



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL IPN**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**

**“Cambios proteicos en el intestino de *Drosophila  
melanogaster* deficiente en manganeso o hierro”**

**T E S I S**

Que presenta:

**IBQ. JOHANA VÁSQUEZ PROCOPIO**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director:

**DR. FANIS MISSIRLIS**

**México, D.F**

**Agosto, 2015**

## **ASESORES:**

Dr. Porfirio Nava Domínguez<sup>1</sup>

Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS.

<sup>2</sup>DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el laboratorio 37 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Fanis Missirlis.

# CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos generales del manganeso y del hierro.....	1
1.2 El Manganeso en México.....	3
1.3 Fuentes de absorción de manganeso.....	3
1.4 Toxicidad inducida por manganeso .....	4
1.5 SLC30A10 (ZnT10).....	5
1.6 Tratamiento de la hipermanganesemia.....	6
1.7 Transporte del Fe, Cu y Zn en mamíferos y <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. HIPÓTESIS .....	11
4. OBJETIVOS .....	11
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	11
5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	12
5.1 Cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	12
5.2 Elaboración de dieta química deficiente de Mn y Fe .....	12
5.3 Concentración de metales por espectrometría de absorción atómica .....	13
5.4 Evaluación del desarrollo.....	14
5.5 Ferritina como biomarcador de la deficiencia de Fe.....	14
5.6 Determinación de la actividad de la SOD.....	14
5.7 Geles 2D .....	15
5.7.1 Preparación de la muestra.....	15
5.7.2 Isoelectroenfoque (1D) .....	16
5.7.3 Electroforesis (2D).....	17
5.7.4 Tinción.....	17

5.8	Búsqueda del gen SLC30A10 homólogo en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	18
5.9	Extracción de RNA .....	19
5.10	Tratamiento del RNA con DNAsa .....	20
5.11	Formación del cDNA y reacción de RT-PCR semicuantitativa .....	21
5.12	Análisis estadístico .....	21
6.	RESULTADOS .....	22
6.1	Dieta química deficiente de Mn y Fe .....	22
6.2	Expresión proteica en geles 2D .....	26
6.3	Superóxido dismutasa 2 como biomarcador de la deficiencia de manganeso....	30
6.4	Análisis de mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> del posible homólogo en el gen SLC30A10.....	33
7.	DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS .....	36
7.1	Evaluación del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizando un medio de cultivo deficiente de manganeso .....	36
7.2	Expresión proteica en geles 2D .....	37
7.3	SOD2 como biomarcador de la deficiencia de manganeso.....	38
7.4	Mutantes de <i>Drosophila melangaster</i> en su homólogo SLC30A10 .....	38
8.	REFERENCIAS .....	39

## ABREVIATURAS

Mn	(Manganeso)
SOD2	(Superóxido dismutasa 2)
Mg <sup>2+</sup>	(Magnesio)
ICP-MS	(Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)
SSA	(Secretaria de Salud)
Fe	(Hierro)
DNA	(Ácido dexorribonucleico)
CAMIMEX	(Cámara minera de México)
MMT	(Metil-ciclopentadienil)
SLC30A10	(Familia de transportadores de soluto 30, miembro 10)
MRI	(Imagen de resonancia magnética)
SNP arrays	(Polimorfismo de un solo nucleótido)
TMD	(Dominio transmembranal)
ZnT8	(Exportador de zinc 8)
ZnT2	(Exportador de zinc 2)
EDTA	(Ácido etilen-diamino-tetracético)
Ca <sup>2+</sup>	(Calcio)
Zn <sup>2+</sup>	(Zinc)
DMT1	(Transportador de metal divalente 1)
CTR1	(Transportador de cobre 1)
ZIP4	(Importador de zinc 4)
Mvl	(Malvolio)
SOD1	(Superóxido dismutasa 1)
DN	(Dieta normal)
DQ	(Dieta química)
DQ-Mn	(Dieta química deficiente de manganeso)
DQ-Fe	(Dieta química deficiente de hierro)
DQ+20%Fe	(Dieta química con sólo 20% de hierro)
DTT	(Ditiotreitol)
IGEPAL	(octil-Fenoxipolietoxi-etanol)
CHAPS	(3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)
DEPC	(Diethyl-pirocarbonato)
SDS	Dodecilsulfato sódico
PBS	(Solución salina amortiguadora por fosfatos)
cDNA	(DNA complementario)
NaHCO <sub>3</sub>	(Bicarbonato de sodio)
NaPO <sub>4</sub>	(Fosfato de sodio)
CaCl <sub>2</sub>	(Cloruro de calcio)
MgSO <sub>4</sub>	(Sulfato de magnesio)
CuSO <sub>4</sub>	(Sulfato de cobre)
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	(Acetato de zinc dihidratado)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura tridimensional de enzimas que utilizan manganeso como cofactor o activador enzimático.....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura tridimensional de enzimas que utilizan hierro como cofactor.....	2
<b>Figura 3.</b> Alineamiento de secuencias de SLC30A1 (ZnT1) y SLC30A10 (ZnT10) de varias especies.....	5
<b>Figura 4.</b> Transporte de hierro, cobre y zinc en mamíferos.....	8
<b>Figura 5.</b> Transporte de hierro, cobre y zinc en <i>D. melanogaster</i> .....	9
<b>Figura 6.</b> Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas ZnT entre <i>Drosophila</i> , mamíferos y levadura.....	18
<b>Figura 7.</b> Estructura tridimensional de SLC30A1 y SLC30A10 con su respectivo homólogo en <i>D. melanogaster</i> .....	19
<b>Figura 8.</b> Tiempo de aparición de la primera pupa.....	23
<b>Figura 9.</b> Población total de adultos de la cepa al cuarto día después de emerger la primera mosca.....	25
<b>Figura 10.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta normal (DN) y dieta química (DQ).....	27
<b>Figura 11.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de manganeso.....	28
<b>Figura 12.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de hierro.....	28
<b>Figura 13.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta química (DQ).....	29
<b>Figura 14.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de manganeso.....	29
<b>Figura 15.</b> Proteínas del intestino de <i>D. melanogaster</i> hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de hierro.....	30
<b>Figura 16.</b> Ferritina como biomarcador de la deficiencia de hierro.....	31
<b>Figura 17.</b> Sistema de expresión génica Gal4/UAS.....	32
<b>Figura 18.</b> Estructura del gen ZnT77C de <i>D. melanogaster</i> .....	33
<b>Figura 19.</b> Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de 50 ng de RNA obtenido de moscas mutantes en el posible homólogo de humanos SLC30A10 crecidas en DN.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Primers que se utilizaron en la reacción de RT-PCR. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con concentraciones disminuidas de metales.. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con 1% de levadura y concentraciones disminuidas de metales. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con 1% de levadura, 1.25% de piloncillo y concentraciones disminuidas de metales. ....	25
<b>Tabla 5.</b> Contenido de metal de moscas adultas completas de las mutantes de ZnT77C crecidas en DN. ....	35



## RESUMEN

Los cationes metálicos  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  son elementos esenciales para el crecimiento de todos los organismos. Estos iones participan como cofactores en diversos procesos enzimáticos y forman parte de estructuras proteicas. El sistema de transporte en mamíferos del  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  a través de la membrana celular se conoce ampliamente. La deficiencia alimenticia ha sido un factor clave para investigar el transporte de los metales antes mencionados ya que los sistemas de captura aumentan en esta respuesta fisiológica. En este trabajo se propuso como objetivo general crear un modelo deficiente de manganeso en *Drosophila melanogaster* utilizando una dieta química definida para estudiar a las proteínas transportadoras del manganeso. Este modelo animal se generó y actualmente se cuenta con el para evaluar el efecto de la deficiencia de manganeso en procesos biológicos que se planteen. Se corrieron geles 2D de extractos proteicos de intestinos de moscas crecidas en condiciones deficientes de manganeso y de hierro. Sin embargo, hasta el momento no se tienen las réplicas biológicas suficientes para evaluar los cambios proteicos de estos tratamientos. Se analizaron también, moscas mutantes con inserciones de elementos P en la región genómica de *ZnT77C* y se observó que estas inserciones reducen la expresión génica de *ZnT77C*. Para ver si la reducción de la expresión de *ZnT77C* tiene un efecto en la acumulación de  $\text{Zn}^{+2}$  o  $\text{Mn}^{+2}$ , se realizó un análisis elemental en las moscas mutantes, pero no se observó ninguna variación en los metales. Por lo tanto para deducir si *ZnT77C* es el homólogo del *SLC30A10* y si tiene relación con el manganeso u otro metal se requiere de una investigación más extensa. En conclusión, en este trabajo se generó por primera vez un modelo de mosca deficiente en manganeso que puede servir para estudiar el sistema de captura de este metal y su efecto en varios procesos biológicos.

## ABSTRACT

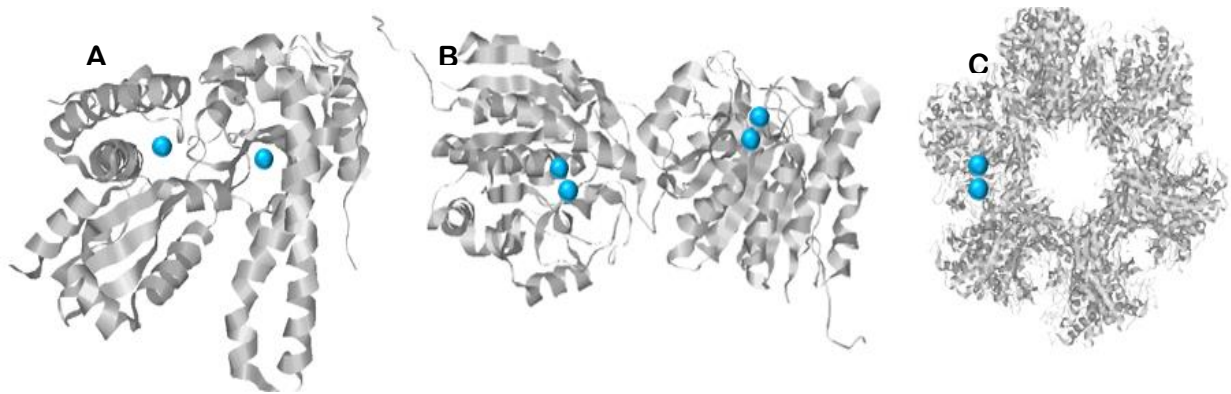
The metal cations  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  are trace elements essential for the growth of most organisms. These ions act as cofactors in enzymatic processes and form part of protein structures.  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  are transported through the cell membrane by specific transporters. A key for the discovery of the transport systems of the aforementioned metals was their specific up-regulation as a physiological response to respective metal deficiencies. Although the transporters for  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  are known, which proteins are involved in  $\text{Mn}^{+2}$  transport is less clear. Recently, the human transporter SLC30A10 has been proposed as a cellular  $\text{Mn}^{+2}$  exporter. Here, the main objective was to generate a *Drosophila* model of manganese deficiency using a chemically defined diet to help identify and study manganese-specific transporters and the requirement of  $\text{Mn}^{+2}$  in different biological processes. 2D gels were performed using samples of intestines dissected from flies raised in conditions of manganese deficiency and, separately, of iron deficiency. More replicates are required to assess protein changes as a result of these treatments. Furthermore, mutant flies with a *P*-element insertion in the genomic region of *ZnT77C*, the closest fly homolog of SLC30A10, were investigated. A reduction of *ZnT77C* expression in the mutant flies was observed as expected. However, metal determinations in the bodies of the mutant flies did not show any specific alterations in total  $\text{Mn}^{+2}$  content or in any of the other metals. Therefore, further investigations are required to deduce whether *ZnT77C* is a homologue of SLC30A10 and to identify if it transports manganese or another metal. In conclusion, this work presents for the first time a fly model of manganese deficiency, which can serve to study the transport system of this metal and its effects in different biological processes.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos generales del manganeso y del hierro

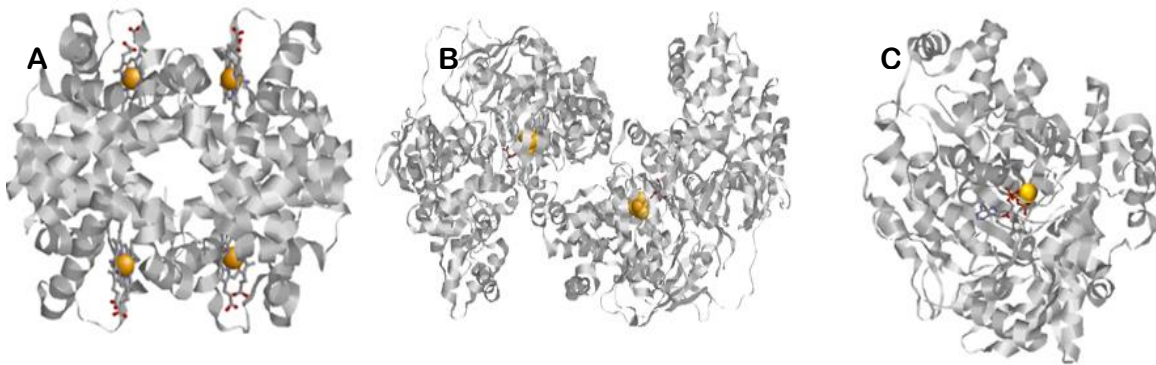
El manganeso (Mn) es el décimo elemento más abundante que se encuentra en la corteza terrestre. Se distribuye en suelos, sedimentos, rocas, agua y es un metal esencial en sistemas biológicos (Post 1999; Aschner et al., 2007). Este metal de transición, existe en diferentes estados de oxidación y el  $Mn^{2+}$  es la forma iónica más común en solución acuosa (Aschner y Aschner, 2005). El Mn está presente en el centro reactivo de diversas metaloenzimas (Hardy 2009); funciona como cofactor de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) que protege del estrés oxidativo (Celotto et al., 2012) y de la arginasa que es la enzima final del ciclo de la urea (Kanyo et al., 1996, Hai et al 2014). El  $Mn^{2+}$  puede sustituir al  $Mg^{+}$  como activador enzimático de la glutamina sintetasa, quien cataliza en los astrocitos la condensación del glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio de la corteza cerebral humana (Wedler et al., 1982) (Fig. 1). El Mn también es esencial para el desarrollo de las plantas, porque forma parte del fotosistema II, responsable de la fotólisis del agua y la producción de  $O_2$  en la fotosíntesis (Huang y Lin 2004; Cox et al., 2014). Por otra parte, en grupos de pacientes con diabetes tipo I y diabetes tipo II se han reportado niveles sanguíneos bajos de Mn, medidos con ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), sugiriendo un posible papel del Mn en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Forte 2013).

Lee et al., 2013, utilizando una línea de ratones a los cuales se les suplementó con Mn durante ocho semanas sometiendo estrés a las células  $\beta$  del páncreas se observó aumento en la secreción de insulina en comparación con el grupo control no tratado, concluyendo que la suplementación con Mn puede incrementar la secreción de insulina para mejorar la tolerancia a la glucosa en condiciones de una dieta estresada ya que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo contribuyen a la complicación de la diabetes, padecimiento que en nuestro país ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, según datos de la SSA 2014.



