



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Inducción de cuatro genes (*Hsp26*, *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*)
en moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* (Canton-S)
tratadas con 4-nitroquinolina 1-óxido, fenobarbital y
cafeína.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAFAEL RAMÍREZ VALENTE



DIRECTOR DE TESIS
ELÍAS PIEDRA IBARRA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

- *A mi mamá, Adriana Valente, quien ha estado apoyándome incondicionalmente durante toda mi vida, es una de las personas más fuertes que conozco y una gran fuente de inspiración y admiración. Su apoyo y confianza me ha dado la fuerza para seguir adelante y llegar a este punto.*
- *A mi papá, Guillermo Ramírez, cuyas enseñanzas y ejemplo me mantienen con los pies en la tierra. Su honestidad y seriedad son cualidades a las que aspiro, que me motivan a mejorarme y explorar nuevos caminos.*
- *A mi hermana Andrea, con quien, a pesar de nuestras peleas entre hermanos, siempre podremos contar el uno con el otro. ¡Te amo chamacita!*
- *Agradezco a mi prima Gaby y mi tía Momi, quienes siempre han estado conmigo y me han apoyado durante toda mi vida, con grandes risas y en los momentos importantes.*
- *También agradezco a Sonia Ramírez, quien me ha apoyado desde que comenzamos a trabajar juntos, gracias por las incontables tazas de café, las películas y los coscorrones a lo largo del camino, eres una persona muy especial.*
- *Gracias a mis grandes amigos Luis, Fanny, Kary y Roberto, con los que tuve toneladas de risas, ñeñadas y consejos durante estos años, conocerlos brindó alegría en momentos difíciles.*
- *Dojo mi agradecimiento también al doctor Ehas Piedra, quien me dio la oportunidad de realizar un proyecto tan ambicioso como este, sus enseñanzas y experiencia en el laboratorio siempre serán referente en mi vida profesional. Además, agradezco también a mis sindicales, las maestras Laura, Irma, María Eugenia y el maestro Luis, quienes siempre creyeron en mí, incluso en momentos en donde yo mismo no lo hice, su confianza, amabilidad y consejos serán siempre un gran recuerdo durante toda mi vida.*
- *Gracias también a Anabel y a los maestros Rafael Quintana y Josefina Vázquez, quienes siempre hicieron un gran ambiente de trabajo, y me ofrecieron siempre apoyo y amistad cuando me encontraba en aprietos.*

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| El estrés oxidativo en los sistemas vivos | 1 |
| Respuesta al estrés oxidante | 2 |
| Familia de las HSP pequeñas (Small Heat Shock Proteins o sHSP) . | 3 |
| Familia de HSP60 | 4 |
| Familia de HSP70 | 6 |
| Familia de las HSP90..... | 7 |
| Metabolismo y propiedades químicas de los compuestos: 4-NQO, fenobarbital y cafeína | 8 |
| 4-NQO | 8 |
| Fenobarbital | 11 |
| Cafeína..... | 12 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> en estudios toxicológicos | 13 |
| HIPÓTESIS | 14 |
| OBJETIVOS | 14 |
| METODOLOGÍA | 15 |
| Propagación e incubación de la línea | 15 |
| Sincronización, colecta de huevos y recuperación de las larvas | 15 |
| Tratamientos..... | 15 |
| Diseño de oligonucleótidos específicos | 16 |
| Extracción de ARN total..... | 16 |
| Síntesis de ADN complementario (ADNc) y estandarización de las condiciones de amplificación | 17 |
| Análisis semicuantitativo..... | 17 |
| Pruebas estadísticas..... | 17 |
| RESULTADOS | 18 |
| Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para las HSPs | 18 |
| Extracciones de ARN total | 19 |
| Síntesis de ADNc y estandarización de las condiciones de amplificación .. | 20 |
| Niveles relativos de transcritos de genes que codifican HSPs | 21 |
| Tratamiento con Agua Mili-Q..... | 21 |
| Tratamiento con Fenobarbital [1 mM]..... | 22 |

| | |
|---|----|
| Tratamiento con Cafeína [7.7 mM] | 23 |
| Tratamiento con Acetona [2%] | 23 |
| Tratamiento con 4-NQO [2 mM] | 24 |
| Análisis estadístico | 25 |
| Cantidades relativas de transcritos codificantes entre tratamientos | 26 |
| DISCUSIÓN | 29 |
| Cafeína | 29 |
| Fenobarbital..... | 30 |
| 4-NQO | 30 |
| CONCLUSIONES | 32 |
| LITERATURA CITADA | 33 |
| ANEXO | 47 |

RESUMEN

Los organismos poseen varios sistemas que mitigan el daño generado por el estrés oxidante, uno de los más importantes es la modulación de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) que permiten reestablecer la proteostasis. Se evaluó la capacidad de generar daño oxidante con 4-NQO [2 mM], un promutágeno y de dos compuestos genotóxicos (cafeína [7.7 mM] y fenobarbital [1 mM]) utilizando como indicadores la inducción transcripcional de cuatro genes *Hsp* (*Hsp26*, *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*) como marcador. No se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles de transcripción inducidos como respuesta a los tratamientos, sin embargo, se observó que al tratar larvas con 4-NQO, hay una disminución en los niveles de los transcritos de *Hsp83* comparados con el control negativo, el resultado contrasta con los observados en los tratamientos con cafeína y fenobarbital, en los cuáles se observaron aumentos de los niveles de transcritos de este gen.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo en los sistemas vivos

Los organismos se encuentran bajo la exposición constante a una miríada de factores con la capacidad de ocasionar daño celular y generar estrés oxidante. Éste, está definido como la desestabilización de la respuesta antioxidante y factores pro-oxidantes ([Yoshikawa y Naito, 2002](#)); estas alteraciones celulares pueden provenir de fuentes endógenas como la fosforilación oxidativa ([De Bont y van Larebeke, 2004](#)) o exógenas como radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas (UV), contaminación ambiental, exposición a químicos y estados de hiperoxia ([Azzam et al., 2012](#); [Church y Pryor, 1985](#)). Estas fuentes de daño oxidante propician la formación de especies reactivas (ERs), entre las que se encuentran algunos radicales libres ([Lushchak, 2014](#)). El desbalance y exceso de ERs está involucrado en la carcinogénesis y mutagénesis ya que pueden ocasionar rupturas en la estructura de ácidos nucleicos, la agregación de proteínas o la inhibición de la actividad enzimática ([Waris y Ahsan, 2006](#); [Jena, 2012](#)).

Existen distintos tipos de ERs, pero las de oxígeno (EROs) son las más estudiadas debido a la ubicuidad de la molécula ([Ozcan y Ogun, 2015](#); [Constanza y Muñoz,](#)

[2012](#)); las especies reactivas de oxígeno son generadas como parte de procesos metabólicos inherentes al organismo y por la acción de xenobióticos ([Finkel y Holbrook, 2000](#); [Valavanadis et al., 2006](#)), forman parte importante de la señalización celular y la respuesta inmune. El mantenimiento del balance conlleva procesos complejos que son mediados por enzimas como las NADPH-oxidasas ([Adam-Vizi y Chinopoulos, 2006](#); [Balch et al., 2008](#); [Halliwell, 2007](#)), que inducen un aumento rápido en la concentración de EROs intracelular formando H₂O₂ y superóxido (O₂⁻), para el denominado estallido respiratorio ([Wientjes y Segal, 1995](#)) que forma parte de los mecanismos de eliminación de elementos ajenos al organismo.

Respuesta al estrés oxidante

La pérdida del balance de EROs requiere la acción de mecanismos para mitigar el daño oxidante y reestablecer la homeostasis ([Sharma et al., 2012](#)), la respuesta al choque térmico (HSR) forma parte de estos mecanismos y mediante la modulación de la expresión de los genes que codifican las proteínas de choque térmico (HSP) permite mantener la homeostasis proteínica (proteostasis) ([Schöffl et al., 1998](#)). Estas proteínas son conocidas como HSPs por las condiciones bajo las que fueron descubiertas y son moléculas de gran importancia en la respuesta antioxidante debido a su amplia distribución, además de las diversas acciones en procesos celulares. Poseen funciones como chaperonas en la translocación de proteínas ([Hendrick y Hartl, 1993](#)), señalización ([Pratt y Toft, 2003](#)), intervención en rutas apoptóticas ([Arya et al., 2007](#)), inhibición de interacciones erróneas entre proteínas y correcciones del plegamiento (reestructuración nativa) de cadenas polipeptídicas ([Hartl et al., 2011](#)). Fueron descubiertas en 1962 por el biólogo italiano [Ferruccio Ritossa](#), quién, al investigar la respuesta al calor de cromosomas politénicos de células salivales en moscas de la fruta *Drosophila melanogaster*, observó sitios de transcripción de ARN (abultamientos cromosómicos o “puffs”) y, no fue sino hasta poco más de una década después que [Tissieres, et al., \(1974\)](#) les dieron nombre a las proteínas responsables de esta respuesta.

Ahora se sabe que la transcripción de estos es inducida también por el estrés oxidante ya que el exceso de moléculas reactivas tiende a generar modificaciones en la estructura nativa de proteínas, alterando la proteostasis (Kalmar y Greensmith, 2009).

Las Hsp son clasificadas en cinco familias dependiendo de su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las HSP pequeñas (sHSP) (Saibil, 2013); cada familia tiene características que las distinguen ya que están involucradas en distintos roles dentro del metabolismo celular (Coronato *et al.*, 1999) y están asociadas con moléculas asistentes específicas (co-chaperonas) (Caplan, 2003).

➤ Familia de las HSP pequeñas (Small Heat Shock Proteins o sHSP)

Reciben este nombre debido a que tienen los pesos moleculares más bajos entre las HSPs (12-42 kDa) (Southgate *et al.*, 1983); son chaperonas encontradas en una gran cantidad de organismos y están caracterizadas por la presencia de un dominio “ α -cristalino” (80-100 residuos) localizado entre las regiones C y N terminales, denominado así por la epónima proteína encontrada en los ojos de organismos vertebrados y que permite la solubilización de proteínas (Caspers *et al.*, 1994; Haslbeck *et al.*, 2005).

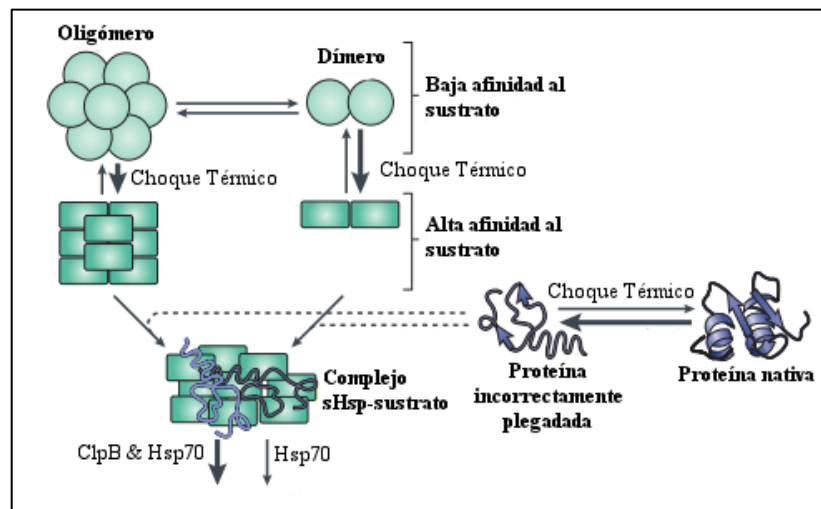


Figura 1. El rol de las sHSPs en la agregación de proteínas está asociado a cambios de afinidad independientes de ATP, permite la interacción con fragmentos hidrofóbicos, formando oligómeros estables que engloban péptidos. Imagen tomada y modificada de Tyedmers *et al.*, 2010.

Las sHSPs son proteínas de producción constitutiva e inducible que se encuentran en todos los estadios de la mosca de la fruta *D. melanogaster* en ausencia de estrés; se ha reportado que en su forma inducible tienen la capacidad de ser sobre-expresadas en respuesta a alteraciones del balance proteostático ([Franzmann, 2008](#); [Treweek et al., 2015](#)), mientras que las constitutivas se encuentran en cuatro tipos de células somáticas (discos imaginales, epitelio, proventrículo y neurocitos) y en dos tipos celulares de la línea germinal (espermatoцитos y ovocitos) ([Glaser et al., 1986](#)). Se unen a residuos hidrofóbicos expuestos en etapas tempranas de plegamiento erróneo de los péptidos de forma independiente al ATP, previenen su agregación ([Haslbeck y Vierling, 2015](#); [Mchaourab et al., 2009](#)), evitan interacciones erróneas y los mantienen fuera de conformaciones no nativas irreversibles para que otras chaperonas asistan en su correcto plegamiento ([Narberhaus, 2002](#); [Haslbeck et al., 2005](#)).

➤ Familia de HSP60

Sus pesos moleculares están entre 55-60 kDa, están involucradas en la prevención de interacciones no nativas y la corrección de plegamientos erróneos de polipéptidos ([Fenton y Horwich, 1997](#)). Sus funciones son dependientes del ATP y pueden aislar fragmentos no nativos de proteínas para permitir el plegamiento, libre de interacciones externas ([Hartl y Hayer-Hartl, 2002](#)).

