

35
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PTERIDINAS DE LA CAPSULA CEFALICA DE LA
MOSCA DEL MEDITERRANEO, *Ceratitis capitata*, W.
(DIPTERA, TEPHRITIDAE): CARACTERIZACION Y
SU USO COMO MARCADORES DE EDAD
CRONOLOGICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LUISA VERONICA LCAMIN CARDIN

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	10
III. MATERIALES Y METODOS.....	11
IV. RESULTADOS.....	14
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES....	19
VI. BIBLIOGRAFIA.....	22

"It is, however, in the insect world that this principle of adaptation of animals to their environments is the most fully and strikingly developed... But the most wonderful and undoubted case of protective resemblance in a butterfly which I have ever seen, is that of the common Indian *Kallima inachis*, and its Malayan ally, *Kallima paralekta*. The upper surface of these insects is very striking and showy, as they are of a large size, and are adorned with a broad band of rich orange on a deep-bluish ground..."

Alfred Russell Wallace (1823-1913)

In: *Mimicry, and Other Protective Resemblance Among Animals* (July, 1867).

"Sin embargo, es en los insectos en donde se ha desarrollado de manera extraordinaria este principio de la adaptación a su medio ambiente... Indudablemente, la más hermosa semejanza con fines de defensa que he apreciado alguna vez, es la de *Kallima inachis* de la India, y la de *Kallima paralekta* de Malasia. La superficie de estos insectos es extraordinariamente vistosa, ya que son muy grandes, y muestran una ornamenta con una banda amplia de color anaranjado sobre un fondo de color azul profundo..."

Alfred Russell Wallace (1823-1913)

En: *Mimicry, and Other Protective Resemblances Among Animals* (Julio de 1867).

RESUMEN

Esta tesis constituye una introducción breve y esquemática al conocimiento que se tiene hoy en día sobre la determinación de edades en las poblaciones de los insectos. El presente trabajo se llevó a cabo al cuantificar las pteridinas de las cápsulas cefálicas de la mosca del Mediterraneo, *Ceratitis capitata* W., de varias edades, desde 0 hasta 28 días, y en ambos sexos. Estas cápsulas se homogenizaron en el amortiguador de Tris-HCl, y se cuantificó la fluorescencia en el espectrofluorómetro con una longitud de onda de excitación a 360 nm, y emisión a 450 nm. Además, se realizó la separación y la caracterización del extracto crudo del homogenizado de las cápsulas, mediante cromatografía bidimensional en papel. Los resultados permitieron establecer que, de manera general, la cuantificación fluorométrica de las pteridinas se puede utilizar como una técnica para determinar la edad en los insectos, puesto que se observó una relación directa entre la edad del insecto y el nivel de la fluorescencia, lo que concuerda con los resultados que reportan otros autores para otras especies de insectos. En cuanto al análisis cromatográfico del extracto, se separaron seis pigmentos cuyos espectros de absorción se compararon con los de compuestos control de estructura similar a la de las pteridinas; mediante este análisis se pudo constatar que los pigmentos fluorescentes de las cápsulas cefálicas de estas moscas son pteridinas y no otros compuestos fluorescentes. Así, se pudo descartar la posibilidad de determinar la edad fisiológica en el lugar de la cronológica durante estas determinaciones.

I. INTRODUCCION

GENERALIDADES. Las poblaciones no se componen por conjuntos de individuos que son idénticos entre sí, pero se tiende a olvidar esta heterogeneidad cuando se estudia a una población. Existen dos variables que diferencian a los individuos de una población: el sexo y la edad.

La edad es una variable importante en las poblaciones y los efectos de ella son comunes en muchas especies. Con frecuencia los individuos de mayor edad son los más grandes, y la diferencia en el tamaño suele ser uno de los mecanismos principales por virtud de la cual la edad ejerce sus efectos. Por ejemplo, los peces de mayor tamaño depositan muchos más huevos que los de menor tamaño; lo mismo ocurre en las plantas en cuanto a la producción de semillas. Por otra parte, la edad y el tamaño son atributos individuales que resultan significativos en muchos animales que presentan una organización social, debido a que es uno de los factores del que depende la posición social del individuo. Las poblaciones se estudian como agregados de individuos, y se calcula tanto la densidad, como otros parámetros, con base en el supuesto implícito de que todos los individuos son equivalentes. Sin embargo, se reconoce que las variaciones individuales son una propiedad clave en todas las poblaciones porque representan la materia prima de los cambios evolutivos (Krebs, 1985).

DETERMINACION DE LA EDAD EN LOS INSECTOS. En algunos grupos de animales, como en los insectos, la determinación de la edad resulta imprecisa; además, estos procedimientos requieren del uso de técnicas que son muy laboriosas: en muchos experimentos tan solo el estado de desarrollo de los órganos sexuales es suficiente para determinar la edad aproximada del insecto. Recientemente, Mail *et al.* (1983), Lehane y Mail (1985) y Lehane *et al.* (1986) desarrollaron una técnica que es útil para estimar la edad de los insectos a partir del análisis cuantitativo de los compuestos fluorescentes que están presentes en los homogenizados de las cápsulas cefálicas (CCs) de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) y de la mosca tse tse, *Glossina morsitans* Westwood (Diptera: Muscidae). Esta técnica se basa en las propiedades que tienen estos compuestos para emitir fluorescencia en longitudes de onda determinadas; algunos de estos compuestos se han descrito como pteridinas, que son pigmentos visuales cuya estructura se relaciona con el ácido

tetrahidrofólico. Estas pteridinas se utilizan como marcadores de edad cronológica en diversos dípteros ya que se acumulan con la edad. Sin embargo, se ha encontrado en diversas especies de insectos que cuando aumenta la actividad fisiológica, lo que depende del espacio, la temperatura o la disponibilidad de los nutrientes, se acumulan diversos compuestos que también fluorescen pero que son de naturaleza química distinta a las pteridinas, aunque con características espectrales (máximos de absorción) muy parecidas; Sheldhal y Tappel (1974) observaron que estos compuestos, que son lípidos fluorescentes, se incrementan en relación con la edad de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

La capacidad para poder determinar la edad de los insectos, que son vectores, es esencial para poder entender la dinámica de sus poblaciones y la epidemiología de las enfermedades que transmiten, lo que es de gran ayuda en las observaciones sobre el comportamiento de éstos (Lehane y Hargrove, 1988). Se han sugerido muchos métodos para poder determinar la edad de los insectos, pero ninguno de ellos es enteramente satisfactorio. Por ejemplo, la técnica de la disección de los ovarios que desarrollaron Saunders (1962) y Challier (1965), que requiere de destreza manual, produce una estimación aproximada de la edad del insecto hembra de la mosca tse tse debido a la notable regularidad del ciclo ovárico; sin embargo, la desventaja de esta técnica radica en la incapacidad para poder determinar la edad de los insectos que presentan más de cuatro ciclos ováricos. Además, esta técnica requiere de gran habilidad manual, así como de paciencia y de tiempo suficiente para poder procesar un gran número de insectos.

El único método que ha sido útil en la determinación de la edad del macho de la mosca tse tse es mediante la observación de las alas maltratadas, así como del color de las mismas. Sin embargo, ninguno de estos métodos se considera confiable para determinar la edad en condiciones de campo. El método que desarrollaron Mall y sus colaboradores parece dar buenos resultados, además de la facilidad de la técnica para poder procesar muchos insectos al día (Lehane y Mall, 1985).

LOS COMPUESTOS FLUORESCENTES: PTERIDINAS. Hopkins estudió a finales del siglo pasado los pigmentos anaranjado y amarillo que están presentes en las alas de las mariposas que pertenecen a la familia Pieridae. A principios de este siglo, en 1925, Wieland y Slopt nombraron a

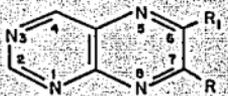
estos pigmentos "pteridinas", un término que comprende a compuestos relacionados entre sí que son los responsables de la pigmentación de las alas de las Pteridae. La estructura de la primera pteridina, la leucopterina, la descubrió Pirman en 1940 (en Ziegler y Harmsen, 1969). Desde entonces se han aislado estos compuestos a partir de microorganismos, plantas y animales, sin embargo, es en el grupo de los insectos en donde se encuentra la mayor concentración y diversidad, con la excepción de algunos anfibios y reptiles (Fox, 1976).

Estructura y Propiedades. Las pteridinas se definen desde el punto de vista estructural como aquellos compuestos que se derivan del anillo básico de pirimidina-pirazina; las pteridinas naturales, que son derivados 2-amino-4-hidroxi de este anillo, se conocen como "pterinas". El ácido fólico y sus derivados, con un sustituyente de p-aminobenzolil-glutamato en el carbono 6 (C_6), se conocen como pteridinas compuestas o conjugadas, mientras que el resto de las pteridinas se denominan no conjugadas (Figura 1). Estas últimas se clasifican de acuerdo con los sustituyentes en los C_6 y C_7 (Tabla I).

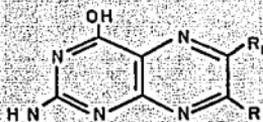
La estructura de la aloxazina, que es característica de las flavinas, se deriva de la sustitución de dos átomos de hidrógeno en C_6 y C_7 , del anillo pirazina por un anillo benzóide. Una de las flavinas que mejor se conoce es la riboflavina, que es el cofactor de varias enzimas que participan en diversas reacciones de óxido-reducción.

Las pteridinas son moléculas polares insolubles en solventes orgánicos; se disuelven con facilidad en agua a pH ácido o alcalino, pero tienden a autoquelarse en la neutralidad. Las pteridinas en solución fluorescen cuando se les irradia con la luz ultravioleta (UV) de longitud de onda larga (365 nm), sin embargo la tetrahidropterina no fluoresce (Fox, 1976). La mayoría de las pteridinas dan una reacción positiva a la prueba del murexido (ver Métodos de Estudio en esta sección).