**Figura 1. Estructura tridimensional de enzimas que utilizan manganeso como cofactor o activador enzimático. A.** Súperoxido dismutasa 2 (PDB 1VAR). **B.** Arginasa (PDB: 2PHA). **C.** Glutamina sintetasa (PDB: 2GLS). Las esferas en color azul indican la presencia del ion manganeso

El hierro (Fe) es un elemento clave en el metabolismo de prácticamente todos los organismos vivos (Camaschella y Strati 2010). A nivel de sistema, el Fe es requerido como componente del grupo hemo, incluyendo la hemoglobina y mioglobina que son esenciales para la entrega y almacenamiento de oxígeno (Hentze et al., 2010). Este elemento es también necesario para la viabilidad celular como constituyente de proteínas que participan en la síntesis y reparación del DNA, metabolismo de energía y proliferación celular (Ganz y Nemeth., 2010) (Fig. 2).



**Figura 2. Estructura tridimensional de enzimas que utilizan hierro como cofactor. A.** Hemoglobina (PDB: 1S14). **B** Aconitasa (PDB: 1L5J). **C.** Ribonucleotido reductasa (1PEU). Las esferas en color amarillo representan al ion hierro.

## **1.2 El Manganeso en México**

En México, la minería es una de las principales actividades industriales y económicas y es también de las de mayor tradición (Rodríguez-Agudelo et al., 2006). México ocupa el segundo lugar en Latinoamérica y el décimo en el mundo como productor de Mn según datos de la CAMIMEX 2013. El distrito de Molango ubicado al norte del estado de Hidalgo, es donde se produce la mayor cantidad de este metal. En este lugar, la inhalación de partículas cargadas de Mn es la fuente principal de exposición representando un problema grave de salubridad para la población en general, especialmente niños, quienes padecen deterioro de las funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje (Torres-Agustín 2013; Catalán-Vázquez 2014).

## **1.3 Fuentes de absorción de manganeso**

El organismo humano contiene de 10 a 20 mg de Mn y se considera un nutriente esencial que se requiere en pequeñas cantidades para el funcionamiento normal del organismo (Roth 2006). La fuente permanente de este metal para el hombre es la ingesta diaria de los alimentos y se encuentra en frutas secas, granos integrales, semillas, legumbres y verduras de hojas verdes (Roth 2006). El Mn puede absorberse desde diversas fuentes (aire, agua, alimentos, etc.) y en altas concentraciones origina daños a la salud (Roth 2006). Ejemplos de trabajadores con alta exposición a Mn son los mineros extractores de Mn (Gorell et al., 1997), soldadores y elaboradores de aceros (Wang et al., 1989; Racette et al., 2001; Kenangil 2006) quienes tienen los mayores riesgos por la gran cantidad de partículas cargadas de este metal que existen en el aire y la exposición crónica es potencialmente tóxica porque induce neurotoxicidad (Zhao et al., 2009), disminución del neurotransmisor inhibitorio GABA (Takeda et al., 2003), estrés oxidativo y lesiones en la mitocondria (Milatovic et al., 2007).

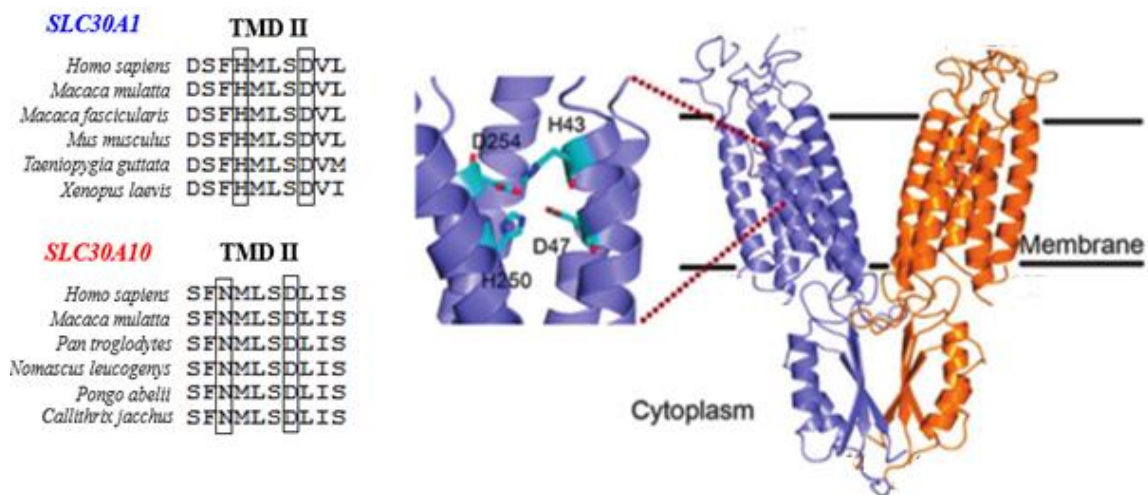
## 1.4 Toxicidad inducida por manganeso

El Mn es un metal de transición indispensable en la producción de acero, es componente de las soldaduras y de sus humos, está presente en pinturas e insecticidas, se utiliza como antidetonante de gasolinas (metilciclopentadienil manganeso (MMT)), en la elaboración de pilas y otros derivados de metales (Sanotsky 2007; Stepens 2008; Chalela 2011). En todos estos casos, el Mn puede ingresar al organismo por la vía respiratoria (Roth 2006).

En particular, el cerebro es fuertemente susceptible a la toxicidad por Mn y cantidades elevadas se acumulan en los ganglios basales y la corteza frontal (Aschner et al., 2007; Reaney et al., 2006; Simmons et al., 2008; Van Meer et al., 2010), principalmente en el globo pálido y la sustancia negra, ocasionando un desorden neurológico conocido como “Parkinsonismo” que se caracteriza por síntomas extrapiramidales, distonia, anorexia, apatía, además de dolores musculares, de las articulaciones y comportamiento compulsivo referido como “locura mangánica” (Cotzias 1968; Kim et al., 1999, Barbeau, 1984; Olanow 2004). Además, el Mn ha sido mostrado que interfiere con varios sistemas de neurotransmisión, especialmente el dopaminérgico en áreas responsables para la coordinación motora, atención y cognición (Dobson et al., 2004). En *Drosophila melanogaster* cantidades elevadas de Mn reducen el tiempo de vida, la actividad locomotora y la cantidad de neuronas dopaminérgicas (Bonilla-Ramírez et al., 2011). Recientemente se reportó una nueva forma de Parkinsonismo como resultado de mutaciones en el gen SLC30A10 que pertenece a la familia de los genes transportadores de zinc conformada por 10 miembros: SLC30A1 (ZnT1) - SLC30A10 (ZnT10) (Tusch et al., 2012, Quadri, et al., 2012, Huang et al., 2013). Esta forma de Parkinsonismo se identificó en dos diferentes familias, con síntomas de hipermanganesemia, distonia, policitemia y cirrosis hepática (Tuschl et al., 2012) y mediante arreglos de alta densidad para identificar Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP arrays) identificaron el gen afectado que resultó ser SLC30A10 (Quadri et al., 2012).

## 1.5 SLC30A10 (ZnT10)

El gen ZnT10 codifica para una proteína integral de membrana con 485 aminoácidos, seis dominios transmembranales (TMD) y sus extremos N y C-terminal son citoplasmático, (Tuschl et al., 2012). Quadri et al., 2012 propusieron a ZnT10 como posible transportador de Mn, basándose en los niveles altos de este metal en la sangre y en el cerebro de pacientes mediante Imagen de Resonancia Magnética (MRI), analizando también la secuencia de aminoácidos de ZnT10 y comparándola con los demás miembros de la familia SLC30A que son considerados como transportadores de zinc. Quadri et al., 2012 encontraron en SLC30A10 un motif conservado de NxxxD en su TMD II que es reemplazado por HxxxD en todos los demás miembros de la familia SLC30A y que SLC30A10 carece de la región rica de histidina en el TMD IV característica de los transportadores de zinc (Fig. 3) (Lichten y Cousins 2009; Huang y Tepasamorndech 2013).



**Figura 3. Alineamiento de secuencias de SLC30A1 (ZnT1) y SLC30A10 (ZnT10) de varias especies.** SLC30A1 posee una histidina (H) y un ácido aspártico (D) en su TMD II que en SLC30A10 la H es reemplazado por asparagina (N) y el D se conserva (Quadri et al 2012). En la parte derecha se muestra la estructura tridimensional del ZnT1 modelada en base a la estructura homóloga de bacteria, donde la H43 y H50 así como el D47 y D254 son los aminoácidos que forman parte del sitio de coordinación del zinc (Lye et al., 2012).

Por otra parte, varios miembros de esta familia de genes que se conocen como transportadores de zinc han sido relacionados con algunas patologías. Por ejemplo: mutaciones en el ZnT2 que está presente en las vesículas secretorias de la glándula mamaria tienen relación con alteraciones en la secreción de la leche (López y Kelleher 2009; López et al., 2011) y mutaciones en ZnT8 que se encuentra en los gránulos de insulina ha sido vinculado con la diabetes tipo I (Kawasaki 2013; Rutter y Chimienti 2015). Con respecto al ZnT10 como ya se mencionó parece tener relación con el transporte de Mn asociado a Parkinsonismo. Investigando este probable vínculo, Leyva-Illades et al., 2014 realizaron experimentos en *C. elegans* donde se sobreexpresó el gen humano SLC30A10 y se evaluó la viabilidad en altas y bajas concentraciones de Mn obteniendo evidencia de que puede estar implicado en la detoxificación del Mn.

## **1.6 Tratamiento de la hipermanganesemia**

Actualmente, para el tratamiento de individuos sobreexpuestos a Mn, principalmente por vía aérea, se utilizan quelantes de metales divalentes como el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) que tiene afinidad por otros cationes divalentes como el Ca<sup>+</sup> los cuales tienen importancia biológica (Stamelou et al., 2012). Hasta la fecha no existe un quelante específico para el Mn, y resulta difícil disminuir su concentración en solución sin afectar a los demás metales divalentes. Por otro lado, para algunos iones metálicos como el Fe y Cu, hay biomarcadores bien definidos que indican su deficiencia (Northrop-Clewes y Thurnham 2013) pero estos no existen para la deficiencia de Mn y se tiene que recurrir a la medición directa.

## **1.7 Transporte del Fe, Cu y Zn en mamíferos y *Drosophila melanogaster***

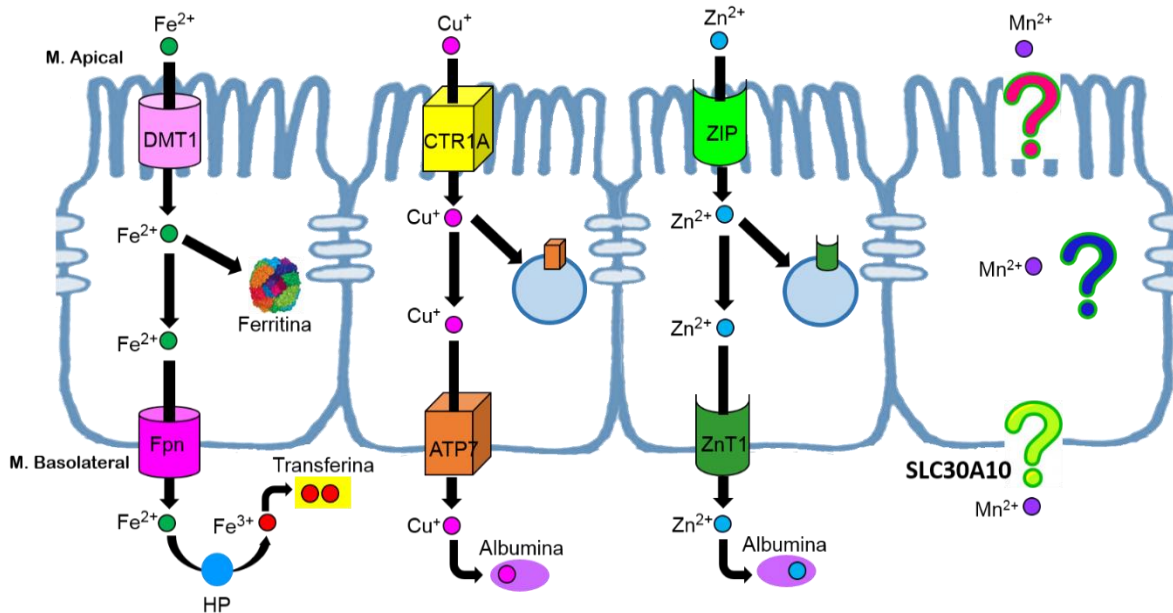
Dentro del grupo de metales considerados como micronutrientes esenciales para el desarrollo de animales, se encuentra el Fe, Cu, Zn y Mn (Harris 2000; MacKenzie et al., 2008; Zhao et al., 2014). En mamíferos, el Fe es absorbido en los enterocitos



por medio del transportador de metal divalente 1 (DMT1, por sus siglas en inglés), se almacena como ferritina dentro de la célula, exportado por la ferroportina y transferido a la sangre por medio de la transferrina (Arredondo y Núñez 2005) (Fig. 4). Para poder investigar a las proteínas transportadoras del Fe, la deficiencia de Fe en animales (anemia) fue un factor clave para su descubrimiento, debido a la sobreexpresión de su sistema de captura (Fleming et al., 1997; McKie et al., 2000; Abboud y Haile 2000). Por su parte, el Cu es absorbido por el transportador de Cu1 (CTR1), se almacena en vesículas y se exporta por una ATPasa (ATPA7) (Turnlund 1998; Southon et al., 2013). El Zn, se absorbe por medio del importador de Zn 4 (ZIP4), se almacena en vesículas y se exporta por el transportador de Zn 1 (ZnT1) (Eide 2006) que como se mencionó anteriormente pertenece a la familia de genes transportadores de Zn, conformado por diez miembros: SLC30A1-SLC30A10 (Huang et al., 2013). Cada uno de los metales mencionados cuenta con su propio sistema de transporte y algún fallo en regulación en su homeostasis puede resultar en patologías que van desde leves a severas o incluso pueden ser mortales (Zhao 2014). No obstante, de los diez miembros que conforman esta familia de genes transportadores de zinc, el SLC30A10 (ZnT10) es hoy en día un tema de investigación porque se desconoce el ion metálico que transporta.

En *Drosophila melanogaster* se han estudiado varias de las proteínas transportadoras de metales mencionadas anteriormente (Fig. 5) (Burke et al., 2008; Qin et al., 2013; Bonilla-Ramirez et al., 2011) siendo este un organismo idóneo para investigar el transporte de iones metálicos. La *D. melanogaster* toma aproximadamente 10 días a 25°C para completar su desarrollo en medio de cultivo estándar (Lewis 2010). El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo, originándose una larva que pasa por tres estadios después de los cuales se origina la pupa. Durante la fase de pupa se produce la metamorfosis, en la que se destruyen la mayor parte de las células de la larva y se forman las estructuras externas del adulto (imago), a partir de estructuras larvales denominadas "discos imagales". Finalizada la metamorfosis, la pupa se abre por la parte superior y emerge el adulto.

