 7.7 mM.

Controles negativos: Agua miliQ, acetona 2 %.

Tratamiento problema: 4-NQO 2 mM.

Unidad poblacional: Aproximadamente, 50 L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaste*.

Experimentos independientes: Dos por tratamiento (A y B).

Las larvas recuperadas fueron tratadas vía oral por 24h, se colocaron en tubos plexiglás acondicionados con una malla en la parte inferior, donde se alimentaron con DIM Carolina Biological Supply Co, hidratado con 18 mL de cada tratamiento. El 4-NQO 2 mM, fue disuelto en acetona 2% v/v (Palacios-López, 2014; Dueñas-García *et al.*, 2017); FBB 1 mM y CF 7.7 mM, ambos fueron disueltos en agua miliQ; acetona 2 %, diluida en agua miliQ, y por último, agua miliQ. Una vez transcurridas las 24 h, las larvas fueron colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, congeladas y maceradas en nitrógeno líquido. Se conservaron a -70 °C en 1 mL de TRIzol® para posteriormente extraer el RNAt. Al mismo tiempo, se colectaron L3 (72 ± 4 h) sin tratar y se conservaron a -70 °C para la extracción de DNAg.

Diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos de *Cyp450s*

Tomando en cuenta una T_m de 58 °C a 60 °C, un tamaño del producto de ± 200 pb, ciertos parámetros termodinámicos como $\Delta G_{max} > -34$, horquillas > -3.5 a > -4.5 , homodímeros y heterodímeros $\Delta G > -3.5$, fueron diseñados manualmente y posteriormente analizados en el programa *oligo analyzer* los oligonucleótidos para *actina 42A* (gen constitutivo), y para las cinco familias de interés: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1*, *Cyp28a5*, los cuales fueron enviados a sintetizar. Con estos cebadores se realizaron reacciones de amplificación a 30 ciclos, empleando DNAg de L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* extraído mediante DNazol®, se sometieron a separación electroforética en gel de agarosa al 1 %; posteriormente se secuenciaron (Laboratorio de Biología Molecular, UBIPRO, FES Iztacala) y de esas secuencias se obtuvo la secuencia consenso, mediante *ClustalW2*, para cada *Cyp450s* y para *actina 42A*; éstas fueron comparadas *in silico* mediante un alineamiento local (*BLASTn*) con las secuencias depositadas en la base de datos NCBI para corroborar que los amplicones correspondieran con los fragmentos de interés.

Normalización de las condiciones de amplificación semicuantitativa de los transcritos de *Cyp450s* por PCR acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)

El RNAt fue extraído mediante Trizol® y Quick-RNA™ MiniPrep, su concentración se determinó por absorbancia (260/280 nm) en nanodrop y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en condiciones libres de RNAsas. Se aplicó 1.5 μ L/40min de TURBO DNA-free™ Kit, siguiendo el tratamiento intensivo del kit, para descartar la contaminación por DNAg. A partir de 2 μ g de RNAt se sintetizó la cadena complementaria de DNA (cDNA) por transcripción reversa empleando oligo dT-GAGA y la reverso transcriptasa *Super Script III* (Invitrogen, California USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de amplificación mediante RT-PCR usando *actina 42A* a 30 ciclos, para ello se consideró el ciclo previo a la saturación de transcritos de la reacción para cada tratamiento.

Una vez establecidos los ciclos de amplificación, se llevó a cabo una RT-PCR, ahora usando el cDNA anteriormente sintetizado y como oligonucleótidos los 15 *Cyp450s* diseñados, más el diseñado para *actina 42A*. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1 % y posteriormente digitalizados en fotodocumentador con luz UV con el propósito de determinar la densitometría de cada amplicón.

Determinación semicuantitativa de los transcritos de *Cyp450s*

Se describieron las imágenes de los geles obtenidos mediante la RT-PCR de cada experimento independiente (A y B), y se determinaron los genes regulados, es decir, los genes que fueron sobreexpresados (UpR) e inhibidos (DownR), con respecto al gen constitutivo *actina 42A* para cada tratamiento.

Análisis densitométrico

Para cada imagen, obtenida con el fotodocumentador, fue seleccionada cada banda visible utilizando la herramienta de rectángulo del *software* GelQuant.NET. Comenzando con la banda de *actina 42A* y luego las de los *Cyp450s*, se obtuvo la intensidad (píxeles) para cada una. Por último se normalizaron los datos tomando *actina 42A* como 1, para obtener la cantidad relativa de transcritos de los *Cyp450s*. Posteriormente se obtuvo la cantidad relativa media (A y B), valor que también fue utilizado para elaborar los densitogramas y determinar los perfiles de expresión de los *Cyp450s* estudiados.

Análisis estadístico

Se llevó al cabo la prueba *t de Student* para determinar las diferencias significativas en las cantidades relativas medias de *Cyp450s* para el tratamiento 4-NQO 2 mM contra el control negativo agua miliQ; para el tratamiento 4-NQO 2 mM contra el control negativo acetona 2 %; y para ambos controles negativos. También se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($\alpha=0.05$) con los promedios obtenidos de la cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* (*GelQuant.NET*) para comparar entre sí los resultados

de los tratamientos 4-NQO 2 mM, FBB 1 mM y CF 7.7 mM contra agua miliQ; el planteamiento de la hipótesis fue:

Ho: Las medias de la cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* entre los cuatro tratamientos son iguales y, por lo tanto, los tratamientos tienen el mismo efecto sobre el nivel de expresión de los *Cyp450s*.

Ha: Al menos un par de medias de la cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* es diferente entre sí.

Cuando la Ho fue rechazada se llevó a cabo la prueba de Fisher o de Diferencia Mínima Significativa (LSD), con $\alpha = 0.025$ con el propósito de determinar en dónde radica(n) la(s) diferencia(s).

RESULTADOS

Miembros de la familia Cyp450 de *D. melanogaster*

De los 94 *Cyp450s* registrados en *Flybase*, 61 conformaron las familias implicadas en el metabolismo de xenobióticos: Cyp4, Cyp6, Cyp9, Cyp12 y Cyp28 (Feyereisen, 2005; Willoughby *et al.*, 2006). El análisis filogenético de éstas se llevó a cabo usando la versión *MEGA 5* (Tamura *et al.*, 2011), en la Tabla 2 se muestra la identidad promedio (p-distancia= $\pm 40\%$) entre los miembros de cada familia y las distancias génicas obtenidas de la matriz de distancia (ANEXO I).

Tabla 2. Identidad media (%) entre los miembros de cada familia de *Cyp450s* de *D. melanogaster*.

Familia	Miembros	Distancia génica media	Identidad media
Cyp4	22	0.643	35.7 %
Cyp6	23	0.625	37.5 %
Cyp9	5	0.526	47.4 %
Cyp12	7	0.546	45.4 %
Cyp28	4	0.561	43.9 %
TOTAL= 61			

La reconstrucción filogenética mediante el método UPGMA (*Unweighet Pair Group Method with Arithmetic mean*) (Figura 7), permitió observar que la pareja *Cyp6a17* y *Cyp6a23* presentó la menor distancia génica (0.158) y por lo tanto la mayor identidad (84.2 %) respecto a los demás miembros de la familia Cyp6; de la familia Cyp9 la pareja *Cyp9b1* y *Cyp9b2* con 74.7 % (0.253); de la Cyp28 la pareja *Cyp28d1* y *Cyp28d2* con 67.6 % (0.324); de la Cyp4 la pareja *Cyp4e1* y *Cyp4e2* con 80.6 % (0.194); y por último, de la familia Cyp12 la pareja *Cyp12a4* y *Cyp12a5* con 76.1 % de identidad (0.239).

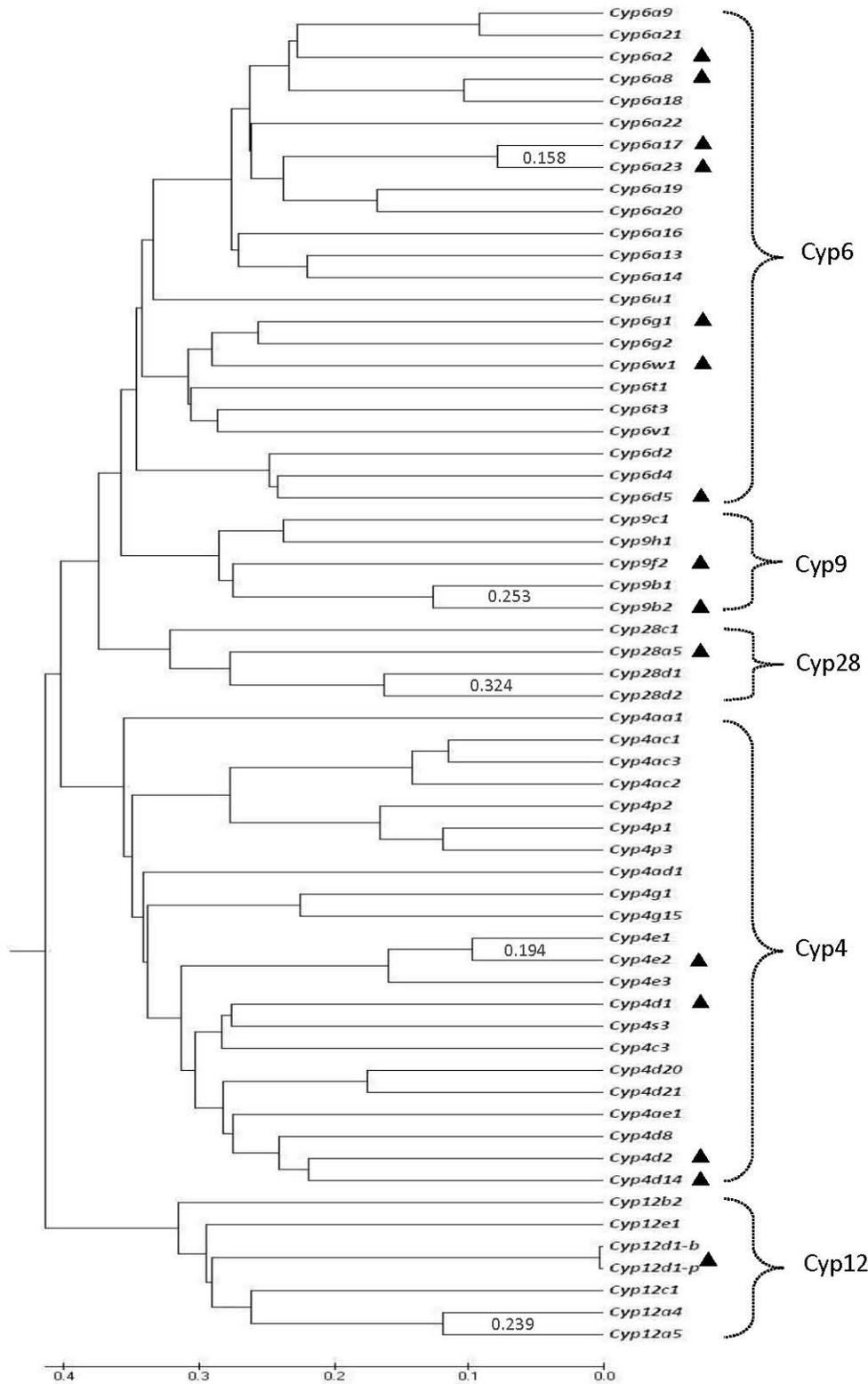


Figura 7. Reconstrucción filogenética de las familias Cyp4, Cyp6, Cyp9, Cyp12 y Cyp28 de *D. melanogaster*. Elaborada por el método UPGMA y distancia p (MEGA 5), en base a las secuencias de aminoácidos de 61 Cyp450s. Los 15 Cyp450s que fueron seleccionados para nuestro trabajo se indican con triángulo negro.

Secuencias e identidad de los oligonucleótidos diseñados para *Cyp450s*

La Tabla 3 muestra la secuencia de los 15 oligonucleótidos específicos que fueron diseñados para los *Cyp450s* con expresión modulada por FBB y/o CF (Willoughby *et al.*, 2006), y los posiblemente implicados en metabolismo de Xbs (Yang, *et al.*, 2007) en L3 ($72 \pm 4h$) de *D. melanogaster*, incluye también la secuencia del control de expresión constitutiva *actina 42A*, y el tamaño de los amplicones generados a partir de DNAg y RNAt.

Tabla 3. Relación de los 16 genes empleados (constitutivo y *Cyp450s*) de *D. melanogaster*.

En todos los casos el tamaño de los amplicones fue verificado experimentalmente.

Gen	Secuencia 5'-3'	Amplicón pb	Gen	Secuencia 5'-3'	Amplicón pb
<i>Actina 42^a</i>	Fw GTCCCTGGAGAAGTCGTAC Rv GCACAGTGTGGCGTACAG	234 (DNAg) 234 (RNAt)	<i>Cyp6a23</i>	Fw TTGATCGCACTTCTAGTGTC Rv CAAGTCGGTGATGACAGCA	241 (DNAg) 241 (RNAt)
<i>Cyp4d1</i>	Fw CGGTGAAGACCATATCAATG Rv CAGAAGGATGTCCAGGAAG	252 (DNAg) 252 (RNAt)	<i>Cyp6d5</i>	Fw TTGGACTGGATGTTGATAGC Rv TATATTGTTCTGTTCCCTGAG	262 (DNAg) 224 (RNAt)
<i>Cyp4d2</i>	Fw AAAATCCCAATCTGCCCTATG Rv AATGTTCTCGGTAAAGTCGTG	200 (DNAg) 200 (RNAt)	<i>Cyp6g1</i>	Fw GAGCCTGAAGCCGTTCTAC Rv ATCCGAAGGTTGATATGCC	236 (DNAg) 176 (RNAt)
<i>Cyp4d14</i>	Fw ATGTGCTGCTGAAGTCCAC Rv CAGAGACTCCTTTATCACGC	265 (DNAg) 265 (RNAt)	<i>Cyp6w1</i>	Fw CTTGGACTACTTATGTGCC Rv TTGCGGAGTGCTCGTTGA	230 (DNAg) 225 (RNAt)
<i>Cyp4e2</i>	Fw ATTCATACTCAGCAGTCAGAC Rv TCTCGTTCATCACCTCGTG	178 (DNAg) 178 (RNAt)	<i>Cyp9b2</i>	Fw TCGTCCTCCAGAGACAAC Rv GGTCCCTCATCACGCTGA	261 (DNAg) 216 (RNAt)
<i>Cyp6a2</i>	Fw ACGGAAAGAAGTGAAGGAC Rv CACATCGGTGGTGAACCTG	194 (DNAg) 194 (RNAt)	<i>Cyp9f2</i>	Fw CTCTGAGTCCGGCATTTACA Rv GGCGATCACATCATTGGTGA	202 (DNAg) 202 (RNAt)
<i>Cyp6a8</i>	Fw ATACTGATTAAGGACTTCTCG Rv CTACGGTCGGATACATTAAC	174 (DNAg) 174 (RNAt)	<i>Cyp12d1</i>	Fw TTGACCCTTTCCAGACCT Rv ACTGTCATTGAGAGTTCGCT	125 (DNAg) 125 (RNAt)
<i>Cyp6a17</i>	Fw GAGTCTTCTACAACGAGATC Rv GTGCCACCAGATCCACAAC	228 (DNAg) 228 (RNAt)	<i>Cyp28a5</i>	Fw TGGGTGTAATAAGGAGGACA Rv TGAAGCAGTAGTGAGGTACAA	321 (DNAg) 255 (RNAt)

Fw: Directo

Rv: Reverso

La Figura 8 corresponde a los productos de PCR obtenidos de la amplificación con los 16 oligonucleótidos diseñados (*Cyp450s* y *actina 42A*) y DNAg de *D. melanogaster* como molde, todos generaron bandas definidas a 30 ciclos, con una temperatura de alineamiento de 60°C.