A diferencia de las flavinas, las pteridinas son sensibles a la oxidación con permanganato, cuando se encuentran en un medio con ácido acético, pero al igual que las flavinas algunas se reducen con el hidrosulfito a derivados leuco, efecto que es reversible al agitar en aire. Esta última característica pudiera resultar reminiscente del papel fisiológico que juegan las flavinas como agentes óxido-

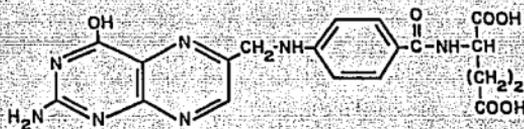


Anillo pirimidina-pirazina



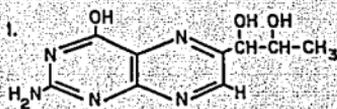
Pterina (derivado 2-amino-4-hidroxi)

(A)

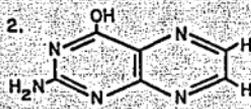


Acido Fólico

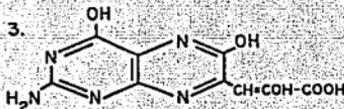
(B)



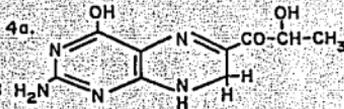
Biopterina



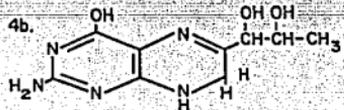
Pterina



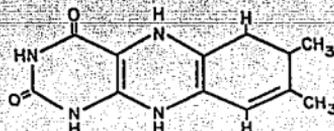
Eritropterina



Sepiapterina



Tetrahydrobiopterina



Riboflavina (lumazina)

Figura 1. Estructura de las pteridinas. A) Conjugadas; B) no conjugadas. Sintetizado de Ziegler y Harnsen (1969).

Tabla I. Clasificación de las pterinas no conjugadas.
Sintetizado de Ziegler y Harmsen (1969).

SUBSTITUCION EN EL CARBONO	SUBSTITUYENTE (RADICAL)	PTERINA
1) C6	R ₁ = -CHOH-CHOH-CH ₃ R ₂ = -H	Blopterina
	R ₁ = -CHOH-CHOH-CH ₂ OH R ₂ = -H	Neopterina
2) C6 y/o C7	R ₁ =R ₂ = -H	Pterina
	R ₁ = -COOH R ₂ = -H	Acido 6 carbónico -pterina
	R ₁ = -OH R ₂ = -H	Xantopterina
	R ₁ =R ₂ = -OH	Leucopterina
	R ₁ = -H R ₂ = -OH	Isoxantopterina
	R ₁ = -COOH R ₂ = -OH	Acido 6 carbónico -isoxantopterina
3) C7	R ₁ = -OH R ₂ = -CH=COH-COOH	Eritropterina
	R ₁ = -OH R ₂ = -CH=CNH ₂ -COOH	Lepidopterina
	R ₁ = -OH R ₂ = -CH ₂ -CHOH-COOH	Ecapterina
4a.) Pterinas dihidrogenadas		
C6 o C7	R ₁ =R ₂ = -H	7,8 dihidropterina
	R ₁ = -CO-CHOH-CH ₃ R ₂ = -H	Septapterina
	R ₁ = -CO-CH ₂ -CH ₃ R ₂ = -H	Isoseptapterina
	R ₁ = -OH R ₂ = -CH ₂ -CHOH-COOH	Dihidroecapterina
4b.) Pterinas tetrahidrogenadas		
C6 o C7	R ₁ = -CHOH-CHOH-CH ₃ R ₂ = -H	Tetrahidropterina
	R ₁ = -CO-CHOH-CH ₃ R ₂ = -H	6-lactoil- tetrahidropterina

reductores y sugiere una función paralela para las pteridinas: algunas pteridinas se conjugan con proteínas y funcionan como coenzimas de manera análoga a como lo hacen las flavoproteínas (Ziegler y Hamsen, 1969).

Biosíntesis. La biosíntesis del anillo pteridina se relaciona estrechamente con el metabolismo de las purinas ya que la guanina es el precursor directo de las pteridinas; la ruta biosintética guanina \rightarrow pteridina parece ser común en el reino Animalia; la ruta se presenta en la figura 2. El anillo purina se abre y el C_4 se elimina como formato, el cual se puede excretar como CO_2 o volver a entrar en la síntesis de las purinas. El intermediario resultante es una pirimidina hidrogenada y fosforilada; al cerrarse el anillo se forma una pteridina inicial no fluorescente que es similar a la tetrahidrobiopterina. La neopterina, con una cadena lateral D-eritro, es uno de los primeros productos estables en la transformación de las purinas a pteridinas. En experimentos en donde se alimentan a larvas de *Drosophila* con glucosa marcada en $^{14}C_1$ y $^{14}C_2$, los carbonos C_1 y C_2 de la cadena lateral de la biopterina y las drosopterinas se originan de los carbonos C_1 y C_2 de la glucosa (Ziegler y Hamsen, 1969).

Al inyectar guanosina marcada a la pupa de la mosca *Collas eurytheme* la marca se incorpora en la seplapterina y en sus productos de oxidación, lo que muestra además que el C_4 de la cadena lateral no se adiciona posteriormente sino que se origina en el momento de la síntesis de la pteridina. Además de la guanosina 5-fosfato, la treonina marcada también se incorpora en el C_4 y/o C_7 que se forman por la actividad de la xantina oxidasa; en presencia de esta enzima, la pteridina se oxida a isoxantopterina (Figura 2).

La biosíntesis del ácido fólico y sus derivados también inicia con la guanosina o la guanosina fosfato, durante este proceso se genera una pteridina hidrogenada que se acopla con el ácido p-aminobenzoico, pero a diferencia de la mayoría de los microorganismos, los protoctistas que producen la malaria, los plasmodia, sintetizan sus cofactores de folato a partir de la pteridina, el ácido 4-aminobenzoico (PABA) y el glutamato, que obtienen del huésped. El crecimiento de los plasmodia se inhibe con sulfonamidas, las cuales son análogos del PABA (Warhurst, 1986).

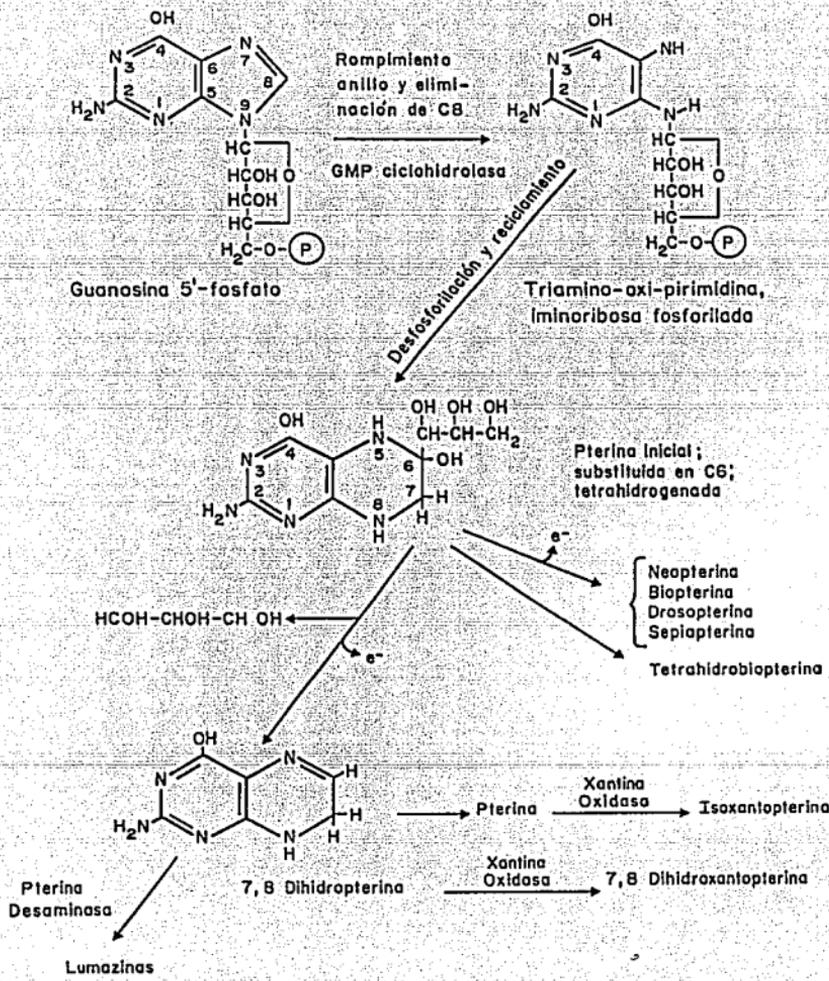


Figura 2. Biosíntesis de algunas pteridinas. Modificado de Ziegler y Harmsen (1969) y Warhurst (1986).

Estos parásitos son los únicos protoctistas en donde se ha encontrado a la enzima GTP ciclohidrolasa (GTPCH), la cual tiene semejanza con la de *Escherichia coli* ya que su actividad no depende del magnesio; tiene un peso molecular de unos 300 KDa, una Km por el GTP de 54.6 μ M, y se inhibe con 7-metil-guanosina (KI de 4.2 μ M), este último con actividad antimalárica *in vitro* (Warhurst, 1986).

Dada la importancia del papel que juegan las pteridinas en el metabolismo de los seres vivos, además de su síntesis enzimática, hasta el momento ha sido posible sintetizar químicamente una gran cantidad de pteridinas para, por ejemplo, aplicarse como agentes terapéuticos. La síntesis se inicia con la condensación de la 4-*o*-2,5,6-tiaminopirimidina con la hidrazona acetilada de la 5-desoxi-L-arabinosa (Figura 3); el azúcar se obtiene a partir de la L-ramnosa, o directamente de la L-arabinosa (Alder *et al.*, 1990).

