



Cinvestav

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Participación de la tetrahidrobiopterina en la
homeostasis del zinc en *Drosophila melanogaster*”**

T E S I S

Que presenta

Lic. Oscar Antonio Núñez Gaytán

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Director de tesis

Dr. Fanis Missirlis

Para esta tesis de Maestría recibí la asesoría de la **Dra. Liliana Quintanar**, profesora investigadora del Departamento de Química y del Centro de Investigación sobre el Envejecimiento. Del **Dr. Marcos Nahmad**, profesor investigador del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (ambos miembros de mi comité tutorial) y del **Dr. Carlos Alberto Tejeda Guzmán**, miembro posdoctorante del laboratorio de Biometalómica.

Como sinodales de examen fungieron la **Dra. Quintanar** y el **Dr. Daniel Martínez Fong**, profesor investigador del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.



Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT No. 1237590), en el laboratorio 37 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Fanis Missirlis



Con dedicatoria para mi Madre, Martha Gaitán
Mi padre, Antonio Núñez
A mi hermano, Yair Núñez

¡Muchas gracias!

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Fanis Missirlis, quien me dio la oportunidad de desarrollarme en este proyecto y me confió un impresionante proyecto, ha demostrado ser la mejor guía para mi camino en la ciencia.

Al Dr. Carlos Tejeda, quien estuvo presente en todo el desarrollo del proyecto y estuvo atento a todas mis dudas, es de las mejores personas que conozco y un excelente científico.

A Beatriz Osorio, auxiliar de nuestro laboratorio, con su trabajo y atención, dio las pautas necesarias para que este proyecto se diera acabo.

A Benjamín Muñoz, técnico de investigación de nuestro laboratorio, gracias a él tenemos a las moscas bajo los cuidados necesarios.

Todos los demás integrantes de mi laboratorio (Cynthia, Karen, Jahir y Raúl), son excelentes compañeros y amigos.

Sin más que agregar, muchas gracias por todo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo de estudio.....	9
Mosca mutante <i>white</i>	9
Pigmentación del ojo de <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Túbulos Malpighianos de <i>Drosophila Melanogaster</i>	13
El zinc y su papel biológico	15
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	18
Vía de degradación del triptófano y su relación con el zinc corporal	18
Posible interacción entre el zinc corporal y la vía de síntesis de tetrahidrobiopterina.....	22
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS '	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Sistema <i>Gal4/UAS</i>	27
Mantenimiento de los stocks	27
Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo	28
Microscopía de fluorescencia y estereoscópica.....	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
Los túbulos Malpighianos de la mutante de <i>purple</i> también presentan un fenotipo de poco Zn.....	30
Las cepas <i>Gal4</i> utilizadas presentan la marca de GFP correspondiente al patrón de expresión esperado.....	31

Coloración de los MTs en las progenies con silenciamiento de <i>pr</i> y <i>Sptr</i>	35
Efecto del silenciamiento tejido-específico de <i>pr</i> en la concentración de Zn ²⁺ corporal.....	39
Efecto del silenciamiento tejido-específico de <i>Sptr</i> en la concentración de zinc corporal.....	40
Aumento de gránulos de Zn en los MTs de <i>NPF>UAS RNAi Sptr</i>	41
PERSPECTIVAS.....	47
ANEXOS	48
Densitometría de la coloración de los MTs.....	48
Cuantificación de los gránulos de almacenamiento de Zn ²⁺ en los MTs	49
REFERENCIAS	50

RESUMEN

El zinc (Zn^{2+}) es uno de los metales iónicos más abundantes en los sistemas biológicos, conocido por su papel como componente regulador, estructural y catalítico de diversas proteínas, incluidas enzimas y factores de transcripción. En *Drosophila melanogaster* se sabe que el Zn^{2+} se almacena en organelos relacionados a los lisosomas presentes en las células primarias de los túbulos Malpighianos (MTs), órgano encargado de la excreción y homólogo de los riñones en mamíferos. Intermediarios en la ruta de degradación del triptófano (metabolitos de la vía de la quinurenina) se unen directamente con el Zn^{2+} dentro de estos organelos subcelulares, que a su vez están involucrados en la síntesis de los pigmentos de omocromos de los ojos en células pigmentarias. La vía de tetrahydrobiopterina (BH_4) también tiene un papel en la síntesis de los pigmentos de los ojos de la mosca *Drosophila melanogaster*, participando en la formación del pigmento drosóptero, donde también se almacena en células pigmentarias, pero en diferentes gránulos de los omocromos. Sobre este segundo tipo de organelos se desconoce si almacena Zn^{2+} en los MTs, no obstante, se ha observado que una mutación en el gen que codifica para la enzima *purple* (*pr*), encargada de sintetizar 6-piruvil tetrahydrobiopterina (6-PTP, precursor de BH_4), presenta un fenotipo de disminución de Zn^{2+} . A su vez, BH_4 es cofactor de 3 enzimas diferentes (tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa y óxido nítrico sintasa) que podrían tener una relación con la regulación de los almacenes de Zn^{2+} a nivel sistémico. Planteo que la vía de BH_4 modula a través de dopamina, serotonina u óxido nítrico la homeostasis de Zn^{2+} en el insecto. Esta hipótesis se probará mediante el silenciamiento de tejido-específico de los genes *pr* y *Sptr* (codifica por sepiapterina reductasa, enzima que convierte 6-PTP a BH_4), observando su impacto en la coloración de los MTs y en la concentración de Zn^{2+} sistémico. Propongo un rol potencial para la serotonina, como señal para la excreción de gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} .

ABSTRACT

Zinc (Zn^{2+}) is an abundant metal ion in biological systems, known for its role as a regulatory, structural, and catalytic component in various proteins, including enzymes and transcription factors. In *Drosophila melanogaster*, Zn^{2+} is stored in lysosomes related organelles (LROs) found in primary cells of Malpighian tubules (MTs), which are responsible for excretion and analogous to mammalian kidneys. Components of the tryptophan degradation pathway (quinurenine pathway metabolites) directly bind with Zn^{2+} within these subcellular organelles. LROs are also involved in the synthesis of eye omochrome pigments in pigment cells. The tetrahydrobiopterin (BH_4) pathway plays a role in synthesizing eye pigments, contributing to drosopterin pigment formation. Drosopterins are stored in pigment cells in separate granules to those accumulating omochrome pigments. It is currently unknown whether this second type of LROs (related to BH_4 synthesis) stores Zn^{2+} in MTs; however, a mutation in the gene encoding the enzyme purple (*pr*), which synthesizes 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin (6-PTP, a BH_4 precursor), results in a zinc-deficient phenotype in flies. BH_4 is a cofactor for three different enzymes (tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase, and nitric oxide synthase) that may herefore be involved in regulating systemic Zn^{2+} stores. I propose that the BH_4 pathway modulates Zn^{2+} homeostasis in the insect via dopamine, serotonin, or nitric oxide. This hypothesis was tested through tissue-specific gene silencing of *pr* and *Sptr* (encoding sepiapterin reductase, which converts 6-PTP to BH_4), observing their impact on MT morphology and systemic Zn^{2+} concentration. I found a potential role for serotonin in the excretion of Zn^{2+} -storage granules.

INTRODUCCIÓN

***Drosophila melanogaster* como organismo modelo de estudio**

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un organismo modelo ampliamente utilizado en investigación biomédica debido a las ventajas que ofrece; fácil y económico cultivo en laboratorio, ciclo de vida corto, alta producción de embriones y manejabilidad a modificaciones genéticas lo convierten en una herramienta experimental invaluable. Ha sido un organismo modelo crucial durante más de un siglo, utilizado para investigar diversos procesos, como la genética, el desarrollo embrionario, el aprendizaje, la memoria, el comportamiento y el envejecimiento. A pesar de las aparentes diferencias entre humanos y moscas de la fruta, se ha establecido que muchos mecanismos y vías biológicas fundamentales que controlan el desarrollo y la supervivencia son conservados a lo largo de la evolución entre estas especies (1).



Fig 1. *Drosophila melanogaster*. Se muestra una hembra silvestre de la mosca de fruta. Noten el color rojo de su ojo.

Mosca mutante *white*

Drosophila melanogaster fue inicialmente utilizada en el laboratorio por William Castle en 1901, pero es Thomas Hunt Morgan quien es considerado el pionero de la investigación con esta mosca de la fruta. Morgan contribuyó significativamente a la comprensión de la herencia al refinar la teoría propuesta por Gregor Mendel, utilizando *Drosophila melanogaster* para identificar genes y demostrando que se encontraban en los cromosomas. Sus logros le valieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1933

por sus descubrimientos sobre el papel de los cromosomas en la herencia (2). Un descubrimiento importante de Morgan fue la mosca mutante *white* (*w*), teniendo como característica los ojos de color blanco. Esta aportación demostró que los genes no sólo eran un concepto teórico, sino que eran objetos físicos(2).

Morgan y colaboradores demostraron que el fenotipo del ojo de color blanco es dado por una mutación en el gen *white* (*w*) ubicado en el cromosoma X cuya expresión del gen está presente en tres tejidos diferentes: los túbulos Malpighianos (MTs), el cuerpo graso y los ojos (3,4).



Fig 2. *Drosophila melanogaster w*. Se muestra una mosca ♀, hembra mutante en el gen *white*. Noten la ausencia de pigmentos en los ojos, característica por la cual se nombró la cepa. Varias décadas después de su descubrimiento, se demostró que el gen *w* codifica un transportador del tipo ABC (5).

Pigmentación del ojo de *Drosophila melanogaster*

La pigmentación del ojo de *Drosophila melanogaster* se logra mediante la síntesis y depósito de dos tipos de pigmentos: las drosopterinas rojas, derivadas del GTP, y los ommocromos marrones, derivados del triptófano (3). Estos procesos bioquímicos contribuyen a la variedad de colores en los ojos de la mosca de la fruta. La pigmentación en *Drosophila melanogaster* implica el transporte de precursores de pigmentos a las células pigmentarias mediante transportadores de membrana de la superfamilia ABC, codificados por los genes *white* (*w*), *scarlet* (*st*) y *brown* (*bw*) (6).

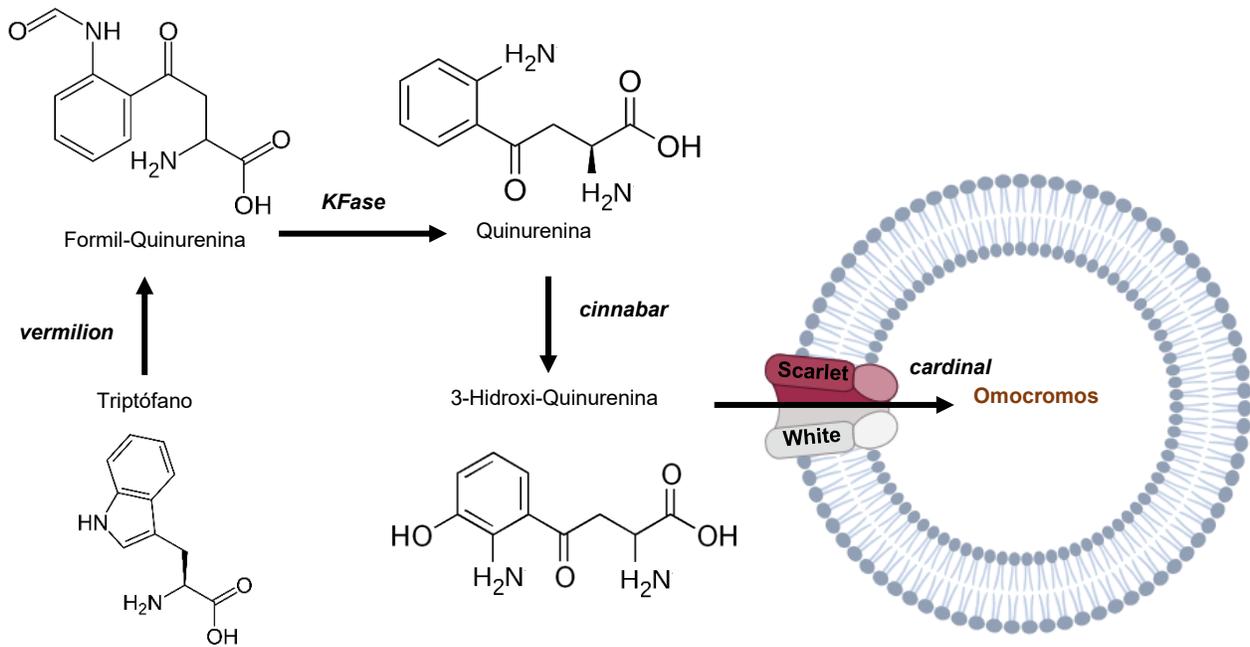


Fig 3. Ruta de biosíntesis de los omocromos. El pigmento omocromo se deriva del triptófano.

La evidencia genética y bioquímica indica que los productos genéticos de *white* y *scarlet* (Figura 3) forman un transportador de 3-hidroxi-quinurenina (derivada de la degradación del triptófano), mientras que los productos de *white* y *brown* forman un transportador de algún precursor de las drosopterinas, posiblemente la 6-piruvil tetrahidroneopterina (Figura 4). El proceso de transporte de estos metabolitos contribuye a la síntesis y deposición de pigmentos en las células, determinando la pigmentación final en los ojos de la mosca de la fruta (7,8).

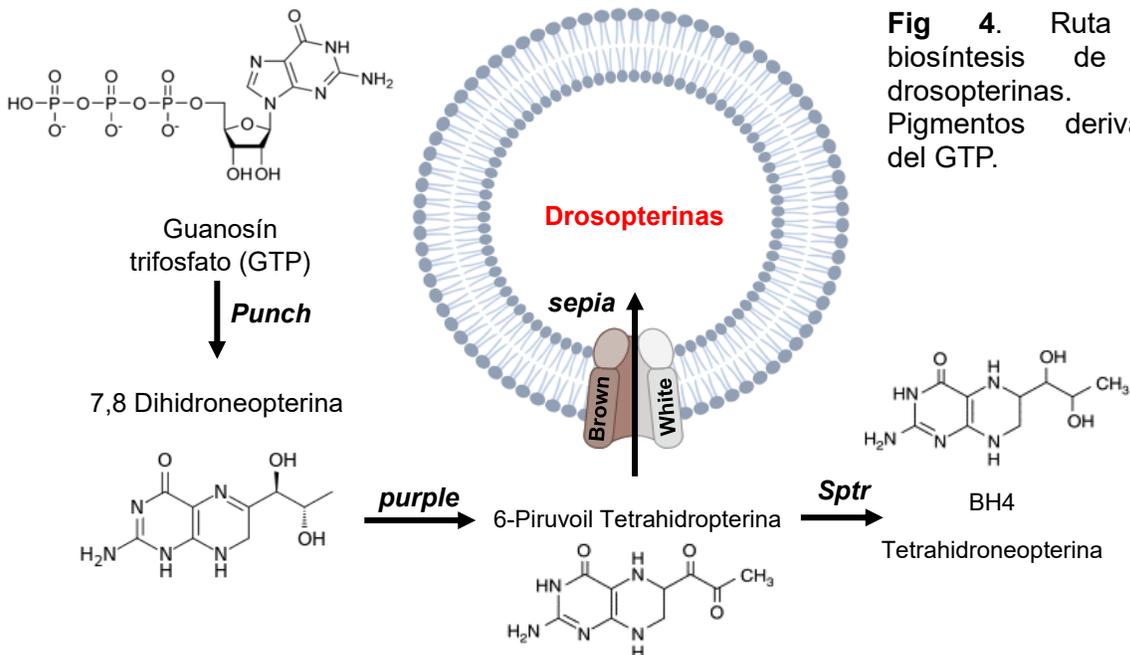


Fig 4. Ruta de biosíntesis de las drosopterinas. Pigmentos derivados del GTP.

Las proteínas esenciales conocidas como transportadores dependientes de ATP (del inglés *ATP-binding cassette*) o transportadores ABC, se encuentran en todos los reinos de la vida. Estas proteínas emplean la energía liberada durante la hidrólisis del ATP para agilizar el proceso de incorporación de nutrientes en las células, así como para la expulsión de compuestos tóxicos o elementos esenciales a través de membranas. La estructura típica de los transportadores ABC incluye dominios transmembrana (TMD) y dominios de unión a nucleótidos (NBD), donde los TMD reconocen los ligandos, y los NBD actúan como el motor de energía del transportador, facilitando la unión y la hidrólisis del ATP (9).

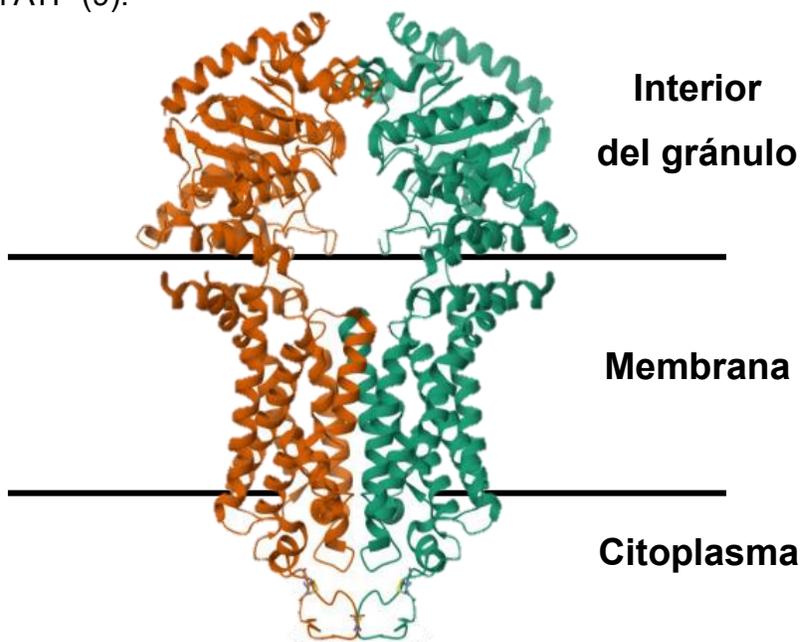


Fig 5. Estructura del transportador completo ABC en su forma cerrada. Los dominios de unión a nucleótidos (NBD) se orientan hacia el citoplasma para actuar como motor de energía del transportador y facilitando la unión e hidrólisis del ATP.