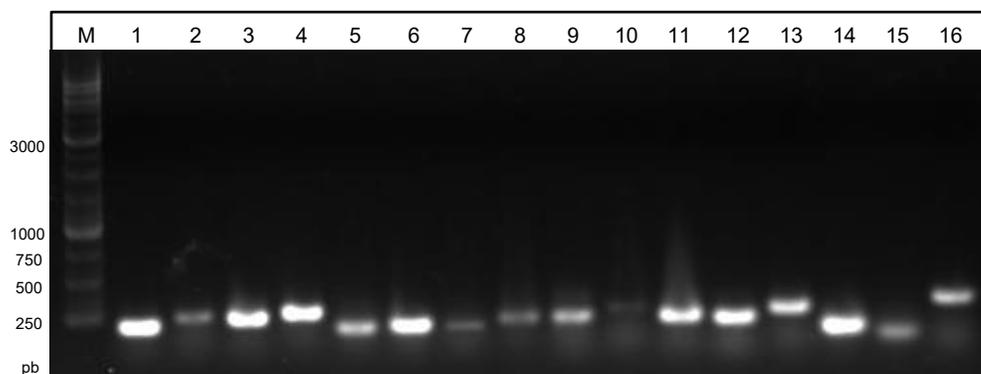


Figura 8. Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos diseñados y DNAg de L3 de *D. melanogaster*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles **M**: Marcador de peso molecular; **1**: *Actina 42A*; **2**: *Cyp4d1*; **3**: *Cyp4d2*; **4**: *Cyp4d14*; **5**: *Cyp4e2*; **6**: *Cyp6a2*; **7**: *Cyp6a8*; **8**: *Cyp6a17*; **9**: *Cyp623*; **10**: *Cyp6d5*; **11**: *Cyp6g1*; **12**: *Cyp6w1*; **13**: *Cyp9b2*; **14**: *Cyp9f2*; **15**: *Cyp12d1*; **16**: *Cyp28a5*.

Los productos de la reacción fueron purificados y secuenciados, de las secuencias obtenidas (ANEXO II), se obtuvieron las secuencias consenso (ANEXO III), el alineamiento local (*BLASTn*) de estas últimas (secuencias *query*) arrojó una identidad de entre 96 % a 100 % con las secuencias de RNA mensajero de *Cyp450s* y del gen constitutivo depositadas en NCBI. En la Tabla 4 se resumen los resultados de este análisis, el valor $e \leq E-10^{100}$ indica que la similitud entre las secuencias no se debió al azar y que corresponden a los genes que se pretendió amplificar.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de los oligonucleótidos de *Cyp450s* diseñados.

Parámetros obtenidos de la base de datos NCBI.

<i>Primer</i>	<i>Query</i>	Valor e	Identidad	<i>Primer</i>	<i>Query</i>	Valor e	Identidad
<i>Actina 42A</i>	100 %	1e-97	100 %	<i>Cyp6a23</i>	100 %	6e-121	100 %
<i>Cyp4d1</i>	100 %	2e-116	98 %	<i>Cyp6d5</i>	77 %	6e-52	98 %
<i>Cyp4d2</i>	75 %	3e-63	100 %	<i>Cyp6g1</i>	100 %	6e-121	100 %
<i>Cyp4d14</i>	100 %	2e-135	100 %	<i>Cyp6w1</i>	100 %	2e-109	99 %
<i>Cyp4e2</i>	100 %	3e-87	100 %	<i>Cyp9b2</i>	77 %	3e-80	100 %
<i>Cyp6a2</i>	100 %	7e-98	100 %	<i>Cyp9f2</i>	100 %	2e-68	96 %
<i>Cyp6a8</i>	100 %	5e-85	100 %	<i>Cyp12d1</i>	100 %	1e-50	97 %
<i>Cyp6a17</i>	98 %	3e-114	100 %	<i>Cyp28a5</i>	79 %	2e-61	99 %

Normalización de las condiciones de amplificación semicuantitativa de los transcritos de *Cyp450s* por RT-PCR

El RNAt de cada uno de los tratamientos fue extraído de aproximadamente 50 L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster*, en ambos experimentos independientes (A y B); en la Figura 9 se muestra la integridad del RNAt extraído en el experimento A, las dos bandas que se observan pertenecen a las subunidades mayores 28s y 18s del RNA ribosomal. Adicionalmente se determinó su concentración mediante nanodrop, la razón de pureza (A260/280) de cada muestra fue de >2 (Tabla 5).

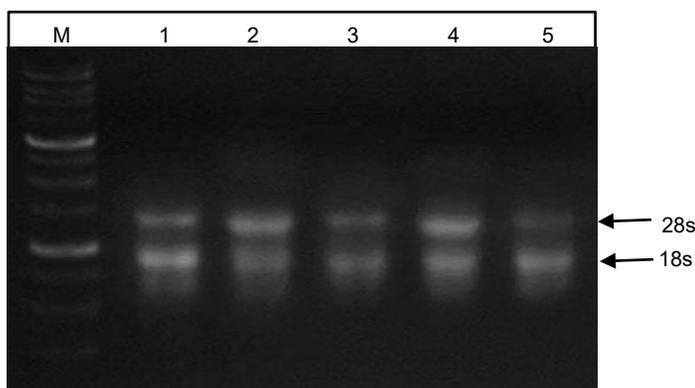


Figura 9. Integridad del RNAt de *D. melanogaster* en gel de agarosa al 1.5 % Obtenido de aproximadamente 50 L3 (72 ± 4 h) tratadas con **1:** agua miliQ; **2:** FBB 1 mM; **3:** CF 7.7 mM; **4:** 4-NQO 2 mM y **5:** acetona 2 %. **M:** Marcador de peso molecular (Experimento A).

Tabla 5. Concentración y pureza del RNAt. Incluye los valores de ambas extracciones (A, superior y B, inferior) de RNAt de L3 de *D. melanogaster*.

Tratamiento	RNA total	A260/280
4-NQO 2 mM	1725.1 ng/ μ L	2.17
	995.3 ng/ μ L	2.07
FBB 1 mM	2710.5 ng/ μ L	2.09
	386.6 ng/ μ L	2.04
CF 7.7 Mm	440.7 ng/ μ L	2.08
	1371.2 ng/ μ L	2.06
Acetona 2 %	810.1 ng/ μ L	2.16
	442.9 ng/ μ L	2.04
Agua miliQ	889.0 ng/ μ L	2.10
	386.9 ng/ μ L	2.16

La Figura 10 se incluye como ejemplo de la normalización de las condiciones de RT-PCR que se llevó a cabo con cada una de las extracciones de RNAt, se tomaron alícuotas de los productos de amplificación a 15-30 ciclos usando el gen constitutivo *actina 42A*.

En el caso que se presenta, que corresponde a 4-NQO 2 mM del experimento A, se observa que entre el ciclo 28 y 30 la concentración del amplicón no se modificó de manera ostensible, es por eso que se determinó el ciclo 27 como adecuado para visualizar las diferencias de expresión de los *Cyp450s* mediante PCR. Así mismo, para ambos controles negativos: acetona 2% y agua miliQ, se determinó el ciclo 29; y para los controles positivos: FBB 1 mM y CF 7.7 mM, el ciclo 28 y el ciclo 26, respectivamente (Experimento A).

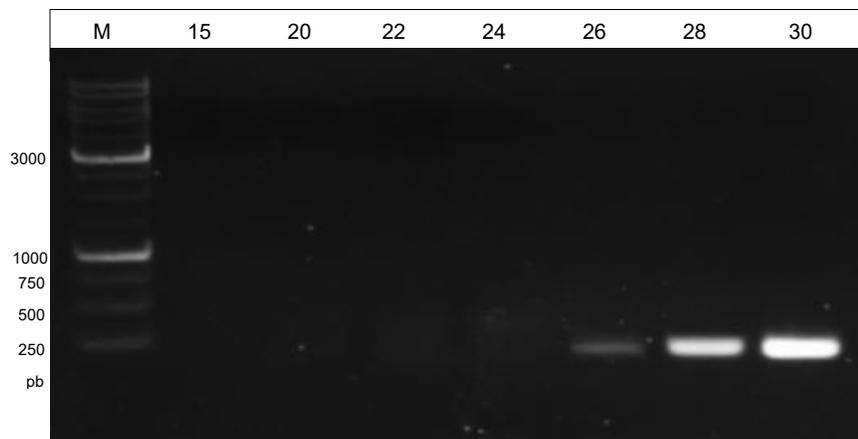


Figura 10. Normalización de las condiciones de amplificación por RT- PCR (15- 30 ciclos) usando gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con 4-NQO 2 mM del experimento A (ciclo óptimo 27).

Determinación semicuantitativa de los transcritos de *Cyp450s*.

De manera subjetiva se analizaron los geles obtenidos mediante la RT-PCR y se infirieron los genes que fueron sobreexpresados (UpR, *Upregulated*), e inhibidos (DownR, *Downregulated*), en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* expuestas a 4-NQO 2 mM, acetona 2 %, agua miliQ, FBB 1 mM y CF 7.7 Mm.

4-NQO 2 mM. Los *Cyp450s* que fueron, aparentemente, regulados por el 4- NQO 2 mM en L3 de *D. melanogaster* fueron, en promedio, 14 de los 15 empleados (considerando A y B). Se obtuvieron bandas definidas para: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*.

En la Figura 11A se observa expresión similar de *Cyp6g1* con el control *actina 42A*, los otros 10 genes fueron DownR: *Cyp4d2*, *Cyp6a2*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2* y *Cyp9f2*; seguidos de *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a17* y *Cyp28a5*; y por último, el *Cyp6a23*.

En el segundo experimento independiente (Figura 11B), los *Cyp450s* con expresión similar al control fueron: *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp6a2*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2* y *Cyp28a5*; en este caso *Cyp6g1* fue UpR; y los seis genes restantes fueron DownR: *Cyp4d1*, *Cyp4e2*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23* y *Cyp12d1*; incluso se aprecia una banda muy tenue para *Cyp6a8* (la RT-PCR permitió observar tres *Cyp450s* más en éste último experimento).

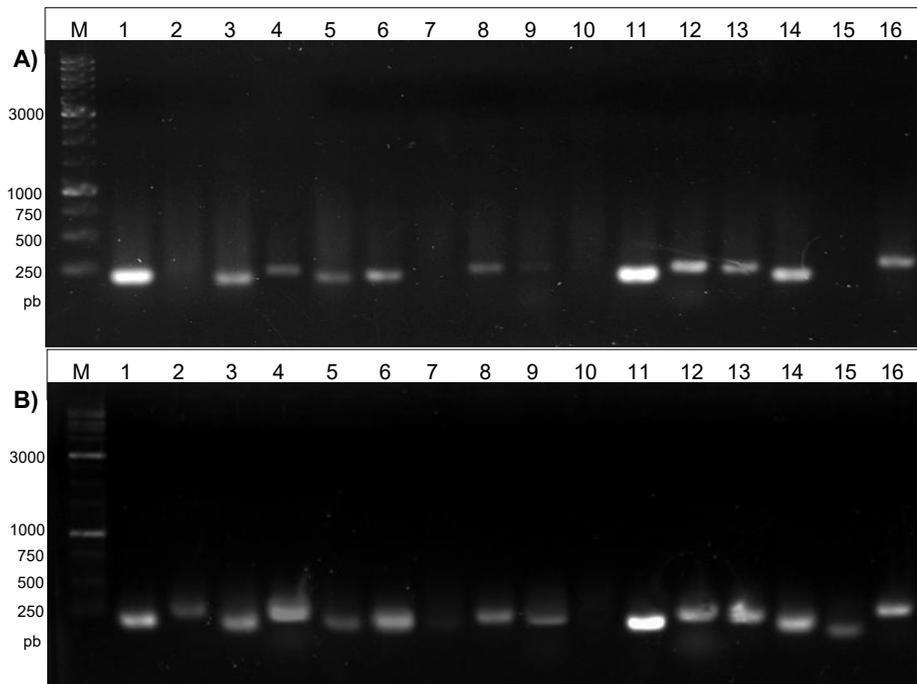


Figura 11. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con 4-NQO 2 mM. Dos experimentos independientes: A (27 ciclos) y B (30 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5*.

Control negativo: acetona 2 %. Empleada como vehículo disolvente del 4-NQO 2 mM, fueron regulados 13 de los 15 *Cyp450s* empleados: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*.

En el experimento A (Figura 12A), *Cyp6a2* y *Cyp12d1* se expresaron de forma similar que el control; mientras que, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9f2* y *Cyp28a5* fueron UpR. Los genes DownR fueron: *Cyp4e2*; seguido de *Cyp4d2*; además de *Cyp4d14* y *Cyp4d1*.

En el experimento B (Figura 12B), los genes *Cyp6g1*, *Cyp9f2* y *Cyp28a5* también fueron UpR, igual que en la Figura 12A. Se obtuvieron los mismos *Cyp450s* DownR que en el experimento A, y en este caso la RT-PCR permitió detectar bandas para tres *Cyp450s* más; de manera que, los genes DownR fueron: *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp6w1*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*; seguidos de *Cyp12d1*, *Cyp4d1*, *Cyp6a8*, *Cyp6a23* y *Cyp6a17*.