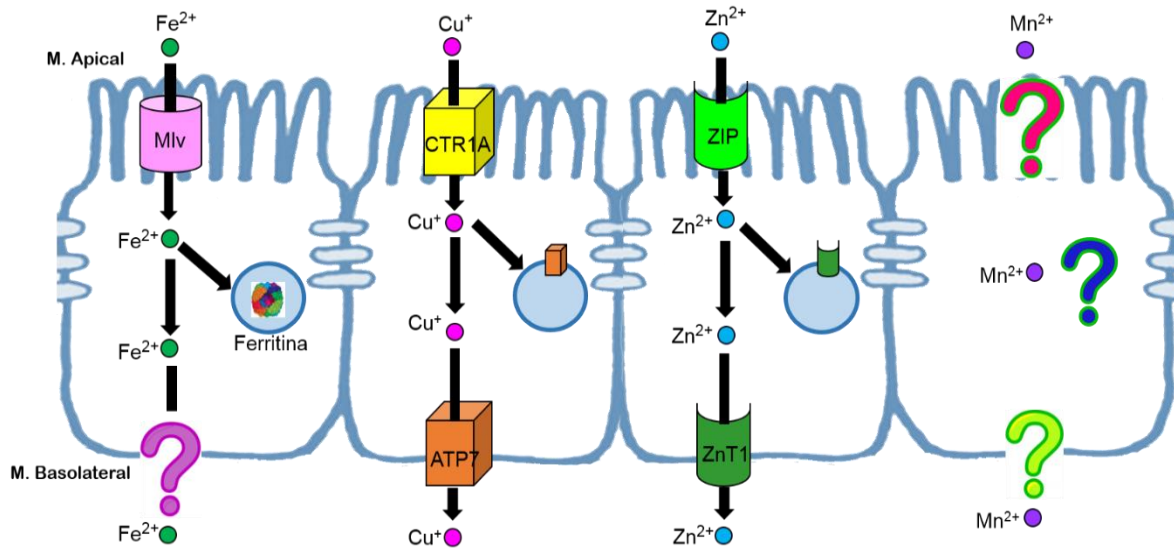
Transcurridas 8 horas tras la eclosión de la pupa, las hembras adultas pueden ser fecundadas (Lewis 2010).



**Figura 4. Transporte de hierro, cobre y zinc en mamíferos.** El  $Fe^{2+}$  es importado a través de la membrana apical por medio del transportador de metales divalentes (DMT1), almacenado en forma de ferritina, exportado en la membrana basolateral por la Ferroportina (Fpn) y transferido a la sangre por medio de la transferrina, donde primeramente es convertido a  $Fe^{3+}$  por la Hepcidina (HP). El  $Cu^{+}$  es importado por el transportador de cobre 1A (CTR1A), almacenado en vesículas en la célula, exportado por una ATPasa y se piensa que es transferido a la sangre por medio de la albumina. EL  $Zn^{+}$  es importado por un importador de Zn (ZIP), almacenado en vesículas en las células, exportado por el exportador de zinc 1 (ZnT1) y al igual que el  $Cu^{+}$  se piensa que es transferido a la sangre por medio de la albúmina. El mecanismo específico del transporte del manganeso es actualmente desconocido y se sugiere que utiliza las mismas proteínas de transporte que el  $Fe^{+}$  y posiblemente SLC30A10 como exportadora de Mn.

Con respecto al sistema de transporte del Mn, este es actualmente desconocido tanto en mamíferos como en *D. melanogaster*, pero algunos autores postulan que puede utilizar las mismas proteínas de transporte que el Fe (DMT1, ferroportina y transferrina) (Lucaciu 1997; Au et al., 2008; Yin 2010; Fujishiro et al., 2012; Madejczyk y Ballatori 2012). Sin embargo, debido al reciente reporte de Parkinsonismo con mutaciones en el gen SLC30A10, Leyva-Illades et al., 2014 en experimentos en *C. elegans* el cual no posee homólogo a SLC30A10, sobreexpresaron este gen y evaluaron la viabilidad en altas y bajas concentraciones

de Mn, obteniendo evidencia que SLC30A10 puede estar implicado en la detoxificación por Mn. Por lo tanto, para caracterizar el papel de SLC30A10 en la homeostasis de este importante metal, *D. melanogaster* es un excelente candidato como organismo modelo de investigación.



**Figura 5. Transporte de hierro, cobre y zinc en *Drosophila melanogaster*.** Se representan las proteínas homólogas de mamíferos en *Drosophila* que participan en su importe y exporte en la célula. El Fe<sup>2+</sup> es importado a través de la membrana apical por medio de Malvolio (Mlv), almacenado como ferritina dentro de vesículas y la forma en que se exporta a la membrana basolateral y se transfiere a la sangre se desconoce. El Cu<sup>+</sup> es importado por medio del transportador de cobre 1A (CTR1A) y exportado en la membrana basolateral por una ATPasa. El Zn<sup>+</sup> utiliza un importador de zinc (ZIP) para pasar al interior de la célula el cual se desconoce que miembro es y por medio del exportador de zinc 1 (ZnT1) cruza la membrana basolateral. De igual manera como en mamíferos aquí no se conoce el sistema de transporte del Mn

## 2. JUSTIFICACIÓN

La sobreexposición a manganeso conlleva a Parkinsonismo en humanos (Kim et al., 1999, Barbeau, 1984; Olanow 2004) un desorden neurológico actualmente no tratable y en *Drosophila melanogaster*, reduce el tiempo de vida, la actividad locomotora y la cantidad de neuronas dopaminérgicas (Bonilla-Ramírez et al., 2011). La falta de modelos apropiados para el estudio del tráfico de este importante metal ha conducido a la idea de que utiliza las mismas proteínas de transporte que el hierro; la propuesta que puede ser errónea debido a: 1) El reporte reciente del gen SLC30A10 afectado en pacientes con hipermanganesemia en la sangre y en el cerebro (Tuschl et al., 2012; Stamelou et al., 2012; Quadri et al., 2012), 2) La mutante de la proteína Malvolio, homólogo del importador de hierro en *Drosophila melanogaster* (DMT1) mostraron deficiencia de hierro pero no de manganeso (Bettendi et al., 2011). La razón de generar deficiencias de manganeso, es que una respuesta biológica típica, es la sobreexpresión del sistema de captura del metal, estrategia que fue utilizada por Fleming et al., 1997; Abboud y Haile 2000; McKie et al., 2000 para descubrir a las proteínas transportadoras del hierro.

### 3. HIPÓTESIS

La deficiencia de manganeso en *Drosophila melanogaster* causa un cambio en la expresión intestinal de las proteínas transportadoras de manganeso las cuales son diferentes a las proteínas transportadoras del hierro.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Generar un modelo deficiente de manganeso en *Drosophila melanogaster* utilizando una dieta química deficiente de este metal para evaluar proteínas transportadoras del manganeso.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el desarrollo de *Drosophila melanogaster* en un medio de cultivo deficiente de manganeso o hierro.
2. Analizar la expresión de proteínas en intestinos deficientes de manganeso o hierro de *Drosophila melanogaster* mediante geles 2D.
3. Evaluar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) como biomarcador de la deficiencia de manganeso.
4. Analizar mutantes de *Drosophila melanogaster* en su homólogo SLC30A10.
  - a) Isogenizar dos inserciones de transposones P en el gen homólogo de SLC30A10 con la cepa control *white*.
  - b) Utilizar RT-PCR para validar las mutantes.
  - c) Análisis elemental de las mutantes.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 Cepas de *D. melanogaster*

Para este estudio se utilizaron moscas adultas machos y hembras de 3 a 4 días de edad de las cepas *white*<sup>+</sup> que provino de una cepa silvestre de Tannes, Italia (Sadraie y Missirlis 2011). Las moscas se mantuvieron en incubadora a 25°C en medio de cultivo consistente de 10% levadura, 12.5% piloncillo, 0.3% grenetina, 1.6% agar, 1% ácido propanoico y 74.6% agua (dieta normal (DN). Para realizar los geles 2D sólo se usó esta misma cepa de moscas. Para evaluar la actividad de la SOD2 se usó la cepa *da*<sup>G32</sup>-*Gal4* en los cuales se expresaron los transgenes UAS para la sobreexpresión o interferencia de los genes de SOD1 y SOD2 (Kirby et al., 2002, Missirlis et al., 2003). Para el análisis del homólogo de SLC30A10 en *Drosophila melanogaster* se utilizaron las cepas *w*<sup>1118</sup>; *P* {*w*<sup>+mGT</sup>} *ZnT10* y *y*<sup>1</sup>, *w*<sup>67c23</sup>; *P* {*w*<sup>+mC</sup>, *y*<sup>+mDint2</sup>} *ZnT10*, ambas obtenidas del *Bloomington Drosophila Stock Center*.

### 5.2 Elaboración de dieta química deficiente de Mn y Fe

Se realizó la dieta química definida reportada por Blatch y Harrison (2005), la cual está basada en los estudios de Sang (1956) con algunas modificaciones. La dieta consiste de componentes proteicos (caseína 53.19 g/L Bacto™ Casamino Acids), lipídicos (colesterol 0.29 g/L Sigma-Aldrich y colina 0.58 g/L Sigma-Aldrich), azúcares (sacarosa 9.67 g/L Sigma-Aldrich), ácidos nucleicos (RNA de levadura 3.86 g/L Sigma-Aldrich), vitaminas (tiamina 0.011 g/L Sigma-Aldrich, Ca-pantoteno 0.019 g/L Sigma-Aldrich, piridoxina 0.005 g/L Sigma-Aldrich, biotina 0.0006 g/L, Sigma-Aldrich, ácido ascórbico 0.5377 g/L Sigma-Aldrich, ácido fólico 0.002 g/L Sigma-Aldrich, riboflavina 0.0097 g/L Sigma-Aldrich y niacina 0.046 g/L Sigma-Aldrich) y sales inorgánicas (NaHCO<sub>3</sub> 0.964 g/L Sigma-Aldrich, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.686 g/L Sigma-Aldrich, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.605 g/L Sigma-Aldrich, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.827 g/L Sigma-Aldrich, CaCl<sub>2</sub> 0.193 g/L Sigma-Aldrich, MgSO<sub>4</sub> 0.599 g/L Sigma-Aldrich, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.1239 g/L Sigma-Aldrich, MnSO<sub>4</sub> 0.0125 g/L Sigma-Aldrich, CuSO<sub>4</sub> 0.0048 g/L

Sigma-Aldrich, Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 0.193 g/L Sigma-Aldrich y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) Sigma-Aldrich, refiriéndonos a esta dieta como dieta química (DQ). Para generar una dieta química deficiente de Mn o Fe, no se le añadió la concentración de la sal metálica correspondiente y se sustituyó el volumen por agua milliQ. Para conocer la concentración de metales en esta dieta química se llevó a cabo un análisis elemental en la mosca completa por medio de espectrometría de absorción atómica

### **5.3 Concentración de metales por espectrometría de absorción atómica**

En medios de cultivo DQ, DQ-Mn, DQ-Fe y DQ +20%Fe, se colocaron 50 moscas adultas de ambos sexos para obtener una progenie abundante. Todas las moscas de la progenie se recolectaron de 4 a 5 días de edad en hielo seco y se liofilizaron durante 7.5 h. Se pesaron 200 mg de mosca (masa seca) por cada medio de cultivo, se digirieron en 9 mL de ácido nítrico ultra puro concentrado (TraceSELECT® Fluka Analytical) y se incubaron a 60°C por 36 h (Sadraie y Missirlis 2011). Las muestras se vaciaron en un vaso de precipitado y se calentaron a 90° hasta casi evaporar el líquido dejando aproximadamente 0.5 mL. Enseguida se agregó poco a poco ácido nítrico al 1% recuperando todos los sólidos adheridos a las paredes del vaso y cada muestra se aforó a 25 ml. Poco después las muestras se filtraron a través de filtros Whatman No. 42, el filtrado se recuperó en tubos de 50 ml con tapón de rosca y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Para poder medir la concentración de los metales Zn, Mn, Fe y Cu se realizaron curvas de calibración para cada metal a partir de soluciones estándares con concentraciones conocidas de 1000 ppm (Sigma-Aldrich) usando como vehículo ácido nítrico al 1%. Para cada metal se usaron cuatro concentraciones conocidas. Al graficar las diferentes absorbancias de las soluciones estándar del metal en cuestión contra la concentración, se obtuvo una curva de calibración lineal y la concentración del analito en la muestra dada se obtuvo interpolando su absorbancia en la curva. Una vez finalizada esta fase, se procedió a medir la concentración total de los metales por medio de espectrometría de absorción atómica (Avanta M System 300, GF 3000 S/N 10288).

## **5.4 Evaluación del desarrollo**

Para evaluar el efecto de la dieta deficiente de Mn y Fe, se colocaron en viales de DN, DQ, DQ-Mn y DQ-Fe diez hembras y tres machos por un periodo de cuatro días. Posteriormente los viales se vaciaron y se tomó el tiempo de aparición de la primera pupa, metamorfosis, primer adulto y al cuarto día se contó la población total de moscas. La evaluación del desarrollo se realizó en todas las DQ, a las que se les añadió levadura y/o piloncillo, así como en presencia y en ausencia de Mn o Fe.

## **5.5 Ferritina como biomarcador de la deficiencia de Fe**

Para evaluar la ferritina como biomarcador de la deficiencia de hierro, se utilizaron 30 hembras de 3 a 4 días de edad crecidas en DN y en DQ. Se homogenizaron en hielo con 120  $\mu$ L de búfer de lisis (NaCL 137 mM, TRIS-HCL 20 mM, Triton X-100 1%, pH 7.5) y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 12 min a 4°C. Se transfirió 70  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregó 35  $\mu$ L de búfer de carga (glicerol 1%, TRIS-HCL 0.5 M, azul de bromofenol 0.01%). Posteriormente, se cargó 15  $\mu$ L en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (10% separador y 5% concentrador) y se corrió a 80 V. Una vez finalizada esta fase se lavó el gel con agua milliQ y se colocó en agitación en búfer de incubación (Ferrocitrato de amonio 1% Sigma-Aldrich y HCL 1% J.T. Barker) durante 12 h a cubierto de la luz. Finalmente, se lavó el gel de 2 a 3 veces con agua milliQ en agitación hasta eliminar el ferrocitrato y la imagen obtenida se registró en un fotodocumentador ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare Life Sciences). Como control de carga se cargó 10  $\mu$ L de la proteína en un gel de poliacrilamida en la misma condición y se tiñó con azul de Coomassie.

## **5.6 Determinación de la actividad de la SOD**

Para determinar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa 2 como probable biomarcador de la deficiencia de Mn, se recolectaron 20 hembras de 3 a 4 días de edad de los siguientes genotipos:



1. *daG<sup>32</sup>Gal4* (control)
2. *daG<sup>32</sup>Gal4/UAS-SOD1* (sobrexpresión de SOD1)
3. *daG<sup>32</sup>Gal4/UAS-SOD2* (sobrexpresión de SOD2)
4. *daG<sup>32</sup>Gal4/UAS-SOD1RNAi*
5. *daG<sup>32</sup>Gal4/UAS-SOD2RNAi*

Posteriormente estas moscas se homogenizaron con 100  $\mu$ L de búfer de extracción (KPO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 0.1 mM, Triton X-100 1% pH 7.8) en hielo según Martin et al., (2009). Para la ruptura mitocondrial las muestras se sonicaron por 20 s y se incubaron a 4°C durante 20 min. Los extractos mitocondriales se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 15 min y 90  $\mu$ L del sobrenadante se transfirieron a un tubo Eppendorf de 0.6 mL. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 5 min y se transfirieron 70  $\mu$ L a un nuevo tubo Eppendorf de 0.5 mL al que se le añadió la misma cantidad de búfer de muestra (Tris-HCL 0.5 M, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.01%) y se evaluó la actividad de SOD1 y SOD2 usando un gel nativo (condiciones no desnaturalizantes) de poliacrilamida (separador 10% y concentrador 5%) (Beauchamp y Fridovich, 1971). La actividad enzimática se detectó después de la electroforesis, se incubó el gel en 30 mL de búfer de incubación I (Nitroblue Tetrazolium 2.5 mM Sigma-Aldrich y K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM Sigma-Aldrich) durante 20 min en oscuridad y se lavó 2 veces con 10 mL de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM. A continuación el gel se incubó una vez más en 30 mL de búfer de incubación II (TEMED 0.3% Bio-Rad, rivo flavina 0.035 mM Sigma-Aldrich, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM) y se lavó con 10 mL de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (Martin et al., 2009). Para el completo desarrollo del color de la reacción se expuso el gel a la luz durante 15 min y la actividad enzimática se observó cómo bandas acromáticas en el fondo azul intenso del gel.

