



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS**

**“Expresión génica y proteica en el intestino de  
*Drosophila melanogaster* crecidas en una dieta  
deficiente de manganeso”**

**T E S I S**

Que presenta:

**M en C. JOHANA VÁSQUEZ PROCOPIO**

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director:

**DR. FANIS MISSIRLIS**

**México, D.F**

**Enero, 2020**

## **ASESORES:**

Dra. Liora Shoshani<sup>1</sup>  
Dr. Ismael Jiménez Estrada<sup>1</sup>  
Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández<sup>2</sup>  
Dr. Oscar Medina Contreras<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”.

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



# CONTENIDO

ABSTRACT .....	v
RESÚMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Aspectos generales del manganeso .....	1
1.3 Toxicidad inducida por manganeso.....	4
1.4 Transporte y regulación de metales en mamíferos y <i>D. melanogaster</i> .....	5
1.5 Un medio definido para cultivar a la mosca <i>Drosophila</i> .....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS .....	13
4. OBJETIVO GENERAL .....	13
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	13
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
6.1 Cepas de <i>D. melanogaster</i> .....	14
6.2 Elaboración de una dieta química definida .....	14
6.3 Análisis elemental por ICP-OES.....	14
6.4 Evaluación del tiempo de desarrollo .....	17
6.5 Determinación de la actividad de la Sod.....	17
6.6 Determinación del pH en el lumen intestinal .....	17
6. 7 Geles 2D.....	18
6.7.1 Preparación de la muestra .....	18
6.7.2 Isoelectroenfoco (1D).....	18
6.7.3 Electroforesis 2D .....	19
6.7.4 Tinción.....	19
6.7.5 Análisis de imagen y digestión de proteínas en gel.....	19
6. 8 Maldi-TOF/TOF.....	20
6.9 Cuantificación proteómica <i>label-free</i> .....	20
6.9.1 Preparación de la muestra .....	20
6.9.2 Espectrometría de Masas .....	21
6.9.3 Análisis de datos.....	22
7 RNAseq.....	22
7.1 Preparación de la muestra.....	22

7.2	<i>Secuenciación y análisis de datos</i> .....	23
7.2.3	<i>PCR cuantitativa</i> .....	23
7.	RESULTADOS .....	25
7.1	Una dieta deficiente de manganeso .....	25
7.2	Sod2 un indicador de la deficiencia del manganeso.....	30
7.3	Proteoma intestinal con geles 2D .....	32
7.4	V-ATPasa en la homeostasis de los metales .....	35
7.5	Transcriptómica intestinal en ausencia del manganeso.....	39
7.8	Cuantificación de proteínas <i>label free</i> .....	40
7.8.1	<i>Proteínas más abundantes en el intestino</i> .....	40
7.9	La deficiencia de manganeso en el intestino .....	41
8.	DISCUSIÓN .....	46
8.1	Una dieta química deficiente de manganeso .....	46
8.2	Respuesta celular a la deficiencia del manganeso.....	47
8.3	Aumento del Mn en los primeros días de vida adulta de la mosca .....	48
8.4	La V-ATPasa en la absorción de los metales .....	49
9.	CONCLUSIONES .....	50
10.	REFERENCIAS .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de enzimas dependientes del Mn.....	2
Figura 2. Sistema de regulación y transporte de metales en mamíferos .....	8
Figura 3. Sistema de regulación y transporte de metales en <i>Drosophila</i> .....	10
Figura 4. Evaluación del tiempo de desarrollo de la mosca.....	25
Figura 5. Cantidad de adultos al cuarto día después de la metamorfosis.....	27
Figura 6. Mediciones de metales en la comida DQ1 en comparación con la DE .....	27
Figura 7. Mediciones de sodio en componentes de la DQ1 .....	28
Figura 8. Mediciones del sodio en moscas y comida.....	28
Figura 9. Mediciones del Mn en los componentes de la DQ1.....	29
Figura 10. Ensayo en gel de electroforesis de la actividad de la Sod1 y 2.....	30
Figura 11. Actividad de la Sod2 y 1 en diferentes edades de la mosca.....	31
Figura 12. Mediciones del Mn en los días dos y siete de edad de la mosca.....	31
Figura 13. Mediciones de Mn en las moscas crecidas en la DQ3 .....	32
Figura 14. Gel 2D representativo de las proteínas del intestino de la mosca.....	33
Figura 15. Análisis de geles 2D. ....	33
Figura 16. Estructura de la V-ATPasa. ....	35
Figura 17. Esquema de cruce de moscas.....	36
Figura 18. Determinación del pH luminal.....	37
Figura 19. Metalomas de moscas con RNAi en genes que codifican para la V-ATPasa.....	37
Figura 20. Metalomas de moscas con RNAi inducidos por cuatro diferentes drivers .....	38
Figura 21. qPCR de cinco genes seleccionados para validar el experimento de RNAseq.....	39
Figura 22. Cuantificación de proteínas y sus mensajeros más abundantes en el intestino.....	40
Figura 23. Correlación de proteínas y mensajeros en respuesta a la deficiencia del Mn .....	41
Figura 24. Respuestas celulares a la deficiencia del Mn.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes y sus concentraciones utilizadas para la elaboración de la dieta química ....	15
Tabla 2. Lista de las cepas de RNAi usadas en este estudio .....	16
Tabla 3. Lista de <i>primers</i> utilizados para los ensayos de PCR cuantitativa .....	24
Tabla 4. Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas. ....	26
Tabla 5. Proteínas del intestino identificadas por Maldi-TOF .....	34
Tabla 6. Genes en respuesta a la deficiencia del manganeso. ....	52
Tabla 7. Proteínas más abundantes en el intestino .....	55
Tabla 8. Proteínas agrupadas funcionalmente cuya expresión cambia por la deficiencia del Mn ....	57



## ABSTRACT

Manganese (Mn) functions as a cofactor of glutamine synthase, superoxide dismutase 2 (Sod2), arginase and of several glycosyltransferases. In this way, Mn plays a critical role in glutamatergic and gabaergic neurotransmission, mitochondrial oxidative metabolism, nitrogen clearance and glycosylation of membrane and secreted proteins, respectively. In insects, Mn has been implicated in the synthesis of ceramide phosphoethanolamine, a sphingomyelin analogue, critical component of membrane lipid rafts. Despite these known biological activities that require Mn, how its homeostasis is regulated remains unknown. Here, I show specific absorption and accumulation of Mn, but not other metals, during the first days of adult life of the fly *Drosophila melanogaster*. A marked increase in Sod2 activity is also observed during the same period. In order to study intestinal cell responses to Mn deficiency, I used a defined chemical diet that lacks Mn. Metallomic analysis and Sod2 activity measurements were performed to validate the model. Intestines of flies raised with no Mn (experimental condition) or 5 ppm Mn (control) were dissected and processed for RNAseq and quantification proteomics by 2D gels and label free analysis. I describe the adult *Drosophila* intestinal proteome in detail for the first time. Overall, I found that intestinal cells compensated for Mn deficiency by downregulating enzymes to counter for the lack of known Mn-dependent enzymatic activities. Specifically, I observed a decrease in the expression of glutaminase that catalyses the reverse reaction to Mn-dependent glutamine synthase; of two lysosomal mannosides involved in deglycosylation; and of the sphingomyelin phosphodiesterase homolog that catalyzes the degradation of ceramide phosphoethanolamine. I also knocked down specific V-ATPase subunits using tissue-specific RNA interference and found that Mn absorption through the intestine is independent of V-ATPase activity and luminal pH. In contrast, the V-ATPase is required for Mn excretion from the Malpighian tubules.

## RESÚMEN

El manganeso (Mn) es cofactor de las enzimas glutamina sintetasa, superóxido dismutasa 2 (Sod2), arginasa y de varias glicosiltransferasas. De esta forma el Mn tiene un papel crítico en la regulación de la transmisión glutamatérgica y gabaérgica en el cerebro, en el metabolismo oxidativo mitocondrial, en la depuración del nitrógeno y en la glicosilación de proteínas membranales y secretadas. En insectos, el Mn se ha implicado en la formación de la ceramida fosfoetanolamina, componente análogo a la esfingomielina en mamíferos, crítico para la formación de las balsas lipídicas en las membranas. A pesar de estas funciones, la forma en cómo se rige la homeostasis del Mn no se conoce. En esta tesis demuestro que durante los primeros días de vida adulta de la mosca *Drosophila melanogaster* existe una absorción y acumulación específica del Mn, pero no de otros metales, la cual se correlaciona con un incremento en la actividad de la Sod2 en este mismo periodo. Elaboré una dieta química definida que carece del Mn para crecer a la mosca y estudiar la respuesta de células intestinales a la deficiencia de este metal que se corroboró mediante análisis metalómicos en la mosca completa y ensayos de medición de la actividad de la Sod2. Intestinos de moscas crecidas en dietas sin Mn añadido (experimental) y con 5 ppm de Mn (control) se disectaron y procesaron para RNAseq y cuantificación proteómica en geles 2D y *label free*. Describimos por primera vez a detalle el proteoma intestinal adulto de *Drosophila*. En un panorama general, observamos cambios compensatorios para las actividades de enzimas que dependen del Mn. Las células intestinales respondieron a una deficiencia del Mn disminuyendo la expresión de la glutaminasa que cataliza la reacción opuesta a la glutamina sintetasa que requiere del Mn; de dos manosidasas lisosomales que funcionan en la deglicosilación; y del homólogo de la esfingomielina fosfodiesterasa que cataliza la degradación de ceramida fosfoetanolamina. Mediante RNA de interferencia tejido específico de las subunidades de la V-ATPasa, hallamos que la absorción del Mn en el intestino no depende de la V-ATPasa ni del pH luminal, pero que en los túbulos malpighianos la V-ATPasa se requiere para su excreción.

# 1. INTRODUCCIÓN

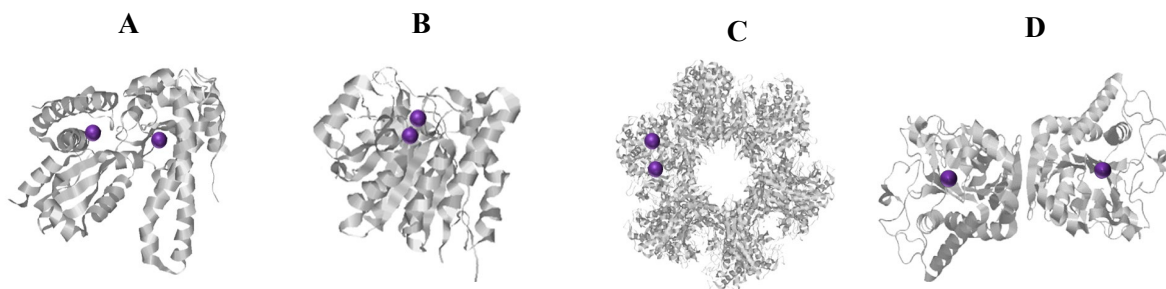
## 1.1 Aspectos generales del manganeso

El manganeso (Mn) es el quinto metal más abundante en la tierra (Pan Chen, et al., 2018). En aspecto evolutivo, fue utilizado para la fotosíntesis por las Cianobacterias, antiguamente llamadas algas verdeazuladas, de ahí su esencialidad para el desarrollo de las plantas, porque forma parte del fotosistema II, responsable de la fotólisis del agua y la producción de O<sub>2</sub> (Cox N, et al., 2014). El Mn metálico es de color gris plateado y es fácil de oxidar. No se encuentra como un elemento libre, pero generalmente se localiza en óxidos, carbonatos y silicatos, distribuyéndose en suelos, sedimentos y rocas (Post JE, 1999).

El Mn un metal de transición y se presenta en diferentes estados de oxidación (2+, 3+, 4+, 6+ y 7+), de los cuales Mn<sup>2+</sup> es la forma iónica más común en solución acuosa (Aschner JL & Aschner M, 2005) aunque un ciclo redox Mn<sup>2+</sup>↔Mn<sup>3+</sup> es observado en algunas metaloenzimas como la superóxido dismutasa 2 (Sod2). La Sod2 es un homotetrámero con un ion de Mn<sup>3+</sup> por monómero, se localiza en la mitocondria y necesita del Mn para su actividad. Esta enzima protege a la célula del daño oxidativo y regula las concentraciones de superóxido que es un poderoso agente oxidante y un subproducto no deseado del metabolismo celular (Celotto AM, et al., 2012). El Mn también es un cofactor catalíticamente requerido por otras enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno y oxígeno (Hardy G, 2009). La arginasa es un homotrímero que contiene un ion de Mn por cada subunidad y este ion es necesario para la hidrólisis de la cadena lateral de arginina para producir urea y ornitina como eliminación de desechos nitrogenados del catabolismo de proteínas y aminoácidos en el ciclo de la urea (Kanyo ZF, et al., 1996), (Hai Y, et al., 2015). El Mn juega un papel importante en el sistema nervioso. Lo requiere la glutamina sintetasa (GS) que añade grupos de amonio al glutamato para sintetizar glutamina (Krajewski WW, et al., 2008). Asimismo, el Mn es el cofactor preferido por varias glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de residuos de azúcares en la biosíntesis de glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Fig. 1) (Lairson LL, et al., 2008). Otro dato importante, es la presencia de este metal en la enzima piruvato carboxilasa (enzima implicada en la gluconeogénesis que cataliza la conversión

de piruvato en oxalacetato de forma dependiente de ATP). La piruvato carboxilasa fue aislada y purificada de la mitocondria de hígado de pollo por (Scrutton MC, et al., 1966) donde hallaron cuatro moles de  $Mn^{2+}$  por mol de enzima, aunque a la fecha su estructura no se ha cristalizado.

En *D. melanogaster*, los iones de Mn son requeridos por la enzima ceramida fosfoetanolamida sintasa para la formación de ceramida fosfoetanolamida, un componente de la membrana celular análogo a la esfingomielinea en mamíferos (Vacaru AM, et al., 2013), (Panevska A, et al., 2019).



**Figura 1. Estructura tridimensional de enzimas dependientes del Mn**

**A.** Súperoxido dismutasa 2 (Pdb 1var), **B.** Arginasa (Pdb: 2pha), **C.** Glutamina sintetasa (Pdb: 2gls), **D.**  $\alpha$ 1-3 Galactosiltransferasa (Pdb: 2vfz). Las esferas en color morado indican la presencia del ion Mn. Pdb (Protein Data Bank archive)

## 1.2 Deficiencia de manganeso

El Mn, en el año 1931 fue mostrado ser esencial para el crecimiento y reproducción de ratas y ratones (Kemmerer A, et al., 1931; Orent ER & McCollum EV, 1931). Las hembras deficientes de Mn presentaron fallas en la ovulación y los machos degeneración testicular. Poco después, fue demostrado que era necesario para prevenir la “Perosis” en pollos (Wilgus HS Jr, et al., 1936), (Leach RM Jr & Muenster AM, 1962). “Perosis” es el término usado para describir anomalías esqueléticas en pollos normalmente criados en corrales. A partir de ese descubrimiento se comenzaron a mencionar algunas deficiencias del Mn en bovinos (Rojas MA, et al., 1965). Dentro de los síntomas de deficiencia se han reportado defectos en la postura (ataxia), anomalías esqueléticas y defectos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Interesantemente, las anomalías esqueléticas proporcionaron uno de los vínculos más claros de las propiedades biológicas del Mn y su función

bioquímica. La necesidad de este elemento en el desarrollo óptimo de esqueletos se ha indicado para muchas especies animales incluyendo ratas, puercos, cobayos, conejos, ganados, patos y corderos. Análisis de cartílagos en pollos deficientes de Mn comparados con el control revelaron una reducción sustancial del contenido de proteoglicanos, los principales constituyentes extracelulares del cartílago (Leach RM Jr & Muenster AM, 1962; Wilgus, Jr HS & Patton AR, 1939). El papel del Mn en la biosíntesis de los proteoglicanos parece ser asociado por su habilidad para activar a las enzimas glicosiltransferasas. Estas enzimas son necesarias para la síntesis de cadenas de sulfato condroitina, componentes de la molécula de proteoglicanos (Tsopanakis AD & Herries DG, 1978; Leach RM, 1986).

La deficiencia del Mn en humanos hasta la fecha no ha sido reportada de manera natural, quizás porque este elemento tiene una alta disponibilidad en los alimentos (Pennington JAT, et al., 1986). Sin embargo, tres estudios han reportado síntomas inducidos por el consumo de dietas deficientes de Mn (Doisy EA Jr, 1974), (Friedman BJ, et al., 1987) y (Norose N, et al., 1992). Un individuo alimentado por cuatro meses de una dieta semipurificada deficiente de vitamina K y Mn (0.35 mg Mn/día) desarrolló dermatitis, náuseas y vómito, bajos niveles de colesterol, pérdida de peso, cambio en el color de cabello y barba (Doisy EA Jr, 1974). Posteriormente la vitamina K se reincorporó a la dieta y el sujeto continuó con los síntomas hasta agregar los niveles adecuados del Mn a la dieta. Otro individuo alimentado con 0.22 mg Mn/día en una dieta semipurificada también desarrolló dermatitis e hipocolesterolemia (Friedman BJ, et al., 1987). Sin embargo, la investigación en esta área permanece inconclusa (Finley JW & Davis CD, 1999).

Recientemente, en pacientes con diabetes tipo I y II se han observado bajos niveles 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 G, et al., 2013).

### 1.3 Toxicidad inducida por manganeso

Algunas funciones del Mn han sido mencionadas y podemos atribuirlo a su esencialidad o toxicidad. En humanos, es bien reconocido que la toxicidad por Mn puede desencadenar efectos severos, particularmente en el sistema nervioso central (Mena I, et al., 1967; Lucchini R, et al., 2017). Estos efectos también se han investigados en roedores (Shukla GS & Chandra SV, 1981), *D. melangaster* (Bonilla-Ramirez L, et al., 2011) y *C. elegans* (Settivari R, et al., 2009).

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 M, et al., 2007); (Reaney SH, et al., 2006) y (van Meer MP, 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 GC, et al., 1968; Barbeau A, 1984; Kim E, et al., 1999b; Olanow CW, 2004). 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 AW, et al., 2004). Cotzias GC, et al., (1976) mostraron los efectos de la intoxicación crónica por Mn la cual eleva la cantidad de dopamina en el cerebro. La neurotoxicidad por Mn (Zhao F, et al., 2009), induce disminución del neurotransmisor inhibitorio GABA (Takeda A, 2003), estrés oxidativo y lesiones en la mitocondria (Milatovic D, et al., 2007). Recientemente, la neurotoxicidad por Mn ha incrementado su atención por su alta presencia en la producción de acero, porque es un 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 Y, et al., 2007, Stepens A, et al., 2008; Chalela JA, et al., 2011).

Los mineros extractores de Mn (Gorell JM, et al., 1997), soldadores y elaboradores de aceros (Wang JD, et al., 1989; Racette BA, et al., 2001; Kenangil G, et al., 2006) son ejemplos de trabajadores con alta exposición al Mn y principalmente quienes tienen los riesgos mayores por la gran cantidad de partículas cargadas de este metal que existen en el

aire. Otra forma de Parkinsonismo se ha descrito como resultado de alteraciones genéticas en el gen SLC3A10 que pertenece a la familia de los genes transportadores de zinc (Tuschl K, et al., 2012; Quadri M, et al., 2012; Guilarte TR & Gonzales KK, 2015). Estas alteraciones se identificaron en dos familias diferentes que presentaron distonia, policitemia, cirrosis hepática y altos niveles de Mn sanguíneo (Tuschl K, et al., 2012). En *D. melanogaster* cantidades elevadas del Mn reducen el tiempo de vida, la actividad locomotora y la cantidad de neuronas dopaminérgicas (Bonilla-Ramirez L, et al., 2011).

De acuerdo con todo esto, hoy en día existe un amplio interés por descubrir tratamientos para individuos sobreexposados al Mn. Debido a que en la mayoría de los pacientes la fase neurológica del manganismo se asemeja al cuadro clínico de la enfermedad del Parkinson, el manganismo se ha tratado con levodopa y se ha observado mejoras en el cuadro clínico, lo que sugiere la participación del aparato dopaminérgico (Cotzias GC, et al., 1968; Huang CC, et al., 1989). También se ha aplicado la terapia con quelantes y actualmente se utilizan quelantes de metales divalentes como el ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) donde se ha observado una reducción de los otros cationes divalentes (Stamelou M, et al., 2012), por lo que a la fecha resulta difícil reducir los niveles del Mn sin afectar a los demás iones divalentes de importancia biológica.

#### **1.4 Transporte y regulación de metales en mamíferos y *D. melanogaster***

El Fe, cobre (Cu), zinc (Zn) y Mn son metales de transición esenciales para la vida porque se requieren en múltiples procesos biológicos (Calap-Quintana P, et al., 2017). Son nutrientes importantes, cofactores de numerosas enzimas y mediadores intracelulares (Andrew W. Foster, et al., 2014).

*D. melanogaster* comparte varios genes claves del metabolismo del Fe de mamíferos. *Malvolio (Mlv)* es el ortólogo del *Transportador de metales divalentes-1* de mamíferos, DMT1 (Rodrigues V, et al., 1995). DMT1 se expresa en el intestino de la mosca y se ha propuesto funciona como un importador del Fe de manera similar a su equivalente en mamíferos (Folwell JL, et al., 2006). El Fe absorbido en mamíferos e insectos se almacena dentro la ferritina, una proteína formada por 12 subunidades de cadena pesada y ligera (codificada por los genes *Fer1HCH* y *Fer2LCH* respectivamente en *Drosophila*). La

ferritina en mamíferos es una proteína citosólica y en insectos incluyendo la mosca se localiza en la vía secretoria (retículo endoplásmico, Golgi y vesículas secretorias) y se secreta a la hemolinfa en grandes cantidades (Nichol H, et al., 2002; Tang X & Zhou B, 2013). La transferrina (TF) es una proteína abundante en la hemolinfa que une Fe y en insectos se le han sugerido múltiples funciones. Sin embargo, aún se mantiene en investigación si esta proteína funciona como un transportador de Fe en una manera similar como lo transfiere en mamíferos (Dunkov B & Georgieva T, 2006; Tang X & Zhou B, 2013) aunque recientemente (Xiao G, et al., 2019) han propuesto a *Tsfl* como su homólogo en la mosca y que funciona en el tráfico del Fe entre el intestino y el cuerpo graso de forma similar a la TF en mamíferos.

La absorción del Fe y su metabolismo son procesos postranscripcionales regulados a través de las proteínas reguladoras de hierro (IRP) que se unen a los elementos de respuesta al hierro (IRE) de los ARNm regulados. El sistema IRP/IRE se conserva en varios grupos taxonómicos incluyendo a la mosca (Muckenthaler M, et al., 1998; Lind MI, et al., 2006; Huynh N, et al., 2019).

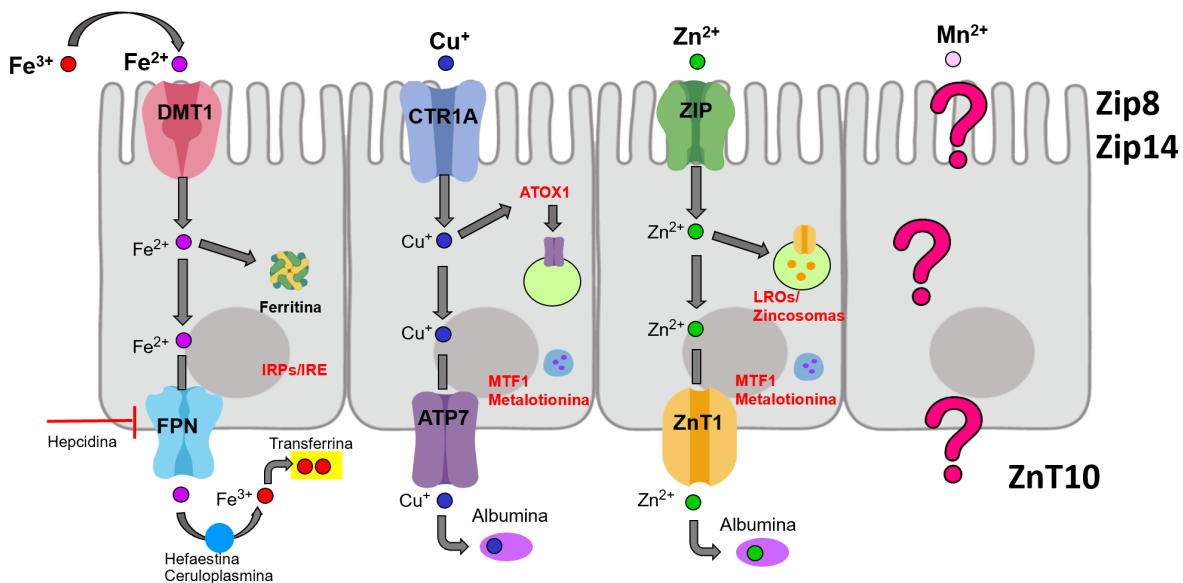
En *Drosophila* se conocen también genes ortólogos con funciones conocidas al metabolismo del Fe en mamíferos. La *Citocromo duodenal b (Dcytb)* se expresa altamente en el epitelio intestinal de mamíferos y tiene actividad de reductasa para convertir el estado de oxidación inorgánico del Fe dietario ( $Fe^{+3}$ ) al  $Fe^{+2}$  en el proceso de absorción. En la mosca dos candidatos para esta función han sido propuestos; el gen *de memoria no extendida (nemy)* y el de la anotación con ID *CG1275* (Wim Verelst & Han Asard, 2003).

El  $Fe^{2+}$  para su salida del enterocito se oxida a  $Fe^{+3}$ . Este proceso depende de una ferroxidasa de Cu, hefaestina, que medía el eflujo en cooperación con el exportador de Fe, ferroportina 1. La ceruloplasmina, otra oxidasa de cobre, también ha sido propuesta participa en el transporte del Fe al plasma. En *Drosophila* se han sugerido la *multicobre oxidasa -1 (Mco1)* y la *multicobre oxidasa-3 (Mco3)* con funciones similares a la hefaestina (Lang M, et al., 2012) y ceruloplasmina (Bettledi L, et al., 2011) respectivamente. Finalmente, hay unos genes de mamíferos que participan en el metabolismo del Fe pero que no tienen ortólogos en la mosca, tales como los que codifican para el receptor de transferrina, la ferroportina y hepcidina (Mandilaras K, et al., 2013).