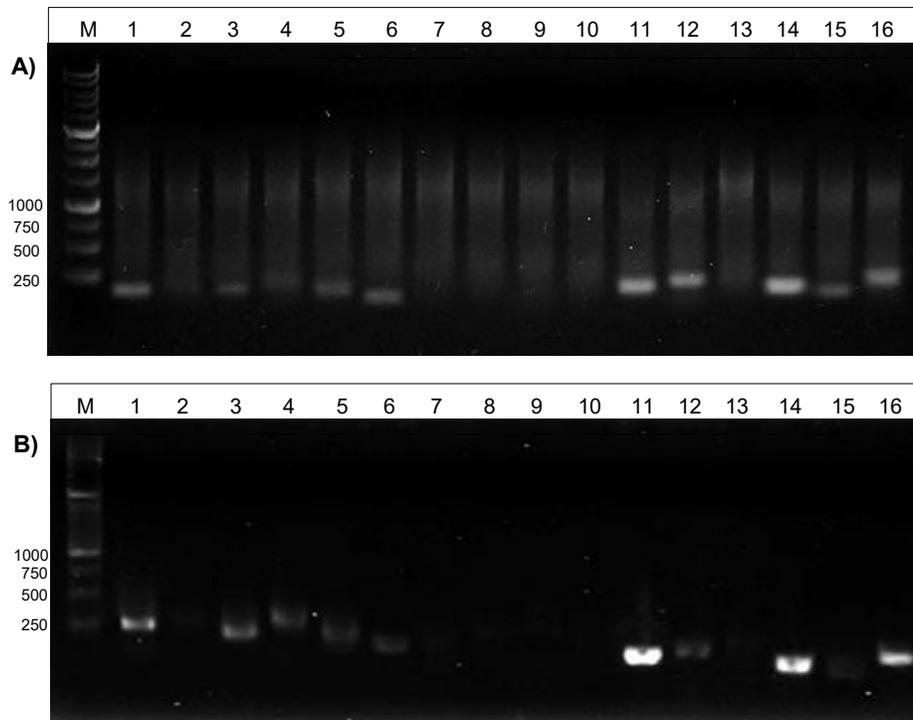


Figura 12. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con acetona 2%. Dos experimentos independientes: **A** (29 ciclos) y **B** (29 ciclos); **M**: Marcador de peso molecular, **1**: *Actina 42A*; **2**: *Cyp4d1*; **3**: *Cyp4d2*; **4**: *Cyp4d14*; **5**: *Cyp4e2*; **6**: *Cyp6a2*; **7**: *Cyp6a8*; **8**: *Cyp6a17*; **9**: *Cyp6a23*; **10**: *Cyp6d5*; **11**: *Cyp6g1*; **12**: *Cyp6w1*; **13**: *Cyp9b2*; **14**: *Cyp9f2*; **15**: *Cyp12d1* y **16**: *Cyp28a5*.

Control negativo: agua miliQ En estas condiciones las L3 expresaron en promedio 12 de los 15 *Cyp450s* empleados: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*.

A excepción de los genes *Cyp6g1* y *Cyp9f2* del experimento A (Figura 13A), que aparentemente se expresan igual que *actina 42A*, en ambos experimentos independientes los *Cyp450s* fueron DownR, como se esperaba. En el experimento B (Figura 13B), la RT-PCR brindó bandas para *Cyp4d1* y *Cyp6a23*, que no fueron visibles en el experimento A (Figura 13A).

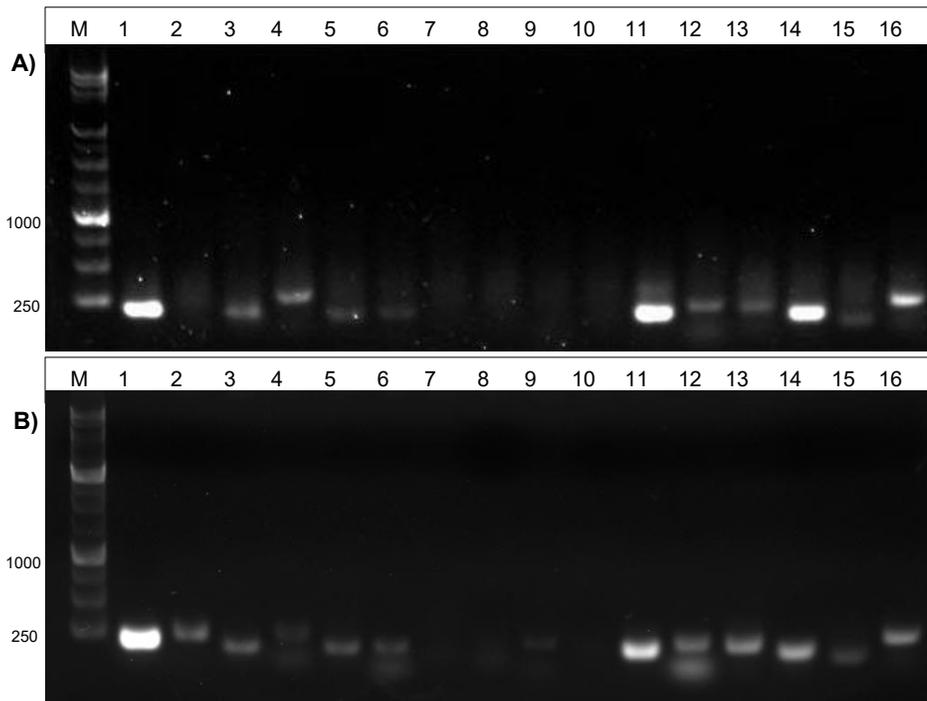


Figura 13. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con agua MiliQ. Dos experimentos independientes: A (29 ciclos) y B (27 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5*.

Control positivo: FBB 1 mM Se tuvo la expresión de 13 de los 15 *Cyp450* empleados: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*. De los 13 *Cyp450s* obtenidos, 10 son los reportados por Willoughby y colaboradores (2006), como regulados por fenobarbital 10 mM en L3 de *D. melanogaster*.

De la Figura 14A, se infirió que la expresión de *Cyp6g1* y *Cyp9f2* no cambió ostensiblemente respecto a la de *actina 42A*; los demás *Cyp450s* fueron DownR con intensidades similares entre ellos. Cabe señalar la presencia del *Cyp6a17* en este experimento, el cual no fue visible mediante la RT-PCR del experimento B (Figura 14B).

En la Figura 14B, en cambio, el *Cyp6g1* fue UpR; en cuanto a los *Cyp450s* restantes también fueron DownR; además se observaron bandas para *Cy4d1*, *Cyp4d14* y *Cyp6a8*, que no estuvieron presentes en el experimento A (Figura 14A).

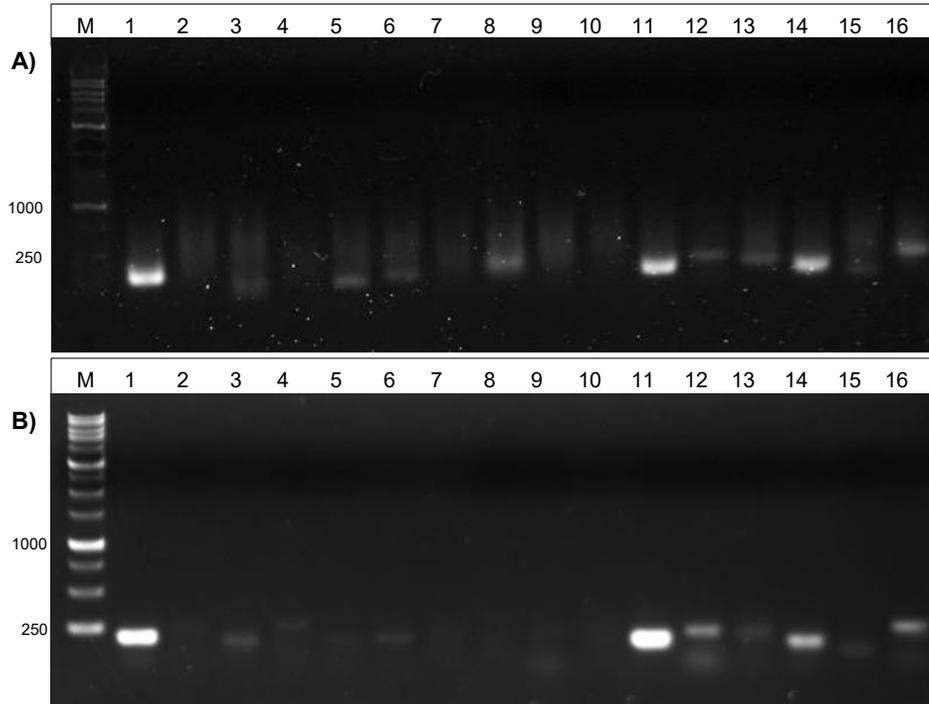


Figura 14. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con FBB 1 mM. Dos experimentos independientes: A (28 ciclos) y B (28 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2: *Cyp4d1*; 3: *Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5: *Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7: *Cyp6a8*; 8: *Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5*.

Control positivo: CF 7.7 mM Se obtuvieron bandas para 13 de los 15 *Cyp450s*: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*. De acuerdo con Willoughby *et al.*, (2006), siete de estos *Cyp450s* son inducidos por cafeína 7.7 mM en L3 de *D. melanogaster*.

El primer experimento independiente (Figura 15A), supone que los genes *Cyp4d2*, *Cyp4e2* y *Cyp28a5* no fueron regulados con cafeína 7.7 mM, ya que presentaron expresión similar al control; por otro lado, *Cyp6a2*, *Cyp6g1* y *Cyp12d1* fueron UpR; los seis *Cyp450s* restantes fueron DownR.

En el segundo experimento (Figura 15B), en contraste con la Figura 15A, las bandas de *Cyp6a2* y *Cyp12d1* fueron similares a la de *actina 42A*. El *Cyp6g1* fue UpR; y finalmente, los otros 10 *Cyp450s* fueron DownR. En este último experimento se obtuvo banda para *Cyp4d1*, la cual no se apreció en el experimento A (Figura 15A).

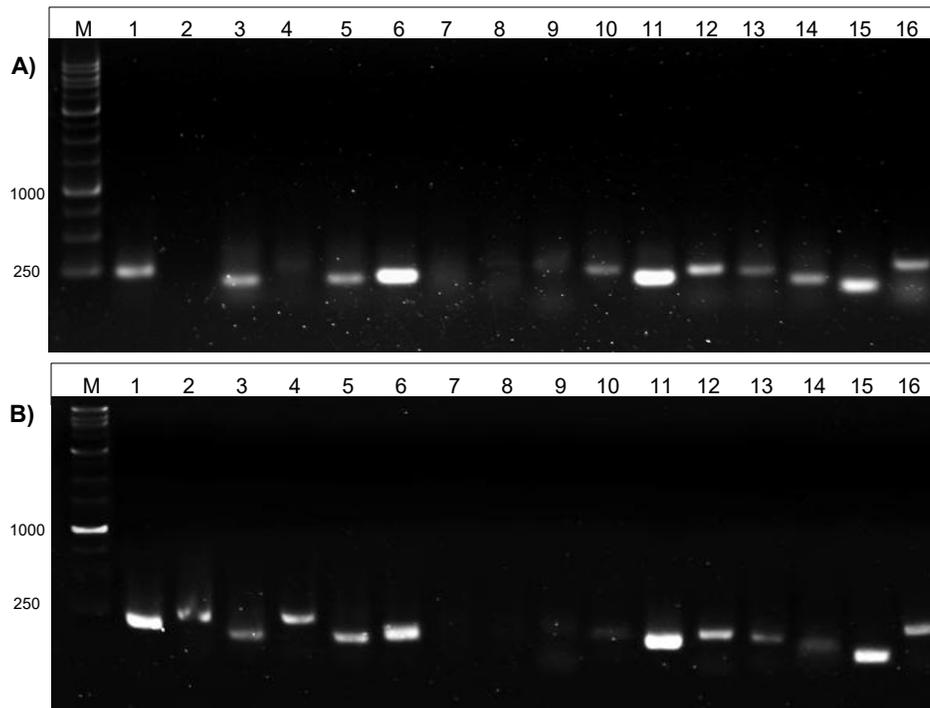


Figura 15. Amplicones de transcritos de *Cyp450s* de L3 (72±4h) de *D. melanogaster* tratadas con CF 7.7 mM. Dos experimentos independientes: A (26 ciclos) y B (29 ciclos); M: Marcador de peso molecular, 1: *Actina 42A*; 2:*Cyp4d1*; 3:*Cyp4d2*; 4: *Cyp4d14*; 5:*Cyp4e2*; 6: *Cyp6a2*; 7:*Cyp6a8*; 8:*Cyp6a17*; 9: *Cyp6a23*; 10: *Cyp6d5*; 11: *Cyp6g1*; 12: *Cyp6w1*; 13: *Cyp9b2*; 14: *Cyp9f2*; 15: *Cyp12d1* y 16: *Cyp28a5*.

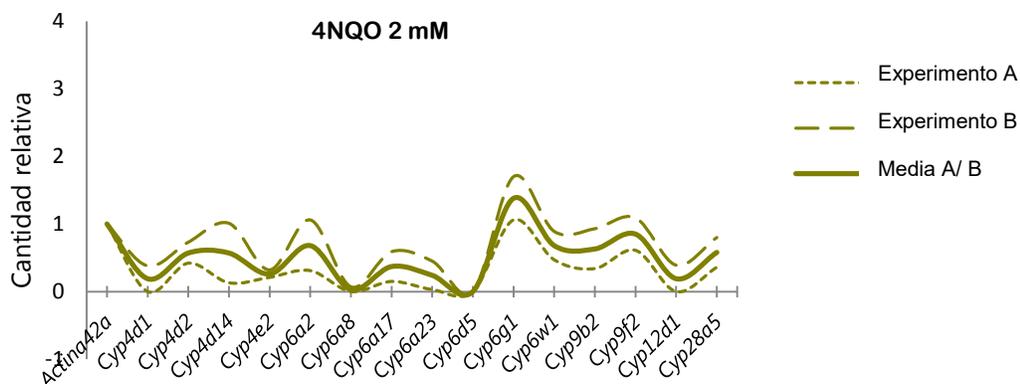
Análisis densitométrico de los transcritos de *Cyp450s* (*GelQuant.NET*)

Se empleó el programa *GelQuant.Net* para analizar las bandas generadas por los *Cyp450s* mediante la RT-PCR, los valores de intensidad relativa fueron expresados como cantidad/expresión relativa de transcritos de los *Cyp450s*, después de normalizar con *actina 42A*. En la Tabla 6, se resumen los datos de dicho análisis para el caso de 4-NQO 2 mM. A partir de las cantidades relativas se elaboraron los densitogramas correspondientes, debido a que en ambos experimentos independientes la tendencia de los picos fue similar en cada tratamiento, se tomó la cantidad relativa media para determinar los perfiles de expresión de los *Cyp450s*. Dicho lo anterior, con 4-NQO 2 mM, sólo *Cyp6g1* fue 1.38 de *actina 42A* (UpR), los demás *Cyp450s* se expresaron por debajo del control constitutivo; *Cyp6d5* no fue detectado con este tratamiento (Gráfica 1).