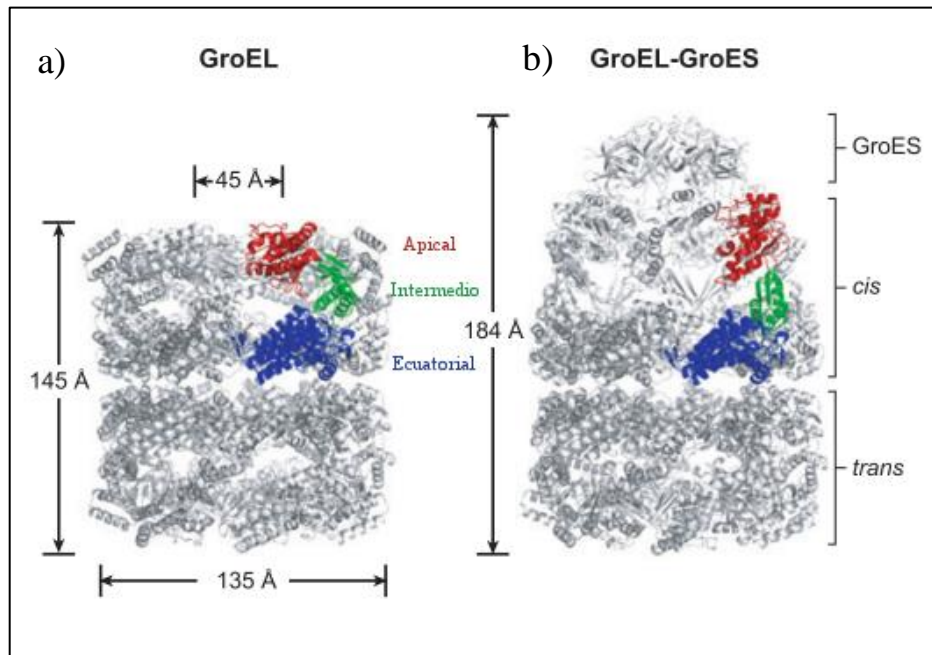


Figura 2. a) Estructura molecular de un integrante de la familia de HSP60 (*GroEL*); los colores representan distintos dominios. b) El complejo *GroEL/GroES* conocido como “jaula de Anfinsen”. Tomado y editado de [Horwich et al., 2007](#).

Forman complejos en conjunto a co-chaperonas específicas de la familia de las sHSPs (*Hsp10* o *GroES*) y actúan secuestrando segmentos de cadenas polipeptídicas que tengan fragmentos hidrofóbicos expuestos al medio celular, manteniéndolas aisladas y evitando interacciones no nativas dentro de un amplio canal central (jaula de Anfinsen) (Fig. 2b) ([Sakikawa et al., 1999](#)). Los residuos hidrofóbicos expuestos interactúan con la superficie hidrofóbica del dominio apical de la chaperonina, formando una unión muy estable ([Bukau y Horwich, 1998](#)); la reacción inicia cuando se unen siete moléculas de ATP al complejo, cerrando la cavidad y encapsulando la proteína ([Walter, 2002](#)). El complejo permite la aceleración del plegamiento espontáneo de la proteína, evitando las interacciones erróneas a través del secuestro y la unión de la proteína con las cargas netas negativas de la superficie de *Hsp60* o *GroES*, de esta manera se mitiga la formación de intermediarios no nativos, capaces de formar agregados ([Horwich et al., 2007](#); [Kim et al., 2013](#)).

➤ Familia de HSP70

Es una de las familias más estudiadas a nivel mundial debido a su presencia en un gran número de sistemas biológicos ([Whitley et al., 1999](#)). Algunas son sintetizadas de manera constitutiva como la “Heat Shock Cognate 70” (gen *Hsc70*), mientras que otras son inducibles de forma casi exclusiva (gen *Hsp70*) ([Patterson y Höhfeld, 2006](#)).

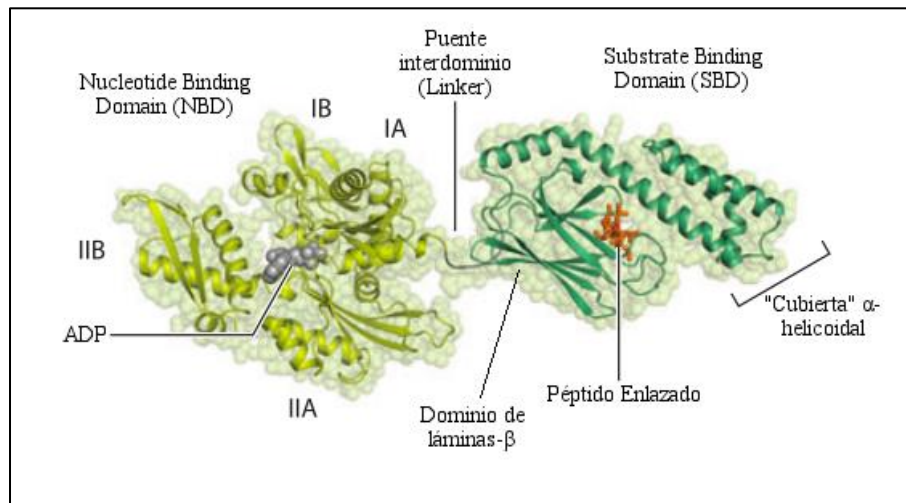


Figura 3. Estructura molecular de la familia de las HSP70 en estado cerrado; están compuestas por dos dominios, *NBD* y *SBD*, conectados por un puente interdominio conservado. Tomado y editado de [Kim et al., \(2013\)](#).

Realizan múltiples funciones que las vuelven indispensables en el mantenimiento de la proteostasis, pueden encontrarse en asociación con los ribosomas y actúan de manera co-traducciona a péptidos, evitando interacciones no nativas, realizan disgregaciones de cúmulos peptídicos, traslocan secuencias polipeptídicas a su sitio de acción, y además están involucradas en el desvío de proteínas no nativas a rutas de la apoptosis ([Lanneau et al., 2010](#)). La proteína actúa mediante ciclos de acoplamiento e hidrólisis de ATP con el dominio *NBD*, lo que ocasiona cambios alostéricos de la afinidad de *SBD* con su sustrato ([Zhuravleva y Gierasch, 2011](#)). Es decir, cuando una molécula de ATP se une al dominio ATPasa (*NBD*), ocasiona que el puente interdominio gire *SBD* abriendo un sitio de unión y aumentando la afinidad por el sustrato, elevando la tasa de disociación ([Kityk et al., 2012](#)); mientras que la hidrólisis y desfosforilación subsecuente a ADP permiten el reajuste de *SBD*, por lo

que el sitio de unión vuelve a cerrarse, disminuyendo la disociación ([Mayer et al., 2000](#)).

➤ Familia de las HSP90

Es una familia muy abundante, constituyen del 1-2% de las proteínas solubles totales encontradas en la célula ([Borkovich et al., 1989](#); [Csermely et al., 1998](#)). Estas proteínas son encontradas en condiciones fisiológicas, pero algunas también son inducibles bajo condiciones de estrés ([Mason et al., 1984](#)). Las proteínas tienen funciones, junto a *Hsp70*, en la maduración estructural y regulación conformacional de proteínas para la transducción de señales; entre sus proteínas clientes se encuentran cinasas, receptores de hormonas esteroideas y algunos factores de transcripción ([McClellan et al., 2007](#); [Pratt, 1998](#)). Su rol en las rutas de transducción es esencial ya que mantienen la actividad de numerosas proteínas gracias a interacciones dinámicas que establecen con co-chaperonas, considerándoseles un eje para la proteostasis ([Li et al., 2012](#)).

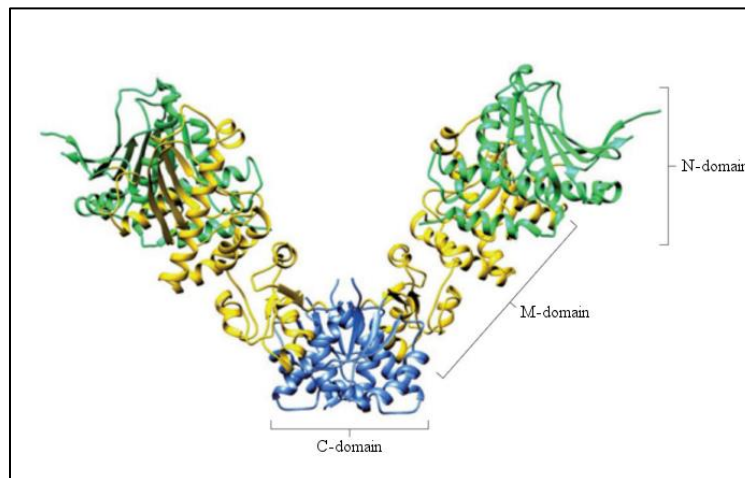


Figura 4. Estructura molecular general de la familia de las HSP90s. *N-domain*: dominio N terminal, *M-domain*: dominio medio, *C-domain*: dominio C-terminal. Tomado y editado de [Saibil, 2013](#).

Metabolismo y propiedades químicas de los compuestos: 4-NQO, fenobarbital y cafeína.

4-NQO

La 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) es un compuesto sintético promutágeno derivado de la quinolina (Fig. 5) con un amplio uso en estudios de cáncer oral debido a su potente actividad carcinogénica, resultado de la interacción con el metabolismo xenobiótico ([Kitano, 2001](#); [Riviera, 2012](#)). Al ser metabolizado tiene la capacidad de generar ERs como radicales superóxido y H_2O_2 que inducen estrés oxidante, dañando macromoléculas y provocando lesiones al ADN ([Nunoshiba y Demple, 1993](#); [Wilkey et al., 2009](#)).

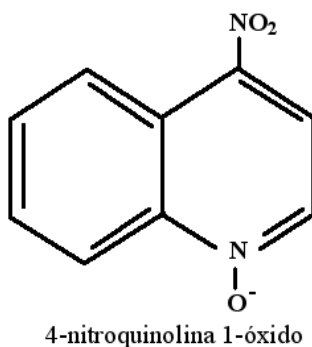


Figura 5. Estructura molecular del 4-NQO.

El compuesto induce un daño similar al ocasionado por la radiación UV ya que promueve la formación de aductos en el ADN ([Nagao y Sugimura, 1976](#)), tras la reducción enzimática de su grupo nitro se propicia la formación de dos moléculas, 4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido (4-HAQO) y 4-aminoquinolina 1-óxido (4-AQO) (Figs. 6a y 6b), de éstas, solamente 4-HAQO es considerada como carcinogénica ([Bailleul et al., 1989](#)). El compuesto es posteriormente acetilado para formar 4-acetoxiaminoquinolina 1-óxido (Ac-4HQO), que puede ser activada por una reacción con seril-tRNA sintetasa y forma un reactante electrofílico que, en presencia de ATP

es capaz de introducir grupos de quinolina al ADN, formando aductos estables ([Tada y Tada, 1975](#); [Galiègue-Zouitina et al., 1985](#); [Nagao y Sigimura, 1976](#)).

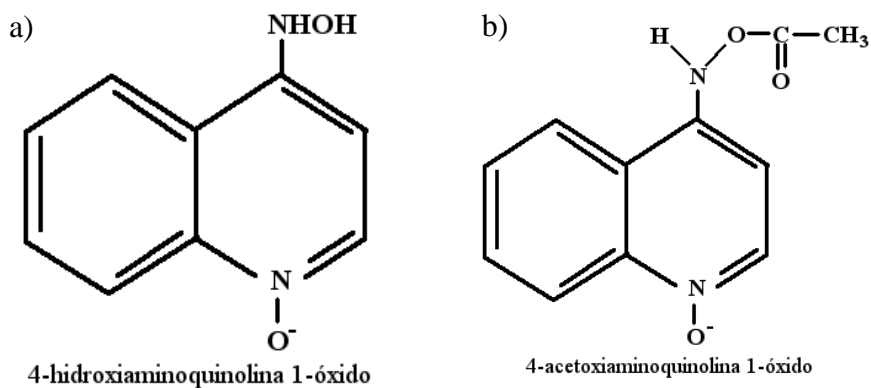
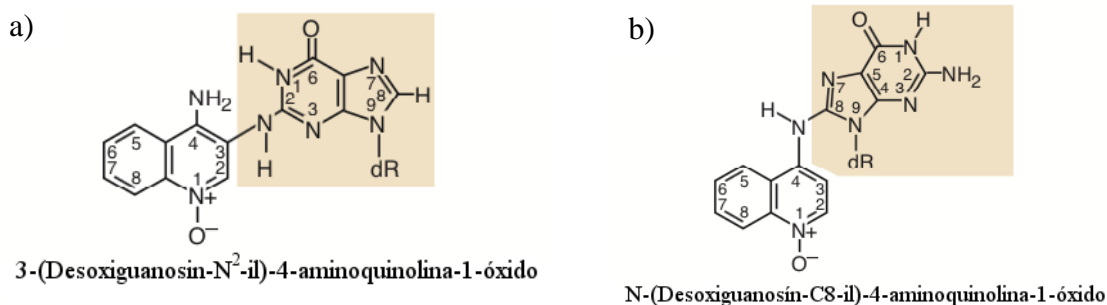


Figura 6. Estructuras moleculares de los metabolitos de 4-NQO.