En mamíferos, el Cu se distribuye en dos pasos: primeramente, el Cu se absorbe en la superficie apical de los enterocitos y se exporta a la circulación unido a proteínas del suero. Seguido de esto, el Cu se absorbe en el hígado donde se une a la ceruloplasmina en el suero y se exporta a la circulación. El hígado es el responsable para la eliminación del exceso de Cu, exportándolo a la bilis para su eliminación a través de las heces (van den Berghe PV & Klomp LW, 2009). El principal importador celular del Cu es CTR1 (copper transporter 1) (Petris MJ, 2004). El Cu previo para a ser transportado por CTR1 se reduce de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por reductasas en la membrana plasmática. En la mosca se conocen CTR1A como el principal transportador primario para la absorción del Cu dietario (Turski ML & Thiele DJ, 2007). En *Drosophila*, el Cu se transporta en un solo paso del intestino a todos los tejidos. La *Mco3* es similar a la ceruloplasmina en su actividad de ferroxidasa (Bettledi L, et al., 2011) pero no se ha detectado en la hemolinfa (Vierstraete E, et al., 2003). Para su excreción se ha observado que los túbulos de Malpighi pueden absorber Cu y eliminarlo en las heces (Southon A, et al., 2013). Una vez que el Cu ha entrado a la célula, se distribuye a las cuproenzimas mediante chaperonas específicas CCS, Cox17 y Atox1, que tienen alta afinidad por el metal. La chaperona CCS cede el Cu a la Sod1. Las chaperonas Cox17 y Cox11 abren las vías que conducen a los centros Cu A y Cu B de la citocromo C oxidasa mitocondrial (Horng YC, et al., 2004). La Atox1 cede el cobre a los transportadores ATP7A y ATP7B, que permiten su tráfico a través del aparato de Golgi y la membrana plasmática (Prohaska JR & Gybina AA, 2004). Ambas proteínas tienen una doble función: a) suministrar el Cu a las cuproenzimas, como la tirosinasa y la ceruloplasmina, b) eliminar el exceso del Cu por la bilis (Harris ED, 2003). En *Drosophila* se han encontrado ortólogos de Atox1, CCS y Cox17 y se sugieren realizan las mismas funciones que en mamíferos (Kirby K, et al., 2008; Porcelli D, et al., 2010; Hua H, et al., 2011). Sin embargo, en la mosca solo existe un transportador de Cu tipo ATPasa nombrado ATP7 que se expresa en todos los tejidos (Southon A, et al., 2010). Este transportador es similar a ATP7A y transfiere Cu a las enzimas por la vía secretoria (Binks T, et al., 2010). El Cu y todos los metales deben ser controlados para la vida ya que su acumulación puede resultar potencialmente tóxico (Valko M, et al., 2005). Para este mecanismo de almacenamiento, las células expresan un grupo de proteínas conocidas como metalotioninas (MT) que tienen un alto contenido de cisteínas que le brinda la capacidad de unirse al metal (Bonneton F, et al.,

1996). Las metalotioninas se expresan a nivel basal y se inducen fuertemente en respuesta a la toxicidad de metales (Egli D, et al., 2003). En mamíferos se conoce las MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV (Palmiter RD, 1998) y en *Drosophila* se han descrito cinco, MtnA, MtnB, MtnC, MtnD y MtnE (Egli D, et al., 2006; Atanesyan L, et al., 2011). En este proceso de almacenamiento, el factor de transcripción MTF-1 (metal-responsive transcription factor-1), es el principal regulador de respuesta a una carga de metales, incluyendo Cu ( Zhang B, et al., 2001). Cuando se incrementa la concentración del metal, MTF-1 se une, cambia su conformación y se presenta en el núcleo donde se une a los elementos de respuestas de metales MRE para inducir la expresión de sus genes blancos que incluyen metalotioninas, tanto en mamíferos como en *D. melanogaster* ( Balamurugan K, et al., 2004).



**Figura 2. Sistema de regulación y transporte de metales en mamíferos**

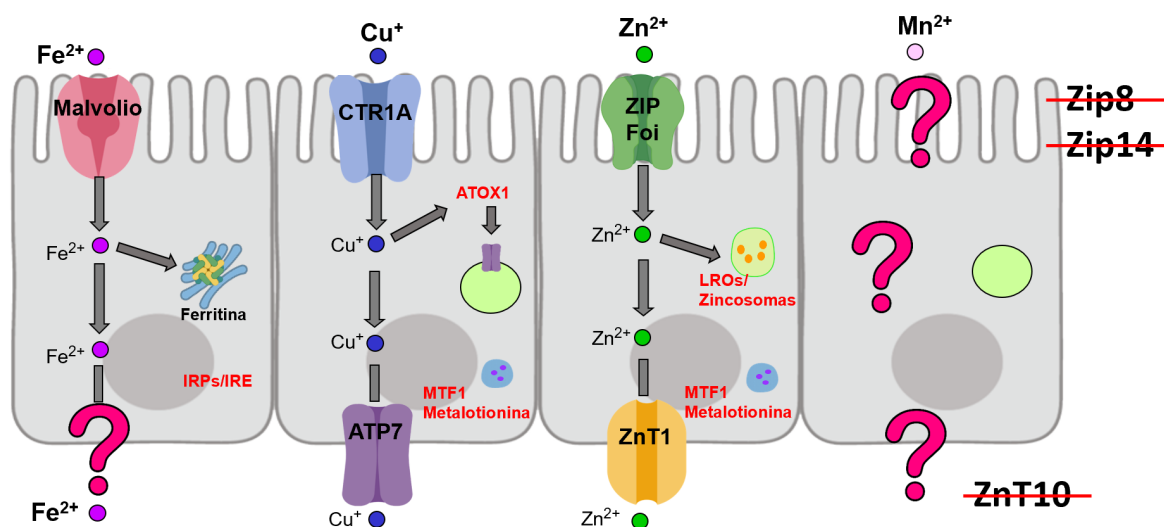
De izquierda a derecha, se indican el transporte del Fe, Cu, Zn y Mn. La enzima *DcytB* convierte el Fe<sup>3+</sup> luminal a Fe<sup>2+</sup> para su absorción por el DMT1. En el citoplasma el Fe<sup>2+</sup> se distribuye a la célula y su exceso se almacena en la ferritina. El Fe<sup>2+</sup> sale de la célula por medio de la ferroportina para ser unido a la transferrina, la proteína que entrega el Fe a las células. Fe<sup>2+</sup> previo a unirse a la Tsf se convierte en Fe<sup>3+</sup> por las enzimas hefaestina y/o ceruloplasmina. La hormona hepcidina secretada por el hígado, regula el Fe a nivel sistémico. A nivel celular, la homeostasis se regula postranscripcionalmente por medio de las proteínas IRPs que se unen a los elementos de respuesta del Fe (IRE) en los RNAm de la ferritina y del receptor a la transferrina. El Cu ingresa al medio celular por el transportador CTR1. Dentro de la célula el Cu se distribuye a las cuproenzimas. La chaperona ATOX1 cede el Cu al tráfico vesicular. Las metalotioninas cuando se unen al MTF1 regula la concentración de Cu en el interior celular. Finalmente, el Cu se excreta por una P-ATPasa, la ATP7. El Cu y el Zn se unen a la albúmina para distribuirse a otros sitios. Para la homeostasis de Zn se conocen una gran familia de transportadores. Los ZIP importan y los ZnT son exportan el metal. Los LROs y zincosomas son los sitios de almacén de Zn. Algunos transportadores de la familia del Zn han sido sugeridos estar implicados en el transporte del Mn en tejidos periféricos, pero se desconoce cómo se absorbe en el intestino.

Con respecto al Zn, sus concentraciones se mantienen a niveles nanomolares a través de su absorción, almacenamiento y excreción ( Bozym RA, et al., 2010). Varios estudios han indicado que los transportadores de Zn son el principal mecanismo de mantenimiento de su homeostasis. En mamíferos, existen dos familias de transportadores de Zn, uno compuesto de genes transportadores de solutos, nombrado SLC39a o proteínas ZIP, mientras que la otra familia incluye genes facilitadores de la difusión de cationes SLC30a o proteínas ZnT. La familia de los ZnTs ( Kambe T, et al., 2004) promueve el transporte de Zn del citosol al ambiente extracelular o transfieren Zn a compartimentos dentro de la célula (Liuzzi JP & Cousins RJ, 2004). La familia de los ZIP promueve el importe de Zn del ambiente extracelular al citosol o de los organelos al citoplasma. 14 ZIPs y diez ZnTs se han identificado en mamíferos ( Kambe T, et al., 2004). Diez ZIPs y siete ZnTs ortólogos se conocen en *Drosophila*. *Catsup* (*Catecholamines up*) y *foi* (*fear of intimacy*) son los transportadores de Zn mejor caracterizados en *Drosophila*. *Catsup* es el ortólogo del gen *hZIP7* (Stathakis DG, et al., 1999). *Foi*, ha sido sugerido ser el ortólogo de los genes humanos *hZIP6* y *hZIP10* (Carrasco-Rando M, et al., 2016). *dZip42C.1*, *dZip42C.2* y *dZip89B* (probablemente homólogos de *hZIP1*, *hZIP2* y *hZIP3*) se localizan en la membrana apical y son los transportadores más importantes para la absorción del Zn del lumen intestinal (Qin Q, et al., 2013). La liberación del Zn es mediada por los exportadores *dZnT63C* y *dZnT77C* (ortólogos de *hZnT1* y *hZnT10*) ambos localizados en la membrana basolateral de los enterocitos (Qin Q, et al., 2013; Wang X, et al., 2009).

Todo esto descrito, es porque los mecanismos de control son claves en la sobrevivencia de los animales. Controlar la homeostasis de los metales es crucial para las diferentes actividades enzimáticas a cambio de la función y mantenimiento celular (Calap-Quintana P, et al., 2017). Alteraciones en algunos de estos procesos conduce a daño y muerte celular.

Interesantemente, en *D. melanogaster* los principales componentes de la homeostasis de metales de mamíferos se conservan y han sido identificados y caracterizados (Rodrigues V, et al., 1995; Zhou H, et al., 2003; Qin Q, et al., 2013), reconociendo a ese organismo como un modelo útil para la investigación de los iones metálicos (Fig. 3).

La homeostasis de los metales resulta de una regulación coordinada de diferentes proteínas involucradas en la absorción, excreción y/o almacenamiento y tráfico intracelular, (Cai L, et al., 2005). Con respecto a la homeostasis y como se regula el Mn, se desconoce tanto en mamíferos y en *D. melanogaster*. No obstante, en mamíferos Zip8 (Gordon SJV, et al., 2019), Zip14 (Jenkitkasemwong S, et al., 2018) y ZnT10 (Tuschl K, et al., 2012) han sido implicados en el transporte del Mn pero estos genes no se conservan en la mosca. También, se ha propuesto que el Mn se absorbe a través del DMT1 (Orgad S, et al., 1998; Fitsanakis VA, et al., 2011), pero mutaciones de este transportador divalente en otras especies han indicado afectar al Fe y no al Mn (Bettedi L, et al., 2011; Shawki A, et al., 2015).



**Figura 3. Sistema de regulación y transporte de metales en *Drosophila***

El sistema de mamíferos descrito en la fig. 2 es altamente conservado en la mosca, aunque se desconoce el exportador del Fe. Los genes descritos para el transporte del Mn en mamíferos no tienen homólogos en *Drosophila*.

### 1.5 Un medio definido para cultivar a la mosca *Drosophila*

En muchos estudios nutricionales y bioquímicos, es frecuentemente necesario criar insectos en dietas químicamente definidas (holídicas) para conocer y regular el contenido exacto de nutrientes (Blatch SA & Harrison JF, 2005). *D. melanogaster* fue el primer animal multicelular criado en condiciones asépticas en una dieta de composición conocida (Tranger W, 1947). Las dietas holídicas utilizados en *Drosophila*, han sido los trabajos tempranos de Sang JH, (1954). Sin embargo, estos medios holídicos han sido incapaces de

producir suficiente cantidad de moscas a diferencia a las que crecen en la dieta estándar que contiene levadura (Rapport EL, 1986). Varios intentos en estandarizar una dieta holidica se han reportado y así estudiar aspectos biológicos en *Drosophila*, (Sang JG & King RC, 1961; Troen AM, et al., 2007; Lee WC & Micchelli CA, 2013; Piper MD, 2017). Por otra parte, la gran parte de estudios nutricionales en organismos modelos se ha realizado en rata y ratones, donde su requerimiento nutricional ha sido ampliamente establecido, incluyendo energía, lípidos, ácidos grasos, carbohidratos, proteínas y aminoácidos, así como vitaminas, minerales y oligoelementos (Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995). En el caso de la mosca, los requerimientos nutricionales y metabólicos solo han sido determinados en la larva (Schultz J, et al., 1946; Hinton T, et al., 1951; Sang JH, 1954).

También existe lo que se conoce como “Quelante”, que es un producto químico que tiene la propiedad de combinarse con los iones positivos divalentes o trivalentes y formar complejos estables para ser eliminados y desproveer la toxicidad. Los quelantes pueden ser mezclados con la dieta estándar del laboratorio y así reducir la absorción del metal en el insecto. Por ejemplo, para el Fe se conoce sulfato de batofenantrolina (Gutiérrez L, et al., 2013), sulfato de batocuproína para el Cu (Hwang JE, et al., 2014) y N,N,N’N’-tetrakis-(2-piridilmetil) etilenodiamina (Tejeda-Guzmán C, et al., 2018). Sin embargo, este no se ha desarrollado para el Mn y actualmente se usa el EDTA que tiene afinidad por otros iones divalentes de importancia biológica (Stamelou M, et al., 2012). Es por tal motivo que este trabajo se inició con preparar una dieta química definida que nos permitiera manipular las concentraciones del Mn.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las respuestas celulares a la carencia de un nutriente son complicadas si este es esencial, pero a la vez su exceso puede ser tóxico. La sobreexposición a Mn conlleva a Parkinsonismo en humanos ( Kim E, et al., 1999b; Barbeau A, 1984; Olanow CW, 2004) un desorden neurológico actualmente no tratable. En *D. melanogaster*, la exposición al Mn reduce el tiempo de vida, la actividad locomotora y la cantidad de neuronas dopaminérgicas (Bonilla-Ramirez L, et al., 2011) pero a la fecha en este organismo modelo no se ha estudiado la consecuencia de una deficiencia del mismo metal.

A pesar de los requerimientos de los iones metálicos en la estructura y función de proteínas aún se desconoce cómo se regulan metabólicamente (Bloom AJ, 2019). Actualmente, los mecanismos moleculares que rigen la homeostasis del Mn no son entendidos (Harischandra DS, et al., 2019) y los transportadores de metales implicados en su homeostasis no presentan exclusividad (Southon A, et al., 2008; Bittedi L, et al., 2011). También se carece de información respecto a sus sensores celulares y los mecanismos de traducción de señales que podrían participar en su regulación, pero la falta de un organismo modelo deficiente de Mn para estudiar el tráfico de este metal no ha tomado ventajas en esta área.

La estrategia de cultivar a un organismo modelo en ausencia de un metal definido fue utilizada por (Fleming MD, et al., 1997; Abboud S & Haile DJ, 2000; McKie AT, et al., 2000) para descubrir a las proteínas reguladoras del hierro. Estos autores observaron que la carencia del metal en la dieta indujo la sobreexpresión del sistema de captura. Por esta razón, en este estudio buscamos para nuestra estrategia experimental una dieta química definida deficiente de Mn, en la cual monitoreamos la expresión de genes y proteínas en el intestino de hembras adultas de *D. melanogaster*, con la hipótesis de que al generar deficiencia de Mn podríamos observar el aumento en la abundancia de las moléculas implicadas en su absorción y manejo.

### **3. HIPÓTESIS**

La deficiencia de manganeso genera respuestas celulares que son el resultado de cambios en la expresión de genes y proteínas en el intestino de la mosca *D. melanogaster*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el proteoma y transcriptoma del intestino de la mosca *D. melanogaster* criada en un medio deficiente de manganeso.

### **5. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Elaborar una dieta química definida deficiente de manganeso para crecer a la mosca *D. melanogaster*.
2. Evaluar la actividad enzimática de la Sod2 en la mosca como marcador de la deficiencia de manganeso.
3. Analizar la expresión de proteínas en geles 2D de intestinos de moscas crecidas en la dieta con bajo manganeso e identificarlas por espectrometría de masas.
4. Secuenciar el transcriptoma de los intestinos de moscas crecidas en deficiencia del manganeso.
5. Cuantificar proteínas en intestinos de *Drosophila* deficientes de manganeso aplicando espectrometría de masas *label-free*.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1 Cepas de *D. melanogaster*

En este estudio se utilizaron moscas adultas de ambos sexos 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). *white*<sup>+</sup> fue cruzada por 20 generaciones con la cepa *white* del laboratorio para su isogenización (Tejeda-Guzmán C, et al., 2018). La cepa Oregon-R del laboratorio del Dr. Norbert Perrimon, de la universidad de Harvard, se utilizó para el RNAseq. Diversas líneas de RNAi obtenidas del DBSC (Drosophila Bloomington Stock Center) se utilizaron para reducir la expresión de la V-ATPasa (tabla 2). También, un conjunto de líneas Gal4 fueron utilizadas: Da-Gal4, Fer2LCH-Gal4<sup>21B</sup> [en el texto se refiere como Fer2-Gal4], FB-Gal4, Uro-Gal4 (BDSC #44416) y NP-Gal4<sup>3084</sup>. Todas 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 estándar (DE)].

### 6.2 Elaboración de una dieta química definida

Tres versiones diferentes de DQ se realizaron en este trabajo. Los componentes con sus respectivas concentraciones para cada una de ellas se muestran en la tabla 1. Para causar una deficiencia del Mn, no se agregó este metal a la dieta.

### 6.3 Análisis elemental por ICP-OES

Se recolectaron moscas hembra y macho de 4-7 días de edad del genotipo y dieta correspondiente. Las moscas se liofilizaron ocho horas con objetivo de eliminar la parte líquida. Posteriormente, se pesaron 20 mg de la muestra seca y se digirieron en 1 ml de ácido nítrico concentrado libre de metales a 200°C por 15 min en viales del sistema de horno de digestión MARS6 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Transcurrido el tiempo las muestras se diluyeron con 5 ml de agua y la concentración de analitos se midió contra curvas de calibración y un blanco de digestión en el instrumento de espectrometría de emisión mediante plasma inductivo de argón (ICP-OES) PerkinElmer Optima 8300 (Shelton, CT, USA).



**Tabla 1. Componentes y sus concentraciones utilizadas para la elaboración de la dieta química**

COMPONENTE QUÍMICO	PROVEEDOR	CANTIDAD (g/l)		
		Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
<b>Proteínas y azúcares</b>				
Caseína	BD Biosciences 223050	53.2	21.6	21.6
Sacarosa	Sigma-Aldrich S0389	9.7	19.3	19.3
<b>Sales inorgánicas</b>				
Fosfato de sodio dibásico	Sigma-Aldrich S7907	1.82	-	-
Fosfato de potasio monobásico	Merck 4873	0.69	0.1	0.1
Fosfato de potasio dibásico	Sigma-Aldrich P2222	3.61	0.54	0.54
Bicarbonato de sodio	Sigma-Aldrich S6297	0.96	0.064	0.064
Sulfato de mangnesio heptahidratado	Sigma-Aldrich M5921	0.6	0.5	0.5
Cloruro de calcio dihidratado	Sigma-Aldrich C5670	0.19	0.15	0.15
Acetado de zinc dihidratado	Sigma-Aldrich 379786	0.19	0.003	0.003
Citrato de amonio férrico	Sigma-Aldrich F5879	0.01	0.008	0.008
Sulfato de Mn monohidratado	Sigma-Aldrich M7634	0.013	0.002	0.002
Sulfato de cobre	Sigma-Aldrich C1297	0.005	0.0005	0.0005
Molibdato de amonio	Merck 321182	0.005	0.001	0.001
<b>Vitaminas</b>				
B1. Tiamina	Sigma-Aldrich T1270	0.012	0.006	0.006
B2. Riboflavina	Sigma-Aldrich R9504	0.01	0.005	0.005
B3. Niacina	Sigma-Aldrich N4126	0.046	0.023	0.023
B5. Pantotenato de calcio	Sigma-Aldrich C8731	0.019	0.019	0.019
B6. Pirodoxina	Sigma-Aldrich P6280	0.006	0.003	0.003
B8. Biotina	Sigma-Aldrich B4639	0.0006	0.0003	0.0003
B9. Ácido fólico	Sigma-Aldrich F8758	0.003	0.003	0.003
C. Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich A5960	0.54	0.54	0.54
<b>Otros</b>				
ARN de levadura	Sigma-Aldrich R6625	3.9	2.5	-
Colesterol	Sigma-Aldrich C8667	0.29	0.29	0.29
Triptófano	Sigma-Aldrich T0254	2.4	0.24	0.24
L-carnitina	Sigma-Aldrich C0283	0.01	0.01	0.01
Colina	Sigma-Aldrich C1879	0.058	0.058	0.058
Lecitina	Sigma-Aldrich P3644	-	0.4	0.4
Putrescina	Sigma-Aldrich P5780	-	0.16	0.16
Ácido lipoico	Sigma-Aldrich T1395	-	0.052	0.052
Myo-inositol	Sigma-Aldrich I7508	-	-	0.005
Uridina	Sigma-Aldrich U3750	-	-	0.06
Inosina	Sigma-Aldrich I4125	-	-	0.065
Levadura	Grupo La Florida	10	-	-
Agar	Oxoid LP0011	29	16	16
Ácido propiónico	Sigma-Aldrich P5561	10 mL/L	10	10

**Tabla 2. Lista de las cepas de RNAi usadas en este estudio.** Los genes subrayados corresponden al complejo V1 de la V-ATPasa. Las subunidades en negrita son codificadas por un solo gen en la bomba de protones. Usando el código de identificador *Bloomington, Drosophila Stock Center* (BDSC) se puede obtener más información en [www.flybase.org](http://www.flybase.org) de las líneas de RNAi.

Gen RNAi	GENOTIPO COMPLETO	BDSC
<u><i>Vha13</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS01677}attP40</i>	38233
<u><i>Vha26</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS01912}attP2</i>	38996
<u><i>Vha44</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS00821}attP2</i>	33884
<u><i>Vha55</i></u>	<i>y<sup>l</sup> v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS02132}attP40/Cyo</i>	40884
<u><i>VhaSFD</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS02144}attP40/Cyo</i>	40896
<u><i>Vha68-1</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS02581}attP40/Cyo</i>	42888
<u><i>Vha68-2</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS01056}attP2</i>	34582
<u><i>Vha68-3</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS02647}attP40</i>	42954
<u><i>Vha14-2</i></u>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC06115}attP40/Cyo</i>	65363
<i>Vha16-1</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS02171}attP40</i>	40923
<i>Vha16-2</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC06043}attP40/Cyo</i>	65167
<i>Vha16-3</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC04786}attP40</i>	57474
<i>Vha16-5</i>	<i>y<sup>l</sup> v<sup>l</sup>; P{TRiP.JF01821}attP2</i>	25803
<i>Vha36-3</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC06023}attP40</i>	65075
<i>VhaPPA1-2</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC06080}attP40/Cyo</i>	65217
<i>VhaM9.7-a</i>	<i>y<sup>l</sup> v<sup>l</sup>; P{TRiP.JF02029}attP2</i>	26004
<i>VhaM9.7-b</i>	<i>y<sup>l</sup> w<sup>67c23</sup>; P{SUPor-P}VhaM9.7-b<sup>KG03854</sup> ry<sup>506</sup></i>	13351
<i>VhaM9.7-d</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS05645}attP40/Cyo</i>	67822
<i>Vha100-1</i>	<i>y<sup>l</sup> v<sup>l</sup>; P{TRiP.JF02059}attP2</i>	26290
<i>Vha100-2</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC05732}attP40</i>	64859
<i>Vha100-5</i>	<i>y<sup>l</sup> v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMJ30067}attP40/Cyo</i>	62990
<i>VhaAC39-1</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS01442}attP2</i>	35029
<i>VhaAC39-2</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS05622}attP40</i>	67809
<i>VhaAC45</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMS01717}attP40</i>	38522
<i>VhaAC45-2</i>	<i>y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup>; P{TRiP.HMC04789}attP40</i>	57476
<i>Sod1</i>	<i>w*; P{UAS-Sod1.IR}4</i>	24491
<i>Sod2</i>	<i>w1; P{UAS-Sod2.dsRNA.K}15/SM5</i>	24489

#### **6.4 Evaluación del tiempo de desarrollo**

Diez hembras y diez machos se colocaron por un periodo de cuatro días para depositar huevos en viales frescos. Posteriormente las moscas se retiraron y se tomó el tiempo de aparición de la primera pupa, primer adulto y se contó la población total de moscas al cuarto día después de la aparición del primer adulto.

#### **6.5 Determinación de la actividad de la Sod**

30 moscas hembra se homogenizaron en 130  $\mu$ L de búfer de extracción (KPO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 0.1 mM, Triton X-100 1%, pH 7.8). Los extractos se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 15 min. Posteriormente 90  $\mu$ L del sobrenadante se transfirió a un nuevo Eppendorf y se volvió a centrifugar a la misma revolución, pero por 5 min. Seguido de eso, 70  $\mu$ L se colocaron a un Eppendorf y se le añadió la misma cantidad de búfer de muestra (Tris-HCL 0.5 M, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.01%). Después, 30  $\mu$ L del extracto se corrieron en un gel nativo (condiciones no desnaturalizantes) de poliacrilamida (separador 10% y concentrador 5%). Para detectar la actividad enzimática el gel se incubó en oscuridad con 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. Posteriormente se realizó una segunda incubación con 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). Previo a finalizar la reacción, el gel se lavó con 10 mL de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (Martin RC, et al., 2009) y para el completo desarrollo del color de la reacción el gel se expuso a la luz durante 15 min y la actividad enzimática se observó cómo bandas acromáticas en el fondo azul intenso del gel.