## **5.7 Geles 2D**

### **5.7.1 Preparación de la muestra**

Se disectaron 150 intestinos de hembras adultas de 3-4 días de edad con PBS 1X provenientes de los medios de cultivos: DN, DQ, DQ-Mn y DQ +20% Fe de las cepas

*white* + y se colocaron en 100  $\mu$ L de búfer de muestra (urea 7M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, IPG búfer 2% (GE Healthcare), agua milliQ) y 60  $\mu$ L de inhibidor de proteasas (cOmplete Mini-EDTA-free, Roche Life Science) conservándolo a -80°C hasta su uso. Las muestras se homogenizaron en nitrógeno líquido y se les añadió 500  $\mu$ L de búfer de lisis (TRIS-HCL 50 mM, NaCL 120 Mm, IGEPAL 0.5 %, agua milliQ, pH 8.0) y 75  $\mu$ L más de inhibidor de proteasas. Las muestras se agitaron a 4°C durante 24 h a cubierto de la luz para favorecer la liberación de las proteínas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 1,200 rpm durante 7 min y se le agregó 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético (Merck) para favorecer la precipitación de las proteínas. Se centrifugó una vez más a 14,000 rpm por 15 min y se removió el sobrenadante. Se lavó 3 veces la pastilla con acetona fría (Merck), se secó a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm por 7 min con objetivo de eliminar la mayor cantidad de sales presente en la muestra. A la pastilla final se le agregó 50  $\mu$ L de inhibidor de proteasas, 100  $\mu$ L de búfer de hidratación (urea 7 M, tiourea 2M, CHAPS 2%, 0.002 de azul de bromofenol, IPG búfer 2%, agua milliQ) y se volvió a homogenizar. La concentración de proteínas fue medida utilizando el Kit 2D-quant (GE-HealthCare Life Sciences) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Las proteínas se almacenaron a -20°C para su uso al día siguiente.

### **5.7.2 Isoelectroenfoque (1D)**

Para separar las proteínas por su punto isoeléctrico se realizó isoelectroenfoque para lo cual se utilizaron tiras IPG (pH de 3-10 NL, 7 cm de longitud, GE Healthcare). Las proteínas se disolvieron en un volumen final de 150  $\mu$ L con búfer de GE (pH de 3-10 NL) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agitó suavemente. En el volumen de 150  $\mu$ L antes mencionado se colocó la tira a la que previamente se le desprendió el plástico que lo recubre y se le añadió 1 mL de aceite mineral para favorecer la hidratación la cual se realizó durante 16 h cubriéndola de la luz a temperatura ambiente. Tras la rehidratación se realizó el isoelectroenfoque en un equipo Ettan IPGphor (GE Healthcare) a 20°C, 50  $\mu$ A por tira en cuatro pasos:

- 300 V durante 30 min
- 1000 V durante 30 min
- 5000 durante 1 h 30 min
- 5000 durante 30 min

Finalizado el isoelectroenfoco se guardaron las tiras en un tubo de 15 mL con tapón de rosca cubierto con papel aluminio a -80°C hasta su posterior uso.

### **5.7.3 Electroforesis (2D)**

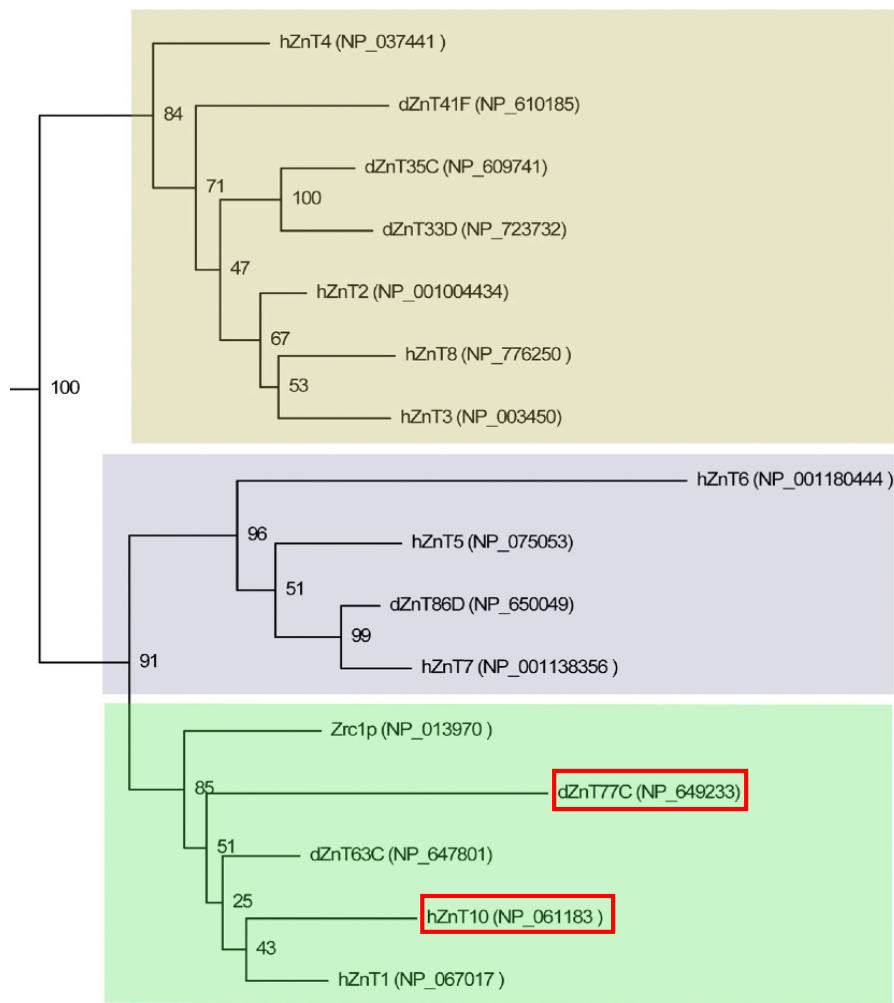
Para la segunda dimensión de separación de las proteínas se elaboraron geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 20%, Acrilamida, APS 10%, TEMED, agua milliQ). Las tiras con las proteínas que anteriormente se separaron por su pI se colocaron en búfer de equilibrio I (urea 6 M, Tris-HCL 75 Mm pH 8.8, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, agua milliQ y DTT 1% dejándola en agitación durante 15 min y posteriormente con búfer de equilibrio II (urea 6 M, Tris-HCL 75 Mm pH 8.8, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, agua milliQ y Iodoactemida 2.5%) cubriéndolo de la luz. A continuación las tiras se colocaron con las proteínas en el gel para separarlas por su peso molecular (PM). El gel se corrió a 100 V hasta pasar el gel concentrador y después se disminuyó el voltaje a 80.

### **5.7.4 Tinción**

El gel de electroforesis 2D se puso en solución de fijación (etanol 30% y ácido acético 10%) durante 12 h. Retirada la solución de fijación se le añadió al gel la solución de azul de Coomassie (metanol 50%, ácido acético 10%,) por 24 h. Al día siguiente se decantó la solución teñidora y se lavó las veces necesarias con agua milliQ hasta contrastar completamente el gel para observar la mayor cantidad de spots. Finalizada estas fases se procedió al escaneo del gel en un fotodocumentador ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

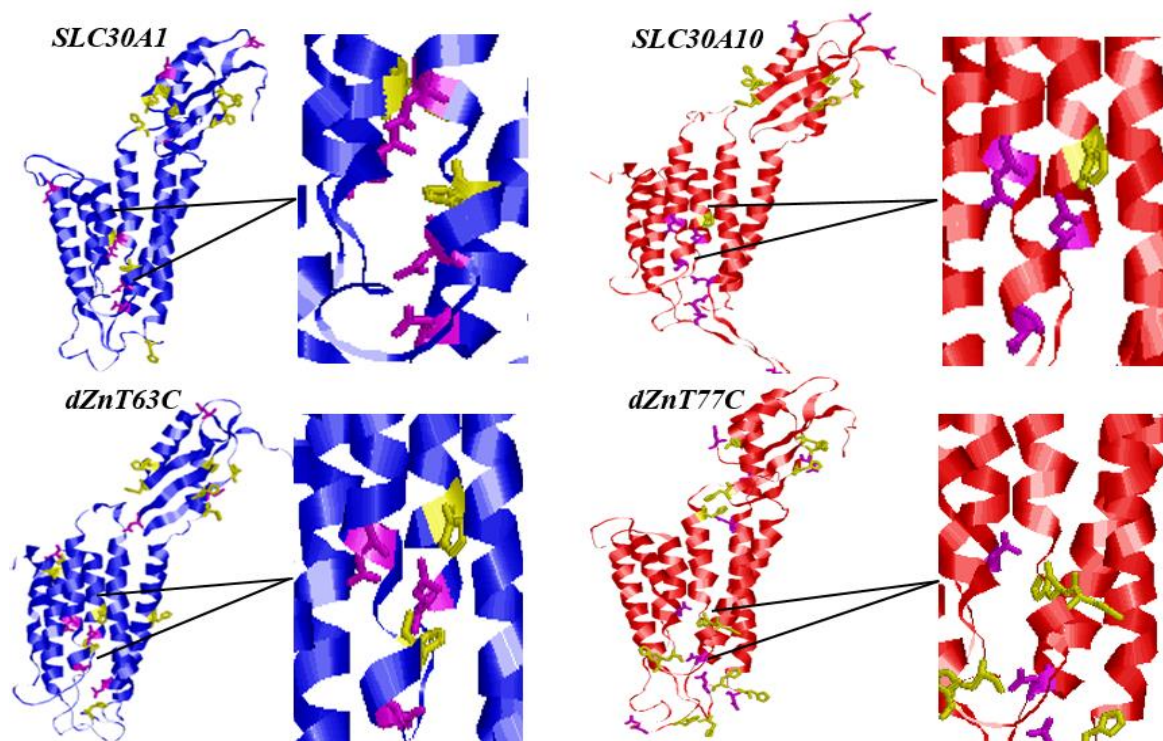
## 5.8 Búsqueda del gen SLC30A10 homólogo en *Drosophila melanogaster*

Para hallar el probable gen homólogo de SLC30A10 en *D. melanogaster* se realizó un Blast y se obtuvieron seis secuencias de posibles genes homólogos en la mosca. Estas secuencias se analizaron con el programa Clustal W y mediante datos reportados por Quadri et al., 2012 quienes indicaron la diferencia de SLC30A10 con respecto a lo demás miembros de los transportadores de zinc.



**Figura 6. Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas ZnT entre *Drosophila*, mamíferos y levadura (Lye et al., 2012). Se encierra en recuadro rojo dZnT63C cual presenta más homología a ZnT1 y dZnT77C a ZnT10 en *Drosophila melanogaster*.**

Para realizar un análisis *in silico* de los genes SLC30A1 y SLC30A10 con sus respectivos homólogos en *D. melanogaster* nos basamos en el reporte de Lye et al., 2012 (Fig. 6), quienes observaron que el ZnT63C de *D. melanogaster* es el más parecido a SLC30A1 de humano y ZnT77C a SLC30A10. El análisis *in silico* se realizó con los programas Phyre2 disponible en <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> y RasMol versión 2.7.5.2 disponible en <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/> y se observó que SLC30A1 y su posible homólogo ZnT77C en *D. melanogaster* conservan una estructura muy similar así como las dos histidinas y ácido aspártico en el TMD II que funcionan como sitio de coordinación del zinc que están ausentes en SLC30A10 de humano y ZnT77C de *D. melanogaster* (Fig. 7).



**Figura 7. Estructura tridimensional de SLC30A1 y SLC30A10 con su respectivo homólogo en *Drosophila melanogaster*.** En color amarillo se indican las histidinas y en magenta los ácidos aspárticos. En SLC30A1 y dZnT63C se conservan las dos H y D como sitio de coordinación del Zn que por su parte en SLC30A10 y dZnT77C solo se conserva una H.

Una vez obtenido en *Drosophila melanogaster* un gen como posible homólogo del SLC30A10 se encontraron en la base de datos (www.flybase.org) dos stocks con transposones P1( $w^{1118}; P \{w^{+mGT}\} ZnT10$ ) P2 ( $y^1, w^{67c23}; P \{w^{+mC}, y^{+mDint2}\} ZnT10$ ) insertados en el gen ZnT77C y se isogenizaron con una cepa control *white isogénica*. Isogenizar es hacer cruces de las moscas que en ese caso se hicieron por siete generaciones siguiendo el elemento P que se podía distinguir con la presencia del color rojo en el ojo de la mosca.

Para evaluar las mutantes de ZnT77C en *D. melanogaster* se recolectaron 30 hembras de 3 a 4 días de edad de las cepas  $w; P \{w^{+mGT}\} ZnT10, y^1, w; P \{w^{+mC}, y^{+mDint2}\} ZnT10$ . Se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5, se le añadió 500  $\mu$ L de Reagent TRIzol LS (ambion by life technologies) y se homogenizaron en hielo. Se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó 200  $\mu$ L de cloroformo (Sigma-Aldrich), se agitó vigorosamente en el vortex y se centrifugaron a 12,000 g durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo ependor de 1.5 mL y se le añadió 500  $\mu$ L de isopropanol (Sigma-Aldrich). Se incubaron las muestras a -80°C durante 24 horas, se lavaron dos veces con etanol (J.T. Barker) al 75% centrifugando a 12,000 g por 5 min a 4°C y finalmente se disolvió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua DEPC. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro (NanoDrop® 1000).

### **5.10 Tratamiento del RNA con DNAsa**

Para eliminar el DNA de las muestras de RNA extraído de las mutantes de ZnT77C de *D. melanogaster* y evitar falsos positivos en las reacciones de RT-PCR, se utilizó DNase I Amplification Grade (Invitrogen Cat no. 18068-015). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, se le agregó 2  $\mu$ L de EDTA 25 mM para inactivar la reacción y se calentó a 60°C durante 10 min. Finalizado el procedimiento se guardó la muestra a -80°C hasta su uso.

### 5.11 Formación del cDNA y reacción de RT-PCR semicuantitativa

Para sintetizar la primera hebra (cDNA) a partir del RNA tratado con DNAasa, se usó la SuperScrip III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat no. 18080-093) con el oligo dT (Invitrogen Cat no. 18418-020). El cDNA resultante se almacenó en agua inyectable a -80°C para su uso en las reacciones de PCR. La tabla 1 muestra los primers (Sigma-Aldrich) utilizados en este trabajo.