Los aductos son resultado de reacciones con purinas (guanina y adenina), generando los monoadductos estables de quinolina “3-(desoxiguanosin-N²-il)-4-aminoquinolina-1-óxido”, “N-(desoxiguanosin-C8-il)-4-aminoquinolina-1-óxido” y “3-(desoxiadenosin-N⁶-il)-4-aminoquinolina-1-óxido” (Figs. 7a, 7b y 7c) ([Kohda et al., 1991](#); [Galiègue-Zouitina et al., 1986](#)).



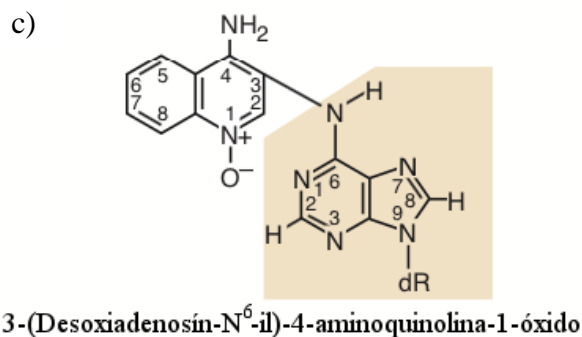


Figura 7. Estructura molecular de los monoadductos estables formados de la interacción de Ac-4HAQO con purinas. Imágenes tomadas y modificadas de [Friedberg et al., \(2006\)](#).

El potencial genotóxico del compuesto ha sido observado en estudios como el de [Gaivão et al., \(1999\)](#) quienes evaluaron el efecto de tres concentraciones [0.25, 0.5 y 0.75 mM] mediante el ensayo SMART en los ojos de *D. melanogaster* con una línea resistente a insecticida (*OR(R)-flr³*) y observaron la presencia de manchas en los ojos, con lo que concluyeron el potencial genotóxico del compuesto, sin embargo, no lograron determinar una correlación lineal entre el daño y las concentraciones utilizadas.

En un trabajo posterior, [Heres-Pulido et al., \(2004\)](#) utilizaron el ensayo SMART en ala para evaluar la toxicidad de dos concentraciones de 4-NQO [2.5 y 5 mM] en las cruza de *D. melanogaster*, bioactivación elevada (HB) y la estándar (ST) con niveles inducibles de Citocromos P450 (Cyp450), en el estudio observaron un aumento dependiente de la concentración en la frecuencia de los tres tipos de manchas por ala para ambas cruza, indicando un efecto mutagénico y recombinogénico, además, observaron que la cantidad de manchas de HB respecto a ST era mayor (~1.7 veces). Concluyeron que el compuesto tiene efecto genotóxico relacionado con el metabolismo xenobiótico.

[Dueñas-García et al., \(2005\)](#) determinaron la toxicidad del compuesto en dos cruza de *D. melanogaster* utilizando cinco concentraciones [0.625, 1.25, 2.5 y 5.0 mM]. Observaron diferencias significativas entre las dosis necesarias para alcanzar la LC₅₀; se necesita una concentración menor del compuesto en *flr³* [2.10 mM] que para *OR(R)-flr³* [3.05 mM], este resultado le fue atribuido a los niveles elevados de

Cyp450s en esta línea y a la reparación recombinogénica derivada del daño de 4-NQO.

Fenobarbital

Es un barbitúrico utilizado en el tratamiento de la epilepsia, principalmente por países en desarrollo debido a su bajo costo ([Radhakrishnan et al., 2005](#)), pero a pesar de su efectividad en la terapia, es conocido por ser un clásico inductor de enzimas del metabolismo xenobiótico (Cyp450, NADPH, GST) e incluso algunos autores han reportado que tiene potencial cancerígeno ([Junqueira et al., 1991](#); [Maglich et al., 2002](#)).

No existe mucha información respecto a la ruta de acción del fenobarbital (FB), pero una hipótesis muy aceptada plantea que tiene interacción indirecta con el complejo “receptor constitutivo androstano-HSP90” (CAR-HSP90), propiciando la traslocación de CAR al núcleo celular ([Yoshinari et al., 2003](#)). CAR forma parte de la superfamilia de los receptores nucleares y se encuentra principalmente en las células del hígado ([Wang et al., 2012](#)). Cuando es traslocada y activada puede regular la expresión de genes de la fase I y II del metabolismo xenobiótico mediante la unión con el “módulo elemento responsivo a fenobarbital” dentro de las regiones promotoras de los genes blanco ([Honkakoski et al., 1998](#)).

El FB está indirectamente involucrado en la regulación de la expresión de algunas proteínas como CYP1A, CYP2B1/2, CYP2A6, CYP3A, CYP2C, CYP6A2, CYP6A8, glutatión transferasas, sulfotransferasas, UDP-glucuronosiltransferasas ([Sugatani et al., 2001](#); [Ferguson et al., 2002](#); [Goodwin et al., 2002](#); [Saini et al., 2004](#); [Wang et al., 2012](#)).

La toxicidad del compuesto fue reportada por [Castañeda-Partida et al., \(2011\)](#), quienes detectaron el efecto genotóxico de FB [12 mM] como pretratamiento en dos cruza de *D. melanogaster* (HB y ST) mediante el ensayo SMART en ala y obtuvieron resultados positivos para la cruza ST en la frecuencia de manchas totales por mosca, casi el doble en comparación con el control negativo.

Cafeína

Es un estimulante del sistema nervioso central encontrado en diversos productos de consumo diario como el café, té y chocolates, además es un analgésico adyuvante incluido en algunos medicamentos para el dolor ([Nehlig et al., 1992](#); [Mandel, 2002](#)). Este alcaloide forma parte de las metilxantinas y actúa como antagonista de los receptores de adenosina en el cerebro; trabajos previos han mostrado una relación dosis-dependiente entre la cafeína y los mecanismos de la respuesta al estrés ([Fisone et al., 2004](#); [Brunquell et al., 2017](#)). Esto se debe a que el metabolismo de la cafeína aumenta los niveles de serotonina, lo que puede actuar como un mecanismo de señalización a la HSR ([van Oosten-Hawle y Morimoto, 2014](#); [Tatum et al., 2014](#)).

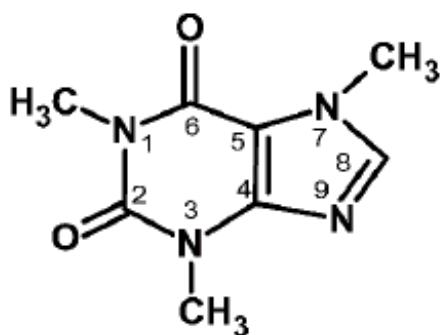


Figura 8. Estructura de la molécula de cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Tomado de [Monteiro et al., \(2016\)](#).

[Nikitin et al., \(2008\)](#) evaluaron el efecto de cuatro concentraciones de cafeína sobre la vida media de moscas *D. melanogaster* adultas de la línea Canton-S, observaron una reducción significativa en la vida de moscas tratadas con las concentraciones más altas [1.25 y 2.5 mg/mL], mientras que las que fueron tratadas con concentraciones menores [0.3125 y 0.625 mg/mL] presentaron niveles similares al control. Por esto concluyeron que hay una relación dependiente de la concentración del compuesto en la disminución de la vida media de las moscas.

Por otro lado, [del Rey et al., \(2011\)](#) utilizaron la respuesta transcripcional de *Hsp70* como marcador molecular para evaluar la toxicidad de la exposición a la cafeína [0.05, 0.2 y 0.5 µg/L] en *Mytilus californianus*; observaron un aumento significativo en la expresión transcripcional sólo en las concentraciones de 0.05 y 0.2 µg/L al

cabo de 30 días, pero únicamente en las branquias del organismo. Con esto concluyeron que la inducción de los transcritos de *Hsp70* depende de la duración del tratamiento y la dosis del compuesto, pero no necesariamente de una manera lineal ya que a la concentración más elevada no se registraron cambios significativos.

***Drosophila melanogaster* en estudios toxicológicos**

La mosca de la fruta *D. melanogaster* es un modelo ideal para la evaluación de compuestos genotóxicos ya que posee rutas metabólicas similares y homología genética con el ser humano ([Abolaji et al., 2013](#)), entre 65 y 70% de los genes involucrados con enfermedades humanas se encuentran presentes en este díptero ([Pandey y Nichols, 2011](#)), además posee un tiempo de desarrollo corto (aprox. 10 días a 25°C), no necesita de un medio de cultivo de alto costo y permite recuperar un gran número de organismos sin la necesidad de infraestructura compleja ([Graf et al., 1992](#)).

El tiempo necesario para completar el ciclo de vida de la mosca es de 10 días a una temperatura promedio de 25°C. En un período de 24 h posterior a la puesta de huevos, las larvas eclosionan y atraviesan tres estadios en el transcurso de los tres días; durante la etapa tardía del tercer estadio (L3) abandonan la fuente de alimento y presentan un proceso de pupación durante el cual reabsorben muchos órganos de sus etapas tempranas y atraviesan metamorfosis, para finalmente emerger como moscas adultas ([Wangler y Bellen, 2017](#)) (Fig. 9).

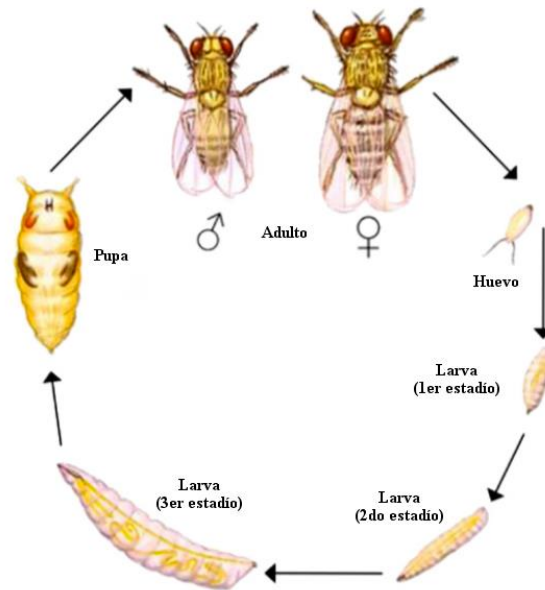


Figura 9. Ciclo de vida de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

HIPÓTESIS

El desbalance entre la formación y eliminación de las EROs provoca daño oxidante que puede alterar la proteostasis celular, por tanto, si se tratan larvas de *Drosophila melanogaster* con compuestos como 4-NQO, cafeína o FB, cuyo metabolismo puede propiciar la formación excesiva de radicales oxidantes, habrá también una modificación de la actividad transcripcional de los genes que codifican las HSP que actuarán para restaurar la proteostasis.

OBJETIVOS

Determinar los niveles de expresión relativa de cuatro genes codificantes de proteínas de choque térmico (*Hsp26*, *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*) en larvas *D. melanogaster* de tercer estadio (72 ± 4 h) expuestas a 4-NQO [2 mM], cafeína [7.7 mM] y FB [1 mM].

Determinar si existen diferencias estadísticas entre los transcritos de los genes de interés en las larvas tratadas y los vehículos de disolución (agua Mili-Q y acetona 2%).

Evaluar si existen interacciones entre los tratamientos y las respuestas transcripcionales de las HSPs.

METODOLOGÍA

Propagación e incubación de la línea

Se propagaron moscas de la línea silvestre “Canton-S” de *D. melanogaster* que fueron mantenidas a 25°C en condiciones de oscuridad, dentro de frascos estériles con 5 g de hojuela de papa de la marca comercial Maggi® y 20 mL de una solución conservadora [5 mL de una solución de Nipagin en EtOH al 12% y 5 mL de ácido propiónico aforados a 1 L de agua ([Guzmán et al., 1998](#); [Dueñas et al., 2002](#))].

Sincronización, colecta de huevos y recuperación de las larvas

Con las moscas adultas recién eclosionadas (imago) se realizó la sincronización en frascos con levadura fresca activada (marca Florida) como medio y se mantuvieron en colecta durante 8h, después de lo cual fueron removidas de los frascos. Los huevos fueron colocados en incubación durante 72h a 25°C, tras lo que se recuperaron las larvas L3.

Tratamientos

Como controles disolventes se emplearon acetona 2% (CAS 67-64-1) y agua Milli-Q, para los controles positivos se utilizó FB [1 mM] (CAS 50-06-6) y cafeína [7.7 mM] (CAS 58-08-2) ([Willoughby et al., 2006](#)) disueltos en agua, mientras que 4-NQO (CAS 56-57-5) fue evaluado a una concentración de 2 mM y se solubilizó en acetona al 2% ([Heres-Pulido et al., 2004](#)).