Función y Distribución. Las pteridinas son compuestos orgánicos muy versátiles y que participan en diversas reacciones dentro del organismo, e inclusive juegan un papel importante en la interacción entre los componentes de un ser vivo, y en interacciones intra e interespecíficas. A continuación se describen algunos ejemplos.

a) Como cofactores de enzimas. El ácido tetrahidrofólico, un derivado de las pteridinas (Figura 4), es un cofactor importante de las enzimas que participan en reacciones de transferencia de grupos monocarbonados, en donde el carbono que se transporta está ligado al átomo de nitrógeno N5 o N10 (se representan como N⁵ y N¹⁰, respectivamente) o a ambos (Figura 4a); esta unidad de carbono puede existir en diferentes estados de oxidación: metilo (-CH₃), metileno (-CH₂-), formilo (-CHO), formimino (-CHNH), metenilo (-CH=), o el más oxidado, el CO₂. A excepción del CO₂, que se transporta por la biotina, todas estas unidades de carbono se transportan por el ácido tetrahidrofólico, las que además son interconvertibles entre sí (Figura 4b). Entre las reacciones en las que participa este cofactor, algunas de las más importantes son las que corresponden a la síntesis de la metionina a partir de la homocisteína por transferencia del grupo metilo, o la incorporación en las purinas de algunos átomos de carbono que se derivan del N⁵,N¹⁰-metenil y el N¹⁰-formil del ácido tetrahidrofólico, como el grupo metilo de la timina. Además, el ácido tetrahidrofólico también actúa como aceptor de carbonos en reacciones de degradación: la conversión de serina a glicina, o la ruptura de la histidina

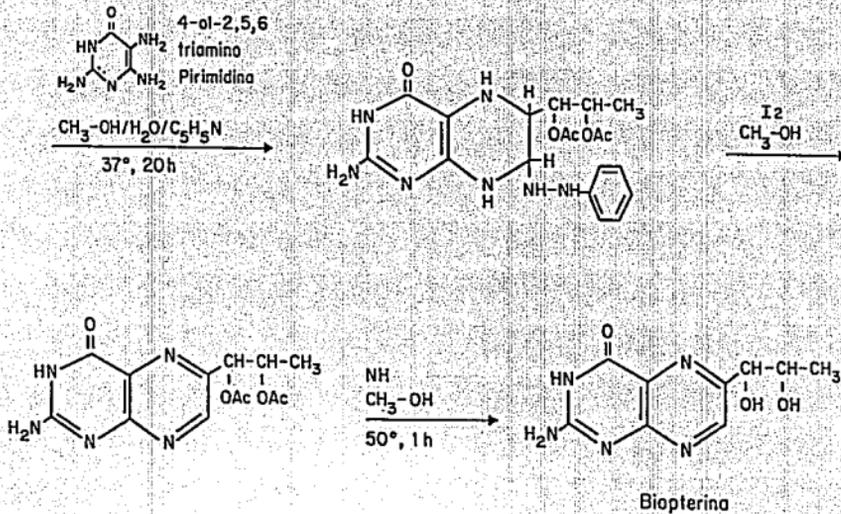
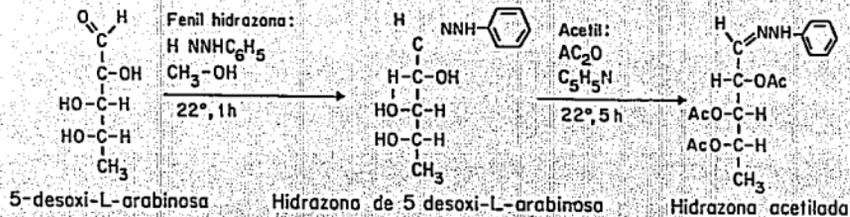
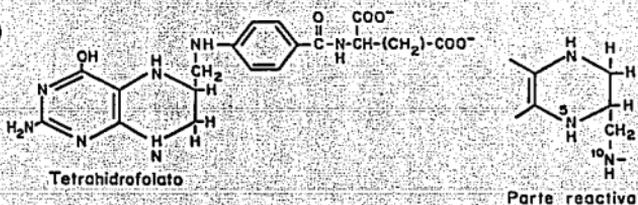


Figura 3. Síntesis química de la biopterina. Tomado de Alder *et al* (1990).

(A)



(B)

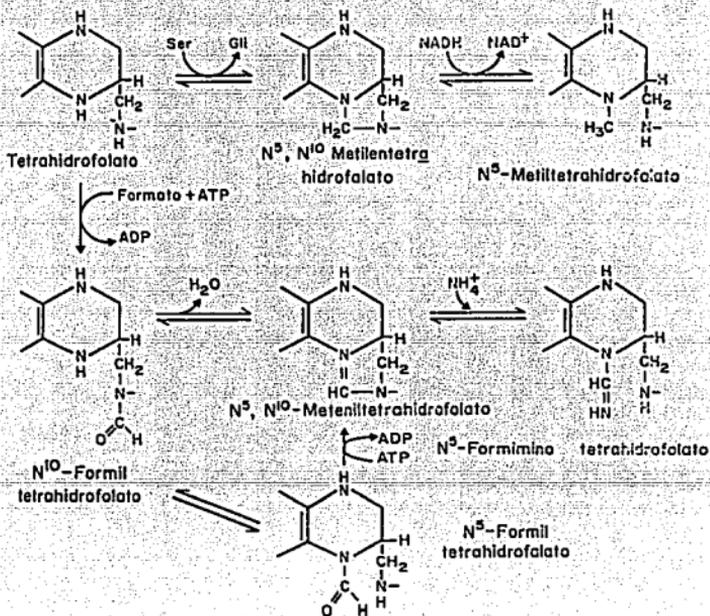


Figura 4. A) Estructura del ácido tetrahidrofólico y de su parte reactiva; B) conversión de unidades de carbono por el ácido tetrahidrofólico. Tomado de Stryer (1988).

para generar N-formimino glutamato (Stryer, 1988).

b) Como quimioatrayentes. La agregación de células generalmente es mediada por compuestos quimioatrayentes a los que también se les conoce con el nombre de acrasinas; el AMP cíclico, AMP_c, fue una de las acrasinas que primero se identificaron, ésta induce la agregación de las células de *Dictyostellium discoideum*. Otra acrasina se aisló de *D. lacteum*, la que se identificó como un derivado de las pteridinas (Van Haastert *et al.*, 1982), y que muestra una actividad alta como quimioatrayente.

c) En la respuesta inmune. Se ha observado en experimentos *in vitro* que en los macrófagos estimulados con el sobrenadante del medio de cultivo de linfocitos T activados, la concentración de neopterina alcanza hasta 10 veces más los niveles basales que están presentes en las células no estimuladas. Este incremento en la concentración de las pteridinas se acompaña de un aumento significativo en el nivel de GTP y de la actividad de la GTPCH, lo que también se observa al estimular a los macrófagos con el Interferón γ purificado, IFN- γ , en comparación con los macrófagos no estimulados (Schoendon *et al.*, 1986). La activación de la GTPCH por el IFN- γ resulta de interés ya que a la fecha tan sólo se conocían dos enzimas que se pueden activar por esta linfocina: la 2'-5' oligoadenilato sintetasa y una proteína cinasa. Desde el punto de vista clínico, en la actualidad se determinan los niveles de neopterina en la sangre para detectar enfermedades que se asocian con estados hiperinmunes (Schoendon *et al.*, 1987).

d) Como pigmentos biológicos. En los insectos las pteridinas se localizan en las células epidérmicas en donde forman cristales, los que dan una apariencia oscura al penetrar la luz, o tonalidades brillantes y muy vistosas al reflejarla; como resultado de la orientación del eje óptico de los cristales, la brillantez varía con el ángulo del haz luminoso incidente. Los patrones de coloración resultantes tienen importancia ecológica en cuanto a los mecanismos de reconocimiento entre individuos de la misma especie, o como protección frente a depredadores cuando generan coloraciones francamente alarmantes.

La mayoría de las pteridinas se asocian con gránulos de proteína en los tejidos de los insectos, a los que se les conoce como gránulos pigmentarios. Además del pigmento y de la proteína, estos gránulos contienen RNA y una determinada cantidad de fosfolípidos, lo que los hace similares a las mitocondrias, en cuanto a su composición. Estos gránulos se encuentran en gran cantidad en las células pigmentarias que rodean a los lentes y a la retícula de las omatíidas de los insectos. Una omatíida es la unidad del ojo compuesto en los insectos, en donde estos pigmentos pudieran

funcionar como agentes que evitan la dispersión de la luz y como filtros, particularmente para la región del UV cercano y del azul. Se ha demostrado la existencia de una relación directa entre la actividad optomotora del insecto y la cantidad de pigmentos que están presentes en las omatidias, en donde las moscas mutantes con ojos blancos, sin pigmentos, no presentan reacciones optomotoras y su agudeza visual es nula (Ziegler y Harmsen, 1969).

Métodos de Estudio. El estudio experimental de las pteridinas generalmente comprende la extracción de los compuestos y su purificación. La extracción a partir de diversos tejidos de animales implica el rompimiento del tejido con homogenizadores específicos, por ejemplo del tipo Potter, en el amortiguador adecuado, a 4°C. La solución resultante se centrifuga para eliminar los restos celulares y el material insoluble; el sobrenadante es una fuente rica de pteridinas, las que se determinan al evaluar su fluorescencia en un espectrofluorómetro con excitación a 360 nm y emisión a 450 nm (Mail *et al.*, 1983). La determinación química de las pteridinas y de otros compuestos relacionados, se realiza mediante la prueba del murexido (Leclercq, 1950), que consiste en exponer el tejido o la solución al ácido nítrico concentrado con lo que se forma un residuo amarillo, y posteriormente al KOH al 10%; después de adicionar unas gotas de agua, de calentar y de evaporar, se obtiene un residuo rojo, que se determina por colorimetría.

La separación y la purificación se realizan por procedimientos convencionales, como las técnicas de cromatografía en papel o en gel de sílice, con diferentes sistemas de solventes; esto ha permitido separar una gran cantidad de pteridinas fluorescentes a partir de los cromatogramas que se exponen a la luz UV después del corrimiento, las que se recuperan de cada mancha mediante disolución en el amortiguador apropiado. Recientemente se han aplicado con éxito las técnicas de HPLC ("High Performance Liquid Chromatography"- cromatografía líquida de alta resolución) en la purificación de estos compuestos con buenos rendimientos (Van Haastert *et al.*, 1982). El uso de cartuchos de octadecilsilano (C₁₈ Sep-Pack) también ha dado muy buenos resultados en la purificación y la concentración de las pteridinas (Ferre y Jacobson, 1985).

Desde el punto de vista biológico, la mosca *Drosophila melanogaster* es un modelo que ha

aportado mucha información en cuanto al metabolismo y la genética de las pteridinas. Ello se debe al trabajo con las mutantes de esta mosca, en las que los cambios fenotípicos al nivel de la coloración de los ojos se relacionan con cambios genotípicos, o mutaciones, que alteran rutas metabólicas determinadas. Tal es el caso de las mutantes con ojos color de rosa ("rosy") en donde se detecta, en cromatogramas bidimensionales, la mancha que corresponde a la hipoxantina en el lugar del ácido úrico que esta presente en las cepas silvestres; además de la diferencia en los patrones de manchas, en las mutantes se desarrollan tubos de Malpighi -que son el equivalente al riñón en las moscas- de menor longitud y deformes, lo que se debe a la acumulación de la hipoxantina, que es el material de excreción en las mutantes. Esta acumulación de hipoxantina se debe a una deficiencia en la síntesis de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH), que es la que se encarga de producir el ácido úrico a partir de la hipoxantina (Figura 5) (Hadorn, 1952). El efecto de la mutación en el gen que codifica para la XDH, que se conoce como mutación en el gen "rosy", se refleja a diferentes niveles fenotípicos, como es el cambio en los patrones de pigmentos y la deformación en los tubos de Malpighi, lo que en genética se define como un efecto pleiotrópico.