Tabla 6. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* en *D. melanogaster*. L3 (72 ± 4h) tratadas con 4-NQO 2 mM. Intensidad relativa del amplicón obtenida mediante *GelQuant.NET*.

GEN	IA/IB	CR	\bar{X}	GEN	IA/IB	CR	\bar{X}
<i>Actina 42A</i>	0.19433	1	1	<i>Cyp6a23</i>	0.00655	0.03	0.24
	0.08716	1			0.04000	0.45	
<i>Cyp4d1</i>	S/A	0	0.19	<i>Cyp6d5</i>	S/A	0	0
	0.03325	0.38			S/A	0	
<i>Cyp4d2</i>	0.08263	0.42	0.57	<i>Cyp6g1</i>	0.20726	1.06	1.38
	0.06393	0.73			0.14900	1.70	
<i>Cyp4d14</i>	0.02706	0.13	0.57	<i>Cyp6w1</i>	0.09236	0.47	0.68
	0.08836	1.01			0.07768	0.89	
<i>Cyp4e2</i>	0.04116	0.21	0.26	<i>Cyp9b2</i>	0.06734	0.34	0.63
	0.02792	0.32			0.08243	0.93	
<i>Cyp6a2</i>	0.06158	0.31	0.68	<i>Cyp9f2</i>	0.11896	0.61	0.85
	0.09266	1.06			0.09562	1.09	
<i>Cyp6a8</i>	S/A	0	0.03	<i>Cyp12d1</i>	S/A	0	0.19
	0.00686	0.07			0.03438	0.39	
<i>Cyp6a17</i>	0.03076	0.15	0.37	<i>Cyp28a5</i>	0.07003	0.36	0.58
	0.05145	0.59			0.07032	0.80	

IA/IB: Intensidad experimento A/B CR: Cantidad relativa \bar{X} : CR media S/A: Sin amplicón



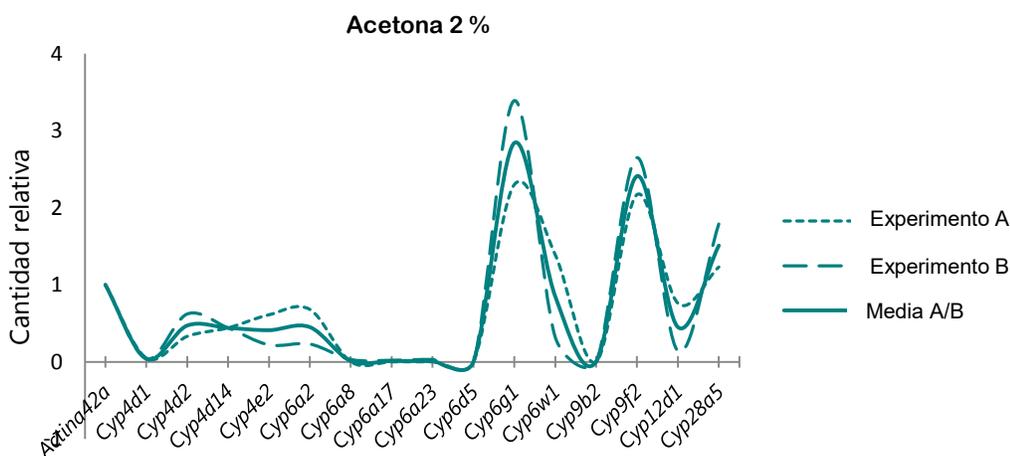
Gráfica 1. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450* en relación al gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ± 4h) de *D. melanogaster* tratadas con 4-NQO 2 mM.

Control negativo: acetona 2 %. En este caso, el *Cyp6g1* también fue UpR (2.84 de *actina 42A*), además de *Cyp9f2* (2.41 de *actina 42A*) y *Cyp28a5* (1.51 de *actina 42A*); los *Cyp450s* DownR fueron 10; y por último, *Cyp9b2* y *Cyp6d5* no fueron detectados (Tabla 7; Gráfica 2).

Tabla 7. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* en *D. melanogaster*. L3 (72 ± 4 h) tratadas con acetona 2 %. Intensidad del amplicón obtenida mediante *GelQuant.NET*.

GEN	IA/IB	CR	\bar{X}	GEN	IA/IB	CR	\bar{X}
<i>Actina 42a</i>	0.09133	1	1	<i>Cyp6a23</i>	S/A	0	0.01
	0.08823	1			0.00301	0.03	
<i>Cyp4d1</i>	0.00469	0.05	0.04	<i>Cyp6d5</i>	S/A	0	0
	0.00377	0.04			S/A	0	
<i>Cyp4d2</i>	0.03035	0.33	0.47	<i>Cyp6g1</i>	0.21011	2.30	2.84
	0.05527	0.62			0.29915	3.39	
<i>Cyp4d14</i>	0.04029	0.44	0.44	<i>Cyp6w1</i>	0.12744	1.39	0.85
	0.03935	0.44			0.02865	0.32	
<i>Cyp4e2</i>	0.05635	0.61	0.41	<i>Cyp9b2</i>	S/A	0	0
	0.02029	0.22			S/A	0	
<i>Cyp6a2</i>	0.06284	0.68	0.45	<i>Cyp9f2</i>	0.19858	2.17	2.41
	0.02035	0.23			0.23413	2.65	
<i>Cyp6a8</i>	S/A	0	0.01	<i>Cyp12d1</i>	0.07032	0.76	0.45
	0.00283	0.03			0.01242	0.14	
<i>Cyp6a17</i>	S/A	0	0.01	<i>Cyp28a5</i>	0.11238	1.23	1.51
	0.00226	0.02			0.15830	1.79	

IA/IB: Intensidad experimento A/B CR: Cantidad relativa \bar{X} : CR media S/A: Sin amplicón



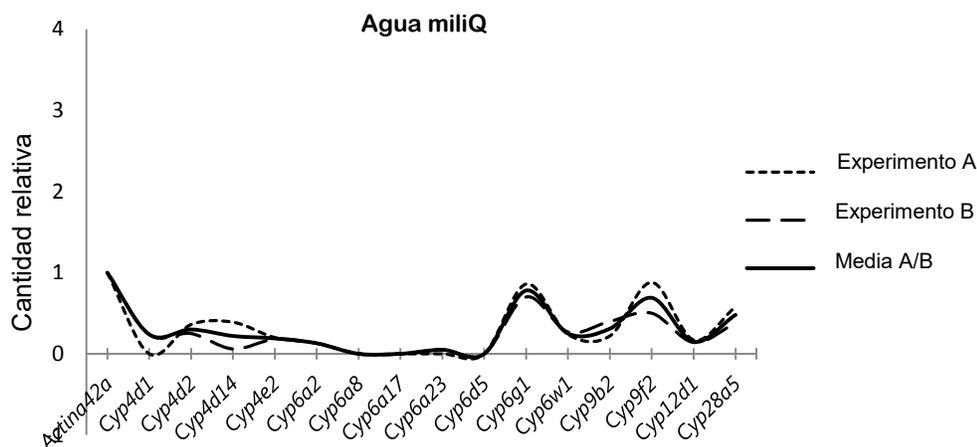
Gráfica 2. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450* en relación al gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con acetona 2 %.

Control negativo: agua miliQ Los *Cyp450s* que se expresaron en estas condiciones fueron 12 y se encontraron por debajo del gen constitutivo; *Cyp6a8*, *Cyp6a17* y *Cyp6d5* no fueron detectados (Tabla 8; Gráfica 3).

Tabla 8. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* en *D. melanogaster*. L3 (72 ± 4h) tratadas con agua miliQ. Intensidad del amplicón obtenida mediante *GelQuant.NET*.

GEN	IA/IB	CR	\bar{X}	GEN	IA/IB	CR	\bar{X}
<i>Actina 42A</i>	0.19626	1	1	<i>Cyp6a23</i>	S/A	0	0.02
	0.23094	1			0.01175	0.05	
<i>Cyp4d1</i>	S/A	0	0.12	<i>Cyp6d5</i>	S/A	0	0
	0.05723	0.24			S/A	0	
<i>Cyp4d2</i>	0.07089	0.36	0.30	<i>Cyp6g1</i>	0.17004	0.86	0.78
	0.05789	0.25			0.16331	0.70	
<i>Cyp4d14</i>	0.07827	0.39	0.22	<i>Cyp6w1</i>	0.04817	0.24	0.25
	0.01531	0.06			0.06302	0.27	
<i>Cyp4e2</i>	0.04067	0.20	0.19	<i>Cyp9b2</i>	0.04504	0.22	0.31
	0.04206	0.18			0.09342	0.40	
<i>Cyp6a2</i>	0.02671	0.13	0.13	<i>Cyp9f2</i>	0.17401	0.88	0.69
	0.03074	0.13			0.11736	0.50	
<i>Cyp6a8</i>	S/A	0	0	<i>Cyp12d1</i>	0.03511	0.17	0.15
	S/A	0			0.03464	0.14	
<i>Cyp6a17</i>	S/A	0	0	<i>Cyp28a5</i>	0.11482	0.58	0.48
	S/A	0			0.08932	0.38	

IA/IB: Intensidad experimento A/B CR: Cantidad relativa \bar{X} : CR media S/A: Sin amplicón

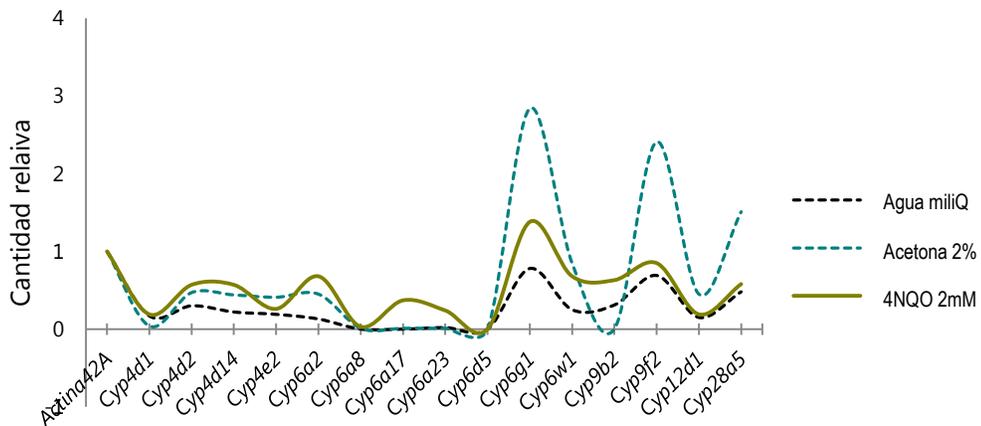


Gráfica 3. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450* en relación al gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ± 4h) de *D. melanogaster* tratadas con agua miliQ.

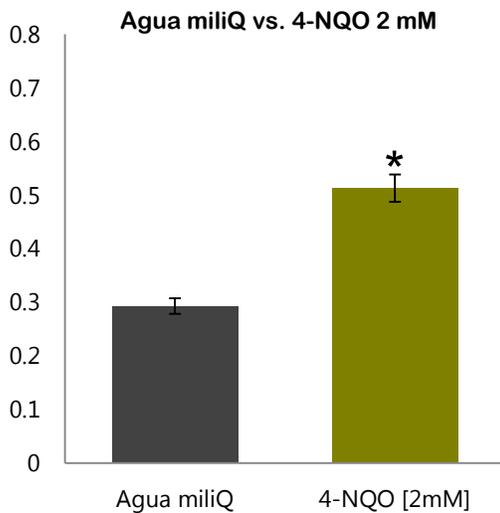
Para determinar si hubo diferencias en la expresión de los *Cyp450s* con 4-NQO 2 mM, los resultados de este tratamiento se compararon contra el control agua miliQ y también contra el control acetona 2 % (Gráfica 4)

Agua miliQ vs. 4-NQO 2 mM. El 4-NQO 2 mM aumentó significativamente ($p < 0.05$) las cantidades relativas de los transcritos de *Cyp450s* en las L3, respecto a los niveles de expresión basal (agua miliQ) (Gráfica 5).

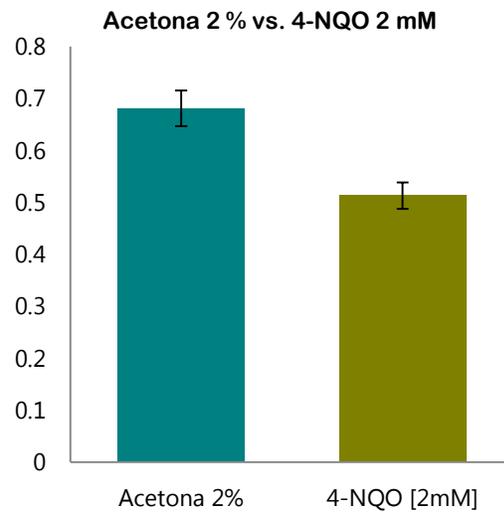
Acetona 2 % vs. 4-NQO 2 mM. Al comparar contra el disolvente, las cantidades relativas de los *Cyp450s* no aumentaron significativamente ($p > 0.025$) con 4-NQO 2 mM. En la Tabla 9, se muestran las diferencias en el nivel de expresión de los *Cyp450s* (Gráfica 6).



Gráfica 4. Comparación de las cantidades relativas de los transcritos de *Cyp450s*. L3 tratadas con agua miliQ, acetona 2 % y 4-NQO 2 mM.



Gráfica 5. Diferencias entre 4-NQO 2 mM y el control negativo agua miliQ. Se indica con asterisco la media que resultó significativa.

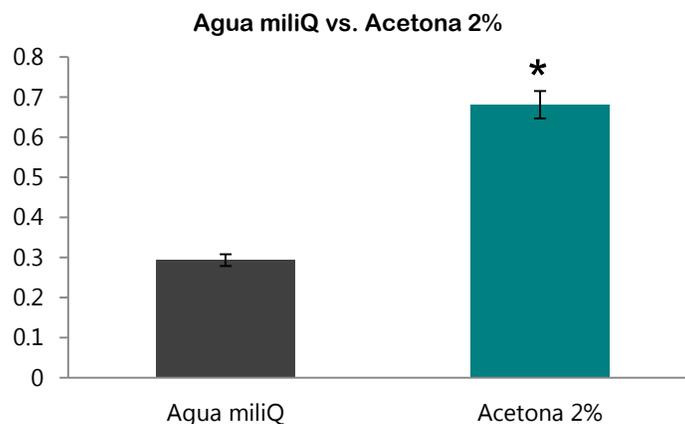


Gráfica 6. Diferencias entre 4-NQO 2 mM y el control negativo acetona 2%. Sin diferencias significativas.