Se colocaron 50 larvas en tubos plexiglás con 20g de medio instantáneo Carolina previamente macerado e hidratado con 18 mL de cada compuesto, los tubos fueron cubiertos con una malla por ambos extremos. Los tratamientos fueron administrados a través del alimento y se mantuvieron bajo estas condiciones durante 24h, tras lo

cual fueron rápidamente congeladas con hielo seco, maceradas y conservadas en Trizol (Figura 10).



Figura 10. Colocación e incubación de las larvas L3 en los tubos de plexiglás con los tratamientos.

Diseño de oligonucleótidos específicos

Se obtuvieron secuencias de los genes de interés (*Hsp26*, *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*) de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y FlyBase (<http://flybase.org/>). Con éstas, se realizaron alineamientos múltiples en un software en línea (*Clustal Omega*) y a partir de las secuencias conservadas entre isómeros se diseñaron oligonucleótidos, se consideraron temperaturas de alineamiento (T_m) de 55-60°C con valores $\Delta G_{\max} > -34$ y $\Delta G > -3.5$ para evitar la formación de homodímeros y heterodímeros.

Los oligonucleótidos fueron enviados a sintetizar y se realizaron reacciones de PCR punto final (30 ciclos) utilizando ADN genómico extraído de las larvas de *D. melanogaster* como molde; los productos de la reacción fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular de la UBIPRO en la FES-Iztacala, y, mediante la herramienta para alineamientos locales (BLAST) de NCBI se determinaron los porcentajes de identidad con los fragmentos de interés.

Extracción de ARN total

Para las extracciones de ARN total se empleó el kit “Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit” de *Zymo Research* de acuerdo con las indicaciones del proveedor; este protocolo consiste en la maceración del tejido orgánico (~100 mg de larvas) en TRIzol para

asegurar una lisis total, seguido del paso de la muestra a través de un tubo con una membrana porosa de sílice, lo que permite la recuperación del ARN total en un tubo colector.

Síntesis de ADN complementario (ADNc) y estandarización de las condiciones de amplificación

Las muestras de ARN fueron tratadas con “DNA-free™” (*Invitrogen*) y el protocolo indicado por el fabricante; éste, consiste en la aplicación de un buffer junto con 1.5 µL de enzima DNasa, seguido de un periodo de incubación (37 °C, 20-30 min) y la posterior inactivación de la enzima. Después, se utilizó el kit “*RevertAid First Strand cDNA Synthesis*” (*Thermo Scientific*) para la síntesis del ADNc, empleando 2 µg de las muestras de ARN total y oligo (dT)₁₈.

A partir de las muestras de ADNc sintetizadas, se estandarizaron las condiciones de amplificación con una reacción de RT-PCR y utilizando oligos de *actina42A* se tomaron alícuotas a los 20, 22, 24, 26, 28 y 30 ciclos. Cada ciclo consistió en un paso inicial de desnaturalización (94°C), seguido de alineamiento (60°C) y un paso final de extensión (72°C). Para las reacciones se utilizó un volumen final de 25 µL, empleando 20 µL de “*AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix*” (*Applied Biosystems*), 1 µL de los oligos *forward (Fw)* y *reverse (Rv)*, además de 2 µL de la muestra de ADNc.

Análisis semicuantitativo

Los amplicones obtenidos fueron cargados en geles de agarosa [1%] separados por electroforesis a 70 V y digitalizados con un fotodocumentador de luz UV y procesados en un software de análisis de imagen (*GelQuant V.1.8.2*) para establecer las cantidades relativas de píxeles por banda, los valores se normalizaron considerando al gen constitutivo *actina42A* como control.

Pruebas estadísticas

Ya que los datos no se ajustan a una distribución de tipo normal, fue necesario emplear análisis de tipo no paramétrico; se utilizó la prueba Kruskal-Wallis (K-W),

considerando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) para determinar si los tratamientos mostraban cambios significativos entre las cantidades de transcritos.

RESULTADOS

Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para las HSPs

A continuación, se muestran las secuencias *Fw* y *Rv* de los oligos diseñados, incluyendo temperaturas de alineamiento (T_m) y el tamaño de los amplicones (Tabla 1). A partir de las secuencias obtenidas (*Anexo*) se realizaron alineamientos locales utilizando la herramienta BLAST de NCBI, con la que se determinó que poseen una identidad del 95-98% respecto a las HSPs correspondientes despositadas en la base de datos.

Tabla 1. Secuencias e identidad de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de secuencias específicas. La identidad fue obtenida mediante el software en línea BLAST y la base de datos de NCBI.

| Gen | | Secuencia | T_m | Identidad | Amplicón (No. Bases) |
|--------------|-----------|----------------------|-------|-----------|----------------------------|
| <i>Hsp26</i> | <i>Fw</i> | TCGCTATCTACTCTGCTTTC | 58 | 97% | 118 |
| | <i>Rv</i> | CGCAAGGGCATCCGTTGA | 58 | | |
| <i>Hsp60</i> | <i>Fw</i> | CTCGGCGTGGAGATTGTG | 58 | 97% | 191 |
| | <i>Rv</i> | GTCTGTGATGGCGGTGC | 56 | | |
| <i>Hsp70</i> | <i>Fw</i> | GGAGTATAAGGGTGAGTCC | 58 | 98% | 175 |
| | <i>Rv</i> | GGCTCATTGATGATGCGGA | 58 | | |
| <i>Hsp83</i> | <i>Fw</i> | ACGATGAGGCTGATGATGAG | 60 | 95% | 149 |
| | <i>Rv</i> | CCAGATGGGCTTGGTCTTG | 60 | | |

Los productos obtenidos a partir de las reacciones de amplificación con los oligos diseñados se muestra en la Figura 11. Las condiciones para estas reacciones consistieron de 30 ciclos, considerando las T_m y empleando el ADN genómico extraído de las larvas (L3) de *D. melanogaster* como molde.

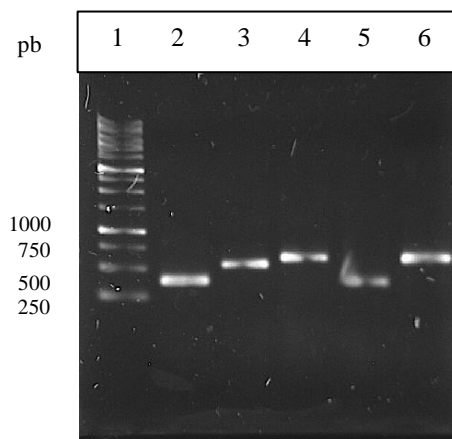


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones producto de PCR (30 ciclos) utilizando los oligonucleótidos sintetizados a partir del ADN genómico como molde. Carriles: 1) Marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

Extracciones de ARN total

Las muestras de ARN total extraídas del tejido de las larvas fueron cargadas en un gel desnaturizante de agarosa [1%] en donde se observaron bandas que corresponden con las subunidades del ARN ribosomal (Fig. 12).

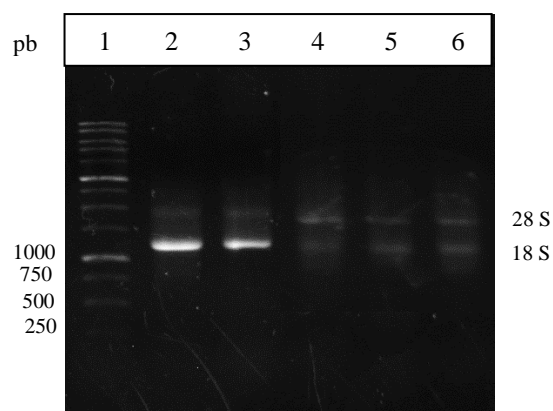


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Extracciones de ARN total de las larvas (L3) tratadas. Carriles: 1) marcador molecular; 2) agua Mili-Q; **3) 4-NQO**; **4) cafeína**; **5) FB**; 6) acetona.

Para asegurar la integridad y pureza de las muestras, estas, fueron analizadas en un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop) con el cual se obtuvieron las concentraciones y absorbancias, se consideró una relación A260/280 con valores cercanos a 2.00 como criterio (Tabla 2).

Tabla 2. Relaciones de absorbancia 260/280 y concentración de las muestras del ARN total extraído.

| Compuesto | A260/280 | ARN total (ng/μL) |
|--------------------|-----------------|---|
| <i>Agua Mili-Q</i> | 1.85 | 188.6 |
| <i>4-NQO</i> | 1.87 | 498.8 |
| <i>Acetona</i> | 1.98 | 160.4 |
| <i>FB</i> | 2.05 | 284.7 |
| <i>Cafeína</i> | 1.98 | 623.2 |

Síntesis de ADNc y estandarización de las condiciones de amplificación

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 μ g del ARN total de cada extracción y el kit “First Strand cDNA Synthesis” (*Thermo Scientific*), utilizando oligo (dT)₁₈, un inhibidor de RNasa, y la enzima transcriptasa reversa “*RevertAid*” de acuerdo con el protocolo del fabricante.

En la estandarización de las condiciones de amplificación se realizaron reacciones a través de RT-PCR (30 ciclos), utilizando los oligos del control constitutivo (*actina42A*) y las muestras de ADNc como molde. Se tomaron alícuotas cada dos ciclos a partir de los 20 y éstas se emplearon para electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1%.

Los geles fueron digitalizados en fotodocumentador y con un software de análisis de imágenes (*GelQuant*) se obtuvieron las densidades de pixeles, registrándose el ciclo previo a la saturación de las bandas para cada tratamiento (Figura 13), con lo que posteriormente se obtuvieron las densidades relativas.

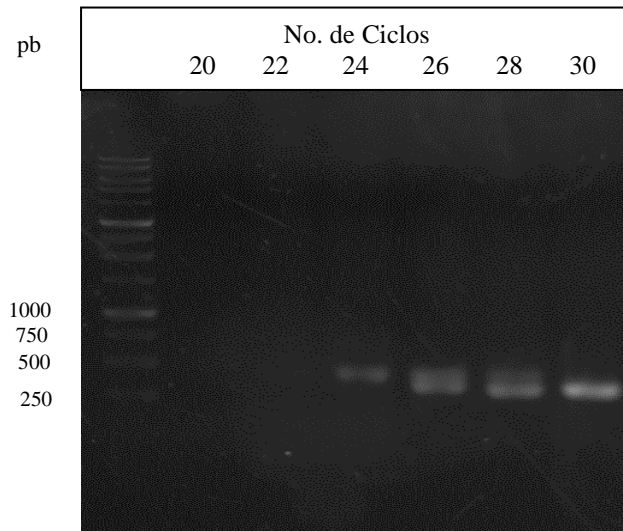


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Estandarización de las condiciones de amplificación mediante RT-PCR (20-30 ciclos). Larvas de *D. melanogaster* (L3) tratadas con cafeína [7.7 mM].

Niveles relativos de transcritos de genes que codifican HSPs

Tratamiento con agua Mili-Q

En las larvas tratadas con este vehículo se registraron bandas definidas para los cuatro genes evaluados en ambos experimentos independientes. Además, las densidades relativas respecto al control mostraron niveles similares en comparación a actina entre ambas réplicas (Figuras 14a y 14b). Las intensidades de las bandas correspondientes a *Hsp26*, *Hsp60* y *Hsp70* son más tenues que actina, mientras que para *Hsp83* son más intensas.

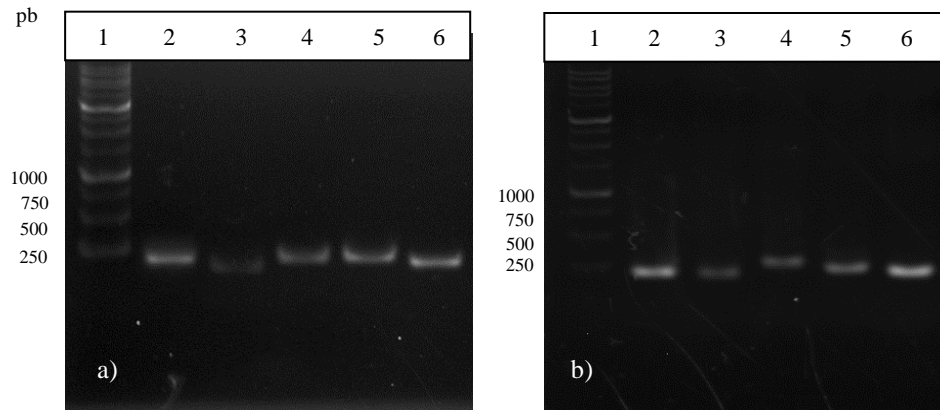


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones de los transcritos de genes codificantes para HSPs en larvas (L3) de *D. melanogaster* tratadas con agua Mili-Q. a) 1er réplica, b) 2da réplica. Carriles: 1) marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

Tratamiento con Fenobarbital [1 mM]

En la Figura 15 se observan diferencias entre las densidades relativas de ambas réplicas, en la primera solamente las bandas de *Hsp70* y *Hsp83* son más intensas que el control, mientras que en el segundo experimento son las bandas correspondientes a *Hsp60* y *Hsp83* las que muestran un aumento en la intensidad respecto al control. Únicamente la respuesta transcripcional de *Hsp83* fue reproducible.

