



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA Y UNIDAD DE
GENÓMICA AVANZADA**

**“Efecto de la dieta en el perfil metabólico de *Drosophila melanogaster* y
especies cactofílicas”**

Tesis que Presenta

Ing. Daniel Cázarez García

Para Obtener el Grado de

Maestría en Ciencias en Biología Integrativa

Directores de Tesis
Dr. Robert Winkler
Dra. Therese Ann Markow

Irapuato, Gto. México

Marzo, 2017



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA Y UNIDAD DE
GENÓMICA AVANZADA**

**“Efecto de la dieta en el perfil metabólico de *Drosophila melanogaster* y
especies cactofílicas”**

Tesis que Presenta

Ing. Daniel Cázarez García

Para Obtener el Grado de

Maestría en Ciencias en Biología Integrativa

Directores de Tesis

Dr. Robert Winkler

Dra. Therese Ann Markow

Comité tutorial

Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro

Dr. Stefan de Folter

Irapuato, Gto. México

Marzo, 2017

Agradecimientos

Primero me gustaría agradecer al Concyt, por la beca otorgada con número de registro 326137, con la que pude pasar éstos últimos años como estudiante del CINESTAV-IPN, trabajando con personas increíbles que ahora son muy especiales para mí.

Después me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Robert Winkler, por su paciencia, por brindarme herramientas y oportunidades y por dejarme resolver problemas en su laboratorio. También a la Dra. Therese Ann Markow, porque me permitió experimentar con moscas *Drosophila* y a mi comité tutorial, porque me dieron valiosos comentarios y observaciones durante mi maestría.

Después me gustaría agradecer a mis compañeros del Laboratorio de análisis bioquímico e instrumental, porque sus críticas y comentarios me preparan para el mundo de afuera, y a Cristina Elizarraraz y a Teresa Carrillo, por su tiempo y dedicación al laboratorio. Del Laboratorio de genómica para la biodiversificación, me gustaría agradecer su compañerismo y apoyo, especialmente a Mariana Ramírez y a Néstor Nazario Yepiz, porque todos los experimentos con moscas los aprendí de ellos.

Finalmente, me gustaría agradecer a mis amigos, por escucharme y apoyarme, a mis hermanos, por acompañarme y cuidarme siempre, y a mis padres, porque esto es suyo, por su ejemplo de superación y por apoyarme toda mi vida.

Para mis padres,
Anita y Memo,

y mis hermanos,
Lupita y Memito

“Las causas desconocidas del metabolismo se encuentran en las células de un organismo” Carl Von Voit (1881).

Índice

Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	viii
Abreviaciones	ix
Resumen	x
Abstract.....	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ecología de <i>Drosophila melanogaster</i> y especies cactofílicas	2
1.2 Especies de <i>Drosophila</i> como sistemas de estudio.....	5
1.3 Lípidos en <i>Drosophila</i>	6
1.4 Metabolómica y Lipidómica.....	7
1.5 Estudio presentado	10
2 HIPÓTESIS	11
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos	11
4 METÓDOS	12
4.1 Experimentación con dietas y especies de <i>Drosophila</i>	12
4.2 Colección de muestras	13
4.3 Extracción de metabolitos	13
4.4 Análisis con espectrometría de masas	14
4.5 Análisis estadístico	15
4.5.1 Pre-procesamiento de datos.....	15
4.5.2 Análisis robusto con minería de datos.....	16
4.5.3 Comparaciones de cambios	17

4.6	Identidad de las características discriminatorias	17
5	RESULTADOS	20
5.1	Efectos de la dieta en el tiempo de desarrollo	20
5.2	Alta dimensionalidad en el metaboloma de especies de <i>Drosophila</i>	21
5.3	Características discriminatorias del genotipo y la dieta	23
5.4	Significancia de las características discriminatorias	26
5.5	Identificación	30
6	DISCUSIÓN	38
6.1	La dieta afecta el tiempo de desarrollo de especies de <i>Drosophila</i>	38
6.2	Características discriminatorias con bosques aleatorios	39
6.3	Fosfolípidos y ecología de las especies de <i>Drosophila</i>	40
6.4	Especies cactofílicas como modelos de estudio	42
7	CONCLUSIÓN	45
	BIBLIOGRAFÍA	47
	ANEXOS	52

Lista de figuras

Figura 1. Relación filogenética de 12 especies de <i>Drosophila</i>	3
Figura 2. Resumen general del procesamiento de datos	19
Figura 3. Tiempo de desarrollo.....	20
Figura 4. Cromatograma total de iones (TIC) crudo típico	21
Figura 5. PCA no supervisado por código de color para especies.....	24
Figura 6. PCA de las especies por código de color para dieta.....	25
Figura 7. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias del modelo global dirigido a especies.	27
Figura 8. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias de los modelos selectivos dirigidos a sexo	28
Figura 9. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias de los modelos selectivos dirigidos a dieta.....	29
Figura 10. Patrón de elusión de fosfolípidos	33
Figura 11. Cromatograma reconstruido con las características discriminatorias para sexo resaltadas	34
Figura 12. Cromatograma reconstruido con las características discriminatorias para dieta resaltadas.....	35
Figura 13. Mecanismo bioquímico simplificado	44

Lista de tablas

Tabla 1. Métodos de Ionización	8
Tabla 2. Iones y pérdidas neutrales de fosfolípidos.....	9
Tabla 3. Receta de las dietas utilizadas	12
Tabla 4. Gradiente de UPLC.....	15
Tabla 5. ANOVA del tiempo de desarrollo	21
Tabla 6. Número de muestras de cada grupo de las especies.....	22
Tabla 7. Características con RSD < 20%	22
Tabla 8. Características informativas por modelo.....	23
Tabla 9. Patrón de fragmentación.....	31
Tabla 10. Características con hit en LipidBlast-mz-Lookup.....	36

Abreviaciones

EPS igual proporción proteína:azúcar

ESI ionización por electro spray

FDR Tasa de falsos positivos (False Discovery Rate)

HPS Alta proporción proteína:azúcar

kHz kilo Hertz

kV kilo volts

LPC liso-fosfatidilcolina

LPE liso-fosfatidiletanolamina

LPS Baja proporción proteína azúcar

MetS Síndrome metabólico

MS Espectrometría de masas

ms milisegundos

MS2 Espectro de masas con fragmentación de un ion precursor

m/z razón masa carga

NAFLD hígado graso no alcohólico

OOB error fuera de bolsa (out of bag error)

PC fosfatidilcolina

PCA análisis de componentes principales

PE fosfatidiletanolamina

PI fosfatidilinositol

PS fosfatidilserina

RF bosques aleatorios (random forest)

rt tiempo de retención

T2D diabetes tipo 2

UPLC cromatografía líquida de alta resolución

Resumen

Las enfermedades metabólicas como obesidad, hígado graso no alcohólico, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 comparten procesos patológicos que surgen de interacciones complejas de factores genéticos y ambientales pobremente entendidos.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha sido un excelente modelo en la investigación del metabolismo. Además, en el género *Drosophila* existen más de 2,000 especies descritas, ofreciendo la oportunidad para identificar rutas metabólicas novedosas que permiten a cada especie sobrevivir en sus respectivos nichos ecológicos y nutricionales. *D. melanogaster*, es una especie cosmopolita, que se alimenta de frutas en descomposición, ricas en fructosa y glucosa, por el contrario, las moscas del grupo repleta, se alimentan principalmente de cactus en descomposición, bajos en fósforo, nitrógeno y carbohidratos simples. En este grupo, *D. arizoane* es una especie oportunista que se alimenta incluso de frutas, mientras que su pariente cercana *D. mojavensis*, está restringida a cactus.

Para estudiar el efecto de dietas isocalóricas con distinta proporción de proteína:azúcar en las especies con ecologías contrastantes mencionadas, se usó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Se seleccionaron variables discriminatorias con modelos de bosques aleatorios y se visualizó su poder de separación con análisis de componentes principales. Los perfiles metabólicos de *D. melanogaster* fueron indistinguibles por efectos de la dieta, en contraste, se observaron cambios significativos en los perfiles de las especies cactofílicas. Con datos de fragmentación se identificaron cambios en las fosfatidiletanolaminas y fosfatidilcolinas entre las especies y entre las dietas, lo que sugiere un mecanismo bioquímico por el cual las especies cactofílicas son más susceptibles a los cambios nutricionales. Además, como los fosfolípidos son biomarcadores tempranos de la diabetes tipo 2, los resultados indican el potencial de las especies cactofílicas para investigar el rol de los fosfolípidos y su relación con enfermedades metabólicas.

Abstract

Metabolic diseases as obesity, non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and type 2 diabetes share pathophysiological processes that emerge by poorly understood complex interactions of genetic and environmental factors.

The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has been an excellent model in metabolism research. Moreover, the genus *Drosophila* contains more than 2,000 diverse species, offering the opportunity to identify novel metabolic pathways that allows each species to survive in their respective ecological and nutritional environments. *Drosophila melanogaster* is a cosmopolitan species that feeds of decomposed fruits rich in fructose and glucose. In contrast, flies from the repleta group feed mainly of decomposed cactus, which are low in phosphorus, nitrogen and simple carbohydrates. In this group, *D. arizonae* is an opportunistic species that also feeds on fruits, while it's closest relative *D. mojavensis*, is restricted to cactus.

To study the effects of isocaloric diets with distinct protein:sugar ratio on the metabolomes of the ecologically diverse species mentioned above, liquid chromatography coupled with mass spectrometry was used. Discriminant features were selected with random forest models and their discriminant power was visualized with principal component analysis. Metabolic profiles of *D. melanogaster* were indistinguishable due to diet, in contrast, significant changes were observed in cactophilic species. Data dependent analysis identified changes in phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines between species and between diets, which suggests a biochemical mechanism of the susceptibility of cactophilic species to nutritional changes. Moreover, as phospholipids are early biomarkers of type 2 diabetes, the results indicate the potential of cactophilic species to research the role of phospholipids in metabolic diseases.

1 INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico es una enfermedad en la que convergen los procesos patofisiológicos como obesidad visceral, resistencia a la insulina, dislipidemia y disfunción endotelial. En otras enfermedades metabólicas estrechamente relacionadas como obesidad, hígado graso no alcohólico y diabetes tipo 2 también se presentan algunos de éstos procesos, los cuales surgen de la interacción compleja de factores genéticos y ambientales (Marchesini *et al.*, 2001; Pradhan, 2007; Despres *et al.*, 2008; Cheneke *et al.*, 2016).

En particular, la dislipidemia se caracteriza por niveles elevados de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad del colesterol y disminuidos de lipoproteínas de alta densidad del colesterol. Además, utilizando métodos sensibles como la espectrometría de masas, Wang *et al.* (2005) encontraron que ciertas fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE) y esfingomielinas discriminan entre sujetos sanos de pacientes con prediabetes o diabetes tipo 2, sugiriendo un rol central de los fosfolípidos en las enfermedades metabólicas.

En el 2007, Carrasco y Mérida sugirieron la importancia de los diacilgliceroles en los procesos de señalización y regulación y enfatizan la necesidad de modelos animales de investigación para elucidar los mecanismos del metabolismo de lípidos y poder ofrecer herramientas de prevención, diagnóstico y terapia de enfermedades como la diabetes tipo 2.

Más tarde en el 2012, Weijers propuso que las fosfatidilcolinas con cadenas saturadas producen membranas más rígidas que dificultan el ensamblaje de receptores de insulina, como el GLUT4 y por tanto disminuyen la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo y muscular. Aunque esta propuesta no consideró las características físicas de otras clases de fosfolípidos, sí sugirió un mecanismo bioquímico de la resistencia a la insulina y mostró la importancia de las interacciones intermoleculares de los fosfolípidos en el desarrollo de diabetes tipo 2 (T2D).

Por otro lado, Cano y Alonso (2014) indicaron que la disminución en la proporción de fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas de los hepatocitos hace ineficiente el transporte de triglicéridos fuera del hígado, lo que ocasiona NAFLD, una enfermedad estrechamente relacionada con el síndrome metabólico (Marchesini *et al.*, 2001).

Finalmente, aunque se conoce la maquinaria del metabolismo de lípidos y se ha investigado el rol de los fosfolípidos en las enfermedades metabólicas con distintas perspectivas, cómo interactúa el genotipo con el ambiente para establecer la composición de las membranas celulares permanece elusivo (Barroso, 2005; Orešič *et al.*, 2008; Cheneke *et al.*, 2016; Kulick *et al.*, 2016). En consecuencia, se necesitan enfoques de investigación novedosos y sistemas biológicos que permitan diferenciar los factores genéticos de los ambientales involucrados en los procesos de la dislipidemia.

En este sentido, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un excelente modelo para la investigación del metabolismo porque muchas rutas metabólicas están conservadas evolutivamente con el humano (Palanker Musselman *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2015). Y no solo su genoma está completamente caracterizado, sino también los genomas de alrededor de 30 especies de *Drosophila* (<https://stockcenter.ucsd.edu/info/genomesets>), por lo que se ofrecen ventajas para identificar rutas metabólicas que permiten a cada especie sobrevivir en sus respectivos nichos ecológicos y nutricionales (Stark *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2011).

Ecología de *Drosophila melanogaster* y especies cactofílicas

En el género *Drosophila* existen más de 2,000 especies de moscas con comportamientos y dietas variadas (Markow and O'Grady, 2005), por lo que son

sistemas biológicos interesantes para la investigación los efectos de la dieta en su metabolismo (Stark *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2011).

En Matzkin *et al.*, (2009), la dieta estándar de laboratorio tuvo efectos diferenciales en el contenido total de proteína, glucógeno y triglicéridos en 12 especies de *Drosophila* adaptadas a climas y nutrientes particulares. Las moscas del subgénero *Drosophila* adaptadas a consumir plantas en descomposición, presentaron mayor contenido total de triglicéridos que las especies adaptadas a consumir frutas del subgénero *Sophophora* (Figura 1).

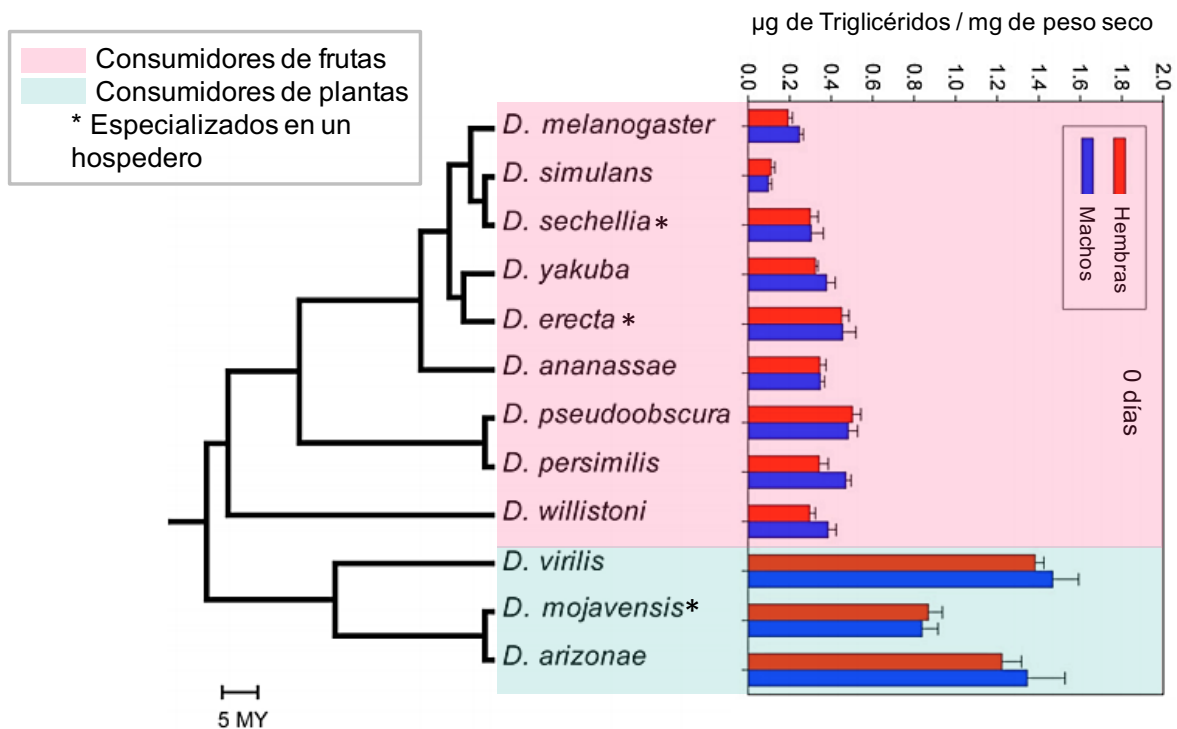


Figura 1. Relación filogenética de 12 especies de *Drosophila*. Contenido total de Triglicéridos por mg de peso seco de hembras y machos a los 0 días pos eclosión en dieta estándar de laboratorio, las barras representan el promedio \pm SE. Adaptado de (Matzkin *et al.*, 2009).

En el subgénero *Sophophora*, la mosca de la fruta, *D. melanogaster*, es comensal del humano y su flexibilidad dietaria le ha permitido ser una especie

cosmopolita, se alimenta de frutas en descomposición, ricas en carbohidratos simples y tiene alta tolerancia al etanol.

En contraste, en el subgénero *Drosophila*, las especies del grupo repleta son insectos saprófitos de cactus, que tienen una dieta natural baja en fósforo, nitrógeno y carbohidratos simples y están expuestas a compuestos altamente tóxicos para otras especies como los alcaloides (Ruiz y Heed, 1988). En este grupo se ha estudiado ampliamente la ecología y evolución de dos especies cercanas filogenéticamente, *D. arizonae* y *D. mojavensis*, que son simpátricas en algunas regiones e hibridan en el laboratorio. Además, el genoma de ambas especies está secuenciado (Reed *et al.*, 2006; Sanchez-Flores *et al.*, 2016).

Drosophila arizoane es una especie oportunista, su distribución es desde el sureste de los Estados Unidos hasta Guatemala y se alimenta de cactus columnar cina (*Stenocereus alamosensis*), cactus tubo de órgano (*Stenocereus thurberi*), pitaya agria (*Stenocereus gummosus*), varios opuntia e incluso cítricos (Reed *et al.*, 2006), lo que sugiere que su metabolismo debe ser muy flexible para tolerar cambios nutricionales drásticos.

Por el contrario, *D. mojavensis* está altamente especializada en ciertos cactus según la población geográfica, en Desierto de Sonora y Sureste de Arizona se alimenta de cactus tubo de órgano (*Stenocereus thurberi*) y ocasionalmente de cactus columnar cina (*Stenocereus alamosensis*), en Desierto de Sonora cerca de Desemboque de pitaya agria (*Stenocereus gummosus*), en Baja California de agria (*Stenocereus gummosus*), en Desierto de Mojave de biznaga (*Ferocactus cylindraceus*) y en Isla Catalina de tuna (*Opuntia littoralis*). Además, presenta resistencia a la desecación y tolerancia térmica a los veranos de hasta 50°C de los desiertos de Norteamérica (Matzkin y Markow, 2009).

Al considerar la ecología e historia adaptativa de distintas especies de *Drosophila* se pueden encontrar qué características metabólicas permiten a ciertas especies tolerar ciertos alimentos y a otras no.

Especies de *Drosophila* como sistemas de estudio

Además de que muchas rutas metabólicas están conservadas evolutivamente, en las moscas *Drosophila*, también se encuentran órganos y tejidos con funciones análogas con el humano (Baker y Thummel, 2007), y se estima que alrededor del 75% de las enfermedades genéticas de humanos tienen ortólogos funcionales en la mosca (Ugur *et al.*, 2016).

En Musselman (2012) indujeron T2D en una línea silvestre de *D. melanogaster*, no obstante, las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial con un contenido del 80% de azúcares simples y contrastaron con las dietas comparadas con dos veces más el contenido calórico. Aun así, lograron identificar procesos patológicos como resistencia a la insulina y niveles altos de triglicéridos, lo que indica de alguna manera que los mecanismos por sobreconsumo de azúcar están conservados evolutivamente.