Tabla 9. Diferencias en el nivel de expresión (DNE) de los *Cyp450s* de *D. melanogaster*. L3 (72 ± 4h) tratadas con agua miliQ, acetona 2 % y 4-NQO 2 mM. Se indica con asterisco la media con diferencias significativas.

Gen	Agua miliQ	4-NQO 2mM	DNE	Gen	Acetona 2%	4-NQO 2mM	DNE
<i>Actina42A</i>	1	1	0	<i>Actina42A</i>	1	1	0
<i>Cyp4d1</i>	0.17	0.19	-0.02	<i>Cyp4d1</i>	0.04	0.19	-0.15
<i>Cyp4d2</i>	0.3	0.57	-0.27	<i>Cyp4d2</i>	0.47	0.57	-0.10
<i>Cyp4d14</i>	0.22	0.57	-0.35	<i>Cyp4d14</i>	0.44	0.57	-0.13
<i>Cyp4e2</i>	0.19	0.26	-0.07	<i>Cyp4e2</i>	0.41	0.26	0.15
<i>Cyp6a2</i>	0.13	0.68	-0.55	<i>Cyp6a2</i>	0.45	0.68	-0.23
<i>Cyp6a8</i>	0	0.03	-0.03	<i>Cyp6a8</i>	0.01	0.03	-0.02
<i>Cyp6a17</i>	0	0.37	-0.37	<i>Cyp6a17</i>	0.01	0.37	-0.36
<i>Cyp6a23</i>	0.02	0.24	-0.22	<i>Cyp6a23</i>	0.01	0.24	-0.23
<i>Cyp6d5</i>	0	0	0	<i>Cyp6d5</i>	0	0	0
<i>Cyp6g1</i>	0.78	1.38	-0.6	<i>Cyp6g1</i>	2.84	1.38	1.46
<i>Cyp6w1</i>	0.25	0.68	-0.43	<i>Cyp6w1</i>	0.85	0.68	0.17
<i>Cyp9b2</i>	0.31	0.63	-0.32	<i>Cyp9b2</i>	0	0.63	-0.63
<i>Cyp9f2</i>	0.69	0.85	-0.16	<i>Cyp9f2</i>	2.41	0.85	1.56
<i>Cyp12d1</i>	0.15	0.19	-0.04	<i>Cyp12d1</i>	0.45	0.19	0.26
<i>Cyp28a5</i>	0.48	0.58	-0.1	<i>Cyp28a5</i>	1.51	0.58	0.93
$\bar{X} = 0.293$ $\bar{X} = 0.513^*$				$\bar{X} = 0.681$ $\bar{X} = 0.513$			

Al no existir diferencias entre el vehículo disolvente (acetona 2 %) y el 4-NQO 2 mM, se comparó acetona 2% contra agua miliQ, las cantidades relativas de los *Cyp450s* aumentaron significativamente ($p < 0.025$), cuando las L3 (72 ± 4h) fueron expuestas a acetona 2 % (Gráfica 7).



Gráfica 7. Diferencias entre ambos controles negativos. Se indica con asterisco la media que resultó significativa.

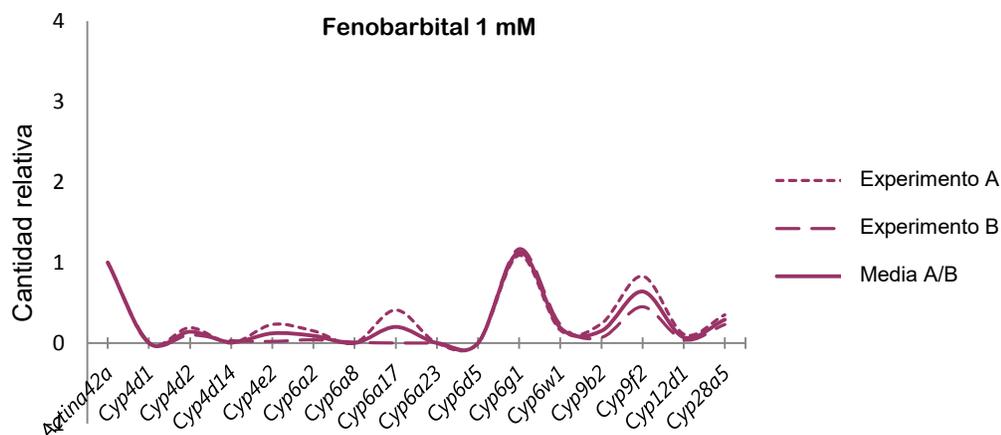
Continuando con el análisis densitométrico, se midieron las bandas de los controles positivos: con FBB 1 mM se obtuvieron nueve de los once *Cyp450s* reportados, y con CF 7.7 mM se obtuvieron siete de los ocho descritos por Willoughby et al. (2006). De acuerdo con lo planteado en los objetivos, con estos resultados se pretendió validar lo obtenido con 4-NQO 2 mM.

Control positivo: FBB 1 mM. Los nueve *Cyp450s* que corresponden a lo reportado son: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*; además de estos, se tuvo la presencia de *Cyp4d2* y *Cyp9f2*. En contraste con el gen constitutivo, el *Cyp6g1* fue 1.13 de *actina 42A*, los 10 *Cyp450s* restantes presentaron cantidades relativas de transcritos por debajo del control (DownR) (Tabla 10; Gráfica 8).

Tabla 10. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* de *D. melanogaster*. L3 (72 ± 4 h) tratadas con FBB 1 mM. Intensidad del amplicón obtenida mediante *GelQuant.NET*.

GEN	IA/IB	CR	\bar{X}	GEN	IA/IB	CR	\bar{X}
<i>Actina 42A</i>	0.20975	1	1	<i>Cyp6a23</i>	S/A	0	0
	0.28990	1			S/A	0	
<i>Cyp4d1</i>	S/A	0	0	<i>Cyp6d5</i>	S/A	0	0
	0.00329	0.01			S/A	0	
<i>Cyp4d2</i>	0.04035	0.19	0.14	<i>Cyp6g1</i>	0.22993	1.09	1.13
	0.02929	0.10			0.34009	1.17	
<i>Cyp4d14</i>	S/A	0	0.01	<i>Cyp6w1</i>	0.03448	0.16	0.19
	0.01074	0.03			0.06697	0.23	
<i>Cyp4e2</i>	0.04870	0.23	0.12	<i>Cyp9b2</i>	0.05193	0.24	0.15
	0.00792	0.02			0.02083	0.07	
<i>Cyp6a2</i>	0.03185	0.15	0.09	<i>Cyp9f2</i>	0.17604	0.83	0.64
	0.01419	0.04			0.13225	0.45	
<i>Cyp6a8</i>	S/A	0	0	<i>Cyp12d1</i>	0.02456	0.11	0.07
	0.00329	0.01			0.01263	0.04	
<i>Cyp6a17</i>	0.08701	0.41	0.20	<i>Cyp28a5</i>	0.07442	0.35	0.29
	S/A	0			0.06861	0.23	

IA/IB: Intensidad experimento A/B CR: Cantidad relativa \bar{X} : CR media S/A: Sin amplicón



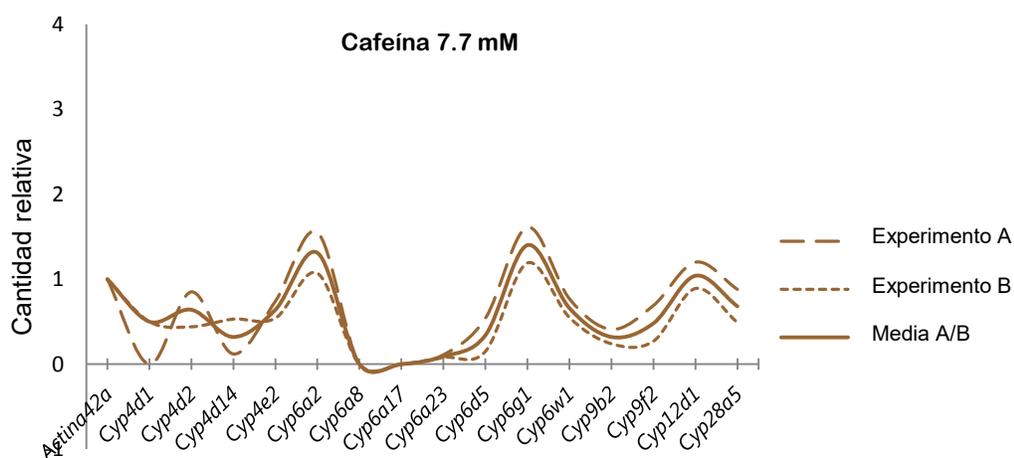
Gráfica 8. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* en relación al gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* tratadas con FBB 1 mM.

Control positivo: CF 7.7 mM. Los *Cyp450s* que corresponden a lo obtenido por Willoughby, et al. (2006) son: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1* y *Cyp12d1*; pero también se obtuvo la expresión de otros seis genes: *Cyp6a23*, *Cyp9b2*, *Cyp28a5*, *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, y *Cyp9f2*. La cantidad relativa de transcritos de *Cyp6a2* y *Cyp6g1* se encontró por arriba del gen constitutivo, fueron 1.31 y 1.40 de *actina42A*, respectivamente. El nivel de expresión de *Cyp12d1* fue como el del control (1.04 de *actina 42A*) (Tabla 11; Gráfica 9).

Tabla 11. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* de *D. melanogaster*. L3 (72 ±4 h) tratadas con CF 7.7 mM. Intensidad del amplicón obtenida mediante *GelQuant.NET*.

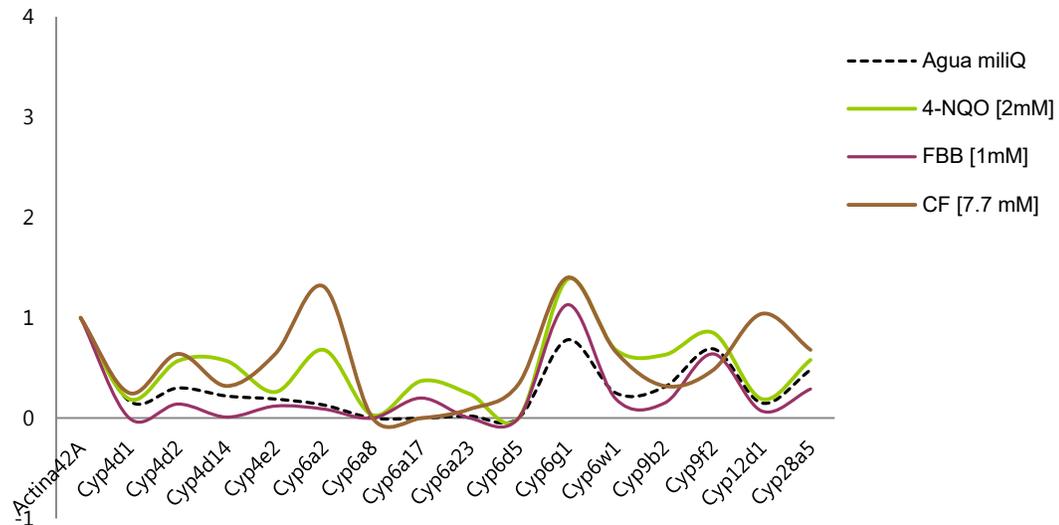
GEN	IA/IB	CR	\bar{X}	GEN	IA/IB	CR	\bar{X}
<i>Actina 42A</i>	0.08962	1	1	<i>Cyp6a23</i>	0.01075	0.11	0.09
	0.12894	1			0.01145	0.08	
<i>Cyp4d1</i>	S/A	0	0.25	<i>Cyp6d5</i>	0.04879	0.54	0.34
	0.06460	0.50			0.02020	0.15	
<i>Cyp4d2</i>	0.07652	0.85	0.64	<i>Cyp6g1</i>	0.14450	1.61	1.40
	0.05737	0.44			0.15386	1.19	
<i>Cyp4d14</i>	0.01162	0.12	0.32	<i>Cyp6w1</i>	0.06949	0.77	0.66
	0.06893	0.53			0.07160	0.55	
<i>Cyp4e2</i>	0.06652	0.74	0.64	<i>Cyp9b2</i>	0.03675	0.41	0.32
	0.06992	0.54			0.03182	0.24	
<i>Cyp6a2</i>	0.13972	1.55	1.31	<i>Cyp9f2</i>	0.06273	0.69	0.48
	0.11867	1.07			0.03510	0.27	
<i>Cyp6a8</i>	S/A	0	0	<i>Cyp12d1</i>	0.10804	1.20	1.04
	S/A	0			0.11546	0.89	
<i>Cyp6a17</i>	S/A	0	0	<i>Cyp28a5</i>	0.07943	0.88	0.68
	S/A	0			0.06352	0.49	

IA/IB: Intensidad experimento A/B CR: Cantidad relativa \bar{X} : CR media S/A: Sin amplicón



Gráfica 9. Cantidad relativa de transcritos de *Cyp450s* en relación al gen constitutivo *actina 42A*. L3 (72 ±4h) de *D. melanogaster* tratadas con CF 7.7 mM.

Se interpolaron las cantidades relativas medias del 4-NQO 2 mM en el análisis de los controles positivos FBB 1 mM y CF 7.7 mM, de lo cual, mediante ANOVA ($\alpha = 0.05$) y la prueba de Fisher (LSD = 0.2602), se determinó que la cantidad relativa de los transcritos de *Cyp450s* aumentó significativamente en L3 (72 ±4h) tratadas con CF 7.7 mM; seguidas de las expuestas a 4-NQO 2 mM; sin embargo, con FBB 1 mM, las cantidades relativas permanecieron sin cambios respecto a las basales, tal y como lo reporta Willoughby et al. (2006) a esta concentración (Gráfica 10; Tabla 12).



Gráfica 10. Comparación de las cantidades relativas de los transcritos de *Cyp450s*.

L3 (72 ±4h) tratadas con FBB 1 mM, CF 7.7 mM y 4-NQO 2 mM, contra las tratadas con agua miliQ.

Tabla 12. Matriz de diferencias de medias (\bar{Y}) de los controles positivos contra agua miliQ.