BIOLOGIA DE LA MOSCA DEL MEDITERRANEO, *Ceratitis capitata* W. La Mosca del Mediterraneo (Moscamed) recibe este nombre debido a que fue en la cuenca del Mediterraneo en donde se le reportó inicialmente como una plaga de árboles frutales de importancia económica. El primer registro de *C. capitata* es el de Latreille en 1817 en la isla Mauricio, en el Océano Indico. En 1829, Widemann la describió como *Trypeta capitata*, para la cual se reportó a las Indias Orientales como su lugar de origen. Años después, Filippo Silvestri llegó a la conclusión de que el origen más probable de *C. capitata* es el África Occidental, esto con base en haber detectado poco más de 20 especies diferentes del género *Ceratitis* que se distribuyen ampliamente en esta región (SAG, 1976).

De acuerdo con las condiciones ecológicas, la mosca puede vivir varios meses en estado adulto: normalmente su longevidad es de 1 a 2 meses, pero puede alcanzar hasta los 10 meses en áreas templadas y frías, o menos de 60 días cuando se encuentra en climas cálidos. Las hembras alcanzan su madurez sexual entre los 4 y 5 días después de la emergencia, lo que les permite iniciar la oviposura entre 7 y 9 días después, cuando se encuentran en temperaturas que oscilan entre los 24

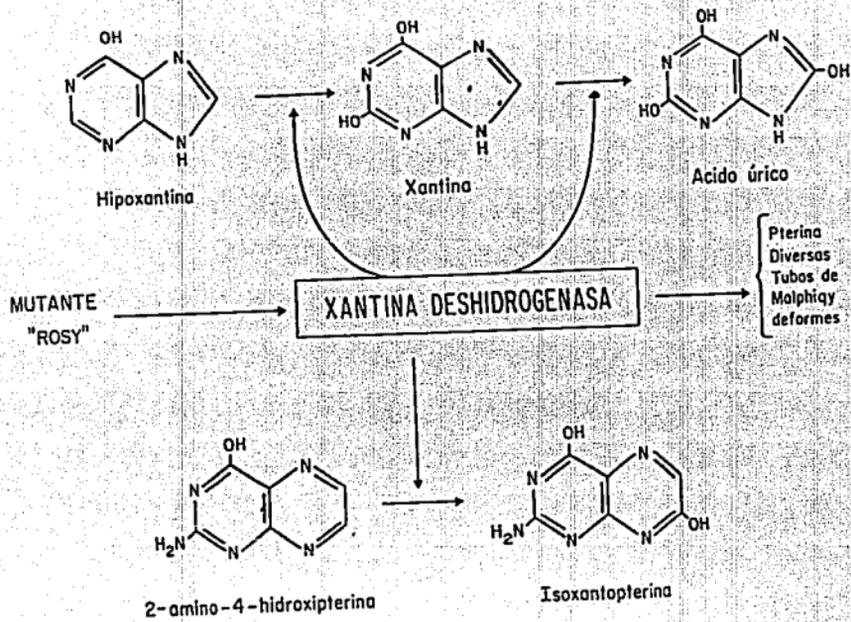


Figura 5. Actividad de la enzima xantina deshidrogenasa, y efecto de la mutación en el gen "rosy". Tomado de Hadorn (1952).

y los 27°C (SAG, 1976). Las hembras sexualmente maduras despiden un olor fuerte que atrae al macho a la cópula (Figura 6). Los machos, cuando se encuentran bajo las mismas condiciones que las hembras, maduran sexualmente a los 3 ó 4 días después de la emergencia, y como característica de este estado se destaca el movimiento de las alas y el arqueado del último segmento abdominal, lo que prolonga el aparato sexual hacia arriba, en donde se secreta un líquido cristalino que es de color ligeramente amarillo. La hembra requiere de una sola cópula en su vida; generalmente pone de 4 a 10 huevecillos por oviposición. Por lo general, cada hembra pone 20 huevecillos al día; el promedio es de 300 durante toda su vida, pero bajo condiciones óptimas puede poner hasta 800 huevecillos, aunque no todos alcanzan el estado adulto. La incubación de los huevecillos es de 2 a 7 días en temperaturas cálidas, lo que se prolonga hasta 20 ó 30 días en la época invernal. Al efectuarse la eclosión, la larva penetra al interior del fruto en donde completa su desarrollo después de 6 a 11 días. Al término del período de alimentación, la larva abandona el fruto y busca un lugar adecuado para enterrarse en el suelo. El período pupal requiere de 9 a 11 días, a 24°C, o hasta de varias semanas durante la época invernal (SAG, 1976).

Debido a la capacidad de adaptación a los climas más diversos y a su alto índice reproductivo, esta mosca se distribuye actualmente en los cinco continentes (Figura 7). En las últimas décadas ha invadido regiones que antes le eran inaccesibles por la presencia de barreras geográficas, sin embargo esto dejó de ser así cuando se incrementó el transporte de los productos vegetales, así como el intercambio turístico. La Mosca del Mediterráneo es una plaga de importancia agrícola porque sus larvas se alimentan de una gran variedad de frutos que tienen valor comercial, inclusive se le considera como el insecto plaga que causa el mayor impacto económico a nivel mundial (Carey, 1991).



Figura 6. Moscas adultas de *Ceratitis capitata*, W. Tomado de SAG (1976).

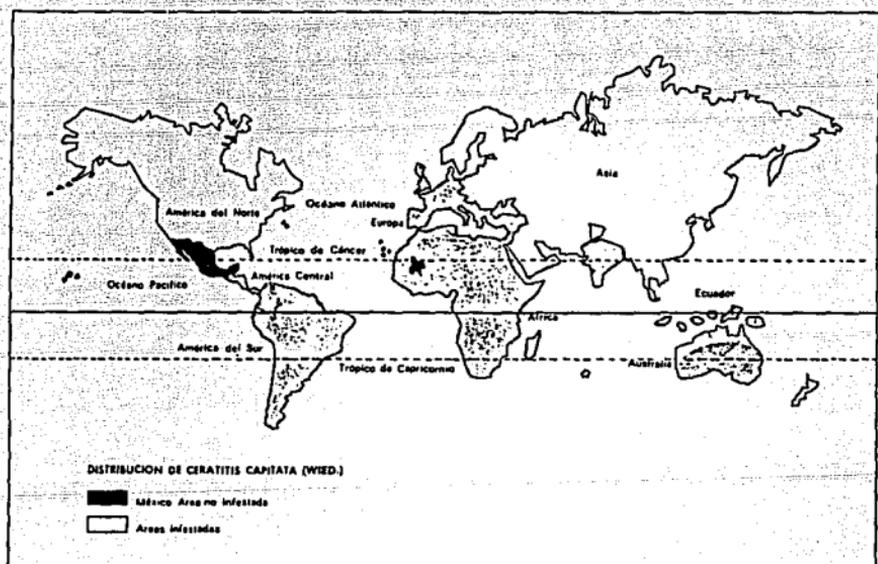


Figura 7. Mapa que muestra la distribución mundial de *Ceratitis capitata*, W. Tomado de SAG (1976).

II. OBJETIVOS

La Mosca del Mediterraneo, *Ceratitis capitata* W., es un insecto de importancia agrícola debido a que sus larvas se alimentan de una gran variedad de frutos que tienen valor comercial.

La distribución de esta mosca se controla en México gracias al programa de irradiación que se lleva a cabo en la actualidad al Sur de nuestro país; sin embargo, son muy importantes los estudios ecológicos y demográficos de las moscas que se liberan en el campo, para lo cual es esencial la determinación de edades. Tradicionalmente, se han utilizado características morfológicas para poder definir la edad cronológica de estos dípteros, lo que consume mucho tiempo y es poco preciso. En años recientes se ha aprovechado la propiedad que tienen las pteridinas para emitir fluorescencia, lo que permite utilizarlas como marcadores de edad cronológica, ya que se acumulan con la edad.

El objetivo inicial de este trabajo fue el determinar si existe un aumento en los niveles de fluorescencia en las cápsulas cefálicas (CCs) de *C. capitata* en relación con la edad de la mosca, para poder determinar la existencia de marcadores de edad cronológica en estos insectos, los cuales pudieran resultar de utilidad en estudios de campo, además de estudiar las condiciones experimentales que permitan desarrollar esta técnica sin un consumo excesivo de tiempo. En segundo lugar, y debido a que durante el proceso de envejecimiento fisiológico se acumulan una serie de compuestos fluorescentes de naturaleza lipídica, y a que sus características espectrales son muy parecidas a las de las pteridinas, se propuso caracterizar a los pigmentos fluorescentes que se obtuvieran de las CCs, para conocer su naturaleza y, consecuentemente, saber si la determinación se relaciona con la edad cronológica o la fisiológica, de las cuales son indicadores las pteridinas y los derivados lipídicos, respectivamente.

III. MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE LA MOSCA Y OBTENCION DE LAS CAPSULAS CEFALICAS (CCs). Las pupas de *Ceratitis capitata* se obtuvieron de la planta de irradiación del programa Moscamed que se ubica en Metapa, Chis., México. Antes de la entrega, las pupas se irradiaron con una fuente de Co^{60} y con una intensidad de 14 Krad. Posteriormente, las moscas se transfirieron a las instalaciones del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste en Tapachula, Chis., en donde se mantuvieron en jaulas, a 22°C de temperatura y con fotoperiodos de 12h luz/12h oscuridad. Cuando se utilizaron pupas no irradiadas, los procedimientos se realizaron dentro de la planta de irradiación debido a las restricciones de cuarentena.

Las moscas de edad conocida se anesteciaron con acetato de etilo o con bióxido de carbono, se decapitaron y se almacenaron las CCs en viales que contenían CaCl como desecador, y que se cubrieron con papel aluminio para evitar su exposición a la luz; los viales se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso.