Los mencionados dominios pueden presentarse en diversas disposiciones: distribuidos entre cuatro polipéptidos separados, como en el caso del transportador de fosfato en *Escherichia coli*; distribuidos entre dos polipéptidos, cada uno con un dominio transmembrana y uno citoplasmático, como se evidencia en los transportadores de precursores del pigmento en *Drosophila melanogaster*; o presentes en un solo polipéptido, como ocurre en los bien estudiados transportadores ABC eucarióticos, que incluyen al regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en humanos y ratones. En cada caso, estos

dominios desempeñan funciones específicas en el reconocimiento de sustratos y en el acoplamiento con la energía derivada de la hidrólisis del ATP (5).

No obstante, se especula que la presencia del dímero *white-scarlet* también está presente en los túbulos Malpighianos (MTs), sirviendo como transportador para metabolitos de la vía de degradación del triptófano. Este dímero se localizaría en las membranas subcelulares, permitiendo el almacenamiento de la 3-hidroxiquinurenina que a su vez se une a Zn^{2+} (10).

Túbulos Malpighianos de *Drosophila Melanogaster*

Los MTs se conforman de dos pares de túbulos, un par posterior y otro par anterior, conectados por con sus extremos proximales al canal alimentario en la unión entre el intestino medio y el intestino posterior (Fig. 6), manteniéndose en contacto directo con la hemolinfa, para funcionar como órganos excretores y osmoreguladores (11).

Deben su nombre al científico *Marcelo Malpighi*, quien es considerado “el padre” de la histología y la fisiología comparada. Malpighi realizó diversas disecciones de números insectos, describiendo dichos componentes, incluyendo los túbulos Malpighianos (12).

La hemolinfa se filtra a los túbulos, estos absorben iones y otras sustancias de la hemolinfa y excreta los desechos del metabolismo en su lumen. El líquido fluye por el túbulo y desemboca en el intestino posterior. De regreso, las células de los MTS de la parte posterior absorben los nutrientes funcionales, transportándolos a través de la célula hasta la hemolinfa. Las sustancias no funcionales o tóxicas, se mantienen en la orina para su posterior excreción (13).

Los túbulos están conformados por dos tipos de células tubulares: tipo I (Principales) y tipo II (secundarias o estrelladas) (14); Las células principales mantienen 5 clases de transportados que componen su función: Na^{+} - K^{+} ATPasa, canales de K^{+} , V-ATPasa, intercambiador de metales alcalinos/protones (11) y transportadores de tipo ABC (10). En conjunto, estos transportadores realizan transporte activo de iones desde la parte basolateral hasta la parte apical de la célula. Por su parte, las células secundarias

funcionan como ruta para el transporte pasivo y el paso de agua a través de canales de

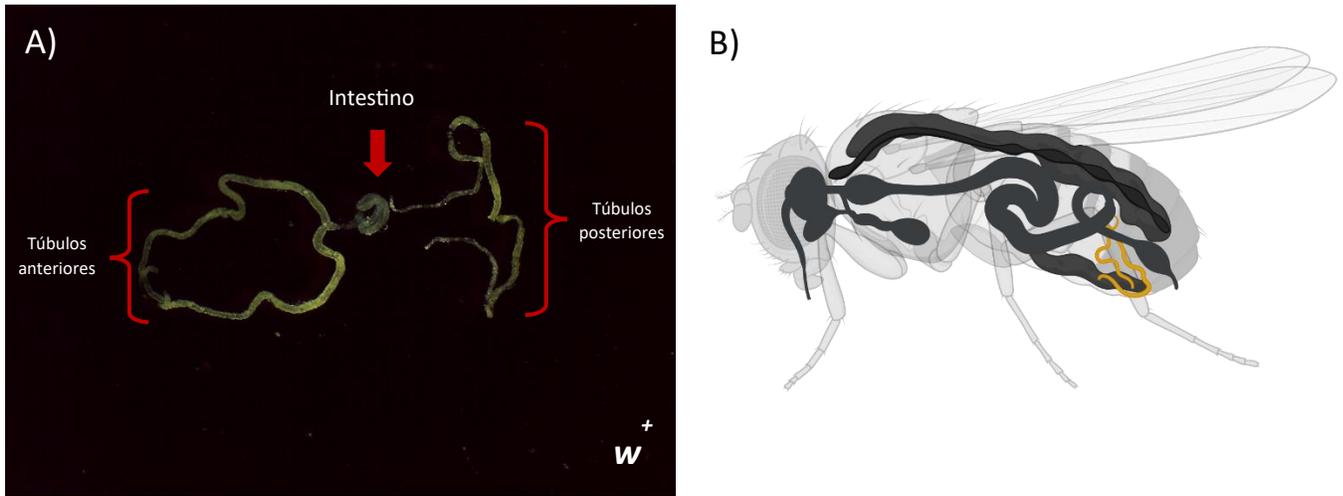


Fig 6. Túbulos Malpighianos de *Drosophila Melanogaster*. A) Los túbulos están conformados por dos pares diferentes, uno posterior y otro anterior, estando conectados al intestino medio. B) Esquema representativo de los MTs en el interior de *Drosophila Melanogaster*.

Tal y como se mencionó anteriormente, el Zn^{2+} se almacena en los MTs de *Drosophila melanogaster* (10), este almacenamiento estaría dado por gránulos subcelulares que están conformados por los dímeros de white-scarlet, transportadores como ZNT35C y su almacenamiento depende también de metabolitos de la vía de degradación de triptófano.

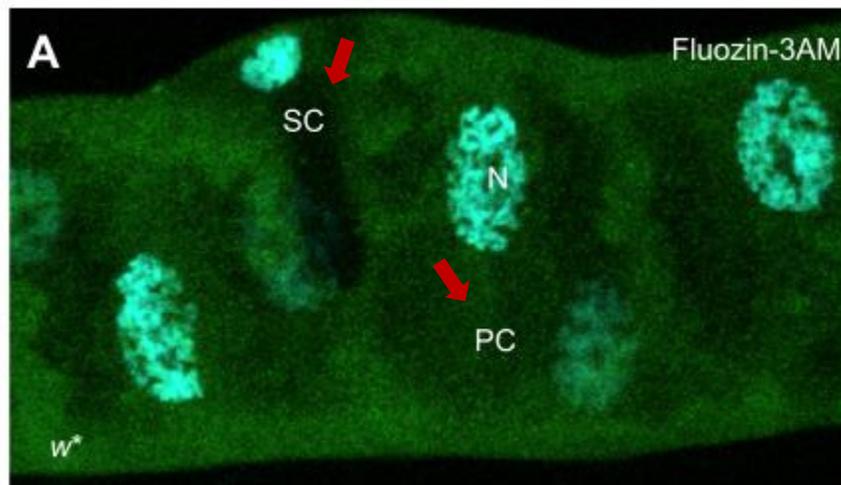


Fig 7. Células primarias y secundarias de los MTs (16). Las fechas en rojo muestran las dos diferentes células: PC (Células primarias) y SC (Células secundarias).

Cabe destacar que, hay genes conservados evolutivamente tanto en los MTs como en los riñones humanos, por ende, el uso de herramientas genéticas disponibles en *Drosophila melanogaster* se pueden utilizar para comprender el desarrollo y la función del riñón. De esta manera, el sistema renal de *Drosophila* ofrece una valiosa oportunidad para entender las causas moleculares de diversas enfermedades renales ayudando a identificar posibles objetivos para el tratamiento y prevención de la insuficiencia renal (14).

El zinc y su papel biológico

Los iones de zinc (Zn^{2+}) están ampliamente presentes en el cuerpo humano, desempeñando funciones clave como componentes reguladores, estructurales y catalíticos en más de 3000 proteínas, que incluyen enzimas y factores de transcripción. Su participación es crucial para diversos procesos biológicos y destaca su papel esencial en la salud y funcionamiento del organismo (17).

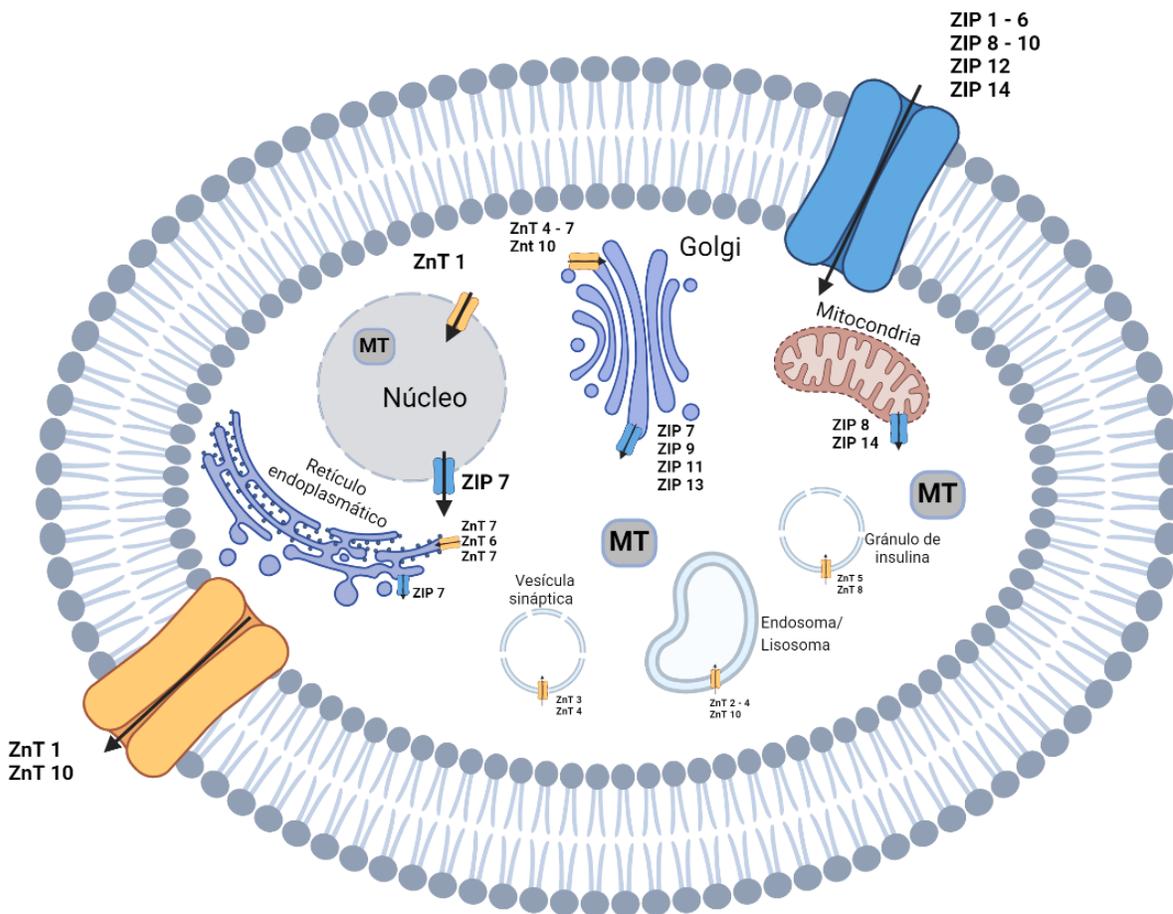


Fig 8. Esquema de la homeostasis del Zn^{2+} (17). La regulación de los flujos de zinc celular dentro y fuera de la célula está controlada por varias proteínas (ZIP: azul y ZnT; Naranja) y metalotioneinas (MT; gris) Las MT son proteínas clave en la homeostasis del Zn^{2+} ; actúan como amortiguadores de Zn^{2+} al unirse a estos iones y liberarlos en el citoplasma para aumentar los depósitos intracelulares de Zn^{2+} libre, según las necesidades celulares.

Dada la diversidad de funciones que requieren Zn^{2+} , es crucial mantener niveles celulares regulados para garantizar concentraciones fisiológicas óptimas. A diferencia de otros metales pesados que pueden acumularse y causar toxicidad, el cuerpo regula eficientemente la absorción, distribución subcelular, almacenamiento y excreción de Zn^{2+} .

Las principales proteínas que están involucradas en la homeostasis del Zn^{2+} incluyen a los importadores de Zn^{2+} (ZIPs, proteínas similares a Zrt e Irt), a los exportadores de Zn^{2+} (ZnTs, que transportan el ion del citosol hacia afuera de la célula o hacia el interior de organelos) y a las metalotioneínas (quienes unen hasta 7 iones de Zn^{2+} mientras la concentración esté elevada en el citosol). Estos actores desempeñan un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio adecuado de Zn^{2+} en el organismo (18).

Se ha visto la participación del Zn^{2+} en la señalización celular. Se ha detectado Zn^{2+} en vesículas presinápticas de las neuronas glutamatérgicas del hipocampo que, tras su liberación, tras estimulación exocítica, después de esta liberación, el Zn^{2+} puede actuar como primer mensajero interactuando con receptores de la membrana plasmática para generar respuestas intracelulares, o actuar como modulador de señal, siendo transportado al interior de las células a través de canales iónico-activados por transmisores (19). El Zn^{2+} que se libera puede unirse a diversos receptores neuronales como los NMDA, los GABA, y los receptores de glicina, mostrando diversos efectos moduladores dependiendo de las isoformas de los receptores, de la concentración de Zn^{2+} y de la actividad sináptica (20).

No obstante, en órganos secretores como la próstata, el páncreas, las glándulas mamarias o el intestino, también almacenan Zn^{2+} dentro de organelos especializados. En estos órganos, el Zn^{2+} ayuda en las de síntesis/secreción, y se libera mediante exocitosis vesicular para la modulación paracrina autocrina y endocrina de diversos objetivos (21).

Además, se ha observado que el zinc estimula la señalización de fosfotirosina al inhibir la actividad de la fosfatasa, lo que potencialmente contribuye al mantenimiento de la señalización de fosforilación y la proliferación celular (22)

Por último, el Zn^{2+} contribuye en el mantenimiento de la estabilidad del genoma a través de varios mecanismos antioxidantes: Se une al superóxido dismutasa (SOD) de cobre (Cu)/Zn, ayudando a eliminar el anión superóxido ($O_2 \bullet^-$), una molécula altamente reactiva (23). Además, el Zn^{2+} directamente unido a grupos tiol y sulfhidrilo previene la oxidación de proteínas, y su regulación del metabolismo de la metalotioneína a través de MTF-1 reduce el estrés oxidativo, actuando como amortiguadores del metal (24). Las metalotioneínas, inducidas por un aumento de Zn^{2+} , no solo regulan Zn^{2+} , sino que también eliminan ROS. La expresión de metalotioneína disminuye en células con deficiencia de Zn^{2+} , asociada con un aumento del estrés oxidativo (25).

Con base a estos datos, el Zn^{2+} se considera un micronutriente vital como componente de numerosas enzimas y factores de transcripción, como factor de señalización promoviendo diversas respuestas celulares.

En *Drosophila melanogaster*, su genoma codifica para 10 proteínas Zip, 7 proteínas ZnT, 5 MT y MTF-1 (26). Al respecto, se conocen las funciones de varios miembros mediante experimentos que hicieron uso del sistema Gal4/UAS (26); Un conjunto de transportadores de Zn^{2+} , se localiza en la membrana plasmática y participan en la absorción de Zn^{2+} en la dieta: Zip42C.1 (CG9428), Zip42C.2 (CG9430) y Zip89B (CG6898) y otro grupo fue identificado para mover el Zn^{2+} absorbido hacia la hemolinfa: ZnT63C (CG17723) y ZnT77C (CG5130) (27–29)

Como se mencionó anteriormente, los MTs de *Drosophila* son órganos renales que realizan funciones excretoras como el riñón en los vertebrados. El único transportador que se conoce que participa en la excreción de Zn^{2+} de los MTs es ZnT35C (homólogo en mamíferos de ZnT2, 3, 4 y 8). Este exportador está localizado en la membrana apical de las células de los MTs (27) y en los gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} (10). También se conoce la participación de Zip71B y de dZnT1 en la excreción y reabsorción de Zn^{2+} , respectivamente (28).

Un estudio reciente ha mostrado que las moscas son capaces de detectar el Zn^{2+} en la comida, evitando dietas con altas concentraciones de Zn^{2+} , todo esto mediante la acción directa de la hormona adipocinética, manteniendo un eje insulina-glucagón para la

detección de metales en *Drosophila melanogaster* (29). Dando cuenta que los animales regulan la cantidad del alimento ingerido para evitar la toxicidad por el metal (29).

Para concluir, el modelo de *Drosophila* es ampliamente utilizado para el estudio de la homeostasis de metales, específicamente el Zn^{2+} , porque los mecanismos de regulación en mamíferos están conservados en *Drosophila melanogaster* (30).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Vía de degradación del triptófano y su relación con el zinc corporal

Los insectos acumulan Zn^{2+} en gránulos especializados llamados organelos relacionados a los lisosomas (LROs, por sus siglas en inglés) o gránulos de Zn^{2+} , presentes en las células principales del MTs. El proceso de concentración de Zn^{2+} en estos gránulos forma parte de la regulación intracelular y sistémica de este metal en los insectos. La formación de los gránulos de Zn^{2+} implica la acción coordinada de varios complejos protéicos como los AP-3, Rab32, HOPS y BLOC (16). Además, se requiere la participación de transportadores específicos como el dímero *white-scarlet* (homólogo de ABCG2) y el ZnT35C (homólogo de ZnT2/ZnT3/ZnT8), sin embargo, a la fecha se desconoce cómo se regula el proceso de biogénesis de los gránulos de Zn^{2+} para la correcta acumulación y almacenamiento de zinc en las células primarias de los MTs (Fig. 9)

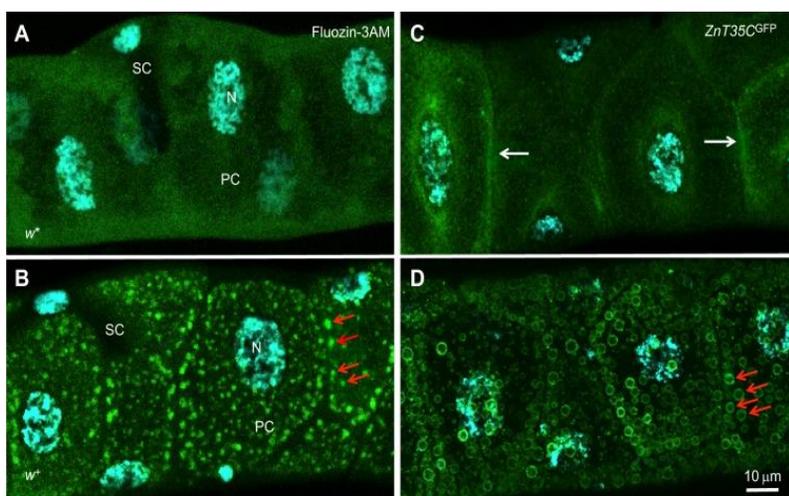
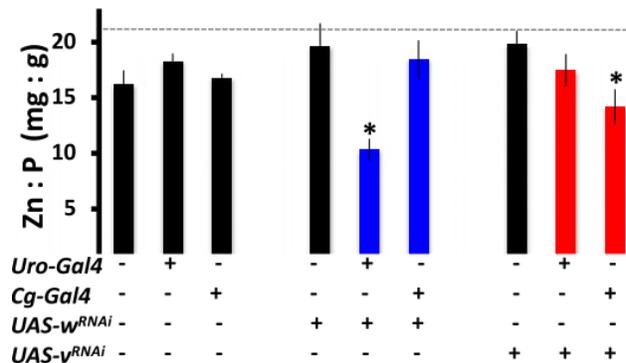


Fig 9. Gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} en los MTs (16). A) MTs de hembras adultas w^+ no muestran señal del indicador de zinc, FluoZin-3AM. B) En MTs de hembras adultas w^+ sí se observa acumulación de la fluorescencia, sugiriendo la presencia de los gránulos de almacenamiento de zn indicados con flechas rojas. C) En la mutante de w^- , el transportador ZnT35c se localiza en la membrana celular, indicado por las flechas blancas, D) a diferencia de las moscas silvestres, donde el transportador se localiza en la membrana de los gránulos de almacenamiento de zinc, indicados con flechas rojas.