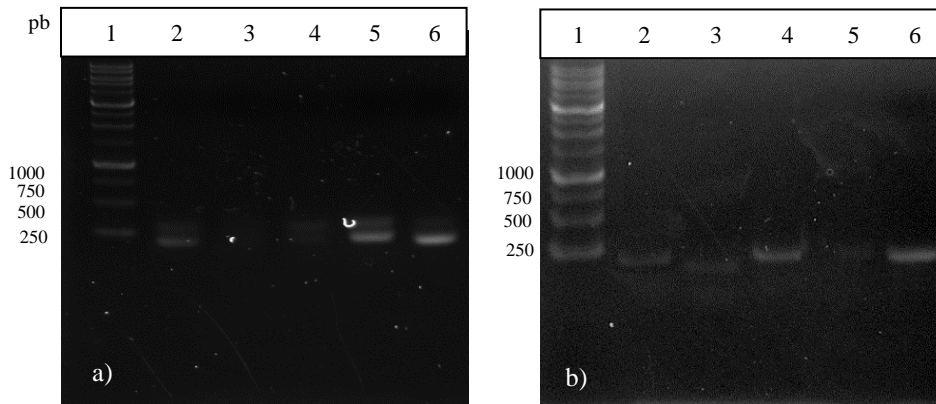


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones de los transcritos de genes de HSPs de las larvas tratadas con FB [1 mM]. a) 1er réplica, b) 2da réplica. Carriles: 1) marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

Tratamiento con Cafeína [7.7 mM]

Las densidades de las bandas que corresponden a *Hsp26* y *Hsp70* son diferentes entre ambas réplicas, pero se observa que las intensidades de las bandas de *Hsp60* y *Hsp83* son mayores respecto al control constitutivo, observándose una respuesta conservada en ambos experimentos para estos dos transcritos.

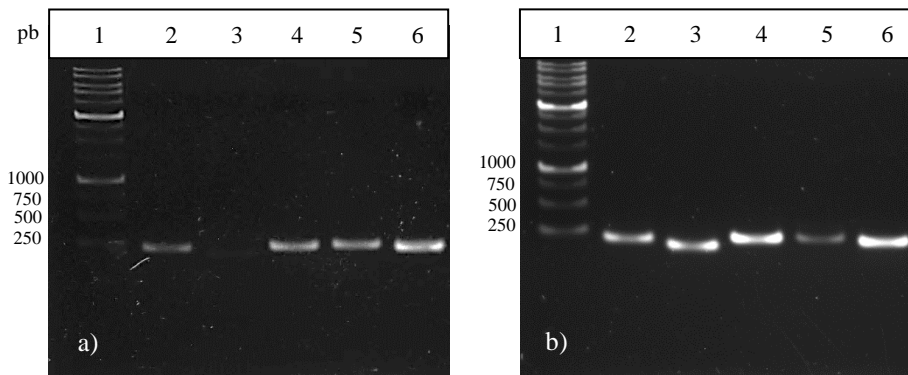


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones de los transcritos de genes de HSPs en larvas tratadas con cafeína [7.7 mM]. a) 1er réplica, b) 2da réplica. Carriles: 1) marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

Tratamiento con Acetona [2%]

Las intensidades de las bandas son menores que el control en todas las HSPs evaluadas del primer experimento (Figura 17a), mientras que, en el segundo se mantuvieron densidades menores de las bandas correspondientes a *Hsp26*, *Hsp60* y *Hsp70* respecto a actina, aunque la respuesta de *Hsp83* no fue reproducible (Figura 17b).

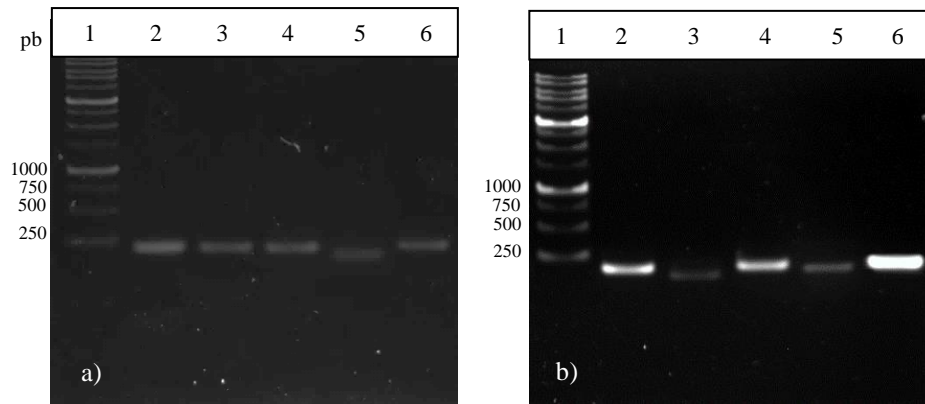


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones de los transcritos de genes de HSPs en larvas tratadas con acetona [2%]. a) 1er réplica, b) 2da réplica. Carriles: 1) marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

Tratamiento con 4-NQO [2 mM]

En el primer experimento no se distinguen amplicones de *Hsp26* o *Hsp70* en la matriz de agarosa, mientras que, para *Hsp60* y *Hsp83* se registraron densidades por debajo del control constitutivo (Figura. 18a), en contraste, en el segundo experimento la respuesta de *Hsp60* es más elevada que actina y las respuestas de *Hsp70* y *Hsp83* son menores, pero sí presentan bandas definidas (Figura 18b). La única respuesta reproducible fue la inducción transcripcional de *Hsp83*, que mostró disminución respecto a actina en ambas réplicas.

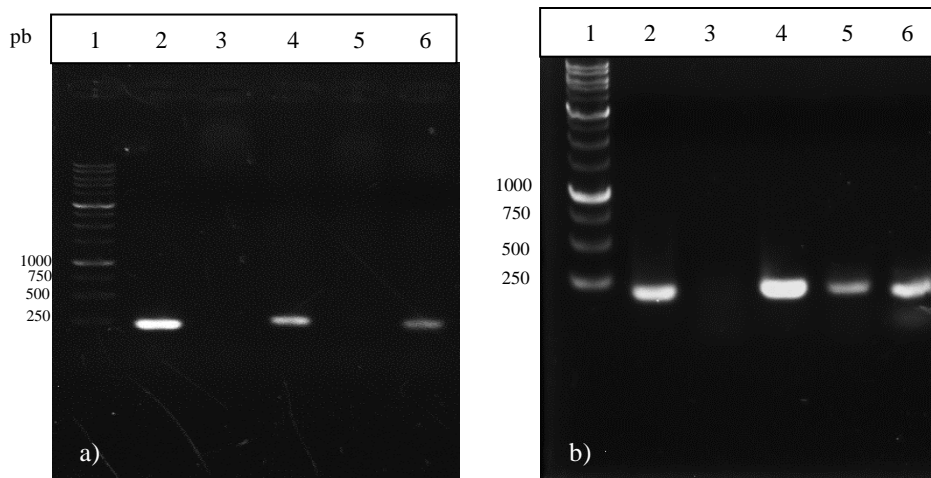


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa [1%]. Amplicones de los transcritos de HSPs en larvas tratadas con 4-NQO [2 mM]. a) 1er réplica, b) 2da réplica. Carriles: 1) marcador molecular, 2) *actina42A*, 3) *Hsp26*, 4) *Hsp60*, 5) *Hsp70*, 6) *Hsp83*.

En la Tabla 3 se observa que, con excepción de los organismos tratados con agua Mili-Q, no todas las densidades relativas de los transcritos correspondientes a las HSPs evaluadas fueron reproducibles entre réplicas.

Tabla 3. Cambios de densidades de transcritos relativas al gen constitutivo (*actina42A*) en ambos experimentos independientes. Los asteriscos (*) indican las respuestas transcripcionales reproducibles entre las dos réplicas.

| Gen | Agua Mili-Q | | Acetona | | 4-NQO | | FB | | Cafeína | |
|--------------|-------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 1 | Exp. 2 |
| <i>Hsp26</i> | * ↓ | ↓ | * ↓ | ↓ | ● | ↓ | ● | ↓ | ↓ | ↑ |
| | 0.3621 | 0.3868 | 0.633 | 0.251 | 0 | 0.028 | 0 | 0.707 | 0.653 | 1.204 |
| <i>Hsp60</i> | * ↓ | ↓ | * ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | * ↑ | ↑ |
| | 0.7950 | 0.4694 | 0.592 | 0.964 | 0.6398 | 1.438 | 0.2667 | 2.361 | 1.591 | 1.323 |
| <i>Hsp70</i> | * ↓ | ↓ | * ↓ | ↓ | ● | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| | 0.9345 | 0.6623 | 0.342 | 0.358 | 0 | 0.505 | 1.686 | 0.652 | 1.093 | 0.422 |
| <i>Hsp83</i> | * ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | * ↓ | ↓ | * ↑ | ↑ | * ↑ | ↑ |
| | 1.0644 | 1.1672 | 0.607 | 1.606 | 0.478 | 0.917 | 2.269 | 3.606 | 2.031 | 1.344 |

Análisis estadístico

Debido a que estos datos no se encuentran ajustados a una distribución de tipo normal, se emplearon pruebas no paramétricas para realizar los análisis; mediante la prueba K-W para comparaciones múltiples y un intervalo de confianza del 95% se evaluaron los efectos de los tratamientos sobre las cantidades relativas de transcritos (Tabla 4).

Tabla 4. Hipótesis nulas y alternativas del efecto de los tratamientos sobre la transcripción de las familias de HSPs evaluadas mediante la prueba de K-W ($\alpha = 0.05$).

| Efecto evaluado | H ₀ /H _A | Hipótesis |
|--------------------|--------------------------------|--|
| <i>Tratamiento</i> | H ₀ | Los tratamientos empleados no tienen efecto sobre las cantidades relativas de transcritos. |
| | H _A | Los tratamientos empleados tienen efecto sobre las cantidades relativas de transcritos. |

Ya que los valores calculados de “p” son mayores que 0.05, se considera que no existen pruebas suficientes para rechazar H₀ en ninguno de los casos, por lo que se concluye que, bajo las condiciones evaluadas en el presente trabajo, los

tratamientos empleados no modulan significativamente las cantidades relativas de transcritos entre pares de medianas muestrales (Tabla 5).

Tabla 5. Valores calculados de “p” de Kruskal-Wallis para las medianas muestrales. Se rechaza H_0 cuando $p < 0.05$.

| Gen | Valor p |
|--------------|---------|
| <i>Hsp26</i> | 0.512 |
| <i>Hsp60</i> | 0.604 |
| <i>Hsp70</i> | 0.567 |
| <i>Hsp83</i> | 0.308 |

Cantidades relativas de transcritos codificantes entre tratamientos

Agua Mili-Q y 4-NQO: Con excepción de los niveles de transcritos de *Hsp60*, se pueden observar cantidades relativas menores al control en las larvas tratadas con 4-NQO (Figura 20), y, considerando los datos reproducibles entre réplicas, es posible afirmar que hay una disminución en la respuesta transcripcional de *Hsp83* como respuesta al compuesto.

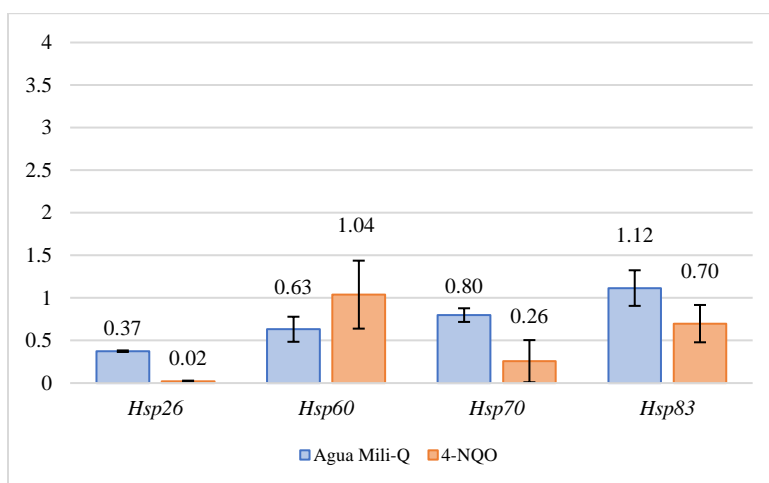


Figura 20. Variaciones entre las cantidades relativas medias de transcritos inducidas en larvas (L3) tratadas con agua Mili-Q y 4-NQO [2 mM].

Agua Mili-Q y cafeína: Las cantidades medias de transcritos registradas en el tratamiento con cafeína son más elevadas que las observadas en su vehículo de disolución (Figura 21), en particular, las HSPs con respuestas reproducibles (*Hsp60*

y *Hsp83*) mostraron un aumento de las cantidades relativas al compararlas con agua mili-Q, indicando un aumento de la transcripción.