#### **6.6 Determinación del pH en el lumen intestinal**

El indicador de pH Thymol blue (Sigma-Aldrich), se mezcló en la comida estándar de la mosca en una concentración de 0.1% w/v, previamente descrito por (Overend G, et al., 2016). Posteriormente, hembras adultas del genotipo apropiado se colocaron en los viales para alimentarse por tres días. Transcurrido este tiempo se disectaron los intestinos en PBS 1X y las imágenes se adquirieron en un estereomicroscopio EZ4 HD (Leica, Germany).

## 6.7 Geles 2D

### 6.7.1 Preparación de la muestra

150 intestinos de hembras adultas de la cepa *white+* provenientes de los medios de cultivos: DN, DQ, DQ-Mn y DQ-Fe se disectaron con PBS 1X. Los intestinos se colocaron en 100  $\mu$ L de búfer de muestra (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, IPG búfer 2% (GE Healthcare), agua milliQ) suplementadas con inhibidor de proteasas (cOmplete Mini-EDTA-free, Roche Life Science). Para la extracción de proteínas, las muestras se homogenizaron en nitrógeno líquido y se les añadieron 500  $\mu$ L de búfer de lisis (TRIS-HCL 50mM, NaCL 120Mm, IGEPAL 0.5%, agua milliQ, pH 8.0). Posteriormente 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, se recolectó el sobrenadante, se le agregaron 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético (Merck) y se incubaron a -20°C durante 30 min para favorecer la precipitación de proteínas. Seguido de eso, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min y posteriormente el sobrenadante se desechó quedándonos con la pastilla final que se lavó tres veces con acetona fría (Merck) con objetivo de eliminar la mayor cantidad de sales presente en la muestra. Finalmente, después del último lavado de la pastilla se le agregaron 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). La concentración de proteínas fue medida utilizando el Kit 2D-quant (GE-HealthCare Life Sciences) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

### 6.7.2 Isoelectroenfoque (1D)

Las proteínas se separaron por su punto isoeléctrico en tiras IPG (pH de 3-10 NL, 7 cm de longitud, GE Healthcare). 250  $\mu$ g de proteínas se llevó un volumen final de 150  $\mu$ L con IPG búfer. Con este volumen de 150  $\mu$ L se recubrió la tira IPG y se le añadió 1 mL de aceite mineral para favorecer la hidratación que se realizó durante 16 h cubriéndola de la luz. El isoelectroenfoque se realizó en un equipo IPGphor (GE Healthcare) y finalizado el

procedimiento las tiras se guardaron en un tubo con tapón de rosca de 15 mL cubierto con papel aluminio a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

### *6.7.3 Electroforesis 2D*

En la segunda dimensión se elaboraron geles de acrilamida (concentrador 10%, separador 5%). Las tiras con las proteínas previamente separadas por su pI se colocaron en búfer de equilibrio (urea 6M, Tris-HCL 75Mm pH 8.8, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002% y agua milliQ) agitándolo durante 15 min en presencia de DTT 1% y después con Iodoacetamida 2.5% cubriéndolo de la luz. Posteriormente, las tiras se colocaron en el gel de acrilamida para separarlas por su peso molecular (PM). El gel se corrió a 100 V en una cámara de electroforesis.

### *6.7.4 Tinción*

Finalizada la corrida del gel se colocó en solución de fijación (etanol 30% y ácido acético 10%) durante 12 h. Transcurrido el tiempo, la solución de fijación se retiró y se le añadió azul de Coomassie (metanol 50%, ácido acético 10%,) por 24 h. Al día siguiente se decantó la solución teñidora y el gel se lavó con agua milliQ hasta contrastarlo completamente y observar la mayor cantidad de spots. Finalizada estas fase, el gel se escaneó en un equipo densitométrico (ChemiDoc XRS+ system, Bio-Rad).

### *6.7.5 Análisis de imagen y digestión de proteínas en gel*

Los geles se analizaron con el software PDQuest 2-D, versión 8.0 (Bio-rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los spots de los geles correspondientes a la proteína de interés se cortaron con un EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) y se colocaron en una placa de 94 pozos. Los fragmentos de geles se lavaron tres veces con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y acetonitrilo las cuales se mezclaron en igual proporción. Para la reducción de proteínas, los fragmentos de geles se cubrieron con una solución de DTT 10 mM (45 min a  $56^{\circ}\text{C}$ ) y se alquilaron con Iodoacetamida 55mM (20 min a TA cubiertas de la luz). Posteriormente se volvieron a lavar con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y acetonitrilo. Finalmente, el sobrenadante fue eliminado y las partículas del gel se secaron a TA. La digestión se procesó siguiendo el protocolo estándar

de Bruker con pequeñas modificaciones. Los fragmentos de geles se incubaron con Tripsina 25 ng/l (Gold mass spectrometry, Promega) en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C. Los péptidos se extrajeron en 50  $\mu\text{l}$  de 0.1% ácido trifluoroacético/acetonitrilo (1:1) por 30 min en agitación a TA y posteriormente se secaron al vacío en un speed vaac (Ependefor).

## 6. 8 Maldi-TOF/TOF

Los péptidos se resuspendieron en TFA 1% y se colocaron con la matriz (ácido  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic) en una placa metálica conductora AnchorChip siguiendo el protocolo de secado de Bruker. El análisis se realizó en un espectrómetro de masas Ultraflextreme (Bruker, USA). La intensidad del láser se ajustó a 50% para la adquisición de las masas parentales y 80-90% para masas fragmentadas realizando de tres o cuatro repeticiones. Para el análisis se consideraron los espectros con intensidad de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$ . La identidad de las proteínas se mapeó con la base de datos de *Drosophila melanogaster* utilizando el motor de búsqueda Mascot con los siguientes parámetros: enzima, tripsina; missed cleavages, 1; modificación fijada, carbamidometil C; modificación variable, oxidación M; tolerancia parental, 0.2 Da y tolerancia de fragmento, 0.5 Da. Las proteínas que presentaron en Mascot un score mayor a 30 se consideraron como identificaciones significativas.

## 6.9 Cuantificación proteómica *label-free*

### 6.9.1 Preparación de la muestra

Diez machos y hembras de la cepa *white+* se colocaron en viales de la DQ3 con 0 ppm Mn añadido (experimental) y 5 ppm Mn (control) para que depositaran huevos durante cinco días. Transcurrido este tiempo, los padres se removieron y horas después de eclosionar las moscas recién nacidas se transfirieron a viales frescos por cinco días. 40 intestinos se disectaron de cada réplica biológica y se colocaron en 100  $\mu\text{L}$  de búfer RIPA suplementándolo con inhibidores de proteasas. Después, los intestinos se congelaron en nitrógeno líquido y se homogenaron tres veces. Posteriormente, 300  $\mu\text{l}$  de RIPA se añadieron y se colocaron en agitación en el cuarto frío por dos horas. Transcurrido el tiempo los homogenados se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante

se transfirió en un nuevo Ependor de 1.5 ml con 500  $\mu$ l de acetona fría. El precipitado se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 20 min. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspendió en 50  $\mu$ l de búfer Laemli 2x y la concentración de proteínas se determinó usando el kit de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific) según indica el fabricante. 15  $\mu$ g de proteína de tres réplicas se concentraron para juntar un pool biológico de 45  $\mu$ g de proteína por cada condición y se introdujeron en un gel SDS-PAGE 10%. El gel se tiñó con azul de Coomassie (Biosafe) y los fragmentos correspondientes se cortaron y digirieron con tripsina de acuerdo con el protocolo descrito por (Shevchenko A, et al., 2006).

### 6.9.2 Espectrometría de Masas

*Label-free* es una técnica de cuantificación de proteínas libre de marcajes y consta de tres principales modos: espectrometría de masas multiplexada (MSE), espectrometría de masas de alta definición (HDMSE) y espectrometría de masas de ultradefinición (UDMSE). En el primer modo, los péptidos digeridos se inyectaron en el espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA) para determinar el área bajo la curva de los iones totales y normalizar la cantidad de proteínas. Los péptidos digeridos se cargaron en una columna simétrica C18 Trap V/M de 180  $\mu$ m x 20 mm, tamaño de poro de 100  $\text{Å}$  y de partícula de 5  $\mu$ m. Para el desalado, se usó la fase móvil A, 0.1% de ácido fórmico (AF) en  $\text{H}_2\text{O}$  y la fase B, 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo con los siguientes gradientes isocráticos: 99.9% de la fase móvil A y 0.1% de la fase móvil B a un flujo de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  durante 3 min. En el modo HDMSE, los espectros se adquirieron del espectrómetro de masas (Synapt G2-Si) utilizando ionización de electrospray y separación de movilidad iónica. Energía de colisión se aplicó para obtener los cromatogramas y los iones precursores se fragmentaron en una rampa de energía de colisión de 19-55 V. De este modo se generaron archivos con una extensión \*.raw y se analizaron con el software DriftScope v2.8 (Water, Milford, MA) con objetivo de aplicar energía de colisión casi específica por cada péptido detectado en el espectrómetro. De este análisis se generaron los archivos con extensión rule (\*.rul) y fueron aquellos que se utilizaron para aplicar energía de colisión por cada péptido detectado en el modo UDMSE separando lo iones de acuerdo con su masa, estado de carga y tiempo de deriva.

### 6.9.3 *Análisis de datos*

Los archivos \*raw que contenían mediciones de MS y MS/MS se normalizaron, alinearon, identificaron y compararon con la base de datos de *D. melanogaster* usando el software Progenesis QI v3.0.3 (Water, Milford, MA). La base de datos se descargó de Uniprot y contenía 21,922 secuencias de proteínas con una última modificación el 26 de enero del 2019. Los parámetros usados para la identificación de proteínas fueron: enzima, tripsina; modificación fijada, carbamidometil (C); oxidación, (M); modificación variable, fosforilación (S, T, Y) y FDR  $\leq$  4%. El Synapt G2-Si se calibró con fragmentos de fibrinopéptido [Glu1]. Los resultados generados del software Progenies se exportaron en archivos \*.xlsx para verificar dos niveles de control de calidad de datos: cantidad de péptidos y de proteínas. Finalmente, la cuantificación de las proteínas se calculó con base al promedio de respuesta de señal de los tres péptidos más intensos de cada proteína identificada en cada condición.

## 7 RNAseq

### 7.1 *Preparación de la muestra*

Diez machos y hembras de la cepa *Oregon-R* se colocaron para depositar huevos en viales de la DQ2 en las condiciones experimental (0 ppm Mn añadido) y control (5 ppm Mn añadido) por cinco días. Pasado este tiempo, retiramos a los padres y después de nacer las moscas se transfirieron por cinco días en viales frescos de comida. Diez intestinos se recolectaron en PBS 1x y se homogenizaron con TRIzol. El ARN se extrajo utilizando el kit Direct-zol RNAMicroPrepkit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se diluyó en agua estéril y se dividió en dos alícuotas; una de ellas se utilizó para evaluar el número de integridad del ARN [(*RIN*) por sus siglas en ingles] y la otra se guardó a -80°C para su uso posterior. El RNA sin degradación y con un *RIN* > 6.7 se utilizó para secuenciación.



## 7.2 Secuenciación y análisis de datos

Librerías de ARN de dos réplicas biológicas de cada tratamiento control (0 ppm Mn) y experimental (5 ppm Mn) se prepararon usando los protocolos estándares de Illumina y se secuenciaron en el equipo de Illumina NextSeq 500.

Archivos \*.fastq se obtuvieron del secuenciador y el primer paso fue realizar el análisis del control de calidad de las genotecas con la herramienta bioinformática FastQC, considerando los siguientes parámetros: calidad de las secuencias por base, *score* de calidad por secuencia, contenido de secuencias por base, contenido de GC por base, contenido de GC por secuencia, distribución de la longitud de la secuencia y contenido de Kmer. Posteriormente, las secuencias se mapearon con el genoma de *D. melanogaster* (versión dm6.24) aplicando la herramienta STAR (Dobin A, et al., 2013) versión 2.5.2.b. El siguiente paso fue la cuantificación de lecturas por gen. Para este fin se usó la herramienta HTSeq-count que proporciona los recuentos por gen (Anders S, et al., 2015). Los datos obtenidos se normalizaron con el método FPKM (Fragments per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped) para eliminar los efectos sistemáticos y asegurar que los sesgos técnicos tengan un impacto mínimo en los resultados finales de expresión diferencial (Robinson and Oshlack, 2010). Finalizada la normalización, se determinó el análisis de expresión diferencial con el paquete de DESeq2 (Love MI, et al., 2014). Finalmente, se nombraron hits de alta confianza (genes expresados diferencialmente) aquellos con cambios >1.5 consistentes entre réplicas y un valor de  $p < 0.05$ .

### 7.2.3 PCR cuantitativa

El ARN se aisló de intestinos de moscas hembra con el kit de extracción Direct-zol RNAMicroPrepkit (Zymo Research). Posteriormente se trató con DNAasa (Invitrogen) y el cDNA se preparó con oligo-dT y la enzima Superscript II. Los primers usados en este experimento se mencionan en la tabla 3 y se obtuvieron de Fly Primer Bank for PCR Primers in *D. melanogaster* (Hu Y, et al., 2013). Las reacciones de qPCR se prepararon usando SYBR® Green PCR Mastermix en un sistema de PCR-TIEMPO REAL StepOnePlus (Applied Biosystems) y los resultados se calcularon usando el método 2-

$\Delta\Delta CT$ . Como control de referencia se usó el primer para el gen *ZnT63C* que codifica un transportador de Zn y que su expresión fue inafectada en el transcriptoma.

**Tabla 3. Lista de *primers* utilizados para los ensayos de PCR cuantitativa.**

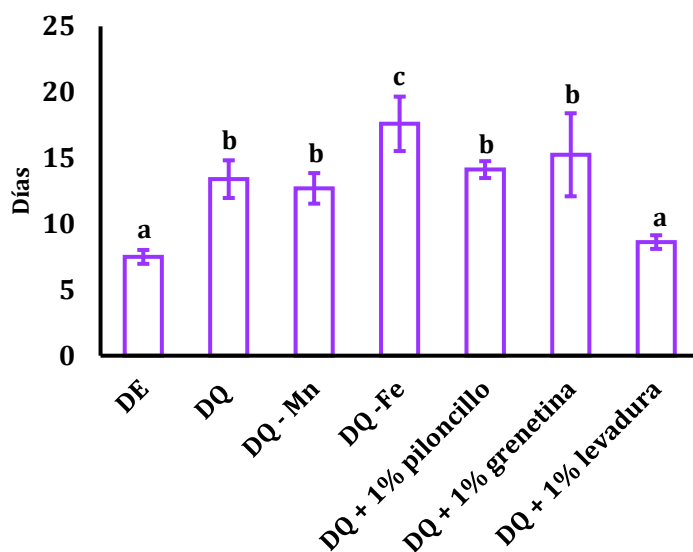
<b>GEN</b>	<b>PRIMERS</b>
<i>sug</i>	CCAGCGATTTTCGTATGCAACT
	GCGGCAATAGTAGAGTCCGTC
<i>CG1946</i>	TCCTGCTGTACTACGGCGAA
	GCTGCGGTAGAATAACCAACCA
<i>Lip3</i>	AAAACGGGTGAATCTTCCAACC
	CCAGCATATAGGCCAGGGA
<i>Amyrel</i>	TTGCCCAGGAGTGTGAGAGT
	TCCTCATTACCAGACCGAGTG
<i>prt</i>	CCTGATTGCCGTGATTGTTTACC
	CGGACGATGTATCCGCCTC
<i>ZnT63C</i>	TTGCGGCCCTGGTCATATC
	GGCCCAGCCAAAAGTGTCT

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Una dieta deficiente de manganeso

La mosca *Drosophila* crece en el laboratorio en una dieta estándar (DE) que se basa en piloncillo, levadura y grenetina, reportada por (Rempoulakis P, et al., 2014). La DE es un medio en donde la mosca crece en condiciones óptimas porque aporta los nutrientes necesarios para su desarrollo y viabilidad, pero no se tiene un control estricto de las concentraciones de los iones metálicos y en particular del Mn.

Por la falta de un quelante específico para reducir las concentraciones del Mn en la mosca, elaboramos una DQ basándonos en el reporte de (Blatch SA & Harrison JF, 2005). La DQ la elaboramos en tres condiciones: DQ sin Mn añadido (DQ-Mn), DQ sin Fe añadido (DQ-Fe) y la DQ control con presencia de todos los iones metálicos. Posteriormente, evaluamos el efecto de la dieta en el desarrollo de la mosca. La Fig. 4 muestra el tiempo de aparición de la primera pupa de las moscas crecidas en la DE y DQ, donde observamos retardo significativo del tiempo de desarrollo en las moscas crecidas en la DQ. Este tiempo de retardo fue mayor en las moscas deficientes de Fe. Para corregir el efecto de demora, evaluamos los elementos de la DE (piloncillo, levadura y grenetina), agregando por separado a la DQ el 1% de estos componentes. Al evaluar el desarrollo observamos que la presencia de 1% de levadura revirtió el tiempo de retardo de la primera pupa (Fig. 4) muy similar al desarrollo de la mosca en la DE.



**Figura 4. Evaluación del tiempo de desarrollo de la mosca.**

La pupa en la DE surge aproximadamente después del día séptimo. El tiempo de desarrollo se extendió a casi el doble en la DQ y el mayor tiempo lo observamos en la DQ-Fe. Las últimas tres barras representan la evaluación del 1% de los componentes de la DE a la DQ. El tiempo de retardo se redujo al agregar 1% de levadura en comparación al piloncillo y grenetina. Se realizó ANOVA de una vía como prueba estadística. Letras repetidas indican que no hubo diferencia significativa. Letras diferentes en cada barra muestran significancia entre cada condición.

Posteriormente, preparamos la DQ con 1% de levadura. A la DQ-Fe donde el tiempo de retardo fue mayor le agregamos una quinta parte del Fe contenido en la DQ control. Seguido de eso, realizamos un análisis elemental por medio de espectrometría de absorción atómica en la mosca completa para determinar la concentración del Mn y otros iones metálicos. Observamos que a pesar de añadir 1% de levadura a la DQ la concentración del Mn en la DQ-Mn era significativamente menor en comparación a la DQ control (Tabla 4). La medición del elemento Fe fue también reducida en la DQ-Fe. Concluimos que dicha dieta podría ser utilizada para generar una disminución del Mn en la mosca.

**Tabla 4. Contenido de metal (mg metal/g de masa seca) de moscas adultas en tres condiciones de la DQ.** ANOVA de una vía. \*\*\*Significancia estadística ( $p < 0.001$ ) prueba de Tukey.

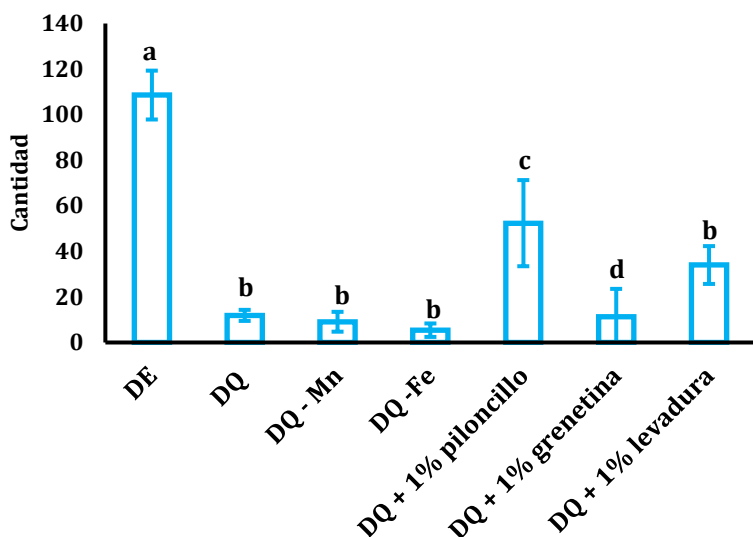
DIETA + 1%levadura	n	Fe	Zn	Cu	Mn
DQ control	3	0.288	0.078	0.025	0.030
DQ-Mn	3	0.317	0.083	0.025	<b>0.008***</b>
DQ -Fe	3	<b>0.170***</b>	0.086	0.039	0.032

Aparte de evaluar el tiempo del desarrollo de la mosca en la DQ también contabilizamos el número de moscas adultas y observamos la población de moscas por abajo del 50% a las que nacen en la DE. No obstante, observamos un efecto positivo cuando le añadimos 1% de piloncillo o levadura (Fig. 5).

La mosca es sugerida como un organismo modelo para el estudio de la homeostasis de los metales (Calap-Quintana P, et al., 2017), pero en insectos no se ha desarrollado un modelo deficiente de Mn. Con objetivo de reducir la deficiencia de este ion, realizamos tres versiones diferentes de DQ, nombrando DQ1 a la DQ que se le añadió 1% de levadura, con la cual efectuaron los ensayos de proteómica en geles 2D.

Los estudios de una DQ en *Drosophila* surgen de Sang JH, (1954). A la fecha existen varios protocolos que describen como preparar una DQ, pero ninguna a sido capaz de dar suficiente cantidad de moscas como las que crecen en el medio que contiene levadura. Numerosos esfuerzos en mejorar una DQ se han presentado, pero ninguna en donde se equilibre los iones metálicos. En este trabajo, realizamos un análisis elemental de la DQ1,

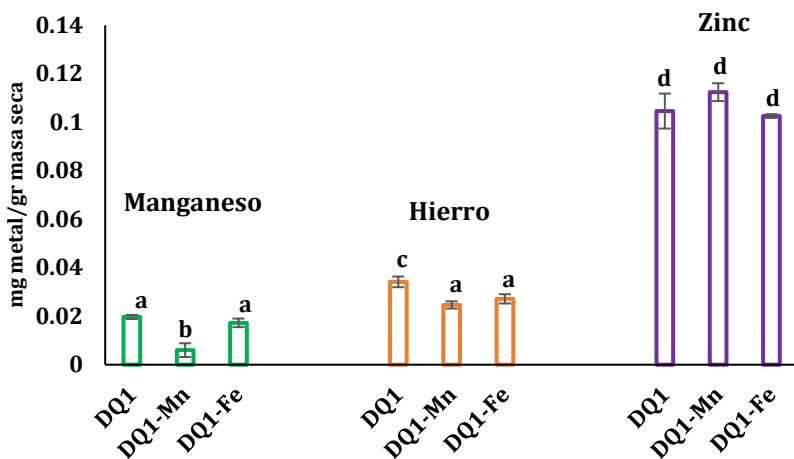
es decir pulverizamos la comida y posteriormente la digerimos con ácido nítrico para determinar la concentración de los principales iones metálicos mediante ICP-OES.



**Figura 5. Cantidad de adultos al cuarto día después de la metamorfosis.**

El número de moscas se contabilizó en las diferentes condiciones de la DQ. La presencia de 1% de piloncillo dio una mayor cantidad de moscas. Se realizó ANOVA de una vía como prueba estadística. Letras repetidas indican que no hubo diferencia significativa. Letras diferentes en cada barra muestran significancia entre cada condición.

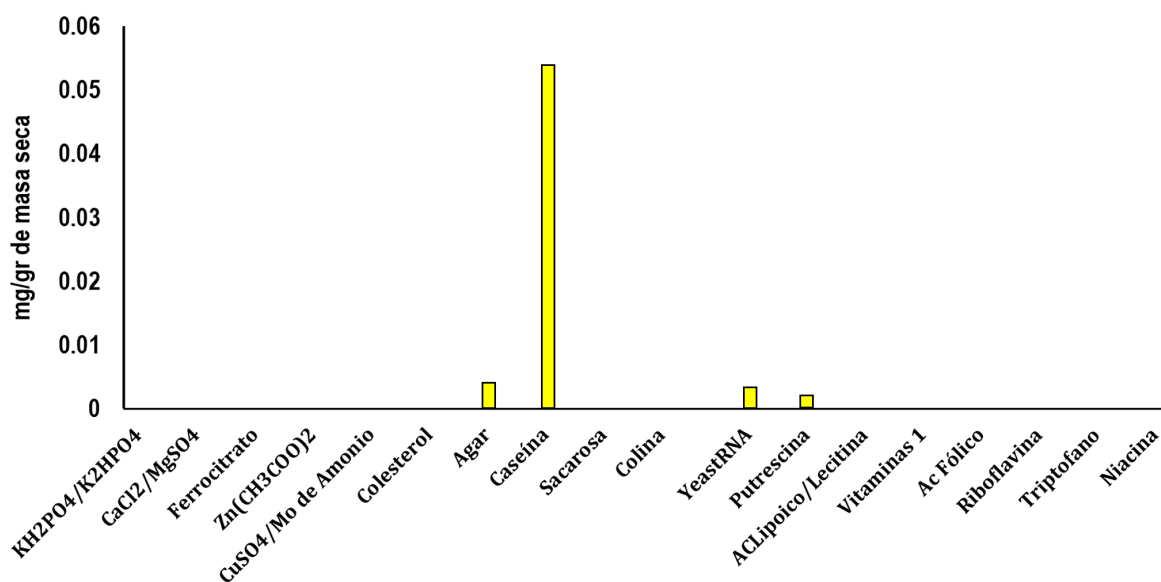
En este análisis encontramos alta concentración del Mn en la comida de la DQ1 y aun en la condición cuando no se le añadía el metal (Fig. 6). También el Fe, fue altamente detectado. El Zn, aquel elemento que no modificamos su concentración en la dieta. Con esto concluimos que la levadura era una fuente de contaminación de metales a la DQ1 que no debimos agregar.