GEN	SECUENCIA	SENTIDO	LONGITUD
RP49	TGGTTGGAGTTTTGTGCCTG	forward	20
RP49	CCCATTGAACTGCTACGTCC	reverse	21
ZnT77C (RA)	CAAAGCAATTTACGCTGCCG	forward	20
ZnT77C (RA/RB)	TGTACAGCGGTATCGGCTTG	reverse	20
ZnT77C (RB)	AAAATTAGCGCGTGTGCCTC	forward	20

**Tabla 1.** Primers que se utilizaron en la reacción de RT-PCR (ver Fig. 18).

Se usaron 50 ng de cDNA para la PCR en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Select BioProducts con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98°C por 5 min seguido por 40 ciclos de desnaturalización de 94°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg y una elongación final a 72°C por 5 min. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1%.

### 5.12 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación del desarrollo de *Drosophila melanogaster* se analizaron mediante análisis de varianza de dos vía (ANOVA) seguido por una prueba de comparación Bonferroni's múltiple. Para el análisis elemental de las DQ correspondientes se realizó ANOVA de una vía seguido con una prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism para Windows.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Dieta química deficiente de Mn y Fe

Para iniciar a investigar el sistema de transporte del Mn, se realizó una dieta química (DQ) definida deficiente de este metal para alimentar a *D. melanogaster* reportada por Blatch y Harrison (2005) que se basa en la adición de sales metálicas. Se realizó un análisis elemental en esta DQ por medio de espectrometría de absorción atómica y la concentración de los metales Zn, Mn, Fe y Cu se obtuvieron en mg metal/g de masa seca (Tabla 2). Se observó una deficiencia de Mn en la DQ-Mn y disminución de la concentración del Fe en la DQ-Fe validando estas DQ.

DIETA	N	Fe (mg/g)	Zn (mg/g)	Cu (mg/g)	Mn (mg/g)
DQ	1	0.187	0.111	0.029	0.054
DQ-Mn	1	0.199	0.087	0.027	<b>0.003</b>
DQ-Fe	1	<b>0.085</b>	0.086	0.027	0.046

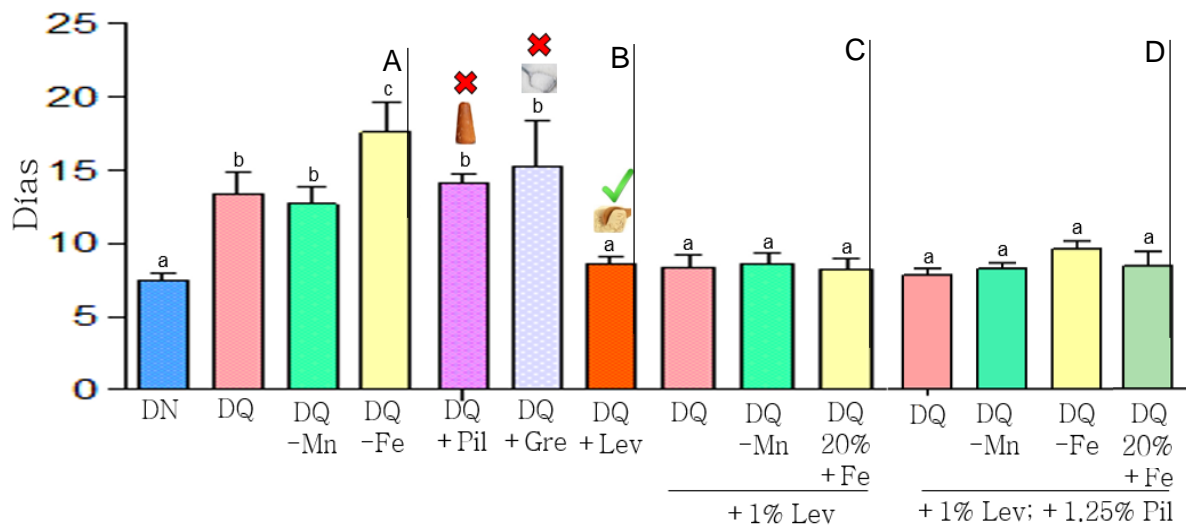
**Tabla 2. Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con concentraciones disminuidas de metales.** La baja concentración de Fe y Mn medida en la dieta química deficiente de dicho metal la hace (0.085 mg Fe /g; 0.003 mg Mn /g). Con respecto al Cu este mantiene casi las mismas concentraciones en las tres dietas y con el Zn se observó un ligero aumento en la dieta química control.

Verificada la deficiencia de Mn y Fe en la DQ elaborada se evaluó su efecto en el desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster* y se midió el tiempo de aparición de la primera pupa (Fig. 8A). En este análisis, se observó retardo significativo del desarrollo en la DQ y DQ-Mn. Sin embargo, el tiempo de retardo del desarrollo y menor población de moscas con respecto a la DN fue más evidente en la DQ-Fe. No obstante, las moscas cultivadas en el medio deficiente de Fe no sobrevivieron en una segunda o tercera generación, mostrando que el Fe es un elemento indispensable para su viabilidad, mantenimiento y desarrollo.

Con estos datos, se concluyó que la DQ en comparación con la DN (12.5% de piloncillo, 0.28% de grenetina y 10% de levadura) carecía de algún nutriente o compuesto necesario para el desarrollo de *Drosophila melanogaster* y por lo tanto



se decidió evaluar los elementos del medio de cultivo estándar agregando a la DQ sólo el 10% de estos componentes por separado. Al evaluar el desarrollo se observó que la presencia de 1% de levadura favoreció la aparición de la primera pupa (Fig. 8B), la metamorfosis y la aparición del primer adulto en comparación a la DN. En lo que se refiere a la población total de moscas, con la presencia de 1.25% de piloncillo se observó un mayor incremento (Fig. 8B).



**Figura 8. Tiempo de aparición de la primera pupa.** A. Se midió el tiempo de aparición de la primera pupa usando la DQ reportada por Blatch y Harrison (2005). Se observó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) de las 3 DQ (con o sin metal) con respecto a la dieta normal (DN). B. Se evaluó el efecto del 1.25% piloncillo (Pil), 0.028% grenetina (Gre) y 1% levadura (Lev) (que son componentes de un medio de cultivo estándar para mantener a *Drosophila melanogaster*) y se observó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con el Pil y Gre excepto con la Lev. C. Se midió la aparición de la primera pupa en las DQ (con o sin metal) utilizando 1% Lev y 80% deficiente de Fe. No se observó diferencia significativa en las DQ en comparación con la DN. D. Representa la DQ la cual se le añadió 1% Lev y 1.25% Pil así como a una DQ que se agregó de más 20% de Fe. En todas estas últimas DQ no se observó diferencia significativa. Las letras a,b,c,d indican diferencia significativa usando "Bonferroni post-tests".

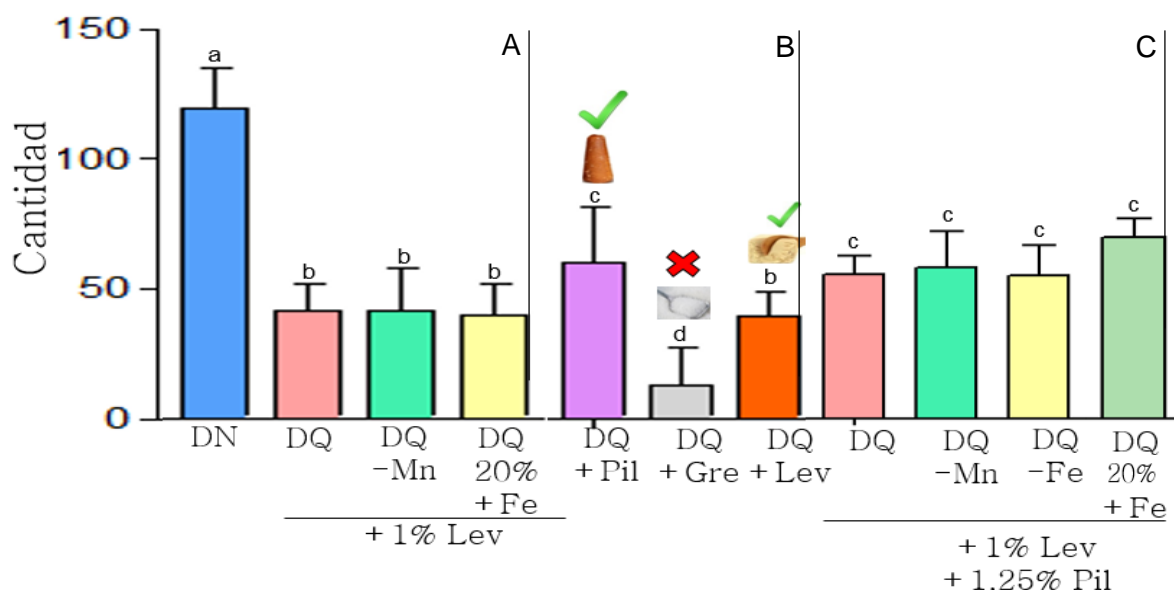
Posteriormente para la elaboración de las DQ se utilizó 1% de levadura y la DQ-Fe fue deficiente un 80%, ya que como se mencionó anteriormente, el utilizar una DQ totalmente carente de Fe desencadena efectos severos en el desarrollo de la mosca. Al evaluar el desarrollo de las moscas crecidas en esta nueva DQ modificada no se observó diferencia significativa en comparación con la DN (Fig. 8C) pero si en la población total (Fig. 9A). Se midió también por espectrometría de absorción atómica la concentración de Zn, Mn, Fe y Cu en la mosca completa (mg metal/g de masa seca, tabla 3) y se concluyó que dicha dieta puede ser utilizada para generar una deficiencia de Mn o Fe sin perturbar el desarrollo de la *D. melanogaster*. Por lo que para los experimentos posteriores se utilizó una DQ a la que se le añadió 1% de Lev y 20% Fe.

DIETA	N	Fe(mg/g)	Zn(mg/g)	Cu(mg/g)	Mn(mg/g)
DQ	3	0.288 ±0.015	0.078 ±0.003	0.025 ±0.002	0.038 ±0.000
DQ-Mn	3	0.317 ±0.024	0.083 ±0.001	0.025 ±0.001	0.008 ±0.000***
DQ+20%Fe	3	0.170± 0.012***	0.086 ±0.006	0.039 ±0.014*	0.032 ±0.000

**Tabla 3. Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con 1% de levadura y concentraciones disminuidas de metales.** El agregar 1% de levadura a la dieta química no interfiere la deficiencia de Fe y Mn. Se observó mayor contenido del Cu en la DQ y la DQ+1%Lev, 20%Fe. ANOVA de una vía. \*Significancia estadística \*(P<0.5); \*\*\*(p<0.001); prueba de Tukey.

Más tarde, para mejorar el rendimiento de producción de moscas, se elaboró un nuevo medio de cultivo al cual se le agregó 1% de levadura y 1.25% de piloncillo. A las moscas crecidas en esta DQ, se les determinó la concentración de los metales (tabla 4), se les evaluó el desarrollo (Fig. 8D) y se contó la población total de adultos (Fig. 9C). No se observó diferencia significativa en el desarrollo con respecto a la DQ+1%Lev ni con la población de adultos en comparación con la DN. No obstante, la presencia de los metales en esta nueva dieta artificial modificada mostraron que aún se conserva la deficiencia de Fe y Mn, concluyendo que el agregar 1% de levadura y 1.25% de piloncillo no afecta significativamente la incorporación de estos metales en la biomasa. Por lo que para los experimentos posteriores se utilizó una DQ a la que le añadió 1% de levadura (y 20% de Fe para causar una deficiencia de Fe). Como conclusión en este objetivo se logró generar un medio de cultivo para

*Drosophila melanogaster* deficiente de Mn con el cual se estudiaran funciones biológicas cuando existe deficiencias de este metal.



**Figura 9. Población total de adultos al cuarto día después de emerger la primera mosca.** A. Se contó la cantidad de moscas en la DQ (Blatch y Harrison, 2005). Se observó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) de las 3 DQ (con o sin metal) con respecto a la DN. B. Se evaluó el efecto del 1.25% piloncillo (Pil), 0.028% grenetina (Gre) y 1% levadura (Lev) y se contaron las moscas. Se observó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con los tres componentes. C. Se contó también en las DQ (con o sin metal) utilizando 1% Lev y 80% deficiente de Fe y se obtuvo diferencia significativa en las DQ en comparación con la DN. Las letras a,b,c,d indican diferencia significativa usando "Bonferroni posttests" y los pares de letras b,c y c,d que no hubo diferencia significativa.

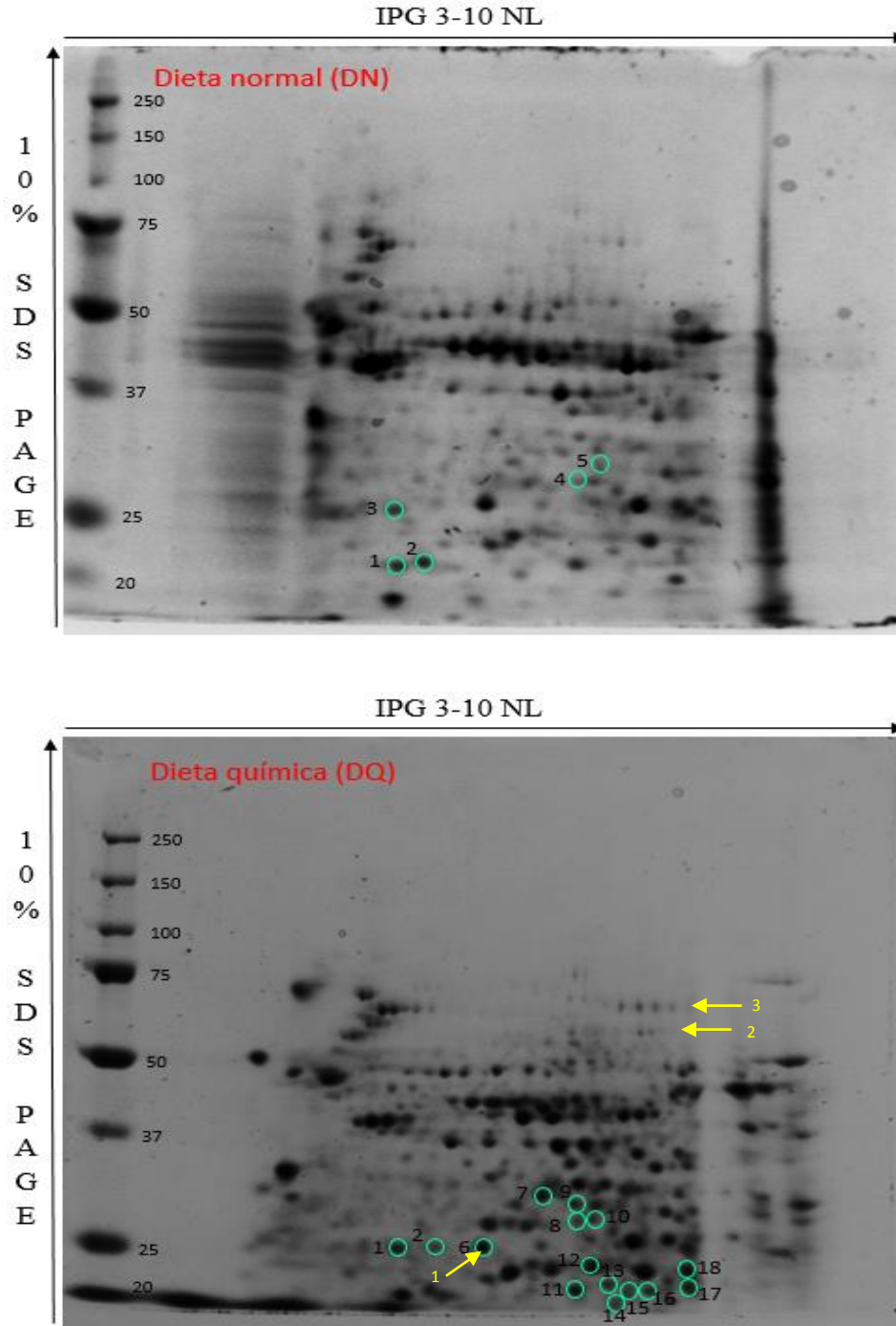
DIETA	N	Fe(mg/g)	Zn(mg/g)	Cu(mg/g)	Mn(mg/g)
DQ	3	0.216 ±0.010	0.083 ±0.001	0.025 ±0.004	0.026 ±0.000
DQ-Mn	3	0.167 ±0.028	0.093 ±0.007	0.029 ±0.005	0.007 ±0.000***
DQ-Fe	3	0.071 ± 0.006***	0.087 ±0.014	0.028 ±0.008	0.040 ±0.000

**Tabla 4. Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas cultivadas en tres dietas artificiales con 1% de levadura, 1.25% de piloncillo y concentraciones disminuidas de metales.** La concentración de Fe como de Mn medida en la dieta deficiente de dicho metal valida la comparación con el dieta. La concentración de Zn muy similar en la DQ con o sin metal. ANOVA de una vía. \*\*\*Significancia estadística ( $p < 0.001$ ) prueba de Tukey.