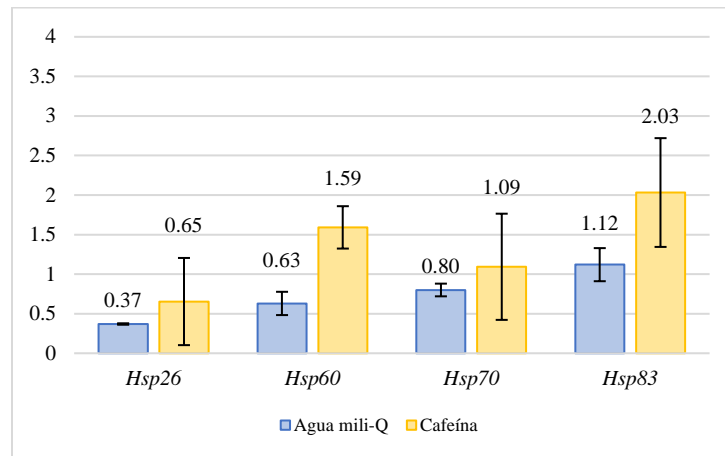


Figura 21. Diferencias entre las cantidades medias de transcritos inducidos en larvas (L3) tratadas con agua Mili-Q y cafeína [7.7 mM].

Agua Mili-Q y FB: En la Figura 22 se observan cambios en las cantidades relativas medias de HSPs en respuesta al tratamiento con FB comparado con agua mili-Q, hay aumentos de la respuesta transcripcional de *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp83*. Además, considerando la respuesta replicable de *Hsp83*, es posible afirmar que cuando las larvas (L3) de *D. melanogaster* son tratadas con FB [1 mM], hay un aumento en la transcripción de este gen como respuesta.

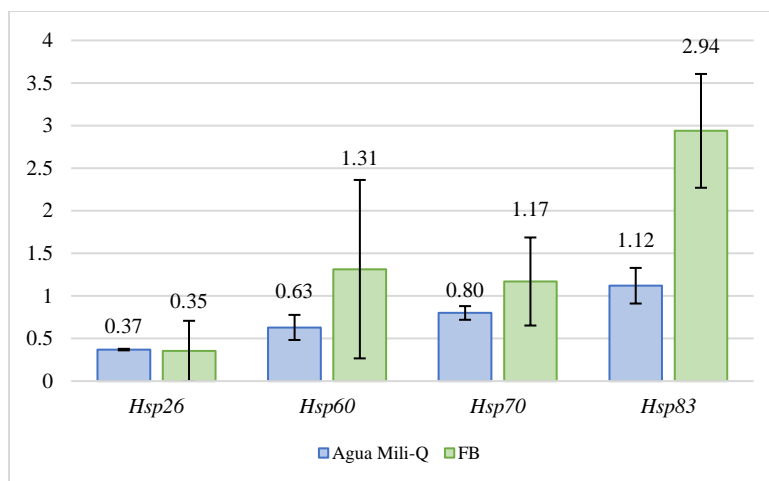


Figura 22. Diferencias entre las cantidades medias de transcritos de larvas (L3) en respuesta a FB [1 mM] y agua Mili-Q.

4-NQO y *FB*: Al contrastar las respuestas transcripcionales conservadas de *Hsp83* entre las réplicas de ambos tratamientos se observa que, pese a que ambos compuestos son genotóxicos, solamente *FB* induce un aumento, mientras que *4-NQO* tiende a disminuir las cantidades de transcritos (Figura 24).

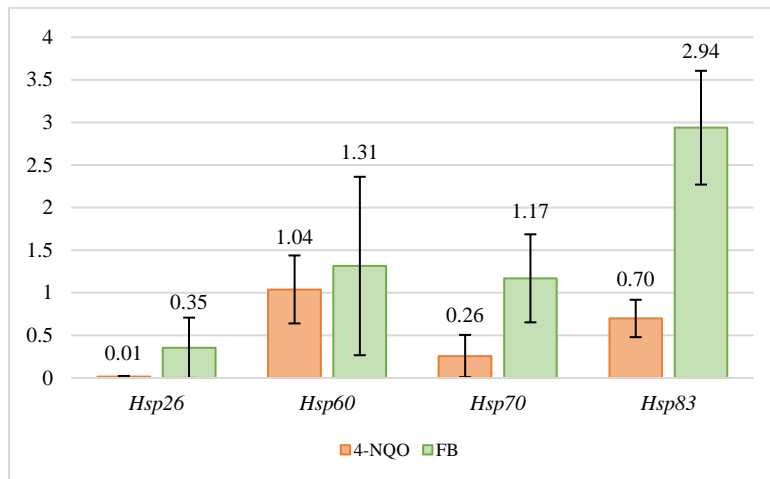


Figura 24. Diferencias entre los niveles medios de transcritos inducidos en las larvas (L3) tratadas con 4-NQO [2 mM] y FB [1 mM].

4-NQO y *cafeína*: Las larvas tratadas con cafeína presentaron cantidades relativas de transcritos más elevadas que las observadas en el tratamiento con 4-NQO; la respuesta transcripcional de *Hsp83* fue reproducible en ambos tratamientos y al compararlas es posible resaltar la modulación diferencial, siendo 4-NQO el compuesto que genera menor expresión que la cafeína a pesar de su potencial genotóxico.

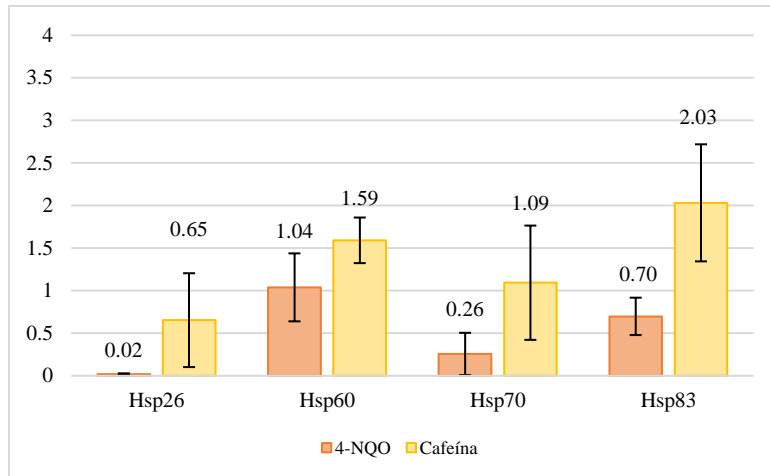


Figura 25. Diferencias entre los niveles de transcritos inducidos en las larvas (L3) tratadas con 4-NQO [2 mM] y cafeína [7.7 mM].

DISCUSIÓN

Cafeína

En la Figura 21 se observa que las cantidades medias de transcritos de *Hsp26* son mayores al control, pero no es posible afirmar modulación transcripcional ya que no hubo reproducibilidad de este gen en respuesta a la cafeína [7.7 mM], sin embargo, algunos autores han descrito que los miembros de esta familia (sHSPs) son dependientes de la concentración; la exposición de células embrionarias de *D. melanogaster* a 1 mM no indujo la respuesta de *Hsp26* o *Hsp27*, pero, empleando una mayor concentración [30 mM] se registró el aumento significativo de un ortólogo de la familia de las sHSP (HSP-16.2) ([Buzin y Bournias-Vardiabasis, 1984](#); [Al-Amin et al., 2016](#)).

El efecto de la cafeína en la expresión de los miembros de la familia HSP70 ha sido previamente evaluado en estudios acerca de la HSR, en donde fue empleado como marcador molecular y se determinó una inducción transcripcional diferencial que también es dependiente de la concentración ([Brunquell, 2017](#); [Al-Amin et al., 2016](#)). La respuesta conservada de *Hsp60* y *Hsp83* en las larvas (L3) tratadas con el compuesto mostró un aumento de las cantidades de transcritos al compararlas con su vehículo (agua mili-Q) (Figura 21), esto, es congruente con trabajos previos, en

los que se ha registrado que la capacidad genotóxica de la cafeína tiene influencia sobre la HSR y modifica la respuesta transcripcional de las HSPs ([Brunquell et al., 2017](#)). [Lu et al., en 2008](#), reportaron que una dosis de 2 mM por 24h del compuesto estimula el estrés oxidante intracelular de manera directa, promoviendo el aumento en la producción de EROs en osteoblastos, si bien, observaron una disminución de HSP90 a nivel de proteína, esto parece ser una respuesta dinámica; [Pollack et al., \(2009\)](#) evaluaron el efecto tóxico de la cafeína en algas endosimbiontes de corales y observaron que los niveles proteínicos de las familias HSP60, HSP70 y HSP90 fueron modulados dependiendo de la especie y en respuesta a cafeína 0.3 mM hubo un aumento de 2-3 veces respecto al control en *Symbiodinium sp.* mientras que en *S. goreau* disminuyeron hasta 9 veces.

Fenobarbital

El tratamiento con FB [1 mM] mostró variaciones en las cantidades de transcritos respecto al control negativo (Figura. 22), pero únicamente la respuesta transcripcional de *Hsp83* fue reproducible en ambas repeticiones y es comparativamente más elevada que en el tratamiento con agua mili-Q. No hay muchos estudios sobre la influencia del metabolismo del FB en la inducción de HSPs, sin embargo, se han encontrado conclusiones contrastantes; algunos estudios han reportado que el tratamiento con el compuesto no parece modificar la respuesta transcripcional de *Hsp70* y *Hsp83* en ratas ([Carr et al., 1986](#); [Lin et al., 1994](#)), pero, [Timsit y Negishi \(2014\)](#) en un posterior trabajo observaron que tras la activación de CAR durante el metabolismo de FB, hay modificaciones de las familias HSP90, HSP70 y HSP60 a nivel de proteína que permiten la modulación de la concentración de este receptor.

4-NQO

Al comparar la respuesta de *Hsp83* observada entre los tratamientos de agua mili-Q y 4-NQO se detectaron menores cantidades de transcritos en este último (Figura 20), además, si se contrasta con los controles positivos cafeína y FB, que indujeron un aumento en la cantidad de transcritos, puede determinarse que, a las presentes

condiciones, el tratamiento con 4-NQO modula negativamente la respuesta transcripcional de *Hsp83*.

Si bien la disminución de la cantidad de transcritos de *Hsp83* no era esperada, ya que trabajos previos reportaron daño oxidante ocasionado por el compuesto ([Arima et al., 2006](#)), existen estudios anteriores en los que se ha observado que la expresión de las HSPs puede fluctuar en respuesta a diversos factores. Por ejemplo, Singh y colaboradores observaron variaciones de la respuesta transcripcional, registrando no solamente cambios dependientes del compuesto y familia de HSP, sino también variaciones en las cantidades de transcritos a través del tiempo y en respuesta a la co-exposición entre diferentes compuestos ([Singh et al., 2009](#); [Singh et al., 2010](#)), mientras que, en el trabajo de [Vázquez-Gómez \(2011\)](#) se reportó que en la respuesta de *Hsp60* al tratar dos cruces de larvas *D. melanogaster* (L3) con una micotoxina (zearalenona) hay una disminución de la cantidad de transcritos respecto al control constitutivo (-1.76 veces) en la línea *flr³* y un drástico aumento en la línea resistente a insecticida *OR(R)-flr³* (+15.72 veces).

Tomando esto en cuenta, también es posible que la solubilización de 4-NQO en acetona haya modificado la expresión de los genes *Hsp*, ya que se ha reportado que este compuesto posee toxicidad moderada ([Hewitt et al., 1987](#)) debido su capacidad para generar EROs ([Armutcu et al., 2005](#)), inducir la expresión de *Cyp450* ([Ronis et al., 1998](#); [Ramírez-Pérez, 2018](#)) y producir daño oxidante a través de metabolitos secundarios como el metilglioxal ([Casazza et al., 1984](#)). Además, ya que el compuesto induce la formación de aductos que pueden dañar al ADN de manera similar a los rayos UV, cabe la posibilidad de que los mecanismos involucrados en responder a este tipo de daño, es decir, la reparación por escisión de nucleótidos y la reparación por escisión de bases también hayan modulado la respuesta de las *Hsp*, debido a que estas forman parte importante del proceso de reparación ([Mendez et al., 2000](#); [Sottile y Nadin, 2018](#)).

Los cambios de la respuesta transcripcional son un reflejo de las distintas rutas de acción e interacciones de cada HSP involucrada ([Morton et al., 2006](#); [Shrestha et al., 2016](#)). El mecanismo de HSR es dinámico e induce expresiones diferenciales que permiten a los organismos moderar el daño, dependiendo del compuesto,

concentración y tiempo de interacción con éste ([Bruce et al., 1993](#); [Moore et al., 2003](#); [Jovic et al., 2017](#)). Los niveles transcripcionales bajos de las HSPs han sido parcialmente atribuidos al costo energético de ser expresadas en organismos bajo constante exposición a estrés ([Bettencourt et al., 1999](#); [Magdalena et al., 2011](#)), ya que se ha especulado que puede suscitarse la disminución de la expresión en estadios larvarios para mantener la fecundidad en la etapa adulta y otras proteínas pueden suplir la función, como *Hsc70* ([Lansing et al., 2000](#)), aunque no hay una gran cantidad de estudios sobre este fenómeno.