**Figura 6. Mediciones de metales en la comida DQ1.**

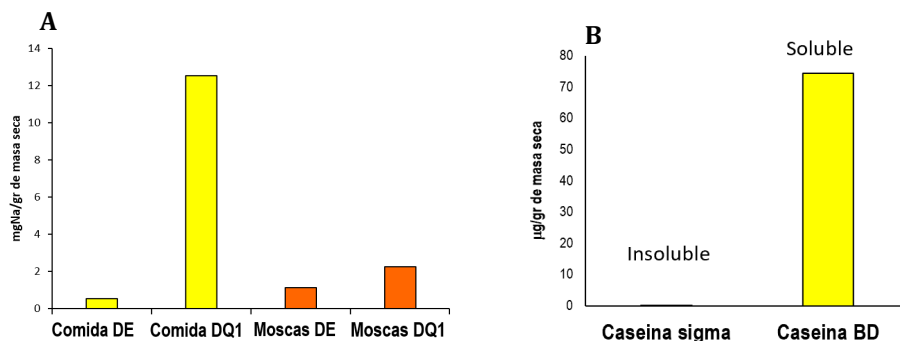
Las barras de color verde representan las mediciones del Mn, las barras naranjas el Fe y las barras moradas las mediciones del Zn. El Mn estaba altamente presente en la DQ1 y aun cuando no se le agregaba el metal. Las concentraciones del Fe no mostraban deficiencia. El Zn fue el elemento que no modificamos su cantidad. Se realizó "Bonferroni post tests" como prueba estadística. Letras repetidas indican que no hubo diferencia significativa. Letras diferentes en cada barra muestran significancia entre cada condición.

Eliminamos la levadura, realizamos una comparación con otros protocolos de DQ (Troen AM, et al., 2007; Reis T, 2016) y optamos suplementar la dieta con putrescina, lecitina y ácido lipoico para inducir un mejor desarrollo de la mosca. Posteriormente, realizamos un análisis elemental de todos los componentes de la DQ1 mencionados en la tabla 1 y encontramos un exceso de sodio en la caseína y presencia en el agar, yeastRNA y putrescina de los cuales posteriormente redujimos su concentración (Fig. 7). El sodio era consumido por la mosca donde también detectamos alta su concentración y en la comida era 12 veces más que en la DE (Fig. 8).



**Figura 7. Mediciones de sodio en componentes de la DQ1**

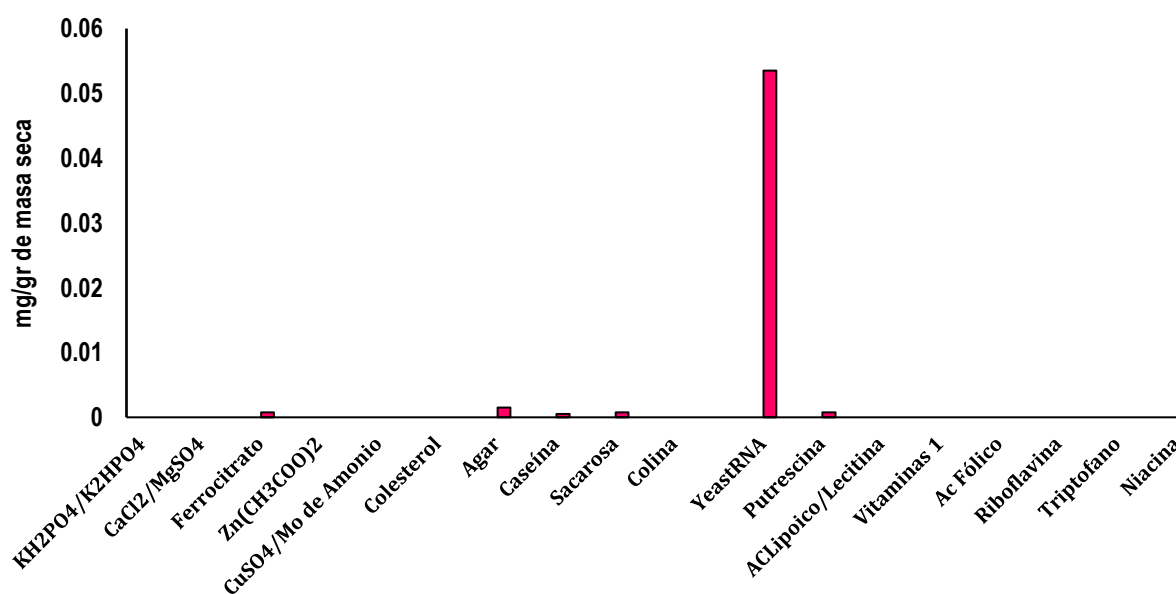
La barra amarilla indica la cantidad de sodio medida por ICP-OES. Fue en la caseína donde detectamos mayor cantidad, pero también en el agar, yeastRNA y putrescina.



**Figura 8. Mediciones del sodio en moscas y comida.**

A. La DQ1 presentaba un exceso de sodio en comparación a la DE. Este incremento se reflejaba en las moscas crecidas en la DQ1. B. Mediciones del sodio en dos caseínas diferentes. La caseína de Sigma no contiene sodio, pero resultó ser insoluble.

Para corregir el exceso de sodio presente en la DQ1 y en la mosca, intentamos cambiar la caseína (BD) por una de la casa comercial Sigma. Sin embargo, al intentar usar esta caseína resultó ser insoluble. Paralelo a esta determinación, también encontramos alta presencia del Mn en el yeastRNA y en otros componentes de la dieta (Fig. 9). Para reducir el sodio de la caseína BD realizamos ensayos de diálisis de membrana para intercambiar el sodio por potasio en la caseína, y el Mn por Mg en el yeastRNA, pero no se tuvo éxito porque afectábamos a los demás iones metálicos. Finalmente, en la DQ1 redujimos las concentraciones de la caseína BD y otros componentes por contaminación de metales nombrándola como DQ2. Además, para mantener el contenido calórico incrementamos la cantidad de azúcar (Tabla 1). Dos condiciones de dieta se elaboraron de la segunda versión: DQ2 con 0 ppm de Mn añadido (experimental) y DQ2 con 5 ppm añadido (control) con la cual secuenciamos el transcriptoma del intestino de la hembra adulta para conocer los cambios de expresión génica en deficiencia del Mn.

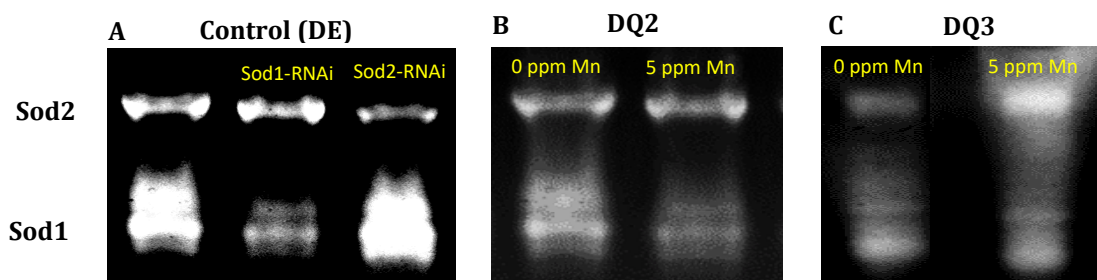


**Figura 9. Mediciones del Mn en los componentes de la DQ1**

En este análisis elemental encontramos un exceso de Mn en el YeastRNA señalado con la barra color fucsia y en menor cantidad en el ferrocitrato, agar caseína, sacarosa y putrescina.

En las moscas crecidas en la DQ2 realizamos experimentos para evaluar la actividad de la Sod2 como biomarcador de la deficiencia del Mn. El ensayo de la actividad de la Sod2 se estableció utilizando el sistema de expresión génica Gal4/UAS con el silenciamiento por RNAi de la Sod1 y Sod2 (Fig. 10 A). Al llevar a cabo este ensayo observamos inafectada la

actividad de la Sod2 aun cuando no se le añadía el Mn (Fig. 10 B), refiriéndolo como la mínima cantidad que requiere la enzima para su óptima actividad. Posteriormente, el yeastRNA se reemplazó por nucleósidos libres: uridina e inosina (Tabla 1). Además, añadimos Myo-Inositol, y cuando realizamos el análisis elemental en las moscas con el ICP-OES detectamos una menor concentración del Mn que se relacionó con la reducción de la actividad de la Sod2 (Fig. 10 C). Con el reemplazo del yeastRNA nombramos a la DQ2 como DQ3 con la cual realizamos los experimentos de proteómica *label free*.



**Figura 10. Ensayo en gel de electroforesis de la actividad de la Sod1 y 2**

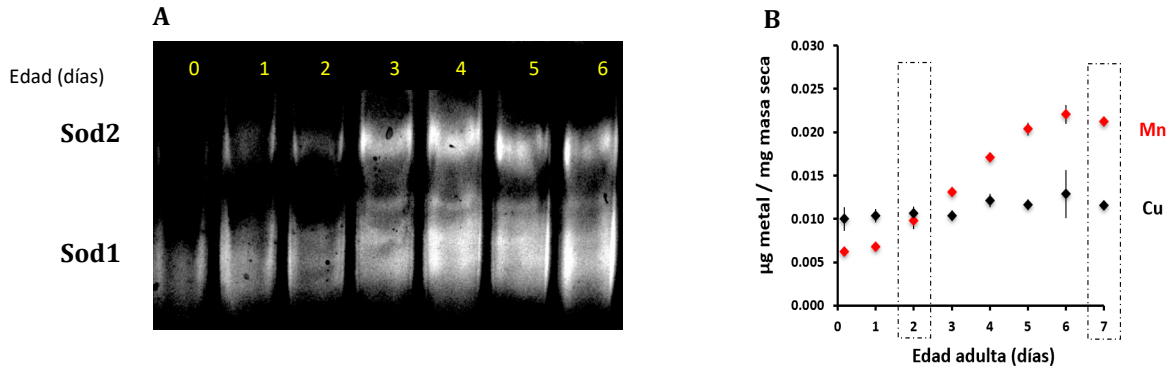
**A.** Control experimental. Para determinar la banda correspondiente a la Sod1 o 2 utilizamos silenciamiento por RNAi. La banda que se reduce corresponde a la Sod con el RNAi. **B.** Actividad enzimática de la Sod en moscas crecidas en dos condiciones de la DQ2 donde la actividad enzimática no fue afectada. **C.** También actividad enzimática, pero de moscas cultivadas en la DQ3. En esta tercera versión de la dieta observamos reducida la actividad de la Sod2, definiéndola como biomarcador de la deficiencia del Mn.

## 7.2 Sod2 un indicador de la deficiencia del manganeso

Se aplicó el ensayo de Sod2 en las moscas crecidas en la DE. Realizamos una curva de edades de la mosca de cero a siete días y observamos que la mosca nace con baja actividad de la Sod2 y lo incrementa durante los primeros días de vida (Fig. 11 A). Este incremento se correlacionó con las mediciones del Mn en las edades de las moscas (Fig. 11 B). Los otros metales fueron inafectados. Los días dos y siete de edades de la mosca se seleccionaron para corroborar el incremento del metal y volvimos a observar el cambio en la diferencia de edades para el Mn, pero no en el Fe, Cu y Zn (Fig. 12).

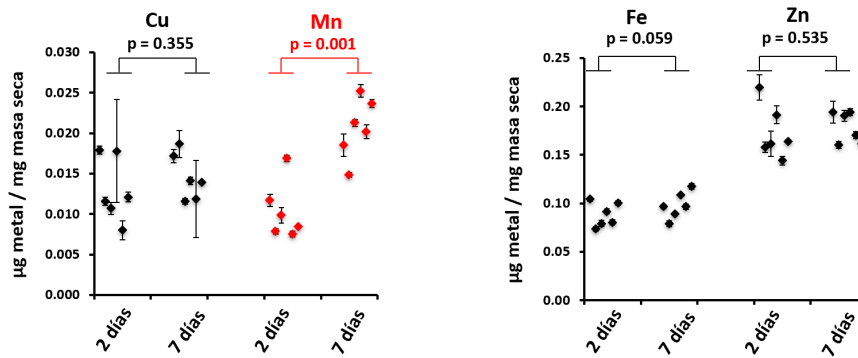
Fue en las moscas crecidas en la DQ3 que presentaron 0.0002 mg de Mn/gr de masa seca donde observamos una menor actividad de la Sod2 (Fig. 10 C). El Mn también se midió en las moscas crecidas en la DQ3.





**Figura 11. Actividad de la Sod2 y 1 en diferentes edades de la mosca crecidas en la DE**

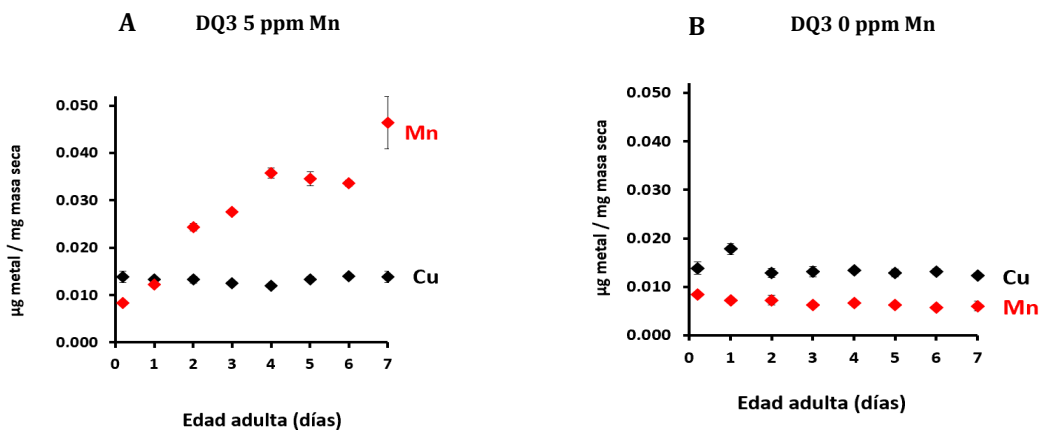
**A.** Al día cero la mosca tiene poca actividad de la Sod2 y lo incrementa en la primera semana de vida. **B.** La actividad de la Sod2 se correlaciona al Mn medido en la mosca completa. El día dos y siete se seleccionaron para volver a monitorear el aumento del Mn.



**Figura 12. Mediciones del Mn en los días dos y siete de edad de la mosca crecidas en DE**

Se muestran las mediciones del Mn, Cu, Fe y Zn, en la mosca completa. Solamente el Mn cambió significativamente en comparación a los otros iones. La  $p$  corresponde una prueba de  $t$ .

Los resultados para la DQ control, es decir cuando se suplementa con 5 ppm de Mn, indicaron aumento del Mn conforme crece la mosca (Fig. 13 A) de la misma manera como sucede en la DE (Fig. 11 A). Sin embargo, cuando a la DQ no se le agrega el Mn los resultados mostraron constante la concentración del Mn (0.008 mg/gr de masa seca) durante los días uno a siete. Concluyendo que la cantidad del metal medido corresponde a la mínima cantidad requerida por la Sod2 para su actividad catalítica y la sobrevivencia de las moscas.



**Figura 13. Mediciones de Mn en las moscas crecidas en la DQ3**

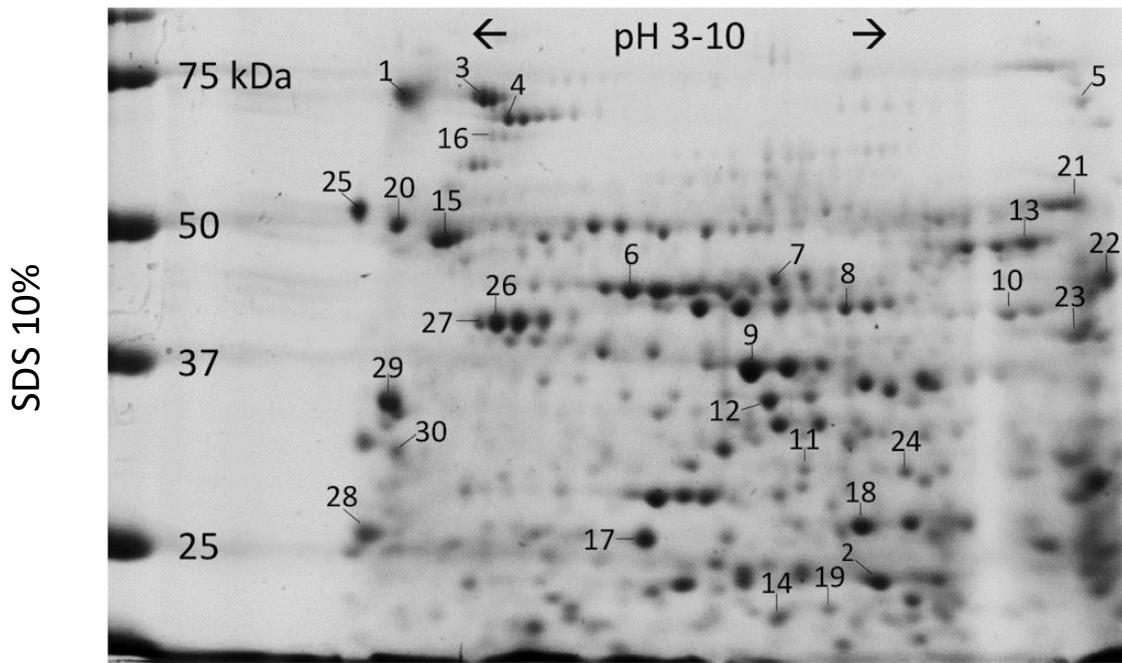
**A.** En la dieta control (5 ppm de Mn añadido) las mediciones del Mn aumentaron de manera creciente relacionándose con la Fig. 12. **B.** Cuando a la dieta no se le añade el metal, el metal se mantiene constante, indicando la mínima cantidad del Mn necesario para la actividad de la Sod2.

### 7.3 Proteoma intestinal con geles 2D

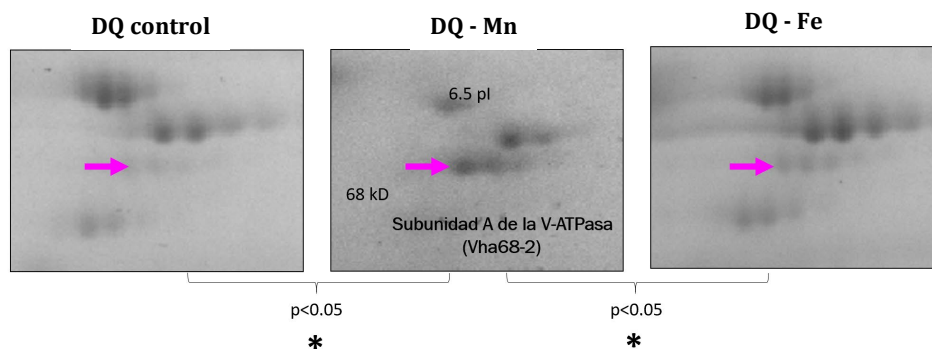
Estos experimentos se realizaron con la DQ1 en tres condiciones: DQ control, DQ-Mn y como un control adicional la deficiencia de Fe (DQ -Fe). A diferencia del transcriptoma intestinal de *D. melanogaster* descrito a detalle, información correspondiente al proteoma es limitada. En los últimos años con el surgimiento de la proteómica de alto rendimiento se han caracterizado varios proteomas de tejidos de mamíferos, pero en invertebrados el diminuto tamaño que presentan los tejidos y la cantidad de muestra requerida lo vuelve complicado. Previo a mencionar la comparación del proteoma en respuesta a la disminución de Mn, describimos brevemente las proteínas intestinales más abundantes. 90 spots fueron reproducibles de tres ensayos independientes contabilizados con el software de análisis de geles 2D PDQest (Fig. 14). De los 90 spots, 60 se analizaron por espectrometría de masa Maldi/TOF-TOF y 30 correspondieron a diferentes proteínas enlistadas en la tabla 5. Dentro de estas proteínas destacan enzimas digestivas, glucolíticas y de respuesta al estrés, subunidades de la F y V-ATPasa, proteínas involucradas en el almacenamiento de energía y componentes principales del citoesqueleto.

Para conocer proteínas que respondieran a la deficiencia del Mn, tres replicas independientes de geles 2D por cada condición se analizaron el software PDQest. Como resultados, solo una proteína respondió a la ausencia del Mn incrementando su expresión. Con análisis de espectrometría de masas Maldi/TOF determinamos se trataba de la

subunidad A de la V-ATPasa (Vha68-2 referida en *D. melanogaster*). Consultando Fly atlas (<http://flyatlas.org/atlas.cgi>) observamos que el gen Vha 68-2 es altamente expresado en el intestino y codifica para la subunidad que apoya la actividad catalítica de la bomba de protones V-ATPasa. También identificamos otra subunidad de la V-ATPasa (Vha26) pero no respondió al tratamiento sin Mn.



**Figura 14. Gel 2D representativo de las proteínas del intestino de la mosca hembra adulta**  
Cada *spot* indica una proteína que se separó de acuerdo con su pI y PM, previamente descrito en métodos. Los números indican el orden de la descripción de proteínas enlistadas en la tabla 5.



**Figura 15. Análisis de geles 2D.**

La V-ATPasa aumentó su expresión en la deficiencia del Mn y corresponde al *spot* señalado por la flecha color rosado que es menor en la DQ control y la deficiente de Fe.

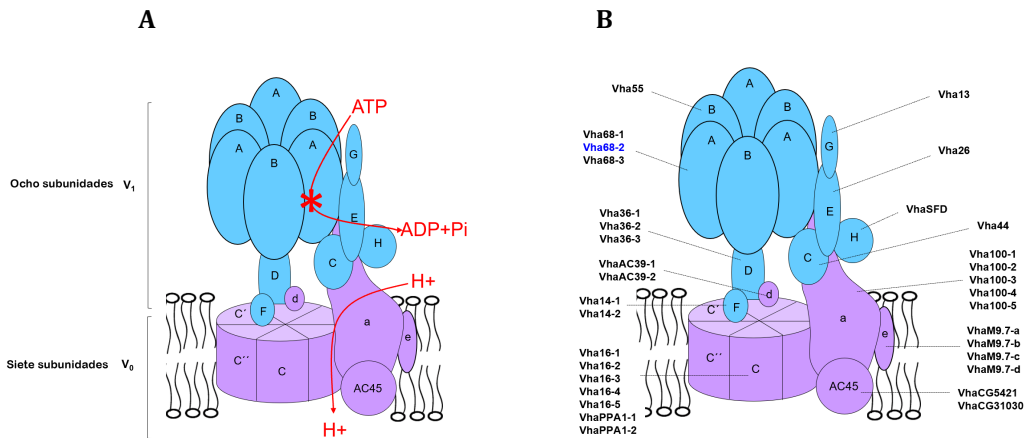
**Tabla 5. Proteínas del intestino identificadas por Maldi-TOF**

Nº	Proteína	Código de acceso	Nombre completo y función
			<b><i>Enzima digestiva</i></b>
1	Mal-A1	Q9V4T6	Maltasa A1 (rompe disacaridos para liberar glucosa)
			<b><i>Detoxificación y de respuesta al choque térmico</i></b>
2	Adh	Q50L96, Q8N0A0	Alcohol dehidrogenasa
3	Hsc70-3	F3YDH0	Proteína Heat shock 70 kDa cognate 3
4	Hsc70-4	Q9VFB0	Proteína shock 70 kDa cognate 4
			<b><i>Transporte de lípidos</i></b>
5	Apolpp	Q94907	Apolipoproteínas (transporta lípidos, fosfolípidos y esteroides)
6	Yp1	Q9W2Y9, P02843	Proteína Yolk 1 (vitellogenina; lipoproteína y actividad de lipasa)
7	Yp2	Q9W2Z0, P02844	Proteína Yolk 2 (vitellogenina; lipoproteína y actividad de lipasa)
8	Yp3	Q9VY89, P06607	Proteína Yolk 3 (vitellogenina; lipoproteína y actividad de lipasa)
			<b><i>Almacenamiento de energía</i></b>
9	Argk	Q9VST5, Q9VST6	Arginina cinasa
			<b><i>Glucólisis</i></b>
10	Ald1	A4V3F9, P07764	Aldolasa 1
11	Gapdh1	P07486, A4UZ75	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa 1
			<b><i>Ciclo del ácido tricarbóxico</i></b>
12	Tpi	Q7JNS1, O76996	Fosfato triosa isomerasa
			<b><i>Bomba de protones</i></b>
13	Blw	Q9W1Z7	ATP sintasa, subunidad $\alpha$
14	ATPsynD	Q24251, A4V344	ATP sintasa, subunidad D
15	ATPsyn $\beta$	Q9V494	ATP sintasa, subunidad $\beta$
16	Vha68-2	Q9V3M7	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPasa 68 kDa subunidad 2
17	Vha26	Q9V3K4, P54611	Vacuolar H <sup>+</sup> ATPasa 26 kDa subunidad E
			<b><i>Transporte entre la membrana y el citoplasma</i></b>
18	Porin	Q94920, Q29QZ3	Porina (canal de aniones dependiente de voltaje)
			<b><i>Enzimas redox</i></b>
19	Jafrac1	Q9V3P0, Q0KHT0	Tioredoxina peroxidasa 1
20	Pdi	Q9VUL7	Proteína disulfuro isomerasa
21	Cat	Q9VVT1	Catalasa
			<b><i>Transcripción y síntesis de proteínas</i></b>
22	eEF1a1	Q9VHA3	Factor de elongación de traducción eucariótica 1 alpha 1
23	Prp38	Q7JVL3	Factor de procesamiento Pre-mRNA 38
			<b><i>Traducción de señal</i></b>
24	RACK1	Q9VLW5, O18640	Guanine nucleotide-binding subunit beta like protein
25	CALR	Q9VHA3, P29413	Calreticulina
			<b><i>Citoesqueleto</i></b>
26	Act5C	Q24227, P10987	Actina 5C
27	Act79B	Q9VNW5, P02574	Actina 79B (específica de músculo)
28	Mlc2	P18432, Q9VA98	Myosin light chain 2
29	Tm1-PK	Q955Z3, P06754	Tropomiosina 1 isoforma 9A
30	Tm1-PO	Q7KSH9	Tropomiosina 1 isoforma 33/34

## 7.4 V-ATPasa en la homeostasis de los metales

La bomba de protones V-ATPasa, se divide en dos complejos: V0 membranaral y V1 citoplasmática. Está conformado por 15 subunidades que se coordinan en conjunto para su actividad (Fig. 16). En *D. melanogaster*, cinco subunidades se localizan en el citoplasma y se codifican por un solo gen, es decir solo tienen una isoforma. El resto de las diez subunidades están embebidas entre la membrana y el citoplasma y son codificadas por 29 genes.