En estudios de Reed *et al* (2014), se compararon los perfiles transcripcionales y los perfiles metabólicos de 20 líneas de *D. melanogaster* en 4 dietas, y se asociaron las diferencias no solo al genotipo y a la dieta, sino que su interacción explicó gran proporción de la variación. Además, se provee evidencia de que la dieta altera el metabolismo de los fosfolípidos y ácidos grasos a nivel transcripcional y metabólico (Reed *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2015).

Por otro lado, en un estudio previo donde se compararon los efectos de dietas isocalóricas con alta, media y baja proporción de proteína:azúcar en moscas con ecologías contrastantes (Matzkin *et al.*, 2011), las líneas de *D. melanogaster* presentaron incremento en triglicéridos y glucógeno total al incrementar los

carbohidratos de la dieta, además de que en las líneas de *D. mojavensis* el incremento fue mayor. También se observaron efectos severos en la viabilidad y tiempo de desarrollo únicamente en *D. mojavensis*, al no haber sobrevivientes en la dieta con baja proporción de proteína:azúcar. Esto podría indicar que la especie cactofílica es más susceptible al azúcar, sin embargo, la cuantificación de triglicéridos con ensayos colorimétricos solo ofrecen una estimación del contenido total de una sola clase de lípidos y no permite distinguir entre di glicéridos y mono glicéridos (Al-Anzi y Zinn, 2010). Por lo tanto, para identificar la extensión de los efectos de la dieta en los lípidos totales se necesitan métodos más finos de caracterización, cómo los descritos en los siguientes apartados.

Lípidos en *Drosophila*

Ya que los lípidos desempeñan múltiples funciones fisiológicas y la importancia de los fosfolípidos en los procesos patológicos de las enfermedades metabólicas, estudios recientes en *Drosophila* han comenzado a describir cómo factores ambientales y genéticos dan forma a los perfiles lipídicos con técnicas como la espectrometría de masas.

En Scheitz *et al.* (2013), se observó que la composición de distintas clases de lípidos es altamente heredable en cinco poblaciones de *D. melanogaster*; las fosfatidilcolinas (PC) y las fosfatidiletanolaminas (PE) muestran mayor variación en la heredabilidad, por lo que sugieren que la razón PC/PE es el mecanismo por el cual ajustan la rigidez de las membranas plasmáticas a la variación térmica, así como las saturaciones de las cadenas alquílicas aunque no consideran los efectos de la nutrición en la regulación de las membranas plasmáticas.

En el aspecto de desarrollo y maduración sexual, en Parisi *et al.*, (2011) encontraron que el perfil de lípidos es diferente en machos y hembras, incluso sin línea germinal. Y en Guan *et al.*, (2013) describieron la composición de lípidos durante varias etapas del desarrollo de *D. melanogaster*, siendo interesante que las

diferencias entre machos y hembras son muy sutiles al día 1 de edad y más contrastantes a los 5 días de edad. Por otro lado en Carvalho *et al.*, (2012), encontraron que dietas de diferente fuente de ácidos grasos, una vegetal y otra de levaduras, afectan el perfil lipídico a nivel de tejidos. Sin embargo, pocas investigaciones describen los efectos de distintos macronutrientes en el metabolismo de lípidos, además de que los estudios se han limitado principalmente a *D. melanogaster*.

Metabolómica y Lipidómica

Como se mencionó con anterioridad, para estudiar con alta sensibilidad los procesos dinámicos de los lípidos en sistemas biológicos se usan técnicas poderosas como la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear y la cromatografía de capa fina. La ventaja principal de MS sobre las otras, es que detecta gran diversidad de lípidos con alta sensibilidad y reproducibilidad (Milne *et al.*, 2006).

En MS, la fuente de ionización por spray eléctrico (ESI) permite analizar los extractos por inyección directa (DIESI) o acoplar la cromatografía líquida de alta resolución (UPLC). Con UPLC-MS se detectan mayor cantidad de lípidos que en DIESI, además de que el tiempo de elusión lo determina la clase de lípido, la longitud de cadena de ácidos grasos y su número de insaturaciones (Checa *et al.*, 2015; Bilgin *et al.*, 2016).

Dado que ESI es una fuente de ionización suave (Tabla 1), comúnmente se forman iones con razón masa carga (m/z) de lípidos intactos, sin embargo, aunque la masa molecular es una característica intrínseca de cada lípido o molécula, su identidad se determina con el uso de estándares o con el análisis de datos dependientes para comparar su patrón de fragmentación con bases de datos de referencia (Hartler, 2015).

Tabla 1. Métodos de Ionización

Métodos de ionización	Positivo	Negativo
Suaves*	Protonación Cationización	Desprotonación
Duras	Expulsión de electrones	Captura de electrones

*Métodos de ionización que ocurren en ESI

De entre las tecnologías de analizadores de masas, la trampa de iones ofrece ventajas en éste tipo de análisis; iones (precursores) seleccionados son atrapados en un campo de radio frecuencia y permite aplicar energía de colisión (CID) para obtener su patrón de fragmentación (Siuzdak, 2003), después iones de muestras complejas se asocian a lípidos o moléculas específicas como compuestos identificados, compuestos putativamente anotados, clases putativamente anotadas y compuestos desconocidos (Dunn *et al.*, 2013).

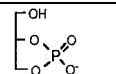
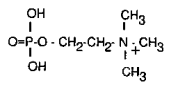
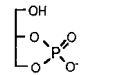
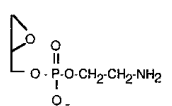
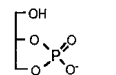
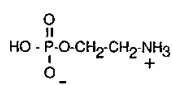
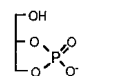
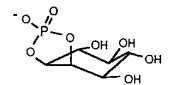
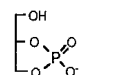
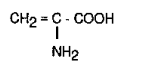
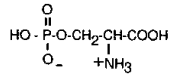
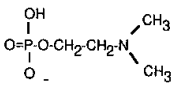
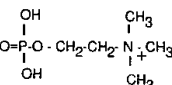
En estudios de lípidos con ESI-MS, se han caracterizado los patrones de fragmentación de diversas clases de fosfolípidos (Tabla 2, Revisado en Brügger *et al.*, 1997; Milne *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2009), lo que facilita que iones se asocien inequívocamente a cierta clase de lípidos.

Finalmente, en el detector se registra la razón masa/carga (m/z) y la abundancia relativa de cada ion para generar los espectros de masas y por la alta dimensionalidad de los datos en lipidómica se utilizan análisis estadísticos robustos. Típicamente están los análisis de componentes principales (PCA) y los análisis discriminatorios por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) o análisis no ortogonales como redes neuronales o bosques aleatorios (Random Forests, RF).

El algoritmo de RF permite hacer modelos de clasificación predictivos no supervisados o supervisados para detectar la señal biológica específica para diferenciar entre dos o más grupos. Tiene alta tolerancia al ruido, proporciona la importancia de las variables con el *mean-DecreaseGini* e incluso la proximidad entre

las muestras, las variables con mayor *mean-DecreaseGini* son las que tienen mayor poder discriminatorio (Touw *et al.*, 2013a).

Tabla 2. Iones y pérdidas neutrales de fosfolípidos

Clase	Estructura	Precursor	MS/MS	Fragmento
PA		$[M-H]^-$	PIS, 153 <i>m/z</i>	Glicerol fosfato —H ₂ O
PC		$[M+H]^+$	PIS, 184 <i>m/z</i>	Fosfocolina
		$[M-H]^-$	PIS, 153 <i>m/z</i>	Glicerol fosfato —H ₂ O
	(CH ₃) ₃ N	$[M+H]^+$	NL, 59 <i>m/z</i>	Trimetilamina
PE		$[M-H]^-$	PIS, 196 <i>m/z</i>	Glicerol fosfatoetanolamina —H ₂ O
		$[M-H]^-$	PIS, 153 <i>m/z</i>	Glicerol fosfato —H ₂ O
		$[M+H]^+$	NL, 141 <i>m/z</i>	Fosfoetanolamina
PI		$[M-H]^-$	PIS, 153 <i>m/z</i>	Glicerol fosfato —H ₂ O
		$[M-H]^-$	PIS, 241 <i>m/z</i>	Fosfato inositol cíclico
PS		$[M-H]^-$	PIS, 153 <i>m/z</i>	Glicerol fosfato —H ₂ O
		$[M-H]^-$	NL, 87 amu	Serina
		$[M+H]^+$	NL, 185 <i>m/z</i>	Fosfoserina
SM		$[M-H]^-$	PIS, 168 <i>m/z</i>	Fosfocolina (dimetilada)
		$[M+H]^+$	PIS, 184 <i>m/z</i>	Fosfocolina

PA ácidos fosfatídicos PS fosfatidilserina

PC fosfatidilcolina PIS iones hijos

PE fosfatidiletanolamina NL pérdida neutral

PI fosfatidilinositol

Revisado en: Brügger *et al.*, 1997; Milne *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2009

El algoritmo de RF internamente subdivide 2/3 de los datos para entrenar el modelo y el 1/3 restante para probar el error de clasificación (Out of bag error, OOB) y asigna un valor de importancia a cada variable según su capacidad discriminativa, además, con métodos de validación cruzada se puede evaluar la exactitud de clasificación de los modelos predictivos.

Estudio presentado

Con relación a que se desconoce la extensión de los efectos de la dieta en *D. melanogaster* y *D. mojavensis* (Matzkin *et al.*, 2011), en el presente estudio se caracterizaron los perfiles metabólicos de estas especies en las dietas isocalóricas con distinta proporción de proteína:azúcar, además se comparan los perfiles de *D. arizonae*, una especie cactofílica que está expuesta a azúcares simples en su nicho ecológico (Reed *et al.*, 2006).

Para caracterizar con alta sensibilidad los perfiles metabólicos de moscas con ecologías contrastantes, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS), se hicieron modelos clasificatorios con bosques aleatorios (RF) para especies, sexo y dieta y análisis de componentes principales para visualizar el poder discriminativo de las variables seleccionadas con RF. Finalmente se caracterizan las variables discriminatorias con análisis de datos dependientes y el patrón de elusión de fosfolípidos.

1 HIPÓTESIS

Las especies de *Drosophila* con nutrición especializada mostrarán cambios en los perfiles metabólicos debido a los cambios nutricionales por dietas isocalóricas con distinta proporción de proteína:azúcar.

2 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los perfiles metabólicos de especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes alimentadas con dietas con distinta proporción de proteína:azúcar.

Objetivos específicos

- Desarrollar método de colecta, extracción y análisis de moscas *Drosophila*.
- Clasificar los perfiles metabólicos no dirigidos de moscas según la especie, el sexo y la dieta de las moscas.
- Proponer metabolitos marcadores de las diferentes clases de muestras.

3 METÓDOS

Experimentación con dietas y especies de *Drosophila*

Para la experimentación se siguió el protocolo reportado por Matzkin y col. en 2011. Primero se obtuvieron líneas de una sola hembra de *D. melanogaster*, *D. arizonae* y *D. mojavensis* del Laboratorio de genómica de la biodiversificación del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad-Unidad de Genómica Avanzada (Langebio-UGA). Éstas se reprodujeron en alimento estándar de plátano, levadura, jarabe de malta Karo y agar, y se mantuvieron a temperatura controlada de 25°C con ciclos de 12 horas luz/oscuridad.

Después, cientos de moscas se colocaron en cámaras con placas Petri con 0.5% agar y una pizca de levadura activa y para las especies cactofílicas se agregó un poco de tuna para inducir la ovoposición. Larvas de tercer instar temprano se transfirieron gentilmente a tubos de vidrio con 10 g de dietas isocalóricas con distinta proporción proteína:azúcar (Tabla 3, Anexo Figura A1); alta proporción proteína:azúcar (HPS), igual proporción proteína:azúcar (EPS) y baja proporción proteína:azúcar (LPS).

Tabla 3. Receta de las dietas utilizadas (Matzkin *et. al.* 2011)

	HPS	EPS	LPS
Sacarosa (g)	8	20	32
Levadura activa seca (g)	32	20	8
Harina de maíz amarillo (g)	9	9	9
Agua destilada (ml)	200	200	200
Agar granulado (g)	1	1	1
Etanol absoluto (ml)	4.5	4.5	4.5
Metilparabeno (g)	0.45	0.45	0.45
Proporción total proteína:carbohidratos	0.43	0.20	0.10
Calorías (kJ/100g)	452	456	469

HPS (alta proporción proteína:azúcar), EPS(igual proporción proteína:azúcar), LPS (baja proporción proteína:azúcar)

Se registró el tiempo de desarrollo del tercer instar al primer adulto observado por vial y se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar los cambios durante el tiempo de desarrollo de cada especie.

Colección de muestras

Comúnmente para clasificar las moscas por machos y hembras, se anestesian con dióxido de carbono, sin embargo, éste afecta el metabolismo energético y se recomienda hacer los estudios fisiológicos pasado un día de la anestesia (Colinet y Renault, 2012). Como el objetivo fue determinar los efectos de la dieta en los perfiles metabólicos en especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes y a que el tiempo de recuperación por exposición a CO₂ en especies cactofílicas no se ha documentado, se clasificaron machos y hembras a los 0 días de eclosión, congeladas en nitrógeno líquido para suspender cualquier actividad enzimática (quenching) y después se colocaron las moscas en cajas Petri enfriadas con hielo seco para su clasificación con ayuda de un estereoscopio por características morfológicas (Markow y O'Grady, 2005).

Después de la clasificación las muestras se almacenaron a -70°C hasta terminar la colecta total de las moscas. Para obtener el peso seco de las muestras y normalizar la extracción, se optó por la liofilización ya que la deshidratación en horno tarda hasta 3 días a 50°C (Matzkin *et al.*, 2011), lo cual podría degradar los metabolitos y oxidar los lípidos termolábiles (Ivanova *et al.*, 2009). Al terminar la colecta total de los experimentos con dietas, se liofilizaron las moscas, se pesaron y se conservaron a -70°C hasta la extracción.

Extracción de metabolitos

Manteniendo los tubos con las muestras de moscas en nitrógeno líquido, se homogenizaron con un pistilo de polipropileno y se agregaron 66 µL por mg de peso seco de metanol al 85 % a -20°C. Después los tubos se sometieron a 5 ciclos de un

minuto en hielo y un minuto en baño ultrasónico a 40 kHz, se centrifugaron por 10 minutos a 4 °C a 15,870 g y se filtró el sobrenadante con membrana de nylon de 0.2 µm. Finalmente se almacenaron los extractos a -20°C hasta el análisis por espectrometría de masas.

Análisis con espectrometría de masas

Se realizó un análisis no dirigido por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS). Para la cromatografía se utilizó un Accela UPLC, usando una columna C18 Hypersil Gold (50x 2.1mm, con 1.9µm de tamaño de partícula) a 30°C con un flujo de 400µL/min. Se inyectaron 10 µL de muestra con las fases móviles: agua con 0.1 %(v/v) ácido fórmico (solvente A) y metanol con 0.1 % ácido fórmico (solvente B), el gradiente se muestra en la Tabla 4. Para la detección el UPLC se acoplo a una trampa de iones LCQFleet (Thermo Finnigan, San José, California)

Se adquirieron los espectros en el rango de 100 a 1400 de masa carga (m/z) en modo centroide y en polaridad positiva. El tiempo de escaneo fue de 500 ms con tres *microscans*). Los parámetros de la fuente de ionización fueron: temperatura del capilar 330 °C, voltaje del capilar 35 V, voltaje del espray 4.0 kV, *tube lens* 80 V, *sheath gas* de nitrógeno 30 unidades arbitrarias (AU) y *auxiliary gas* 20 AU.

El análisis de las muestras se hizo en distintos bloques, de 10 a 15 muestras por bloque en alrededor de 12 meses. Las muestras por especie de los distintos grupos de dietas y sexos se analizaron en orden aleatorio por UPLC-MS, con 6 muestras por grupo.

Finalmente, aunque no fue cuantificado el poder de extracción, los perfiles metabólicos obtenidos indican que el protocolo propuesto es muy eficaz en la extracción de lípidos polares en congruencia con los métodos de extracción revisados (Teo *et al.*, 2015). Por lo tanto, nuestra metodología para la colección y

extracción de lípidos de muestras de *Drosophila* podría ser utilizado en otros insectos para el estudio del lipidoma.

Tabla 4. Gradiente de UPLC, con agua 0.1% ácido fórmico (A) y metanol con 0.1% ácido fórmico (B)

Tiempo (min)	Flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	%A	%B
0.0	400	100	0
2.0	400	100	0
2.1	400	100	0
6.5	400	70	30
17.5	400	35	65
52.0	400	0	100
53.0	400	0	100
53.1	400	100	0
55.0	400	100	0

Análisis estadístico

3.1.1 Pre-procesamiento de datos

Los datos crudos *.raw del UPLC-MS fueron convertidos a *.mzXML con MSConvert. El preprocesamiento del total de las réplicas se hizo en MZmine versión 2.0 como se describe enseguida. Primero se corrigió la línea base de los cromatogramas, se detectaron picos con el algoritmo de GridMass (Treviño *et al.*, 2015) con una tolerancia de 0.35 de m/z , 0.1 a 0.9 min de ancho y una intensidad relativa mínima de 100, después las características se alinearon con RANSAC alignment con una tolerancia de 0.5 m/z y 1.5 min de tiempo de retención, se agruparon isotopos, se hizo gapfilling y se normalizó con el pico más intenso.

En Excel la lista de características con abundancia relativa <300 en los blancos fueron conservadas, después los grupos de muestras fueron separados para calcular la desviación estándar relativa (RSD) de las características por grupo,

se conservan únicamente las características con RSD máximo del 20%. Finalmente se aplica la transformación con \log_2 para el análisis estadístico.

$$RSD_{grupo} = I_{grupo}/SD_{grupo} * 100$$

$I \rightarrow$ intensidad promedio

$SD \rightarrow$ desviación estándar de la intensidad

3.1.2 Análisis robusto con minería de datos

Para el análisis estadístico se generaron modelos supervisados con bosques aleatorios para clasificar los perfiles metabólicos e identificar características con alto poder discriminatorio, los datos se procesaron en R con el paquete *randomForest* para generar modelos globales y selectivos. Los modelos globales fueron dirigidos para clasificar entre especies, para descubrir las diferencias metabólicas entre las especies; y entre sexos y dietas como análisis exploratorio de sus efectos en los perfiles metabólicos. Por otro lado, los modelos selectivos fueron dirigidos para descubrir la identidad metabólica de cada especie debido al sexo o a la dieta. Para los modelos se utilizaron 500 árboles y 28 variables por división.

La exactitud de clasificación e implementación del modelo se midió con validación cruzada base 10. Para esto los datos se dividieron en 10 subconjuntos con una distribución tan parecida como fuera posible a la distribución de datos total para los modelos globales, en los modelos selectivos no se consideró esta distribución. En la validación cruzada 9 subconjuntos son usados para entrenar el modelo y uno para probarlo, este proceso es iterado 10 veces para que cada subconjunto sea puesto a prueba.

De cada modelo se calculó la matriz de error, se obtuvo la exactitud promedio y se obtuvo el valor promedio del *mean-DecreaseGini* para seleccionar las características más discriminativas para cada modelo. Para garantizar el poder discriminatorio de las características seleccionadas, una variable aleatoria fue utilizada en una iteración de los modelos para probar el umbral del valor de *mean-*

DecreaseGini, todas las características con un valor mayor al de la variable aleatoria se consideran discriminatorias para el modelo específico.

Por último, para visualizar el poder clasificatorio de los modelos y el poder discriminatorio de las características seleccionadas con RF, se hicieron análisis de componentes principales (PCA) sin supervisar para cada dieta y para cada especie con las 20 características más discriminatorias del modelo global para especie y de los modelos selectivos de sexo y dieta.

3.1.3 Comparaciones de cambios

Para la estadística inferencial, el total de características fueron analizadas con MetabR (Ernest *et al.*, 2012), con la prueba de Tukey-HSD, las comparaciones entre especies se hicieron por separado para cada dieta y se consideraron cambios significativos los que tengan un valor $p < 0.05$, solamente se mostraron los resultados de la características discriminatorias. Se corrigió la significancia estadística con Benjamini-Hochberg, con una tasa de falsos positivos (FDR, por sus siglas en inglés) de 0.1.