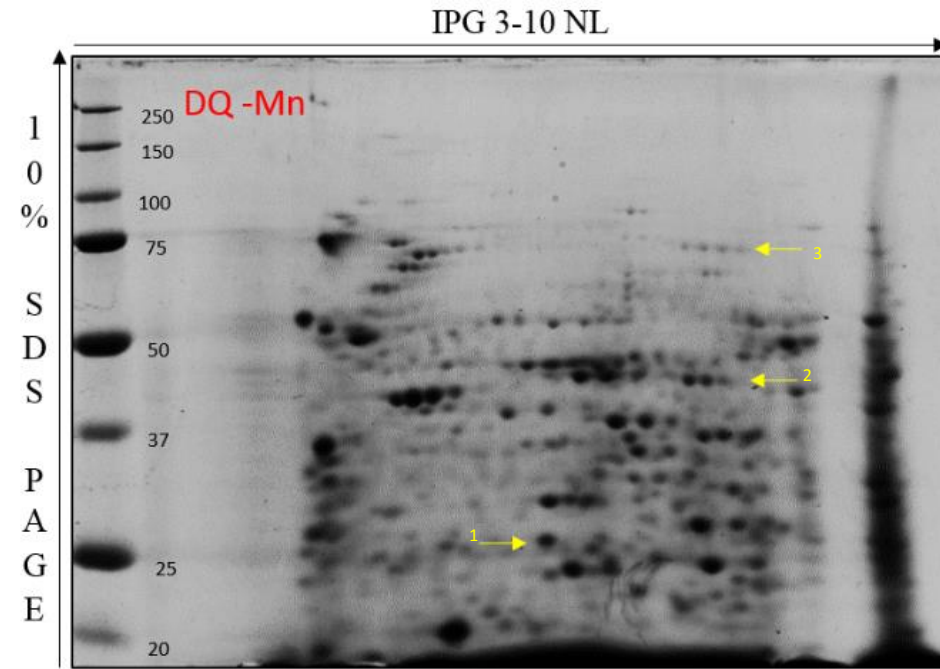
## 6.2 Expresión proteica en geles 2D

La electroforesis en 2D es un método que permite analizar de manera amplia las proteínas de los organismos y comparar los cambios que ocurran en condiciones contrastantes. Este método se eligió para analizar los cambios que pudieran ocurrir por la deficiencia de metales en moscas *Drosophila melanogaster* adultas. Para este fin se realizaron geles de dos dimensiones con las proteínas de 150 intestinos de hembras cultivadas en DN y DQ a la que se le adicionó 1% de levadura y 20% de Fe (Fig. 10). Las proteínas se separaron primeramente de acuerdo a su pI con IPG Bufer (pH 3-10) y posteriormente por su peso molecular (SDS 10%). En el análisis de los spots de estos dos geles se observaron algunos cambios. Los círculos 1 y 2 en la DQ no descendieron al mismo PM que en la DN. Los puntos 3, 4 y 5 de la DN no se observaron en la DQ y los puntos del 6 al 17 presentes en la DQ estuvieron ausentes en la DN.

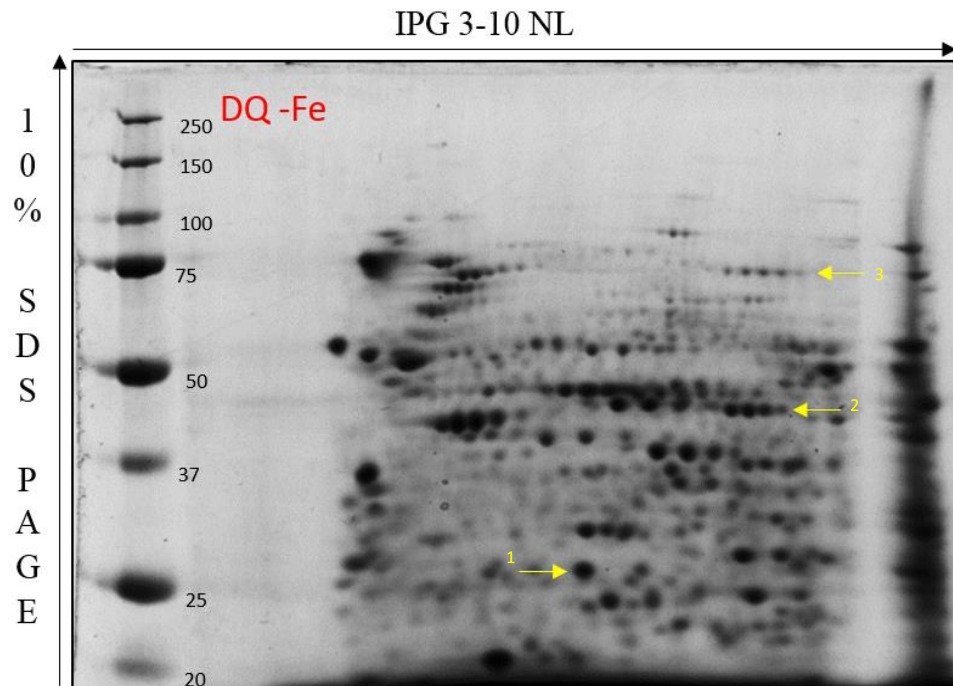
Las proteínas totales de los intestinos obtenidos en DQ-Fe y DQ-Mn fueron similares excepto que en la DQ-Fe se logró apreciar dos puntos más, indicados por la flecha amarilla 1 y 2 que están ausentes en la DQ-Mn y también mayor intensidad del punto indicado por la flecha uno (Fig. 11 y 12). Por otra parte, en un experimento preliminar se observó una proteína de aproximadamente 25 kDa que al parecer disminuyó de pI. Este resultado deberá comprobarse dado que Karlsson et al., (2004) reportaron que ferritina, proteína almacenadora del hierro, presenta estas características fisicoquímicas y cambios en esta molécula serían relevantes para nuestro estudio (Fig. 15).



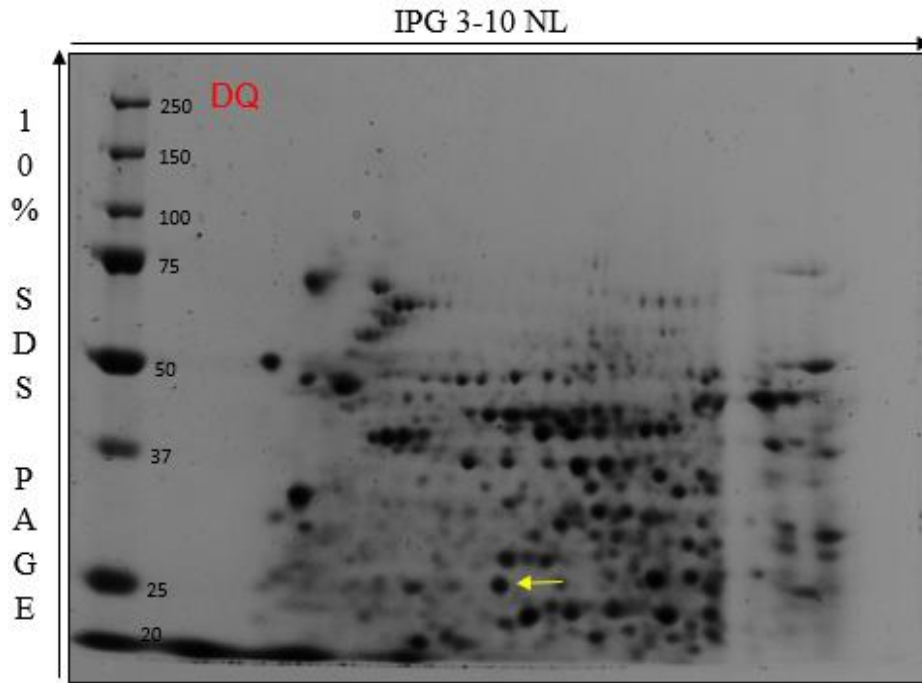
**Figura 10. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta normal (DN) y dieta química (DQ).** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. Los círculos que encierran spots mostraron cambios en ambos geles. Los círculos 1 y 2 en la DQ no descendieron al mismo PM que en la DN. Los puntos 3, 4 y 5 de la DN no se observaron en la DQ y los puntos del 6 al 18 presentes en la DQ estuvieron ausentes en la DN. Las flechas amarillas indican cambios con la DQ-Mn y la DQ-Fe.



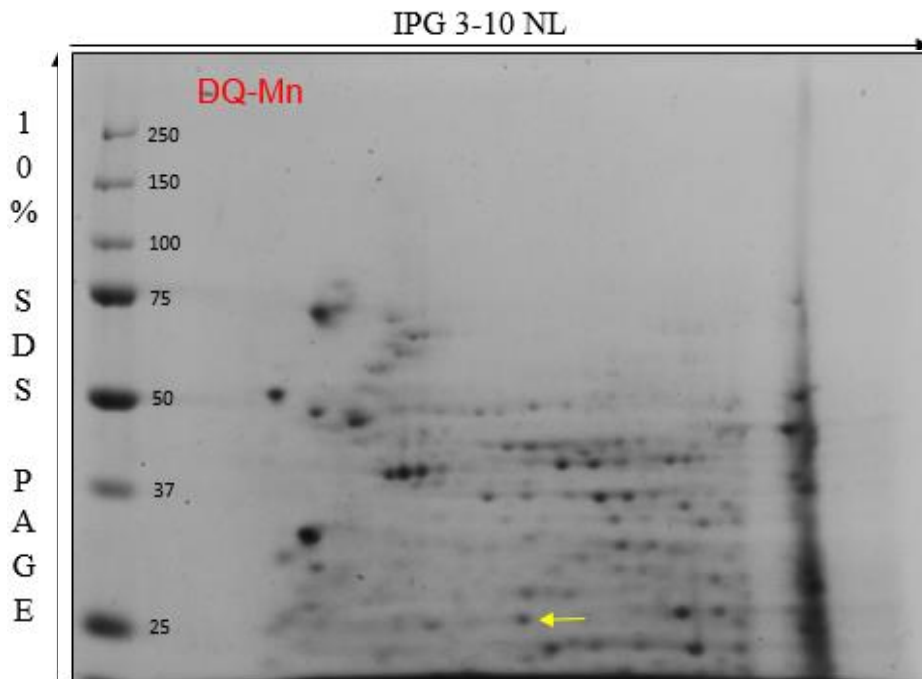
**Figura 11. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de manganeso.** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. La flechas amarilla 1 indica una intensidad menor del punto en comparación con la DQ.



**Figura 12. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de hierro.** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. Las flechas amarillas indican cambios proteicos con respecto a la DQ-Mn y DQ-Fe.

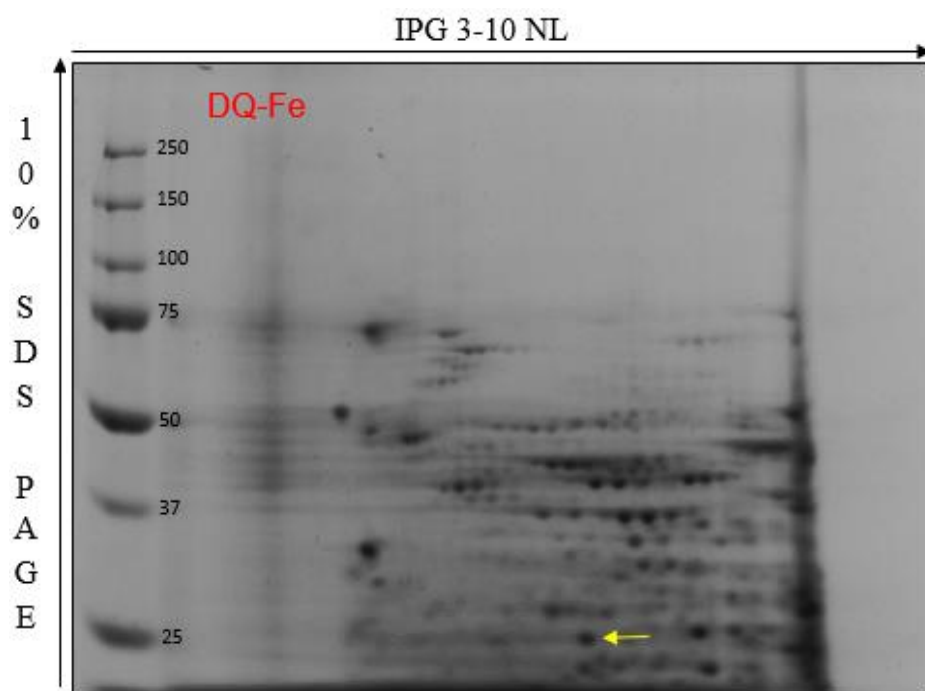


**Figura 13. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta química (DQ).** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. La flecha amarilla indica probablemente la presencia de la ferritina (Karlsson et al., 2004) que al parecer cambió de pI en la DQ-Fe



**Figura 14. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de manganeso.** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. La flecha amarilla indica el spot situado en el mismo pI y PM en la DQ pero que en la DQ-Fe se observó un movimiento del pI.





**Figura 15. Proteínas del intestino de *D. melanogaster* hembras adultas crecidas en la dieta química deficiente de hierro.** Las proteínas de 150 intestinos se separaron por electroforesis en dos dimensiones (pH 3-10) y se tiñeron con azul de Coomassie. La flecha amarilla indica el spot situado en el mismo pI y pM en la DQ y DQ-Mn pero que en esta DQ-Fe se observó un movimiento del pI.