Considerando lo anterior, puede decirse que, al ser mecanismos dinámicos y dependientes de diversas variables, no es posible utilizarlas como marcadores universales de estrés oxidante, ya que es necesario tomar en cuenta la respuesta transcripcional de las HSPs frente al compuesto, a diferentes concentraciones y distintos puntos en el tiempo para posteriores trabajos. Además, el uso de acetona como vehículo de disolución para 4-NQO podría estar induciendo estrés oxidante que altera la expresión génica, impidiendo la evaluación de la respuesta al compuesto.

CONCLUSIONES

No hay diferencias significativas entre las cantidades de transcritos inducidas en las larvas tratadas con 4-NQO [2 mM], cafeína [7.7 mM], FB [1 mM] y las larvas tratadas con los vehículos (agua mili-Q y acetona 2%).

Con excepción de las larvas tratadas con agua mili-Q, las cantidades de transcritos inducidas no fueron reproducibles en todos los tratamientos.

El tratamiento con cafeína [7.7 mM] induce un aumento reproducible de las cantidades medias de transcritos de *Hsp60* y *Hsp83* en comparación al tratamiento con agua mili-Q.

En respuesta al tratamiento con FB [1 mM] hay una inducción transcripcional más elevada que las detectadas en su vehículo de disolución.

Como respuesta al tratamiento con 4-NQO [2 mM], se indujo una cantidad media de transcritos de *Hsp83* menor que en el tratamiento con agua mili-Q.

LITERATURA CITADA

1. Abolaji, A. O; Kamdem, J. P; Farombi, E. O; Rocha, J. B. T. (2013). *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *Archives of Basic & Applied Medicine*. 1:37-44.
2. Adam-Vizi, Vera; Chinopoulos, Christos. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trend in Pharmacological Sciences*. 27(12):639-645.
3. Al-Amin, Mohammad; Kawasaki, Ichiro; Gong, Joomi; Shim, Yhong-Hee. Caffeine induces the stress response and up-regulates heat shock proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells*. 39(2):163-168.
4. Arima, Yaeno; Nishigori, Chikako; Takeuchi, Toru; Oka, Shigenori; Morimoto, Kanehisa; Utani, Atsushi; Miyachi, Yoshiki. (2006). 4-nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*. 91(2):382-392.
5. Armutcu, F; Coskun, Ö; Gürel, A; Sahin, S; Kanter, M; Cihan, A; Varim Numanoglu, K; Altinyazar, C. (2005). Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells. *Cell Biology and Toxicology*. 21(1):53-60.
6. Arya, Richa; Mallik, Moushami; Lakhotia, Subhash C. (2007). Heat shock genes – integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*. 32(3):595-610.
7. Azzam, Edouard I; Jay-Gerin, Jean-Paul; Pain, Debkumar. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*. 327:48-65.
8. Bailleul, Bernard; Daubersies, Pierre; Galiègue-Zoutina, Sylvie; Loucheux-Lefebvre, Marie-Henriette. (1989). Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Japanese Journal of Cancer Research*. 80:691-697.

9. Balch, William E; Morimoto, Richard I; Dillin, Andrew; Kelly, Jeffery. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 319(Feb):916-919.
10. Bettencourt, Brian R; Feder, Martin E; Cavicchi, Sandro. (1999). Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 53(2):484-492.
11. Borkovich, Katherine A; Farrelly, Frances W; Finkelstein, David B; Taulien, John; Linqvist, Susan. (1989). Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and Cellular Biology*. 9(9):3919-3930.
12. Bruce, Jacqueline L; Price, Brendan D; Coleman, C. Norman; Calderwood, Stuart K. (1993). Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Research*. 53(1):12-15.
13. Brunquell, Jessica. (2017). Uncovering transcriptional activators and targets of HSF-1 in *Caenorhabditis elegans*. Tesis para obtener el grado de doctor. University of South Florida. EUA. 361 pp.
14. Brunquell, Jessica; Morris, Stephanie; Snyder, Alana; Westerheide, Sandy D. (2017). Coffee extract and caffeine enhance the heat shock response and promote proteostasis in an HSF-1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress and Chaperones*. 23(1):65-75.
15. Bukau, Bernd; Horwich, Arthur L. (1998). The *hsp70* and *hsp60* chaperone machines. *Cell*. 92(3):351-366.
16. Buzin, Caroly H; Bournias-Vardiabasis, Nicole. (1984). Teratogens induce a subset of small heat shock proteins in *Drosophila* primary embryonic cell cultures. *Proceedures of the Natural Academy of Sciences*. 81:4075-4079.
17. Caplan, Avrom J. (2003). What is a co-chaperone?. *Cell Stress & Chaperones*. 8(2):105-107. Czarnecka, Eva; Gurley, William B; Nagao, Ronald T; Mosquera, Luis A; Key, Joey L. (1985). DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82(11):3726-3730.

18. Carr, Brian I; Huang, Ting H; Buzin, Carolyn H; Itakura, Kellchi. (1986). Induction of heat shock gene expression without heat shock by hepatocarcinogenesis and during hepatic regeneration in rat liver. *Cancer Research*. 46:5106-5111.
19. Casazza, Joseph P; Felver, Michael E; Veech, Richard L. (1984). The metabolism of acetone in rat. *The Journal of Biological Chemistry*. 259(2):231-236.
20. Caspers, Gert-Jan; Leunissen, Jack A.M; de Jong, Wilfried W. (1994). The expanding small heat shock protein family, and structure predictions of the conserved "α-crystallin domain". *Journal of Molecular Evolution*. 40:238-248.
21. Castañeda-Partida, Laura; Heres-Pulido, María Eugenia; guzmán-Rincón, Judith; Hernández-Portilla, Luis Barbo; Dueñas-García, Irma Elena; Durán-Díaz, Ángel; Delfín-Alcalá, Irma. (2011). Lead acetate does not inhibit dimethylnitrosamine activation and interacts with phenobarbital which is genotoxic in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 2172-2179.
22. Church, Daniel F; Pryor, William A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives*. 64:111-126.
23. Constanza Corrales, Lucía; Muñoz Ariza, Maira María. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 10(18).
24. Coronato, Silvia; Di Girolamo, Wanda; Salas, Margarita; Spinelli, Osvaldo; Laguens, Graciela. (1999). Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina*. 59:477-486.
25. Csermely, Péter; Schnaider, Tamás; Söti, Csaba; Prohászka, Zoltán; Nardai, Gábor. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 79(2):129-168.
26. De Bont, Rinne; van Larebeke, Nik. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 19(3):169-185.

27. Dueñas-García, Irma Elena; Heres, María Eugenia; Castañeda Partida, Laura; Graf, Ulrich. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*. 84:166.
28. Dueñas-García, Irma Elena; Vega-Contreras, V; Gómez-Luna, L. C; Santos-Cruz, Luis Felipe; Castañeda-Partida, Laura; Durán-Díaz, Ángel; Heres-Pulido, María Eugenia. (2005). Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*. 88:83-89.
29. Fenton, Wayne A; Horwich, Arthur L. (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Science*. 6:743-760.
30. Ferguson, Stephen S; LeCluyse, Edward L; Negishi, Masahiko; Goldstein, Joyce A. (2002). Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: Discovery of a new distal binding site. *Molecular Pharmacology*. 62(3):737-746.
31. Finkel, Toren; Holbrook, Nikki J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809): 239-247.
32. Fisone, G; Borgkvist, A; Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61(7-8):857-872.
33. Franzmann, Titus Marcellus. (2008). Chaperone mechanism of the small heat shock protein 26. Tesis para obtener el título de doctor. Technischen Universität München. Alemania. 216 pp.
34. Friedberg, Errol C; Walker, Graham C; Siede, Wolfram; Wood, Richard D; Schultz, Roger A; Ellenberger, Tom. (2006). Sources and consequences of DNA damage, In: *DNA Repair and Mutagenesis*. 2da edición. ASM Press. Washington D.C. pag 45.
35. Gaivão, Isabel; Sierra, L. Maria; Comendador, Miguel A. (1999). The *w/w⁺* SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of

- reactive oxygen species inducing compounds. Mutation Research. 440:139-145.
36. Galiègue-Zouitina, Sylvie; Bailleul, Bernard; Ginot, Y-Michel; Perly, Bruno; Vigny, Paul; Loucheux-Lefebvre, Marie-H. (1986). N²-guanyl and N⁶-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. Cancer Research. 46(4):1858-1863.
37. Galiègue-Zouitina, Sylvie; Bailleul, Bernard; Loucheux-Lefebvre, Marie H. (1985). Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxiaminoquinoline 1-oxide in rats and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. Cancer Research. 45:520-525.
38. Glaser, Robert L; Wolfner, Mariana F; Lis, John T. (1986). Spatial and temporal pattern of *Hsp26* expression during normal development. The EMBO Journal. 5(4):747-754.
39. Goodwin, Bryan; Hodgson, Echusia; D'Costa, Daniel J; Robertson, Graham R; Liddle, Christopher. (2002). Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. Molecular Pharmacology. 62(2):359-365.
40. Graf, Ulrich; van Schaik, Nancy; Würgler, Friedrich E. (1992). Drosophila Genetics: A Practical Course. Springer. Heidelberg. USA. 241 pp.
41. Guzmán Rincón, Judith; Espinosa, Javier; Graf, Ulrich. (1998). Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research. 412:69-81.
42. Halliwell, Barry. (2007). Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions. 35(part 5):1147-1150.
43. Hartl, F. Ulrich, Hayer-Hartl, Manajit. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. 295(5561):1852-1858.
44. Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature. 475:324-332.

45. Haslbeck, Martin; Franzmann, Titus; Weinfurter, Daniel; Buchner, Johannes. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*. 12(10):842-846.
46. Haslbeck, Martin; Vierling, Elizabeth. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology*. 427(7):1537-1548.
47. Hendrick, Joseph P; Hartl, Franz-Ulrich. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 62:349-384.
48. Heres-Pulido, María Eugenia; Dueñas-García, Irma; Castañeda-Partida, Laura; Sánchez-García, Antonio; Contreras-Souza, Martha; Durán-Díaz, Ángel; Graf, Ulrich. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 19(3):187-193.
49. Hewitt, L. Arthur; Valiquette, Céline; Plaa, Gabriel L. (1987). The role of biotransformation-detoxification in acetone-, 2-butanone-, and 2-hexanone-potentiated chloroform-induced hepatotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 65(11):2313-2318.
50. Honkakoski, Paavo; Zelko, Igor; Sueyoshi, Tatsuya; Negishi, Masahiko. (1998). The nuclear orphan receptor CAR-Retinoid X Receptor heterodimer activates phenobarbital responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Molecular Cell Biology*. 18(10):5652-5658.
51. Horwich, Arthur L; Fenton, Wayne A; Chapman, Eli; Farr, George W. (2007). Two Families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 23(1):115-145.
52. Jena, N. R. (2012). DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *Journal of Biosciences*. 37(3):503-517.
53. Jovic, Katharina; Sterken, Mark G; Grilli, Jacopo; Bevers, Roel P. J; Rodriguez, Miriam; Riksen, Joost A. G; Allesina, Stefano; Kammenga, Jan E; Snoek, L. Basten. (2017). Temporal dynamics of gene expression in heat-stressed *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*. 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189445>

54. Junqueira, V. B. C; Simizu, K; Pimentel, R; Azzalist, L.A; Barros, S.B.M; Koch, O; Videla, L.A. (1991). Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on the early oxidative stress component induced by lindane in rat liver. *Xenobiotica*. 21(8):1053-1065.
55. Kalmar, Bernadett; Greensmith, Linda. (2009). Induction of heat shock protein for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61:310-318.
56. Kim, Yujin E; Hipp, Mark S; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit; Hartl, F. Ulrich. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*. 82(1):323-355.
57. Kitano, Motoo. (2001). Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathology International*. 50(5):353-362.
58. Kityk, Roman; Kopp, Jürgen; Sinning, Irmgard; Mayer, Matthias P. (2012). Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of *hsp70* chaperones. *Molecular Cell*. 48(6):863-874.
59. Kohda, K; Kawazoe, Y; Minoura, Y; Tada, M. (1991). Separation and identification of N4-(guanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, a novel nucleic acid adduct of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis*. 12:1523-1525.
60. Lanneau, David; Wettstein, Guillaume; Bonniaud, Philippe; Garrido, Carmen. (2010). Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *Scientific World Journal*. 10:1543-1552.
61. Lansing, Erwin; Justesen, Just; Loeschecke, Volker. (2000). Variation in the expression of *Hsp70*, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*. 25(6):443-450.
62. Li, Jing; Soroka, Joanna; Buchner, Johannes. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biologica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*. 1823(3):624-635.