Para cada especie se compararon los sexos de hembras sobre machos de las dietas disponibles. También para cada especie se compararon las dietas con más proporción proteína:azúcar sobre las de menor proporción proteína:azúcar, es decir HPS/EPS, EPS/LPS y HPS/LPS según la disponibilidad y combinando ambos sexos, se consideraron cambios significativos los que tengan un valor $P < 0.05$.

Identidad de las características discriminatorias

Primero se caracterizó la composición de una muestra de cada especie con igual número de hembras y machos de la dieta EPS por UPLC-MS de alta resolución, se utilizó una columna BEH C18 Waters Acquity (2.1 x 50mm, con 1.7 μm de tamaño de partícula) acoplada a un espectrómetro de masas tiempo de vuelo

(Q-TOF, por sus siglas en inglés) Synapt-G1 (Waters) en polaridad positiva de datos dependientes.

Después una muestra de cada especie de la dieta EPS con igual número de machos y hembras se adquirió en polaridad positiva y negativa de datos dependientes (MS2) con la columna C18 Hypersil Gold acoplada a la trampa de iones LCQFleet (Thermo Finnigan, San José, California). Previamente al software Xcalibur se introdujeron las 20 características más discriminativas para adquirir sus fragmentos, si la característica indicada no sobrepasa un umbral de intensidad relativa de 400 se fragmenta el ion más intenso del espectro en el tiempo de retención dado para caracterizar el patrón de elusión de los iones identificados.

Los datos de fragmentación en ambas polaridades se procesaron por separado en MSDial (Tsugawa *et al.*, 2015). La base de datos de referencia se obtuvo de MassBank (<http://www.massbank.jp>) de lípidos para ambos modos de ionización.

Los resultados de la detección de características con datos de fragmentación de MSDial se exportó a Excel en una sola tabla para revisar manualmente la asociación de las MS2 con los datos de referencia de lípidos y verificar la presencia de los hijos característicos de las clases de lípidos, así como de las pérdidas neutrales (Han, 2003).

Para asignar la clase de lípido a la cual pertenecen las características más discriminatorias de los modelos de RF, se caracterizó el patrón de elusión de los lípidos con datos de fragmentación, se determinaron 4 regiones en el cromatograma, la región polar (R1) y tres regiones menos polares (R2 a R4) para delimitar el rango de m/z y el tiempo de retención de los fosfolípidos. Finalmente se estima putativamente la identidad de las características más discriminatorias que se encuentran dentro de las regiones de fosfolípidos con “LipidBlast-lookup” (Kind *et al.*, 2013). En la Figura 2 se resume el análisis de datos.

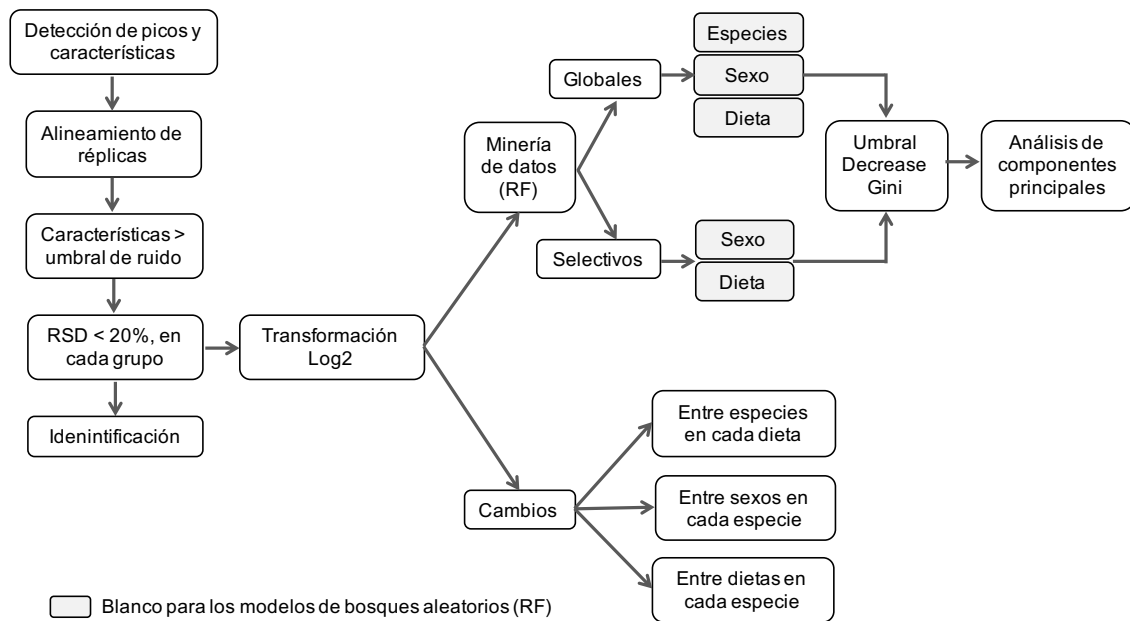


Figura 2. Resumen general del procesamiento de datos. Preprocesamiento de datos, modelos clasificatorios con bosques aleatorios (RF), análisis de componentes principales y estadística con la prueba de Tukey-HSD para las comparaciones de cambios.

4 RESULTADOS

Efectos de la dieta en el tiempo de desarrollo

El tiempo de desarrollo fue afectado en distinto grado según la ecología de las distintas especies por las dietas isocalóricas con distinta proporción de proteína:azúcar. El tiempo de desarrollo de *D. melanogaster* no mostró cambios significativos (Tabla 5, Figura 3). *D. arizonae* mostró cambios significativos por efectos de la dieta, únicamente en la dieta en LPS (baja proporción proteína:azúcar) se retardó 1.6 días respecto a EPS (igual proporción proteína:azúcar) y HPS. Por último, *D. mojavensis* también mostró cambios significativos, en HPS se aceleró 0.89 días respecto a EPS y no hubo sobrevivientes en LPS (Figura 3). Aunque la viabilidad total no fue registrada, *D. melanogaster* fue viable en las tres dietas y *D. arizonae* disminuyó su viabilidad al incrementar el contenido de azúcar de la dieta.

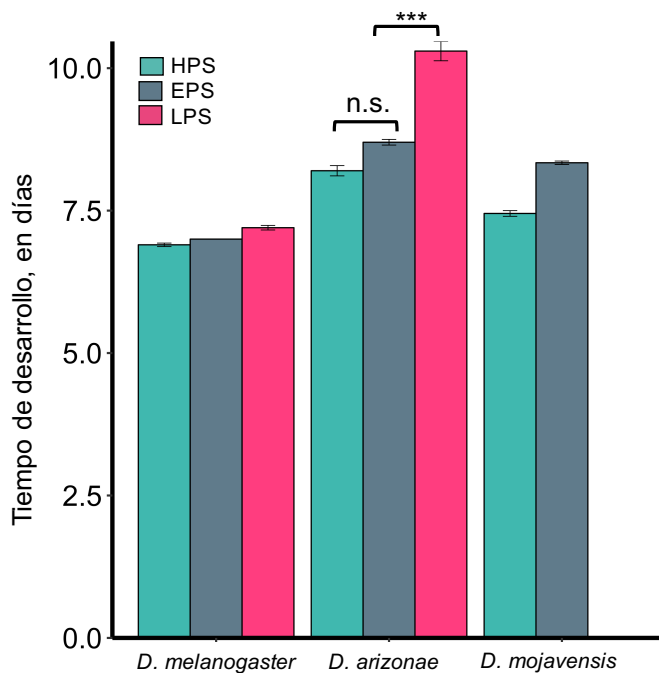


Figura 3. Tiempo de desarrollo. Las barras representan el promedio \pm SE en días de larvas de tercer instar temprano a primer adulto observado por vial, n = 10 (HPS), 10 (EPS), y 10 (LPS) viales en *D. melanogaster*; n= 10 (HS), 10 (EPS) y 9 (LPS) viales en *D. arizonae*; n=10 (HPS) y 29 (EPS) viales en *D. mojavensis*. En *D. arizonae* se indican grupos que no son significativamente diferentes (Tukey–Kramer $P>0.05$)

Tabla 5. ANOVA del tiempo de desarrollo para *D. melanogaster* y *D. arizonae* en las dietas HPS, EPS y LPS y para *D. mojavensis* en HPS y EPS

Especie	Fuente	Df	SS	F ratio	
<i>D. melanogaster</i>	Dieta	2	0.46667	2.52	
<i>D. arizonae</i>	Dieta	2	25.94	9.3874	***
<i>D. mojavensis</i>	Dieta	1	6.321	8.2038	**

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Alta dimensionalidad en el metaboloma de especies de *Drosophila*

El protocolo de extracción permitió la detección de abundantes características con UPLC-MS (Figura 4). Con el preprocesamiento se produjo una matriz con aproximadamente 900 características para las 95 muestras (Tabla 6), las muestras faltantes en machos de *D. arizonae* y en la dieta de LPS de *D. mojavensis* se debió la baja viabilidad de las especies en las dietas (datos no presentados).

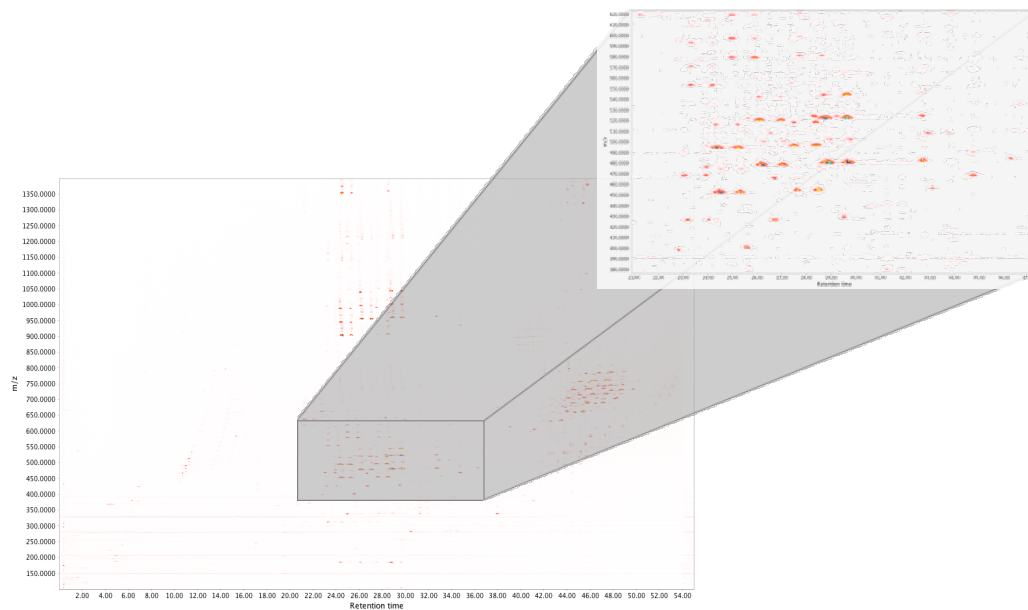


Figura 4. Alta dimensionalidad en los perfiles metabólicos de los extractos de moscas *Drosophila*. Cromatograma total de iones (TIC) crudo típico de un extracto de moscas, los puntos rojos representan una característica, el eje X representa el tiempo de retención (min) y el eje Y la razón masa carga (m/z), en el recuadro superior se observa un acercamiento a una región del cromatograma; captura de pantalla del TIC en 2D en MZmine.2.21.

Tabla 6. Número de muestras inyectadas por UPLC-MS de cada grupo de las especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes

Especie	Sexo	Dieta		
		HPS	EPS	LPS
<i>D. melanogaster</i>	Hembra	6	6	6
	Macho	6	6	6
<i>D. arizonae</i>	Hembra	6	6	6
	Macho	5	5	4
<i>D. mojavensis</i>	Hembra	6	6	0
	Macho	6	6	0

Después se calculó la desviación estándar relativa (RSD) de cada característica (una característica es una m/z asociada a un tiempo de retención) por cada grupo para conservar únicamente las que tuvieran un umbral máximo del 20% y con ello remover características ruidosas. En *D. melanogaster* se encontró mayor variabilidad en las características (Tabla 7), sin embargo, no podemos distinguir si es debido a variación biológica o técnica.

Tabla 7. Características (m/z asociada a un tiempo de retención) detectadas con UPLC-MS con RSD < 20% en cada grupo de las especies de *Drosophila*

Especie	Sexo	HPS	EPS	LPS	Total no redundantes
<i>D. melanogaster</i>	Hembra	16	61	29	224
	Macho	80	49	58	
<i>D. arizonae</i>	Hembra	71	37	20	317
	Macho	100	22	109	
<i>D. mojavensis</i>	Hembra	352	326	NA	729
	Macho	313	151	NA	
Total no redundantes					824
Total de características sin faltantes					784

Al final se obtuvo una sola matriz considerando las 784 características sin faltantes de la Tabla 7 para las 95 muestras de los 16 grupos. Los datos de ésta matriz se transformaron con log2 y después se hicieron los modelos clasificatorios con bosques aleatorios y las comparaciones de cambios.

Características discriminatorias del genotipo y la dieta

Para los modelos de RF globales, la exactitud de clasificación promedio calculada con validación cruzada base 10 fue de 93.3% para especies, 73.3% para sexo y 56.3% para dieta (Anexos Tablas: A2, A3 y A4).

La exactitud de los modelos, indican una estimación optimista de su poder clasificatorio y permiten la comparación entre los modelos selectivos. Para los modelos selectivos la exactitud de clasificación promedio del modelo de RF dirigido a sexo en *D. melanogaster* fue de 83.3% y los correspondientes para ambas especies cactofílicas fueron de 65% (Figura 6; Anexos Tablas: A5, A7 y A9). La exactitud para los modelos dirigidos a dieta en *D. melanogaster* fue de 26.7%, en *D. arizonae* fue de 56.7% y en *D. mojavensis* fue de 95.0% (Figura 7, Anexos Tablas: A6, A8, A10).

Tabla 8. Características informativas para los modelos clasificatorios construidos con árboles aleatorios (RF)

Blanco del modelo de RF	Umbral <i>mean-DecreaseGini</i>	No. de características informativas	% características informativas
Modelos de RF globales			
Especies	0	682	86.98
Sexo	0.1091	59	7.53
Dieta	0.4882	449	57.27
Modelos de RF selectivos			
<i>D. melanogaster</i> sexo	0.0178	270	34.44
<i>D. arizonae</i> sexo	0.0075	453	67.78
<i>D. mojavensis</i> sexo	0.0801	17	2.17
<i>D. melanogaster</i> dieta	0.0057	674	85.97
<i>D. arizonae</i> dieta	0.0438	109	13.90
<i>D. mojavensis</i> dieta	0	342	43.62

Las características con *mean-DecreaseGini* promedio por encima de la variable aleatoria (simulada con valores al azar) se consideraron informativas, en la Tabla 8, se indica el número de características (*m/z* asociada a un tiempo de retención) informativas para cada modelo de RF. Se optó por seleccionar las 20

características con mayor *mean-DecreaseGini* promedio para enfocarse en características relevantes para el metabolismo de las distintas especies, sexos y dietas.

En los análisis de componentes principales (PCA) construidos con las 20 características más discriminatorias del modelo global dirigido a especies, las

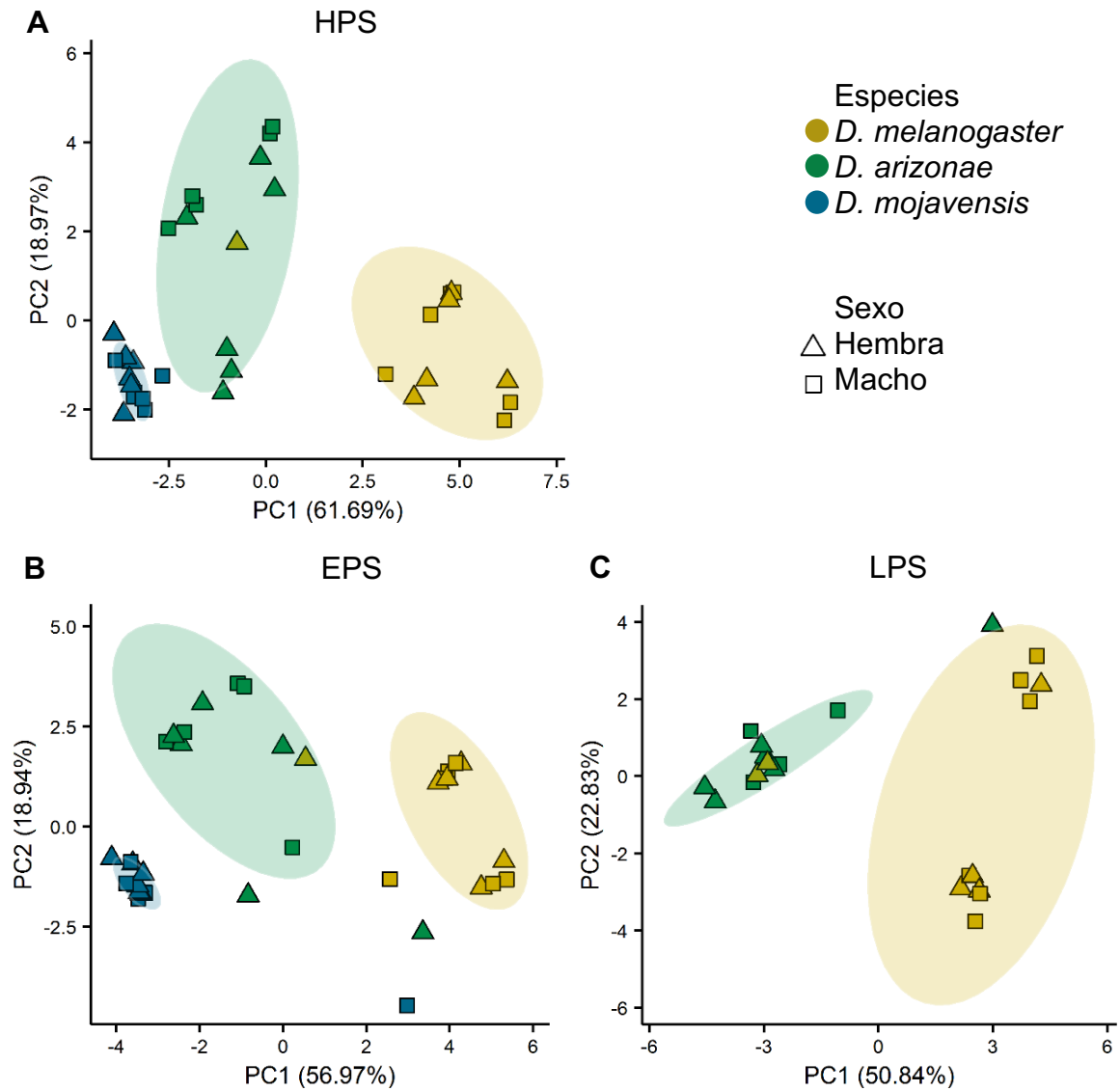


Figura 5. En el metaboloma predomina el genotipo de las especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes. PCA no supervisado por código de color para especies y por código de figura para el sexo elaborados con las 20 características con mayor *mean-DecreaseGini* promedio del modelo global de RF dirigido a especies en HPS (A), EPS (B) y LPS (C). Elipses de densidad del 0.8.

especies se agruparon claramente en cada una de las dietas. Lo que indica al seleccionar características con RF, se rescata la influencia genética en los perfiles metabólicos de las moscas (Figura 5), además en la Figura 5 A y B, las especies más cercanas filogenéticamente, las especies cactofílicas, están más cerca entre ellas y más distantes de *D. melanogaster*.