Recientemente, se ha demostrado que las reservas corporales de Zn^{2+} en *Drosophila melanogaster* dependen del consumo de triptófano (10). La quinurenina, un metabolito de la ruta de degradación del triptófano es secretada del cuerpo graso de los insectos desencadenando la formación de gránulos de almacenamiento de zinc en los MTs, siendo la 3-hidroxiquinurenina y el ácido xanturénico, metabolitos río debajo de la quinurenina, quelantes endógenos del zinc. Esto se comprobó con la estrategia experimental que se define en la leyenda de la fig. 10, se basa en ARN de interferencia en forma de tejido específico mediante el sistema Gal4/UAS.

Fig 10. Efecto del silenciamiento tejido-específico de *white* y *vermillion* en el almacenamiento corporal de Zn^{2+} (10). Utilizando el sistema Gal4/UAS se silenciaron los genes *white* (barras azules) y *vermillion* (barras rojas) en los MTs (*Uro-Gal4*) y en el cuerpo graso (*Cg-Gal4*). Se observan efectos en el almacenamiento corporal de Zn^{2+} al silenciar *white* en los MTs y al silenciar *vermillion* en el cuerpo graso.



De esta forma se sugiere que la quinurenina está involucrada en la homeostasis fisiológica del Zn^{2+} participando en la regulación de su almacenamiento. Cabe mencionar que tanto la vía de la quinurenina como el Zn^{2+} son conocidos moduladores de la inmunidad, la presión arterial, el envejecimiento y la neurodegeneración (14).

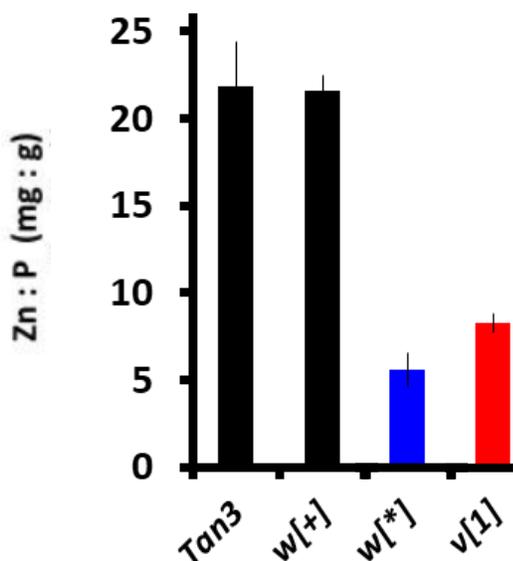


Fig 11. Se necesitan de *w* y *v* para el almacenamiento de Zn^{2+} (17). Los genotipos silvestres (*Tan3* y *w*+) pueden almacenar Zn^{2+} , pero al presentarse las mutaciones de *w*- o *v*, dejan de poder almacenar Zn^{2+} .

Aunado a esto, se ha observado en larvas mutantes de *vermilion*, un gen que codifica para la enzima vermilion y que participa en la vía de degradación de triptófano, al momento de administrar Zn^{2+} en sus dietas, estas no eran capaces de almacenarlo, debido a que no se encuentran los metabolitos necesarios para almacenarlo, pero al momento de administrar quinurenina + Zn^{2+} (metabolito de la vía de triptófano) sí eran capaces de almacenar el Zn^{2+} distribuido en la dieta, hecho que tiene sentido debido a que la quinurenina está río debajo de la mutación de *vermilion*, por ende se pueden formar los metabolitos necesarios (3-hidroxiquinurenina y ácido xanturénico) para interactuar con el Zn^{2+} y así almacenarlo (10).

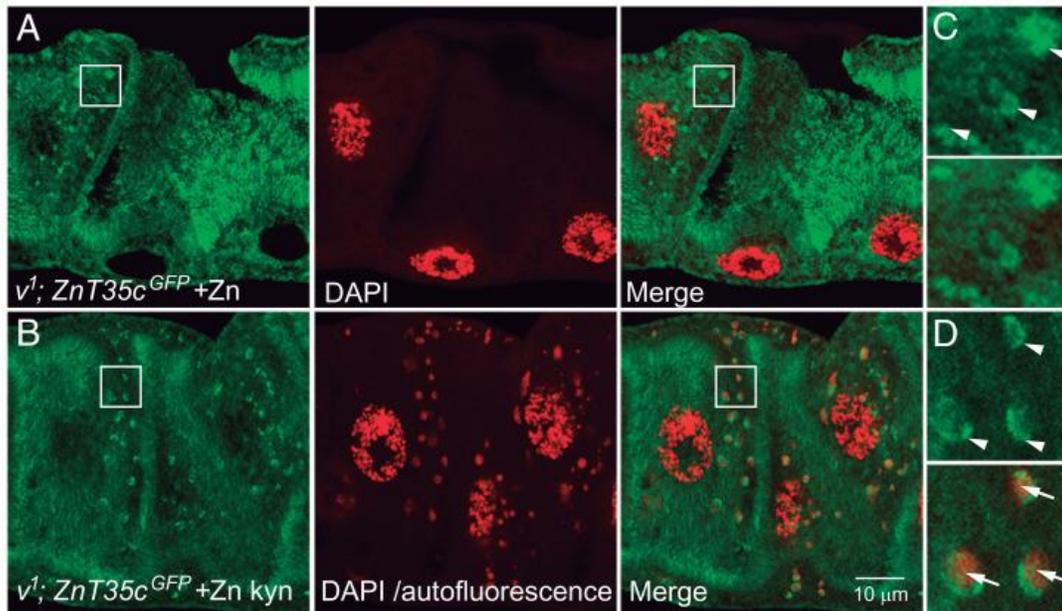


Fig 12. Se necesitan metabolitos de la vía de degradación de triptófano para almacenar Zn^{2+} en los MTs (10). A y C) En larvas mutantes de *vermilion* con ZnT35c marcado con GFP se les administró Zn en dietas, pero no se observó ningún indicio de almacenamiento de zinc aún a pesar de observarse gránulos. B y D) En estas mismas larvas se les administró también quinurenina y se pudo observar indicios de almacenamiento, se formó una autofluorescencia de la interacción de metabolitos de la vía de triptófano y Zn.

Entonces, se sugiere que el Zn^{2+} se almacena en gránulos subcelulares, unido a 3-hidroxiquinurenina y ácido xanturénico en los MTs de *Drosophila melanogaster* (10). Es importante destacar, que el fenotipo de poco zinc también muestra otro fenotipo particular; Los MTs pierden coloración al no almacenar Zn^{2+} (16). Los túbulos de las

moscas que pierden los almacenes Zn^{2+} , cambian su coloración amarilla a una transparente y blanquecina (inclusive la morfología del túbulo se ve alterada). Las moscas que sí son capaces de almacenar Zn^{2+} , sus MTs mantienen una coloración amarilla, por sustancias que se acumulan en las células de los MTs (10,16,31).

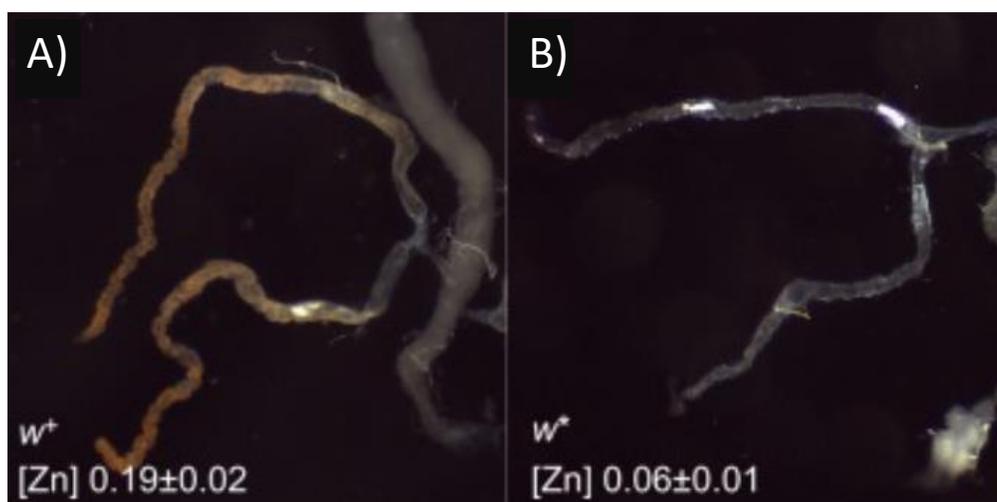


Fig 13. MTs de *D. Melanogaster* y su fenotipo de poco zinc. A) Se muestran unos MTs de una mosca silvestre, la cual es capaz de almacenar Zn^{2+} , se observa que sus túbulos presentan una coloración más fuerte y sin transparencias. B) Los MTs de una mosca mutante *white*, la cual no es capaz de almacenar Zn^{2+} , se observa que sus túbulos presenten una menor coloración y transparencias.

Se hipotetiza, que los gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} , que mantienen una interacción de metabolitos de la vía de degradación de triptófano y el Zn^{2+} , son las responsables de la coloración de los MTs (10), aunque también se propone que los mismos MTs mantienen otro tipo de gránulos pigmentarios de riboflavina (16). En otras palabras, se desconoce hasta el momento los componentes que mantienen la coloración silvestre de los MTs y su relación con el Zn^{2+} . Datos no publicados de nuestro laboratorio, muestran que el tratamiento de moscas tipo silvestre con un quelante específico de Zn^{2+} , causa pérdida de coloración de los MTs.

Posible interacción entre el zinc corporal y la vía de síntesis de tetrahidrobiopterina

La biosíntesis de drosopterinas se logra mediante una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. El primer paso en la biosíntesis de drosopterinas es la conversión de GTP en trifosfato de 7,8-dihidroneopterina (H₂-NTP) con la liberación de ácido fórmico por la GTP ciclohidrolasa I (EC 3.5.4.16; codificada por el gen *punch*). Luego, el H₂-NTP se convierte en 6-piruvoiltetrahydropterina (6-PTP) mediante la 6-PTP sintasa (EC 4.6.1.10; codificada por el gen *purple*). A continuación, la PDA sintasa (EC 1.5.4.1; codificada por el gen *sepia*) convierte 6-PTP en PDA para luego pasar a la síntesis de drosopterinas (32). Los primeros dos pasos en la biosíntesis de drosopterinas se comparten en la biosíntesis *de novo* de tetrahidrobiopterina (BH₄), que se logra mediante por la acción de la sepiapterina reductasa (EC 1.1.1.153; *Sptr*) que convierte 6-PTP a BH₄ (32).

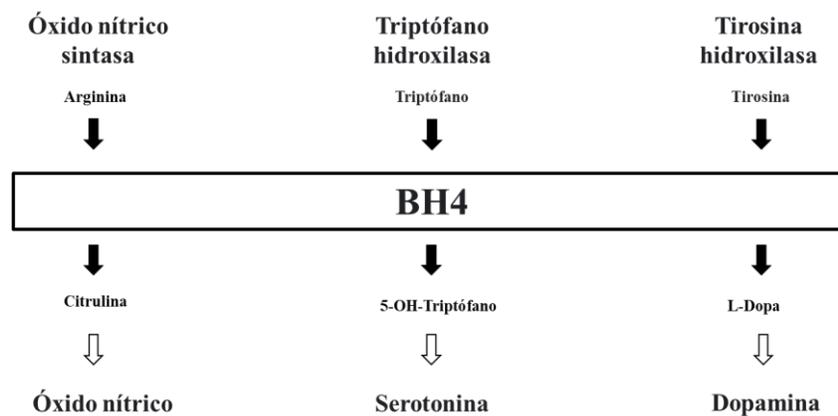


Fig 14. BH₄ como cofactor importante para la síntesis de serotonina, dopamina y óxido nítrico.

La BH₄ es un cofactor enzimático fundamental necesario para la síntesis de serotonina, dopamina y óxido nítrico (Figura 7). En mamíferos, la BH₄ es esencial para numerosos procesos fisiológicos a nivel periférico y central, como la vascularización, la inflamación, la homeostasis de la glucosa, la regulación del estrés oxidativo y la neurotransmisión (33). Respecto a la presencia de los metabolitos en los tejidos, en un estudio donde se estudió el circuito de alimentación en *D. melanogaster* (34), se encontró que *Punch* (*Pu*) y *purple* (*pr*) son necesarios en el cuerpo gordo para generar 6-PTP a partir de GTP. 6-PTP luego se transfiere al cerebro donde se convierte en BH₄ en las neuronas del

neuropéptido F (NPF). A través de un mecanismo aún desconocido, BH₄ parece reducir la liberación de NPF, lo que a su vez reduce la alimentación, mostrando que 6-PTP actúa como una señal derivada de la grasa que se convierte en BH₄ e induce saciedad al inhibir la actividad de las neuronas NPF (Figura 9).

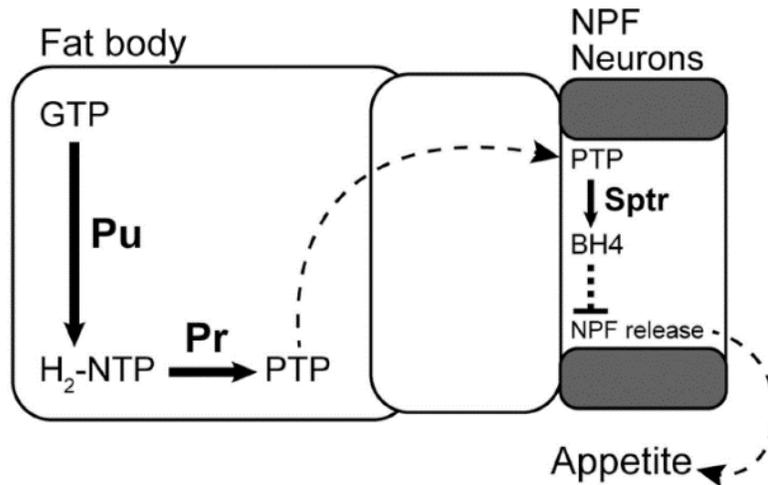


Fig 15. Modelo de síntesis de BH₄ y su actividad en *Drosophila melanogaster* (34). *Pu* y *pr* son necesarios en el cuerpo graso para generar 6-PTP a partir de GTP. En dicho modelo, 6-PTP se transfiere al cerebro donde se convierte en BH₄ por la enzima *Sptr* en las neuronas peptidérgicas. BH₄ parece reducir la liberación de NPF, lo que a su vez reduce la alimentación.

En recientes observaciones del laboratorio, se ha visto que una mutación en la enzima *pr* da lugar a una disminución en la concentración del Zn²⁺ corporal. Sugiriendo una relación entre la vía de BH₄ las concentraciones corporales del Zn²⁺ (35).

También se ha observado el efecto de la dieta con alguno de los metabolitos de la vía de degradación de triptófano en moscas mutantes en las vías de síntesis de los pigmentos de los ojos de *D. Melanogaster* y sus concentraciones corporales de zinc (35). Los datos indican que los metabolitos de la vía de degradación de triptófano no recuperan las concentraciones típicas de Zn²⁺ en la mosca mutante de *pr*, el cual presenta un fenotipo de baja concentración de Zn²⁺.

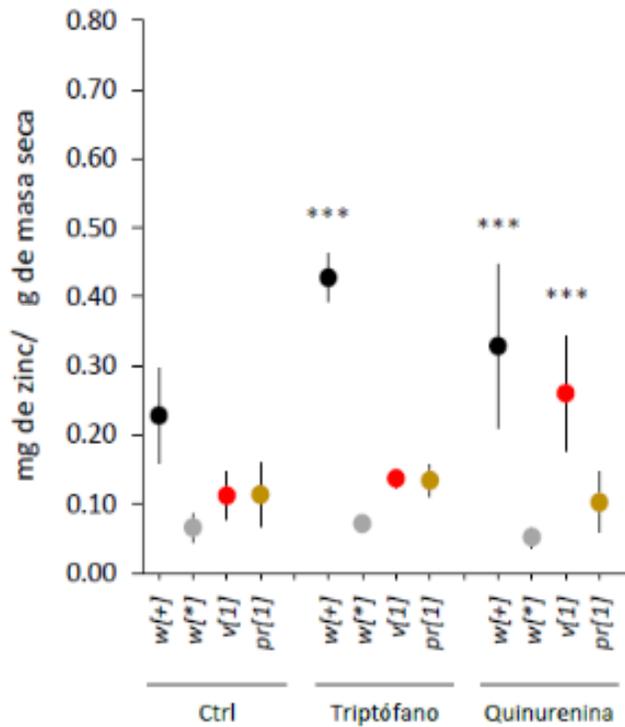


Fig 16. Las moscas mutantes de *purple* también tienen un fenotipo de poco zinc (35). Las moscas mutantes de purple, un gen que codifica para la enzima purple y a su vez participa en la vía de síntesis de BH₄, también presentan un fenotipo de poco zinc y la administración de metabolitos de la vía de degradación de triptófano no recuperan el almacenamiento de Zn.

Este resultado confirma que los metabolitos de la vía de quinurenina no interfieren a la vía de síntesis de BH₄ y por ende no son capaces de recuperar la pérdida de Zn²⁺ en esta mutación (35).