DETERMINACION DE LA FLUORESCENCIA. La técnica que se empleó para determinar la edad de las moscas es la que reportan Mall *et al.* (1983) y Lehane y Mail (1985). Se homogenizó cada CC en 2 ml de una solución de cloroformo/metanol (2:1) a la que se le adicionaron 3 ml de NaOH 0.1N; el pH se ajustó a 10 con una solución de glicina 0.15 M. El homogenizado se centrifugó a 5 Krpm/3 min en una centrifuga clínica, e inmediatamente después se determinó la fluoreescencia del sobrenadante en un espectrofluorómetro (Mark I, Farrand Optical Co.) al utilizar una longitud de onda de 360 nm para la excitación y 450 nm para la emisión. De manera alternativa, se homogenizaron las CCs en el amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH=8.0 (Lehane y Mail, 1985). Se utilizó una solución de sulfato de quinina 0.27 nM, en H₂SO₄ 0.1 N, como blanco para ajustar el aparato al valor máximo de fluorescencia. Se determinaron los espectros de excitación y de emisión tanto para el sulfato de quinina como para el sobrenadante del homogenizado.

EFFECTO DEL CAMBIO DE COLOR DEL HOMOGENIZADO. Debido a que en experimentos

preliminares se detectó un cambio en la coloración del homogenizado, de rojo-canela a verde-amarillo, los procedimientos de extracción se realizaron en el cuarto frío a 5°C; además, el sobrenadante se manejó en tubos de centrifuga que estaban cubiertos con papel aluminio, y se mantuvieron en hielo durante la lectura de la fluorescencia. En estos experimentos se utilizaron moscas de edades diferentes, de 5 a 20 días, y con 10 repeticiones por cada sexo.

EFFECTO DE LA IRRADIACION. Para determinar el efecto de la irradiación, se utilizaron moscas con 2 días de edad: un lote se irradió, y otro no; estos experimentos contemplaron 10 repeticiones para cada sexo.

EFFECTO DEL MARCAJE CON PIGMENTOS FLUORESCENTES. Las pupas que se irradian en la planta de Metapa generalmente se marcan con un polvo fluorescente (Day-Glow, Switzer Brothers Inc., Cleveland, Ohio), con el propósito de saber si las moscas proceden de la planta de irradiación, y la fecha en la que se liberaron. Para tener la certeza de que este colorante no interfiere con los valores de fluorescencia que se obtienen de las CCs, se examinó un lote de moscas marcadas, y otro de moscas que no se marcaron con el colorante; se procesaron 10 repeticiones para cada sexo.

EFFECTO DE LA EDAD. Los primeros experimentos se llevaron a cabo con tres categorías de edad: 1.5, 10 y 20 días, y con 11 ó 12 réplicas por cada edad y cada sexo. En experimentos posteriores se utilizaron edades desde 0 hasta 27 días, con intervalos de 3 días de edad; se analizaron 60 repeticiones para cada sexo y cada edad.

EFFECTO DEL TAMAÑO DE LA CAPSULA CEFALICA. Durante los experimentos se notó una diferencia importante en el tamaño de las CCs entre moscas de la misma edad, por lo que se determinó el efecto del tamaño con moscas de la misma edad al separar las CCs en dos categorías: chicas y grandes; la separación fue a simple vista.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS PIGMENTOS FLUORESCENTES DE LAS CAPSULAS CEFALICAS. Para la separación cromatográfica de los pigmentos fluorescentes se homogenizaron las CCs en el amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH=8.0; posteriormente se tomó una muestra del

sobrenadante y se aplicó al papel de cromatografía (Whatman No. 1, con dimensiones de 15 x 15 cm). El cromatograma se corrió en dos dimensiones, 2D, con la siguiente mezcla de solventes: ácido acético/butanol/agua (33:120:80), para la primera dimensión, y piridina/butanol/agua (33:33:33), para la segunda dimensión. Durante el corrimiento cromatográfico se trabajó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para evitar la fotodegradación de los pigmentos fluorescentes. Al finalizar el corrimiento, los cromatogramas se secaron en un horno a 60°C, y se observaron en una cámara de luz UV de longitud de onda corta. Se registraron las diferencias en el patrón de manchas entre CCs que provenían de moscas machos o hembras, o de edades diferentes.

CARACTERIZACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS PIGMENTOS FLUORESCENTES. Se extrajeron algunas manchas fluorescentes a partir de los cromatogramas al recortar la porción del papel que contenía al pigmento, y al agitarlo vigorosamente en el amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH=8.0. Estos pigmentos se caracterizaron espectrofotométricamente al determinar su espectro UV/visible. Como controles se utilizaron soluciones de sulfato de quinina 13 nM, riboflavina 27 nM y ácido 4-aminofólico 22 nM, debido a que estos compuestos, además de fluorescer, presentan una estructura química similar a la de las pteridinas, de tal manera que la presencia de máximos de absorción similares pudieran indicar alguna semejanza de tipo estructural.

PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS. Los valores de fluorescencia que se obtuvieron para las variables que se estudiaron se procesaron de manera estadística mediante el análisis de varianza, ANDEVA, de manera manual y con la ayuda del programa Statgráfc. Las diferencias mínimas significativas, o separación de medlas, se determinaron mediante el análisis del "rango" múltiple de Duncan (Thomas y Jackson, 1984).

IV. RESULTADOS

SELECCION DE LA SOLUCION DE HOMOGENIZACION. Se presentaron algunos problemas cuando se utilizó la solución de cloroformo/metanol para homogenizar las CCs de *C. capitata*. En primer lugar, la eficiencia de la homogenización fue baja debido a que la ruptura del tejido fue incompleta, y por lo tanto se libera una cantidad menor de pigmentos a la solución. En segundo lugar, al adicionar la solución de hidróxido de sodio se forman dos fases que son inmiscibles, lo que complica la obtención de la fase que contiene al pigmento. Estos problemas no se presentaron cuando la homogenización se realizó con el amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH=8.0, en donde el tejido se disgrega en su totalidad y se liberan los pigmentos, lo cual se aprecia cualitativamente ya que la solución se torna a un color rojo-canela intenso; además, ésta es una solución homogénea de una sola fase. Así, durante todos los experimentos se utilizó al amortiguador de Tris-HCl para la homogenización.

ESPECTROS DE EXCITACION Y DE EMISION DE LOS PIGMENTOS FLUORESCENTES Y DEL SULFATO DE QUININA. El espectro del sulfato de quinina y del sobrenadante del homogenizado de las CCs de las moscas presentan máximos de fluorescencia similares (Figura 8), lo que mostró que el sulfato de quinina es un compuesto adecuado para ajustar los valores máximos al evaluar la emisión de fluorescencia por los pigmentos que están presentes en el sobrenadante del homogenizado.

VARIACION DE LA FLUORESCENCIA EN RELACION CON EL TIEMPO. Lehane y Mail (1985) reportan que la fluorescencia del homogenizado de las CCs de la mosca *tse tse* aumenta con el tiempo después de la homogenización, por lo que recomiendan determinar inmediatamente la fluorescencia. En este trabajo, el cambio de color del homogenizado de las CCs de *C. capitata*, de rojo-canela a verde-amarillo, después de un minuto de la homogenización, sugirió determinar el efecto que tiene este cambio de color en la producción de fluorescencia. Para realizar un seguimiento en la producción de fluorescencia se tomaron alícuotas del mismo sobrenadante 1, 15 y 30 min después de la homogenización, en donde no se observó variación alguna en los niveles de fluorescencia. Por

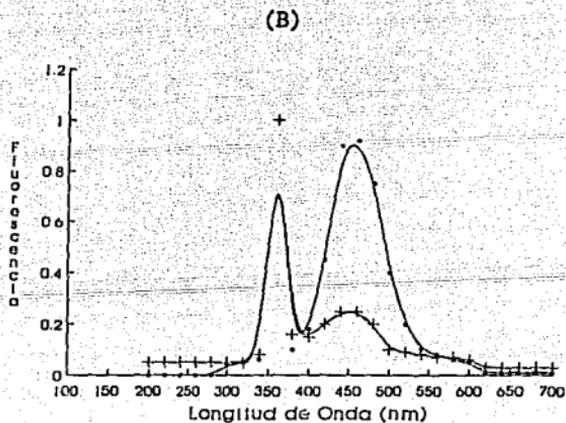
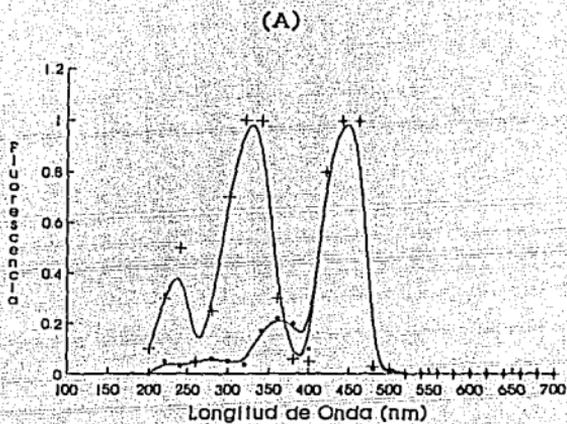


Figura 8. Espectro de fluorescencia del sulfato de quinina (+) y del homogenizado de las CCs de *C. capitata* (m). A) Espectro de excitación; B) espectro de emisión.

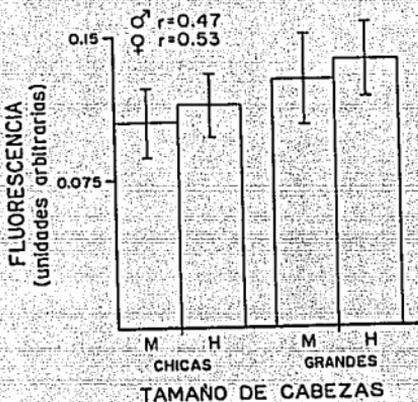
lo tanto, estos resultados difieren de los que reportan Lehane y Mall (1985) para la mosca tse tse, y que además muestran que las lecturas de la cantidad de fluorescencia se pueden llevar a cabo en intervalos de tiempo razonables.

EFFECTO DEL TAMAÑO DE LAS CCs. Este experimento resultó de suma importancia ya que la cantidad de fluorescencia varía en relación con el tamaño de las CCs de *C. capitata*, en donde en las CCs de mayor tamaño la fluorescencia es mayor, y a la inversa (Figura 9). Este factor requiere de un análisis más profundo y detallado debido a que la variación en el tamaño de las CCs es grande, lo que puede tener implicaciones importantes en la aplicación de esta técnica en estudios de campo, inclusive permite explicar la dispersión de los datos, en relación con los valores medios, de la mayor parte de los experimentos que se realizaron.