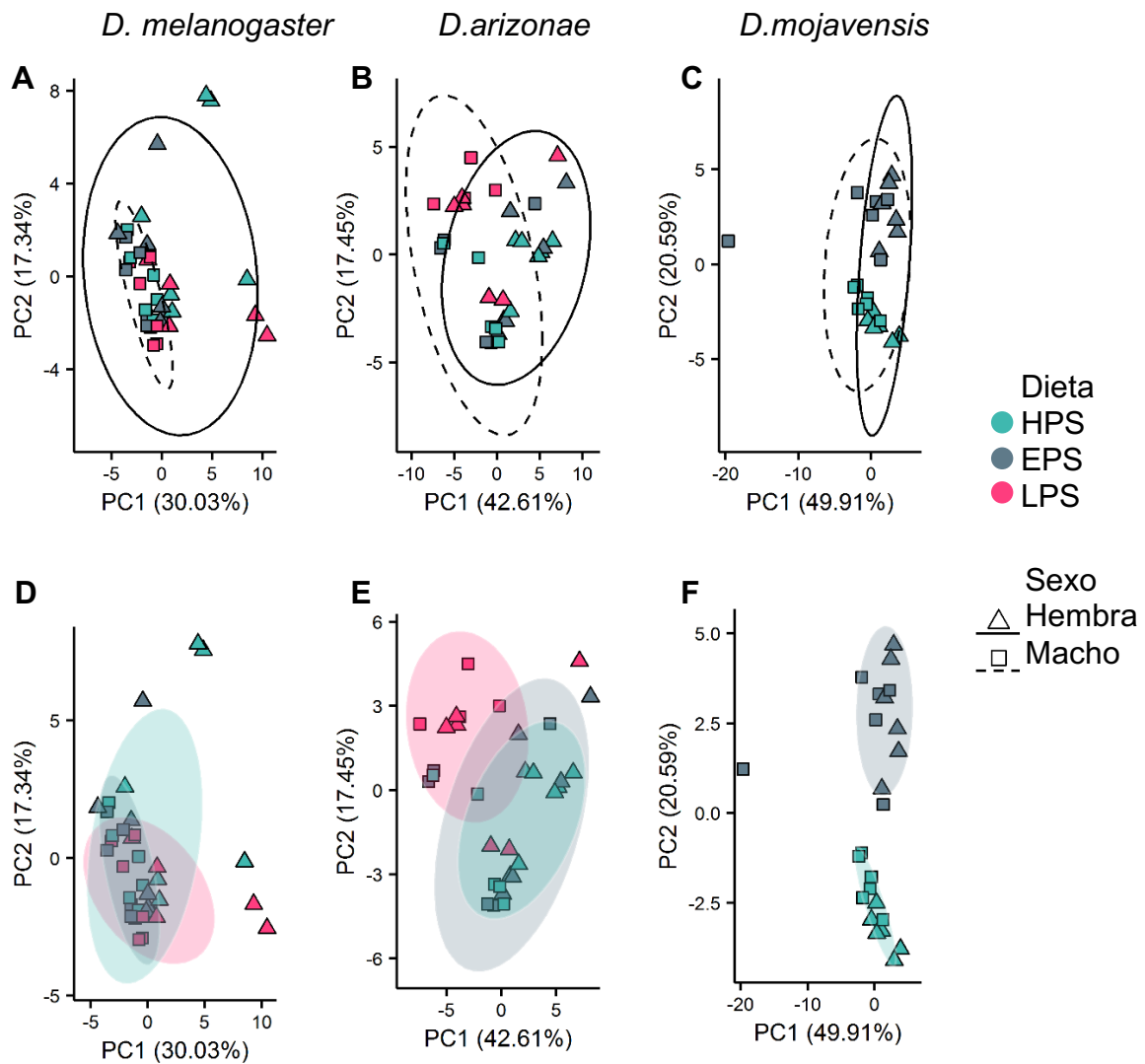


Figura 6. Las dietas afectan a las especies de *Drosophila* según su grado de especialización y la razón proteína:azúcar de la dieta. PCA de las especies por código de color para dieta y por figura para el sexo, elaborados con las 20 características con mayor mean-DecreaseGini promedio de los modelos selectivos de RF para sexo y para dieta de las especies correspondientes. Elipses de densidad del 0.80 para sexo (A, B, C) y para dieta (D, E, F).

Para *D. melanogaster* el grupo de machos formó un agrupamiento muy estrecho (Figura 6 A) aunque sobrelapado con las hembras y no se observó agrupamiento distinguible en las dietas (Figura 6 D). En *D. arizonae* los machos y hembras se sobrelaparon y en la dieta únicamente se distinguió el agrupamiento de LPS (baja proporción proteína azúcar), ya que HPS (alta proporción proteína:azúcar) y EPS (igual proporción proteína:azúcar) estuvieron sobrelapados, lo que indica que mientras mayor sea la diferencia en la proporción de proteína:azúcar de la dieta, mayores serán sus efectos en los perfiles metabólicos.

Por último, en *D. mojavensis* los grupos de sexo también estuvieron sobrelapados pero se distinguieron grupos para las dietas claramente separados (Figura 6 F), lo que sugiere las dietas afectaron a las especies de *Drosophila* según su grado de especialización.

Significancia de las características discriminatorias

Con las 20 características discriminatorias del modelo general dirigido a especies y los resultados de las comparaciones de cambios (Tukey-HSD, $p < 0.05$ y Benjamini-Hochberg, 0.1 FDR), se construyeron mapas de calor (Figura 7 A) para observar la tendencia de los cambios entre las especies en cada una de las dietas, las características están ordenadas en orden descendente del *mean-DecreaseGini* promedio, representado por la barra y los límites el error estándar de los subconjuntos de la validación cruzada base 10 del modelo respectivo (Figura 7 B).

En las comparaciones de *D. melanogaster* con las especies cactofilicas se observaron cambios contrastantes en los mapas de calor y las comparaciones de *D. melanogaster* con *D. arizonae* mostraron en general un mismo patrón para las tres dietas. Por otro lado, en las comparaciones entre *D. arizonae* con *D. mojavensis* se observaron cambios sutiles y en su mayoría no fueron significativos (Figura 7 A, Tukey-HSD, $p < 0.05$).

De los modelos selectivos dirigidos a sexo, el construido con los perfiles metabólicos de *D. melanogaster* tuvo mayor exactitud promedio que el de las especies cactofílicas. Por lo tanto, se observa contraste entre hembras y machos en los mapas de calor de ésta especie y no en las especies cactofílicas (Figura 8).

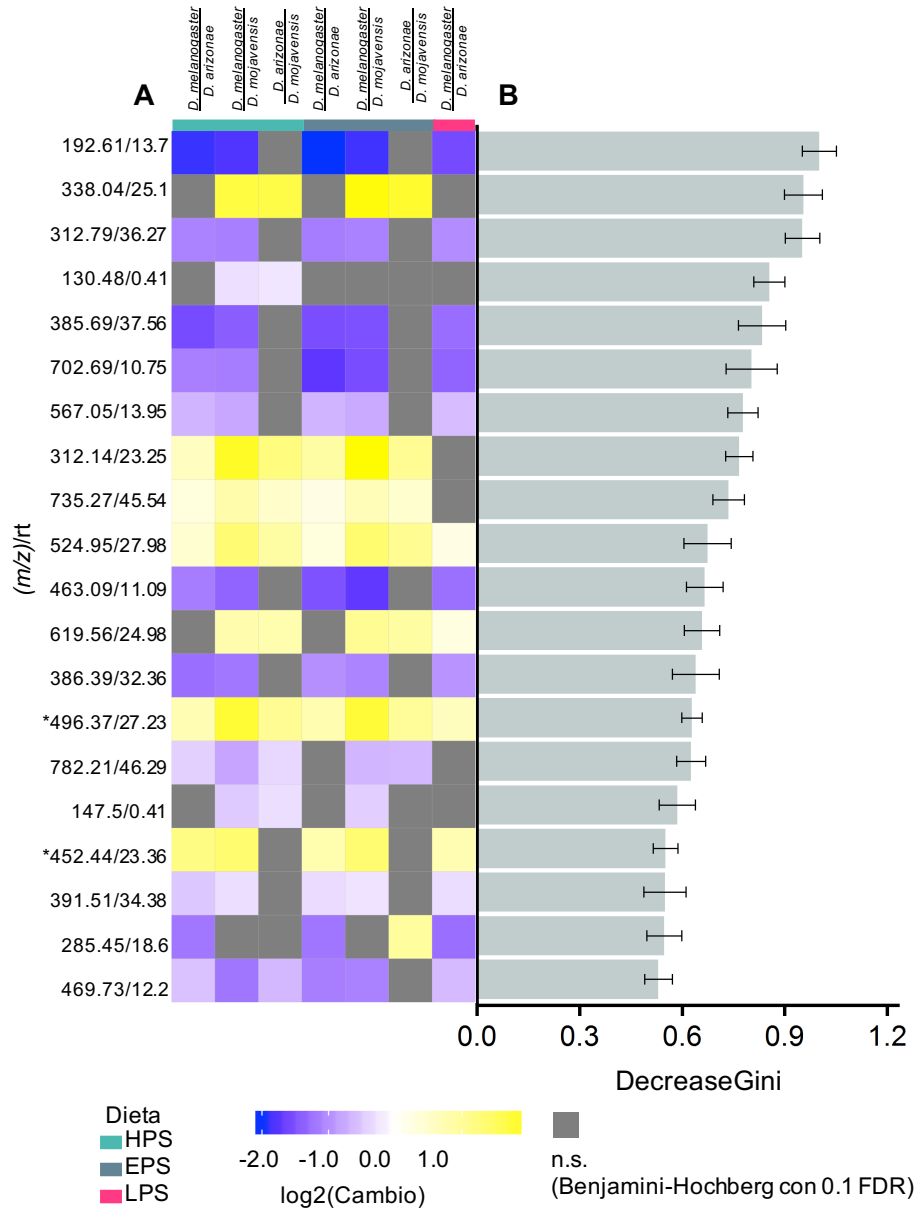


Figura 7. Mayor contraste entre el metaboloma de *D. melanogaster* y las especies cactofílicas. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias del modelo global dirigido a especies (A, Tukey-HSD, $p < 0.05$ y Benjamini-Hochberg, 0.1 FDR), las barras representan el valor promedio del *mean-DecreaseGini* y los límites el error estándar de los modelos generados con los subconjuntos en la validación cruzada-10 (B). Las características con * están putativamente identificadas (ver Tabla 9).

También se observa que las 20 características discriminatorias para los modelos selectivos dirigidos a sexo fueron diferentes para cada especie, excepto la característica con 631.77 *m/z* y 42.65 minutos de tiempo de retención (rt), que fue común en las especies cactofílicas.

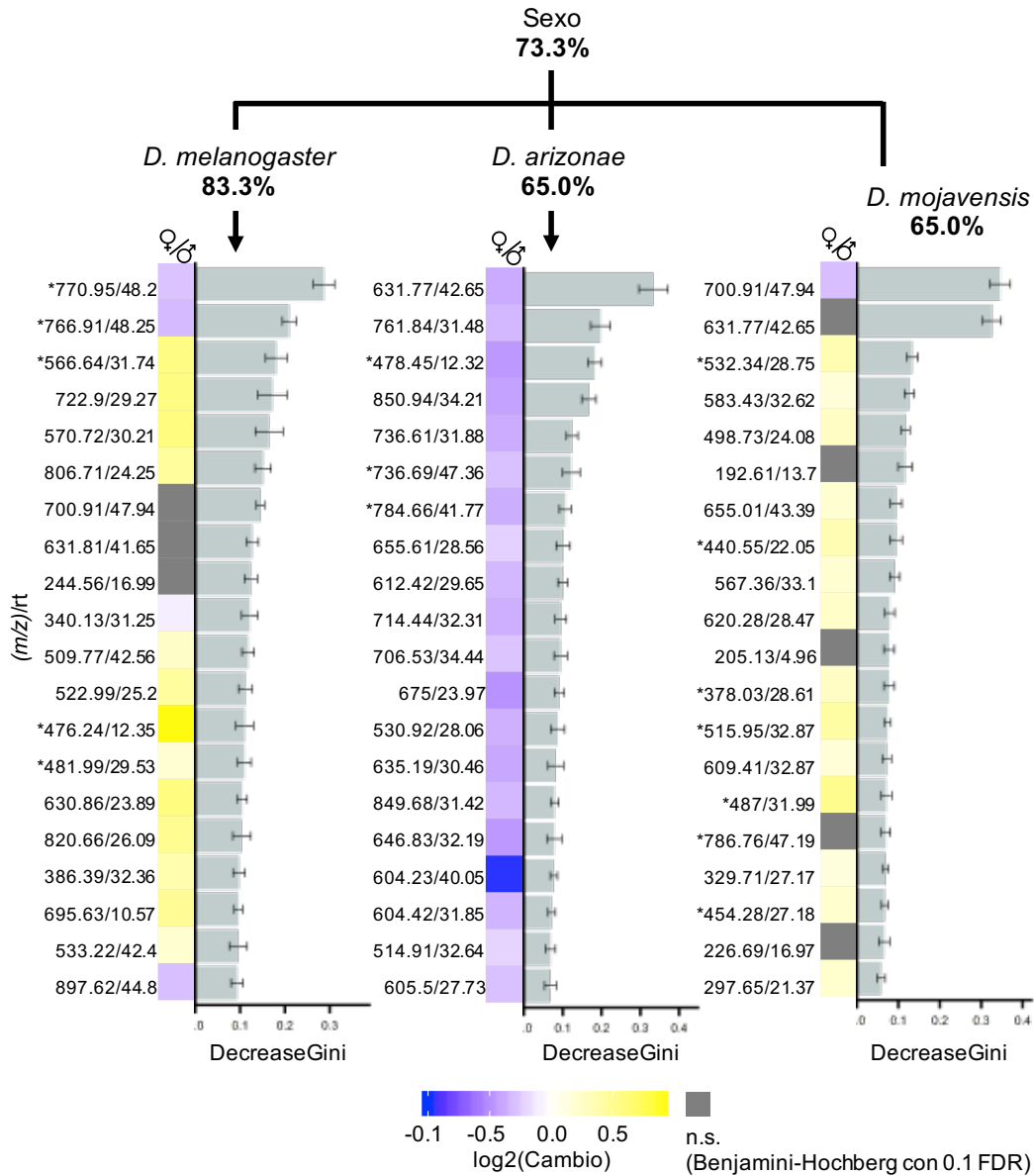


Figura 8. Comparación de las características más discriminatorias para sexo en las especies de *Drosophila*. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias de los modelos selectivos dirigidos a sexo (Tukey-HSD, $p < 0.05$ y Benjamini-Hochberg, 0.1 FDR), las barras representan el valor *mean-DecreasGini* promedio y los límites el error estándar de los modelos generados con los subconjuntos en la validación cruzada-10 para la especie correspondiente, también se indica la exactitud promedio para cada modelo. Las características con * están putativamente identificadas (ver Tabla 9).

En *D. melanogaster* los cambios entre dietas fueron tenues y como se observa en la Figura 9, los cambios no fueron significativos (Tukey-HSD, $p < 0.05$) a pesar de ser las características con mayor *mean-DecreasGini* promedio de su respectivo modelo selectivo dirigido a dieta.

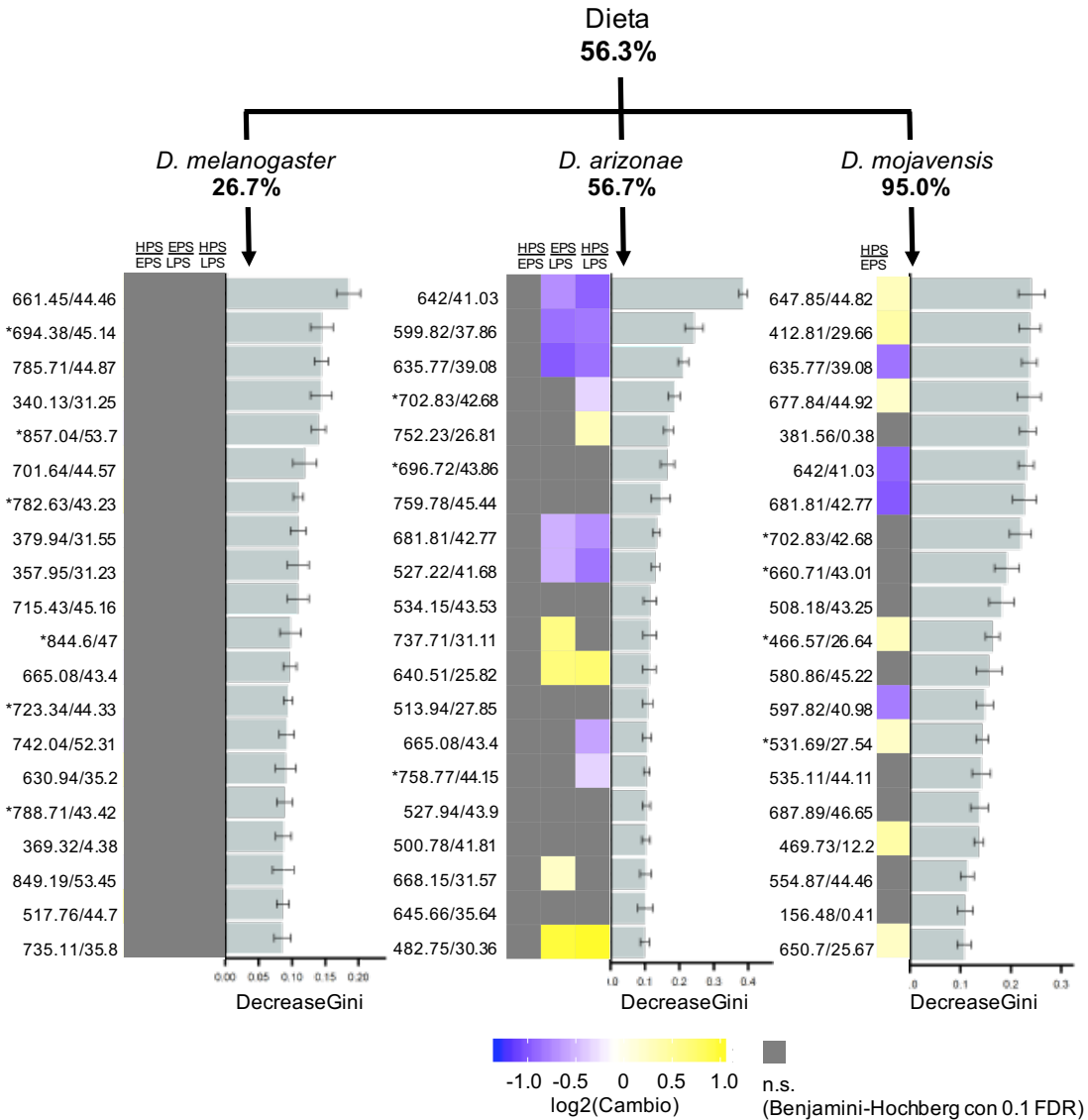


Figura 9. Cambios más contrastantes entre las dietas en las especies cactofílicas. Mapa de calor de las 20 características más discriminatorias de los modelos selectivos dirigidos a dieta, se comparan los cambios de la dieta con mayor proporción proteína:azúcar sobre la de menor proporción proteína azúcar (Tukey-HSD, $p < 0.05$ y Benjamini-Hochberg, 0.1 FDR), las barras representan el *mean-DecreasGini* promedio y los límites el error estándar de los modelos generados con los subconjuntos en la validación cruzada-10 para la especie correspondiente. Se indica la exactitud promedio del modelo global para dieta y de los modelos selectivos de cada especie. Las características con * están putativamente identificadas (ver Tabla 9).

En *D. arizonae* se observaron cambios contrastantes en las comparaciones de las dietas EPS/LPS y HPS/LPS, como se esperaba por el agrupamiento observado en el PCA de la Figura 6 E.

Las características con m/z de 635.77, 642, 681.89 y 702.83 se encontraron entre las 20 características discriminatorias para los modelos selectivos dirigidos a dieta en *D. mojavenis* y *D. arizonae*. En ambas especies, éstas características mostraron una tendencia decreciente en las comparaciones de la dieta con mayor proporción sobre las de menor proporción de proteína:azúcar (Figura 8 en *D.arizonae* y *D. mojavenis*).

Identificación

La asignación putativa de fosfolípidos se basó en datos de fragmentación, tiempo de retención y razón masa:carga de las características, indicando un análisis válido para la identificación de lípidos con MS (Herzog *et al.*, 2013; Kind *et al.*, 2013).

Los datos con espectrometría de masas de alta resolución (Waters ACQUITY UPLC acoplado a un Synapt G1 Q-TOF) indicaron que lípidos polares fueron abundantes en los extractos de moscas, debido a la combinación de la información en tándem de espectrometría de masas de alta resolución con la información bioquímica de la cromatografía líquida de alta resolución.