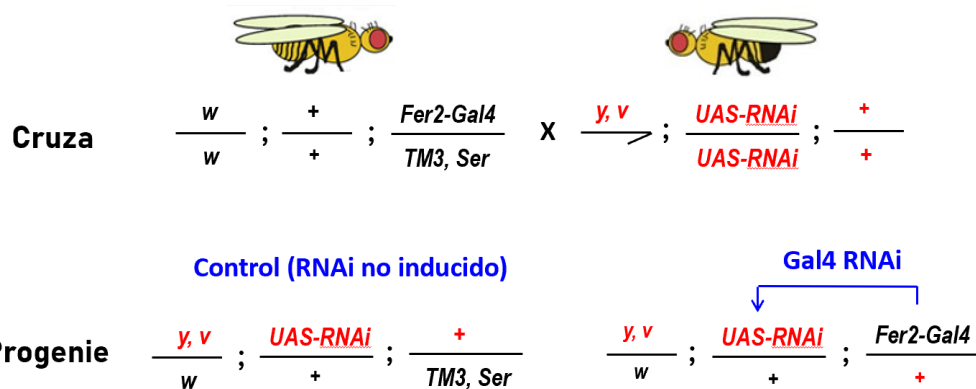
Algunas subunidades de la V-ATPasa en *D. melanogaster* se han silenciado con RNAi, indicando que el mantenimiento del pH bajo en la región ácida del intestino depende de este complejo proteico, además de ser altamente expresado en esta zona (Overend G, et al., 2016). En el tracto intestinal de la larva de tercer estadio, la V-ATPasa favorece un ambiente electroquímico y el transporte de iones de K<sup>+</sup> (D'Silva NM, et al., 2017). Mohr SE, et al., (2018), en una búsqueda genómica funcional a gran escala en células S2R<sup>+</sup> de *Drosophila* expuestas a la toxicidad por Zn o Mn, indicaron que genes correspondientes a algunas subunidades de la V-ATPasa confieren resistencia a la toxicidad en presencia del Mn.



**Figura 16. Estructura de la V-ATPasa.**

**A.** La V-ATPasa tiene dos dominios, V1 formado por ocho subunidades citoplasmáticas y V0 por siete membranales. Su función es generar protones de la hidrólisis del ATP. **B.** En *Drosophila* se conocen 33 genes que codifican para la bomba de protones. Cinco subunidades se codifican por genes exclusivos y ocho por 29 genes. La subunidad Vha-68-2 que respondió a la disminución del Mn en los geles se indica en color azul.

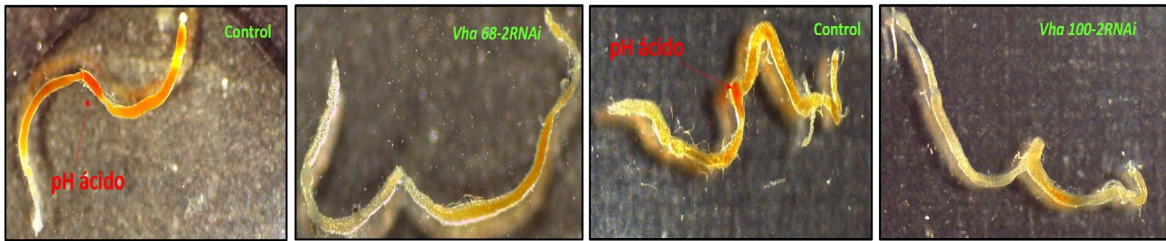
Para investigar la relación de la V-ATPasa en la homeostasis del Mn, aplicamos RNAi a 23 genes de subunidades que la conforman. Usamos el sistema de expresión génica Gal4/UAS (Missirlis F, et al., 2003). El primer driver o cepa de mosca con presencia del gen Gal4 para realizar el silenciamiento tejido-específico fue Fer2Gal4 (Rosas-Arellano A, et al., 2016) , que tiene una fuerte expresión en la zona ácida del intestino. Hembras vírgenes de este driver se cruzaron con líneas del RNAi de las distintas subunidades que contenían el elemento UAS RNAi. De esta progenie, dos tipos de moscas se obtuvieron: la mosca experimental RNAi y la mosca control identificada fenotípicamente por la presencia del cromosoma balaceador TM3 (Fig. 17).



**Figura 17. Esquema de cruce de moscas.**

*D. melanogaster* tiene tres cromosomas que se representan separados por un punto y coma. Una mosca hembra con la proteína Gal4 se cruzó con una mosca macho que contenía el elemento *UAS-RNAi*. De la progenie se obtuvieron las moscas control y con el RNAi inducido. Los genes de la mosca macho se indican en color rojo. En la progenie se observa la recombinación de un gen del padre y la madre.

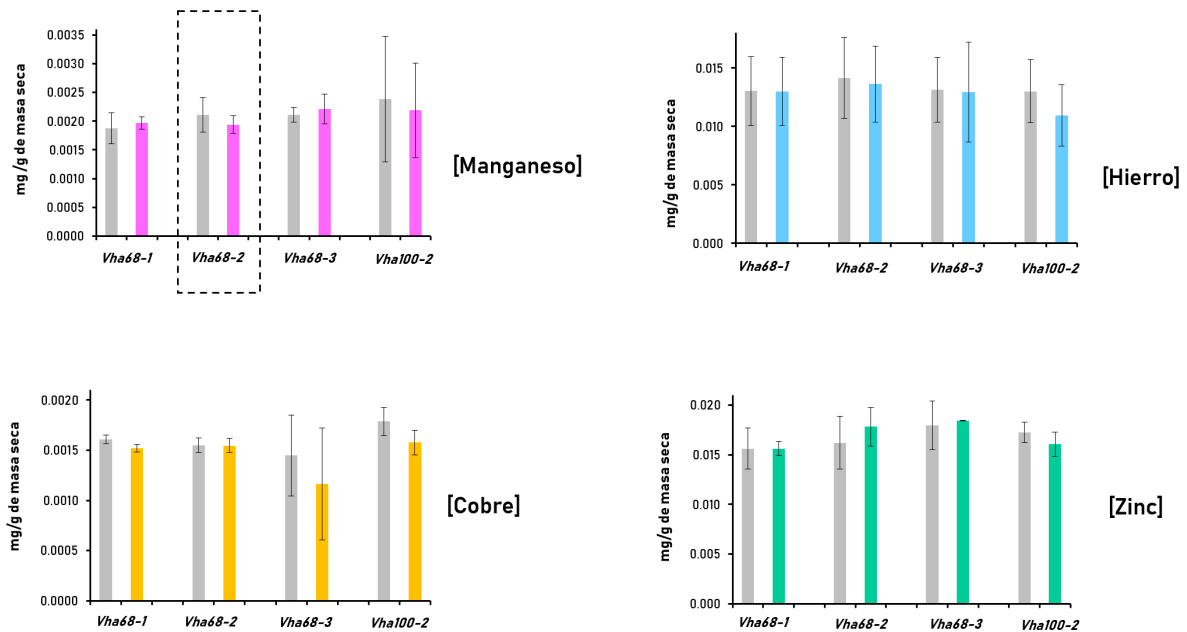
La funcionalidad de los RNAi se determinó con ensayos de observación de pH en el lumen intestinal, considerando el reporte de la participación de la V-ATPasa en la acidificación del intestino de la mosca (Overend G, et al., 2016). Estas observaciones, efectivamente indicaron el efecto del RNAi de la bomba en el pH intestinal y así comprobamos indirectamente la función del RNAi (Fig. 18). Las mediciones de los iones metálicos Mn, Fe, Cu, Zn, fosforo, calcio, potasio, sulfuro y magnesio se realizaron con ICP-OES en la mosca completa. El RNAi para el gen *Vha68-2* y sus otras isoformas resultaron inafectadas para el Mn y el resto de los metales (Fig. 19), indicando que el pH luminal no influencia en la actividad de la V-ATPasa para la absorción de los metales.



**Figura 18. Determinación del pH luminal.**

Moscas RNAi con sus respectivos controles se sometieron a la determinación del pH que se observó de color rojo en la zona media del intestino que se ausenta en la mosca experimental. Se muestran determinaciones para dos RNAi, *Vha68-2* y *Vha100-2*.

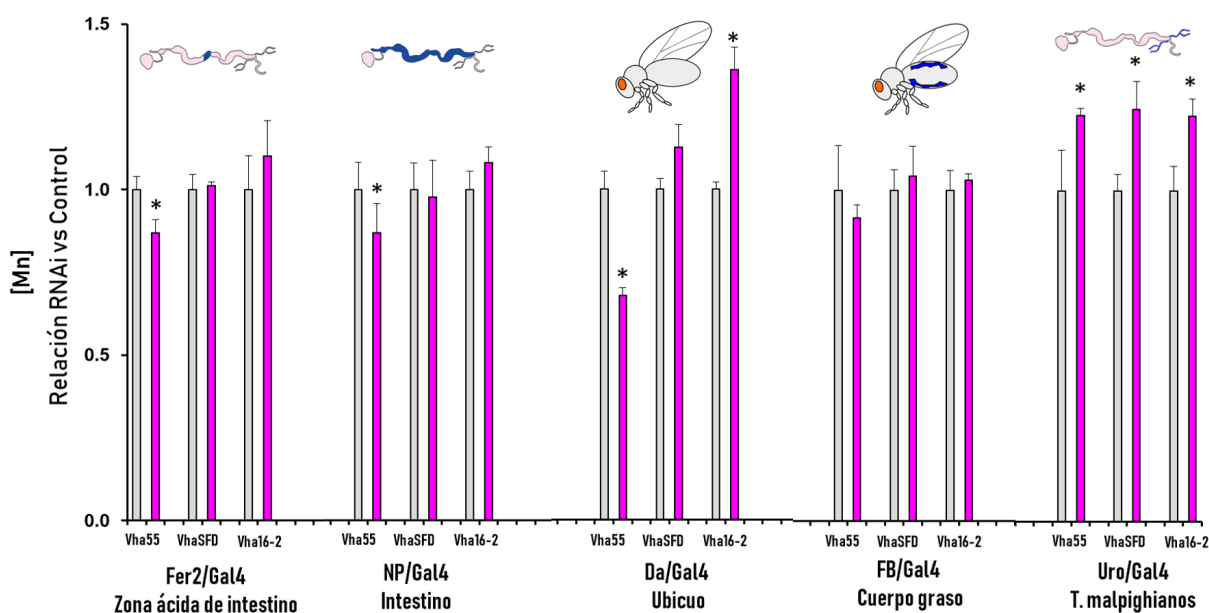
Posteriormente, realizamos un análisis similar para el resto de las subunidades enlistadas en la tabla 2, donde observamos que en algunos casos había un cambio en la acumulación del metal en las subunidades *Vha55*, *VhaSFD* y *Vha16-2* (Fig. 20).



**Figura 19. Metalomas de moscas con RNAi en genes que codifican para la V-ATPasa**

La subunidad A es codificada por tres isoformas (*Vha68-1*, *Vha68-2* y *Vha68-3*). Se muestra *Vha100-2* por ser de alta expresión en el intestino. La barra gris representa las moscas controles y las de colores al metal correspondiente indicado en paréntesis en la parte derecha de cada gráfica. En el gen *Vha68-2* encerrado con el rectángulo punteado y para los otros genes no observamos cambios en la medición del Mn ni para los otros iones metálicos (Fe, Cu y Zn).

Para conocer si estos cambios se conservaban en el intestino completo (NP-Gal4) o en algún otro sitio de la mosca utilizamos primeramente un driver de localización ubicuo Da-Gal4 y posteriormente dos drivers de expresión dirigida: uno en el cuerpo graso (Fb-Gal4) y el otro en los túbulos malpighianos (Uro-Gal4). La V-ATPasa en los túbulos malpighianos, ha sido extensamente estudiada como un modelo para la absorción de iones (Dow JA, et al., 1994; Ianowski JP & O'Donnell MJ, 2004; Linton SM & O'donnell MJ, 2000). Los datos del silenciamiento con el driver ubicuo y los dirigidos para las subunidades Vha55, VhaSFD y Vha16-2 indicaron disminuir la concentración del Mn en los túbulos malpighianos (Fig. 20), indicando un posible sitio de regulación para este ion. Los metalomas del resto de los iones y subunidades de la V-ATPasa se depositaron en un repositorio en línea <http://www.flyrnai.org/tools/metallomes2/web/> elaborado en este trabajo.



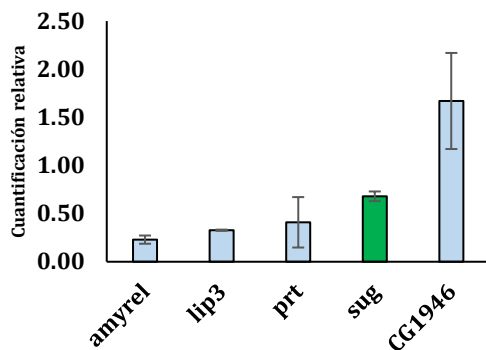
**Figura 20. Metalomas de moscas con RNAi inducidos por cuatro diferentes drivers**

En la parte superior de la imagen se representa gráficamente en la mosca el sitio dirigido del RNAi en color azul marino. Las barras grises indican la relación de las mediciones de metales en el RNAi vs control normalizadas a 1. Los túbulos malpighianos fue el lugar donde observamos incremento del Mn de forma consistente. Este es el sitio análogo a los riñones en mamíferos.



## 7.5 Transcriptómica intestinal en ausencia del manganeso

La transcriptómica estudia y compara los conjuntos de ARN mensajeros o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo. Como los proteomas, los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando en un momento dado. Para investigar proteínas y mensajeros en respuesta a la deficiencia de Mn aplicamos RNAseq en el intestino de la mosca crecida en condiciones de la DQ2. Del análisis de secuenciación masiva, 540 genes respondieron a la deficiencia de Mn. La tabla 6 resume los genes agrupados de acuerdo a su función y se indica el cambio en su expresión diferencial (up o down). Para validar este experimento, seleccionamos algunos genes para corroborar su expresión diferencial con ensayos de qPCR en dos librerías de cDNA adicionales. Elegimos el gen que codifica para la diacil gliceroltransferasa, *Dgat2* y *CG1646*, los cuales incrementaron 2 y 3 veces con respecto al control, mientras que los genes *Lip3* y *Amirel* que codifican para la lipasa y amilasa, redujeron 5 y 6 veces respectivamente. El cambio de estos genes puede estar dado por la actividad del factor de transcripción *sugarbabe* (*sug*) que regula el metabolismo de los carbohidratos (Zinke I, et al., 2002). La expresión de *Sug* incrementó en el transcriptoma (Tabla 6). Usamos como control el gen *Znt63C* que codifica para un transportador de Zn que no se afectó en los datos del RNAseq. Efectivamente como esperábamos los transcritos fueron validados en su respectiva respuesta de aumento o disminución al tratamiento sin Mn, pero el gen *Sug* se comportó de una manera ambigua, posiblemente en su papel de regulador (Fig. 21). También confirmamos la disminución del gen *Portabella* (*prt*) que en *Drosophila* codifica para un transportador de iones vesicular (Brooks ES, et al., 2011).



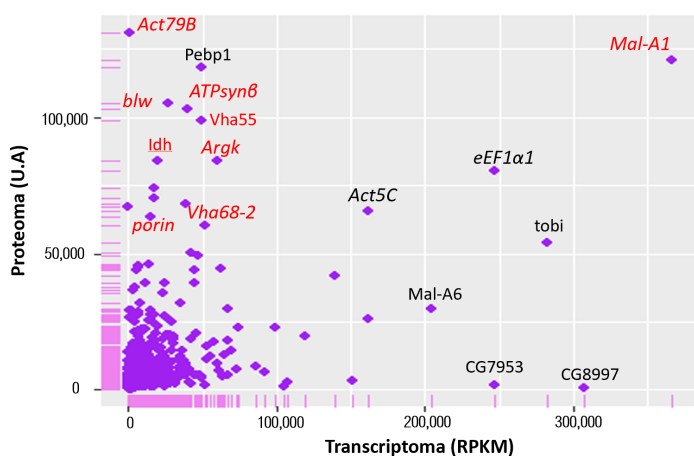
**Figura 21. qPCR de cinco genes seleccionados para validar el experimento de RNAseq**

Las barras de color azul indican cambios en la misma dirección del experimento de RNAseq. La barra verde representa el gen *sug* que mostró un incremento en el transcriptoma, el cual no se confirmó en los ensayos de qPCR.

## 7.8 Cuantificación de proteínas *label free*

### 7.8.1 Proteínas más abundantes en el intestino

La cuantificación *label free* es un método de espectrometría de masas que permite cuantificar la cantidad relativa de proteínas en dos o más muestras sin utilizar marcaje con isótopos (Neilson KA, et al., 2011). Al reemplazar el yeastRNA por nucleósidos uridina e inosina (Dieta que nombramos como DQ3), el déficit de Mn se aminoró y observamos menor actividad de la Sod2 (Fig. 10 C). La cuantificación *label free* se realizó en dos experimentos independientes de un pool de muestras biológicas correspondientes a intestinos de la mosca silvestre *white+* criadas en la DQ3. En el primer experimento se identificaron 1195 proteínas y 882 en el segundo, de las cuales 649 fueron reproducibles en ambos experimentos y se compararon con la expresión de sus transcritos (Fig. 23). En la tabla 7 se enumeran las proteínas intestinales más abundantes y se clasifican de acuerdo con su función molecular. Las 30 proteínas identificadas por MALDI-TOF en los geles 2D fueron reconocidas por ésta otra técnica de proteómica y nueve de ellas correspondieron a las diez más abundantes: Actina 79B, actina 5C, maltasa A1, factor de elongación 1- $\alpha$ , ATPsintasa  $\beta$  y ATPsintasa D, ATPsintasa  $\alpha$ , porina y la arginina cinasa (Fig. 22).



**Figura 22. Cuantificación de proteínas y sus mensajeros más abundantes en el intestino**

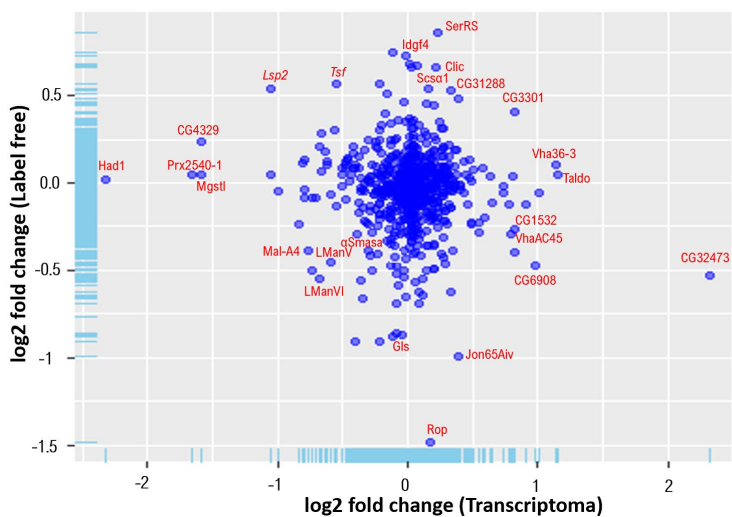
Las lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas (RPKM) que son las unidades del transcriptoma se graficaron en el eje de las x vs las unidades arbitrarias (U.A) de la cuantificación de proteínas. En color rojo se resaltan las nueve proteínas más abundantes identificadas en los geles 2D.

En el transcurso de este trabajo (Tain LS, et al., 2017) mediante LC-MS caracterizaron el proteoma intestinal pero unido a los túbulos malpighianos y resaltaron una alta actividad del proteosoma. De las proteínas más abundantes en la tabla 7 se encuentran la familia de

las maltasas y aproximadamente 100 proteasas necesarias para el metabolismo de carbohidratos y proteínas. Igualmente, lipasas y proteínas de movilización de ácidos grasos son de gran presencia en el intestino para la absorción y movilización de los lípidos en la dieta. Alcohol y aldehído deshidrogenasa y citocromo oxidasa se concentran para las reacciones de detoxificación. Asimismo, enzimas antioxidantes y proteínas de choque térmico son numerosas en el intestino. Identificamos proteínas del citoesqueleto propias del enterocito y de células enteroendócrinas. La arginina cinasa cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo ( $\text{PO}_4^-$ ) de la fosforilarginina a un ADP, generando ATP y arginina. Sobreabundan las bombas de protones F-ATPasa y V-ATPasa empleadas para la regulación del pH intestinal. Enzimas de la vía glucolítica, del ciclo de Krebs y complejos de la fosforilación oxidativa también sobresalen en el intestino. Concluyendo que todas estas proteínas citadas conforman el centro de actividad del intestino que es la absorción de nutrientes.

## 7.9 La deficiencia de manganeso en el intestino

Para analizar los cambios del aumento o disminución en proteínas y genes, los datos generados se visualizaron graficando el cambio proporcional de genes o fold change (su nombre en inglés) que va de -2 a 2 en una escala logarítmica contra los cambios respectivos obtenidos para las proteínas (Fig. 23).



**Figura 23. Correlación de proteínas y mensajeros en respuesta a la deficiencia del Mn**

En color rojo se resaltan las proteínas descritas en el texto y en la tabla 8. Los datos completos se encuentran depositados como material suplementario en Vásquez-Procopio, et al., 2020.

Al tener una deficiencia de Mn, esperábamos afectar las enzimas dependientes de este ion metálico. Con la DQ3 aminoramos la actividad de la Sod2 cuando no se le agrega el metal a la dieta, mostrando una menor reducción de Mn en la mosca. Esta enzima juega un papel antioxidante, elimina el superóxido generado por la actividad de la cadena respiratoria (Robinson BH, 1998). Algunos investigadores han informado una menor actividad catalítica de la Sod2 en el corazón e hígado de animales deficientes de Mn (Sheri Zidenberg, et al., 1983; Cindy D. Davis, et al., 1989). Cuando se interrumpe la actividad de la Sod2 los iones superóxidos quedan libres en la matriz mitocondrial y son potencialmente tóxicos (Wong HS, et al., 2017) que destruyen los centros [Fe-azufre] de las proteínas como aconitasa y succinato deshidrogenasa (Gardner PR & Fridovich I, 1991; Gardner PR, et al., 1995) alterando el ciclo de Krebs e interrumpiendo la homeostasis del Fe (Marelja Z, et al., 2018)

En esta cuantificación proteómica *label free*, observamos algunos marcadores típicos de la deficiencia del Fe en respuesta a la afectación de la Sod2: las dos subunidades de la ferritina (proteína almacenadora de Fe) fueron reducidas y el sensor de Fe citosólico IRP-1A, así como de su proteína reguladora Cisd-2 (Tabla 8) (Huynh N, et al., 2019). También observamos el incremento de la transferrina. Esta proteína se ha indicado se secreta del cuerpo graso en respuesta a un bajo Fe sistémico (Xiao G, et al., 2019). La unión de la transferrina a la membrana basolateral del intestino explica porque el mRNA se redujo (Fig. 23). Isocitrato deshidrogenasa y la succinil CoA ligasa, enzimas intermediarias del ciclo de Krebs también se redujeron.

La glutamina sintetasa (GS) es otra metaloenzima que depende del Mn. La célula requiere GS para la formación de glutamina añadiendo grupos de amonio al glutamato. Existen dos isoformas: mitocondrial (GS1) y el citoplasma (GS2) (Wedler FC & Denman RB, 1984). Ambas GS1 y GS2 respondieron de manera decreciente en condiciones restrictivas del Mn. La célula también realiza la reacción inversa, el paso de glutamina a glutamato, y esta reacción la lleva a cabo la enzima glutaminasa (Windmueller HG, 1982) que fue disminuida en este análisis (Fig. 24) como respuesta a una menor actividad de la GS. El glutamato es un neurotransmisor excitatorio y precursor de un neurotransmisor inhibitorio, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que tienen un papel esencial en las interacciones neurona-glía

(Sidoryk-Wegrzynowicz M, et al., 2009). La enzima transaminasa aminobutírico, necesaria para la síntesis de GABA, fue también reducida en esta búsqueda. Interesantemente, estos datos nos sugieren una participación del Mn en la señalización glutaminérgica y gabaérgica, pero desconocemos como puede darse este mecanismo.

Los esfingolípidos son componentes esenciales de la membrana. Tanto en mamíferos como en insectos, estas biomoléculas son claves para el proceso de desarrollo como la embriogénesis, neurogénesis y gametogénesis (Acharya U & Acharya JK, 2005; Kraut R, 2011). Su unidad estructural es la ceramida, formada por la unión de una molécula de esfingosina con un ácido graso. Dependiendo de la naturaleza del grupo polar que se une a la ceramida los esfingolípidos se pueden dividir en esfingomielinas y esfingoglucolípidos. Las esfingomielinas (SM) son esfingolípidos donde la ceramida se une a un grupo fosfórico y éste a su vez se esterifica con un aminoalcohol (colina, serina o etanolamina) (Tafesse FG, et al., 2006). En mamíferos, la biosíntesis de SM es catalizada por la enzima PC:ceramida colinafosfotransferasa (EC2.7.8.27) o SM sintasa (SMS). Esta enzima realiza la transferencia de fosfocolina de fosfatidilcolina a una ceramida produciendo SM y diacilglicerol (Voelker DR & Kennedy EP, 1982). Las células de mamíferos contienen dos SMS, identificados como SMS1 y SMS2. SMS1 se encuentra en el aparato de trans-Golgi, mientras que SMS2 se asocia principalmente en la membrana plasmática (Tafesse FG, et al., 2006).