Además, se sabe que la enzima GTPCH1, homologa de la enzima *punch* en *D. Melanogaster*, tiene tres sitios de unión para el Zn²⁺ (36), uniéndose a dos cisteínas y una histidina (C141 – H144 – C212); Se ha visto en modelos murinos, que una desregularización homeostática del Zn²⁺, consecuencia de una hiperglucemia por estreptozocina, da como consecuencia la liberación del Zn²⁺ de GTPCH1 y la degradación de la misma, esto también da como resultado una baja concentración de BH₄, no obstante, una suplementación exógena del Zn²⁺ revierte la reducción de GTPCH1 y BH₄ (37). Se desconoce si el aumento de BH₄ es dado por la regularización de GTPCH1 en si o por la suplementación exógena de Zn²⁺, no obstante, estos datos nos muestran una primera relación entre estas 2 variables.

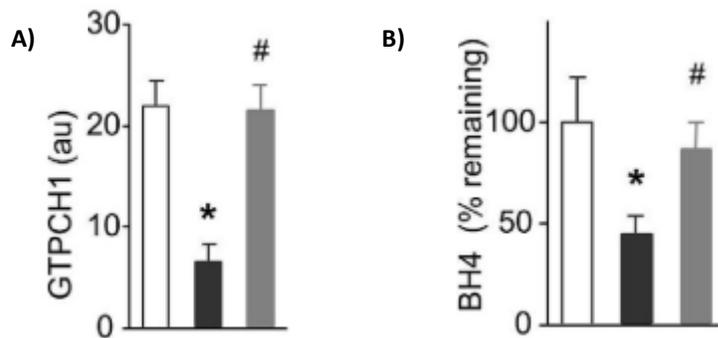


Fig 17. Suplementación de Zn²⁺ en ratones diabéticos (37). A) La barra blanca muestra los niveles de la enzima GTPCH1 en ratones control, la barra negra muestra la administración de estreptozocina que provoca una hiperglucemia en ratones y al administrar Zn²⁺ en este mismo grupo (barra gris) los niveles de GTPCH1 se recuperan. B) Bajo los mismos estándares, la administración de estreptozocina (barra negra) que provoca hiperglucemia, los niveles de BH₄ disminuyen, pero al administrar Zn los niveles de BH₄ se recuperan.

Por último, se ha visto que *catsup* (*catecholamines up*), un regulador negativo de la actividad de la tirosina hidroxilasa (38) y que a su vez tiene relación directa con BH₄ (33) también tiene relación con la homeostasis de Zn²⁺; *Catsup* codifica por el transportador Zip7, localizado en el Golgi. Al usar RNAi de *catsup* específicamente en el intestino posterior, este disminuye la acumulación de Zn²⁺ y a su vez detiene el desarrollo larvario, pero el recate por Zip7 humano puede compensar los defectos provocados por el RNAi de *catsup*, sugiriendo que este regulador negativo de tirosina hidroxilasa tiene un papel en la homeostasis de Zn²⁺ (39).

Con base a estos datos, en este trabajo se plantea usar un protocolo que nos permita conocer acerca de esta relación de la vía de biosíntesis de BH₄ y el almacenamiento de zinc.

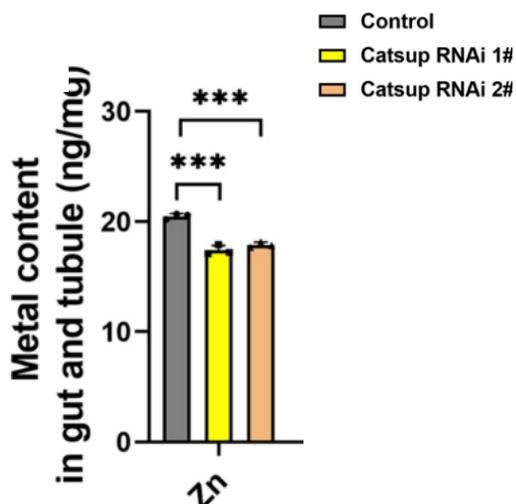


Fig 18. La inhibición de *catsup* decrece los niveles de Zn²⁺ en los MTs y en el intestino (10). Inhibiendo la expresión de *catsup* en el intestino posterior, se observó que los niveles de Zn²⁺ disminuyeron tanto en este mismo tejido específico, como en los MTs.

HIPÓTESIS

- El silenciamiento de genes que codifican para enzimas que sintetizan BH4, tendrá un impacto en la homeostasis del Zn^{2+} sistémico.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar en qué tejidos de *Drosophila melanogaster* se requiere la expresión de los genes *purple* y *Sptr* para la regulación del Zn^{2+} corporal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Corroborar mediante un gen reportero y microscopía confocal la expresión tejido específico de las líneas *Gal4*.
- Evaluar mediante microscopía estereoscópica el fenotipo de los túbulos Malpighianos de las moscas con los genes *pr* y *Sptr* silenciados.
- Cuantificar mediante espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo el contenido de Zn^{2+} en las moscas.
- Evaluar mediante microscopía confocal la distribución de gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} con FluoZin-3AM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema *Gal4/UAS*

Se empleará el sistema *Gal4/UAS* para inhibir la expresión de la enzima *pr*, *spt*r en tejidos específicos: los TM, el cuerpo graso y neuronas peptidérgicas (Tabla 1). Los MTs y el cuerpo graso son sitios de regulación de Zn^{2+} previamente comprobados (10), mientras las neuronas peptidérgicas se investigaron por su implicación previa a la función de *Sptr*. A su vez, para confirmar que se está usando un *driver* específico, se utilizará el marcador *UAS-GFP* para comprobar la expresión en cada tejido.

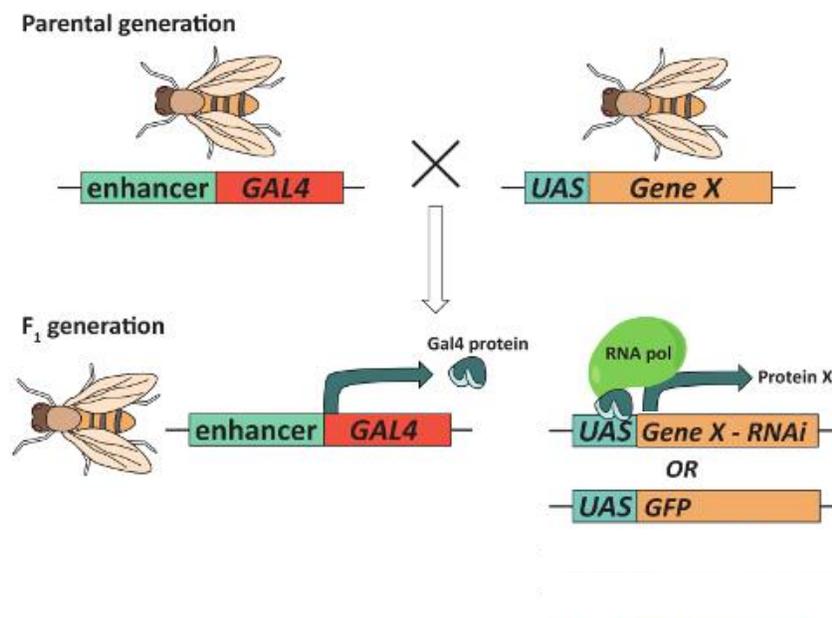


Fig 19. Sistema bipartito GAL4/UAS. El sistema está repartido en dos partes en dos diferentes parentales, al cruzarse, en la progenie (primera generación) En las células donde se expresa el factor de transcripción GAL4, esta proteína reconoce los elementos UAS, Cuando GAL4 se une a UAS, desactiva la transcripción del gen de interés, o activa la transcripción de algún gen en específico.

Mantenimiento de los stocks

Las moscas se desarrollan a 24°C en alimento estándar (agar 6.5%, levadura 40.9%, piloncillo 51.2%, grenetina 1.1% y ácido propiónico 0.1%). Las mutantes están descritas en la Tabla 1.

Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo

La concentración de zinc en la mosca se determinó por espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Para la cuantificación de Zn²⁺ en los experimentos con el sistema Gal4/UAS se utilizaron exclusivamente las hembras para asegurar la presencia de al menos un alelo funcional de *w* y *v*. Su edad para la recolección fue de 4 a 7 días de edad y se almacenaron a -80°C. A posterior, se liofilizaron durante 6 horas. Se tomaron máximo 20 mg de masa seca, los cuales fueron digeridos a 200 °C durante 15 minutos en un sistema de digestión de microondas MARS6 (CEM).

Microscopía de fluorescencia y estereoscópica

Los MTs fueron disecados de hembras moscas adultas en PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂ HPO₄, 3 mM NaH₂ PO₄, pH 7.0). Para luego observar el fenotipo de color en los MTs mediante microscopía estereoscópica.

A su vez, diferentes tejidos correspondientes a la progenie de todos los *drivers* y los parentales de *UAS GFP* fueron disecados en PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂ HPO₄, 3 mM NaH₂ PO₄, pH 7.0). El tejido fue fijado con paraformaldehído (PFA) durante 5 minutos y lavado 3 veces por 3 minutos con PBS. Después de los lavados, los tejidos fueron montados en *Vecta Shield* con DAPI y observados bajo el microscopio confocal.

Mutantes		Stock
<i>w</i> ⁺	Alelo silvestre de <i>white</i> , cepa control	Propia del laboratorio
<i>w</i> ⁻	Mutación nula de <i>white</i>	Propia del laboratorio
<i>v</i> ¹	Mutación hipomórfica de <i>vermillion</i>	86542
<i>pr</i> ¹	Mutación hipomórfica de <i>purple</i>	370
<i>Trhn</i> ¹	Mutación nula de <i>triptófano hidroxilasa neuronal</i>	86147

Tabla 1. Los diferentes mutantes utilizados en este estudio. Número de stock pertenecientes a *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC).

Por otro lado, también se aplicó el ensayo de Fluozin-3AM, los MTs fueron disecados en PBS + 10% de suero fetal bovino (130 mM NaCl, 7 mM Na₂ HPO₄, 3 mM NaH₂ PO₄, pH 7.0). Posterior a ello se dejó incubar durante 25 minutos en una solución de Fluozin-3AM a 2 mM (500 ul de PBS + 10% SFB), para después realizar 2 lavados rápidos con PBS y un lavado de 10 min con PBS. El tejido fue fijado con paraformaldehído (PFA) durante 3 minutos y lavado 3 veces por 3 minutos con PBS. Después de los lavados, los tejidos fueron montados en *Vecta Shield* con DAPI y observados bajo el microscopio confocal.

Gal-4	Tejido específico	Stock
<i>CG</i>	Cuerpo graso	7011
<i>Uro</i>	Túbulos Malpighianos	Donada por Julian A. T. Dow (40)
<i>NPF</i>	Cerebro - neuronas peptidérgicas	25681

Tabla 2. Los diferentes tejidos específicos (*Gal-4*) a utilizar. Número de stock pertenecientes a *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC).

UAS	Acción	Stock
<i>RNAi pr</i>	Cuerpo graso	53346
<i>RNAi Sptr</i>	Túbulos Malpighianos	28968
<i>GFP</i>	Reportero	Propia del laboratorio

Tabla 3. Los diferentes transgénicos *UAS* que se usaron para reducir la expresión génica de *pr* y *Sptr*. La cepa *UAS-GFP* se usó para

confirmar el patrón de expresión de las cepas *Gal-4*. Número de stock pertenecientes a *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Prism (versión 8.4.3). Se realizó una ANOVA de una vía, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de tres o más grupos.

RESULTADOS

Los túbulos Malpighianos de la mutante de *purple* también presentan un fenotipo de poco Zn.

Se conocen bien los fenotipos de Zn^{2+} presentes en w^+ , w^- , v^1 y pr^1 (10,16,41), no obstante, se replicaron los experimentos para determinar que estos fenotipos se siguen manteniendo. Para ello se cuantificó el Zn^{2+} mediante el espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo (Fig. 20).

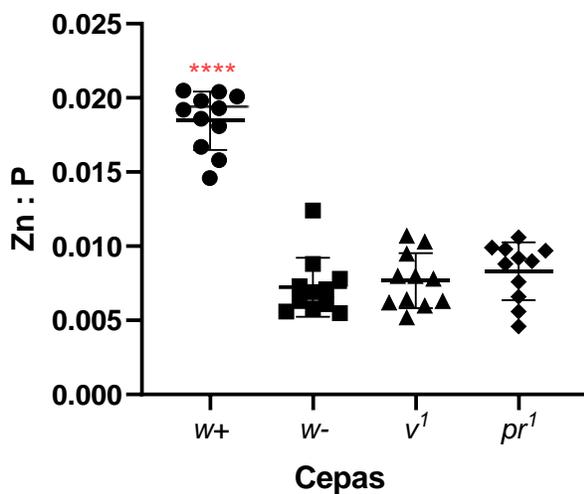


Fig 20. Efecto de las mutaciones en la ruta de biosíntesis de los pigmentos de los ojos de *Drosophila melanogaster* en la concentración de Zn^{2+} . Las moscas mutantes en los genes w , v y pr , tienen, aproximadamente, 3 veces menos zinc que la mosca silvestre w^+ que sí almacena Zn^{2+} . ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre las mutantes y la silvestre. **** $P < 0.0001$. $n=4$.

Se puede observar que las mutantes mantienen ese fenotipo de “poco Zn”, que se debe a problemas en el almacenamiento de Zn^{2+} a diferencia de la mosca silvestre que sí puede almacenar Zn.

Aunado a esto, también se decidió realizar disecciones de los MTs para observar si se mantiene el fenotipo de color en los túbulos, relacionado al poco Zn^{2+} (41); Los MTs de la mutante de *purple* también presenta un fenotipo similar a la mutante de *white* y *vermillion*. Se observa que los túbulos de *purple* son translucidos e incluso presentan coloraciones blanquecinas, también es claro que la forma de los túbulos es muy diferente a los túbulos de las moscas silvestres, son notablemente más cortos. Esto también se observa en la forma de los MTs de *vermillion* y *white*. Las diferencias cuantitativas se muestran en el anexo (Fig 42.)

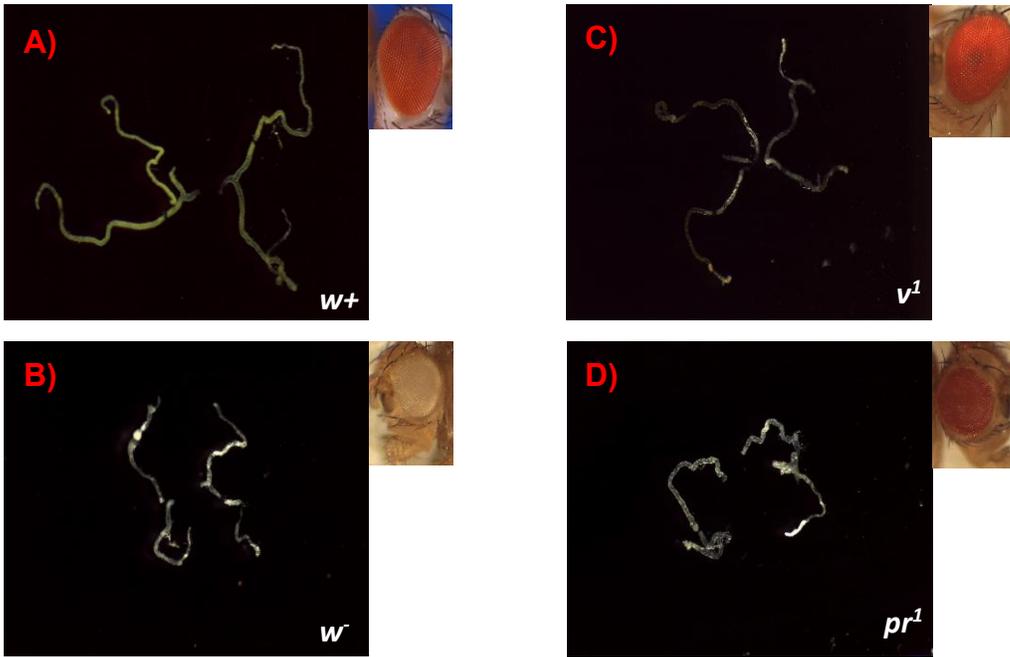


Fig 21. Diferencias entre w^+ , w^- , *purple* y *vermillion*. En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca silvestre y su respectivo color de ojos B) unos túbulos de una mosca w^- y su correspondiente color de ojos C) Los túbulos de una mosca mutante de v^1 y el color de ojos que corresponde a su mutación D) Los MTs de una mosca mutante pr^1 y sus respectivos ojos.

Las cepas Gal4 utilizadas presentan la marca de GFP correspondiente al patrón de expresión esperado.

Para verificar la especificidad de los *drivers*, se realizó una cruce por *driver* con un parental de UAS con GFP para poder observar que la marca fuese correspondiente al driver. Posteriormente se realizaron las disecciones en larvas de tercer estadio (debido a la facilidad de manipulación y asumiendo una continuidad de la expresión esperada en el adulto) del cerebro, MTs y cuerpo graso para luego fijarlas y observarlas en el microscopio confocal.

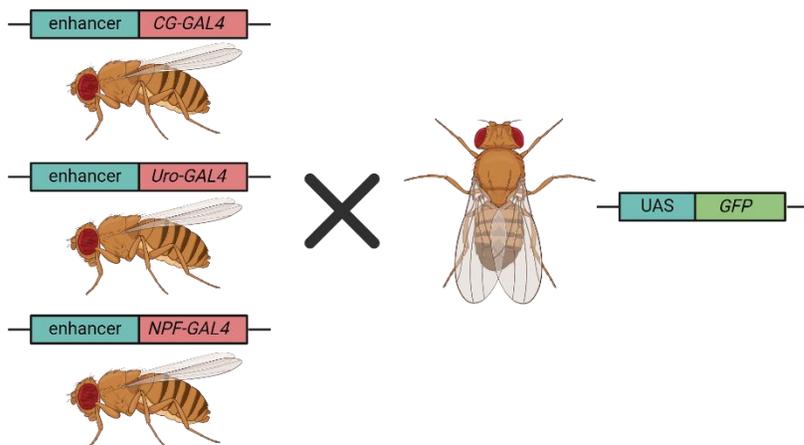


Fig 22. Cruza de cada uno de los drivers con parentales de *UAS-GFP*. Se tomaron hembras vírgenes de cada uno de los drivers propuestos, para posteriormente cruzarlos con un parental macho del sistema UAS con GFP.

El primero en realizarse fue el *driver* de cuerpo graso (CG); CG muestra marca en el cuerpo graso y no en el cerebro o MTs (Figura 23).