Prueba de Fisher o de la Diferencia Mínima Significativa ($\alpha = 0.025$)

	$\bar{Y}_{AGUA}=0.2931$	$\bar{Y}_{FBB}= 0.2518$	$\bar{Y}_{4-NQO}= 0.5137$	$\bar{Y}_{CF}=0.5731$
$\bar{Y}_{AGUA}=0.2931$	-	0.0413	0.2206	0.2800*
$\bar{Y}_{FBB}= 0.2518$		-	0.2619*	0.3213*
$\bar{Y}_{4-NQO}= 0.5137$			-	0.0594
$\bar{Y}_{CF}=0.5731$				-

La Tabla 13, se incluye como una síntesis de la dinámica de los 15 *Cyp450s* estudiados, considerando como expresión basal lo obtenido con agua miliQ, la expresión relativa de algunos *Cyp450s* incrementó significativamente con 4-NQO 2 mM ($p < 0.05$), acetona 2 % ($p < 0.025$) y CF 7.7 mM ($\alpha = 0.025$), sin embargo, no se modificó de manera significativa con FBB 1 mM; además, algunos genes fueron inducidos y/o silenciados, otros no cambiaron respecto a la expresión basal. Así, por ejemplo, analizando la Tabla 13 por filas: *Cyp4d1* fue silenciado en L3 ($72 \pm 4h$) expuestas a FBB 1 mM; pero con CF 7.7 mM, aumentó significativamente. Poniendo por caso al *Cyp6a8*, la expresión de éste sólo fue detectada en larvas tratadas con 4-NQO 2 mM y con acetona 2 %. La expresión relativa de *Cyp6d5* sólo fue detectada con CF 7.7 mM. Todavía cabe señalar que la expresión relativa de *Cyp6g1* incrementó significativamente con 4-NQO 2 mM, acetona 2% y CF 7.7 mM.

Tabla 13. Relación de la expresión relativa de algunos *Cyp450s* (basada en la cantidad relativa media de transcritos) en L3 ($72 \pm 4h$) de *D. melanogaster* expuestas a cinco Xbs.

Gen	Agua Mili Q		4-NQO 2 mM		Acetona 2%		FBB 1 mM		CF 7.7 mM	
<i>Actina 42A</i>	1		1		1		1		1	
<i>Cyp4d1</i>	0.17	●	0.19	=	0.04	↓	0	○	0.25	↑
<i>Cyp4d2</i>	0.30	●	0.57	↑	0.47	↑	0.14	↓	0.64	↑
<i>Cyp4d14</i>	0.22	●	0.57	↑	0.44	↑	0.01	↓	0.32	↑
<i>Cyp4e2</i>	0.19	●	0.26	↑	0.41	↑	0.12	↓	0.64	↑
<i>Cyp6a2</i>	0.13	●	0.68	↑	0.45	↑	0.09	↓	1.31 ^{UpR}	↑
<i>Cyp6a8</i>	0	○	0.03	●	0.01	●	0	=	0	=
<i>Cyp6a17</i>	0	○	0.37	●	0.01	●	0.20	●	0	=
<i>Cyp6a23</i>	0.02	●	0.24	↑	0.01	=	0	○	0.09	↑
<i>Cyp6d5</i>	0	○	0	=	0	=	0	=	0.34	●
<i>Cyp6g1</i>	0.78	●	1.38 ^{UpR}	↑	2.84 ^{UpR}	↑	1.13 ^{UpR}	↑	1.40 ^{UpR}	↑
<i>Cyp6w1</i>	0.25	●	0.68	↑	0.85	↑	0.19	↓	0.66	↑
<i>Cyp9b2</i>	0.31	●	0.63	↑	0	○	0.15	↓	0.32	=
<i>Cyp9f2</i>	0.69	●	0.85	↑	2.41 ^{UpR}	↑	0.64	↓	0.48	↓
<i>Cyp12d1</i>	0.15	●	0.19	↑	0.45	↑	0.07	↓	1.04	↑
<i>Cyp28a5</i>	0.48	●	0.58	↑	1.51 ^{UpR}	↑	0.29	↓	0.68	↑

↑ (aumenta) ↓ (disminuye) ● (inducido) ○ (silenciado) = (expresión basal) UpR (sobrexpresión)

DISCUSIÓN

Miembros de la familia Citocromo P450 de *D. melanogaster*

Mediante el proyecto de secuenciación del genoma se han identificado los *Cyp450s* de *D. melanogaster* (incluyendo cuatro pseudogenes) (Sztal *et al.*, 2007); en el presente estudio se extrajeron 61 secuencias de *Flybase* que conforman las familias implicadas en el metabolismo de Xbs: Cyp4, Cyp6, Cyp9, Cyp12 y Cyp28 (Feyereisen, 2005; Willoughby *et al.*, 2006). De acuerdo a Tijet *et al.* (2001); aproximadamente la mitad de las 90 secuencias de *D. melanogaster* pertenecen a sólo dos familias: Cyp4 y Cyp6; de *Flybase* se obtuvieron 22 miembros para la familia Cyp4 y 23 para la Cyp6 (Tabla 1), representando el 47.8% de las secuencias de *Cyp450s* registradas.

Generalmente la identidad entre miembros corresponde al 40 %, sin embargo, existen algunas excepciones a la regla en donde la identidad de aminoácidos de los miembros agrupados en la misma familia es menor y son agrupados como tal, ya que conservan residuos de cisteína (Scott, 2001); mediante nuestra reconstrucción filogenética de las 61 secuencias de *Cyp450s* por el método UPGMA (Figura 7), se pudo observar que las familias Cyp9, Cyp12 y Cyp28 cumplen con la regla del 40 %, y las familias Cyp4 y Cyp6, se encontraron ligeramente por abajo (35.7 % y 37.5 %, respectivamente).

Oligonucleótidos diseñados para *Cyp450s*

Considerando las cinco familias implicadas en el metabolismo de Xbs (Feyereisen *op. cit.*; Willoughby *op. cit.*), fueron diseñados los oligonucleótidos para 15 genes *Cyp450s*: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*, ya que han sido reportados como regulados, principalmente, por FBB y CF en estudios realizados en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* (Willoughby *op. cit.*; Chung *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2006; Boey, 2011). Y también para *Cyp4d1*, *Cyp4d2* y *Cyp9f2*, debido a que han sido sugeridos con posible función desintoxicante en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* (Yang *et al.*, 2007; Chung *op. cit.*), el último *Cyp450* se encuentra recientemente registrado en NCBI *HomoloGene* con un 33 % de identidad con *CYP3A4* de *Homo sapiens*. Así mismo, se diseñó un par de oligonucleótidos para *actina 42A*, empleado como gen constitutivo.

Cambios en la expresión relativa de 15 *Cyp450s* en L3 (72 ±4h) de *D. melanogaster* después del tratamiento con cinco Xbs.

a) Determinación semicuantitativa de los transcritos de *Cyp450s*.

De los geles obtenidos mediante RT-PCR (A y B), se infirió que con 4-NQO 2 mM sólo *Cyp6g1* fue UpR (Figura 11); con acetona 2% los genes UpR fueron: *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9f2* y *Cyp28a5* (Figura 12). En el caso de agua miliQ, la expresión de los 12 genes fue DownR (Figura 13); con el tratamiento por FBB 1 mM sólo *Cyp6g1* fue UpR (Figura 14); y por último con CF 7.7 mM los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* y *Cyp12d1* fueron UpR (Figura 15).

La regulación de los *Cyp450s*, ya sea sobreexpresión (UpR), inhibición (DownR) e incluso expresión basal, afecta significativamente la disposición de Xbs en los tejidos de los organismos, alterando así su efecto farmacológico o toxicológico. En *D. melanogaster*, la UpR de *Cyp450s* resulta en un aumento de los niveles y actividad de la proteína Cyp450 y a su vez en la desintoxicación metabólica de Xbs (p. e. insecticidas) (Yang, 2011).

b) Análisis densitométrico de los transcritos de *Cyp450s* (*GelQuant.NET*).

Para determinar los cambios en el perfil de expresión de los *Cyp450s* después del tratamiento con 4-NQO 2 mM, acetona 2%, agua mili Q, FBB 1 mM y CF 7.7 mM, se compararon las cantidades relativas de transcritos (obtenidas mediante *GelQuant.NET*) de 15 *Cyp450s* con respecto a *actina 42A* en L3 (72 ±4h) de *D. melanogaster*

4NQO 2 mM. La información acerca de los patrones de expresión de *Cyp450s* con 4-NQO es escasa, sólo *CYP1A2* de *Homo sapiens* ha sido reportado (Kranendonk, *et al.*, 2016). Debido a ello, en el presente trabajo, la expresión relativa de los *Cyp450s* obtenidos con 4-NQO 2 mM se validó con los *Cyp450s* expresados con FBB 1 mM y CF 7.7 mM (Willoughby *et al.*, 2006).

Controles negativos. De manera basal 81 *Cyp450s* fueron los expresados en L3 (72 ±4h) de *D. melanogaster* en el trabajo de Chung *et al.*, 2009; los 15 *Cyp450s* estudiados en el presente estudio se encuentran entre ellos y según Chung (*op. cit.*): *Cyp4d1* presenta un patrón de expresión larval en el intestino medio y cuerpo graso; *Cyp4d2* y *Cyp4d14* en intestino medio; *Cyp4e2* y *Cyp6a2* en intestino medio y túbulos de

Malpighi; *Cyp6a8* en túbulos de Malpighi; *Cyp6a23* en intestino medio y túbulos de Malpighi; *Cyp6a17* y *Cyp6d5* en intestino medio; *Cyp6g1* y *Cyp6w1* en intestino medio, túbulos de Malpighi y cuerpo grasoso; *Cyp9b2* y *Cyp9f2* en intestino medio y túbulos de Malpighi; *Cyp12d1* en intestino medio, cuerpo grasoso y túbulos de Malpighi; y por último, *Cyp28a5* en intestino medio.

Con nuestro control negativo, agua miliQ, las L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* presentaron transcritos para 14 de los 15 *Cyp450s* empleados, y sus cantidades relativas se encontraron por debajo del gen constitutivo (Gráfica 3; Tabla 7), resultados que eran esperados en este control.

Por otro lado, la acetona es considerada como un buen inductor de *Cyp450s* (Chan *et al.*, 2014), en vertebrados se ha identificado la inducción del *CYP2E1*; y en insectos, acetona 0.4 % induce siete genes de la familia CYP6 en larvas de tercer y cuarto estadio de *Aedes albopictus* Chan (*op. cit.*), sin embargo, sugieren la realización de más estudios, ya que su trabajo constituye el primer reporte de inducción por acetona. En el presente trabajo, con acetona 2 %, se obtuvieron cantidades relativas de transcritos para 13 de los 15 *Cyp450s* estudiados: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1* (UpR), *Cyp6w1*, *Cyp9f2* (UpR), *Cyp12d1* y *Cyp28a5* (Tabla 6), considerando nuestros resultados como el segundo reporte de inducción por acetona en insectos (Chan *op. cit.*).

4NQO 2 mM vs agua miliQ vs. acetona 2 %. Mediante la prueba SMART, se infiere que el 4-NQO es activado a sus metabolitos genotóxicos por una vía dependiente de los Citocromo P450, ya que generó los tres tipos de manchas en ala de *D. melanogaster*: pequeñas, grandes y totales (cruzas estándar, ST y de bioactivación elevada, HB) (Heres-Pulido *et al.*, 2004; Dueñas-García *et al.*, 2017). En el presente trabajo, con el tratamiento por 4-NQO 2 mM, se obtuvieron cantidades relativas para 14 *Cyp450s*: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*, aunque se descarta al *Cyp4d1*, ya que presentó un perfil de expresión similar al basal (0.17 de *actina 42A* con agua miliQ/ 0.19 de *actina 42A* con 4-NQO 2 mM) (Tabla 13). Entonces, los niveles de expresión de los 13 *Cyp450s*, en comparación con los niveles basales (agua miliQ), aumentaron significativamente ($p < 0.05$) (Gráfica 5; Tabla 9), sin embargo, cabe la posibilidad de que nuestros resultados se

deban al disolvente utilizado (acetona 2 %), ya que la comparación entre el 4-NQO 2 mM y su control disolvente no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.025$) (Gráfica 6; Tabla 19), a pesar de lo obtenido para los genes *Cyp4d1*, *Cyp6a2*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23* y *Cyp9b2* (Tabla 13); y de la comparación de acetona 2 % contra agua miliQ, el incremento en las cantidades relativas fue significativo ($p < 0.025$) en larvas expuestas a acetona 2 % (Gráfica 7). Dichos resultados obtenidos con acetona 2 % (Gráfica 6), concuerdan con Chan *et al.*, (2014), donde explican que emplear acetona como disolvente podría dificultar la interpretación de resultados, ya que la inducción de los *Cyp450s* por acetona en larvas estaría enmascarando la inducción por el compuesto de interés, en este caso del 4-NQO en L3 (72±4h) de *D. melanogaster*.

Controles positivos. FBB 1 mM y CF 7.7 mM se emplearon para validar los oligonucleótidos diseñados a dichas concentraciones según lo reportado por Willoughby *et al.* (2006) en L3 (72±4h) de *D. melanogaster*.

Los *Cyp450s* regulados por tratamiento con FBB 10 mM por 4 h en L3 (72±4h) de *D. melanogaster* son 11: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a23*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5* (Willoughby *op. cit.*). En el presente estudio, a excepción del *Cyp6d5* y *Cyp6a8*, se obtuvieron transcritos de los mismos *Cyp450s* con el control FBB 1 mM, concentración que también fue utilizada por Willoughby (*op. cit.*), además en su trabajo reportan una respuesta de inducción bifásica para *Cyp6a2* y *Cyp6a8*, es decir, durante un periodo de 24 h en que las larvas fueron expuestas a FBB 1 mM, la inducción de estos genes tendió a disminuir, teniendo mayor inducción a las 4 h; en nuestro trabajo las larvas fueron tratadas por 24 horas, lo que podría explicar la ausencia del *Cyp6a8* con este control positivo (Tabla 9; Figura 14). También obtuvimos cantidades relativas de transcritos para otros dos *Cyp450s* (Tabla 9): *Cyp4d2*, registrado en *FlyAtlas* con un alineamiento cercano ($6e-12$) con el *CYP2C8* de *Homo sapiens*, y reportado como involucrado en el metabolismo de algunos fármacos (Lazalde, 2012); y para *Cyp9f2*, que se encuentra actualmente registrado en *Flybase* (2017) y relacionado con el *CYP3A4* de *Homo sapiens*, sin embargo, las cantidades relativas de los 11 *Cyp450s* obtenidas en nuestro trabajo no fueron significativas en comparación con las basales, lo que podría indicar una generalización de respuesta de inducción bifásica con FBB 1 mM (Willoughby *op. cit.*) para los *Cyp450s* que estudiamos.