EFFECTO DE LA IRRADIACION. Se cuantificó la fluorescencia de los pigmentos de las CCs de lotes de moscas con 2 días de edad, irradiadas y sin irradiar, ya que la irradiación puede producir mutaciones y éstas influyen directamente en la producción de las pteridinas, como lo describe Hadorn (1952). El análisis ANDEVA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y los controles ($F=0.033$; $P=0.857$), así como tampoco entre los sexos ($F=0.291$; $P=0.593$).

EFFECTO DE LA MARCA CON POLVOS FLUORESCENTES. Los resultados del experimento cuyo objeto fue el investigar el efecto del marcaje de las moscas con polvos fluorescentes, indicaron la presencia de un efecto significativo del marcaje en la producción de la fluorescencia total, ya que la cuantificación disminuye cuando las moscas tienen el polvo fluorescente (Figura 10). Por lo tanto, se recomienda detectar la presencia o ausencia de estos polvos en las moscas antes de que éstas se sujeten a evaluación en cuanto a la producción de fluorescencia.

EFFECTO DE LA EDAD. La fluorescencia en las CCs de moscas de 3 categorías de edad, 1.5, 10 y 20 días, mostraron un aumento significativo en la fluorescencia en relación con la edad ($F=29.874$; $P=0.0001$), aunque no se observaron diferencias significativas entre los sexos ($F=0.40$; $P=0.844$). Las diferencias mínimas significativas, que se determinaron por el "rango" múltiple de Duncan, mostraron diferencias significativas entre las CCs de 1.5 días y las de 10 y 20 días ($P=0.01$), sin embargo no



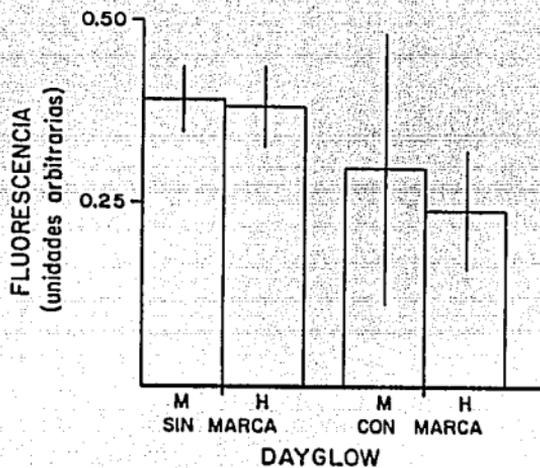
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F OBS	F REQUERIDA	5%	1%
Total	11	0.006406					
Bloques	2	0.004292	0.0021458	21.2	5.15	10.92	
Tratamiento	3	0.001502	0.0005007	4.9	4.76	9.78	
Error	6	0.000613	0.0001021				

Separación de medias

Tratamiento: Sexo-Tamaño

H-CH H-CH M-G H-G

Figura 9. Efecto del tamaño de la CC de *C. capitata* en la producción de fluorescencia, ANDEVA y separación de medias (los tratamientos que se unen por las líneas no muestran diferencias significativas; M, machos, H, hembras; Ch, chicas, G, grandes).



FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F OBS	F REQUERIDA 5%	1%
Total	19	0.195695				
Tratamiento	1	0.099405	0.099405	18.6	4.41	8.28
Error	18	0.096290	0.00535			

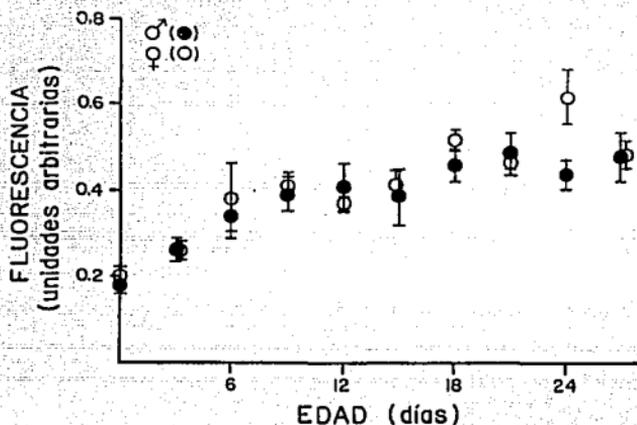
Figura 10. Efecto del colorante DayGlow en la determinación de la fluorescencia de las CCs y ANDEVA.

existieron diferencias significativas entre estas dos últimas edades, lo que sugiere que la síntesis de los pigmentos fluorescentes es mayor durante las etapas tempranas del desarrollo de la mosca.

En un experimento similar al anterior, cuando se determinó el aumento de la fluorescencia en las CCs de moscas cuya edad varió entre los 0 y 27 días, con intervalos de 3 días, se encontró un aumento significativo de la fluorescencia en relación con la edad (Figura 11), en donde la fluorescencia que producen las moscas hembras parece ser mayor que la de los machos. Sin embargo, el análisis de las diferencias mínimas significativas mostró que el mayor incremento en los niveles de fluorescencia se presenta hasta los 10 ó 12 días de edad, después de los cuales disminuye dicho incremento; esto sugiere que esta técnica puede resultar de utilidad cuando se analicen moscas que alcancen hasta los 10 ó 12 días de edad, pero más allá puede resultar imprecisa, por ejemplo a los 24 días. Por lo tanto, es necesario tomar en cuenta esto cuando se interpolen los valores experimentales en la recta que resulta del ajuste por medio del análisis de regresión (Figura 12); el coeficiente de correlación, r , para dicha recta fue de 0.85 para las moscas macho, y de 0.82 para las hembras.

Para conocer posteriormente la edad que se calcula mediante la determinación de los valores de fluorescencia por la interpolación en la curva de regresión (Figura 12), se realizó un experimento al que se le denominó de las "edades ocultas", ya que se calculó la edad por medio de la fluorescencia de moscas cuya edad cronológica se desconocía por el operador. En la tabla II se muestra que la determinación de la edad por la cuantificación de la fluorescencia resulta más precisa para las moscas machos que para las hembras, sin embargo, la determinación es precisa hasta los 12 días de edad aproximadamente.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS PIGMENTOS FLUORESCENTES. La cromatografía de los extractos solubles de las CCs reveló la existencia de 9 y de 6 pigmentos fluorescentes que están presentes en las moscas jóvenes y senescentes, respectivamente (Figura 13). La ausencia de los pigmentos 3, 8 y 9 en las moscas senescentes, de 10 días, pudiera ser un criterio en la determinación de la edad, aunque se requieren estudios más detallados al respecto. Es notable el hecho de que no se observó diferencia alguna entre los patrones cromatográficos de las moscas machos y las



A)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	OPMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F OBS	F RECALCADA	SS	LS
Total	59	0.5845					
Tratamiento	9	0.5508	0.0612	22.9	2.07	2.78	
Error	50	0.1227	0.00244				

Separación de medias

Tratamiento: Edad (días)

0 3 6 9 12 15 18 21 24 27



B)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	OPMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F OBS	F RECALCADA	SS	LS
Total	59	0.5202					
Tratamiento	9	0.8129	0.09	41.9	2.07	2.78	
Error	50	0.1072	0.002146				

Separación de medias

Tratamiento: Edad (días)

0 3 6 9 12 15 18 21 24 27



Figura 11. Efecto de la edad de adultos de *C. capitata* en la producción de fluorescencia por las CCs, ANDEVA y separación de medias (A, machos; B, hembras).

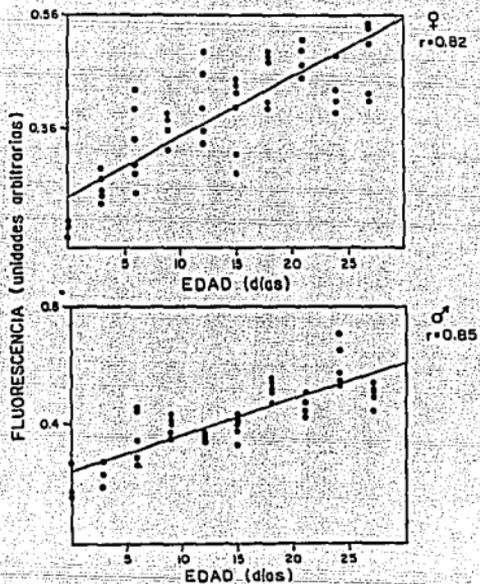
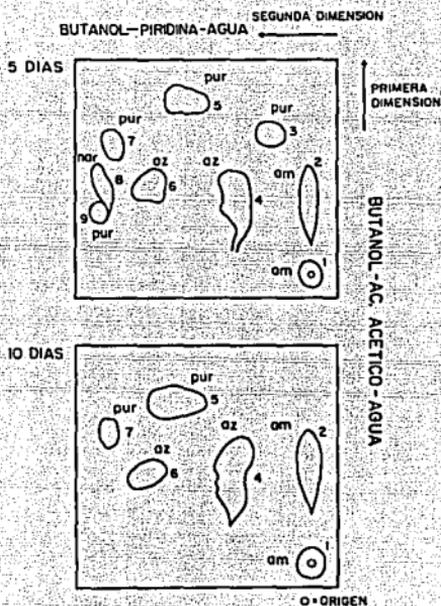


Figura 12. Curva de regresión y coeficiente de correlación (r) del efecto de la edad de los CCs de adultos de *C. capitata* en la producción de fluorescencia.

Tabla II. Experimento de las "edades ocultas".

CLAVE (Lote)	FLUORESCENCIA ¹ (Unidades Arbitrarias)	EDAD REAL ² (Días)	EDAD CALCULADA ³ (Días)
a) Machos			
U-37	0.18	0	0
R-40	0.27	3	3
O-41	0.33	6	6
S-50	0.38	9	10
V-42	0.41	12	13
T-44	0.38	15	10
Q-35	0.46	18	17.5
P-43	0.49	21	19.5
D-51	0.44	24	15
C-52	0.50	27	21
b) Hembras			
G-49	0.20	0	0
I-38	0.26	3	1.5
M-36	0.38	6	13
J-48	0.40	9	15
F-45	0.37	12	12
H-39	0.40	15	15
K-47	0.52	18	27
L-46	0.47	21	22
E-33	0.61	24	mayor a 30
X-34	0.50	27	25

¹Media de seis repeticiones; ²a partir del crecimiento en el laboratorio;
³a partir de la curva de regresión correspondiente.