Debido a la presencia de GFP en cuerpo graso y no en los demás tejidos, esto garantiza el uso de CG-Gal4 para el silenciamiento de *purple* y *Sptr*.

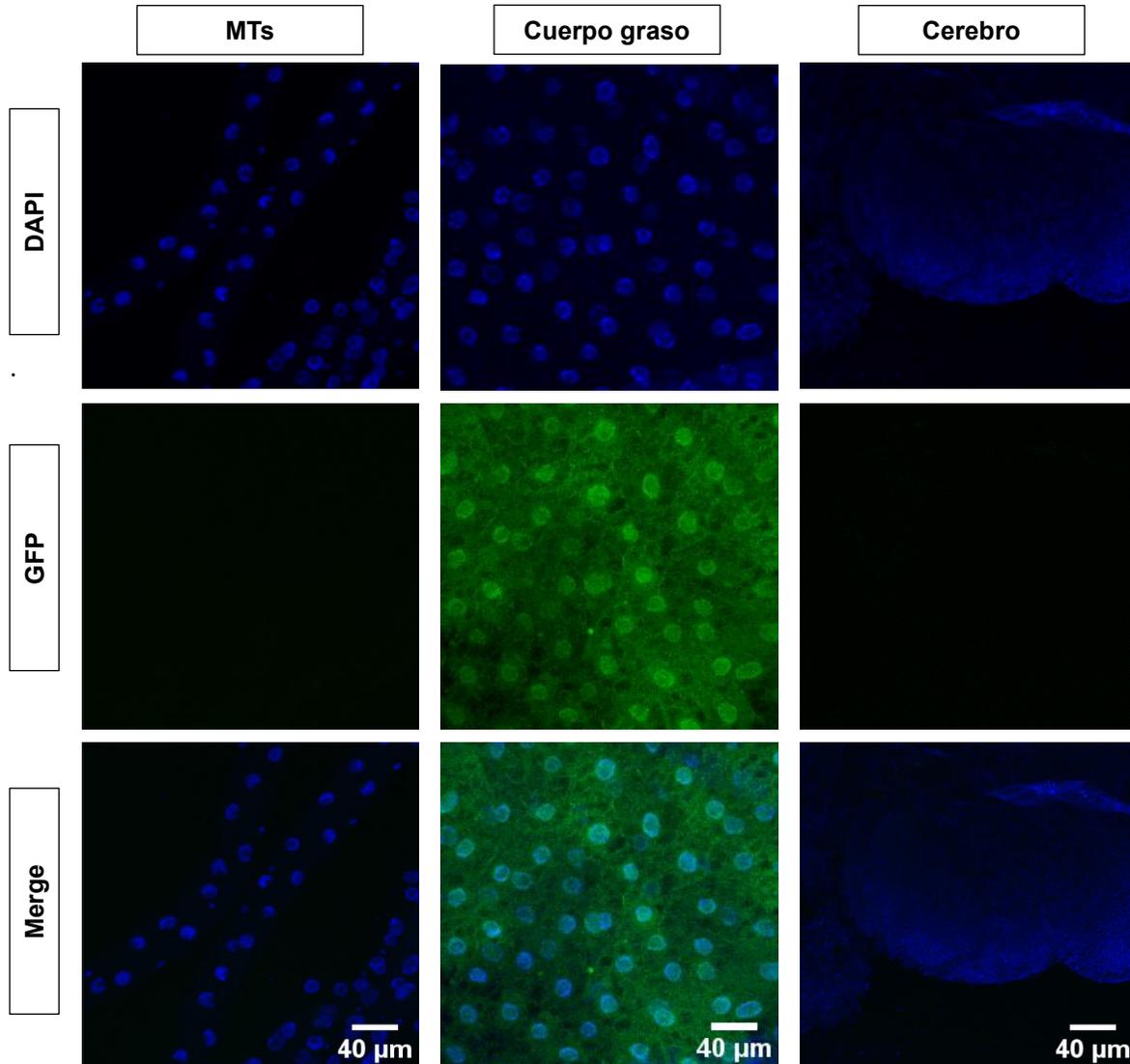


Fig 23. Expresión tejido-específica de GFP en cuerpo graso. Imágenes de fluorescencia de los tejidos de la progenie de las cruces entre los diferentes drivers y el stock *UAS-GFP*. Se observa expresión de GFP en cuerpo graso, pero no en el cerebro o MTs.

Después, se verificó la marca del *driver* de *Uro*, que corresponde al tejido de los MTs; el *driver* demostró tener marca en los MTs y no en cerebro o cuerpo graso (Fig 24.).

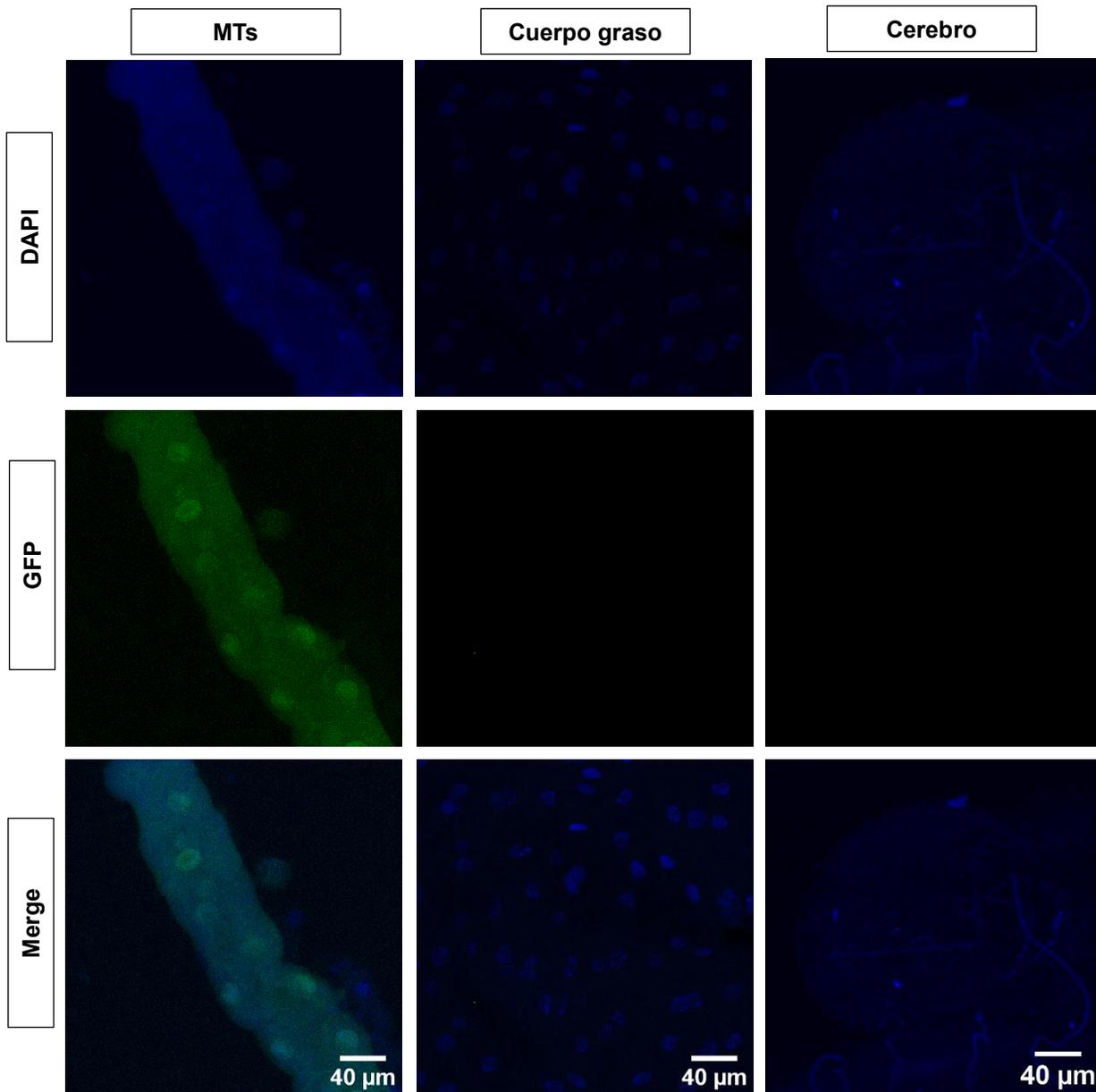


Fig 24. Expresión tejido-específica de GFP en MTs. Imágenes de fluorescencia de los tejidos de la progenie de las cruces entre los diferentes drivers y el stock *UAS-GFP*. Se observa expresión de GFP en MTs, pero no en el cerebro o cuerpo graso.

Por último, se realizó el mismo procedimiento con *driver NPF*, correspondiente a un conjunto de neuronas peptidérgicas del cerebro. Recordemos que es potencial blanco para el silenciamiento de *pr* y *Sptr*, debido a que en las neuronas neuropeptidérgicas (*NPF*) se reportó que *Sptr* tiene presencia y función para la regulación alimenticia de *Drosophila* (34).

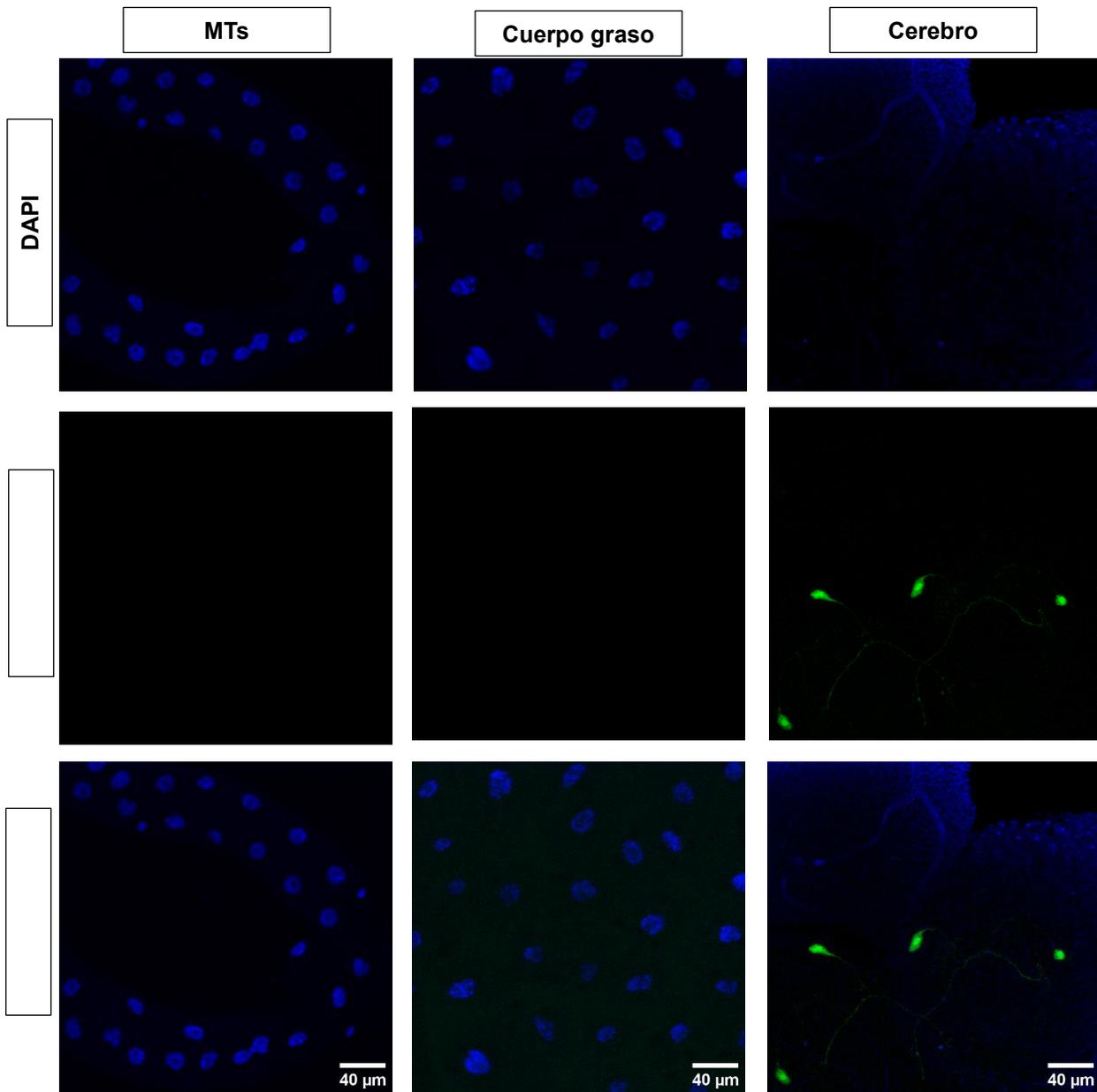


Fig 25. Expresión tejido-específica de GFP en NPF. Imágenes de fluorescencia de los tejidos de la progenie de las cruces entre los diferentes drivers y el stock *UAS-GFP*. Se observa expresión de GFP en cerebro, pero no en el MTs o cuerpo graso.

Coloración de los MTs en las progenies con silenciamiento de *pr* y *Sptr*.

Recordemos que un fenotipo presente en las bajas concentraciones corporales de zinc es el cambio de coloración y morfología de los MTs (16,41); por ello se decidió realizar disecciones de las progenies con los dos diferentes silenciamientos, para poder saber si existe un cambio en la coloración de los MTs.

Para realizar las comparaciones, se generaron los controles necesarios con el objetivo de homogenizar el fondo genético y especialmente considerar que las moscas utilizadas experimentales y controles tienen la mutación de *w* y *v¹* en forma recesiva (Tabla 4). Específicamente las cepas UAS vienen en el fondo de *v¹*, mientras que las *Gal4* en el fondo *w*. Así, como controles se optó por cruzar la cepa *w* con las *UAS pr RNAi* y *UAS Sptr RNAi* respectivamente.

Macho	Hembra	w, y^+, v^+	w, y^+, v^+
w^+, y^1, v^1	$\frac{w, y^+, v^+}{w^+, y^1, v^1}$	$\frac{w, y^+, v^+}{w^+, y^1, v^1}$	$\frac{w, y^+, v^+}{w^+, y^1, v^1}$
$\frac{\quad}{/}$	$\frac{w, y^+, v^+}{\quad /}$	$\frac{w, y^+, v^+}{\quad /}$	$\frac{w, y^+, v^+}{\quad /}$

Tabla 4. Cuadro de Punnet del primer cromosoma del grupo control. Los parentales corresponden a machos de moscas mutantes de *w* y hembras de UAS RNAi *pr*. El genotipo de hembras resultantes del primer cromosoma ($w, y^+, v^+ / w^+, y^1, v^1$) tiene las mutaciones recesivas, por lo que es viable usar a las hembras de esta progenie.

Utilizando el *driver* de tejido específico de *CG-Gal4*, que se expresa en el cuerpo graso, observamos que en el RNAi de *pr*, no se presenta el fenotipo de pérdida de coloración en los MTs (Figura 26). Esta pérdida de color tampoco sucede con el RNAi de *Sptr*, donde los túbulos no presentan alguna diferencia (Figura 27).

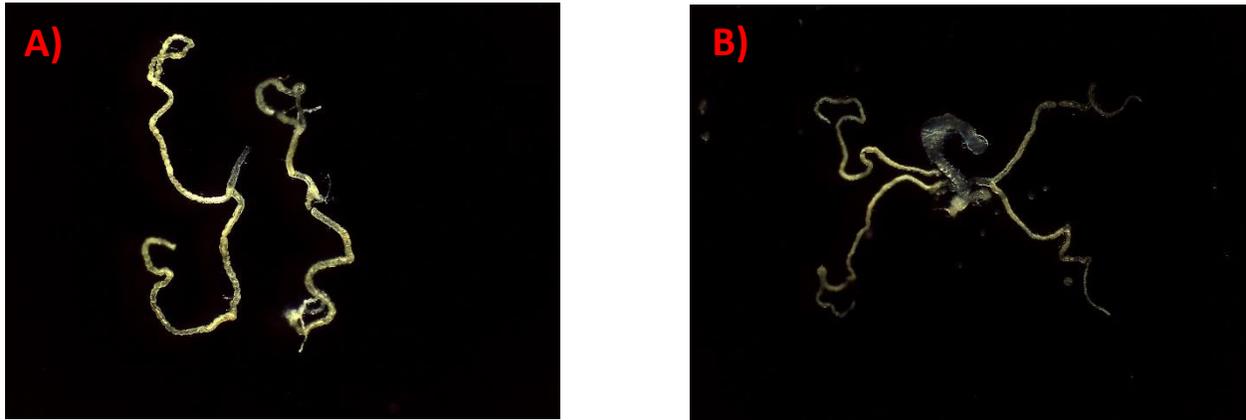


Fig 26. Diferencias entre *CG>UAS RNAi pr* y *w->UAS RNAi pr* ($y^1, v^1/w^+$; *CG-Gal4/UAS RNAi pr* y $y^1, v^1/w^+$; $+/UAS RNAi pr$). En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *CG-gal4+UAS RNAi pr*.

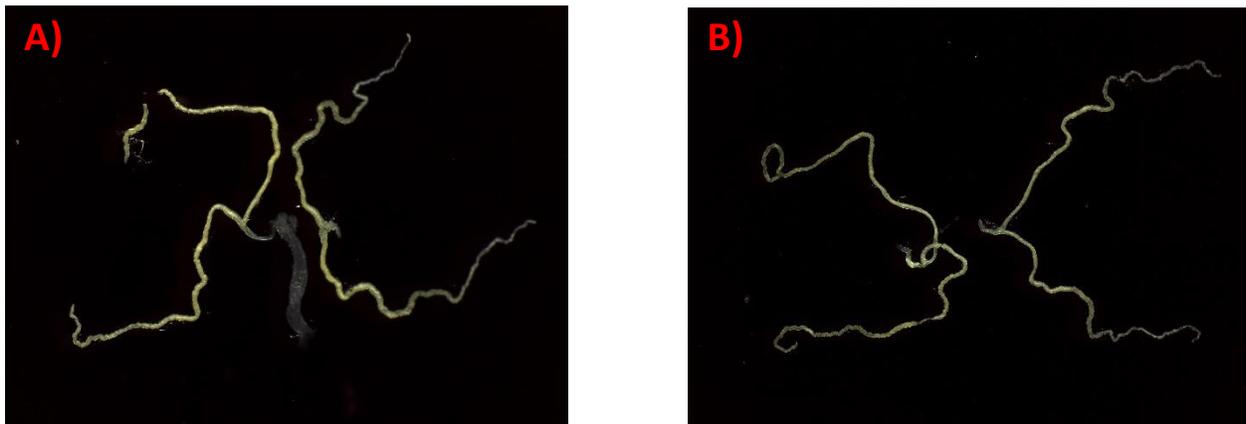


Fig 27. Diferencias entre *CG>UAS RNAi Sptr* y *w->UAS RNAi sptr* ($y^1, v^1/w^+$; *CG-Gal4/+; UAS RNAi Sptr/+* y $y^1, v^1/w^+$; $+/+; UAS RNAi Sptr/+$). En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *CG-gal4+UAS RNAi Sptr*.