*D. melanogaster* carece de SM y en su lugar sintetiza un análogo conocido como ceramida fosfoetanolamida (CPE), el principal esfingolípidos de membrana (Rietveld A, et al., 1999). SMS1 y SMS2 no son conservados en la mosca, pero presenta un homólogo conocido como CPE sintasa (Vacaru AM, et al., 2013). El mecanismo de como esta enzima actúa en la producción de CPE, se desconoce ampliamente, pero del estudio de (Vacaru AM, et al., 2013) sabemos que en insectos la presencia de iones de Mn mejora la producción de CPE, de aquí la sugerencia que la deficiencia del Mn puede reducir los niveles de CPE. Para la reacción inversa, las SM se degradan por acción de la esfingomielina fosfodiesterasa o ácido esfingomielinasa (ASMasa) que resulta en la liberación de ceramidas y fosfocolina. De acuerdo con esto, en uno de nuestros experimentos del análisis de *label free*,

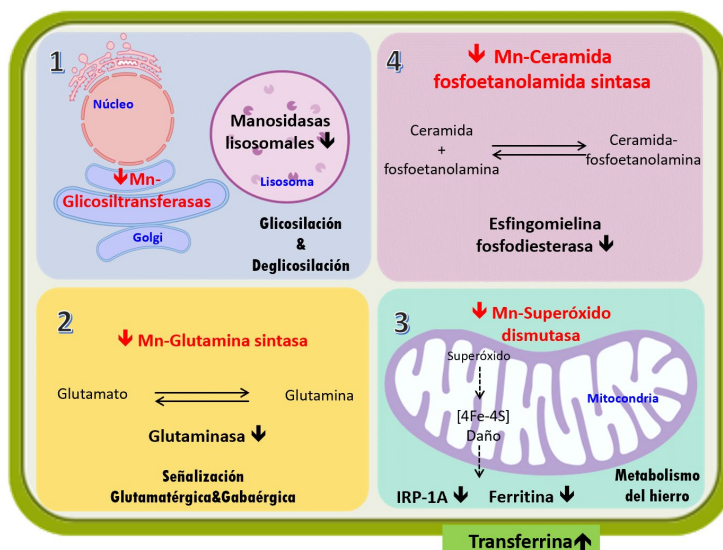
encontramos que la esfingomielina fosfodiesterasa se aminora en la deficiencia del Mn, posiblemente a los mecanismos compensatorios para mantener estable la CPE en la membrana (Fig 24).

Muchas proteínas que se sintetizan en el retículo endoplásmico y se transportan a través de la vía secretora son postranscripcionamente modificados en la asparagina (N) porque se les une un carbohidrato N-glicano (Gavin J and Jon T, et al 2009). La N-glicosilación es clave para el ensamble adecuado, control de calidad y transporte de glicoproteínas durante la biosíntesis (Rosenbaum E, et al 2014). El metabolismo de carbohidratos envuelve su síntesis y degradación, por lo que los organismos requieren de glicosiltransferasas para formar enlaces glucosídicos y de glicosidasas para degradarlas (Nemčovičová I, et al., 2013). Las glicosiltransferasas pueden usar un amplio rango de sustratos donadores, monosacáridos o difosfonucleótidos. Muchas glicosiltransferasas utilizan cofactores de iones metálicos divalentes como  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Lairson LL, et al., 2008). Los N-glicanos que se unen a través de la asparagina, se añaden a las glicoproteínas y colaboran al plegamiento de dichas proteínas, así como en su tránsito y en su distribución. Las manosas recortas los N-glicanos unidos a una proteína mal plegada y como consecuencia quedan marcada para su degradación. Las manosidasas eliminan los residuos de manosa terminal no reductores de los glicoconjugados por lo que juegan un importante papel en el metabolismo de glicoproteínas (Rosenbaum EE, et al., 2014).

Una de las respuestas celulares más significativas a la insuficiencia de Mn a nivel de proteína y mensajero fue la reducción de dos clases de manosidasas lisosomales: LMan V y LManVI. A la fecha en *D. melanogaster* no se ha demostrado ninguna dependencia específica del Mn para las glicosiltransferasas, pero estas enzimas están conservadas sugiriendo la posibilidad que la biosíntesis de glicoproteínas se pueda afectar por la ausencia del Mn. Conclusivamente, como mecanismo compensatorio a una reducción en la glicosilación se reduce también la deglicosilación con menos actividad de las LManV y LManVI (Fi. 24).

La alteración de enzimas en el metabolismo de carbohidratos fue de los cambios notorios al excluir el Mn de la dieta a nivel de RNA y de proteínas. Observamos menos presencia de

fosfoglucomutasa, desoxiribosa fosfato aldolasa, ribosa 5 fosfato isomerasa y glucosa 6 fosfato isomerasa (Tabla 8). Del reporte de Baly DL, et al., (1990) sabemos que existe una posible afectación del metabolismo de carbohidratos en respuesta a la deficiencia del Mn. Se altera la secreción de insulina, se deteriora el metabolismo de carbohidratos y se presentan defectos en el transporte de la glucosa (Baly DL, et al., 1984; Hurley LS, et al., 1984). Baly DL, et al., (1985) ha sugerido que la homeostasis de la glucosa se afecta por los cambios en las actividades de dos enzimas de la gluconeogénesis, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y piruvato carboxilasa. Con esta observación, en este estudio sugerimos que en ausencia del metal se presenta un posible déficit de energía al interrumpirse el ciclo de Krebs, ya que uno de sus intermediarios (Oxalacetato) no se estarían sintetizando completamente.



**Figura 24. Respuestas celulares a la deficiencia del Mn**

Cuando la célula tiene bajo Mn se afectan las enzimas que dependen de este metal. **1.** Se altera la glicosilación y deglicosilación indicando una menor actividad de las glicosiltransferasas al reducir la expresión de las manosidasas lisosomales como mecanismo compensatorio. **2.** La señalización glutamérgica y gabaérgica podrían interrumpirse al tener menor actividad de la glutamina sintasa para la síntesis del glutamato, pero la reducción de la expresión de la glutamina compensa esta actividad. Menor actividad de la Sod2 se presenta en ausencia del Mn y altera el metabolismo del Fe. **4.** También se interrumpe la síntesis y degradación de la ceramida fosfoetanolamina al tener menor actividad de la ceramida fosfoetanolamina sintasa que necesita del Mn y como mecanismo compensatorio se observa menor expresión de esfingomielina fosfodiesterasa.

Otros procesos sobresaltan en la célula en respuesta a la deficiencia del Mn, mecanismos de los cuales desconocemos su relación con este metal y que conocer la vía en que se reconoce sería relevante para la biología del Mn. Dentro de estos procesos destacan la alteración en un gran número de proteasas de serina y cambio en el metabolismo hormonal (Fig. 23 y tabla 8).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Una dieta química deficiente de manganeso

*D. melanogaster* crece en condiciones óptimas en medios estándares a base de levadura, piloncillo, papa, plátano, maíz, azúcar y agar. La mosca de fruta ha sido cada vez más reconocida como un organismo modelo importante de investigación en nutrición. Existen numerosos estudios enfocados en la composición de las dietas, ya que las moscas pueden también alimentarse de dietas químicas definidas nombradas dietas holídicas, que son estandarizadas en términos de su composición en micro y macronutrientes, a pesar de que los requerimientos cuantitativos de nutrientes en la mosca aún no han sido completamente establecidos (Lüersen K, et al., 2019). De los varios protocolos de dietas holídicas reportados (Rapport EL, 1986; Blatch SA & Harrison JF, 2005; Lee WC & Micchelli CA, 2013; Reis T, 2016; Piper MD, 2017) pero ninguno ha sido capaz de dar suficiente cantidad de moscas como las que crecen en la dieta estándar. Estos mismos autores han intentado mejorar la estandarización del medio evaluando el efecto de diferentes concentraciones de los componentes y la ausencia de algunos nutrimentos, pero no los requerimientos de las sales metálicas.

En nuestro modelo de dieta química nos adentramos al campo que llevan años de investigación en la estandarización de un medio holidico para la mosca. Tres diferentes versiones del medio realizamos logrando cada vez una menor deficiencia del Mn. Es difícil depletar a la mosca del Mn, ya que este metal se requiere en cantidades micromolares y además observamos que el Mn es proporcionado por la madre al huevo. No es trivial idear un medio alimentario que permita un crecimiento normal de todas las cepas de *Drosophila* ya que no se conoce si diferentes cepas (p. ej. *Oregon R* versus *Canton S* versus *w+*) tienen diversas necesidades por su fondo genético distinto o si las necesidades entre hembras y



machos son diferentes. De igual manera las condiciones ambientales donde se encuentre se ven afectadas a pesar de que la temperatura de incubación siempre sea constante (Sang JH, 1954; Piper MD, et al., 2014; Lüersen K, et al., 2019). Por otra parte, en la mosca deficiente de Mn nunca observamos alguna característica que remarcara esta condición nutricional. Al principio observamos menor tamaño y cambio en el color del cuerpo de la mosca, pero lo atribuimos a la presencia de un exceso de otros metales en la dieta (Fig.7) y no por la falta del Mn el cual no logramos eliminarlo de la mosca. Por lo tanto, nos parece relevante intentar eliminar totalmente este metal de la mosca siguiendo las indicaciones de ( Huynh N, et al., 2019) quienes recientemente para remover el Fe total de la mosca tuvieron que crecerla por varias generaciones consecutivas en dietas proporcionadas con un quelante específico del Fe.

## **8.2 Respuesta celular a la deficiencia del manganeso**

El Mn se acumula en la mitocondria y su deficiencia la observamos con la reducción catalítica de la actividad de la Sod2. Esta enzima convierte el superóxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno. Consistente con una disminución de la reacción, observamos descenso de la presencia de las enzimas que eliminan el peróxido de hidrogeno, catalasa, además peroxiredoxina 2540-1, prx2540 y glutatión transferasa (Tabla 8). Como se explicó anteriormente, el superóxido al reaccionar con los grupos de [4Fe-4S] altera la homeostasis del Fe en la mitocondria.

En condiciones de deficiencia del Mn se prevé disminución de la actividad de la glutamina sintetasa (GS) debido a que es una enzima que depende del Mn. Esta enzima une el amonio al glutamato para formar glutamina, sin embargo, la célula también realiza la reacción inversa, el paso de glutamina a glutamato mediante la enzima glutaminasa (GLS). Por lo tanto, otras de las respuestas celulares al faltarle Mn a la célula es una menor actividad de la GS que se responde con menor presencia de la GLS (Tabla. 8).

Consiguientemente, en este estudio observamos reducidas dos clases de manosidasas lisosomales (LManV y LManVI). Estas enzimas están involucradas en el catabolismo de

glicoproteínas. Así mismo, sabemos de Sladek V & Tvaroška I, 2017 que las glicosiltransferasas requieren del Mn para su funcionabilidad. Estos pollos deficientes de Mn reducen la producción del ácido hialurónico, sulfato condroitina y otras formas de mucopolisacáridos que son importantes para el crecimiento y mantenimiento del tejido conectivo, cartílago y hueso (Stanley HZ, et al., 1995). Aunque a la fecha en *D. melanogaster* no se ha reportado ninguna dependencia del Mn para las glicosiltransferasas, en este trabajo llegamos a la conclusión de que es probablemente que la glicosilación de proteínas se afecta si la célula no dispone de suficiente Mn, presentando como reacción de equilibrio una reducción de las enzimas de deglicosilación LManV y LManVI (Tabla 8).

Finalmente, se ha señalado que el Mn se requiere para la actividad de la CPES (enzima que sintetiza al análogo a la esfingomielina en mamíferos) aunque el mecanismo de cómo lo realiza no es entendido. Las esfingomielinas se degradan por acción de la esfingomielina fosfodiesterasa o ácido esfingomielinasa (ASMasa) que resulta en la liberación de ceramidas y fosocolina. De acuerdo con esto, en este análisis encontramos que la esfingomielina fosfodiesterasa se disminuye en la deficiencia del Mn, posiblemente a los mecanismos compensatorios para mantener los esfingolípidos de la membrana. La reducción de esta enzima proporciona sustento para la posible propuesta fisiológica de los requerimientos del Mn para la síntesis de CPE.

### **8.3 Aumento del Mn en los primeros días de vida adulta de la mosca**

El aumento del contenido de Mn observamos en los primeros días de edad de la mosca se relacionó con un aumento en la actividad de la Sod2 que apoya el metabolismo aeróbico (Sheri Zidenberg, et al., 1983; Wicks S, et al., 2009). En insectos durante la metamorfosis y hasta los primeros días de vida adulta, suceden una serie de eventos celulares, incluyendo programación de muerte celular, proliferación, diferenciación y disociación celular; eventos que son controlados por dos principales hormonas: hormona juvenil y 20-hidroxiecdisona (Riddiford LM, et al., 2001; Jindra M, et al., 2013). Otros cambios han sido documentados tener lugar en este periodo de edad, el endurecimiento y la impermeabilización de la cutícula de insectos que subraya cambios en la homeostasis de lípidos (Storelli G, et al., 2019), la eliminación de células remanentes del cuerpo graso de la larva mediante señales

hormonales (Bond ND, et al., 2011; Jia Q, et al., 2017), cambios en los circuitos cerebrales (Kato K, et al., 2009) y eventos relacionados con la maduración sexual y el comportamiento (Argue KJ, et al., 2013). Una posible idea es que la edad del insecto es crítica para la absorción del Mn, pero el significado biológico de esta alta absorción del metal debe ser elucidado.

En mamíferos, se ha sugerido que el consumo excesivo del Mn durante la captación infantil puede relacionarse con la discapacidad de aprendizaje (Collipp PJ, et al., 1983). Si bien, ha habido una considerable investigación en el área de Zn y Cu en la nutrición del lactante, pero pocos trabajos han cuestionado los requerimientos nutricionales del Mn durante este periodo de tiempo. A diferencia del Fe, Zn, y Cu, no se cree que las reservas de Mn se acumulen prenatalmente ( Meined B, et al., 1979) pudiendo ser el bebé susceptible a la deficiencia de este metal. (Keen CL, et al., 1986) investigaron la retención de Mn a varias edades en la rata y evaluaron su biodisponibilidad de la leche humana, leche de vaca y fórmulas infantiles usando la rata lactante como sistema modelo. Mostraron que existe un efecto pronunciado de la edad sobre el porcentaje de Mn retenido por las ratas lactantes similar al Cu y Zn ( Sandstrom B, et al., 1983; Lönnerdal B, et al., 1985). También, en relación con los adultos los bebés han mostrado tener alta retención de ingesta de Mn durante el periodo neonatal (Dörner K, et al., 1989; Zlotkin SH, et al., 1995). Estos datos podrían correlacionarse con lo que observamos en la mosca y que los bebés prematuros y de bajo peso al nacer podrían tener un alto riesgo de desarrollar deficiencia de Mn (Friel JK, et al., 1984).

#### **8.4 La V-ATPasa en la absorción de los metales**

*D. melanogaster*, a pesar de su diminuto tamaño es uno de los modelos ideales para investigación genética molecular, por dar un ejemplo los estudios sobre el papel de la V-ATPasa (Dow JA, et al., 1997). Esta bomba de protones multi subunidades se localiza en las membranas de todos los tejidos epiteliales, tales como, glándulas salivales, intestino y túbulos malpighianos, siendo este último en insectos un epitelio de transporte clásico en el cual el papel de las V-ATPasas está bien documentado (Bertram G & Wessing A, 1994;

Dow JA, 1999). Pero el papel de las subunidades de la V-ATPasa cuya expresión no es enriquecida en tejidos epiteliales permanece en discusión (Allan AK, et al., 2005). Su estructura está conformada por dos dominios funcionales, V1 y V0. El dominio V1 localizado en el citoplasma está compuesto de ocho subunidades diferentes (A-H) y es responsable de la hidrólisis del ATP. El dominio V0 es el complejo que conduce los protones y está insertado en la membrana plasmática compuesto de cinco subunidades (a-e). Estas subunidades son codificadas por 33 genes que muestran especificidad de tejido y cada subunidad tiene un gen enriquecido en células epiteliales generalmente acompañado de otras isoformas (Allan AK, et al., 2005). En la búsqueda de la función de la V-ATPasa en la homeostasis del Mn aplicamos knockdown con RNAi de genes que codifican para las distintas subunidades con diferentes drivers tejido específico. RNAi de los genes Vha55, VhaSFD y Vha16-2 en los túbulos malpighianos resultó en acumulación del Mn en la mosca completa. Estos mismos genotipos también mostraron una disminución del Zn en el cuerpo completo, sugiriendo que la V-ATPasa puede estar involucrado de manera inversa en el almacenamiento y excreción de estos dos iones metálicos. Pocos estudios de la V-ATPasa se han enfocado en el epitelio intestinal. Natalie M. D'Silva, et al 2017, mostraron la importancia de la V-ATPasa en el transporte de iones en el intestino de la larva de *Drosophila*. Afectamos el pH intestinal en las líneas de RNAi. Nuestro objetivo fue explorar el intestino, pero no notamos cambio significativo para la absorción o excreción del Mn a pesar de observar evidencia en la absorción del Fe y Cu.

## 9. CONCLUSIONES

Describimos un estudio de la deficiencia del Mn en *D. melanogaster* subrayando un aumento de este metal en los primeros días de vida adulta del insecto que se correlaciona con el acrecentamiento de la actividad de la Sod2. Presentamos el proteoma intestinal adulto de la mosca. Encontramos que un bajo pH luminal no se requiere para la absorción de metales en el intestino. Los túbulos malpighianos podrían ser el centro de regulación del Mn donde la V-ATPasa lo requiere para su excreción. En respuesta a la ausencia del Mn, en el intestino se desarregla el metabolismo general de los lípidos, carbohidratos y proteínas. Como respuestas celulares, al afectar la actividad de la Sod2 también se altera el metabolismo del Fe. Existe un mecanismo de recompensación de la reacción inversa

cuando la célula intestinal se ve afectada en la actividad de la GS, glicosiltransferasa y CPES: se disminuye la actividad catalítica de las enzimas glutaminasa, manosidasas lisosomales y la esfinglomieline fosfodiesterasa, respectivamente. La mosca deficiente de Mn nos ofrece un modelo experimental para investigar los requerimientos fisiológicos de este metal y apoyar en la búsqueda de cómo es la homeostasis del Mn en insectos.

**Tabla 6. Genes en respuesta a la deficiencia del manganeso.**

GEN	EXPRESIÓN	FUNCIÓN	DIRECCIÓN
<i>Akh</i>	Cerebro-Intestino	Hormona adipocinética	up
<i>CG6296</i>	Intestino	Degradación de fosfatidilcolina	up
<i>CG10814</i>	Baja expresión ubicua	Dioxigenasa gamma-butirotetina	up
<i>CG14688</i>	Ubicuo	Dioxigenasa fitanoil-CoA	up
<i>sug</i>	Ubicuo	Factor de transcripción que regula Dilps	up
<i>Dgat2</i>	Intestino	Diacilglicerol aciltransferasa	up
<i>CG1946</i>	Intestino	Diacilglicerol aciltransferasa	up
<i>Lip3</i>	Intestino	Lipasa (AB hidrolasa)	down
<i>CG31091</i>	Intestino	Lipasa (AB hidrolasa)	down
<i>Amyrel</i>	Intestino	Glicosil hidrolasa (amilasa)	down
<i>Gba1a</i>	Intestino	Glucosilceramidasa	down
<i>Gba1b</i>	Baja expresión ubicua	Glucosilceramidasa	down
<i>LManIV</i>	Intestino	Lisosomal $\alpha$ -manosidasa IV	down
<i>CG10383</i>	Ubicuo	Hidrolasa	down
<i>CG9119</i>	Ubicuo	Hidrolasa	down
<i>CG5255</i>	Baja expresión ubicua	Serina proteasa	up
<i>CG11912</i>	Intestino	Serina proteasa	up
<i>CG11911</i>	Intestino	Serina proteasa	up
<i>Jon74E</i>	Intestino	Serina proteasa	up
<i>Jon65Aiii</i>	Intestino	Serina proteasa	up
<i>Spn42De</i>	Glándula accesoria / Intestino	Serina endopeptidasa	up
<i>CG32483</i>	Intestino	Serina carboxil peptidasa	up
<i>hiro</i>	Intestino	Serina carboxil peptidasa	up
<i>CG8560</i>	Intestino	Carboxil peptidasa	up
<i>CG12374</i>	Intestino	Carboxil peptidasa	up
<i>CG3097</i>	Intestino	Carboxil peptidasa	up
<i>CG32751</i>	Intestino	Hidrolasa	up
<i>vanin-like</i>	Intestino	Hidrolasa	up
<i>CG3604</i>	Intestino	Endopeptidasa tipo serina/inhibidor	down
<i>CG5883</i>	Intestino	Unión a quitina	up
<i>CG7252</i>	Intestino de la larva	Unión a quitina	up
<i>CG42728</i>	Intestino de la larva	Unión a quitina	up
<i>CG7298</i>	Intestino	Unión a quitina	up
<i>CG7715</i>	Intestino de la larva	Unión a quitina	up
<i>CG10140</i>	Intestino	Unión a quitina	up
<i>CG17826</i>	Intestino de la larva	Unión a quitina	up
<i>CG43673</i>	Intestino	Unión a quitina	up
<i>CG3348</i>	Ubicuo	Unión a quitina	up
<i>obst-H</i>	Intestino de la larva	Unión a quitina	up
<i>Npc2c</i>	Intestino	Unión a quitina	up
<i>CG3301</i>	Baja expresión ubicua	Esteroides deshidrogenasa	up
<i>jhamt</i>	Ubicuo	Hormona juvenil	up

<i>CG5945</i>	Ubicuo	Hormona juvenil de unión a la hemolinfa	up
<i>CG40198</i>	Disminuye con la edad	?	up
<i>AstC-R2</i>	Baja expresión ubicua	Receptor 2 allatostatina C	up
<i>CapaR</i>	Túbulos malpighianos	Receptor neuropéptido	up
<i>natalisin</i>	Baja expresión ubicua	Hormona peptídica	down
<i>CG34316</i>	Intestino	Hormona juvenil de unión a hormonas	down
<i>Dh44</i>	Cerebro	Hormona diurética	down
<i>Eip71CD</i>	Ubicuo	MsrA	up
<i>Ggt-1</i>	Túbulos malpighianos	$\gamma$ -glutamyl transpeptidasa	up
<i>GstO3</i>	Ubicuo	Gst	up
<i>GstE10</i>	Túbulos malpighianos	Gst	up
<i>St4</i>	Ovario	Sulfotransferasa	up
<i>Prx2540-1</i>	Ubicuo	Peroxiredoxina (1-cys)	down
<i>GstD8</i>	Intestino	Gst	down
<i>CG44013</i>	Intestino	Calicina (familia lipocalina)	up
<i>MtnA</i>	Ubicuo	Metalotionina	up
<i>prt</i>	Cerebro	Transportador Slc18	down
<i>List</i>	Baja expresión ubicua	Transportador SLC6 familia Na/Cl	down
<i>CG1139</i>	Túbulos malpighianos	Transportador Slc36	down
<i>CG1698</i>	Intestino	Transportador SLC6 familia Na/Cl	up
<i>CG8468</i>	Ubicuo	Transportador monocarboxilato Slc16	up
<i>CG4991</i>	Ovario-intestino	Transportador de aminoácidos Slc36	up
<i>CG9825</i>	Intestino	Transportador Slc17	up
<i>ABCA</i>	Intestino	ATPasa	up
<i>TotM</i>	Cuerpo graso	Immunidad / respuesta al estrés	up
<i>TotA</i>	Cuerpo graso	Immunidad / respuesta al estrés	up
<i>TotC</i>	Ubicuo	Immunidad / respuesta al estrés	up
<i>TotX</i>	Cuerpo graso	Immunidad / respuesta al estrés	up
<i>CG14075</i>	Cerebro	?	up
<i>Rab3-GEF</i>	Cerebro	Transportador vesicular	down
<i>CG34451</i>	Intestino	Actividad galactosiltransferasa	up
<i>Oat</i>	Cuerpo graso	Aminotransferasa ornitina	down
<i>Alp2</i>	Intestino	Fosfatasa alcalina 2	down
<i>CG33958</i>	Baja expresión ubicua	Guanilato ciclasa	down
<i>Fer3</i>	Baja expresión ubicua	Factor de transcripción	up
<i>rib</i>	Baja expresión ubicua	Factor de transcripción	down
<i>CG5550</i>	Intestino	Respuesta inmune	up
<i>CecA1</i>	Cuerpo graso	Respuesta inmune	up
<i>Cyp6t1</i>	Ubicuo	Citocromo P450	up
<i>Cyp4d8</i>	Intestino	Citocromo P450	down
<i>Cyp4s3</i>	Ubicuo	Citocromo P450	down
<i>CG31468</i>	Testículo	Sperm-tail PG-rich repeat	down
<i>CG10252</i>	Testículo	Sperm-tail PG-rich repeat	down
<i>rha</i>	Testículo	Remodelaje de la cromatina	down
<i>Tim17b1</i>	Testículo	Proteína mitocondrial	down
<i>CG1979</i>	Testículo /cuerpo graso	?	down
<i>CG32026</i>	Testículo	Deshidrogenasa isopropilmalato	down

<i>CG31741</i>	Baja expresión ubicua	CD36	down
<i>CG4250</i>	Corazón-cerebro	?	up
<i>CG13177</i>	Intestino	?	down
<i>CG13012</i>	Baja expresión ubicua	?	up
<i>lcs</i>	Crop and glándulas	?	up
<i>gprs</i>	Baja expresión ubicua	Proteína enriquecida de serina de función desconocida	down