En las muestras adquiridas con MS2 en la trampa de iones en polaridad positiva y negativa, se identificaron características con fragmentos y pérdidas neutrales característicos de fosfolípidos (Tabla 9), como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS). Con esta información, se determinó el patrón de elución de los fosfolípidos al ordenar las características por el tiempo de retención (rt, Anexo Figura A2 Correlación del tamaño de fosfolípidos con el tiempo de elución).

Las regiones del patrón de elusión de los fosfolípidos determinadas con los datos de la Tabla 9, mostraron relación con el porcentaje del solvente menos polar (metanol; Figura 10 A); a mayor tiempo de elusión fue mayor la *m/z* de los iones identificados como fosfolípidos (Figura 10 B), en congruencia de que los fosfolípidos con ácidos grasos con mayor longitud de cadena se retienen más tiempo en las columnas fase reversa.

Tabla 9. Patrón de fragmentación de iones en el tiempo de elusión de las características discriminatorias de los modelos de bosques aleatorios

rt	m/z	Aducto	Positivo		Negativo				Clase putativa
			Pérdida neutral		PHC	Fragmentos			
			M+H -141	M+H-59		PHC -H ₂ O	GP -H ₂ O-H	PHI	
11.18	340.31	[M+NH ₄] ⁺	*						PE
24.08	491.03	[M+H] ⁺		*					PC
24.31	426.86	[M+H] ⁺	*						PE
24.85	569.67	[M-H] ⁻						*	PI
25.03	468.49	[M+H] ⁺			*				PC
25.36	517.07	[M+H] ⁺		*					PC
25.36	495.22	[M+H] ⁺			*				PC,
25.52	451.6	[M+H] ⁺	*						PE
26.22	452.08	[M+H] ⁺	*						PE
26.3	517.3	[M+H] ⁺		*					PC
26.3	495.4	[M+H] ⁺			*				PC
26.32	453.82	[M+H] ⁺	*						PE
26.33	520.33	[M-H] ⁻					*		PE, PI, PS, PC
26.35	516.93	[M+H] ⁺		*					PC
26.4	494.89	[M+H] ⁺			*				PC
26.67	595.56	[M-H] ⁻						*	PI
27.16	521.11	[M+H] ⁺			*				PC
27.46	543.11	[M+H] ⁺		*					PC
28.12	521.43	[M+H] ⁺			*				PC
28.14	543.4	[M+H] ⁺		*					PC
28.16	571.53	[M-H] ⁻						*	PI
28.53	454.8	[M+H] ⁺	*						PE

28.62	496.66	[M+H] ⁺			*				PC
29.3	497.71	[M+H] ⁺			*				PC
29.4	519.73	[M+H] ⁺		*					PC
29.49	597.73	[M-H] ⁻					*		PI
29.59	519.28	[M+H] ⁺		*					PC
29.86	545.23	[M+H] ⁺		*					PC
29.87	523.11	[M+H] ⁺			*				PC
29.89	524.97	[M+H] ⁺			*				PC
29.9	502.88	[M+H] ⁺	*						PE
29.91	503.12	[M+H] ⁺	*						PE
30.14	522.44	[M-H] ⁻					*		PE, PI, PS, PC
30.23	524.26	[M+H] ⁺			*				PC,
30.28	480.23	[M+H] ⁺	*						PE
30.65	523.5	[M+H] ⁺			*				PC,
30.65	482.11	[M+H] ⁺	*						PE
30.68	525.27	[M+H] ⁺			*				PC
30.83	545.67	[M+H] ⁺		*					PC
35.1	392.55	[M+H] ⁺				*			PC
44.26	655.47	[M+H] ⁺	*						PE
44.63	701.9	[M+H] ⁺		*					PC
44.73	685.46	[M+H] ⁺	*						PE
44.96	685.01	[M+H] ⁺	*						PE
44.99	728.53	[M+H] ⁺		*					PC
45.22	711.1	[M+H] ⁺	*						PE
45.74	737.21	[M+H] ⁺	*						PE
45.99	779.14	[M+H] ⁺		*					PC
46.43	692.14	[M+H] ⁺	*						PE
46.48	713.15	[M+H] ⁺	*						PE
46.77	755.18	[M+H] ⁺		*					PC
46.93	717.68	[M+H] ⁺	*						PE
47.03	716.09	[M+H] ⁺	*						PE
47.22	781.3	[M+H] ⁺		*					PC
47.23	782.68	[M+H] ⁺		*					PC
47.26	742.1	[M+H] ⁺	*						PE
47.43	742.43	[M+H] ⁺	*						PE
47.66	743.67	[M+H] ⁺	*						PE

47.82	689.05	[M+H] ⁺	*							PE
47.93	689.91	[M+H] ⁺	*							PE
47.93	690.54	[M+H] ⁺	*							PE
48.09	741.92	[M+H] ⁺	*							PE
48.1	719.95	[M+H] ⁺	*							PE
48.25	745.84	[M+H] ⁺	*							PE
48.26	745.51	[M+H] ⁺	*							PE
48.34	746.45	[M+H] ⁺	*							PE
48.36	783.17	[M+H] ⁺			*					PC
48.68	809.34	[M+H] ⁺			*					PC

GP glicerolfosfato
 PHC fosfocolina
 PHI fosfoinositol
 PC Fosfatidilcolina

PE Fosfatidiletanolamina
 PI Fosfatidilinositol
 PS Fosfatidilserina

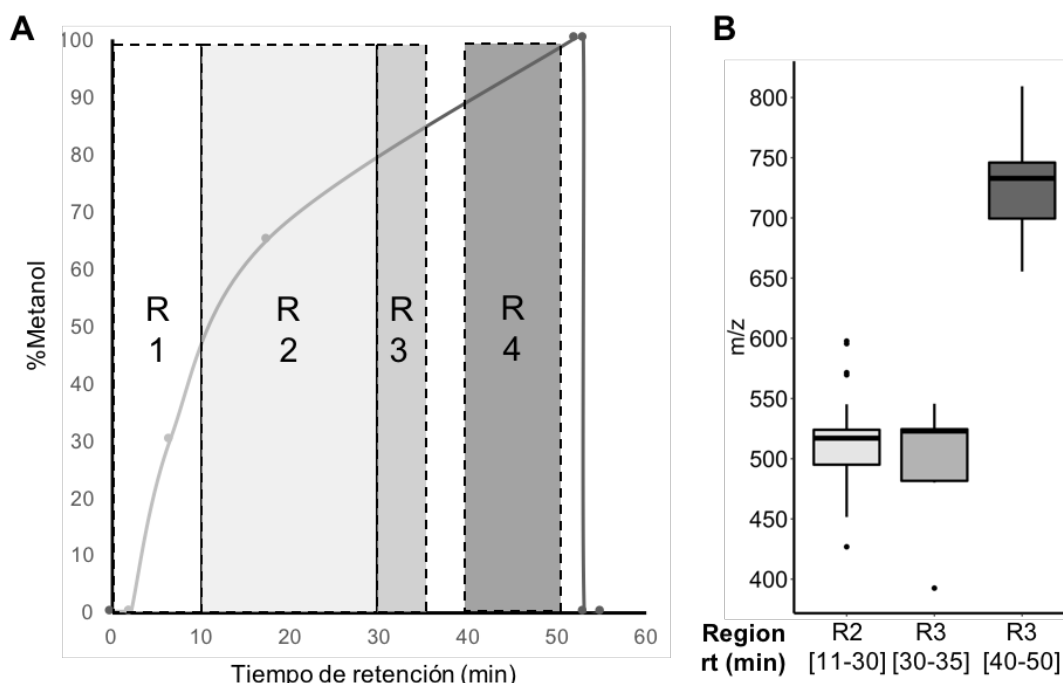


Figura 10. Patrón de elusión de fosfolípidos. Las regiones de los patrones de elusión están relacionadas con la polaridad el solvente (ver Tabla 1). (A) muestra el porcentaje de metanol respecto al tiempo. (B) m/z de iones identificados como fosfolípidos por región.

Después como no se detectaron características discriminatorias con una intensidad relativa suficiente para su fragmentación, se reconstruyó un cromatograma representativo de extractos de moscas de *Drosophila* donde se

muestran las 784 características detectadas y se resaltan las características discriminatorias para los modelos clasificatorios con boques aleatorios (Figura 11 y 12).

En la Figura 11, se observa que solamente un par de características dirigidas a sexo se compartieron en más de una especie y aunque no se indica en la figura el modelo global dirigido a especie tuvo características en común con el modelo selectivos dirigido a sexo de *D. melanogaster*. Además, se observa que solamente cerca de 20 de las características discriminatorias para especies y para sexos de cada especie cumplieron con el patrón de elusión de los fosfolípidos, donde se podrían encontrar ceramidas o hidrocarburos.

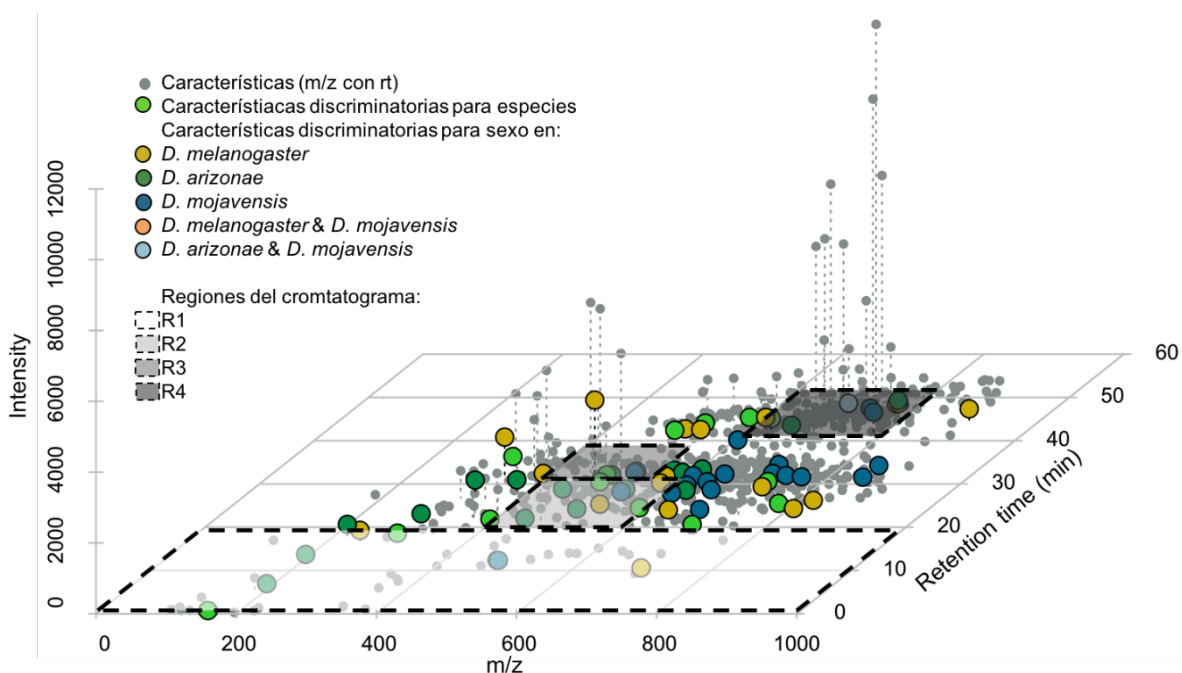


Figura 11. Cromatograma reconstruido con las características detectadas (m/z con tiempo de retención e intensidad relativa) y las características discriminatorias resaltadas en el color correspondiente según el modelo clasificatorio. La mayoría de las características de los modelos relacionados al genotipo se encuentran fuera de la región de los fosfolípidos.

De manera similar, se reconstruyó un cromatograma pero esta vez se resaltaron las características discriminatorias para los modelos selectivos dirigidos

a dieta. Se observaron características que podrían ser fosfolípidos biomarcadores de la dieta al estar conservadas en más de una especie y estar dentro de las regiones del patrón de elusión de los fosfolípidos (Figura 12).

Finalmente, las características discriminatorias que se encontraron dentro del patrón de elusión de los fosfolípidos (m/z y tiempo de retención), se analizaron con "LipidBlast-lookup". Al considerar la información bioquímica de las características con UPLC, se asignó putativamente la identidad de las características discriminatorias.

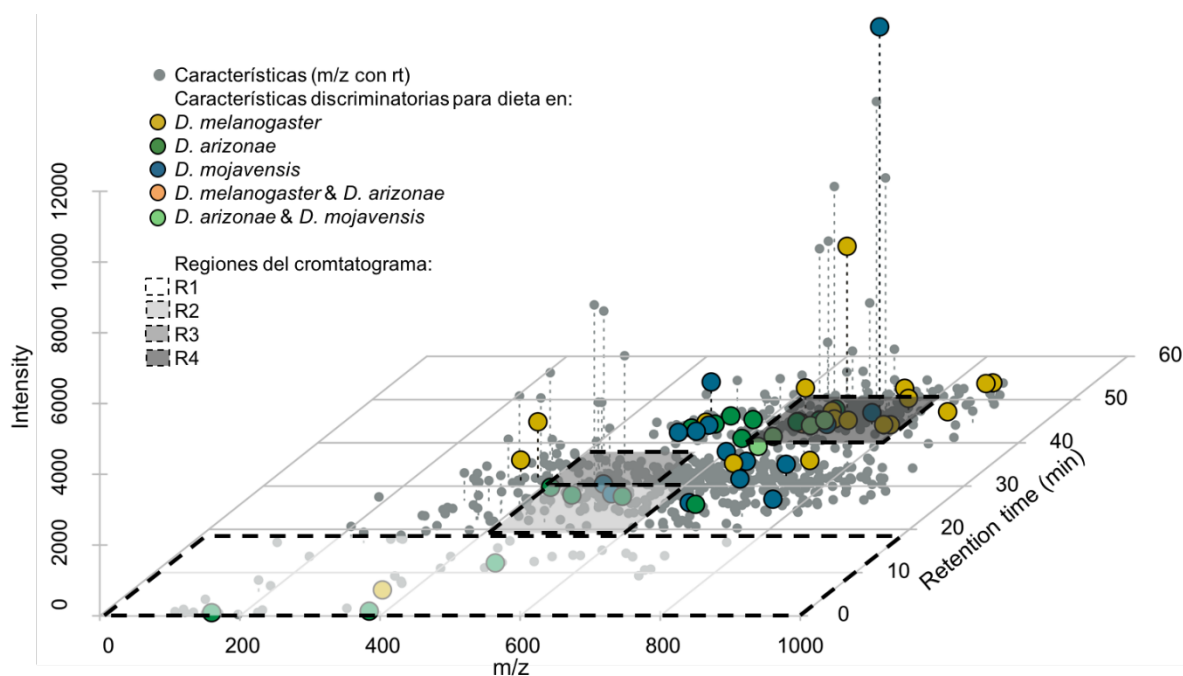


Figura 12. Cromatograma reconstruido con las características detectadas (m/z con rt e intensidad relativa) y las características discriminatorias resaltadas en el color correspondiente según los modelos clasificatorios dirigidos a dieta. Algunas características discriminatorias se comparten en más de una especie.

En la Tabla 10, se muestran las características discriminatorias para el modelo indicado que dieron hit con fosfolípidos, éstas características se identificaron putativamente como fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas.

Por inspección de la Tabla 10, los fosfolípidos identificados que discriminaron entre especies fueron de cadena corta y fueron más abundantes en *D. melanogaster* que en las especies cactofílicas (Figura 7, características con 452.94 y 496.37 *m/z*).

Tabla 10. Características con mayor *mean-DecreaseGini* promedio con hit en LipidBlast-mz-Lookup

rt	<i>m/z</i>	Modelo	PC	PE	pPC	pPE	PS
12.32	478.45	○	(18:2)				
12.35	476.24	□	(13:0)	(16:0), (18:3)			
22.05	440.55	△	(11:0), (12:0)	(14:0), (15:0), (16:0)			
23.36	452.44	*		(16:1)			
26.64	466.57	▲	(14:1)	(16:1), (17:1), (18:0)			
27.18	454.28	△	(12:0), (13:0)	(15:0), (16:0)			
27.23	496.37	*	(15:0), (16:0)	(18:4), (18:0), (19:0), (20:0)			
27.54	531.69	▲					
28.61	378.03	△	(5:0), (6:0)	(8:0), (9:0)			
28.75	532.34	△	(16:0), (17:0), (18:0)	(19:0), (21:3), (20:0)			
29.53	481.99	□	(14:0), (15:0)	(17:0), (18:0)			
31.74	566.64	□	(20:4), (20:0), (21:0)	(23:0), (24:0)			
31.99	487.00	△					
32.87	515.95	△		(18:1), (20:4)			
40.05	604.23	○	(23:2)	(25:6), (26:2), (38:7),			
41.77	784.66	○	(34:0), (36:3)	(40:10), (37:0), (39:3)	(37:2)	(40:2)	
42.68	702.83	●, ▲	(30:2)	(33:2)	(31:1)	(34:1)	
43.01	660.71	▲	(26:6), (27:2)	(29:6), (30:2)		(31:1)	
43.23	782.63	■	(34:1), (36:4)	(38:8), (37:1), (39:4)	(35:0)	(38:0), (40:3)	

43.42	788.71	■	(35:5), (36:1)	(38:5), (40:8), (39:1)	(36:4), (37:0)	(40:0)	
43.86	696.72	●	(28:2), (30:5)	(31:2), (33:5)		(32:1), (34:4)	(28:3), (30:6)
44.15	758.77	●	(33:6), (34:2)	(36:6), (38:9), (37:2)	(35:1)	(38:1)	
44.33	723.34	■					
45.14	694.38	■	(28:3), (30:6)	(31:3), (33:6)			
47.00	844.60	■			(40:4), (41:0)	(44:0)	
47.19	786.76	△	(35:6), (36:2)	(38:6), (40:9), (39:2)	(36:5), (37:1)	(40:1)	(36:5)
47.36	736.69	○		(34:3), (36:6)		(35:2)	
48.20	770.95	□			(36:2)		
48.25	766.91	□				(37:1)	
53.70	857.04	■			(42:1)		

Características discriminatorias dentro de las regiones del patrón de elusión de iones identificados como fosfolípidos.

Modelo global dirigido a:

* Especies

Modelos selectivos dirigidos a sexo:

□ *D. melanogaster*

○ *D. arizonae*

△ *D. mojavensis*

Modelos selectivos dirigidos a dieta:

■ *D. melanogaster*

● *D. arizonae*

▲ *D. mojavensis*

5 DISCUSIÓN

La dieta afecta el tiempo de desarrollo de especies de *Drosophila*

Factores ambientales, como los nutrientes disponibles, alteran el tiempo de desarrollo de *Drosophila*. En el estudio de Matzkin *et al.* (2011) se observaron cambios significativos en el tiempo de desarrollo de *D. melanogaster* solamente en la dieta LPS (baja proporción proteína:azúcar) respecto a HPS (alta proporción proteína:azúcar) y EPS (igual proporción proteína:azúcar), por el contrario, en nuestro estudio no se observó el mismo efecto.

Una diferencia experimental es que se transfirieron larvas de tercer instar temprano a las dietas y no del primer instar, lo que sugiere que los efectos de las dietas son más severos cuando son más jóvenes las larvas de *D. melanogaster*. Como se ha observado en humanos, el ambiente intrauterino de madres con diabetes gestacional, hace más susceptible a la descendencia de desarrollar enfermedades metabólicas y ambientes obesogénicos en etapas infantiles es un factor de riesgo de tener obesidad y diabetes tipo 2 en la adultez (Boney, 2005; Glavas *et al.*, 2010).

Por otro lado, en congruencia con Matzkin *et al.* (2011) en *D. mojavensis* se observó un retraso en el tiempo de desarrollo en EPS (igual proporción proteína:azúcar) respecto a HPS (alta proporción proteína:azúcar) y la viabilidad fue nula en LPS (baja proporción proteína:azúcar). *D. arizonae* por su parte, tuvo viabilidad en las tres dietas, lo que indica que es más flexible a los cambios nutricionales que su relativo *D. mojavensis*, sin embargo, su tiempo de desarrollo también se retrasó al aumentar el contenido de azúcar de la dieta, lo que sugiere que debe existir una concentración óptima de cada macronutriente para su desarrollo.