PIGMENTO	COLOR*	EDAD (días)			
		5		10	
		Rf (α)	Rf (β)	Rf (α)	Rf (β)
1	Anaranjado	0.0	0.0	0.0	0.0
2	Amarillo	0.41	0.0	0.46	0.0
3	Púrpura	0.67	0.22	---	---
4	Amarillo	0.40	0.37	0.45	0.32
5	Púrpura	0.84	0.50	0.80	0.50
6	Azul	0.43	0.74	0.47	0.67
7	Púrpura	0.57	0.88	0.60	0.80
8	Anaranjado	0.55	0.95	---	---
9	Púrpura	0.44	0.95	---	---

*Fluorescencia bajo luz UV (longitud de onda corta)

Figura 13. Cromatograma que muestra la separación de los pigmentos fluorescentes de las CCs de *C. capitata* de edades diferentes. La clave de los colores de cada mancha se encuentra en la tabla. Tabla: valores de Rf en la primera (α) y en la segunda dimensión (β).

hembras.

De los pigmentos que se separaron por los procedimientos cromatográficos, los pigmentos 1 y 4 fueron los más abundantes, aunque el primero de ellos no fluoresce, es de color anaranjado y pudiera corresponder a un homocromo, de acuerdo con el reporte de Ziegler y Harmsen (1969); el segundo pigmento, 4, fluoresce intensamente con un color amarillo de manera similar a la riboflavina, sin embargo, cuando se co-cromatografió este pigmento con la riboflavina el Rf de cada uno de ellos fue diferente, por lo que se descartó la posibilidad de que el pigmento 4 correspondiera a la riboflavina. Tanto el color de la fluorescencia, como el valor de Rf, sugieren que el pigmento 4 pudiera corresponder a la sepiapterina que se ha descrito en la mosca *Musca domestica* (Grigolo et al., 1970).

CARACTERIZACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS PIGMENTOS FLUORESCENTES. El perfil de absorción UV/visible, tanto del extracto crudo de las CCs de *C. capitata* como de una solución del ácido 4-aminofólico, mostró máximos de absorción similares en 230 y 266 nm (Figura 14). Esto indicó que el sobrenadante contiene moléculas que se relacionan químicamente con el anillo pirimidina-pirazina del ácido 4-aminofólico, a diferencia de las purinas y las pirimidinas que no presentan un máximo de absorción alrededor de los 230 nm.

Se extrajeron los pigmentos 1 y 4 de los cromatogramas bidimensionales; no fue posible extraer otros pigmentos debido a que su cantidad fue muy baja. El perfil UV de ambos pigmentos mostró una similitud alta en los máximos de absorción para ambos pigmentos en la región de los 206 a los 263 nm (Figura 15). Por lo tanto, ambos pigmentos se relacionan estructuralmente, y debido a que su absorción máxima se encuentra en la región en donde el anillo pirimidina-pirazina muestra máximos, alrededor de los 260 nm, se sugiere que los pigmentos 1 y 4 se derivan del anillo pirimidina-pirazina. Como apoyo adicional para dicha sugerencia, se observó que el espectro de absorción del pigmento 1 y el de la quinina y la riboflavina muestran máximos de absorción similares (Figura 16): (a) 206/203, 221/222 y 263/264 nm cuando se compararon los espectros del pigmento 1 y la riboflavina; y (b) 221/216, 244/236 y 254/256 nm para la comparación entre el pigmento 1 y la quinina.

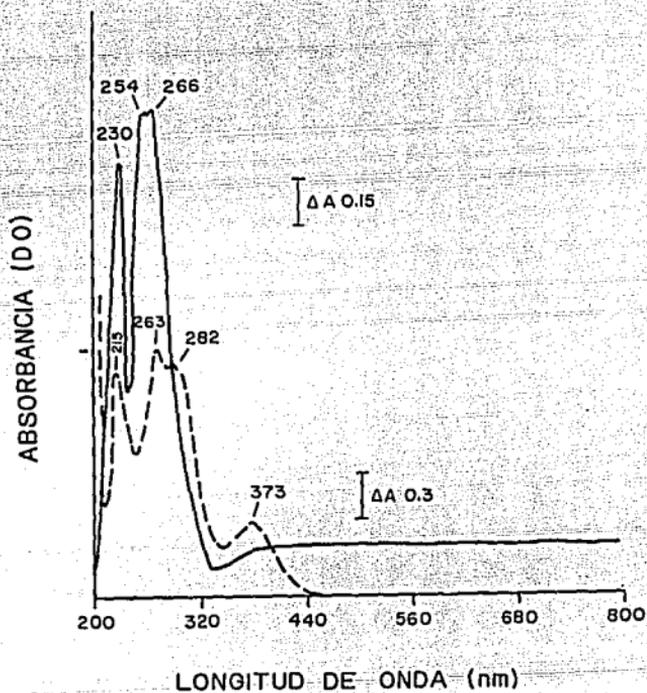


Figura 14. Espectro de absorción en la región UV/visible del sobrenadante de extractos de las CCs de *C. capitata* (—) y de una solución de ácido 4-aminofólico 22 nM (- - -). Para el sobrenadante se homogenizaron 5 mg de CCs de moscas hembras de 10 días de edad.

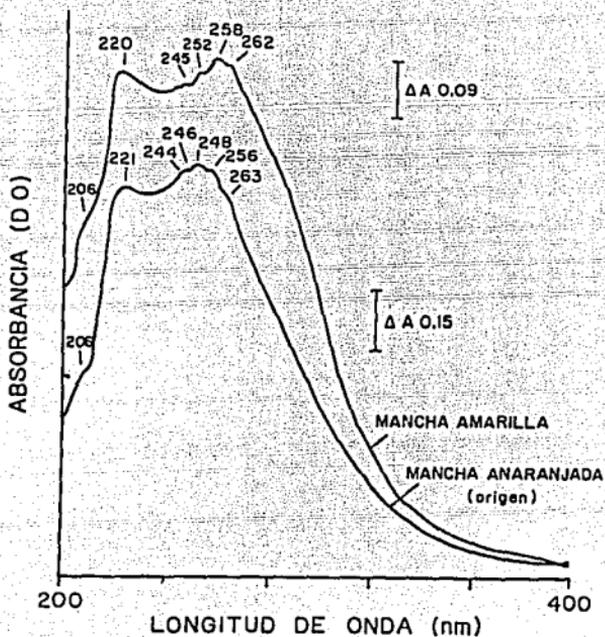


Figura 15. Espectro de absorción en la región UV de los pigmentos que se extrajeron a partir de los cromatogramas; pigmento 1 = mancha anaranjada; pigmento 4 = mancha amarilla. Los homogenizados se prepararon de igual manera a como se describe en la figura 14.

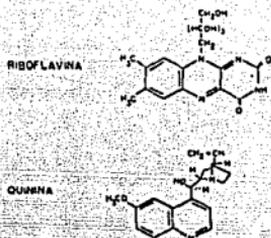
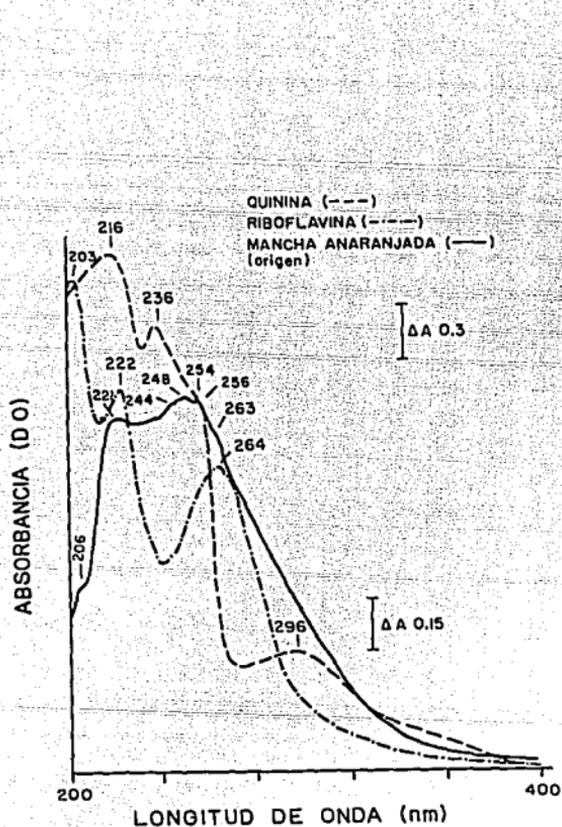


Figura 16. Espectro de absorción en la región UV del pigmento 1 de las CCs de *C. capitata* (—), y de los compuestos control: sulfato de quinina 13 nM (-.-) y riboflavina 27 nM(-.-.-). Los homogenizados se prepararon de igual manera a como se describe en la figura 14, Recuadro: estructura química de los compuestos control.

El perfil de absorción del pigmento 4, de color amarillo, en la región del visible, mostró un máximo a 455 nm, que es similar al de la riboflavina (Figura 17), sin embargo, aunque debe existir alguna relación estructural entre ambos pigmentos, éstos se diferencian claramente cuando se co-cromatografían. Además, es de interés el notar que la absorción máxima del pigmento 4 en el visible se encuentra en la región del amarillo y del verde (Figura 17), lo que es significativo desde el punto de vista de que el extracto inicial de las CCs, que es de color rojo-canela, vira rápidamente a un color verde-amarillo; este cambio de color del sobrenadante pudiera resultar de la oxidación de diversos pigmentos que se acumulan en lo que se observa como el pigmento 4. Sin embargo, como se demostró con anterioridad, este cambio de color no afecta la producción total de fluorescencia.