**Tabla 7. Proteínas más abundantes en el intestino**

NOMBRE	# DE ACCESO	FUNCIÓN
Maltase A1	P07190	Enzimas digestivas
Maltase A6	A1Z7F1	Enzimas digestivas
Maltase A7	A1Z7F2	Enzimas digestivas
Aminopeptidase	Q8IN25	Enzimas digestivas
Aminopeptidase	Q8SWX4	Enzimas digestivas
Aminopeptidase	Q8MRN5	Enzimas digestivas
Serine protease	Q9VXC7	Enzimas digestivas
Alcohol dehydrogenase	P00334	Detoxificación
Aldehyde dehydrogenase	Q9VLC5	Detoxificación
Aldehyde oxidase 1	Q9VF53	Detoxificación
Cytochrome P450 9b2	Q9V4I1	Detoxificación
Heat shock 70 kDa protein cognate 4	P11147	Proteínas Heat Shock / Chaperones
Heat shock 70 kDa protein cognate 3	P29844	Proteínas Heat Shock / Chaperones
Heat shock protein 83	P02828	Proteínas Heat Shock / Chaperones
Heat shock protein 60A	O02649	Proteínas Heat Shock / Chaperones
Apolipoporphin	Q9V496	Metabolismo de lípidos
Enoyl-CoA hydratase   beta oxidation	Q7JR58	Metabolismo de lípidos
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	A1Z8Z9	Metabolismo de lípidos
Acyl-CoA dehydrogenase	Q9VVU1	Metabolismo de lípidos
Fatty Acid Binding Protein (lipocalyn domain)	Q8INK3	Metabolismo de lípidos
Vitellogenin-1	P02843	Proteína Yolk / Lipasas
Vitellogenin-2	P02844	Proteína Yolk / Lipasas
Vitellogenin-3	P06607	Proteína Yolk / Lipasas
Arginine kinase	P48610	Almacenamiento de energía
Fructose-bisphosphate aldolase	P07764	Glucólisis
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	P07486	Glucólisis
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	P07487	Glucólisis
Enolase	P15007	Glucólisis s
Triosephosphate isomerase	P29613	Ciclo del TCA
Citrate synthase_mitochondrial	Q9W401	Ciclo del TCA
Aconitase_mitochondrial	Q9VIE8	Ciclo del TCA
Oxoglutarate dehydrogenase	Q8IQQ0	Ciclo del TCA
Succinate dehydrogenase	Q94523	Ciclo del TCA
ATP synthase subunit alpha_mitochondrial	P35381	Fosforilación oxidativa
ATP synthase subunitdelta_mitochondrial	Q24251	Fosforilación oxidativa
ATP synthase subunit beta_mitochondrial	Q05825	Fosforilación oxidativa
Cytochrome c oxidase subunit 4_isoform A	Q9VIQ8	Fosforilación oxidativa
Ubiquinol-cytochrome c reductase	Q9VV75	Fosforilación oxidativa
ATP synthase subunit gamma_mitochondrial	O01666	Fosforilación oxidativa

Cytochrome c oxidase subunit 2	P00408	Fosforilación oxidativa
Walrus isoform A	Q7KN94	Fosforilación oxidativa
Cytochrome c1 isoform A	Q9VRL0	Fosforilación oxidativa
ATP synthase subunit b mitochondrial	Q94516	Fosforilación oxidativa
ATP synthase subunit O mitochondrial	Q24439	Fosforilación oxidativa
Cytochrome c oxidase subunit 5A mitochondrial	Q94514	Fosforilación oxidativa
V-ATPase V0	Q27331	Generación de pH
V-ATPase V1	P54611	Generación de pH
V-ATPase V0	P31409	Generación de pH
V-ATPase V0	Q9V7N5	Generación de pH
V-ATPase V1	Q9V7D2	Generación de pH
Voltage-dependent anion-selective channel	Q94920	Transportador mitocondrial
SLC25 transporter	Q26365	Transportador mitocondrial
Peroxiredoxin 1	Q9V3P0	ROS
Protein disulfide-isomerase	P54399	ROS
Catalase	P17336	ROS
Glutathione S transferase D1	P20432	ROS
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P61851	ROS
Glutathione S transferase E3	A1ZB68	ROS
Elongation factor 1-alpha 1	P08736	Traducción de proteínas
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P15357	Traducción de proteínas
60S ribosomal protein L7	P32100	Traducción de proteínas
Elongation factor 2	P13060	Traducción de proteínas
60S acidic ribosomal protein P0	P19889	Traducción de proteínas
40S ribosomal protein S8	Q8MLY8	Traducción de proteínas
Ribosomal protein L11 isoform B	A0A0B4LGZ5	Traducción de proteínas
Elongation factor 1-alpha 2	P05303	Traducción de proteínas
60S ribosomal protein L4	P09180	Traducción de proteínas
60S ribosomal protein L19	P36241	Traducción de proteínas
60S ribosomal protein L13	P41126	Traducción de proteínas
60S ribosomal protein L14	P55841	Traducción de proteínas
Dodeca-satellite-binding protein 1	Q7KN75	Traducción de proteínas
40S ribosomal protein S20	P55828	Traducción de proteínas
Alanine--tRNA ligase cytoplasmic	Q9VLM8	Traducción de proteínas
Calreticulin	P29413	Respuesta a calcio
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	O18640	Señalización celular
xc 1	Q9VD01	Señalización celular
14-3-3 protein zeta	P29310	Señalización celular
Nucleoside diphosphate kinase	P08879	Señalización celular
14-3-3 protein epsilon	P92177	Señalización celular
Actin larval muscle	P02574	Citoesqueleto
Actin-5C	P10987	Citoesqueleto
Myosin light chain 2	P18432	Citoesqueleto

Tropomyosin 1	P06754	Citoesqueleto
Tubulin alpha-1 chain	P06603	Citoesqueleto
Actin-57B	P53501	Citoesqueleto
actin crosslinker	A8JNJ6	Citoesqueleto
Unconventional myosin IC	Q23979	Citoesqueleto
Tubulin beta-1 chain	Q24560	Citoesqueleto
Protein hu-li tai shao	Q02645	Citoesqueleto
ALG-2 interacting protein X	Q9VB05	Citoesqueleto
Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog	P45594	Citoesqueleto
Ferritin H	A0A0B4KI27	Metabolismo del hierro
Ferritin L	A0A0B4KHF0	Metabolismo del hierro
Isocitrate dehydrogenase	B7Z0E0	Metabolismo intermediario
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	P13706	Metabolismo intermediario
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	Q9VNW6	Metabolismo intermediario
Glyoxylate reductase (NADP(+))	Q7KT11	Metabolismo intermediario
Alanine transaminase	Q7KV27	Metabolismo intermediario
Transketolase	Q7KSU6	Metabolismo intermediario
Acetyl-CoA transferase	Q9VAC1	Metabolismo intermediario
Glucosidase	Q9VBR6	Catabolismo
Fumarylacetoacetase	Q95S17	Catabolismo
Alpha-mannosidase	Q9VLH9	Catabolismo
17-beta-estradiol 17-dehydrogenase	Q9U1L2	Respuesta hormonal
unknown	Q7JZZ3	Función desconocida
unknown	Q9VBG7	Función desconocida
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17	Q9VEB1	Regulación transcripcional

**Tabla 8. Proteínas agrupadas funcionalmente cuya expresión cambia por la deficiencia del Mn**

NOMBRE	# DE ACCESO	DESCRIPCIÓN	ratio (exp/control)	COMENTARIO
		<b>REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOD2</b>		INACTIVACIÓN DEL CICLO DE KREPS
Scsalpha1	Q94522	Succinyl-CoA ligase subunit alpha mitochondrial	1.6	Aumento de aconitasa
	Q94522	Succinyl-CoA ligase subunit alpha mitochondrial	1.4	
UQCR-6.4	Q500Y7	Ubiquinol-cytochrome c reductase 6.4 kDa subunit	1.1	Disminución del complejo III
	Q500Y7	Ubiquinol-cytochrome c reductase 6.4 kDa subunit	1.4	
Idh3b	Q9VD58	Isocitrate dehydrogenase 3b	1.1	Aumento de aconitasa
	Q9VD58	Isocitrate dehydrogenase 3b	1.4	
Idh3a	Q9VWH4	Isocitrate dehydrogenase 3a	1.1	Aumento de aconitasa
	Q9VWH4	Isocitrate dehydrogenase 3a	1.2	
CG10877	Q9VDL4	Succinate--hydroxymethylglutarate CoA-transferase	0.9	
	Q9VDL4	Succinate--hydroxymethylglutarate CoA-transferase	0.5	
Cyt-c-p	P84029	Cytochrome c-2	0.8	
	P84029	Cytochrome c-2	0.8	
ND-SGDH	Q9VTU2	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) SGDH subunit	0.8	Disminución del complejo I
	Q9VTU2	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) SGDH subunit	0.3	
Fum1	Q8IRQ5	Fumarase	0.9	Disminución de la enzima del TCA
	Q8IRQ5	Fumarase	0.9	
Fer2LCH	A0A0B4KHF0	Ferritin 2L chain homologue	0.8	Deficiencia del hierro citosólico
	A0A0B4KHF0	Ferritin 2L chain homologue	0.8	
Fer1HCH	A0A0B4KI27	Ferritin 1H chain homologue	0.9	
	A0A0B4KI27	Ferritin 1H chain homologue	0.9	
IRP-1A	Q9VCV4	Iron regulatory protein 1A	0.8	Proteína que regula el hierro
	Q9VCV4	Iron regulatory protein 1A	0.9	

Cisd2	Q9VAM6	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 homolog	0.8	Mitoneet
	Q9VAM6	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 homolog	0.5	
Fdx2	Q8SZA8	Ferredoxin 2	0.8	Ferredoxina
	Q8SZA8	Ferredoxin 2	0.5	
dare	Q9V3T9	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase_mitochondrial	0.2	Ferredoxina reductasa
Tsf1	Q9VWV6	Transferrin	1.5	Incremento de la transferrina para compensar
	Q9VWV6	Transferrin	1.5	
Cat	P17336	Catalase	0.8	Reducción de los metabolizadores H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	P17336	Catalase	1	
TrxR-1	P91938	Thioredoxin reductase 1_mitochondrial	0.9	
	P91938	Thioredoxin reductase 1_mitochondrial	0.9	
Clic	Q9VY78	Chloride intracellular channel	2.6	OTRAS RESPUESTAS MITOCONDRIALES
	Q9VY78	Chloride intracellular channel	1.3	
TFAM	Q86BR8	Mitochondrial transcription factor A	1.4	
	Q86BR8	Mitochondrial transcription factor A	1.3	
Letm1	P91927	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	1.4	
	P91927	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	1.1	
Mtpβ	Q9W1H8	Mitochondrial trifunctional protein β subunit	1.1	
	Q9W1H8	Mitochondrial trifunctional protein β subunit	1.3	
Nipsnap	M9PJP0	Nipsnap	0.9	Proteína mitocondrial de función desconocida
	Q9VXK0	Nipsnap	0.5	
CG15093	Q9V8M5	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_mitochondrial	0.7	Catabolismo de valina
	A0A0B4JCU8	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_mitochondrial	0.8	
Lrpprc2	Q9W592	Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing 2	0.9	Traducción mitocondrial reducida
	Q9W592	Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing 2	0.3	

CG3902	Q9VVU1	acyl-CoA dehydrogenase	0.8	Beta oxidación mitocondrial
	Q9VVU1	acyl-CoA dehydrogenase	0.8	
Trap1	A1Z6L9	mitochondrial chaperone protein of the HSP90 family	0.9	Chaperona mitocondrial
	A1Z6L9	mitochondrial chaperone protein of the HSP90 family	0.8	
		<b>REDUCCIÓN DE LA GLUTAMINASA</b>		
GLS	A0A0B4LF95	Glutaminase	0.7	Para conservar la glutamina
	A0A0B4LF95	Glutaminase	0.3	
Gabat	Q9VW68	Gamma-aminobutyric acid transaminase	0.7	
	Q9VW68	Gamma-aminobutyric acid transaminase	0.6	
Gs1	P20477	Glutamine synthetase 1 mitochondrial	0.7	
	E1JHQ1	Glutamine synthetase 1 mitochondrial	1	
Gs2	P20478	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	0.8	
	P20478	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	1	
CG7470	Q9VNW6	Glutamate 5-kinase	1.1	Para movilizar glutamina
	Q9VNW6	Glutamate 5-kinase	1.1	
Got1	A1ZAA5	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	1.1	
	A1ZAA5	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	1.1	
Gclm	Q9VCW6	Glutamate-cysteine ligase modifier subunit	2.7	
GC1	Q9VGF7	Glutamate carrier 1 isoform A	1.8	
		<b>REDUCCIÓN DE LA ARGINASA</b>		<b>DEGRADACIÓN DE NUCLEOTIDOS</b>
cN-IIIB	Q9W197	7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase	0.6	Degradación de purinas
	Q9W197	7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase	0.6	
su(r)	Q9W374	Dihydropyrimidine dehydrogenase	0.9	Degradación de pirimidinas
	Q9W374	Dihydropyrimidine dehydrogenase	0.8	
		<b>DISMINUCIÓN DE DEGLICOSILAICIÓN</b>		
LManVI	Q9VLH9	Lysosomal $\alpha$ -mannosidase VI	0.7	Manosidasa lisosomal

	Q9VLH9	Lysosomal $\alpha$ -mannosidase VI	0.7	
LManV	Q9VLI0	Lysosomal $\alpha$ -mannosidase V	0.7	Manosidasa lisosomal
	Q9VLI0	Lysosomal $\alpha$ -mannosidase V	0.7	
GCS2alpha	Q7KMM4	Glucosidase 2 $\alpha$ subunit	0.9	
	Q7KMM4	Glucosidase 2 $\alpha$ subunit	0.7	
Ugt37A2	Q9VG30	UDP-glycosyltransferase family 37 member A2	0.9	
	Q9VG30	UDP-glycosyltransferase family 37 member A2	0.8	
tobi	Q9VBR6	alpha glucosidase	1.1	
	Q9VBR6	alpha glucosidase	1.2	
		<b>ALTERED CARBOHYDRATE METABOLISM</b>		
Pgm	Q9VUY9	Phosphoglucomutase	0.9	
	Q9VUY9	Phosphoglucomutase	0.4	
Dera	Q7K209	Deoxyribose-phosphate aldolase	0.9	
	Q7K209	Deoxyribose-phosphate aldolase	0.4	
Rpi	Q8MLS2	Ribose-5-phosphate isomerase	0.9	
	Q8MLS2	Ribose-5-phosphate isomerase	0.7	
Pgi	P52029	Glucose-6-phosphate isomerase	1.1	
	P52029	Glucose-6-phosphate isomerase	1.2	
Mal-A4	A1Z7E8	Maltase A4	0.7	
	A1Z7E8	Maltase A4	0.8	
Mal-A7	A1Z7F2	Maltase A7	1.2	
	A1Z7F2	Maltase A7	1.2	
Mal-A6	A1Z7F1	Maltase A6	1.2	
	A1Z7F1	Maltase A6	1.3	
CG1371	A1Z843	Carbohydrate binding, unknown function	0.9	
	A1Z843	Carbohydrate binding, unknown function	0.7	

Amy-d	P81641	Alpha-amylase distal	0.9	
	P81641	Alpha-amylase distal	0.8	
		<b>DISMINUCIÓN DE FACTORES DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN</b>		
eIF2alpha	P41374	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	0.9	
	P41374	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	0.5	
eIF4A3	Q9VHS8	Eukaryotic initiation factor 4A-III	0.8	Complejo del esplaisosoma
	Q9VHS8	Eukaryotic initiation factor 4A-III	0.5	
eIF4G1	A8DZ29	Eukaryotic translation initiation factor 4G1 isoform B	0.9	
	A8DZ29	Eukaryotic translation initiation factor 4G1 isoform B	0.7	
eIF3l	Q9VTU4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	0.6	
	Q9VTU4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	0.9	
eIF3a	Q9VN25	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0.9	
	Q9VN25	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0.7	
eIF3c	A1ZAX1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	0.9	
	A0A0B4LFL2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	0.7	
RpL12	Q9W1B9	Ribosomal protein L12	0.8	Involucrado en la regulación de la biosíntesis del ribosoma
	Q9W1B9	Ribosomal protein L12	0.6	
		<b>DISMINUCIÓN DE <math>\beta</math>-OXIDACIÓN PEROXISOMAL</b>		
CG12512	Q9VMR6	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	1	
	Q9VMR6	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0.4	
Acox57D-d	Q9W2G8	Acyl-coenzyme A oxidase	0.9	
	Q9W2G8	Acyl-coenzyme A oxidase	0.6	
Hacl	Q7K3B7	2-hydroxyacyl-CoA lyase	0.9	
	Q7K3B7	2-hydroxyacyl-CoA lyase	0.9	
Pmp70	M9PF96	Peroxisomal membrane protein 70 kDa	0.9	
	M9PF96	Peroxisomal membrane protein 70 kDa	0.6	



LCAD	B7Z028	Acyl-coenzyme A oxidase	0.9	
	B7Z028	Acyl-coenzyme A oxidase	0.9	
FACL	Q9VCC6	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0.9	
	Q9VCC6	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0.9	
		<b>REDUCCION DE SERINAS PROTEASAS</b>		
SP151	Q9VT25	Serine Protease 151	0.5	Serina proteasa
	Q9VT25	Serine Protease 151	0.6	
CG4734	A1Z9B8	Spermadesin-like	0.7	Serina proteasa
	A1Z9B8	Spermadesin-like	0.6	
26-29-p	Q9V3U6	26-29kD-proteinase	0.9	Cisteína tipo peptidasa
	Q9V3U6	26-29kD-proteinase	0.5	
Jon65Aiv	Q9VRS6	Jonah 65Aiv	1	Serina proteasa
	Q9VRS6	Jonah 65Aiv	0.3	
yip7	Q9VRS4	Machete	0.7	Serina proteasa
	Q9VRS4	Machete	0.5	
betaTry	P35004	Trypsin beta	0.7	Serina proteasa
	P35004	Trypsin beta	0.6	
zetaTry	P42280	Trypsin zeta	0.8	Serina proteasa
	P42280	Trypsin zeta	0.6	
CG32473	Q9VFW7	Aminopeptidase	0.7	Aminopeptidasa
	Q9VFW7	Aminopeptidase	0.6	
Dip-C	Q9VG79	Dipeptidase C	0.9	Creatinasa/aminopeptidasa
	Q9VG79	Dipeptidase C	0.5	
Dip-B	Q9VFAQ9	Dipeptidase B	0.8	Creatinasa/aminopeptidasa
	Q9VFAQ9	Dipeptidase B	0.9	
CG10576	Q9VRP2	Peptidase	0.8	Creatinasa/aminopeptidasa

	Q9VRP2	Peptidase	0.8	Creatinasa/aminopeptidasa
CG18493	Q9VDX6	Serine protease	0.9	Serina proteasa
	Q9VDX6	Serine protease	0.7	
Jon65Aiii	Q9VRS7	Jonah 65Aiii	0.9	Serina proteasa
	Q9VRS7	Jonah 65Aiii	0.3	
Jon74E	Q9VVI4	Jonah 74E	0.9	Serina proteasa
	Q9VVI4	Jonah 74E	0.5	
CG4653	Q9VXC6	Serine protease	1.3	Excepción del aumento de una serina
	Q9VXC6	Serine protease	1.2	Excepción del aumento de una serina
		<b>AUMENTO DE CHITINASAS</b>		
Idgf4	Q9W303	Chitinase-like protein Idgf4	2	
	Q9W303	Chitinase-like protein Idgf4	1.1	
		<b>RESPUESTAS HORMONAL ALTERADA</b>		
CG31288	Q8IMT4	Ecdysteroid kinase like	1.8	
	Q8IMT4	Ecdysteroid kinase like	1.1	
CG3301	Q9VDC0	17-beta-estradiol 17-dehydrogenase	1.3	
	Q9VDC0	17-beta-estradiol 17-dehydrogenase	1.3	
CG11878	Q9VBT8	Ecdysteroid kinase like	1.2	
	Q9VBT8	Ecdysteroid kinase like	1.2	
CG6908	A0A0B4KG94	Ecdysteroid kinase like	0.9	
	A0A0B4KG94	Ecdysteroid kinase like	0.5	
Jheh3	Q7K1W4	Juvenile hormone epoxide hydrolase 3	0.8	
	Q7K1W4	Juvenile hormone epoxide hydrolase 3	0.6	
CG7953	Q9V3P4	Haemolymph juvenile hormone binding	0.6	
	Q9V3P4	Haemolymph juvenile hormone binding	0.7	
CG6830	Q9VGJ8	Ecdysteroid kinase like	0.9	

	Q9VGJ8	Ecdysteroid kinase like	0.6	
		<b>ALTERACIÓN DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO Y SEÑALIZACIÓN</b>		
Rop	Q07327	Ras opposite	1	Actividad de unión a SNARE
	M9PEL1	Ras opposite	0.1	
l(2)gl	M9NCX1	Lethal (2) giant larvae	0.8	Polaridad celular, inhibe Notch
	M9NCX1	Lethal (2) giant larvae	0.6	
Sec24CD	M9PC99	Secretory 24CD	0.6	Vesícula CopII, ER > Golgi
	M9PC99	Secretory 24CD	0.7	
Vps13B	Q9VAD3	Vacuolar protein sorting 13B	0.8	
	Q9VAD3	Vacuolar protein sorting 13B	0.6	
alphaCOP	Q9W0B8	Coatomer subunit alpha	0.9	CopI coat Golgi > ER
	Q9W0B8	Coatomer subunit alpha	0.8	
CG6891	Q8IQX5	actin-binding	1.3	
	Q8IQX5	actin-binding	1.6	
CG5023	Q9I7J0	calponin, actin-binding	1.1	
	Q9I7J0	calponin, actin-binding	1.8	
Moe	P46150	Moesin/ezrin/radixin homolog 1	1.3	Unión a actina y al microtúbulo
	P46150	Moesin/ezrin/radixin homolog 1	1.1	
Ank2	X2JC49	Ankyrin 2	0.8	Unión a microtúbulo
	X2JC49	Ankyrin 2	0.8	
Actn	P18091	Alpha-actinin sarcomeric	0.9	
	P18091	Alpha-actinin sarcomeric	0.7	
128up	P32234	GTP-binding protein 128up	0.9	
	P32234	GTP-binding protein 128up	0.4	
		<b>OTROS</b>		
CG7900	Q9VHV9	Fatty acid amide hydrolase	1.2	

	Q9VHV9	Fatty acid amide hydrolase	1.4	
Ance	Q10714	Angiotensin converting enzyme	1.4	
	Q10714	Angiotensin converting enzyme	1.2	
CG1907	Q9VAJ9	Slc25 mitochondrial transporter	1.2	
	Q9VAJ9	Slc25 mitochondrial transporter	1.2	
Rif1	Q9XZ34	Telomere-associated protein RIF1	1.2	Proteína de envoltura nuclear
	Q9XZ34	Telomere-associated protein RIF1	1.2	
CG17109	Q9VCR0	N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase	0.7	
	Q9VCR0	N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase	0.7	
Cyp28a5	Q9V419	Cytochrome P450 28a5	0.8	
	Q9V419	Cytochrome P450 28a5	0.8	
Cyp12c1	Q9VVR9	Cytochrome P450 12c1 mitochondrial	0.8	
	Q9VVR9	Cytochrome P450 12c1 mitochondrial	0.7	
CG9471	Q9VH72	riboflavin or biliverdin reductase	0.8	
	Q9VH72	riboflavin or biliverdin reductase	0.6	
CG1532	Q9VRD4	unknown function, glyoxalase domain containing	0.9	
	Q9VRD4	unknown function, glyoxalase domain containing	0.7	
CG4562	A0A0B4KGI0	Uncharacterized Triple A ATPase	0.9	
	A0A0B4KGI0	Uncharacterized Triple A ATPase	0.7	
Reg-2	Q94915	Rhythmically expressed gene 2	0.7	Hidrolasa
	Q94915	Rhythmically expressed gene 2	0.9	
AcCoAS	Q9VP61	Acetyl-coenzyme A synthetase	0.8	
	Q9VP61	Acetyl-coenzyme A synthetase	0.9	

## 10. REFERENCIAS

Atanesyan L, y otros, 2011. Characterization of MtnE, the fifth metallothionein member in *Drosophila*. *J. Biol. Inorg. Chem*, Volumen 16.

Balamurugan K, y otros, 2004. Metal-responsive transcription factor(MTF-1)and heavy metal stress response in *Drosophila* and mammalian cells: A functional comparison. *Biol. Chem*, Volumen 385.

Bonneton F, y otros, 1996. Responseof*Drosophila*metallothioneinpromoters to metallic, heat shock and oxidative stresses. *FEBS Lett*, Volumen 380.

Bozym RA, y otros, 2010. Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro. *Exp. Biol. Med*, Volumen 235.

Cindy D. Davis, Denise M. Ney & J. L Greger, 1989. Manganese, Iron and Lipid Interactions in Rats. *Nutrient Interactions*.

Hua H, Günther V, Georgiev O & Schaffner W, 2011. Distorted copper homeostasis with decreased sensitivity to cisplatin upon chaperone Atox1 deletion in *Drosophila*. *Biometals* , Volumen 24.

Huynh N, y otros, 2019. Glycogen branching enzyme controls cellular iron homeostasis via Iron Regulatory Protein 1 and mitoNEET. *Nature Communications*, Volumen 10.

Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasak R & Nagao M, 2004. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell. Mol. Life Sci*, Volumen 61.

Kim E, y otros, 1999b. Idiopathic parkinsonism with superimposed manganese exposure: utility of positron emission tomography. *Neurotoxicology*, Volumen 20.

Meined B, Bode JC, Koenig W & Richter FW, 1979. Contents of trace elements in the human liver before birth. *Biol. Neonate* , Volumen 36.

Sandstrom B, Keen CL & Lönnerd, 1983. An experimental model for studies of zinc bioavailability from milk and infant formulas using ex trinsic labelling. *Am. J. Clin. Nutr.*, Volumen 38.