Como se observó en los resultados cambios en los fosfolípidos entre las especies cactofílicas respecto a *D. melanogaster*, y a que la ruta de señalización de la insulina está involucrada en el desarrollo de larvas de *Drosophila* (Edgar, 2006), se especula que las diferencias en la longitud y saturación de las fosfolípidos de las membranas celulares las especies cactofílicas respecto a *D. melanogaster*, afectan ésta ruta de señalización, especialmente en las dietas con menor proporción de proteína:azúcar (EPS y LPS).

Características discriminatorias con bosques aleatorios

Este es el primer análisis de perfiles metabólicos que reflejaron la interacción del genotipo de tres especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes con dietas isocalóricas con distinta proporción de proteína:azúcar.

El algoritmo de bosques aleatorios (RF) ha emergido como un método eficiente para la detección de características importantes en distintas áreas de la ciencia (Chen *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014; Sotelo-Silveira *et al.*, 2015). En nuestro análisis, los modelos con RF detectaron de manera robusta características discriminatorias (características con mayor valor de *mean-DecreaseGini* promedio) para distintos blancos. Además, el método de utilizar una variable simulada para la selección de variables informativas, puede ser optimizado y tiene potencial para generar modelos clasificatorios con RF basados en datos.

A pesar de que no podemos distinguir entre la variación técnica (por los efectos de bloque en espectrometría de masas) de las diferencias en el metabolismo entre las especies estudiadas, los modelos de RF son bastante robustos y tolerantes al ruido y han permitido identificar variables discriminatorias según el antecedente genético (Touw *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014).

En los modelos globales, el componente genético del fenotipo metabólico fue fácilmente detectado por el modelo global de RF para especies (Figura 11, Tabla

8), donde el 86.98% de las características son informativas. Por el contrario, la exactitud de los modelos globales fue baja para sexo, con solo el 73.3% y más baja para dieta, con el 56.3%, quizás influenciado por la respuesta particular de cada especie a las distintas intervenciones dietarias, lo que se confirmó por la exactitud diferencial de los modelos selectivos dirigidos al sexo y a la dieta de cada especie.

Como *D. arizonae* y *D. mojavensis* están adaptadas a sus respectivos ambientes químicos, nutricionales y climáticos, su ecología contrasta más con *D. melanogaster* que entre ellas (Stratman y Markow., 1998) y debido a que distintas clases de lípidos son altamente heredables (Scheitz *et al.*, 2013), se propone que los fosfolípidos entre especies con ecologías similares deben ser más parecidos que entre las especies con ecologías contrastantes. En congruencia a esta observación, se encontraron más características discriminatorias compartidas para dieta y sexo entre las especies más cercanas filogenéticamente que entre las más distantes (ver Figura 12). Además, sugiere un mecanismo bioquímico por el cual las especies cactofílicas son más susceptibles al azúcar es debido a las características bioquímicas de sus membranas celulares o a los mecanismos de señalización y regulación de los fosfolípidos como se mencionó con anterioridad.

En *D. melanogaster* no se detectaron características con poder discriminatorio para la dieta (Figura 6 D), pero sí se encontraron las correspondientes para distinguir entre el sexo. Por el contrario, en *D. arizonae* y *D. mojavensis* se encontraron características discriminatorias para la dieta y no para el sexo. Puesto que en el metabolismo se conecta el antecedente genético, ecológico y reproductivo con el ambiente (dieta), a continuación, se describen los antecedentes de cada especie.

Fosfolípidos y ecología de las especies de *Drosophila*

Los insectos poseen diversas estrategias para resistir condiciones ambientales adversas, como cambios en los fosfolípidos de las membranas

celulares para resistir estrés por calor (Hazel, 1995; Scheitz et al., 2013). *D. mojavensis* tiene mayor tolerancia a la desecación que *D. melanogaster* (Matzkin y Markow, 2009) debido a la regulación de varios grupos de genes en los que se incluyen los relacionados al metabolismo de lípidos y ácidos grasos. En el presente estudio, los fosfolípidos fueron abundantes en los perfiles metabólicos, donde hasta el 86.98% de las características fueron informativas para el modelo de RF dirigido a especies y se encontraron diferencias significativas entre las especies cactofílicas y *D. melanogaster*. Las diferencias en los perfiles metabólicos sugieren un posible mecanismo bioquímico para la tolerancia al estrés térmico en los desiertos de Norteamérica.

En el aspecto reproductivo, el tiempo de maduración sexual es rápido en *D. melanogaster*, las hembras alcanzan la madurez sexual en 4 días y los machos en dos días y nacen con espermatozoides maduros (Markow, 1996). También es conocido que el perfil de ceramidas es diferencial entre machos y hembras de *D. melanogaster* (Carvalho et al., 2012) e incluso se han descrito diferencias en el perfil de lípidos en hembras y machos sin línea germinal (Parisi et al., 2011). En contraste, en las especies cactofílicas los machos pueden tardar hasta una semana y las hembras hasta 3 días en alcanzar la madurez sexual (Markow y O'Grady, 2005), lo que explica la baja exactitud para clasificar entre machos y hembras en *D. arizonae* y *D. mojavensis* a los 0 días de eclosión (Figura 8).

Además, la mayoría de las características discriminatorias para los modelos selectivos dirigidos a sexo están fuera del patrón de elusión de los fosfolípidos (Figura 11), en las que podríamos encontrar hidrocarburos y ceramidas, que aunque no fueron caracterizados, podrían estar presentes en los perfiles metabólicos por sus características bioquímicas (Lee et al., 2003).

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la intensidad relativa de las características con mayor *mean-DecreaseGini* promedio de *D. melanogaster* debido a la dieta, consistente en que es una especie generalista. Sin embargo, en

Orešič *et al.* (2008), sugieren que incluso cambios del $\pm 10\%$ en la concentración de lípidos afectan la fisiología de un organismo. Alternativamente, los órganos y tejidos de las moscas podrían verse afectados diferencialmente por las distintas dietas (Carvalho *et al.*, 2012) y como las extracciones fueron de cuerpo completo, no se pueden descartar éstos efectos.

En las especies cactofílicas los efectos de la dieta en el perfil de lípidos es mayor cuando mayor es su grado de especialización, por ejemplo, *D. arizonae* (Figura 6. E) la dieta con efectos diferenciales en los perfiles metabólicos fue la de mayor contenido de azúcar (LPS). En *D. mojavensis* los grupos de dieta están claramente separados (Figura 6 F).

Drosophila arizonae por su parte, es una especie oportunista. Además de cactus, se alimenta de frutas, por lo que en su historia ecológica se encuentran los azúcares simples (Reed *et al.*, 2006). Finalmente, *D. mojavensis*, la más susceptible a las dietas con distinta proporción de proteína:azúcar, es la más especializada de las tres, teniendo cactus específicos según la población geográfica y por tanto, es inverosímil que se encuentre con carbohidratos simples en su dieta nativa (Ruiz y Heed, 1988).

Aunque se infiere la relación de los resultados obtenidos con los estudios ecológicos y evolutivos de las especies de *Drosophila* utilizadas, los datos de los perfiles metabólicos concuerdan con las descripciones ecológicas y reproductivas de éstas especies, e indican que las distintas dietas produjeron cambios significativos en los perfiles metabólicos según el grado de especialización de las especies.

Especies cactofílicas como modelos de estudio

La utilidad de *D. melanogaster* en la investigación de enfermedades metabólicas (Baker y Thummel, 2007; Bharucha, 2009; Reed *et al.*, 2010, 2014;

Smith *et al.*, 2014) puede fortalecerse cuando se acompaña de ecología comparativa para descubrir rutas metabólicas novedosas que permiten que una especie sea más tolerante que otra a distintas dietas.

Las especies cactofílicas están adaptadas a ambientes desérticos (Matzkin y Markow, 2009). Entre los mecanismos para resistir la desecación y estrés térmico, se encuentran las membranas celulares con fosfolípidos con cadenas alquílicas largas y/o saturadas (Hazel, 1995). Además, la composición de lípidos es una característica altamente heredable en *D. melanogaster* (Scheitz *et al.* 2013).

Nuestro análisis indica que la composición de fosfolípidos es diferente en las especies de *Drosophila* estudiadas y que las dietas isocalóricas afectaron la composición de fosfolípidos, con cambios significativos en *D. arizonae* y *D. mojavensis*. Además, Drohan y col. en el 2015 sugirieron que los fosfolípidos podrían servir como biomarcadores tempranos de salud en humanos.

En las características discriminatorias para el modelo dirigido a especies, *D. melanogaster* tuvo mayor abundancia relativa de fosfolípidos de cadena corta. Por otro lado, los fosfolípidos anotados que discriminan entre las dietas son de cadenas largas para las especies cactofílicas y tienden a disminuir al aumentar el contenido de azúcar de la dieta (Figura 9), lo que sugiere un posible mecanismo de regulación del metabolismo a nivel de fosfolípidos.

Se conoce que el ambiente nutricional, especialmente la concentración de glucosa, estimula la producción de péptidos similares a la insulina (IIs), que al llegar al receptor de insulina (InR) estimulan la translocación del transportador de glucosa (GLUT). Se sugiere que las especies cactofílicas poseen membranas celulares rígidas que dificultan el ensamblaje de los GLUTs, en congruencia con el modelo propuesto por NM Weijers en el 2012 para la resistencia a la insulina en humanos. En continuación, los niveles de glucosa extracelular se mantienen elevados y estimulan mayor producción de IIs. La ruta de señalización de la insulina

desencadena la acumulación de triglicéridos, glucógeno y trehalosa (Reyes-DelaTorre *et al.*, 2012; Alfa y Kim, 2016). Al respecto, Matzkin y col. en el 2011 observaron niveles elevados de triglicéridos y glucógeno en *D. mojavensis* por efectos de la dieta.

En la Figura 13 se muestra un modelo que integra la información ecológica, bioquímica y de señalización de la insulina para explicar la susceptibilidad de las especies cactofílicas al azúcar. Se sugiere realizar estudios adicionales para caracterizar los fosfolípidos de las especies estudiadas, así como determinar los niveles de insulina y trehalosa de las moscas cactofílicas en las distintas dietas para comprender los mecanismos involucrados.

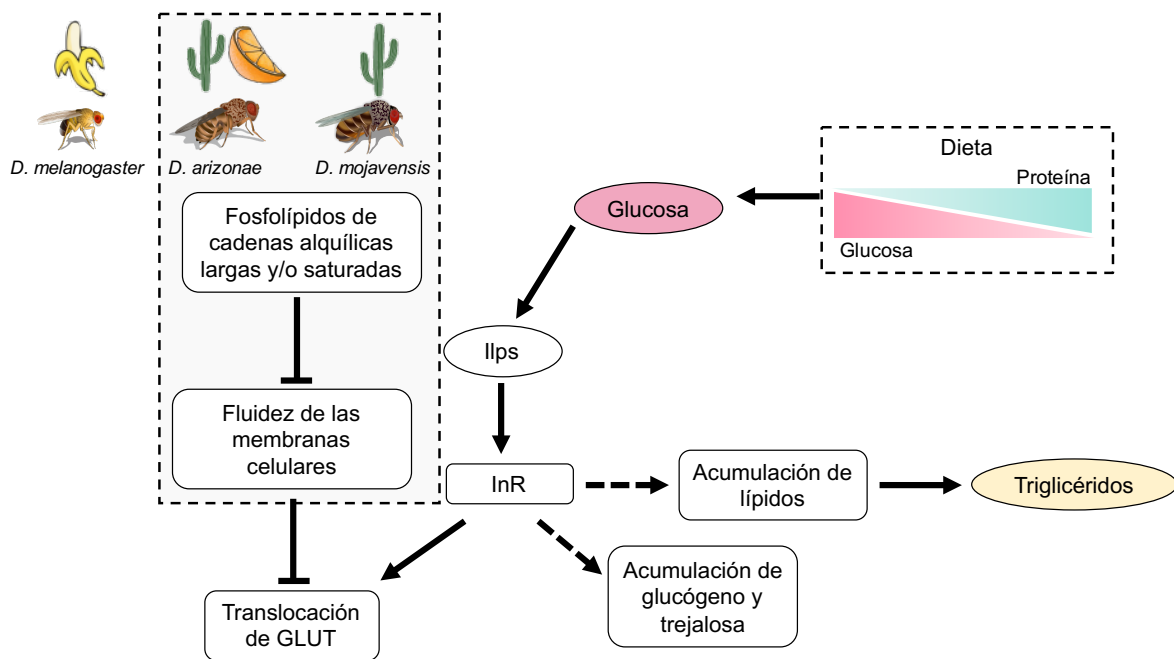


Figura 13 Modelo simplificado que integra la ecología y la ruta de señalización de la insulina para explicar la susceptibilidad de las especies cactofílicas al azúcar.

6 CONCLUSIÓN

Éste estudio representa una investigación integrativa de la interacción del genotipo con la dieta con moscas del género *Drosophila*, perfiles metabólicos no dirigidos con espectrometría de masas (MS) y modelos clasificatorios con bosques aleatorios (RF), mostrando un procesamiento innovador de datos de altas dimensiones.

En el presente estudio se compararon tres especies de *Drosophila* con ecologías contrastantes alimentadas en tres dietas con distinta proporción de proteína:azúcar. Se analizaron los perfiles metabólicos de la especie cosmopolita, *D. melanogaster*, y dos especies cactofílicas con distinto grado de especialización, la oportunista *D. arizonae* y la especialista *D. mojavensis*.

El desarrollo y la aptitud fue afectado únicamente en las especies cactofílicas. Al disminuir la proporción de proteína:azúcar de la dieta, *D. arizonae* y *D. mojavensis* retrasaron su tiempo de desarrollo. Además, *D. mojavensis* no fue viable en la dieta con mayor contenido de azúcar.

Los modelos clasificatorios permitieron comparar el efecto de la dieta y el sexo en los perfiles metabólicos de las especies estudiadas. Se analizó la composición de los extractos con datos de fragmentación, tiempo de retención y razón masa:carga de las características y se reveló que los fosfolípidos fueron abundantes en los extractos.

Drosophila melanogaster fue la única especie donde se observó un efecto en los perfiles metabólicos debido al sexo, posiblemente por el tiempo de maduración sexual requerido por cada especie.

Las especies respondieron de manera diferente a las dietas. Se presentaron diferencias en los fosfolípidos, entre las especies y entre las dietas únicamente

en las especies cactofílicas.

Los perfiles metabólicos de *D. melanogaster* fueron indistinguibles por efectos de la dieta, un resultado esperado debido a la historia adaptativa de la especie generalista. En los perfiles metabólicos de *D. arizonae* la dieta con mayor contenido de azúcar mostró un efecto contrastante con las demás dietas, y en *D. mojavensis* las dietas mostraron diferencias claramente evidentes. Por lo tanto, las especies con mayor grado de especialización son más susceptibles a los cambios nutricionales. Sin embargo, se sugiere estudiar cuantitativamente los fosfolípidos como biomarcadores del status fisiológico de las especies.

En el proceso patológico de la dislipidemia convergen mecanismos de señalización y regulación y mecanismos bioquímicos que alteran las propiedades físicas de las membranas celulares.

Estudios metabolómicos adicionales podrían revelar si existen diferencias en el índice de saturación y longitud de cadena los fosfolípidos entre la especie generalista y las especies cactofílicas. Esto podría ayudar a entender la dislipidemia, la cual está estrechamente relacionada con enfermedades metabólicas, como síndrome metabólico y diabetes tipo 2 en humanos. A su vez, estudios en las especies cactofílicas podrían contribuir en el entendimiento las enfermedades metabólicas mencionadas ya que permiten integrar mecanismos genéticos y bioquímicos interactuando con el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Anzi, B., y Zinn, K. (2010). Colorimetric Measurement of Triglycerides Cannot Provide an Accurate Measure of Stored Fat Content in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5, e12353.

Alfa, R.W., y Kim, S.K. (2016). Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. *Dis. Model. Mech.* 9, 365–376.

Baker, K.D., y Thummel, C.S. (2007). Diabetic Larvae and Obese Flies—Emerging Studies of Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab.* 6, 257–266.

Barroso, I. (2005). Genetics of type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 22, 517–535.

Bharucha, K.N. (2009). The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism. *Pediatr. Res.* 65, 132–137.

Bilgin, M., Born, P., Fezza, F., Heimes, M., Mastrangelo, N., Wagner, N., Schultz, C., Maccarrone, M., Eaton, S., Nadler, A., *et al.* (2016). Lipid Discovery by Combinatorial Screening and Untargeted LC-MS/MS. *Sci. Rep.* 6, 27920.

Boney, C.M. (2005). Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *PEDIATRICS* 115, e290–e296.

Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., y Lehmann, W.D. (1997). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2339–2344.

Cano, A., y Alonso, C. (2014). Deciphering non-alcoholic fatty liver disease through metabolomics. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1447–1452.

Carrasco, S., y Mérida, I. (2007). Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* 32, 27–36.

Carvalho, M., Sampaio, J.L., Palm, W., Brankatschk, M., Eaton, S., y Shevchenko, A. (2012). Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. *Mol. Syst. Biol.* 8.

Checa, A., Bedia, C., y Jaumot, J. (2015). Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Anal. Chim. Acta* 885, 1–16.

Chen, T., Cao, Y., Zhang, Y., Liu, J., Bao, Y., Wang, C., Jia, W., y Zhao, A. (2013). Random Forest in Clinical Metabolomics for Phenotypic Discrimination and Biomarker Selection. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1–11.

Cheneke, W., Abda, E., Hamza, L., y Tesema, F. (2016). Metabolic syndrome and associated factors among outpatients of Jimma University Teaching Hospital. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 47.

Colinet, H., y Renault, D. (2012). Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila*

melanogaster. *Biol. Lett.* 8, 1050–1054.

Despres, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodes-Cabau, J., Bertrand, O.F., y Poirier, P. (2008). Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1039–1049.

Drogan, D., Dunn, W.B., Lin, W., Buijsse, B., Schulze, M.B., Langenberg, C., Brown, M., Floegel, A., Dietrich, S., Rolandsson, O., *et al.* (2015). Untargeted Metabolic Profiling Identifies Altered Serum Metabolites of Type 2 Diabetes Mellitus in a Prospective, Nested Case Control Study. *Clin. Chem.* 61, 487–497.

Dunn, W.B., Erban, A., Weber, R.J.M., Creek, D.J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J., *et al.* (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* 9, 44–66.

Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7, 907–916.

Ernest, B., Gooding, J.R., Campagna, S.R., Saxton, A.M., y Voy, B.H. (2012). MetabR: an R script for linear model analysis of quantitative metabolomic data. *BMC Res. Notes* 5, 1.

Glavas, M.M., Kirigiti, M.A., Xiao, X.Q., Enriori, P.J., Fisher, S.K., Evans, A.E., Grayson, B.E., Cowley, M.A., Smith, M.S., y Grove, K.L. (2010). Early Overnutrition Results in Early-Onset Arcuate Leptin Resistance and Increased Sensitivity to High-Fat Diet. *Endocrinology* 151, 1598–1610.

Guan, X.L., Cestra, G., Shui, G., Kuhrs, A., Schittenhelm, R.B., Hafen, E., van der Goot, F.G., Robinett, C.C., Gatti, M., Gonzalez-Gaitan, M., *et al.* (2013). Biochemical Membrane Lipidomics during *Drosophila* Development. *Dev. Cell* 24, 98–111.

Han, X. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J. Lipid Res.* 44, 1071–1079.

Hartler, J. (2015). MassBank. In *Encyclopedia of Lipidomics*, M.R. Wenk, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 1–3.

Hazel, J.R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19–42.

Herzog, R., Schwudke, D., y Shevchenko, A. (2013). LipidXplorer: Software for Quantitative Shotgun Lipidomics Compatible with Multiple Mass Spectrometry Platforms: LipidXplorer: Software for Quantitative Shotgun Lipidomics. In *Current Protocols in Bioinformatics*, A. Bateman, W.R. Pearson, L.D. Stein, G.D. Stormo, and J.R. Yates, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 14.12.1–14.12.30.

Hu, C., Shi, J., Quan, S., Cui, B., Kleessen, S., Nikoloski, Z., Tohge, T., Alexander, D., Guo, L., Lin, H., *et al.* (2014). Metabolic variation between japonica and indica rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics. *Sci. Rep.* 4.