En el caso del *driver* de MTs; *URO-Gal4*, las diferencias no son notorias, tanto con el RNA de interferencia de *Sptr* y *pr*.

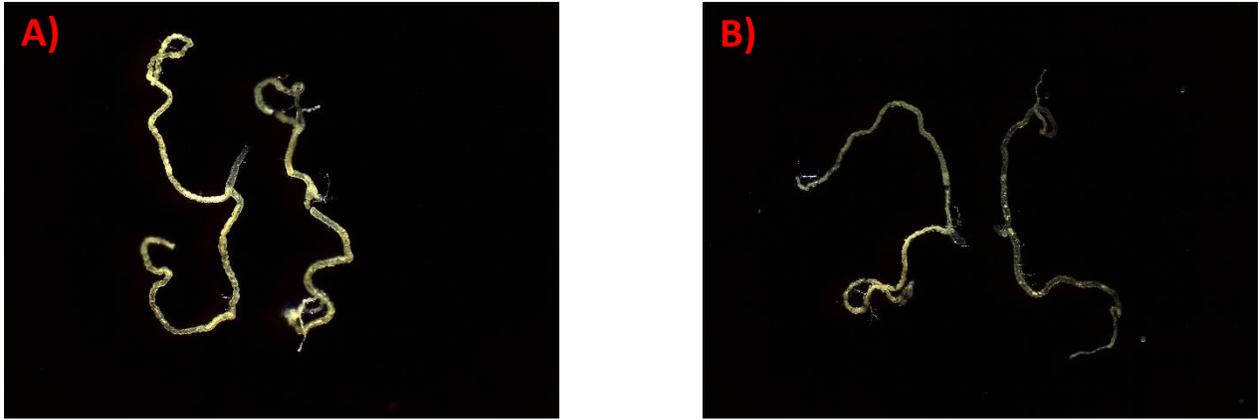


Fig 28. Diferencias entre *URO >UAS RNAi pr* y *w->UAS RNAi pr* (w^+/y^1 , $v1$; *URO-Gal4/UAS RNAi pr* y y^1 , v^1/w ; $+/UAS RNAi pr$). En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *URO-gal4+UAS RNAi pr*.

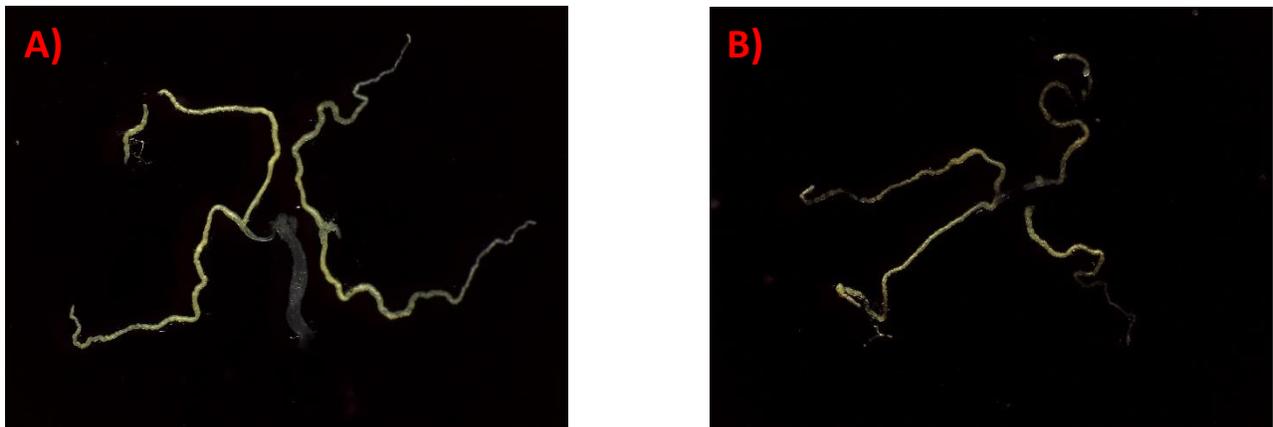


Fig 29. Diferencias entre *URO>UAS RNAi Sptr* y *w->UAS RNAi sptr* (w^+/y^1 , $v1^+$; *Uro-gal4/+*; *UAS RNAi Sptr/+* y y^1 , v^1/w ; $+/+$; *UAS RNAi Sptr/+*). En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *URO-gal4+UAS RNAi Sptr*.

Otro *driver* para usarse fue el de NPF, el silenciamiento tanto de *pr* o *Sptr* no tuvieron efecto en el cambio de coloración de los MTs.

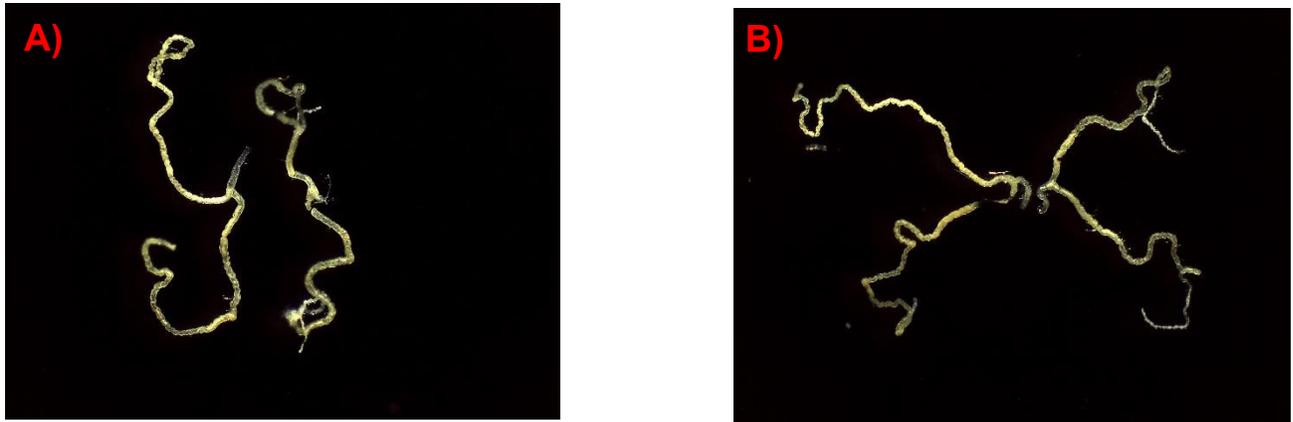


Fig 30. Diferencias entre *NPF >UAS RNAi pr* y *w->UAS RNAi pr (y^{*}/y¹, v1; NPF-Gal4/UAS RNAi pr y y^{*}/w; +/UAS RNAi pr)*. En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *NPF-gal4+UAS RNAi pr*.

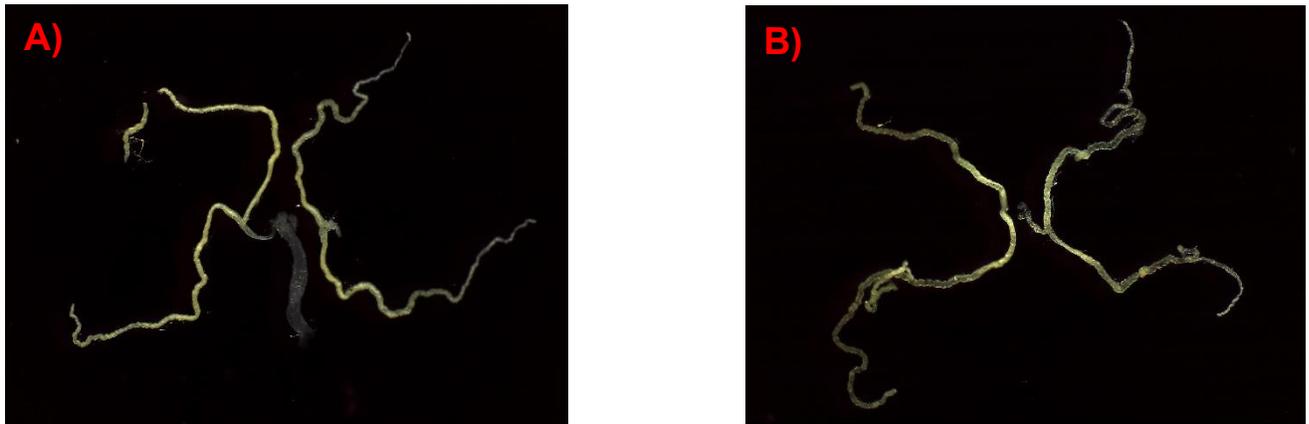


Fig 31. Diferencias entre *NPF>UAS RNAi Sptr* y *w->UAS RNAi Sptr (y^{*}/y¹, v1; NPF-gal4/+; UAS RNAi Sptr/+ y y^{*}/w; +/+; UAS RNAi Sptr/+)*. En la figura A) se muestran unos MTs de una mosca control y en la imagen B) se muestra unos túbulos correspondientes a la progenie de *NPF-gal4+UAS RNAi Sptr*.

Las diferencias cuantitativas se muestran en el anexo (Fig 43.) Aún a pesar de que las mutantes de *white*, *vermillion* o *purple* sean notorios sus fenotipos en los túbulos Malpighianos, no observamos diferencias claras en la mayoría de los tejidos específicos y sus silenciamientos, por lo que supusimos que su almacenamiento no se ha visto

alterado. Para comprobar esta conclusión, se midieron las cantidades de Zn^{2+} en moscas hembra de las progenies con los silenciamientos de *pr* y *Sptr*, utilizando el espectrómetro de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP).

Efecto del silenciamiento tejido-específico de *pr* en la concentración de Zn^{2+} corporal

Aunque no se hayan encontrado diferencias en la coloración de los MTs, pasamos a analizar a las moscas mediante el espectrómetro por plasma inducido para saber las concentraciones de Zn^{2+} en cada uno de los drivers con sus respectivos silenciamientos de *pr* o *Sptr*.

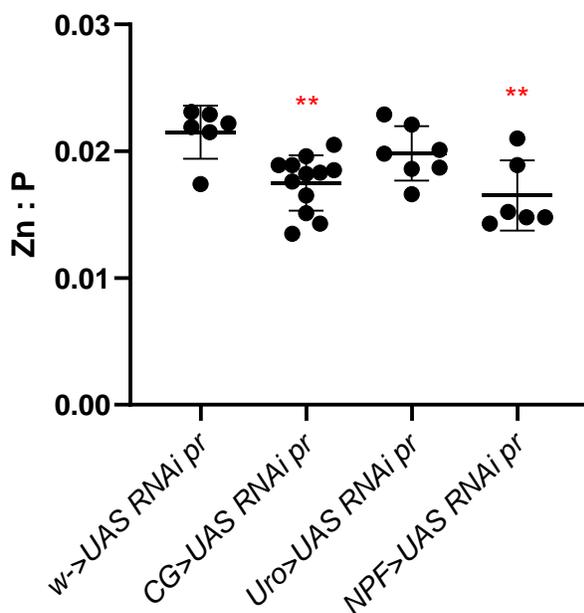


Fig 32. Efecto del silenciamiento de *pr* en los Niveles de Zn:P. Se observan ligeras diferencias en los niveles de Zn^{2+} en los drivers de CG y NPF, al silenciar su almacenamiento de Zn^{2+} reduce. ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y su respectivo control. ** P 0.0018. n=4.

Silenciamiento tejido-especifico

Al silenciar *pr* en túbulos Malpighianos (*Uro*) no se muestran diferencias significativas, pero al silenciar *pr* en cuerpo graso (CG) y neuronas peptidérgicas (NPF) se muestran ligeras diferencias en su almacenamiento de Zn^{2+} , siendo menores a los niveles que muestran en el control. No obstante, estos niveles pueden no ser fisiológicamente significativos, hecho que pudiese corresponder con la coloración de los túbulos, donde no se observaron pérdidas de la coloración (Fig. 26 – 31).

Efecto del silenciamiento tejido-específico de *Sptr* en la concentración de zinc corporal

Además de medir los niveles de Zn^{2+} en los silenciamientos de *pr*, también se midieron los niveles del silenciamiento de *Sptr*.

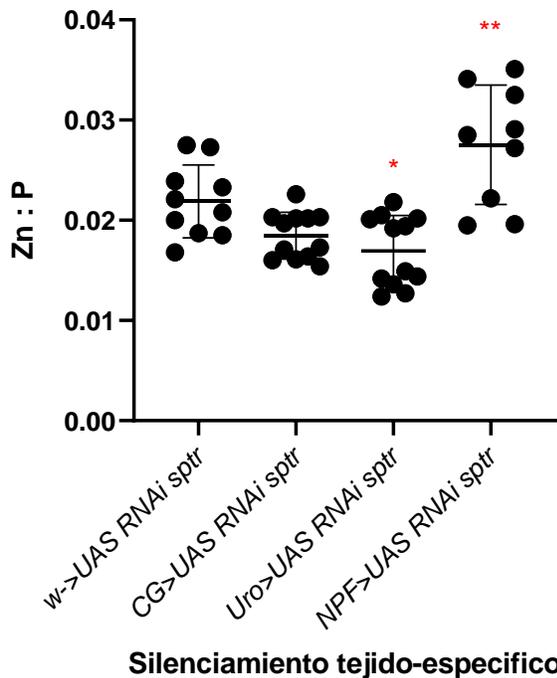


Fig 33. Efecto del silenciamiento de *sptr* en los niveles de Zn:P. Se observan ligeras diferencias en los niveles de Zn^{2+} en el *driver* de *Uro*, pero el *driver* de *NPF* las diferencias son más notorias en su aumento del almacenamiento de Zn^{2+} . ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y su respectivo control. * P 0.0148 ** P 0.0090. n=4.

El silenciamiento de *Sptr* en los MTs (*Uro*) reduce el nivel de Zn^{2+} , aunque las diferencias no son tan notorias. El silenciamiento de *Sptr* no fue lo suficiente para cambiar la coloración de los túbulos, por lo que corresponde con las imágenes de los túbulos del *driver* de *Uro* (Fig. 28 y 29). En contraste el silenciamiento el silenciamiento en neuronas peptidérgicas de *Sptr* dió un resultado inesperado, incrementó los niveles de Zn^{2+} corporales en comparación con el control. Aunque la pérdida de almacenamiento de Zn^{2+} conlleva un cambio en la coloración, podría ser que el aumento de almacenamiento no cambie la coloración de los túbulos, consistente con lo que se observó en este genotipo.

El resultado no fue esperado porque la depleción de BH_4 en los mutantes de *pr* causa una disminución en los niveles de Zn^{2+} pero la depleción de BH_4 en neuronas peptidérgicas por el silenciamiento de *Sptr* tiene efecto contrario.

Aumento de gránulos de Zn en los MTs de *NPF>UAS RNAi Sptr*.

Si bien, observamos un aumento de niveles de Zn^{2+} en el silenciamiento de *Sptr* en neuronas peptidérgicas, desconocemos si este Zn^{2+} se sigue almacenando en los MTs o si existe una mayor presencia de gránulos, habiendo así un efecto fisiológico, por lo que se decidió usar la marca de FluoZin-3AM, para saber si las moscas estaban teniendo mayor cantidad de gránulos en los MTs en neuronas peptidérgicas con silenciamiento de *Sptr*.

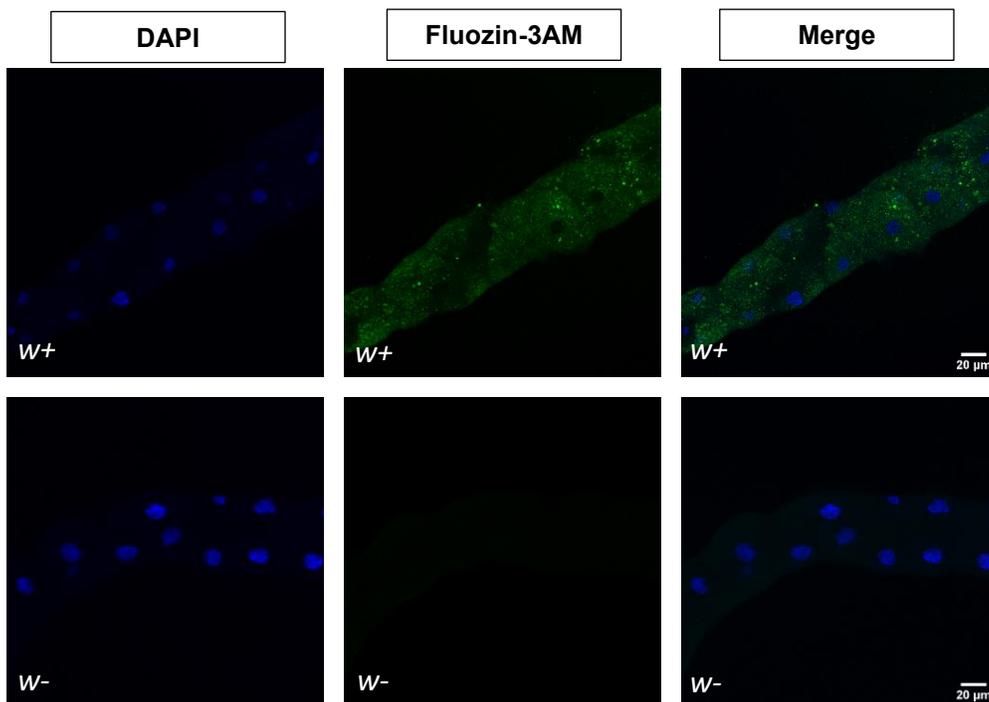


Fig 34. Gránulos presentes de Zn^{2+} en moscas silvestres y mutantes de *white* en la región 3. Mientras la mosca silvestre almacena Zn^{2+} , la mosca mutante de *white* no.

Para empezar, las moscas silvestres muestran marcas típicas de sus gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} (Fig. 34), en regiones de los túbulos anteriores. Hecho que tiene sentido debido a que estas moscas sí son capaces de almacenar Zn^{2+} . Estos gránulos no se observan con la mutante de *white*, esto es debido a que se necesita de *white* en los MTs para la formación de los gránulos y el posterior almacenamiento de Zn^{2+} (10).