CF 7.7 mM, regula ocho *Cyp450s* en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster*: *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6d5*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1* y *Cyp12d1* (Willoughby *et al.*, 2006). Siete, excepto el *Cyp6a8*, fueron los obtenidos en el presente trabajo de los ocho reportados por Willoughby (*op.cit*) con el control CF 7.7 mM (Figura 15). Además, se obtuvieron cantidades relativas de transcritos para *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp6a23*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2* y *Cyp28a5* (Tabla 10).

Zhuo (2014) reporta a *Cyp9b2* y *Cyp28a5*, entre otros *Cyp450s*, como genes inducidos por cafeína 8 mM en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster*, incluso en *HomoloGen*, el *Cyp9b2* está registrado con un 32 % de identidad con *CYP3A5* de *Homo sapiens*. Respecto al *Cyp4d1*, está localizado en intestino medio y tejido graso, considerados como principales sitios de MX (Yang *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009); *Cyp4d2*, junto con *Cyp28a5*, están relacionados respectivamente, con el *CYP2C8* y *CYP2C9* de *Homo sapiens*, que además de metabolizar fármacos, están implicados en el metabolismo primario de CF a concentración terapéutica (100 μ M) (Kot y Wladyslawa, 2008); el *Cyp9f2*, está registrado en *HomoloGen* con un 33 % respecto al *CYP3A4* de *Homo sapiens*; y por último el *Cyp6a23*, junto con el *Cyp4d2*, son sobreexpresados en la cepa Canton S de *D. melanogaster* al ser expuesta a concentraciones mayores de CF (16 mM) (Coelho *et al.*, 2015).

La expresión adicional de los seis *Cyp450s* que obtuvimos con CF 7.7 mM (Tabla 10) y que difieren con lo reportado por Willoughby *et al.* (2006), también podría deberse a la diferencia en el tiempo de exposición, en su trabajo las L3 (72 ± 4 h) fueron tratadas por 4 h con CF 7.7 mM, obteniendo ocho *Cyp450s*, y en nuestro trabajo el tratamiento fue por 24 h, obteniendo 13 *Cyp450s*.

Entonces, de lo obtenido con los controles positivos: FBB 1 mM y CF 7.7 mM, conviene subrayar que se obtuvieron cantidades relativas para nueve de los once *Cyp450s* que son regulados con FBB 10 mM (Willoughby *et al.*, 2006), y que resultaron sin diferencias significativas (Tabla 12), corroborando lo obtenido por Willoughby (*op. cit*) a la concentración de 1 mM. Así mismo, se obtuvieron siete de los ocho *Cyp450s* regulados con CF 7.7 mM (Willoughby *op. cit*), con diferencias significativas (Tabla 12); por lo que fue posible validar el diseño de los oligonucleótidos empleados.

CONCLUSIONES

- 1) Con 4-NQO 2 mM las L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* mostraron un aumento significativo de las cantidades relativas de transcritos para: *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6a23*, *Cyp6g1* (UpR), *Cyp6w1*, *Cyp9b2*, *Cyp9f2*, *Cyp12d1* y *Cyp28a5*. No modificó al *Cyp4d1*, e indujo al *Cyp6a8* y *Cyp6a17*, en contraste con los perfiles basales.
- 2) La validación de los oligonucleótidos diseñados se logró mediante la expresión relativa de nueve de los once *Cyp450s* que son regulados por FBB 10 mM y por siete de los ocho que son regulados por CF 7.7 mM.
- 3) Acetona resultó ser un buen inductor de *Cyp450s* en L3 (72 ± 4 h) de *D. melanogaster* que, a pesar de ser un buen disolvente para 4-NQO, podría dificultar la interpretación de los resultados del compuesto principal.
- 4) Con acetona 2% el incremento también fue significativo, se obtuvieron cantidades relativas de transcritos para: *Cyp4d1*, *Cyp4d2*, *Cyp4d14*, *Cyp4e2*, *Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6a17*, *Cyp6g1* (UpR), *Cyp6w1*, *Cyp9f2* (UpR), *Cyp12d1* y *Cyp28a5* (UpR). No modificó a *Cyp6a23*, indujo a *Cyp6a8* y *Cyp6a17*, y el *Cyp9b2* fue silenciado, respecto a los perfiles basales. Considerando lo anterior como el segundo reporte de respuesta a acetona en insectos.
- 5) En el caso de *Cyp4d1*, este disminuyó con acetona 2 %, fue silenciado por FBB 1 mM, y aumentó significativamente con CF 7.7 mM; *Cyp4d2* aumentó significativamente con 4-NQO 2 mM, con acetona 2 % y también con CF 7.7 mM; *Cyp9f2* tuvo un incremento significativo con 4-NQO 2 mM y acetona 2 % (UpR); por último, *Cyp6a17* aumentó significativamente con 4-NQO 2 mM. Lo cual confirma la importancia de estos *Cyp450s* en respuesta a Xbs.

REFERENCIAS

- Abolaji A., Kamdem J. O., Farombi O. & Teixeira da Rocha J. B. (2013). *Drosophila melanogaster* a promising model organism in toxicological studies: A mini review. *Archives of Basic & Applied Medicine*. 1: 33-38
- Adams et al., (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287(5461): 2185-2195.
- Bailleul B. (1984). La cancérogénèse par le 4-Nitroquinoléine 1-oxyde. Étude des modifications des acides nucléiques par le cancérogène ultime. PhD Thèse. L'Université des Sciences et Techniques de Lille.
- Boey, H. K. A. (2011). The regulation and function of the *Drosophila melanogaster* Cytochrome P450 gene, *Cyp12d1*. PhD thesis, Department of Genetics, The University of Melbourne.
- Chan H. H., Wajidi M. F. F. & Jaal Z. (2014). Molecular Cloning and xenobiotic induction of seven novel Cytochrome P450 monooxygenases in *Aedes albopictus*. *Journal of Insect Science*. 14(163): 2-6.
- Chung H., Sztal T., Pasricha S., Sridhar M., Batterham P., & Daborn P. (2009). Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *PNAS*, 106 (14): 5731-5736.
- Coelho A., Fraichard S., Le Goff G., Faure P., Yves A., Ferveur J. F. & Heydel J. M. (2015) Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*. 10(2): 1-15.
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría (2016). Pediamécum. Fenobarbital. [En línea. Consulta: Noviembre, 2017] Disponible en: <http://www.pediamecum.es>.

- Coutiño R., E. M. R. (2011). Defensa química y citocromo P450: Relación con la defensa inmune. *Revista de Investigación Médica de la UV*. 11(2):54-64.
- Donato M., M. T. (2004). ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Anales de Real Academia Nacional de Farmacia*. 32-43.
- Dueñas-García I. E., Vega-Contreras V., Gómez-Luna J. C., Santos-Cruz L. F., Castañeda-Partida L., Durán-Díaz A. & Heres-Pulido M. E. (2005). Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*. 88: 83-89.
- Dueñas-García I. E., Heres-Pulido M. E., Arellano-Llamas M. R., De la Cruz-Núñez J., Cisneros-Carrillo V., Palacios-López C. S., Acosta-Anaya L., Santos-Cruz L. F., Castañeda-Partida L. & Durán-Díaz A. (2017). Lycopene, resveratrol, vitamin C and FeSO₄ increase damage produced by prooxidant carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in *Drosophila melanogaster*: Xenobiotic metabolism implications. *Food and Chemical Toxicology*. 103: 233-245.
- Feyereisen R. (2005). Insect Cytochrome P450. En: Lawrence, I.G. *Insect development: Morphogenesis, moting and metamorphosis*. Elsevier. pp. 563-620.
- Fronza G., Campomenosi P., Iannone R. & Abbondandolo A. (1992). The 4-nitroquinoline-1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Research*. 20(6):1283-1287.
- Gama R. R. (2010). Efeitos de quimioterapia dos ligantes PPAR- γ e dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no proceso de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo uso de 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos Swiss . PhD. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo.
- Giraud M., Unnithan G. C., Le Goff G. & Feyereisen R. (2010). Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. *Pesticide Biochem Physiology*. 97(2):2-7.

- González-Mendoza D. (2007). El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. *Int Contam Ambient.* 23(4): 177-183.
- Good R. T., Gramzow L., Battlay P., Sztal T., Batterham P. & Robin C. (2014). The molecular evolution of *Cytochrome P450* genes within and between *Drosophila* species. *Genome Biology Evolution.* 6(5): 1118-1134.
- Heres- Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Sánchez-García, A., Contreras-Sousa, M., Durán-Díaz, A. & Graf U. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis.* 19(3): 187-193.
- Heres P., M.E & Castañeda S., A.N. (2009) .*Flujo de la información genética. Procesos postraduccionales, ciclo celular, mitosis y meiosis.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 108 p.
- Idle J.R. & González F. J. (2007). Metabolimics. *Cell Metabolism.* 6(5): 349.
- Jezequel M. L. (2009). Developpement d'approches predictives pour l'ingenierie des proteines par evolution dirigee et application au developpement d'une therapie anticancereuse. PhD Thèse. Université Paris Sud-11.
- Jones R. T., Bakker S. E., Stone D., Shuttleworth S.N., Boundy S., McCart C., Daborn P. J., Ffrench-Constant R. H. & van den Helsen J. M.H. (2010). Homology modelling of *Drosophila* cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. *Society of Chemical Industry.* 66: 1106-1115.
- Kakehashi A., Wei M., Fukusima S. & Wanibuchi H. (2013). Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers.* 5(4):1332-1354.
- Kot M & Wladyslawa A. D. (2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological Reports.* 60: 789.797.
- Kranendonk M., Brito-Palma B., Fisher C. W. & Rueff J., 2016. Prototype systems containing human Cytochrome P450 for high throughput Real-Time detection of

DNA damage by compounds that form DNA-reactive metabolites. *Chemical Research in Toxicology*. 1-43.

Kuruganti S. (2006). Studies on *Cytochrome P450* genes in *Drosophila melanogaster*. Relationship between over expression and DDT resistance, and xenobiotic induction. PhD diss. University of Tennessee.

Lazalde B. P. (2012). Polimorfismos de relevancia farmacogenética de las familias 1A2, 2C y 3A en población indígena del noroeste de México. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Durango, México.

Molina-Ortiz D., Camacho-Carranza R., Domínguez-Ramírez A. M. y Vences-Mejía A. (2012) Modulación de la expresión de enzimas del Citocromo P450 hepáticas durante las etapas fetal y pediátrica. *REB* 31(2):60-71.

Monti M. M. (2014). Effects of pentachlorophenol on *Drosophila melanogaster* transcriptome. PhD Thesis. University of Naples "Federico II"

Nakahara W., Fukuoka F. & Sugimura T. (1957). Carcinogenetic action of 4-Nitroquinoline-N-oxide. *Gann*. 48: 129.

Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyerisen R., Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K., & Nerbert D. W. (1993). The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accessions numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biology*.12: 1-51.

Palacios-López, C. S. (2014). Evaluación del efecto del resveratrol en co-tratamiento con 4-NQO en SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar (CE). Tesis de grado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Estado de México.

Pan S.T., Xue D., Li Z.L., Zhou Z.W., He Z.X., Yang Y., Yang T., Qiu J.X., & Zhou S.F. (2016). Computational identification of the paralogs and orthologs of human

Cytochrome P450 superfamily and the implication in drug discovery. *International Journal of Molecular Science*. 17(7): 1-43.

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(1-2): 75-82.

Rodríguez A., R.; A. N., Castañeda S.; M. G. y Ordaz T. (2006). Biotransformación de xenobióticos mediada por los citocromos P450 en *Drosophila melanogaster*. En: *Tópicos de Genética*. E. Pimentel. Universidad Autónoma del Estado de México y Sociedad Mexicana de Genética. 77-94 p.

Ruíz M. & Cano, M. (2013). Eliminación de fármacos. En: Fernández, M. & Ruíz, M. Fundamentos de farmacología básica y clínica. Editorial Universitaria Ramón Areces. pp.192-198.

Scott J. G. & Wen Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Science* 57: 958-967.

Sun W., Margam M. V., Sun L., Buczkowski G., Bennett G. W., Schemerhorn B., Muir W. M. & Pittendrigh. (2006). Genome-wide analysis of phenobarbital-inducible genes in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*. 15(4): 455-464.

Sztaf T., Chung H., Gramzow L., Daborn P. J., Batterham P. & Robin C. 2007. Two independent duplications forming the *Cyp307a* genes in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37 (10):1044–1053.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.

Tijet, N., Helving, C., Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 superfamily in *Drosophila melanogaster*. Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262- 189-198

- Wallenius K. & Lekholm U. (1973). Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Odontologisk Revy Supplement*. 24(1): 39-48.
- Willoughby L., Chung H., Lumb C., Robin C., Batterham P. & Daborn P. J. (2006). A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 934-942.
- Wang SP, He GL, Chen RR, Li F, Li GQ. 2012. The involvement of cytochrome P450 monooxygenases in methanol elimination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol*. 79(4-5): 264-75.
- Yang J., McCart C., Woods D. J., Terhzaz S., Greenwood K. G., Ffrench-Constant R. H. & Dow, J. A. T. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics*. 30(3): 223- 231.
- Yang T. & Liu N. (2011). Genome analysis of Cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE 6(12): e29418. [En línea. Consulta: Noviembre, 2017.] Disponible en: www.plosone.org.
- Zhuo R. (2014). Caffeine sensitivity in *Drosophila melanogaster*. PhD thesis. University of Alberta. Department of Biological Scien

ANEXOS

ANEXO I

FASE II DEL MX

Esta fase se lleva a cabo en el citosol, donde el Xbs o los metabolitos generados durante la fase I se conjugan con sustancias endógenas como: glucoronato, glutatión, sulfato acetato y aminoácidos, mediante la unión con los grupos reactivos de estos (hidroxilo, amino, carboxilo, epóxido, halogenuro, etc). Las reacciones de conjugación son llevadas a cabo principalmente por transferasas y conjugasas, siendo más común la glutatión-S-transferasa (GST), cuyos conjugados son eliminados por la bilis, y en menor media por la orina (Frédéric *et al.*, 2005).