Ivanova, P.T., Milne, S.B., Myers, D.S., y Brown, H.A. (2009). Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *13*, 526–531.

Kind, T., Liu, K.-H., Lee, D.Y., DeFelice, B., Meissen, J.K., y Fiehn, O. (2013). LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat. Methods* *10*, 755–758.

Kulick, E.R., Moon, Y.P., Cheung, K., Willey, J.Z., Sacco, R.L., y Elkind, M.S.V. (2016). Racial–ethnic disparities in the association between risk factors and diabetes: The Northern Manhattan Study. *Prev. Med.* *83*, 31–36.

Lee, M.H., Lee, G.H., y Yoo, J.S. (2003). Analysis of ceramides in cosmetics by reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *17*, 64–75.

Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., y Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* *50*, 1844–1850.

Markow, T.A., y O’Grady, P. (2005). *Drosophila: a guide to species identification and use* (Academic Press).

Massbank (s.f.). Massbank Database. Consultado agosto 1, 2016 en: <http://www.massbank.jp/index.html?lang=en>

Matzkin, L.M., y Markow, T.A. (2009). Transcriptional Regulation of Metabolism Associated With the Increased Desiccation Resistance of the Cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Genetics* *182*, 1279–1288.

Matzkin, L.M., Mutsaka, K., Johnson, S., y Markow, T.A. (2009). Metabolic pools differ among ecologically diverse *Drosophila* species. *J. Insect Physiol.* *55*, 1145–1150.

Matzkin, L.M., Johnson, S., Paight, C., Bozinovic, G., y Markow, T.A. (2011). Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. *J. Nutr.* *141*, 1127–1133.

Milne, S., Ivanova, P., Forrester, J., y Alex Brown, H. (2006). Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods* *39*, 92–103.

NM Weijers, R. (2012). Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* *8*, 390–400.

Orešič, M., Hänninen, V.A., y Vidal-Puig, A. (2008). Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol.* *26*, 647–652.

Palanker Musselman, L., Fink, J.L., Narzinski, K., Ramachandran, P.V., Sukumar Hathiramani, S., Cagan, R.L., y Baranski, T.J. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* *4*, 842–849.

Parisi, M., Li, R., y Oliver, B. (2011). Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Res. Notes* 4, 198.

Patti, G.J., Yanes, O., y Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 263–269.

Pradhan, A. (2007). Obesity, Metabolic Syndrome, y Type 2 Diabetes: Inflammatory Basis of Glucose Metabolic Disorders. *Nutr. Rev.* 65, 152–156.

Reed, L.K., Nyboer, M., y Markow, T.A. (2006). Evolutionary relationships of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*: DROSOPHILA MOJAVENSIS SPECIES RELATIONSHIPS. *Mol. Ecol.* 16, 1007–1022.

Reed, L.K., Williams, S., Springston, M., Brown, J., Freeman, K., DesRoches, C.E., Sokolowski, M.B., y Gibson, G. (2010). Genotype-by-Diet Interactions Drive Metabolic Phenotype Variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 185, 1009–1019.

Reed, L.K., Lee, K., Zhang, Z., Rashid, L., Poe, A., Hsieh, B., Deighton, N., Glassbrook, N., Bodmer, R., y Gibson, G. (2014). Systems Genomics of Metabolic Phenotypes in Wild-Type *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 197, 781–793.

Reyes-DelaTorre, A., Teresa, M., y Rafael, J. (2012). Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose. In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, C.-F. Chang, ed. (InTech).

Ruiz, A., y Heed, W.B. (1988). Host-Plant Specificity in the Cactophilic *Drosophila mulleri* Species Complex. *J. Anim. Ecol.* 57, 237.

Sanchez-Flores, A., Penazola, F., Carpinteyro-Ponce, J., Nazario-Yepiz, N., Abreu-Goodger, C., Machado, C.A., y Markow, T.A. (2016). Genome Evolution in Three Species of Cactophilic *Drosophila*. *G3* 58 GenesGenomesGenetics.

Siuzdak (2003). *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*. MCC Press.

Scheitz, C.J.F., Guo, Y., Early, A.M., Harshman, L.G., y Clark, A.G. (2013). Heritability and Inter-Population Differences in Lipid Profiles of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 8, e72726.

Smith, W.W., Thomas, J., Liu, J., Li, T., y Moran, T.H. (2014). From fat fruit fly to human obesity. *Physiol. Behav.* 136, 15–21.

Song, X., Goicoechea, J.L., Ammiraju, J.S.S., Luo, M., He, R., Lin, J., Lee, S.-J., Sisneros, N., Watts, T., Kudrna, D.A., *et al.* (2011). The 19 Genomes of *Drosophila*: A BAC Library Resource for Genus-Wide and Genome-Scale Comparative Evolutionary Research. *Genetics* 187, 1023–1030.

Sotelo-Silveira, M., Chauvin, A.-L., Marsch-Martínez, N., Winkler, R., y de Folter, S. (2015). Metabolic fingerprinting of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Front. Plant Sci.* 6.

Stark, A., Lin, M.F., Kheradpour, P., Pedersen, J.S., Parts, L., Carlson, J.W., Crosby, M.A., Rasmussen, M.D., Roy, S., Deoras, A.N., *et al.* (2007). Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature* 450, 219–232.

Stockcenter.ucsd.edu. (s.f.). Genome Stock Sets - *Drosophila* Species Stock Center. Consultado diciembre 2, 2016 en: <https://stockcenter.ucsd.edu/info/genomesets>.

Stratman y Markow (1998). Resistance to thermal stress in desert *Drosophila*. *British ecological society*.

Teo, C.C., Chong, W.P.K., Tan, E., Basri, N.B., Low, Z.J., y Ho, Y.S. (2015). Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 66, 1–18.

Touw, W.G., Bayjanov, J.R., Overmars, L., Backus, L., Boekhorst, J., Wels, M., y van Hijum, S.A.F.T. (2013). Data mining in the Life Sciences with Random Forest: a walk in the park or lost in the jungle? *Brief. Bioinform.* 14, 315–326.

Treviño, V., Yañez-Garza, I.-L., Rodríguez-López, C.E., Urrea-López, R., Garza-Rodríguez, M.-L., Barrera-Saldaña, H.-A., Tamez-Peña, J.G., Winkler, R., y Díaz de-la-Garza, R.-I. (2015). GridMass: a fast two-dimensional feature detection method for LC/MS: GridMass: 2D feature detection for LC/MS. *J. Mass Spectrom.* 50, 165–174.

Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., y Arita, M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* 12, 523–526.

Ugur, B., Chen, K., y Bellen, H.J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis. Model. Mech.* 9, 235–244.

Wang, C., Kong, H., Guan, Y., Yang, J., Gu, J., Yang, S., y Xu, G. (2005). Plasma Phospholipid Metabolic Profiling and Biomarkers of Type 2 Diabetes Mellitus Based on High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Multivariate Statistical Analysis. *Anal. Chem.* 77, 4108–4116.

Williams, S., Dew-Budd, K., Davis, K., Anderson, J., Bishop, R., Freeman, K., Davis, D., Bray, K., Perkins, L., Hubickey, J., *et al.* (2015). Metabolomic and Gene Expression Profiles Exhibit Modular Genetic and Dietary Structure Linking Metabolic Syndrome Phenotypes in *Drosophila*. *G3amp58 GenesGenomesGenetics* 5, 2817–2829.

ANEXOS

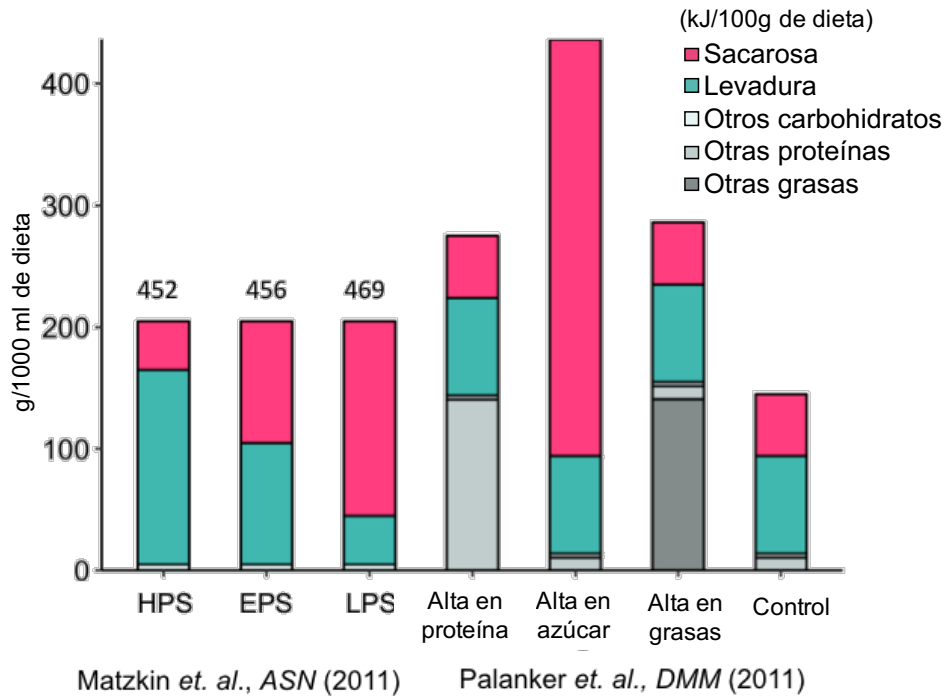


Figure A1. Las dietas isocalóricas difieren en la fuente de las calorías. Gráfica de barras para comparar el contenido de macronutrientes en dietas utilizadas en moscas *Drosophila*. La sacarosa es la principal fuente de carbohidratos y la levadura es la principal fuente de proteínas. Dietas representadas en el diagrama: HPS, EPS y LPS de Matzkin *et. al.* 2011; Alta en proteína, Alta en grasa, Alta en azúcar y Control de Palanker *et. al.* 2011.

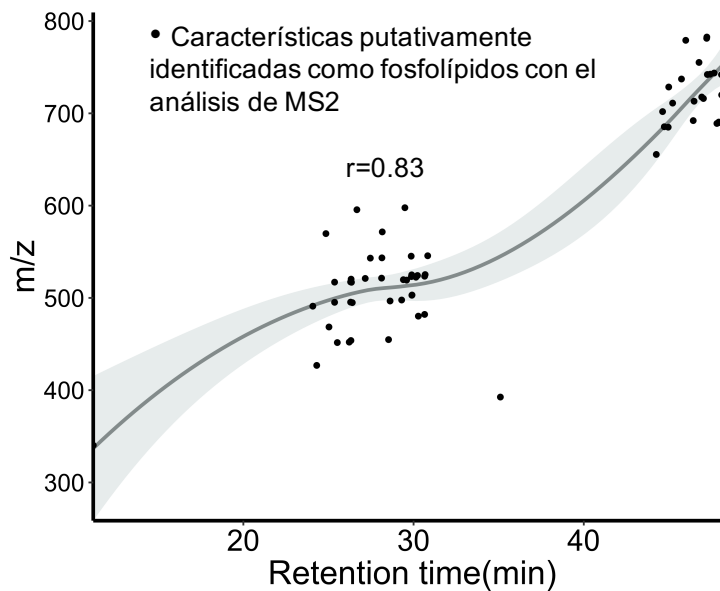


Figure A2. Correlación de Spearman del tamaño de características putativamente identificadas como fosfolípidos (Tabla 9) con el tiempo de elución. Modelo de regresión polinomial local (LOESS, por sus siglas en inglés).

Las matrices de confusión de la validación cruzada se muestran en las tablas siguientes para los modelos globales de RF dirigido a especies (Tabla A2), dirigido a sexo (Tabla A3) y dirigido a dieta (Tabla A4).

Tabla A2. Validación cruzada base 10 del modelo global de RF dirigido a especies

Sub conjunto	OOB	Matriz de confusión			Exactitud
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
1	1.2%	<i>D. melanogaster</i>	3	1	0
		<i>D. arizonae</i>	0	4	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	1
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
2	2.41%	<i>D. melanogaster</i>	3	0	0
		<i>D. arizonae</i>	0	4	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	1	1
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
3	4.82%	<i>D. melanogaster</i>	3	0	0
		<i>D. arizonae</i>	1	3	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	2
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
4	2.41%	<i>D. melanogaster</i>	3	0	0
		<i>D. arizonae</i>	1	3	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	2
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
5	3.61%	<i>D. melanogaster</i>	3	0	0
		<i>D. arizonae</i>	0	4	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	2
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
6	6.02%	<i>D. melanogaster</i>	4	0	0
		<i>D. arizonae</i>	2	0	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	3
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
7	4.82%	<i>D. melanogaster</i>	4	0	0
		<i>D. arizonae</i>	0	2	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	3
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
8	3.61%	<i>D. melanogaster</i>	4	0	0
		<i>D. arizonae</i>	0	2	0
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	3
		<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
9	2.41%	<i>D. melanogaster</i>	4	0	0
		<i>D. arizonae</i>	0	3	0

		<i>D. mojavensis</i>	0	0	2	
			<i>D. melanogaster</i>	<i>D. arizonae</i>	<i>D. mojavensis</i>	
10	3.61%	<i>D. melanogaster</i>	4	0	0	
		<i>D. arizonae</i>	0	3	0	1
		<i>D. mojavensis</i>	0	0	2	
OOB promedio	3.49%					Exactitud promedio 0.933

Tabla A3. Validación cruzada base 10 del modelo global de RF dirigido a sexo

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión			Exactitud
			Female	Male	
1	32.53%	Female	5	0	0.778
		Male	2	2	
2	27.71%	Female	4	0	0.778
		Male	2	3	
3	32.53%	Female	4	1	0.667
		Male	2	2	
4	39.76%	Female	4	0	1.000
		Male	0	5	
5	28.92%	Female	3	1	0.778
		Male	1	4	
6	33.73%	Female	4	2	0.778
		Male	0	3	
7	38.55%	Female	3	2	0.667
		Male	1	3	
8	27.71%	Female	3	2	0.556
		Male	2	2	
9	30.12%	Female	2	3	0.556
		Male	1	3	
10	37.35%	Female	4	1	0.778
		Male	1	3	
OOB promedio	32.89%		Exactitud promedio		0.733

Tabla A4. Validación cruzada base 10 del modelo global de RF dirigido a dieta

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión			Exactitud	
		LPS	EPS	HPS		
1	46.9%	LPS	2	0	0	0.889
		EPS	0	3	0	
		HPS	1	0	3	
2	45.78%	LPS	1	1	0	0.444
		EPS	0	1	4	
		HPS	0	0	2	
3	42.17%	LPS	1	0	2	0.333
		EPS	1	1	3	
		HPS	0	0	1	
4	39.76%	LPS	0	3	1	0.333
		EPS	0	3	1	
		HPS	0	1	0	
5	37.35%	LPS	1	0	1	0.556
		EPS	1	1	1	
		HPS	1	0	3	
6	40.96%	LPS	1	2	0	0.556
		EPS	0	2	0	
		HPS	0	2	2	
7	39.76%	LPS	1	1	0	0.857
		EPS	0	2	0	
		HPS	0	0	3	
8	46.99%	LPS	1	1	0	0.444
		EPS	0	1	1	
		HPS	0	3	2	
9	42.17%	LPS	0	1	0	0.444
		EPS	1	2	0	
		HPS	0	3	2	
10	38.55%	LPS	1	0	0	0.778
		EPS	0	4	1	
		HPS	0	1	2	

OOB promedio 42.04% **Exactitud promedio** 0.563

Las matrices de confusión de la validación cruzada se muestran en las tablas siguientes para los modelos selectivos de RF para *D. melanogaster* dirigido a sexo (Tabla A5) y dirigido a dieta (Tabla A6).

Tabla A5. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D. melanogaster* dirigido a sexo

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión		Exactitud
			Female Male	
1	36.36%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
			Female Male	
2	27.27%	Female	2 0	1
		Male	0 1	
			Female Male	
3	30.3%	Female	1 0	1
		Male	0	
			Female Male	
4	27.27%	Female	1 0	1
		Male	0 2	
			Female Male	
5	21.21%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
			Female Male	
6	24.24%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
			Female Male	
7	27.27%	Female	1 0	1
		Male	0 2	
			Female Male	
8	36.36%	Female	1 0	1
		Male	0 2	
			Female Male	
9	27.27%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
			Female Male	
10	24.24%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
OOB promedio	28.18%	Exactitud promedio	0.833333333	

Tabla A6. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D. melanogaster* dirigido a dieta

Suconjunto	OOB	Matriz de confusión			Exactitud	
		LPS	EPS	HPS		
1	75.76%	LPS	1	0	0.333	
		EPS	0	0		2
		HPS	0	0		0
2	81.82%	LPS	2	0	1	
		EPS	0	0		0
		HPS	0	0		1
3	60.61%	LPS	0	1	0	
		EPS	0	0		0
		HPS	1	1		0
4	69.7%	LPS	1	1	0.333	
		EPS	0	0		0
		HPS	0	1		0
5	72.73%	LPS	0	1	0.333	
		EPS	0	0		0
		HPS	0	1		1
6	66.67%	LPS	0	1	0.333	
		EPS	0	1		0
		HPS	0	1		0
7	66.67%	LPS	0	0	0	
		EPS	2	0		0
		HPS	0	1		0
8	63.64%	LPS	0	0	0	
		EPS	1	0		0
		HPS	1	1		0
9	63.64%	LPS	0	0	0	
		EPS	0	0		2
		HPS	0	1		0
10	69.7%	LPS	1	0	0.333	
		EPS	0	0		1
		HPS	1	0		0
OOB promedio	69.09%	Exactitud promedio			0.267	

Las matrices de confusión de la validación cruzada se muestran en las tablas siguientes para los modelos selectivos de RF para *D. arizonae* dirigido a sexo (Tabla A7) y dirigido a dieta (Tabla A8).

Tabla A7. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D. arizonae* dirigido a sexo

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión		Exactitud
			Female Male	
1	41.38%	Female	2 0	1
		Male	0 1	
			Female Male	
2	34.48%	Female	1 1	0.333
		Male	1 0	
			Female Male	
3	44.83%	Female	1 0	0.667
		Male	1 1	
			Female Male	
4	27.59%	Female	1 0	0.333
		Male	2 0	
			Female Male	
5	37.93%	Female	0 2	0.333
		Male	0 1	
			Female Male	
6	41.38%	Female	1 1	0.667
		Male	0 1	
			Female Male	
7	44.83%	Female	1 0	1
		Male	0 2	
			Female Male	
8	48.28%	Female	2 0	1
		Male	0 1	
			Female Male	
9	41.38%	Female	1 1	0.5
		Male	0 1	
			Female Male	
10	37.93%	Female	2 0	0.667
		Male	1 0	
OOB promedio	40.0%	Exactitud promedio		0.65

Tabla A8. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D. arizonae* dirigido a dieta

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión			Exactitud
		LPS	EPS	HPS	
1	44.83%	LPS	0	0	1
		EPS	0	2	
		HPS	0	0	
2	58.62%	LPS	1	0	1
		EPS	0	1	
		HPS	0	0	
3	48.28%	LPS	1	0	0.333
		EPS	0	0	
		HPS	0	2	
4	51.72%	LPS	1	0	1
		EPS	0	1	
		HPS	0	0	
5	34.48%	LPS	1	0	0.333
		EPS	1	0	
		HPS	0	1	
6	37.93%	LPS	2	0	0.667
		EPS	0	0	
		HPS	0	1	
7	37.93%	LPS	0	0	0.333
		EPS	1	1	
		HPS	1	0	
8	51.72%	LPS	0	1	0
		EPS	0	0	
		HPS	2	0	
9	44.83%	LPS	1	0	0.667
		EPS	0	0	
		HPS	0	1	
10	51.72%	LPS	0	1	0.333
		EPS	0	0	
		HPS	0	1	

OOB promedio 46.21%

Exactitud promedio 0.567

Las matrices de confusión de la validación cruzada se muestran en las tablas siguientes para los modelos selectivos de RF para *D. mojavensis* dirigido a sexo (Tabla A9) y dirigido a dieta (Tabla A10).