También se observó la marca de FluoZin-3AM en la mutante de *vermillion* y *purple*; tanto *v¹* como *pr¹*, presentan menor presencia de gránulos.

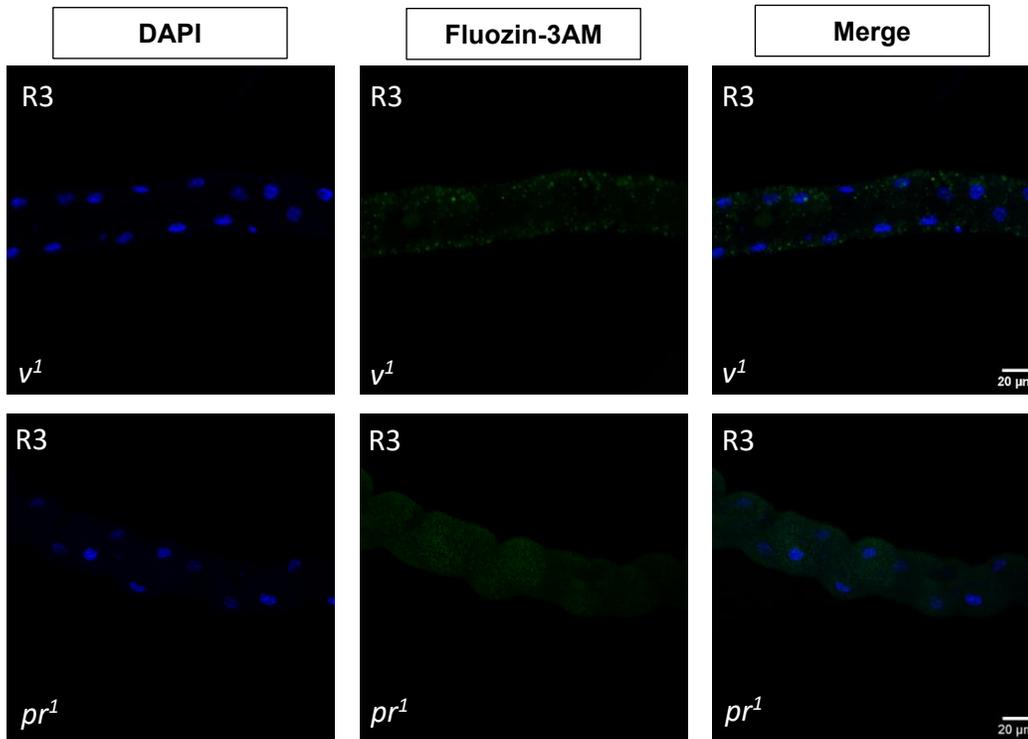


Fig 35. Gránulos de Zn^{2+} presentes en moscas mutantes de *pr*¹ y *v*¹ en la región 3. Se observa que las dos mutantes no almacenan Zn^{2+} .

Por último, en las moscas *NPF>UAS RNAi Sptr* se observaron mayor presencia de gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} a diferencia del control correspondiente (*w>UAS RNAi Sptr*). Las diferencias cuantitativas se muestran en el anexo (Fig. 44 y 45).

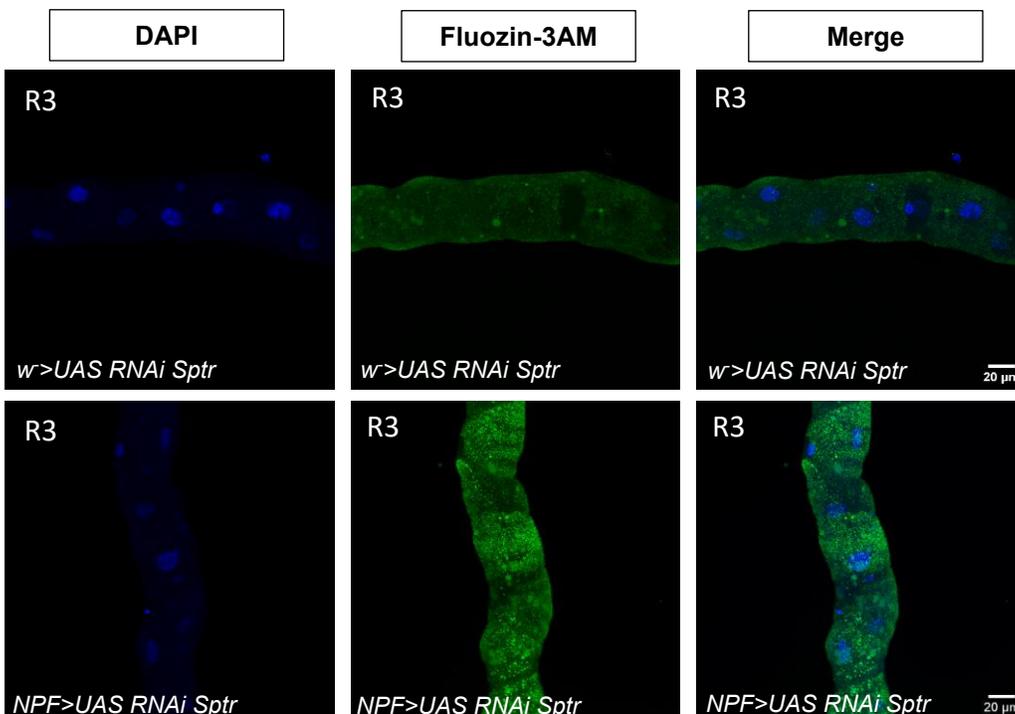


Fig 36. Gránulos presentes de Zn^{2+} en moscas mutantes de *w>UAS RNAi Sptr* y *NPF>UAS RNAi Sptr* en la región 3. *NPF>UAS RNAi sptr* tiene mayor presencia de gránulos de Zn^{2+} en los MTs.

Con base a estas imágenes (Fig. 36) y el análisis de metales (Fig. 40), se dan los primeros indicios de donde podría ser un lugar de acción de la vía de síntesis de BH₄ para la homeostasis del Zn²⁺; Las neuronas peptidérgicas podrían estar sintetizando BH₄ no solo para mediar la alimentación en *Drosophila melanogaster* (34) sino para también evitar que se almacene tanto Zn²⁺, es decir, incidiendo sobre funciones de excreción.

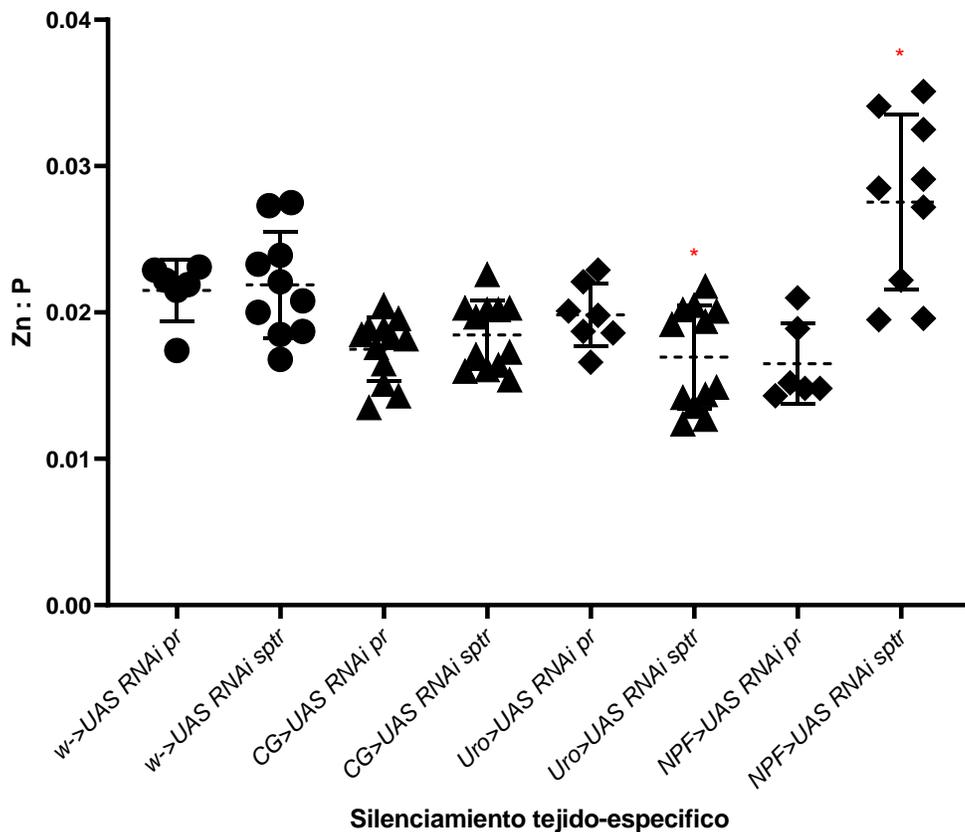


Fig 37. Silenciamiento de *pr* y *Sptr* y su efecto en Zn/P. Los niveles de Zn²⁺ respecto a fosforo de las diferentes progenies con su silenciamiento de *pr* o *Sptr*. Solo Uro con *UAS RNAi Sptr* y NPF con *UAS RNAi* de *Sptr* presentan ligeras diferencias significativas con respecto a sus controles. ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y su respectivo control. * P 0.0109 * P 0.0211. n=4.

Puede ser que el ligando específico que se usa con la presencia de BH₄ en neuronas peptidérgicas para controlar la eliminación de Zn²⁺, es la serotonina. Recordemos que BH₄ es un cofactor de la enzima triptófano hidroxilasa, por ende, la serotonina depende a su vez de BH₄. Por lo que, si un RNAi en la codificación para *Sptr* que en consecuencia aumenta las concentraciones sistémicas de Zn²⁺, es porque la serotonina no está

llegando a su blanco diana para modular la homeostasis del Zn^{2+} . Además, se sabe que la serotonina tiene efectos en los MTs de otros insectos (42,43), por ende, podría tener sentido que las neuronas peptidérgicas están actuando en los MTs para regular la homeostasis de Zn^{2+} a través de la serotonina en *Drosophila melanogaster*.

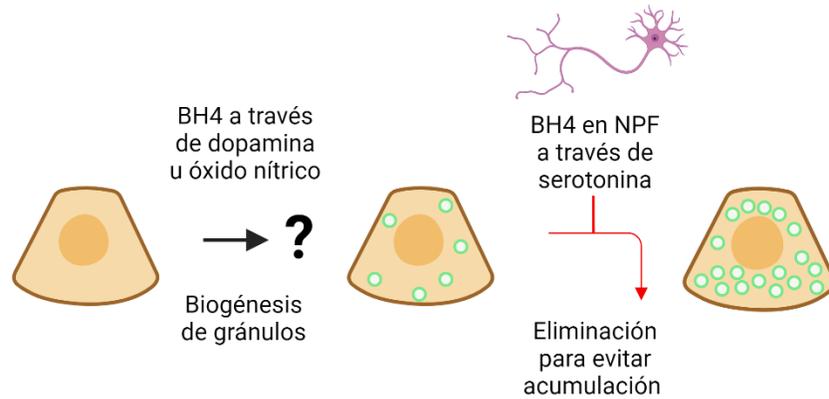


Fig 38. Modelo propuesto para la modulación de la homeostasis del Zn^{2+} a través de la vía de síntesis de BH_4 en *Drosophila melanogaster*. Se proponen dos lugares de acción diferente a través de BH_4 ; La flecha roja indica que por función BH_4 como cofactor en neuronas peptidérgicas que los gránulos de Zn^{2+} se excreten en células de los MTs a través de la serotonina como señal, la flecha negra indica la acción de estimular la biogénesis de gránulos de Zn^{2+} en los MTs, posiblemente a través de la dopamina u el óxido nítrico como señal.

Ahora, en el laboratorio contamos con una mutante de triptófano hidroxilasa, esta mutante tiene un fenotipo particular, tiene altas concentraciones de Zn^{2+} (Fig. 39), superando en niveles de Zn^{2+} a la silvestre. Por lo que tiene más sentido que la serotonina sea el ligando clave que regule la acumulación del Zn^{2+} a través de la eliminación.

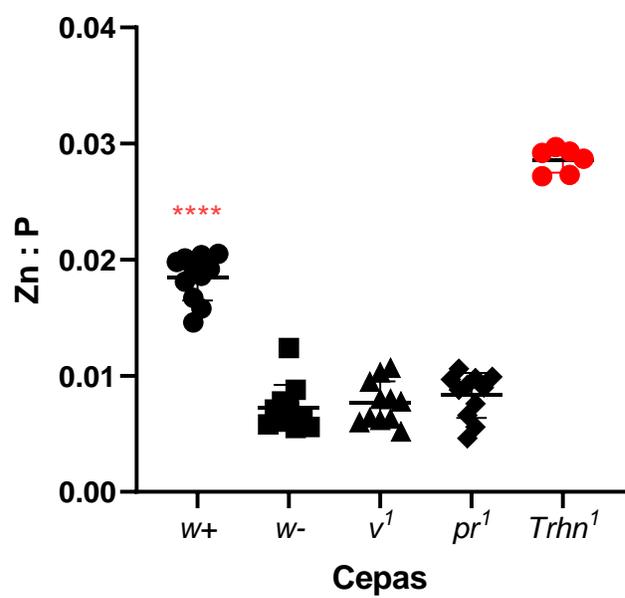


Fig 39. La mutante de Trhn tiene un fenotipo de alto Zn^{2+} . ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y su respectivo control. **** P < 0.0001. n=4.

Inclusive los MTs de *Trhn*¹ no presentan pérdida de color, similar a *NPF>UAS RNAi Sptr* donde sus túbulos tienen coloración amarilla y también tienen el fenotipo de almacenar más Zn²⁺.

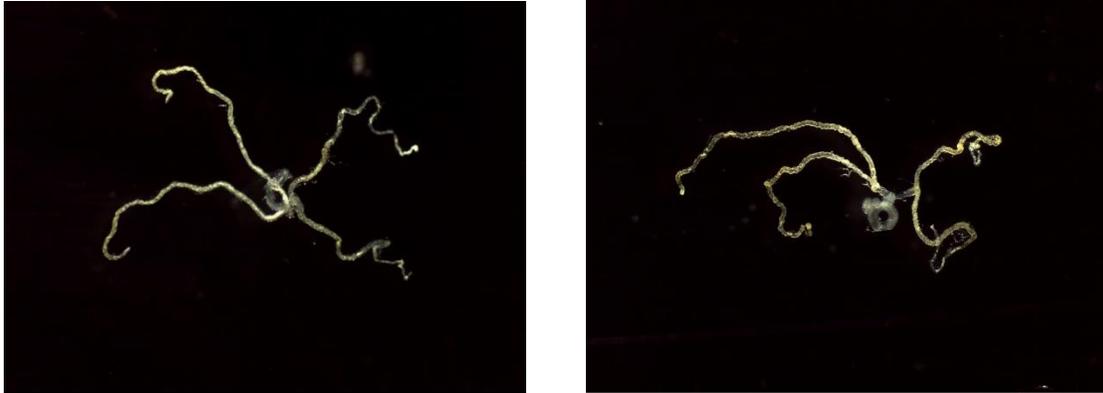


Fig 40. Diferencias entre *w+* y *Trhn*¹. A) se muestran túbulos de una mosca silvestre que sí puede almacenar Zn. B) Se muestran túbulos de una mosca mutante de *Trhn*¹ que almacena más Zn²⁺.

Inclusive utilizando la marca de FluoZín-3AM, se observa mayor marca y presencia de gránulos de Zn²⁺ a diferencia de moscas silvestres.

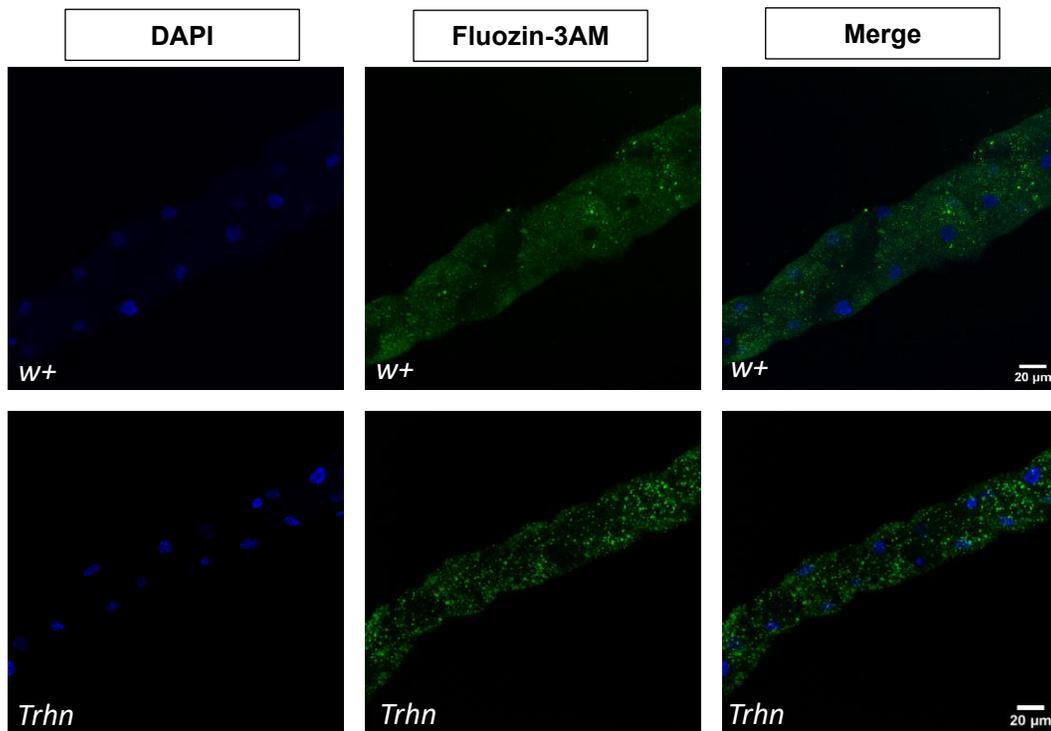


Fig 41. Gránulos Zn²⁺ presentes en *w+* y *Trhn*¹. La mutante de triptófano hidroxilasa (*Trhn*¹) tiene mayor presencia de gránulos de almacenamiento de Zn²⁺.