Zhang B, Egli D, Georgiev O & Schaffne W, 2001. The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol. Cell. Biol*, Volumen 21.

Abboud S & Haile DJ, 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, Volumen 275.

Acharya U & Acharya JK, 2005. Enzymes of sphingolipid metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Cell Mol Life Sci*, Volumen 62.

- Allan AK, Du J, Davies SA & Dow JA, 2005. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. *Physiol Genomics*, Volumen 22.
- Anders S, Pyl PT & Huber W, 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.*, Volumen 31.
- Andrew W. Foster, Deenah Osman & Nigel J. Robinson, 2014. MetalPreferencesand Metallation. *Journal of Biological Chemistry*.
- Argue KJ, Yun AJ & Neckameyer WS, 2013. Early manipulation of juvenile hormone has sexually dimorphic effects on mature adult behavior in *Drosophila melanogaster*. *Horm Behav*, Volumen 64.
- Aschner JL & Aschner M, 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med*, Volumen 26.
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS & Zheng W. Manganese, 2007. Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity.. *Toxicology and Applied Pharmacology.*, Volumen 221.
- Baly DL, Curry DL, Keen CL & Hurley LS, 1984. Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats. *J Nutr*, Volumen 114.
- Baly DL, Joanna SS & García-Welsh AL, 1990. Effect of Manganese Deficiency on Insulin Binding, Glucose Transport and Metabolism in Rat Adipocytes1. *J. Nutr*, Volumen 120.
- Baly DL, Keen CL & Hurley LS, 1985. Pyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity in Developing Rats: Effect of Manganese Deficiency. *J. Nutr*, Volumen 115.
- Barbeau A, 1984. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). *Neurotoxicology*, Volumen 5.
- Bertram G & Wessing A, 1994. Intracellular pH regulation by the plasma membrane V-ATPase in Malpighian tubules of *Drosophila* larvae. *J Comp Physiol B*, Volumen 164.
- Bettedi L, y otros, 2011. Iron depletion in the intestines of Malvolio mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase. *J. Exp. Biol*, Volumen 214.
- Binks T, Lye JC, Camakaris J & Burke R, 2010. Tissue-specific interplay between copper uptake and efflux in *Drosophila*. *J. Biol. Inorg. Chem*, Volumen 15.
- Blatch SA & Harrison JF, 2005. An updated chemically-defined medium for *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv*, Volumen 88.
- Bloom AJ, 2019. Metal regulation of metabolism. *Curr Opin Chem Biol*, Volumen 49.
- Bond ND, y otros, 2011.  $\beta$ FTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Dev Biol*, Volumen 360.

- Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M & Velez-Pardo C, 2011. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometals*, Volumen 24.
- Brooks ES, y otros, 2011. A putative vesicular transporter expressed in *Drosophila* mushroom bodies that mediates sexual behavior may define a neurotransmitter system. *Neuron*, Volumen 72.
- Burke R, Commons E & Camakaris J, 2008. Expression and localisation of the essential copper transporter DmATP7 in *Drosophila* neuronal and intestinal tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, Volumen 40.
- Burke R, Commons E & Camakaris J, 2008. Expression and localisation of the essential copper transporter DmATP7 in *Drosophila* neuronal and intestinal tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, Volumen 40.
- Cai L, Li XK, Song Y & Cherian MG, 2005. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr Med Chem*, Volumen 12.
- Calap-Quintana P, y otros, 2017. *Drosophila melanogaster* Models of Metal-Related Human Diseases and Metal Toxicity. *Int J Mol Sci*, Volumen 18.
- Carrasco-Rando M, y otros, 2016. Fear-of-intimacy-mediated zinc transport controls the function of zinc-finger transcription factors involved in myogenesis. *Development*, Volumen 143.
- Celotto AM, Liu Z, Vandemark AP & Palladino MJ, 2012. A novel *Drosophila* SOD2 mutant demonstrates a role for mitochondrial ROS in neurodevelopment and disease. *Brain Behav*, Volumen 4.
- Chalela JA, Bonilha L, Neyens R & Hays A, 2011. Manganese encephalopathy: an under-recognized condition in the intensive care unit. *Neurocrit Care*, Volumen 14.
- Collipp PJ, Chen SY & Maitinsky S, 1983. Manganese in infant formulas and learning disability. *Ann Nutr Metab*, Volumen 27.
- Cotzias GC, Horiuchi K, Fuenzalida S & Mena I, 1968. Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*, Volumen 18.
- Cotzias GC, Miller ST, Papavasiliou PS & Tang LC, 1976. Interactions between manganese and brain dopamine. *Med Clin North Am*, Volumen 60.
- Cox N, y otros, 2014. Photosynthesis. Electronic structure of the oxygen-evolving complex in photosystem II prior to O-O bond formation. *Science*, Volumen 345.
- Dobin A, y otros, 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, Volumen 29.
- Dobson AW, Erikson KM & Aschner M, 2004. Manganese neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, Volumen 1012.

- Doisy EA Jr, 1974. Effects of deficiency in manganese upon plasma levels of clotting proteins and cholesterol in man. *Trace element metabolims in animals*, Volumen 2.
- Dörner K, y otros, 1989. Longitudinal manganese and copper balances in young infants and preterm infants fed on breast-milk and adapted cow's milk formulas. *Br J Nutr*, Volumen 61.
- Dow JA, y otros, 1997. Molecular genetic analysis of V-ATPase function in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, Volumen 200.
- Dow JA, y otros, 1994. The malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *Journal of Experimental Biology*, Volumen 197.
- Dow JA, 1999. The multifunctional *Drosophila melanogaster* V-ATPase is encoded by a multigene family. *J Bioenerg Biomembr.*, Volumen 31.
- D'Silva NM, Donini A & O'Donnell MJ, 2017. The roles of V-type H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in energizing K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport in larval *Drosophila* gut epithelia. *J Insect Physiol*, Volumen 98.
- D'Silva NM, Donini A & O'Donnell MJ, 2017. The roles of V-type H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in energizing K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport in larval *Drosophila* gut epithelia. *Journal of Insect Physiology*.
- Dunkov B & Georgieva T, 2006. Insect iron binding proteins: insights from the genomes. *Insect Biochem Mol Biol*, Volumen 36.
- Egli D, y otros, 2006. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes Cells*, Volumen 11.
- Egli D, y otros, 2003. Knockout of “metal-responsive transcriptionfactor”MTF-1in *Drosophila* b yhomologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J*, Volumen 22.
- Finley JW & Davis CD, 1999. Manganese deficiency and toxicity: Are high or low dietary amounts of manganese cause for concern?. *BioFactors IOS Press*, Volumen 10.
- Fitsanakis VA, y otros, 2011. Changes in dietary iron exacerbate regional brain manganese accumulation as determined by magnetic resonance imaging. *Toxicol Sci*, Volumen 120.
- Fleming MD, y otros, 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, Volumen 16.
- Folwell JL, Barton CH & Shepherd D, 2006. Immunolocalisation of the *D. melanogaster* Nramp homologue Malvolio to gut and Malpighian tubules provides evidence that Malvolio and Nramp2 are orthologous. *J Exp Biol*, Volumen 209.
- Forte G, y otros, 2013. Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biol Trace Elem Res*, Volumen 156.



- Friedman BJ, y otros, 1987. Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet. *J Nutr*, Volumen 117.
- Friel JK, Gibson RS, Balassa R & Watts JL, 1984. A comparison of the zinc, copper and manganese. *Acta Paediatrica Scandinavica*, Volumen 73.
- Gardner PR & Fridovich I, 1991. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J. Biol. Chem.*, Volumen 266.
- Gardner PR, Raineri I, Epstein LB & White CW, 1995. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem*, Volumen 270.
- Gordon SJV, Fenker DE, Vest KE & Padilla-Benavides T, 2019. Manganese influx and expression of ZIP8 is essential in primary myoblasts and contributes to activation of SOD2. *Metallomics*, Volumen 11.
- Gorell JM, y otros, 1997. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*, Volumen 48.
- Guilarte TR & Gonzales KK, 2015. Manganese-Induced Parkinsonism Is Not Idiopathic Parkinson's Disease: Environmental and Genetic Evidence. *Toxicol Sci*, Volumen 146.
- Gunshin H, y otros, 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, Volumen 388.
- Gutiérrez L, y otros, 2013. Biophysical and genetic analysis of iron partitioning and ferritin function in *Drosophila melanogaster*. *Metallomics*, Volumen 5.
- Hai Y, Kerkhoven EJ, Barrett MP & Christianson DW, 2015. Crystal structure of an arginase-like protein from *Trypanosoma brucei* that evolved without a binuclear manganese cluster. *Biochemistry*, Volumen 54.
- Hardy G, 2009. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement?. *Gastroenterology*, Volumen 137.
- Harischandra DS, y otros, 2019. Manganese-Induced Neurotoxicity: New Insights Into the Triad of Protein Misfolding, Mitochondrial Impairment, and Neuroinflammation. *Front Neurosci*, Volumen 13.
- Harris ED, 2003. Basic and clinical aspects of copper. *Crit Rev Clin Lab Sci*, Volumen 40.
- Hinton T, Ellis J & Noyes DT, 1951. Amino acids and growth factors in a chemically defined medium for *Drosophila*. *Physiol Zool*, Volumen 24.
- Horng YC, y otros, 2004. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem*, Volumen 279.
- Hu Y, y otros, 2013. FlyPrimerBank: an online database for *Drosophila melanogaster* gene expression analysis and knockdown evaluation of RNAi reagents. Volumen 3.

- Huang CC, y otros, 1989. Chronic manganese intoxication. *Arch Neurol*, Volumen 46.
- Hurley LS, Keen CL & Baly DL, 1984. Manganese deficiency and toxicity: effects on carbohydrate metabolism in the rat. *Neurotoxicology*, Volumen 5.
- Hwang JE, de Bruyne M, Warr CG & Burke R, 2014. Copper overload and deficiency both adversely affect the central nervous system of *Drosophila*. *Metallomics*, Volumen 6.
- Ianowski JP & O'Donnell MJ, 2004. Basolateral ion transport mechanisms during fluid secretion by *Drosophila* Malpighian tubules: Na<sup>+</sup> recycling, Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:2Cl<sup>-</sup> cotransport and Cl<sup>-</sup> conductance. *Journal of Experimental Biology*, Volumen 2007.
- Jenkitkasemwong S, y otros, 2018. SLC39A14 deficiency alters manganese homeostasis and excretion resulting in brain manganese accumulation and motor deficits in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Volumen 115.
- Jia Q, y otros, 2017. Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone coordinately control the developmental timing of matrix metalloproteinase-induced fat body cell dissociation. *J Biol Chem*, Volumen 292.
- Jindra M, Palli SR & Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu Rev Entomol*, Volumen 58.
- Julia Bornhorst, Michael Aschner & Pan Chen, 2018. Manganese metabolism in humans. *Frontiers In Bioscience*.
- Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE & Christianson DW, 1996. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, Volumen 383.
- Kato K, Awasaki T & Ito K, 2009. Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. *Development*, Volumen 136.
- Keen CL, Bell JG & Lönnerdal B, 1986. The Effect of Age on Manganese Uptake and Retention from Milk and Infant Formulas in Rats. *The Journal of Nutrition*, Volumen 116.
- Kemmerer A, Elvehjem C & Hart E, 1931. Studies on the relation of manganese to the nutrition of the mouse. *J Biol Chem*, Volumen 92.
- Kenangil G, Ertan S, Sayilir I & Ozekmekçi S, 2006. Progressive motor syndrome in a welder with pallidal T1 hyperintensity on MRI: a two year follow-up. *Mov Disord*, Volumen 21.
- Kirby K, y otros, 2008. Instability of superoxide dismutase 1 of *Drosophila* in mutants deficient for its cognate copper chaperone. *J Biol Chem*, Volumen 283.
- Krajewski WW, y otros, 2008. rystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J Mol Biol*, Volumen 275.

- Kraut R, 2011. Roles of sphingolipids in *Drosophila* development and disease. *J Neurochem*, Volumen 116.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ & Withers SG, 2008. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, Volumen 77.
- Lang M, y otros, 2012. Genetic inhibition of solute-linked carrier 39 family transporter 1 ameliorates  $\beta$  pathology in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS Genet*, Volumen 8.
- Leach RM Jr & Muenster AM, 1962. Studies on the role of manganese in bone formation. I. Effect upon the mucopolysaccharide content of chick bone. *The Journal of Nutrition*, Volumen 78.
- Leach RM, 1986. Mn (II) and glycosyltransferase essential for skeletal development, in: Manganese in Metabolism and Enzyme Function. *Acad. Press, Inc.*
- Lee WC & Micchelli CA, 2013. Development and characterization of a chemically defined food for *Drosophila*. *PLoS One*, Volumen 8.
- Lind MI, y otros, 2006. Of two cytosolic aconitases expressed in *Drosophila*, only one functions as an iron-regulatory protein. *J Biol Chem*, Volumen 281.
- Linton SM & O'donnell MJ, 2000. Novel aspects of the transport of organic anions by the malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, Volumen 203.
- Liuzzi JP & Cousins RJ, 2004. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr*, Volumen 24.
- Lönnerdal B, Keen CL & Hurley LS, 1985. Manganese binding proteins of human and cow's milk. *Am. J. Clin. Nutr*, Volumen 41.
- Love MI, Huber W & Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, Volumen 15.
- Lucchini R, y otros, 2017. Manganese and Developmental Neurotoxicity. *Adv Neurobiol*, Volumen 18.
- Lüersen K, Röder T & Rimbach G, 2019. *Drosophila melanogaster* in nutrition research-the importance of standardizing experimental diets. *Genes & Nutrition*, Volumen 14.
- Mandilaras K, Pathmanathan T & Missirlis F, 2013. Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients*, Volumen 5.
- Marelja Z, Leimkühler S & Missirlis F, 2018. Iron Sulfur and Molybdenum Cofactor Enzymes Regulate the *Drosophila* Life Cycle by Controlling Cell Metabolism. *Front Physiol*, Volumen 9.
- Martin RC, y otros, 2009. Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. *DNA Cell Biol*, Volumen 28.

McKie AT, y otros, 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, Volumen 5.

Mena I, Marin O, Fuenzalida S & Cotzias GC, 1967. Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. *Neurology*, Volumen 17.

Milatovic D, y otros, 2007. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Science*, Volumen 98.

Missirlis F, y otros, 2003. A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol Chem*, Volumen 384.

Mohr SE, y otros, 2018. Zinc Detoxification: A Functional Genomics and Transcriptomics Analysis in *Drosophila melanogaster* Cultured Cells. *G3 (Bethesda)*, Volumen 8.

Montes-Bayon M, Sharar M & Corte-Rodriguez M, 2018. Trends on (elemental and molecular) mass spectrometry based strategies for speciation and metallomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 104.

Muckenthaler M, Gray NK & Hentze MW, 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*, Volumen 2.

Müller E, Müller El & Pozebon D, 2018. Bioimaging Metallomics. *Adv Exp Med Biol*, Volumen 1055.

Neilson KA, y otros, 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, Volumen 14.

Nemčovičová I, y otros, 2013. Characterisation of class I and II  $\alpha$ -mannosidases from *Drosophila melanogaster*. *Glycoconj J*, Volumen 30.

Nichol H, Law JH & Winzerling JJ, 2002. Iron metabolism in insects. *Annu Rev Entomol*, Volumen 47.

Norose N, Terai M & Norose K, 1992. Manganese deficiency in a child with very short bowel syndrome receiving long-term parenteral nutrition. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, Volumen 5.

Olanow CW, 2004. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sc*, Volumen 1012.

Orent ER & McCollum EV, 1931. Effects of deprivation of manganese in rat. *J. Biol. Chem*, Volumen 92.

Orgad S, Nelson H, Segal D & Nelson N, 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant malvolio. *J. Exp. Bio*, Volumen 201.

- Oshlack A & Wakefield MJ, 2009. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biol Direct*, Volumen 16.
- Overend G, y otros, 2016. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. Volumen 6.
- Palmiter RD, 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Volumen 95.
- Pan Chen, Julia Bornhorst & Michael Aschner, 2018. Manganese metabolism in humans. *Frontiers In Bioscienc*.
- Pan Chen, J. B. M. A., 2018. Manganese metabolism in humans. *Frontiers In Bioscience*.
- Panevska A, y otros, 2019. Ceramide phosphoethanolamine, an enigmatic cellular membrane sphingolipid. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, Volumen 1861.
- Pennington JAT, y otros, 1986. Mineral content of foods and total diets: The selected minerals in foods survey , 1982 to 1984. *J Am Diet Assoc*, Volumen 86.
- Petris MJ, 2004. The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch*, Volumen 447.
- Piper MD, 2017. Using artificial diets to understand the nutritional physiology of *Drosophila melanogaster*. *Curr Opin Insect Sci*, Volumen 23.
- Piper MD, y otros, 2014. A holidic medium for *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*, Volumen 11.
- Porcelli D, y otros, 2010. Genetic, functional and evolutionary characterization of scox, the *Drosophila melanogaster* ortholog of the human SCO1 gene. *Mitochondrion*, Volumen 10.
- Post JE, 1999. Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance. *PNAS*, Volumen 96.
- Prohaska JR & Gybina AA, 2004. Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr*, Volumen 144.
- Qin Q, Wang X & Zhou B, 2013. Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for dietary zinc absorption and regulation. *BMC Biol*, Volumen 11.
- Quadri M, y otros, 2012. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *Am J Hum Genet*, Volumen 90.
- Racette BA, y otros, 2001. Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology*, Volumen 56.
- Rapport EL, 1986. Fatty acid composition of wild type and mutant *Drosophila*. *Insect Biochemistry*, Volumen 16.
- Reaney SH, Bench G & Smith DR, 2006. Brain accumulation and toxicity of Mn(II) and Mn(III) exposures. *Toxicol Sci*, Volumen 93.

- Reis T, 2016. Effects of Synthetic Diets Enriched in Specific Nutrients on *Drosophila* Development, Body Fat, and Lifespan. *PLoS One*, Volumen 11.
- Rempoulakis P, y otros, 2014. Conserved metallomics in two insect families evolving separately for a hundred million years. *Biometals*, Volumen 27.
- Riddiford LM, Cherbas P & Truman JW, 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vit. Horm*, Volumen 60.
- Rietveld A, Neutz S, Simons K & Eaton S, 1999. Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem*, Volumen 274.
- Robinson BH, 1998. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J. Inher. Metab. Dis.*, Volumen 21.
- Rodrigues V, Cheah PY, Ray K & Chia W, 1995. Malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAM1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *Embo J*, Volumen 14.
- Rojas MA, Dyer IA & Cassatt WA, 1965. Manganese deficiency in the bovine. *J Anim Sci*, Volumen 24.
- Rosas-Arellano A, y otros, 2016. Ferritin Assembly in Enterocytes of *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci*, Volumen 17.
- Rosenbaum EE, Vasiljevic E, Brehm KS & Colley NJ, 2014. Mutations in four glycosyl hydrolases reveal a highly coordinated pathway for rhodopsin biosynthesis and N-glycan trimming in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*, Volumen 10.
- Roth JA, 2006. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol Res*, Volumen 39.
- Sang JG & King RC, 1961. Nutritional Requirements of Axenically Cultured *Drosophila Melanogaster* Adults. *Journal of Experimental Biology*, Volumen 38.
- Sang JH, 1954. Differences in the nutritional requirements of *Drosophila*. *Proc. gth Int. Congr. Genet. (In the press)*.
- Sanotsky Y, y otros, 2007. Manganic encephalopathy due to "ephedrone" abuse. *Mov Disord*, Volumen 22.
- Schultz J, St Lawrence P & Newmeyer D, 1946. A chemically defined medium for the growth of *Drosophila melanogaster*. *Anat Rec*, Volumen 96.
- Scrutton MC, Utter MF & Mildvan AS, 1966. Pyruvate Carboxylase. VI The presence of tightly bound manganese. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 241.

Settivari R, Levora J & Nass R, 2009. The divalent metal transporter homologues SMF-1/2 mediate dopamine neuron sensitivity in caenorhabditis elegans models of manganese and parkinson disease. *J Biol Chem*, Volumen 284.

Shawki A, y otros, 2015. Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Volumen 309.

Sheri Zidenberg, Carl L Keen, Bo Lönnerdal & Lucille S. Hurley, 1983. Superoxide Dismutase Activity and Lipid Peroxidation in the Rat: Developmental Correlations Affected by Manganese Deficiency. *American Institute of Nutrition*.

Shevchenko A, y otros, 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, Volumen 1.

Shukla GS & Chandra SV, 1981. Manganese toxicity: lipid peroxidation in rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, Volumen 48.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Lee E, Albrecht J & Aschner M, 2009. Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *J Neurochem*, Volumen 110.

Sladek V & Tvaroška I, 2017. First-Principles Interaction Analysis Assessment of the Manganese Cation in the Catalytic Activity of Glycosyltransferases. *J Phys Chem B*, Volumen 121.

Southon A, y otros, 2008. Malvolio is a copper transporter in Drosophila melanogaster. *J Exp Biol*, Volumen 211.

Southon A, y otros, 2013. Presenilin promotes dietary copper uptake. *PLoS One*, Volumen 8.

Southon A, y otros, 2010. Conservation of copper-transporting P(IB)-type ATPase function. *Biometals*, Volumen 23.

Stamelou M, y otros, 2012. Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: A new treatable disorder. *Mov. Disord*, Volumen 27.

Stanley HZ, Stephanie A & Gillian L, 1995. Trace elements in nutrition for premature infants. *Neonatal/Perinatal nutrition*, Volumen 22.

Stathakis DG, Burton DY & McIvor WE, 1999. The catecholamines up (Catsup) protein of Drosophila melanogaster functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity. *Genetics*, Volumen 153.

Stepens A, y otros, 2008. A Parkinsonian syndrome in methcathinone users and the role of manganese. *N Engl J Med*, Volumen 358.

Storelli G, y otros, 2019. Drosophila HNF4 Directs a Switch in Lipid Metabolism that Supports the Transition to Adulthood. *Dev Cell*, Volumen 48.

Tafesse FG, Ternes P & Holthuis JC, 2006. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem*, Volumen 281.

Tain LS, y otros, 2017. A proteomic atlas of insulin signalling reveals tissue-specific mechanisms of longevity assurance. *Mol Syst Biol*, Volumen 13.

Takeda A, 2003. Manganese action in brain function. *Brain Res Brain Res Rev*, Volumen 41.

Tang X & Zhou B, 2013. Iron homeostasis in insects: Insights from *Drosophila* studies. *IUBMB Life*, Volumen 65.

Tejeda-Guzmán C, y otros, 2018. Biogenesis of zinc storage granules in *Drosophila melanogaster*. Volumen 221.

Tranger W, 1947. Insect nutrition. *Biol. Rev*, Volumen 22.

Troen AM, y otros, 2007. Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet. *Age (Dordr)*, Volumen 29.

Tsopanakis AD & Herries DG, 1978. Bovine Galactosyl Transferase. *European Journal of Biochemistry*, Volumen 83.

Turski ML & Thiele DJ, 2007. *Drosophila* Ctr1A functions as a copper transporter essential for development. *J Biol Chem*, Volumen 282.

Tuschl K, y otros, 2012. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet.*, Volumen 90.

Vacaru AM, van den Dikkenberg J, Ternes P & Holthuis JC, 2013. Ceramide phosphoethanolamine biosynthesis in *Drosophila* is mediated by a unique ethanolamine phosphotransferase in the Golgi lumen. *J Biol Chem*, Volumen 288.

Vacaru AM, van den Dikkenberg J, Ternes P & Holthuis JC, 2013. Ceramide phosphoethanolamine biosynthesis in *Drosophila* is mediated by a unique ethanolamine phosphotransferase in the Golgi lumen. *J Biol Chem*, Volumen 288.

Valko M, Morris H & Cronin MTD, 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, Volumen 12.

van den Berghe PV & Klomp LW, 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr Rev.*, Volumen 67.

van Meer MP, y otros, 2010. Correspondence between altered functional and structural connectivity in the contralesional sensorimotor cortex after unilateral stroke in rats: a combined resting-state functional MRI and manganese-enhanced MRI study. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, Volumen 30.

Vierstraete E, y otros, 2003. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, Volumen 304.



- Voelker DR & Kennedy EP, 1982. Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin. *Biochemistry*, Volumen 21.
- Wang JD, y otros, 1989. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *Br J Ind Med*, Volumen 46.
- Wang X, Wu Y & Zhou B, 2009. Dietary zinc absorption is mediated by ZnT1 in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J*, Volumen 23.
- Wedler FC & Denman RB, 1984. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr Top Cell Regul*, Volumen 24.
- Wicks S, y otros, 2009. Hypoxia rescues early mortality conferred by superoxide dismutase deficiency. *Free Radic Biol Med*, Volumen 46.
- Wilgus HS Jr, Norris LC & Heuser GF, 1936. The rôle of certain inorganic elements in the cause and prevention of perosis. *Science*, Volumen 84.
- Wilgus, Jr HS & Patton AR, 1939. Factors Affecting Manganese Utilization in the Chicken. *The Journal of Nutrition*, Volumen 18.
- Wim Verelst & Han Asard, 2003. A phylogenetic study of cytochrome b561 proteins. *Genome Biol*, Volumen 4.
- Windmueller HG, 1982. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, Volumen 53.
- Wong HS, y otros, 2017. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J. Biol. Chem*, Volumen 292.
- Xiao G, y otros, 2019. Transferrin 1 Functions in Iron Trafficking and Genetically Interacts with Ferritin in *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep*, Volumen 26.
- Zhao F, y otros, 2009. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicol Sci*, Volumen 107.
- Zhou H, Cadigan KM & Thiele DJ, 2003. A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. Volumen 278.
- Zinke I, y otros, 2002. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*, Volumen 21.
- Zlotkin SH, Atkinson S & Lockitch G, 1995. Trace elements in nutrition for premature infants. *Clin. Perinatol*, Volumen 22.