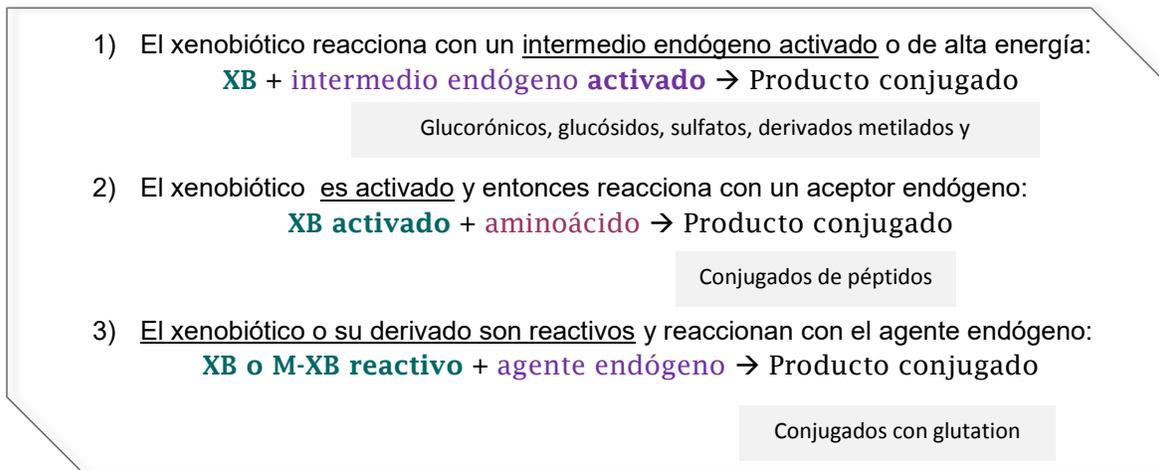


Figura 16. Tipos de reacciones de conjugación (Fase II), según el mecanismo.

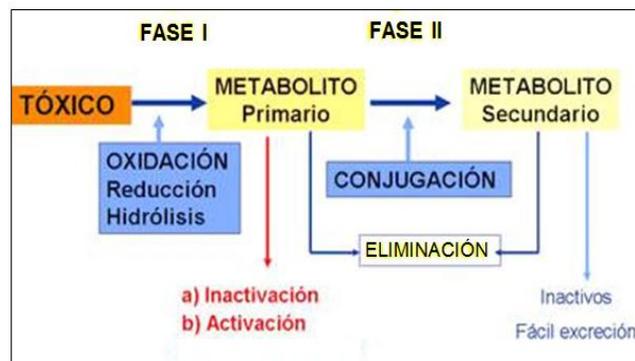


Figura 17. Esquema general del metabolismo xenobiótico.

PRODUCTOS DE LA SECUENCIACIÓN DE LOS *Cyp450s* DISEÑADOS

Los productos (amplicones) fueron obtenidos mediante la amplificación de DNAg de *D. melanogaster* y los 16 oligonucleótidos diseñados (*Cyp450s* y *actina 42A*). Las Figuras 19 y 20 se anexan como ejemplo de los amplicones generados mediante el oligonucleótido directo (Fw) y reverso (Rv) del *Cyp4d1* de *D. melanogaster*, respectivamente. En cada figura se observa la proporción de las cuatro bases indicada en cada posición de la secuencia.

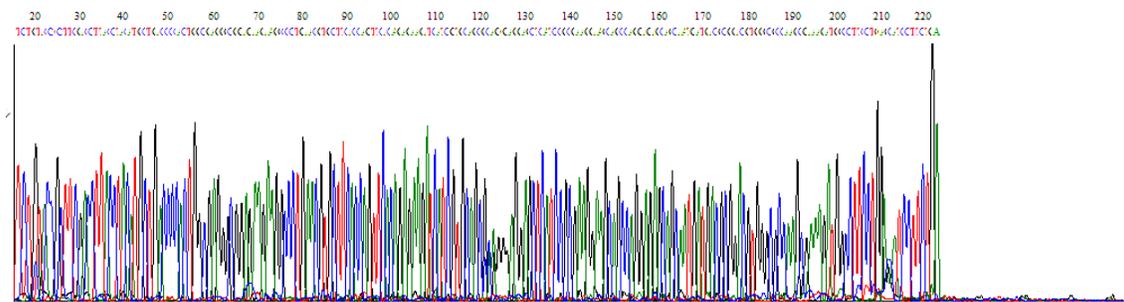


Figura 19. Secuencia completa del *Cyp4d1* de *D. melanogaster*. Amplicón generado por el oligonucleótido directo (*Cyp4d1* Fw).

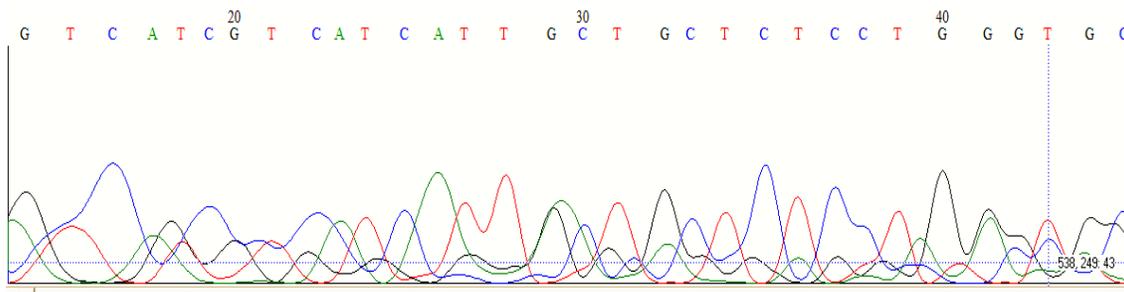


Figura 20. Secuencia parcial del *Cyp4d1* de *D. melanogaster*. Amplicón generado por el oligonucleótido reverso (*Cyp4d1* Rv).

SECUENCIAS CONSENSO

Se obtuvieron mediante el alineamiento múltiple (*Clustal W*) de ambas secuencias de amplicones que generó cada par de oligonucleótidos diseñados (secuenciación, ANEXO III). En sombreado se indican las secuencias de los oligonucleótidos diseñados.

Actina 42A**Actina 42A Directo**

GTCCCTGGAGAAGTCGTACGAGTTGCCCGATGGACAGGTCATCACCATCG
 GAAATGAGCGATTCCGTTGCCCCGAATCGCTGTTCCAGCCGTCGTTCCCTC
 GGCATGGAGGCCTGGCATTACGAGACCACCTACAACCTCAATCATGAAGT
 GTGACGTCGACATCCGTAAGGAT**CTGTACGCCAACACTGTGC**

Actina 42A Reverso complementario**Cyp4d1****Cyp4d1 Directo**

CGGTGAAGACCATATCAATGGTGCTGCACAAGCGGATGTTCAACATTCTG
 TACCGCTTCGACCTTACCTACATGCTGACCCCACTGGCGAGGGCGGAGAA
 GAAGGCCCTGAACGTGCTCCAGCAGTTCACAGAGAAGAGCATTGTCAGCG
 CAGGGAGGAGATCATCCGCGAAGGAAGCAGCCAGGAGAGCAGCAATGATG
 ACGCGGACGTGGGCGCCAAGCGAAAGATGGC**CTTCCTGGACATCCTTCTG**

Cyp4d1 Reverso complementario**Cyp4d2****Cyp4d2 Directo**

AAAATCCCAATCTGCCCTATGTCCAGGCTGTCAATGAGTGAGTGTAATGA
 TAGGTGCAATCCCCACAGTTCTGATGAATTCTTCCTTGTGACAGTGTAC
 CAACATCTTGATTAAACGTTTTATCCACGCTTGGCAGCGGGTGGACTGGA
 TTTTCCGGCTAACGCAGCCAACAGAAGCTAAACGCCAGGACAAAGCTATC
 AAGGTAATG**CACGACTTTACCGAGAACATT**

Cyp4d2 Reverso complementario**Cyp4d14****Cyp4d14 Directo**

ATGTGCTGCTGAAGTCCACCATCGATGGGGCTCCGTTGAGCAACGACGAC
 ATCCGCGAGGAGGTAGACACCTTCATGTTTCGAGGGTCATGACACTACGAC
 CAGTAGCATTGCTTTTACCTGTTATTTGCTGGCTCGACATCCTGAGGTTT
 AGGCTCGCTCTTCCAGGAGGTCAGAGATGTTATCGGTGATGACAAGTCG
 GCTCCAGTTACTATGAAGCTACTCGGCGAGCTCAAGTACTTAGAGT**GCGT**
GATAAAGGAGTCTCTG

Cyp4d14 Reverso complementario

Cyp4e2 Directo

Cyp4e2

ATTCATACTCAGCAGTCAGACGCTGATCACAAAGTCCGACATTTATCAAC
TAACACACCCCTTGGCTGGGATTAGGTCTCCTCACCAGTACTGGCAGCAA
TGGCATAAACACCGCAAGATGATCACCCAGCATTCACCTTCAACATCCT
GCAGGACTTC**CACGAGGTGATGAACGAGA**

Cyp4e2 Reverso complementario

Cyp6a2 Directo

Cyp6a2

ACGGAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGGCTGACGCCGACTTTCACC
TCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTGTCTGAGGAGTTCG
TCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCCAGAACGGCGCTGTGCTCGAGATC
AAGGAGCTGATGGC**CAGGTTACCACCGATGTG**

Cyp6a2 Reverso complementario

Cyp6a8 Directo

Cyp6a8

ATACTGATTAAGGACTTCTCGAATTTCTCGAACAAAGGGTATATTTCTACAA
TGAAAAAGATGATCCCATTTCTGCCCATCTCTTCAATCTGGACGGTGCCC
AGTGGCGTTTGTTAAGGAACAAATTATCATCGACCTTTACATCCGGTAAA
ATGAA**GTTAATGTATCCGACCGTAG**

Cyp6a8 Reverso complementario

Cyp6a17 Directo

Cyp6a17

GAGTCTTCTACAACGAGATCGATGATCCGCTGTCCGGCCACCTTGTTCAGC
ATCGAGGGTCAGAAGTGGCGTCATCTGCCGCACAACTGACACCCACTTT
TACGTCCGGCAAAATGAAGAACATGTTTCCGATTGTTGTGAAAGTTGGAG
AAGAAATGGATAAGGTCTTCAGAAGTAAAACCGCTGCCGATCGGGGTCAA
GTTTTGGAG**GTTGTGGATCTGGTGGCAC**

Cyp6a17 Reverso complementario

Cyp6a23 Directo

Cyp6a23

TTGATCGCACTTCTAGTGTGTCACTGCTTTTGTTCATGGCCCGCCGACGTCA
TGGATACTGGCAGAGGCGGGGTATTCGCACGATGTGCCCCATCCAATAT
ACGGAAACATGAAGGACTGGCCCAAGAAGCGACACATTGCGATGATCTTC
CGGGACTACTATACAAAGTACAAACGTTCCGTTTATCCGTTTGCCGGGTT
CTACTTCTTTTTTACC CGGT**TGCTGTCATCACC GACTTG**

Cyp6a23 Reverso complementario

Cyp6d5

***Cyp6d5* Directo**

TTGGACTGGATGTTGATAGCTTTGCCGATCCCAACAACGAATTCCAGGTT
ATTAGCAAAAAAGTGAATCGTAACAACATTGAAGATATTATTTCGTGGAAC
ATCTAGTTTCTGTATCCCGGGTAAGTTGAAGGTGGACTTTATAGACTTT
ATAATTAAACATAAAACCTATATCTTTCAACCATTTGCAGGCTGGAGAAA
TTCTTTGTGAAAATCGGCTGGAAACAGGAGGCCACCGAAAGAATGCGCGA
GTTGTCCAATCCGAAACCGTCGAT**CTCAGGGAACAGAACAATATA**

***Cyp6d5* Reverso complementario**

Cyp6g1

***Cyp6g1* Directo**

GAGCTGAAGCCGTTCTACGACTACACTCTCGAGAACGGAACCCCTGTGT
TCATACCCATCTATGCACATGCATCATGATCCAAAGGTATTCATCACATT
GAGAAGTTCATAAGCCCCCTCCTCTAACTATCTGGTTATTCCTAGTACTG
GACCAATCCCAGCCAATTTCGATCCGGAGCGTTTCTCACCCGCGAACCGCA
AGAACATAGTGGCCAT**GGCATATCAACCCTTTCGGAT**

***Cyp6g1* Reverso complementario**

Cyp6w1

***Cyp6w1* Directo**

CTTGGACTACTTATGTGCCAGGCAGCTGTTTTTTCAGACCGCCGGATTTG
AACTAGTGCCTCCACAATGACGATGACGCTTACGAGCTGGCCAAGAAC
GAGGCTTACAGGACCGTCTGCGGCAAGAGATCGTTGACTTCTTCGGGGA
CGAGGACCATATAAGCTATGAGCGTATTTCAGGAGATGCCCTACCTATCTC
AGGTTG**TCAACGAGACACTCCGCAA**

***Cyp6w1* Reverso complementario**

Cyp9b2

***Cyp9b2* Directo**

TCGTCCTTCCAGAGACAACTCACCGAGTTCTACGAACGCACTCGTCAACA
GTGAGTAGTTATGCGCCTGACTTCCAGTTGTTCAAACGCTAACAGACTGC
TTATCTGAATGCAGCAAACCTGGTGGGCTTCTTCAATATGCGCACACCTAT
GATCACGCTAAACGACCCGGAGCTGATCAAAAAGGTCTGCGTAAAGGACT
TTGACCACTTCCCCAACCACCAGCCCTTCATCACCTCCAACGATCGCCTG
TTCAACGACATGC**TCAGCGTGATGAGGGACC**

***Cyp9b2* Reverso complementario**

Cyp9f2

***Cyp9f2* Directo**

CTCTGAGTCCGGCATTTACAGGCAGCAAAAATGCTTTGGCACTGTTTCAGCTG
ATGACCAGGTGGCCAAGGAGGCCGTGGACTGTCTTAAGCAGGATGATTCA
AGGGTTCAGGAGAATGAACTGGACATGAAGGACTACTGCACACGAT**TCAC**
CAATGATGTGATCGCC

***Cyp9f2* Reverso complementario**

Cyp12d1

***Cyp12d1* Directo**

TTGACCTCTTCCAGACCTCGAGGGATATTTTCCGTCTTCCATTTAGCTA
GACATTCAGCCCTCCTGTGGAAGATCATATCGACGCCACCTACAGGAAA
ATGA**AGCGAACTCTCAATGACAGT**

***Cyp12d1* Reverso complementario**

Cyp28a5

***Cyp28a5* Directo**

TGGGTCGTAATAAGGAGGACACAGAATCTTCTGCGAGAGGAGATTTCGTTT
CCATCTGCAGGATGGCACCATTGCCTTTGAAAAGCTTAGCGATTTGCCCT
ACCTGGACGCTTGTGTGCAGGGTAAATTAATAATTTTTCAAGCTGCAAT
TATTGTTTTTAACCGTATTTACCCATTTATTTTATAGAAACCATCCGACT
CTTCCCGCCCGATTTATGTGGAATAAACTGTGCACCGAATCCATCGAGA
TTCCCAACAGGGAAGGTCCCAACTTCGTCTGTTGGAGAAGGGCACCCTGTG
GTTGTACCTCACTACTGCTTCA

***Cyp28a5* Reverso complementario**