Si bien, podríamos inducir que la serotonina está teniendo un rol en la homeostasis del Zn^{2+} por BH_4 a través de las neuronas peptidérgicas, desconocemos en donde más estaría actuando la vía de síntesis de BH_4 , pero para la biogénesis de gránulos de almacenamiento de Zn^{2+} .

Es posible que el óxido nítrico o la dopamina estén actuando como señales para la regulación de este almacenamiento, debido a que enzimas involucradas en la síntesis de estos productos necesitan a BH_4 como cofactor, al igual que la serotonina.

No obstante, el antecedente principal de este proyecto es el fenotipo de “poco Zinc” de *pr* (Fig. 20), esto podría explicarse si BH_4 tuviese dos lugares de acción, uno para excretar gránulos de Zn^{2+} y otro para la biogénesis de gránulos, tendría sentido que una delección de *pr* tuviese menor nivel de Zn^{2+} , debido que al no sintetizarse BH_4 para la biogénesis de gránulos de Zn^{2+} y tampoco sintetizarse BH_4 para gránulos que no se están formando, el Zn^{2+} se mantiene bajo.

Por el momento es necesario realizar repeticiones y tener una tendencia más clara, además de utilizar otros *drivers* donde podamos ampliar la vía de acción de BH_4 con respecto al Zn^{2+} en *Drosophila melanogaster*.

Por último, también es posible que la vía BH_4 esté teniendo una estrecha relación con la vía de degradación del triptófano, regulando a la alta o a la baja a través de los ligandos mencionados, para así estimular la biogénesis de gránulos o la excreción de gránulos.

PERSPECTIVAS

- Utilizar más *drivers* específicos para saber en donde más y cómo está regulando la homeostasis del Zn la vía de síntesis de BH₄.
- Realizar los procedimientos anteriores, pero con los RNAi de las enzimas tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa y óxido nítrico sintasa.
- Realizar análisis con espectrofotómetro de los componentes de los MTs para tener un acercamiento cuantitativo del fenotipo de bajo zinc corporal.

ANEXOS

Densitometría de la coloración de los MTs

Para realizar una comparación cuantitativa de los MTs, se realizó un análisis de densidad por píxeles en el software de Fiji (versión 1.54).

Se observan diferencias en la coloración de los MTs (Fig 21 y 40), entre las cepas *w-*, *v¹* y *pr¹* y el control, que corresponde con los bajos niveles de Zn^{2+} en esas cepas (Fig. 20).

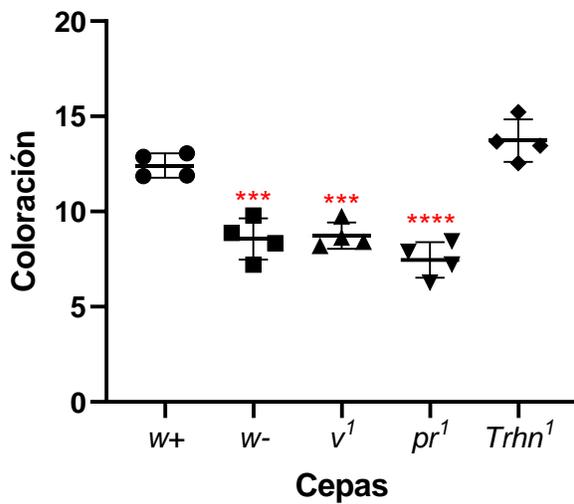


Fig 42. Coloración de los MTs de las cepas. Se observan diferencias significativas en las cepas *w-*, *v¹* y *pr¹*. ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y su respectivo control. **** P <0.0001 *** P 0.0001. n=4.

Respecto a los MTs de la progenie con los silenciamientos de *pr* y *Sptr*, no se observaron diferencias significativas en la coloración de los MTs (Fig. 26-31).

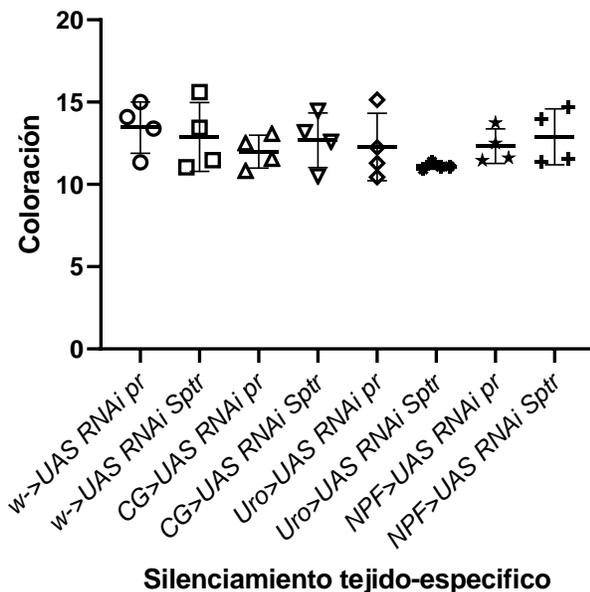


Fig 43. Coloración de los MTs de las progenies con silenciamiento tejido-especifico. No se observan diferencias significativas en la coloración de los MTs de las progenies con el silenciamiento de *pr* y *Sptr* y los respectivos controles. ANOVA unifactorial. n=4.

Cuantificación de los gránulos de almacenamiento de Zn²⁺ en los MTs

Se cuantificaron los gránulos de almacenamiento de Zn²⁺ de las microfotografías con el marcaje de Fluozin-3AM (Fig. 34-36) en los MTs en el software de Fiji (versión 1.54). Se observan diferencias significativas entre las cepas *w-*, *v¹*, *pr¹* y *Trhn¹* con el control.

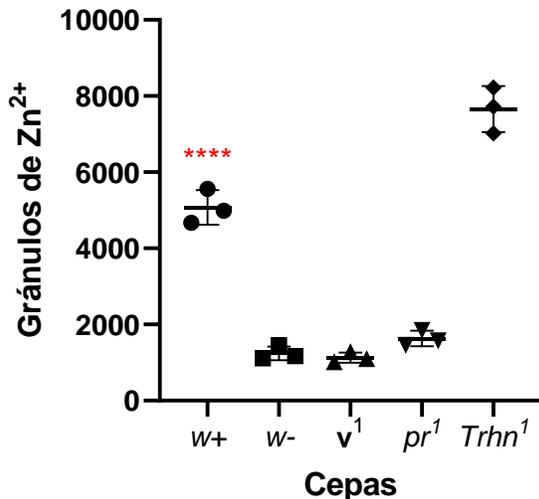


Fig 44. Cantidad de gránulos de almacenamiento de Zn²⁺. Se observan diferencias significativas en las cepas *w-*, *v¹*, *pr¹* y *Trhn¹*. ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y el respectivo control. **** P < 0.0001. n=3.

También se observaron diferencias significativas entre la progenie con el silenciamiento de *Sptr* en neuronas peptidérgicas con el respectivo control y el silenciamiento de *pr* en neuronas peptidérgicas (Fig. 41).

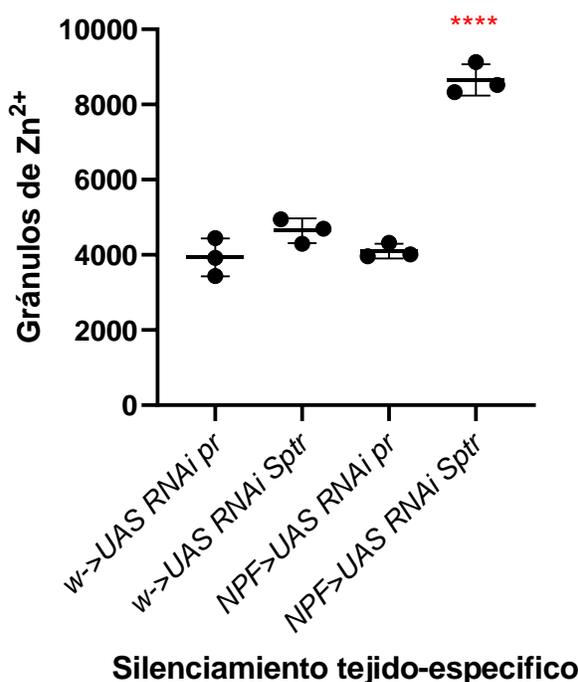


Fig 45. Cantidad de gránulos de almacenamiento de Zn²⁺. Se observan diferencias significativas entre el silenciamiento de *Sptr* con el respectivo control y el silenciamiento de *pr*. ANOVA unifactorial. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los experimentales y el respectivo control. **** P < 0.0001. n=3.

REFERENCIAS

1. Jennings BH. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*. el 1 de mayo de 2011;14(5):190–5.
2. Benson KR. T. H. Morgan's resistance to the chromosome theory. *Nat Rev Genet*. 2001;2(6):469–74.
3. Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. el 15 de julio de 1999;1419(2):173–85.
4. Morgan TH. SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science* [Internet]. 1910 [citado el 19 de junio de 2024];32(812):120–2. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17759620/>
5. Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. el 15 de julio de 1999;1419(2):173–85.
6. Sullivan DT, Grillo SL, Kitos RJ. Subcellular localization of the first three enzymes of the ommochrome synthetic pathway in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology* [Internet]. el 1 de mayo de 1974 [citado el 1 de diciembre de 2023];188(2):225–33. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jez.1401880210>
7. Dreesen TD, Johnson DH, Henikoff S. The Brown Protein of *Drosophila melanogaster* is Similar to the White Protein and to Components of Active Transport Complexes. *Mol Cell Biol* [Internet]. el 1 de diciembre de 1988 [citado el 1 de diciembre de 2023];8(12):5206–15. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/mcb.8.12.5206-5215.1988>
8. Tearle RG, Belote JM, McKeown M, Baker BS, Howells AJ. Cloning and characterization of the scarlet gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* [Internet]. el 1 de julio de 1989 [citado el 1 de diciembre de 2023];122(3):595–606. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/genetics/122.3.595>
9. Ford RC, Beis K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* [Internet]. el 28 de febrero de 2019 [citado el 2 de diciembre de 2023];47(1):23–36. Disponible en: </biochemsoctrans/article/47/1/23/143/Learning-the-ABCs-one-at-a-time-structure-and>
10. Garay E, Schuth N, Barbanente A, Tejeda-Guzmán C, Vitone D, Osorio B, et al. Tryptophan regulates *Drosophila* zinc stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. el 19 de abril de 2022 [citado el 14 de noviembre de 2023];119(16). Disponible en: </pmc/articles/PMC9169789/>
11. Gautam N, Tapadia MG. OVERVIEW OF MALPIGHIAN TUBULES DEVELOPMENT AND FUNCTION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. 2014;

12. West JB. Marcello Malpighi and the discovery of the pulmonary capillaries and alveoli. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2013 [citado el 14 de mayo de 2024];304(6):383–90. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00016.2013>
13. Dow JAT, Maddrell S, Görtz A, Skaer NJ, Brogan S, Kaiser K. The malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *Journal of Experimental Biology*. 1994;
14. Gautam NK, Verma P, Tapadia MG. *Drosophila* Malpighian Tubules: A Model for Understanding Kidney Development, Function, and Disease. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 2017 [citado el 14 de mayo de 2024];60:3–25. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-51436-9_1
15. Spring JH, Robichaux SR, Kaufmann N, Brodsky JL. Localization of a *Drosophila* DRIP-like aquaporin in the Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [Internet]. 2007 [citado el 14 de mayo de 2024];148(1):92–100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17267256/>
16. Tejeda-Guzmán C, Rosas-Arellano A, Kroll T, Webb SM, Barajas-Aceves M, Osorio B, et al. Biogenesis of zinc storage granules in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* [Internet]. el 3 de marzo de 2018 [citado el 14 de noviembre de 2023];221(6). Disponible en: </pmc/articles/PMC5897703/>
17. Costa MI, Sarmiento-Ribeiro AB, Gonçalves AC. Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de marzo de 2023 [citado el 17 de noviembre de 2023];24(5). Disponible en: </pmc/articles/PMC10003636/>
18. Maret W. Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Advances in Nutrition*. el 1 de enero de 2013;4(1):82–91.
19. Krall RF, Tzounopoulos T, Aizenman E. The Function and Regulation of Zinc in the Brain. *Neuroscience* [Internet]. el 1 de marzo de 2021 [citado el 14 de mayo de 2024];457:235–58. Disponible en: <http://www.ibroneuroscience.org/article/S0306452221000178/fulltext>
20. Zhang C, Dischler A, Glover K, Qin Y. Neuronal signalling of zinc: from detection and modulation to function. *Open Biol* [Internet]. el 7 de septiembre de 2022 [citado el 14 de mayo de 2024];12(9). Disponible en: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.220188>
21. Maret W. Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of “Zinc Signals”. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol 18, Page 2285 [Internet]. el 31 de octubre de 2017 [citado el 15 de mayo de 2024];18(11):2285. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/11/2285/htm>
22. Haase H, Maret W. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res*. el 10 de diciembre de 2003;291(2):289–98.
23. Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients* 2019, Vol 11, Page 2273 [Internet]. el 22 de septiembre de 2019 [citado el

- 15 de mayo de 2024];11(10):2273. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2273/htm>
24. Chasapis CT, Spiliopoulou CA, Loutsidou AC, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* [Internet]. abril de 2012 [citado el 15 de mayo de 2024];86(4):521–34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22071549/>
 25. Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E. Zinc Deficiency Alters DNA Damage Response Genes in Normal Human Prostate Epithelial Cells. *J Nutr*. el 1 de abril de 2008;138(4):667–73.
 26. Lye JC, Richards CD, Dechen K, Paterson D, De Jonge MD, Howard DL, et al. Systematic functional characterization of putative zinc transport genes and identification of zinc toxicosis phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* [Internet]. el 15 de septiembre de 2012 [citado el 24 de junio de 2024];215(18):3254–65. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1242/jeb.069260>
 27. Yepiskoposyan H, Egli D, Fergestad T, Selvaraj A, Treiber C, Multhaup G, et al. Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Res* [Internet]. octubre de 2006 [citado el 23 de junio de 2024];34(17):4866–77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973896/>
 28. Yin S, Qin Q, Zhou B. Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for zinc excretion in Malpighian tubules. *BMC Biol* [Internet]. el 14 de febrero de 2017 [citado el 22 de junio de 2024];15(1):1–12. Disponible en: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0355-9>
 29. Luo R, Zhang Y, Jia Y, Zhang Y, Li Z, Zhao J, et al. Molecular basis and homeostatic regulation of Zinc taste. *Protein Cell* [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 23 de junio de 2024];13(6):462–9. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1007/s13238-021-00845-8>
 30. Yin S, Qin Q, Zhou B. Functional studies of *Drosophila* zinc transporters reveal the mechanism for zinc excretion in Malpighian tubules. *BMC Biol* [Internet]. el 14 de febrero de 2017 [citado el 24 de junio de 2024];15(1):1–12. Disponible en: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0355-9>
 31. van Breugel FMA. Differential riboflavin deposition in white and variegated white mutants of *Drosophila hydei*. *Dev Genet* [Internet]. el 1 de enero de 1987 [citado el 14 de julio de 2024];8(1):45–58. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvg.1020080107>
 32. Kim H, Kim K, Yim J. Biosynthesis of drospterins, the red eye pigments of *Drosophila melanogaster*. *IUBMB Life* [Internet]. el 1 de abril de 2013 [citado el 2 de diciembre de 2023];65(4):334–40. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1145>
 33. Fanet H, Capuron L, Castanon N, Calon F, Vancassel S. Tetrahydrobiopterin (BH4) Pathway: From Metabolism to Neuropsychiatry. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. el 4 de abril de 2021 [citado el 2 de diciembre de 2023];19(5):591. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8573752/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348573752/)

34. Kim DH, Shin M, Jung SH, Kim YJ, Jones WD. A fat-derived metabolite regulates a peptidergic feeding circuit in *Drosophila*. *PLoS Biol* [Internet]. el 28 de marzo de 2017 [citado el 2 de diciembre de 2023];15(3):e2000532. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2000532>
35. Tejeda-Guzmán C, Missirlis F. Las células primarias de los túbulos Malpighianos de *Drosophila melanogaster* almacenan zinc en organelos relacionados a los lisosomas. *Exploraciones, intercambios y relaciones entre el diseño y la tecnología* [Internet]. 2021 [citado el 2 de diciembre de 2023];57–79. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4094>
36. Auerbach G, Herrmann A, Bracher A, Bader G, Gütlich M, Fischer M, et al. Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. el 12 de diciembre de 2000 [citado el 10 de febrero de 2024];97(25):13567. Disponible en: </pmc/articles/PMC17616/>
37. Liu P, Liu J, Wu Y, Xi W, Wei Y, Yuan Z, et al. Zinc supplementation protects against diabetic endothelial dysfunction via GTP cyclohydrolase 1 restoration. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. el 22 de enero de 2020 [citado el 9 de enero de 2024];521(4):1049–54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31732151/>
38. Stathakis DG, Burton DY, McIvor WE, Krishnakumar S, Wright TRF, O'Donnell JM. The catecholamines up (Catsup) protein of *Drosophila melanogaster* functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity. *Genetics* [Internet]. septiembre de 1999 [citado el 8 de mayo de 2024];153(1):361. Disponible en: </pmc/articles/PMC1460756/?report=abstract>
39. Jin L, Tian X, Ji X, Xiao G. The expression of Catsup in the hindgut is essential for zinc homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* [Internet]. 2024 [citado el 8 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imb.12916>
40. Cohen E, Sawyer JK, Peterson NG, Dow JAT, Fox DT. Physiology, Development, and Disease Modeling in the *Drosophila* Excretory System. *Genetics* [Internet]. 2020 [citado el 14 de julio de 2024];214(2):235–64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029579/>
41. Tejeda-Guzmán C, Guzmán AT, Fanis M, México DF. Los organelos relacionados a los lisosomas funcionan como almacenes de zinc en *Drosophila melanogaster*. *Exploraciones, intercambios y relaciones entre el diseño y la tecnología* [Internet]. 2015 [citado el 14 de noviembre de 2023];57–79. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3285>
42. Pannabecker TL, Beyenbach KW. Ca²⁺ and cAMP signaling pathways interact to increase the diuretic effect of serotonin in Malpighian tubules of the kissing bug. Focus on “Serotonin triggers cAMP- and PKA-1-mediated intracellular calcium waves in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*”. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. el 10 de octubre de 2014 [citado el 5 de julio de 2024];307(7):R819. Disponible en: </pmc/articles/PMC4187181/>
43. Coast G. Serotonin has kinin-like activity in stimulating secretion by Malpighian tubules of the house cricket *Acheta domesticus*. *Peptides (NY)*. el 1 de marzo de 2011;32(3):500–8.