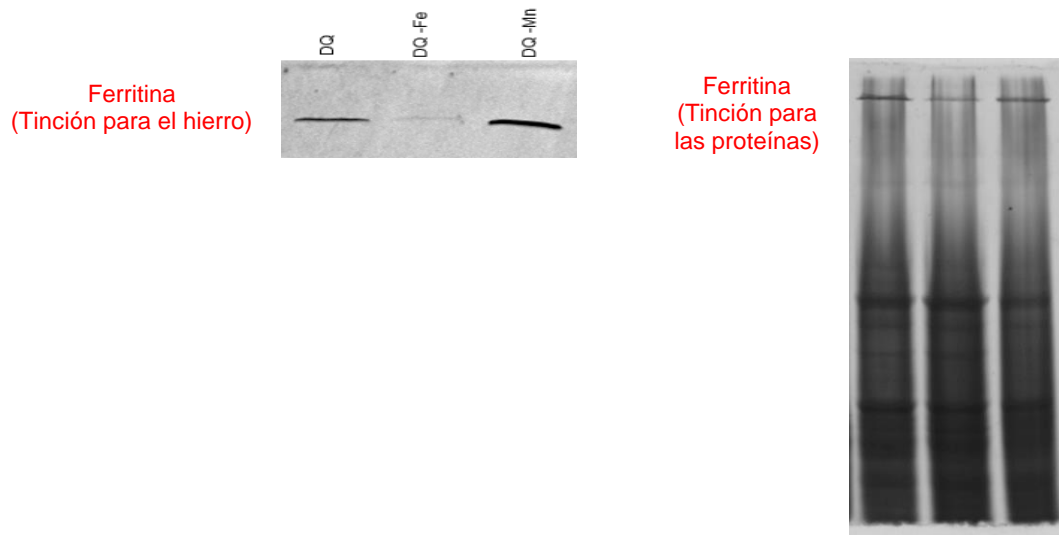
### 6.3 Superóxido dismutasa 2 como biomarcador de la deficiencia de manganeso

Entre los biomarcadores de la deficiencia del hierro se consideran los niveles bajos de hemoglobina, del hematocrito, de la transferrina y de la ferritina (Polin et al., 2013; Toxqui y Vaquero 2015). La ferritina es una proteína que forma una estructura compuesta por 24 subunidades de cadenas polipeptídicas (L ligera o de menor masa y H pesada, con mayor masa) formando una corteza esférica que recubre una cavidad hidrofílica con diámetro interno y externo de 8 y 12 nm respectivamente. En su cavidad interna se pueden almacenar hasta 4500 átomos de hierro aunque el valor normal suele ser de 2000 átomos (Finazzi y Arosio 2014; Didi y Marles-Wright 2015). En este trabajo, se analizó la presencia de la ferritina en las DQ y se observó efectivamente la disminución de la presencia de la ferritina en la DQ-Fe (Fig. 16). También se realizó este experimento en las dietas químicas con 1% de Levadura y

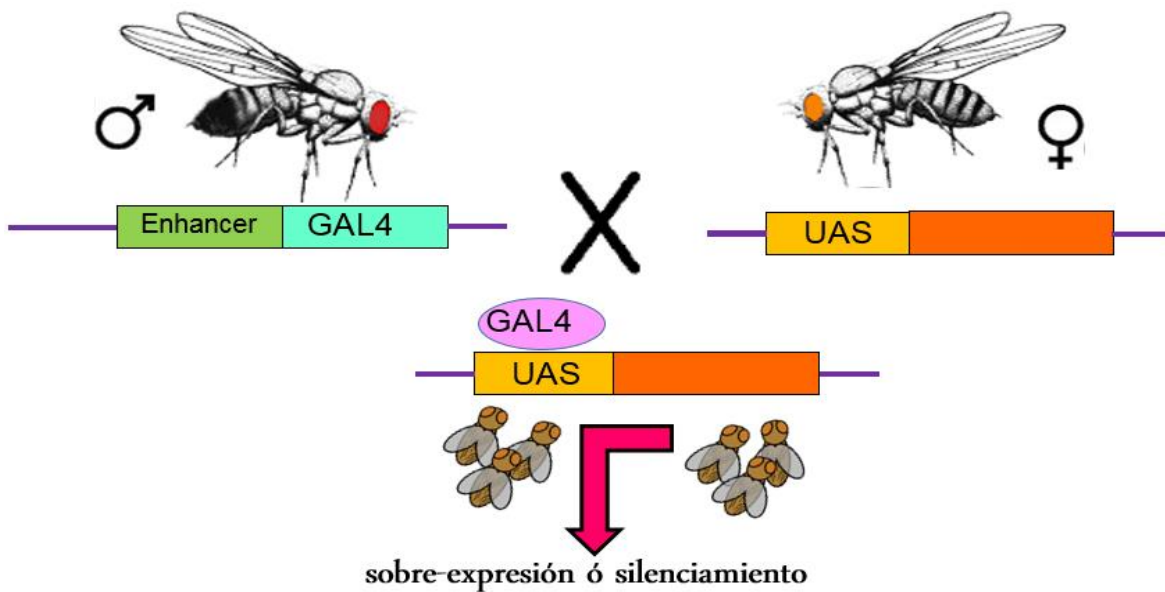


1% de piloncillo y el resultado se reprodujo. Con todo esto se concluyó que las dietas químicas las cuales se utilizaron efectivamente se rectificó la presencia de la ferritina como biomarcador de la deficiencia del hierro.

Para evaluar la actividad de la SOD2 como biomarcador de la deficiencia de Mn se utilizó el sistema de expresión génica Gal4/UAS que permite expresar cualquier proteína de interés *in vivo*, en *Drosophila melanogaster*, utilizando líneas de moscas transgénicas, (Duffy 2002). El sistema *Gal4-UAS* (Fig. 17) es un método *in vivo* para estudiar la función, controlar la expresión de genes individuales de la mosca (Duffy 2002). GAL4 es una proteína de levadura cuya función es activar la transcripción genética y sólo activa genes que tienen una secuencia reguladora que se llama UAS (secuencias activadoras de la transcripción) (Busson y Pret 2007). En la mosca no existen genes homólogos a GAL4 y ningún gen endógeno de mosca tiene secuencias UAS, pero se cuentan con moscas transgénicas que se le ha inducido diversidad de genes.



**Figura 16. Ferritina como biomarcador de la deficiencia de hierro. A.** Ferritina teñido con azul de Prussia. De las tres DQ, efectivamente en la DQ-Fe la ferritina su expresión fue menos en comparación con la DQ. **B.** Gel que representa la proteína teñida con azul de Coomassie.

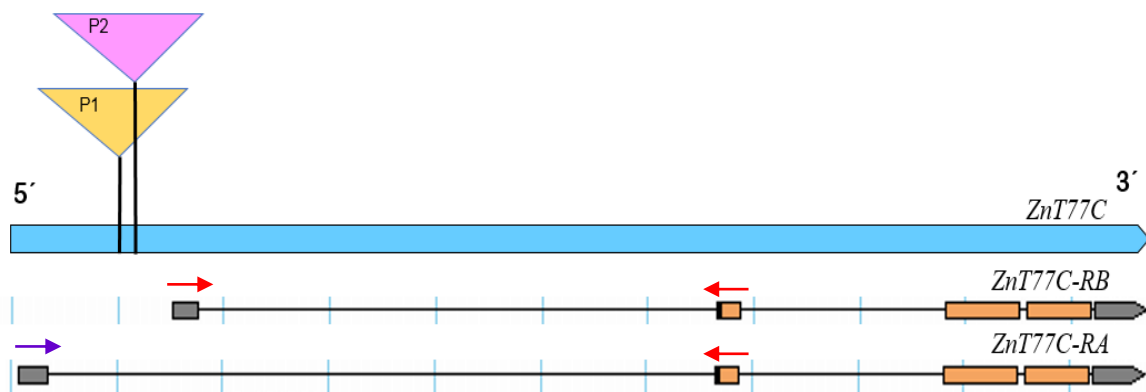


**Figura 17. Sistema de expresión génica Gal4/UAS.** El sistema Gal4/UAS permite expresar cualquier gen de interés *in vivo* en *Drosophila melanogaster*. Gal4 es una proteína que actúa como activador de la transcripción de genes que contienen la secuencia UAS. Para reproducir este sistema, se realizan cruces de moscas que contienen la proteína Gal4 con moscas que presentan la secuencia UAS y la progenie que resulte sobreexpresará o silenciará mediante RNA de interferencia el gen de interés.

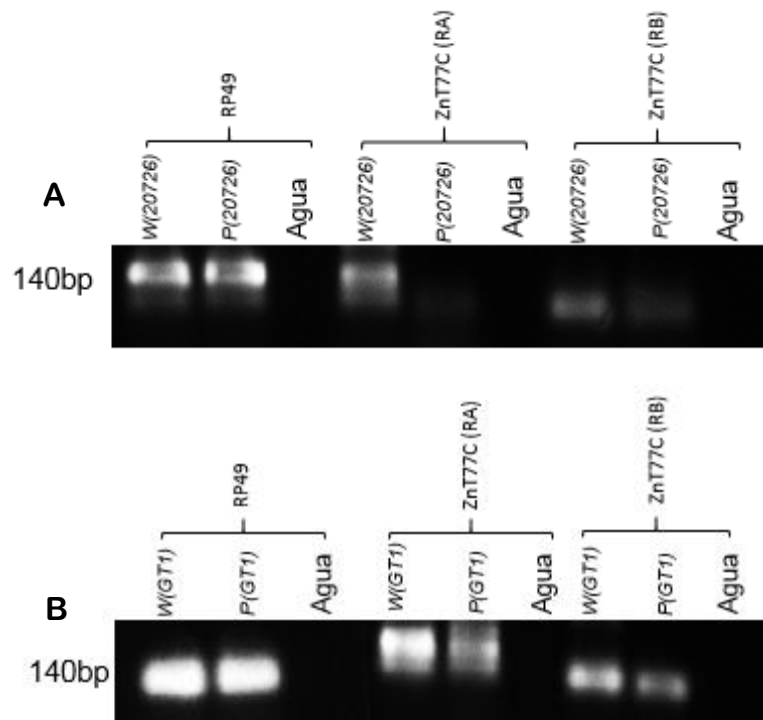
No obstante, este experimento se realizó varias veces con diversas modificaciones en la técnica y en todos los casos se logró apreciar solamente el efecto de sobreexpresión y RNAi de la SOD1 tanto en DN como en DQ; pero con respecto a la SOD2 no se pudo observar claramente, su intensidad fue muy débil. Por lo tanto, se pretende probar otras técnicas y utilizar a la arginasa, enzima que utiliza también Mn como cofactor, ya que hallar un biomarcador de la deficiencia de Mn sería muy importante en este trabajo.

## 6.4 Análisis de mutantes de *Drosophila melanogaster* del posible homólogo en el gen SLC30A10.

Se realizó un análisis *in silico* conforme a las características reportada para el gen SLC30A10 (Quadri et al., 2012, y Lye et al., 2012) y se encontró un posible homólogo denominado ZnT77C. ZnT77C en la mosca pertenece a la familia de los transportadores de Zn con actividad de exportar este metal fuera de la célula, de la cual se conocen dos transcritos con cinco exones cada uno y para fines de este trabajo se usaron dos inserciones de elementos P que no han sido anteriormente caracterizadas (Fig. 18). Para validar que las inserciones redujeran la expresión del mensajero en las mutantes de ZnT77C se realizaron ensayos de RT-PCR, se usaron dos pares de primers y se observó efectivamente menor expresión de ambos transcritos en la mutante con respecto al control (Fig. 19).



**Figura 18. Estructura del gen ZnT77C de *Drosophila melanogaster*.** El gen ZnT77C presenta dos transcritos provenientes de iniciadores distintos (ZnT77C-RA y ZnT77C-RB). En el esquema se muestra el sitio de integración de las dos inserciones P1 ( $w^{1118}$ ; P  $\{w^{+mGT}\}$  ZnT10) y P2 ( $y^1$ ,  $w^{67c23}$ ; P  $\{w^{+mC}$ ,  $y^{+mDint2}\}$  ZnT10) representadas con los triángulos y dan lugar a distintas mutantes (<http://flybase.org/>). Las flechas rojas indican la posición del primer par de primers y las flechas moradas el segundo par utilizados en RT-PCR.



**Figura 19. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de 50 ng de RNA obtenido de moscas mutantes en el posible homólogo de humanos SLC30A10 crecidas en DN. A.** Primera mutante de ZnT77C. Se indica el gen control y el agua como control negativo de la reacción. Se utilizaron dos pares de primers y en ambos casos se observó disminución de la expresión del mensajero de ZnT77C en la cepa mutante comparada con la cepa control isogénica. **B.** Segunda mutante.

Para investigar que metal puede estar transportando ZnT77C, se midieron los metales (Fe, Cu, Zn, Mn) por espectrometría de absorción atómica de las moscas mutantes en ZnT77C crecidas en DN y no se observaron diferencias significativas entre las cuatro cepas (dos cepas control y dos mutantes) para ninguno de los cuatro metales (Tabla 5). Aunque se observó una disminución de la concentración del Cu en ambas mutantes no alcanzó diferencia significativa con los demás metales.

<b>STOCK</b>	<b>N</b>	<b>Fe(mg/g)</b>	<b>Zn(mg/g)</b>	<b>Cu(mg/g)</b>	<b>Mn(mg/g)</b>
<i>White(20726)</i>	9	0.163 ±0.025	0.059 ±0.004	0.019 ±0.003	0.017 ±0.005
<i>P(20726) P1</i>	7	0.136 ±0.008	0.060 ±0.004	0.016 ±0.003	0.014 ±0.002
<i>White(PGT1)</i>	6	0.154 ±0.010	0.067 ±0.004	0.019 ±0.004	0.014 ±0.001
<i>P(GT1) P2</i>	6	0.158 ±0.010	0.058 ±0.003 **	0.017 ±0.005	0.015 ±0.003

**Tabla 5. Contenido de metal de moscas adultas completas de las mutantes de ZnT77C crecidas en DN.** Los resultados representan la media ( $\pm$ SD) de N experimentos. ANOVA de una vía. \*\*Significancia estadística ( $p < 0.05$ ) prueba de Tukey.

## 7. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

### 7.1 Evaluación del desarrollo de *Drosophila melanogaster* utilizando un medio de cultivo deficiente de manganeso

Debido a la falta de un quelante específico para Mn, para estudiar el efecto de una incorporación reducida de este metal en los tejidos de *Drosophila melanogaster*, se utilizó una dieta artificial basada en la reportada por Blatch y Harrison (2005) que permite la manipulación de las cantidades de sales metálicas presentes en el medio. Efectivamente, en este trabajo, al medir por espectrometría de absorción atómica la cantidad de Fe, Mn, Cu y Zn en las moscas cultivadas en las dietas artificiales, se observó que cuando no se agregan las sales correspondientes se generan deficiencias de Mn y Fe. El inconveniente surgió cuando se evaluó el efecto de la DQ deficiente de Mn y Fe el desarrollo de *Drosophila melanogaster*, ya que se alteró el tiempo de desarrollo en comparación con la DN. Además con la DQ-Fe, no se pudo mantener a la mosca en una segunda generación; por lo que se concluyó que la DQ carecía de algún nutriente o compuesto necesario para no afectar el tiempo de desarrollo y que no era factible utilizar una DQ totalmente deficiente de Fe para nuestros experimentos. Por tal razón, se decidió evaluar los efectos del piloncillo, grenetina y levadura (elementos de la DN) y para tener una DQ baja en Fe agregar 20% de ferrocitrato de amonio del que está contenido en la DQ. De los tres elementos evaluados, la adición de levadura no mostró diferencia significativa en el desarrollo con respecto a la DN, aunque en relación a la sobrevivencia con el piloncillo se generó mayor cantidad de moscas en las cepas *white*<sup>+</sup>. Por lo que también se realizó un nuevo medio de cultivo al que se le adicionó 1% de levadura y 1.25% de piloncillo con respecto a la DN. Al momento de evaluar el desarrollo no hubo diferencia significativa en comparación con la levadura aunque se obtuvo una mayor cantidad de población al usar 1.25% de piloncillo. Sin embargo, en este trabajo se usó la DQ con 1% de levadura y 20% de Fe ya que no se mostró diferencia significativa en la población de *Drosophila* y alcanzó una buena cantidad de moscas sobrevivientes.