Tabla A9. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D. mojavensis* dirigido a sexo

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión		Exactitud
			Female Male	
1	31.82%	Female Male	1 0 0 1	1
2	40.91%	Female Male	1 0 0 1	1
3	40.91%	Female Male	0 1 0 1	0.5
4	40.91%	Female Male	1 0 0 1	1
5	31.82%	Female Male	1 0 0 1	1
6	36.36%	Female Male	1 0 1 0	0.5
7	40.91%	Female Male	1 1 0 0	0.5
8	31.82%	Female Male	0 1 0 1	0.5
9	31.82%	Female Male	0 1 0 1	0.5
10	27.27%	Female Male	0 1 1 0	0
OOB promedio	35.46%	Exactitud promedio		0.65

Tabla A10. Validación cruzada base 10 del modelo de RF selectivo para *D.mojavensis* dirigido a dieta

Subconjunto	OOB	Matriz de confusión		Exactitud
		EPS	HPS	
1	0%	EPS	1	0.5
		HPS	0	
2	9.09%	EPS	0	1
		HPS	2	
3	9.09%	EPS	1	1
		HPS	1	
4	4.55%	EPS	1	1
		HPS	1	
5	4.55%	EPS	2	1
		HPS	0	
6	13.64%	EPS	0	1
		HPS	2	
7	9.09%	EPS	1	1
		HPS	1	
8	9.09%	EPS	1	1
		HPS	1	
9	13.64%	EPS	0	1
		HPS	2	
10	13.64%	EPS	2	1
		HPS	0	
OOB promedio	9.0%	Exactitud promedio	0.95	

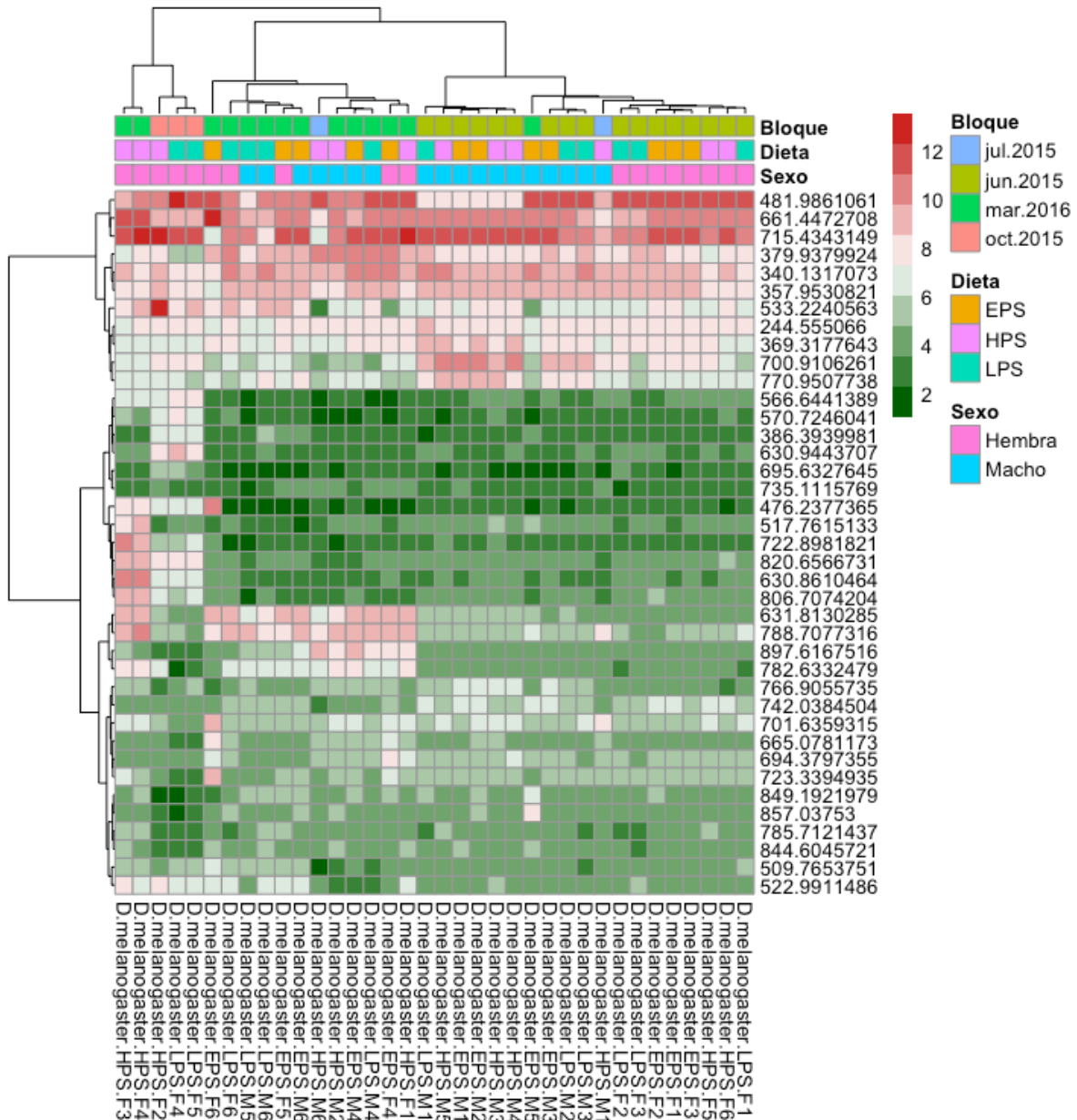


Figura A3. Mapa de calor de las 20 características más importantes de los modelos de bosques aleatorios para sexo y dieta de *D. melanogaster*; intensidades relativas transformadas con \log_2 , distancia euclidiana y clúster "Ward.D" y código de color para bloque (fecha de adquisición), dieta y sexo. No se observan grupos de dieta, pero sí de sexo.

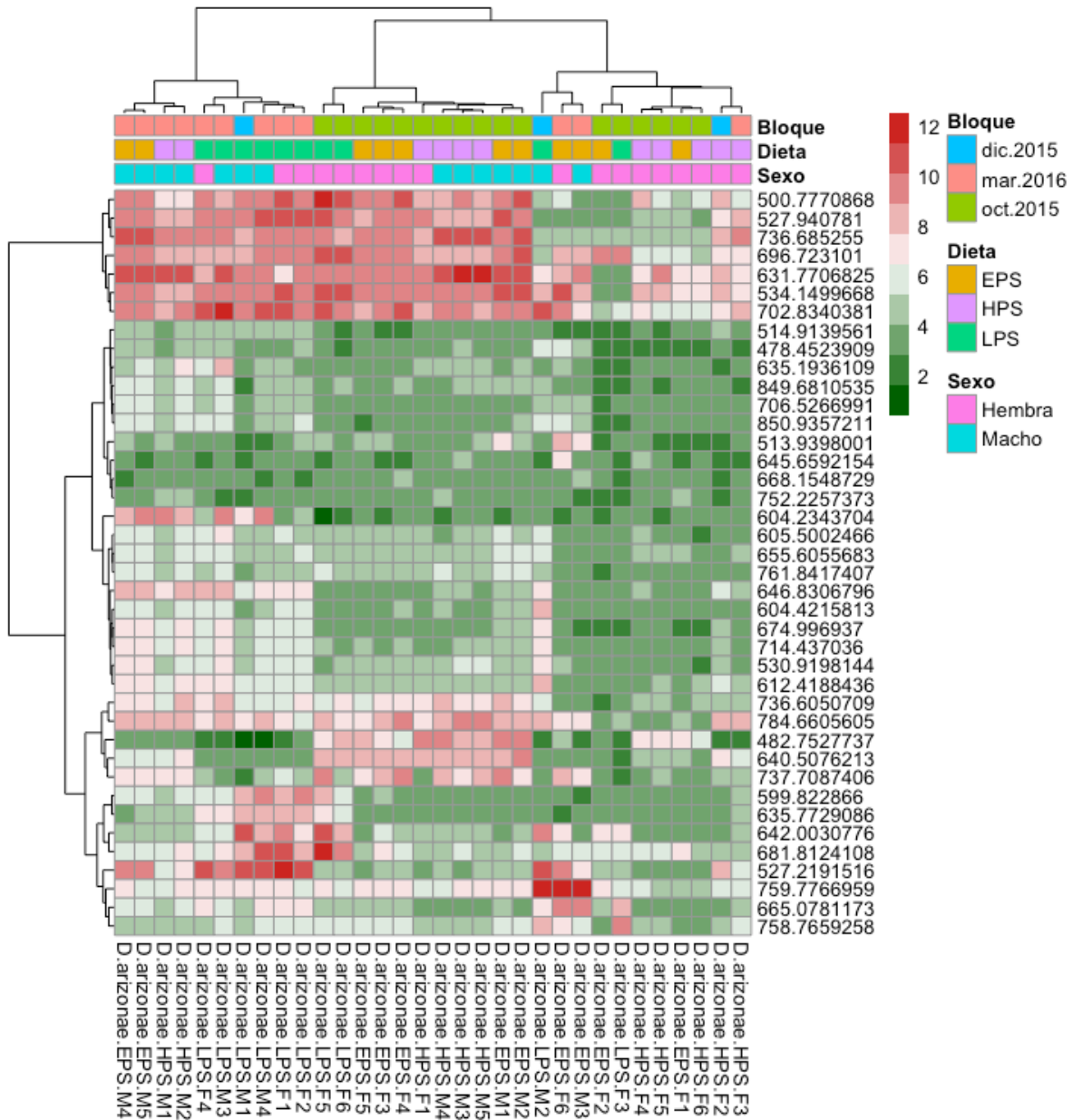


Figura A4. Mapa de calor de las 20 características más importantes de los modelos de bosques aleatorios para sexo y dieta de *D. arizonae*; intensidades relativas transformadas con \log_2 , distancia euclidiana y clúster “Ward.D”, y código de color para bloque (fecha de adquisición), dieta y sexo. Se observa clúster de dieta LPS.

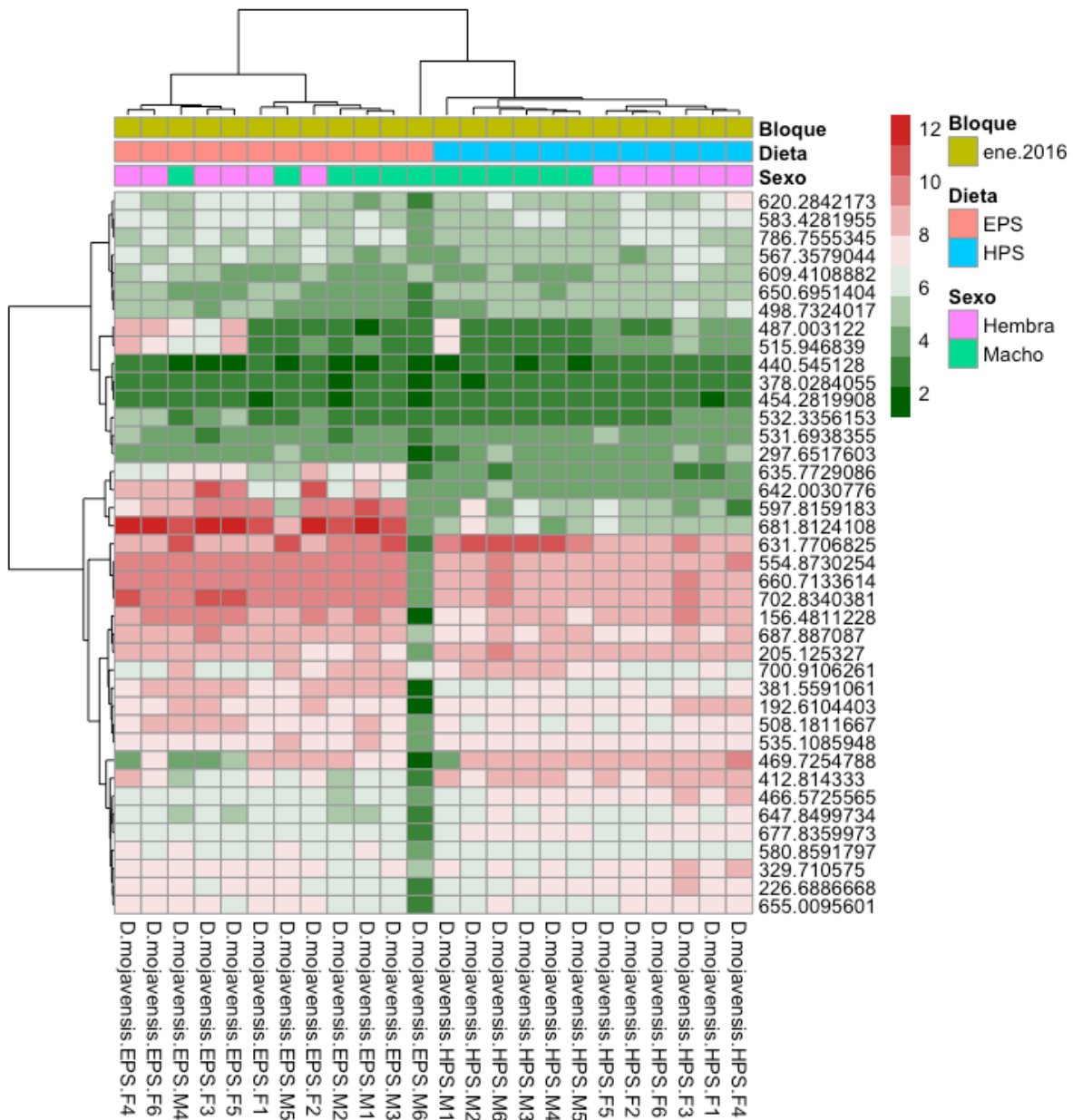


Figura A5. Mapa de calor de las 20 características más importantes de los modelos de bosques aleatorios para sexo y dieta de *D. mojavensis*; intensidades relativas transformadas con \log_2 , distancia euclidiana y clúster “Ward.D “ y código de color para bloque (fecha de adquisición), dieta y sexo. Se observan clústeres de dietas.

Para mostrar si el sexo podría confundir el modelo selectivo dirigido a dieta. Se hicieron modelos de RF específicos de cada sexo en cada especie para clasificar por dieta; incluyendo ambos sexos, solamente machos o solamente hembras (Tabla A11). Se observa un OOB similar al obtenido por el modelo selectivo dirigido a dieta ignorando el efecto del sexo por validación cruzada base 10 (Tablas A6, A8, A 10.

Tabla A11. Error fuera de la bolsa (OOB) de modelos dirigidos a dieta			
<i>D. melanogaster</i>			
Target	Set de datos incluido	OOB	OOB promedio validación cruzada
Dieta	Ambos sexos	72.22%	69.99%
	Hembras	66.67%	--
	Machos	100%	--
<i>D. arizonae</i>			
Target	Set de datos incluido	OOB	OOB promedio validación cruzada
Dieta	Ambos sexos	40.62%	46.21%
	Hembras	55.56%	--
	Machos	57.14%	--
<i>D. mojavensis</i>			
Target	Set de datos incluido	OOB	OOB promedio validación cruzada
Dieta	Ambos sexos	4.17%	9.0%
	Hembras	16.67%	--
	Machos	33.33%	--

Tabla A12. Muestras utilizadas para los análisis. Se indica el ID de las muestras en los mapas de calor de las figuras A3, A4 y A5.

ID	Fecha	Especie	Sexo	Dieta	Bloque
D.arizonae.EPS.F2	07/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.F5	07/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.F6	07/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	oct.2015
D.arizonae.LPS.F3	08/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.F4	14/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.M3	14/10/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	HPS	oct.2015
D.arizonae.LPS.F5	14/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.M1	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	EPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.F1	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.F3	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.F5	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	oct.2015
D.arizonae.EPS.M2	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	EPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.F1	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.M4	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	HPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.M5	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	HPS	oct.2015
D.arizonae.LPS.F6	15/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	oct.2015

D.arizonae.HPS.F4	16/10/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	oct.2015
D.arizonae.HPS.F2	02/12/15	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	dic.2015
D.arizonae.LPS.M1	02/12/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	LPS	dic.2015
D.arizonae.LPS.M2	02/12/15	<i>D.arizonae</i>	Macho	LPS	dic.2015
D.arizonae.EPS.F6	18/03/16	<i>D.arizonae</i>	Hembra	EPS	mar.2016
D.arizonae.EPS.M3	18/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	EPS	mar.2016
D.arizonae.EPS.M4	20/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	EPS	mar.2016
D.arizonae.EPS.M5	20/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	EPS	mar.2016
D.arizonae.HPS.F3	20/03/16	<i>D.arizonae</i>	Hembra	HPS	mar.2016
D.arizonae.LPS.F1	20/03/16	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	mar.2016
D.arizonae.LPS.M3	20/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	LPS	mar.2016
D.arizonae.HPS.M1	21/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	HPS	mar.2016
D.arizonae.HPS.M2	21/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	HPS	mar.2016
D.arizonae.LPS.F2	21/03/16	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	mar.2016
D.arizonae.LPS.F4	21/03/16	<i>D.arizonae</i>	Hembra	LPS	mar.2016
D.arizonae.LPS.M4	21/03/16	<i>D.arizonae</i>	Macho	LPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.F1	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	EPS	jun.2015
D.melanogaster.EPS.F2	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	EPS	jun.2015
D.melanogaster.EPS.F3	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	EPS	jun.2015
D.melanogaster.EPS.M1	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	EPS	jun.2015
D.melanogaster.EPS.M2	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	EPS	jun.2015
D.melanogaster.EPS.M3	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	EPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.F5	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	HPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.F6	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	HPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.M3	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	HPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.M4	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	HPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.M5	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	HPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.F1	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	LPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.F2	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	LPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.F3	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	LPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.M1	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	LPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.M2	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	LPS	jun.2015
D.melanogaster.LPS.M3	29/06/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	LPS	jun.2015
D.melanogaster.HPS.M1	18/07/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	HPS	jul.2015
D.melanogaster.HPS.M6	19/07/15	<i>D.melanogaster</i>	Macho	HPS	jul.2015
D.melanogaster.HPS.F2	29/10/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	HPS	oct.2015
D.melanogaster.LPS.F4	30/10/15	<i>D.melanogaster</i>	Hembra	LPS	oct.2015

D.melanogaster.LPS.F5	30/10/15	D.melanogaster	Hembra	LPS	oct.2015
D.melanogaster.EPS.F6	17/03/16	D.melanogaster	Hembra	EPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.F4	18/03/16	D.melanogaster	Hembra	EPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.M4	18/03/16	D.melanogaster	Macho	EPS	mar.2016
D.melanogaster.HPS.F1	18/03/16	D.melanogaster	Hembra	HPS	mar.2016
D.melanogaster.HPS.F3	18/03/16	D.melanogaster	Hembra	HPS	mar.2016
D.melanogaster.HPS.M2	18/03/16	D.melanogaster	Macho	HPS	mar.2016
D.melanogaster.LPS.F6	18/03/16	D.melanogaster	Hembra	LPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.F5	19/03/16	D.melanogaster	Hembra	EPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.M6	19/03/16	D.melanogaster	Macho	EPS	mar.2016
D.melanogaster.HPS.F4	19/03/16	D.melanogaster	Hembra	HPS	mar.2016
D.melanogaster.LPS.M4	19/03/16	D.melanogaster	Macho	LPS	mar.2016
D.melanogaster.LPS.M5	19/03/16	D.melanogaster	Macho	LPS	mar.2016
D.melanogaster.LPS.M6	19/03/16	D.melanogaster	Macho	LPS	mar.2016
D.melanogaster.EPS.M5	20/03/16	D.melanogaster	Macho	EPS	mar.2016
D.mojavensis.EPS.F1	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.F2	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.F3	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.F4	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.F5	05/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.F6	05/01/16	D.mojavensis	Hembra	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M1	05/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M2	05/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M3	06/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M4	06/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M5	06/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.EPS.M6	07/01/16	D.mojavensis	Macho	EPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F1	07/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F2	05/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F3	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F4	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F5	06/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.F6	07/01/16	D.mojavensis	Hembra	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.M1	06/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.M2	06/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.M3	05/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.M4	05/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016

D.mojavensis.HPS.M5	06/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016
D.mojavensis.HPS.M6	06/01/16	D.mojavensis	Macho	HPS	ene.2016