63. Lin, W.Q; Vandyke, R.A; Marsh, H.M; Trudell, J.R. (1994). Nuclear translocation of heat shock protein 72 in liver cells of halothane-exposed rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 199(2):647-652.
64. Lu, Pin-Zhen; Lai, Ching-Yu; Chan, Wen-Hsiung. (2008). Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(5):698-718.
65. Lushchak, Volodymyr I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 224:164-175.
66. Magdalena, L. M; Coipan, E.C; Vladimirescu, A.F; Savu, L; Costache, M; Gavrilă, L. (2011). Downregulation of *hsp22* gene expression in *Drosophila melanogaster* from sites located near chemical plants. *Genetics and Molecular Research*. 11(1):739-745.
67. Maglich, Jodi M; Stoltz, Catherine M; Goodwin, Bryan; Hawkins-Brown, Diane; Moore, John T; Kliewer, Steven A. (2002). Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Molecular Pharmacology*. 62(3):638-646.
68. Mandel, H.G. (2002). Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food and Chemical Toxicology*. 40:1231-1234.
69. Mason, P. J; Hall, L. M. C; Gausz, J. (1984). The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster* (heat shock/abundant transcripts/developmental regulation). *Molecular and General Genetics*. 194(1-2):73-78.
70. Mayer, Matthias P; Schröder, Hartwig; Rüdiger, Stefan; Paal, Klaus; Laufen, Thomas; Bukau, Bernd. (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of *Hsp70*. *Nature Structural & Molecular Biology*. 7:589-593.
71. McClellan, Amie J; Xia, Yu; Deutschbauer, Adam M; Davis, Ron W; Gerstein, Mark; Frydman, Mark. (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90

- molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*. 131(1):121-135.
72. Mchaourab, Hassane S; Godar, Jared A; Stewart, Phoebe L. (2009). Structure and mechanism of protein stability sensors: the chaperone activity of small heat-shock proteins. *Biochemistry*. 48(18):3828-3837.
73. Mendez, Frances; Sandigursky, Margarita; Franklin, William A; Kennym Mark K; Kureekatti, Raichal; Bases, Robert. (2000). Heat-shock proteins associated with base excision repair enzyme in HeLa cells. *Radiation Research*. 153(2):186-195
74. Monteiro, Joao P; Alves, Marco G; Oliveira, Pedro F; Silva, Branca M. (2016). Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*. 21(8):1-32.
75. Moore, J. Bernadette; Blanchard, Raymond K; Cousins, Robert J. (2003). Dietary zinc modulates gene expression in murine thymus: results from a comprehensive differential display screening. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. 100(7):3883-3888.
76. Morton, James P; MacLaren, Don P. M; Cable, Nigel T; Bongers, Thomas; Griffiths, Richard D; Campbell, Iain T; Evans, Louise; Kayani, Anna; McArdle, Anne; Drust, Barry. (2006). Time course and differential responses of major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. 101(1):176-182.
77. Nagao, Minako; Sugimura, Takashi. (1976). Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Advances in Cancer Research*. 23:131-169.
78. Narberhaus, Franz. (2002). α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(1):64-93.
79. Nehlig, Astrid; Daval, Jean-Luc; Debry, Gérard. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*. 17:139-170.

80. Nikitin, Alexey G; Navitskas, Serena; Gordon, Lee-Ann Nicole. (2008). Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. 63(2):149-150.
81. Nunoshiba, Tatsuo; Demple, Bruce. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research*. 53:3250-3252.
82. Ozcan, Ayla; Ogun, Metin. (2015). Biochemistry of reactive oxygen species and nitrogen species. In: *Basic principles and clinical significance of oxidative stress*. Editor: Thatha Gowder, Sivakumar Joghi. InTech. Arabia Saudita. Pag: 37-58.
83. Pandey, Udai Bhan; Nichols, Charles D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*. 63(2):411-436.
84. Patterson, Cam; Höhfeld, Jörg. (2006). Molecular chaperones and the ubiquitin-proteasome system, In: *Protein Degradation*. Eds: Mayer, John; Ciechanover, Aaron J; Rechsteiner, Martin. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Pp: 1-30.
85. Pratt, William B. (1998). The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 214(4):420-434.
86. Pratt, William B; Toft, David O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*. 228(111):111-133.
87. Pollack, Kelly; Balazs, Kimberly; Ogunseitan, Oladele. (2009). Proteomic assessment of caffeine effects on coral symbionts. *Environmental Science & Technology*. 43(6):2085-2091.
88. Radhakrishnan, K; Dinesh Nayak, S; Pradeep Kumar, S; Sankara Sarma, P. (2005). Profile of antiepileptic pharmacotherapy in a tertiary referral center in South India: a pharmacoepidemiologic and pharmaco-economic study. *Epilepsia*. 40(2):179-185.

89. Ramírez Pérez, Sonia Arizbeth. (2018). Perfiles de expression de algunos Cyp450s en larvas (estadio III) de *Drosophila melanogaster* (Artrópoda: Díptera) tratadas con 4-NQO. Tesis para obtener el título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. 57 pp.
90. Ritossa, Ferruccio. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 18:571-573.
91. Riviera Martínez, César Andrés. (2012). 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Morphology*. 30(1):309-314.
92. Rodriguez del Rey, Zoe; Granek, Elise F; Buckley, Bradley A. (2011). Expression of *HSP70* in *Mytilus californianus* following exposure to caffeine. *Ecotoxicology*. 20(4):855-861.
93. Ronis A, Martin J. J; Huang A, Jian; Longo B; Vincenzo; Tindberg B, Niclas; Ingelman-Sundberg, Magnus; Badger A, Thomas M. (1998). Expression and distribution of cytochrome P450 enzymes in male rat kidney: effects of ethanol, acetone and dietary conditions. *Biochemical Pharmacology*. 55(2):123-129.
94. Saibil, Helen. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 14(10):630-642.
95. Saini, Simrat P.S; Sonoda, Junichiro; Xu, Li; Uppal, Hirdesh; Mu, Ying; Ren, Songrong; Moore, David D; Evans, Ronald M; Xie, Wen. (2004). A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Molecular Pharmacology*. 65(2):292-300.
96. Sakikawa, Chisa; Taguchi, Hideki; Makino, Yoshihide; Yoshida, Masasuke. (1999). On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *Journal of Biological Chemistry*. 274:21251-21256.
97. Schöffl, Fritz; Prändl, Ralf; Reindl, Andreas. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology*. 117(4):1135-1141.
98. Sharma, Pallavi; Jha, Ambuj Bhushan; Dubey, Rama Shanker; Pessarakli, Mohammad. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and

- antioxidative defense mechanisms in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. Vol 2012:1-26.
99. Shrestha, Lisa; Patel, Hardik J; Chiosis, Gabriela. (2016). Chemical tools to investigate mechanisms associated with HSP90 and HSP70 in disease. *Cell Chemical Biology*. 23(1):158-172.
100. Singh, Mahendra Pratap; Krishna, M.M;Mathur, N; Saxena, D.K; Chowdhuri, D. Kar. (2009). Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*. role of ROS generation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 235(2):226-243.
101. Singh, Mahendra Pratap; Ram, Ravi K; Mishra, M; Shrivastava, M; Saxena, D.K. (2010). *Chemosphere*. 79(5):577-587.
102. Sottile, Mayra L; Nadin, Silvina, B. (2018). Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress Chaperones*. 23(3):303-315.
103. Southgate, Richard; Ayme, Agnes; Voellmy, Richard. (1983). Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *Journal of Molecular Biology*. 165(1):35-57.
104. Sugatani, Junko; Kojima, Hiroyuki; Ueda, Akiko; Kakizaki, Satoru; Yoshinari, Kouichi; Gong, Qi-Hung; Owens, Ida S; Negishi, Masahiko; Sueyoshi, Tatsuya. (2001). The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT-1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology*. 33(5):1232-1238.
105. Tada, Mitsuhiro, Tada, Mariko. (1975). Seryl-tRNA synthase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature*. 255(5508):510-512.
106. Tatum, Marcus C; Ooi, Felicia K; Rao Chikka, Madhusudana; Chauve, Laetitia; Martínez-Velazquez, Luis A; Steinbusch, Harry W.M; Morimoto, Richard I; Prahlad, Veena. (2014). Neuronal serotonin release triggers the heat shock response in *C. elegans* in the absence of temperature increase. *Current Biology*. 25(2):163-174.

107. Timsit, Yoav E; Negishi, Masahiko. (2014). Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system. *PLoS One*. 9(5):e96092.
108. Tissieres, Alfred; Hershel, Mitchell K; Tracy, Ursula M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*. 84(3):389-398.
109. Treweek, Teresa M; Meehan, Sarah; Ecroyd, Heath; Carver, John A. (2015). Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(3):429-451.
110. Tyedmers, Jens; Mogk, Axel; Bukau, Bernd. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Molecular Cell Biology*. 11:777-788
111. Valavanadis, Athanasios; Vlahogianni, Thomais; Dassenakis, Manos; Scoullou, Michael. (2006). Oxidative stress in cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64(2):178-189.
112. van Oosten-Hawle, Patricija; Morimoto, Richard I. (2014). Transcellular chaperone signalling: an organismal strategy for integrated cell stress responses. *Journal of Experimental Biology*. 217(1):129-136.
113. Vázquez Gómez, Gerardo. (2011). Determinación de la genotoxicidad de la zearalenona en *D. melanogaster* y patrones de expresión de algunos genes Cyp450 involucrados en su degradación. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 60 pp.
114. Walter, S. (2002). Structure and function of the GroE chaperone. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:1589-1597.
115. Wang, Yue-Ming; Sien Ong, Su; C. Chai, Sergio; Chen, Taoscheng. (2012). Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 8(7):803-817.
116. Wangler, Michael F; Bellen, Hugo J. (2017). In vivo animal modeling: drosophila. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. (Eds.) Jalali, Morteza; Saldanha, Francesca Y. L; Jalali, Mehdi. Academic Press. Reino Unido. 355 pp.

117. Waris, Gulam; Ahsan, Haseeb. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogens*. 5(14):1-8.
118. Whitley, David; Goldberg, Steven P; Jordan, William D. (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*. 29(4):748-751.
119. Wientjes, Frans B; Segal, Anthony W. (1995). NADPH oxidase and respiratory burst. *Seminars in Cell Biology*. 6(6):357-365.
120. Wilkey, J; Buchberger, G; Saucier, K; Patel, S.M; Eisenberg, E; Nakagawa, H; Michaylira, C.Z; Rustgi, A.K. & Mallya, S.M. (2009). Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Molecular Carcinogenesis*. 48:853-861.
121. Willoughby, Lee; Chung, Henry; Lumb, Chris; Robin, Charles; Batterham, Philip; Daborn, Philip 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.
122. Yoshinari, Kouichi; Kobayashi, Kaoru; Moore, Rick; Kawamoto, Takeshi; Negishi, Masahiko. (2003). Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Letters*. 248(1-3):17-20.
123. Yoshikawa, Toshikazu; Naijo, Yuji. (2002). What is oxidative stress?. *Japan Medical Association Journal*. 45(7):271-276.
124. Zhuravleva, Anastasia; Gierasch, Lila M. (2011). Allosteric signal transmission in nucleotide-binding domain of 70-kDa heat shock protein (*Hsp70*) molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(17):6987-6992.

ANEXO

Secuencias de amplicones generadas por los oligonucleótidos diseñados.

– Hsp26

GGTCATAGGGCCGCGCCCATCTACGAGCTTGGACTGGGATTGCATCCGCCATTCCC
GCTACGTGCTGCCCTTGGCACTCAGCAGCGCCGTTCCATCAACGGATGCCCTTGC
GATAACA

– Hsp60

TCGGCGTGGTCTATTGTGCGTCGTGCCCTGCGCATGCCATGCATGACGATTGCCAAG
AACGCCGGCGTTGATGGCGCCATGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAATCAGGCCGGTGA
CTACGGCTACGATGCGCTGAAGGGCGAATACGGCAACCTGATCGAGAAGGCATCTC
GAGACT

– Hsp70

GACCTGGAGGAACAGCTCGATGGTGCTGACCAAGATGAAGGAGACGGCGGAGGCGT
ATCTGGGCGAGAGCATCACAGGATGCAGTCATCACAGTTCCAGCTTACTTCAACGAC
TCTCAGCGCCAGGCTACCAAAGACGCCGGTCCATCGCCGGCCTGAATGTGCTCCG
CATCATCAATGAGCCCAGGGTCTGGTGGTCGATCGACTACCCCCACTGCTGCTGAAT
GATCATCTTCTTTAGCTGCTAGCAAGCCCATTGTGCGACGCGCCACGATTGTTTAGTG
CAGTGCCGGAACTCCAGCTCACCGCTGCAATGTGCGCGCGGAAGGATACCCGAGA
CCATTTCCCTGAAACGTCGGATAAGAACTACATCTCGCGGGACTCACCTTATAATAC
CAACAA

– Hsp83

GAGTTAGAGAGAGGAGTGGAGATGATGAGCCCAAATCGAGGATGTTGGCGAGGAT
GAGGATGCCGACAAGAAGGACAAGGATGCCAAGAAGAAGAAGACCATCAAGGAGAA
GTACACTGAGGATGAGGAGCTGAACAAGACCAAGCCCATCTGGAAGCAATCCCGATG
ATATCTCCAGGAGGATACGGCCAGTTCTACAAATCGGTGACCAACGACTGGGAGGA
TCATCTGGGCGGCAAGCACTTACCCTGGAGGGTCTTCTGGAGTTCCGTGCTCTGCT
CATTATCACCTCATCGTAAGAAAGGATCTCAGCG