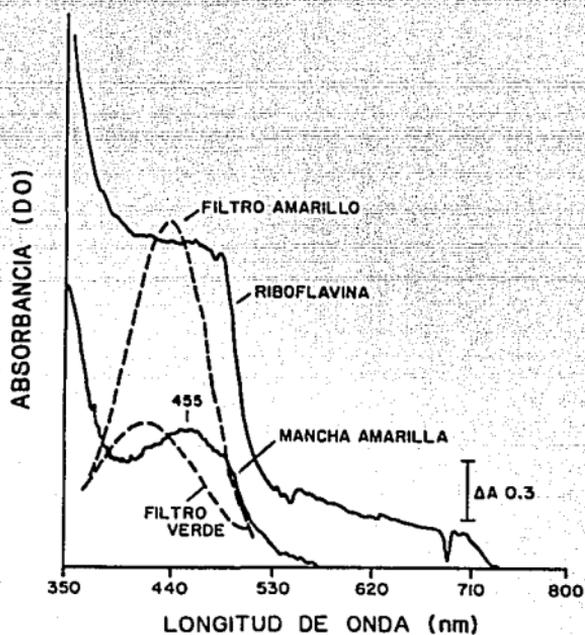


Figura 17. Espectro de absorción en la región del visible del pigmento 4 de las CCs de *C. capitata* y de una solución de riboflavina 27 nM. Se incluyen los espectros de absorción de los filtros que delimitan las regiones del verde y del amarillo.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que en las CCs de *C. capitata* existen compuestos fluorescentes cuya concentración varía con la edad de la mosca. Estos resultados concuerdan con los publicados por Mall y sus colaboradores (1983), Lehane y Mall (1985) y Thomas y Chen (1989). La variación considerable que se observó al determinar la fluorescencia de las moscas que correspondían a la misma edad se puede atribuir a la variación que existe en el tamaño de las CCs. Sin embargo, se debe considerar que no se cuantificó el intervalo de variación del tamaño de las CCs, sino que simplemente se dividieron visualmente en dos categorías: grandes y pequeñas; Thomas y Chen (1989) también encontraron que el tamaño de las CCs es una variable importante en la determinación de la fluorescencia.

·Sin embargo, y a pesar de la dispersión de los datos, es claro que existe una acumulación de pigmentos fluorescentes en las CCs en relación con la edad del insecto; este aumento es mayor en las etapas tempranas del desarrollo, hasta los 10 ó 12 días después de la emergencia, aunque posteriormente la síntesis de estos pigmentos disminuye. Por lo tanto, la aplicación práctica de esta técnica en la determinación de la edad de estas moscas pudiera ser una posibilidad a futuro, sobre todo después de realizar experimentos de campo en donde se determine el efecto que pueden tener los factores ambientales en la producción de los pigmentos fluorescentes ya que, como se mencionó con anterioridad, esta técnica permite procesar una gran cantidad de muestras durante periodos de tiempo cortos. Esta técnica puede llegar a ser una herramienta poderosa en estudios de tipo demográfico, así como para determinar la tasa de sobrevivencia de las moscas irradiadas que se liberan en el campo. Además, con la aplicación de esta técnica pudiera ser relativamente fácil distinguir a las moscas jóvenes de las senescentes; por ejemplo, la existencia en el campo de moscas principalmente jóvenes después de aplicar insecticidas sugeriría un efecto predominante de éstos en las moscas senescentes.

El entendimiento detallado de la naturaleza de los pigmentos visuales de *C. capitata* es un aspecto importante ya que aporta información que es útil, no solamente para determinar la edad del insecto,

sino también como un auxiliar en la taxonomía de las moscas que pertenecen al complejo Tephritidae, de manera similar a como ocurre en la mosca *Drosophila* spp. (Wolf *et al.* 1987). En este sentido, los resultados que se describieron en la sección anterior sugieren fuertemente que los pigmentos fluorescentes de las CCs de *C. capitata* corresponden a pteridinas y no a derivados lipídicos, y consecuentemente la determinación de la edad es cronológica y no fisiológica. Desde el punto de vista técnico, ambos pigmentos se separan con facilidad debido a su solubilidad, ya que las pteridinas son hidrosolubles, y los pigmentos lipídicos son solubles en solventes orgánicos, de tal manera que estos últimos se eliminan de la preparación al homogenizar el tejido en el amortiguador de Tris-HCl y en el precipitado después de centrifugar. Así, el sobrenadante es una fuente rica de pteridinas.

Por otro lado, se separaron aproximadamente ocho pigmentos fluorescentes de los extractos acuosos de las CCs de *C. capitata* mediante cromatografía bidimensional en papel; la cantidad de manchas varió con la edad de la mosca. El número de pigmentos que se resolvieron en el cromatograma es similar al que se ha reportado en otras moscas, por ejemplo en *Musca domestica* (Grigolo *et al.*, 1970); aunque los valores de R_f varían entre estos pigmentos, lo que depende de la especie, algunos de ellos son constantes, en particular el pigmento 4 de *C. capitata* y la sepiapterina de *M. domestica*.

Los perfiles de absorción de los pigmentos que se extrajeron de los cromatogramas, así como de las moléculas control cuya estructura es similar a las pteridinas (el ácido 4-aminofólico, el sulfato de quinina y la riboflavina), sugieren fuertemente que los pigmentos fluorescentes principales de la CC de *C. capitata* son pteridinas. Al igual que estos pigmentos, se ha demostrado que una acrasina del hongo *Dictyostellium lacteum* es una pteridina cuyos máximos de absorción se encuentran en las cercanías de los 260 nm (Van Haastert *et al.*, 1982).

Aún cuando se separaron por cromatografía bidimensional los pigmentos fluorescentes que se caracterizaron posteriormente por medios espectrales, no se puede descartar el hecho de que las manchas contengan otros compuestos contaminantes que se relacionen químicamente con las

pteridinas, por lo que posteriormente será necesario realizar la purificación exhaustiva, por ejemplo mediante HPLC, y la caracterización química de cada pigmento, antes de realizar estudios adicionales. Además, resultará de interés estudiar el comportamiento de las pteridinas individuales durante el envejecimiento cronológico de estas moscas con el objeto de conocer su contribución individual en la fluorescencia total de los extractos.

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que la técnica de la determinación de la fluorescencia en los extractos de las CCs de *C. capitata* puede resultar de utilidad para conocer la edad de estas moscas; sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que aporten datos que permitan controlar de manera óptima las variables que afectan los niveles de fluorescencia, debido a lo cual hasta el momento la técnica es de uso limitado. Además, ya que se sugiere que los pigmentos fluorescentes de las CCs de estas moscas son pteridinas, su determinación corresponde a la edad cronológica y no a la fisiológica, la cual puede variar de manera importante de acuerdo con las condiciones ambientales, tal como la temperatura.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alder, C., M. Visconti, S. Datta y H.C. Curtius. (1990). 105. Pterine chemistry: a simple synthesis of deoxy-L-(5-²H₁) arabinose and L-(3-²H₁) biopterine. *HELVETICA CHEM. ACTA* **73**: 1058-1063.
- Carey, J.R. (1991). Establishment of the mediterranean fruit fly in California. *SCIENCE* **253**: 1369-1373.
- Chailier, A. (1965). Amelioration de la methode de determination de l'age physiologique des glossines. *BULL. SOC. PATHOL. EXOT.* **58**: 250-259.
- Ferre, J. y K.B. Jacobson. (1985). Use of reversed phase C₁₈ Sep Pak cartridges for the purification and concentration of sepiapterine and other pteridines. *J. CHROMATOGR.* **350**: 389-398.
- Fox, D.L. (1976). Animal blochromes and structural colours. University of California Press, USA. pp. 293-300.
- Grigolo, A., L. Sacchi y L. Dima Da Ros. (1970). La pterina de *Musca domestica* (L.). *GENET. AGRIC.* **22**: 382-393.
- Hadorn, E. (1952). Fractionating the fruit fly. *SCI. AM.* **206**(4): 100-110.
- Krebs, Ch.J. (1985). Ecología. Segunda edición. HARLA, México. pp. 158-195.
- Leclercq, J. (1950). Occurrence of pterine pigments in hymenoptera. *NATURE* **165**: 367-368.
- Lehane, M.J. y T.S. Mail. (1985). Determining the age of the adult male and female *Glossina morsitans morsitans* using a new technique. *ECOL. ENTOMOL.* **10**: 219-224.
- Lehane, M.J., J. Chadwick, M.A. Howe y T.S. Mail. (1986). Improvements in the pteridine method for determining age in adult male of female *Stomoxys calcitrans*. *J. ECON. ENTOMOL.* **79**: 1714-1719.
- Lehane, M.J. y R. Hargrove (1988). Field experiments on a new method for determining age in tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *ECOL. ENTOMOL.* **13**: 319-322.
- Mail, T.S., J. Chadwick y M.J. Lehane. (1983). Determining the age of adults of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *BULL. ENT. RES.* **73**: 501-525.
- S.A.G. (1976). La mosca del Mediterraneo. Dirección General de Sanidad Vegetal, México. pp. 1-7.
- Saunders, D.S. (1962). Age determination for female tsetse flies and the age composition of samples of *Glossina pallidipes*, Aust., *G. palpalis fuscipes*, Newsp. and *G. brevipalpis*, Newsp. *BULL. ENTOMOL. RES.* **53**: 579-595.
- Schoendon, G., J. Troppmair, G. Adolf, C. Huber y A. Niederwieser. (1986). Interferon- γ enhances biosynthesis of pterins in peripheral blood mononuclear cells by induction of GTP cyclohydrolyase I

activity. J. INTERFERON RES. 6: 697-703.

Schoendon, G., J. Troppmaier, A. Fontana, Ch. Huber, H.Ch. Curtius y A. Niederwieser. (1987). Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines in man and mouse. EUR. J. BIOCHEM. 166: 303-310.

Sheldahl, J. y A.L. Tappel. (1974) Fluorescent products from aging *Drosophila melanogaster*: an indicator of free radical lipid peroxidation damage. EXP. GERONTOL. 9: 33-41.

Stryer, L. (1988). Biochemistry. W.H. Freeman, NY. pp. 580-583.

Thomas, D.B. y A.C. Chen. (1989). Age determination in the adult screwworm (Diptera: Calliphoridae) by pteridine levels. J. ECON. ENTOMOL. 82: 1140-1144.

Thomas, M.L. y H. Jackson. (1984). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Trillas, México. 270 pp.

Van Haastert, P.J.M., R.J.W. De Wit, A.D. Grijpma y T.M. Konijn. (1982). Identification of a pterin as the acrasin of the cellular slime mold *Dictyostelium lacteum*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 79: 6270-6274.

Wanhurst, D.C. (1986). Pteridine synthesis in malaria parasites. PARASITOL. TODAY 2:57-58.

Wolf, T.M., R. Wassertein y J.S. Yoon. (1987). Qualitative and quantitative studies of pteridine eye pigments in *Drosophila*. Seven species of hawaiian *Drosophila* and *D. melanogaster*. BIOCHEM. SYST. ECOL. 15: 239-245.

Ziegler, I. y R. Harnsen. (1969). The biology of pteridines in insects. ADV. INSECT PHYSIOL. 6: 139-203.