Como perspectiva, se pretende analizar que componentes de la levadura y el piloncillo favorecen el desarrollo y la población de moscas mediante ensayos de diálisis en agua de la levadura y piloncillo para poder aislar los componentes de bajo peso molecular solubles en agua y observar si agregando este extracto a la DQ se rescata el tiempo del desarrollo de la mosca. En caso contrario se analizarán los componentes lipídicos (hidrofóbicos) de la levadura.

Además, se deberá verificar que las moscas se reproducen en la DQ por varias generaciones. Con el modelo de deficiencia de Mn en *Drosophila melanogaster* se pretende conocer el efecto de esta deficiencia en diversos procesos biológicos como el tiempo de vida, la reproducción, y el desarrollo del sistema nervioso central.

## **7.2 Expresión proteica en geles 2D**

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es una herramienta empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos de proteínas (“spots”) en un único gel, mostrando un patrón característico (Issaq y Veenstra 2008; Rabilloud et al., 2010). Los geles 2D realizados con 150 intestinos de moscas hembras adultas crecidas en la DN mostraron menor cantidad de spots en comparación con la DQ y los proteomas de la DQ-Mn y DQ-Fe se observaron similares. No obstante, en un experimento preliminar se observó una proteína de aproximadamente 25 kDa que al parecer disminuyó de pI y puede referirse a la ferritina porque presenta estas características fisicoquímicas (Karlsson et al., 2004). Sin embargo, para poder evaluar cambios proteicos realizando geles 2D se requiere un mínimo de tres replicas biológicas y que los resultados sean reproducibles. Por lo que en este trabajo se realizó solamente dos replicas biológicas y una técnica.

Como perspectiva a este objetivo se realizarán más replicas biológicas comparando los tejidos de las moscas crecidas en DQ y DQ-Fe y las proteínas que reproduciblemente varíen se identificarán mediante espectrometría de masas. Cabe mencionar, que las proteínas que se trabajaron son de células completas, incluso

citosólicas y nucleares, por lo que para mejorar este análisis, se aislaron membranas celulares debido a que los ZnT son proteínas membranales y es de nuestro interés los sistemas de transporte en la membrana.

### **7.3 SOD2 como biomarcador de la deficiencia de manganeso**

Numerosos intentos con diversas modificaciones en la técnica fueron realizados para poder observar a la SOD2, sin embargo solamente en una ocasión en la DN y en las DQ se pudo observar la presencia de la SOD2. También, se desea evaluar la actividad de la arginasa cual es otra enzima que utiliza Mn como cofactor.

### **7.4 Mutantes de *Drosophila melanogaster* en su homólogo SLC30A10**

¿Es realmente ZnT77C homólogo de SLC30A10? Se ha reportado que ZnT1 de *D. melanogaster* es homólogo de SLC30A1 de humano y ambos contienen el sitio de coordinación de zinc transportando este metal en el intestino (Zhou et al., 2009). ZnT77C no posee el dominio de coordinación de zinc con respecto a los demás miembros transportadores de este metal por lo que es relevante conocer que ion metálico puede estar transportando. Para este objetivo se utilizaron mutantes de la mosca en el gen ZnT77C con dos inserciones de elementos P. Para mostrar que estas inserciones afectan la expresión del mensajero de ZnT77C se extrajo RNA de la mosca completa crecida en DN y se analizaron mutantes mediante ensayos de RT-PCR usando distintos pares de primers. Se observó efectivamente, que ambas inserciones redujeron la expresión del mensajero en las mutantes en comparación con el control, aunque las dos mutantes se comportaron de manera distinta. Se realizó también, la medición de los metales presentes en estas mutantes en la DN y no se observó diferencia significativa en la acumulación del Fe, Mn, Cu y Zn, el cual no responde aún la pregunta sobre que metal transporta ZnT77C ya que se requiere de un análisis más amplio. No obstante, se plantea investigar si la exposición de moscas en DQ-Mn y DQ-Zn altera la expresión de ZnT77C, mediante experimentos de RT-PCR, para conocer si la concentración de uno de estos dos metales regula la expresión de este gen.



## 8. REFERENCIAS

- Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26)
- Arredondo M and Núñez M. Iron and copper metabolism. *Molecular aspects of medicine* 26 (2005) 313-327.
- Aschner JL, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med*. 2005 Aug-Oct;26(4-5):353-62.
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jun 1;221(2):131-47.
- Au C, Benedetto A, Aschner M. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology*. 2008 (4):569-576.
- Barajas-Aceves M. Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. *Bioresour Technol*. 2005.
- Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). *Neurotoxicology*. 1984 Spring;5(1):13-35.
- Bettedi L, Aslam MF, Szular J, Mandilaras K, Missirlis F. Iron depletion in the intestines of Malvolio mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase. *J Exp Biol*. 2011 Mar 15;214
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971 Nov;44(1):276-87.
- Blatch SA and Harrinson. An updated chemically-defined medium for *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv*. 88 (2005)
- Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometals*. 2011(6):1045-1057.
- Burke R, Commons E, Camakaris J. Expression and localisation of the essential copper transporter DmATP7 in *Drosophila* neuronal and intestinal tissues. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9)
- Busson D, Pret AM. GAL4/UAS targeted gene expression for studying *Drosophila* Hedgehog signaling. *Methods Mol Biol*. 2007;397:161-201.
- Camaschella C, Strati P. Recent advances in iron metabolism and related disorders. *Intern Emerg Med*. 2010 Oct;5(5):393-400
- Catalán-Vázquez M, Riojas-Rodríguez H, Pelcastre-Villafuerte BE. Risk: For Whom? Representations of Mining Activity by Different Social Actors in the Molango Manganese District of Hidalgo, Mexico. *Risk Anal*. 2013 Oct 1
- Celotto A.M., Liu Z., VanDemark A.P., and Palladino M.J. A novel *Drosophila* SOD2 mutant demonstrates a role for mitochondrial ROS in neurodevelopment and disease. *Brain and Behavior* 2012; 2(4): 424–434.

Cotzias GC, Horiuchi K, Fuenzalida S, Mena I. Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*. 1968 (4):376-82.

Cox N, Retegan M, Neese F, Pantazis DA, Boussac A, Lubitz W. Photosynthesis. Electronic structure of the oxygen-evolving complex in photosystem II prior to O-O bond formation. *Science*. 2014 Aug 15;345

Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Sep;2(9)

Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. 2002 (1-2):1-15.  
Eide D. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (2006) 711–722.

Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1763(7):711-22.

Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*. 1997 Aug;16(4):383-6.

Forte G, Bocca B, Peruzzo A, Tolu F, Asara Y, Farace C, Oggiano R, Madeddu R. Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biol Trace Elem Res*. 2013(1-3):79-90.

Fujishiro H, Yano Y, Takada Y, Tanihara M, Himeno S. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*. 2012 (7):700-8.

Guilarte TR. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ Health Perspect*. 2010 Aug;118(8)

Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:291-310.

Huang L, Tapaamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3).

Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):697-8

Jon Marles-Wright., 2015. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. *N Biotechnol*. 2015 Jan 5. pii: S1871-6784(14)

Kanyo Z., Scolnick L., Ash D., and Christianson D. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 233 (1996): 554-557.

Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocr J*. 2012;59(7):531-7.

Kirby K, Hu J, Hilliker AJ, Phillips JP. RNA interference mediated silencing of *Sod2* in *Drosophila* leads to early adult onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec  
Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1763(7):690-9

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*. 1997:650-8.

Finazzi D, Arosio P. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol*. 2014 Oct;88(10):1787-802.

Hardy G. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? *Gastroenterology*. 2009 N(5):29-35.

Hai Y, Kerkhoven EJ, Barrett MP, Christianson DW. Crystal Structure of an Arginase-like Protein from *Trypanosoma brucei* That Evolved without a Binuclear Manganese Cluster. *Biochemistry*. 2014

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010 Jul 9;142(1):24-38

Kenangil G, Ertan S, Sayilir I, Ozekmekçi S. Progressive motor syndrome in a welder with pallidal T1 hyperintensity on MRI: A two-year follow-up. *Mov Disord*. 2006 (12):2197-2200.

Kim Y, Kim JW, Ito K, Lim HS, Cheong HK, Kim JY, Shin YC, Kim KS, Moon Y. Idiopathic parkinsonism with superimposed manganese exposure: utility of positron emission tomography. *Neurotoxicology*. 1999 (2-3):249-252.

**Lewis Wolpert. Principles of Development. Ed. Panamericana. 3ra edition.**

Leyva-Illades D, Chen P, Zogzas CE, Hutchens S, Mercado JM, Swaim CD, Morrisett RA, Bowman AB, Aschner M, Mukhopadhyay S. SLC30A10 is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and parkinsonism-causing mutations block its intracellular trafficking and efflux activity. *J Neurosci*. 2014 Oct 15;34(42)

Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr*. 2009;29:153-76.

Lee S, Hennigar SR, Alam S, Nishida K, Kelleher SL. Essential Role for Zinc Transporter 2 (ZnT2)-mediated Zinc Transport in Mammary Gland Development and Function during Lactation. *J Biol Chem*. 2015 May 22;290(21)

Lopez V, Kelleher SL. Zinc transporter-2 (ZnT2) variants are localized to distinct subcellular compartments and functionally transport zinc. *Biochem J*. 2009 Jul 29;422(1):43-52.

Lopez V, Foolad F, Kelleher SL. ZnT2-overexpression represses the cytotoxic effects of zinc hyperaccumulation in malignant metallothionein-null T47D breast tumor cells. *Cancer Lett*. 2011 May 1;304(1):41-51.

Lye JC, Richards CD, Dechen K, Paterson D, de Jonge MD, Howard DL, Warr CG, Burke R. Systematic functional characterization of putative zinc transport genes and identification of zinc toxicosis phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*. 2012 Sep 15;215(Pt 18):3254-65.

Lucaciuc CM, Dragu C, Copaescu L, Morariu VV. Manganese transport through human erythrocyte membranes. An EPR study. *Biochim Biophys Acta*. 1997 (2):90-98.

MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jun;10(6):997-1030.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2000 Feb

Madejczyk MS, Ballatori N. The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochim Biophys Acta*. 2012 (3):651-657.

Milatovic D., Yin Z, Gupta R., Sidoryk M., Albrecht J., Aschner J., and Aschner M. Manganese Induces Oxidative Impairment in Cultured Rat Astrocytes. *Toxicological sciences* 98(1), 198–205 (2007).

Missirlis F, Hu J, Kirby K, Hilliker AJ, Rouault TA, Phillips JP. Compartment-specific protection of iron-sulfur proteins by superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48)

Missirlis F, Kosmidis S, Brody T, Mavrakis M, Holmberg S, Odenwald WF, Skoulakis EM, Rouault TA. Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics.* 2007 Sep;177(1):89-100.

Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. Biomarkers for the differentiation of anemia and their clinical usefulness. *J Blood Med.* 2013

Olanow CW. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Mar;1012:209-23.

Péran P, Cherubini A, Assogna F, Piras F, Quattrocchi C, Peppe A, Celsis P, Rascol O, Démonet JF, Stefani A, Pierantozzi M, Pontieri FE, Caltagirone C, Spalletta G, Sabatini U. Magnetic resonance imaging markers of Parkinson's disease nigrostriatal signature. *Brain.* 2010 Nov;133(11)

Poulson DF, Bowen VT, Hilse RM, Rubinson AC. The Copper Metabolism of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1952 (10):912-21.

Polin V, Coriat R, Perkins G, Dhooge M, Abitbol V, Leblanc S, Prat F, Chaussade S. Iron deficiency: from diagnosis to treatment. *Dig Liver Dis.* 2013 Oct;45(10):803-9.

Post JE. Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 3447–3454, March 1999

Qin Q, Wang X, Zhou B. Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for dietary zinc absorption and regulation. *BMC Biol.* 2013, 24;11:101.

Quadri M1, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, Severijnen LA, Di Toro Mammarella L, Mignarri A, Monti L, Sanna A, Lu P, Punzo F, Cossu G, Willemsen R, Rasi F, Oostra BA, van de Warrenburg BP, Bonifati V. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *Am J Hum Genet.* 2012, (3):467-477.

Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics.* 2010 Oct 10;73(11).

Racette BA, McGee-Minnich L, Moerlein SM, Mink JW, Videen TO, Perlmutter JS. Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology.* 2001 Jan 9;56(1):8-13.

Rodriguez-Agudelo J., Riojas-Rodriguez H., Rios C., Rosas I, Sabino E., Miranda J., Siebe C., Texcalac J.L and Santos-Burgoa C. Motor alterations associated with exposure to manganese in the environment in Mexico. *Science of the Total Environment* 368 (2006) 542-556.

Sadraie M, Missirlis F. Evidence for evolutionary constraints in *Drosophila* metal biology. *Biometals.* 2011 Aug;24(4):679-86.

Roth J. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol Res* 39: 45-57, 2006.

Rutter GA, Chimienti F. SLC30A8 mutations in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2015 Jan;58(1):31-6.

Southon A, Burke R, Camakaris J. What can flies tell us about copper homeostasis? *Metallomics*. 2013 Oct;5(10):1346-56

Stamelou M, Tuschl K, Chong WK, Burroughs AK, Mills PB, Bhatia KP, Clayton PT. Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: a new treatable disorder. *Mov Disord*. 2012, (10):1317-22.

Takeda A., Sotogaku N and Oku N. Influence of manganese on the release of neurotransmitters in rat striatum. *Brain Research* 965 (2003) 279–282.

Torres-Agustin R., Rodríguez-Agudelo Y., Schilman A., Solis-Vivanco R., Montes S., Riojas-Rodríguez H., Cortez-Lugo M., and Ríos C. Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. *Environmental Research* 121 (2013) 39–44.

Toxqui L, Vaquero MP., 2015. Chronic iron deficiency as an emerging risk factor for osteoporosis: a hypothesis. *Nutrients*. 2015 Apr 2;7(4):2324-44

Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998, 6: 960S-964

Tuschl K1, Clayton PT, Gospe SM Jr, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS, Del Rosario ML, Dyack S, Price V, Rideout A, Gordon K, Wevers RA, Chong WK, Mills PB. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet*. 2012 (3):457-466.

Wang JD, Huang CC, Hwang YH, Chiang JR, Lin JM, Chen JS. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *Br J Ind Med*. 1989 (12):856-9.

Wedler FC, Denman RB, Roby WG. Glutamine synthetase from ovine brain is a manganese (II) enzyme. *Biochemistry*. 1982 Dec 7;21(25)

Yin Z, Jiang H, Lee ES, Ni M, Erikson KM, Milatovic D, Bowman AB, Aschner M. Ferroportin is a manganese-responsive protein that decreases manganese cytotoxicity and accumulation. *J Neurochem*. 2010 (5):1190-8.

Zhao L, Xia Z, Wang F. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism. *Front Pharmacol*. 2014 Mar 6;5:33.