



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE
COMPUESTOS C₂₀ (ÁCIDO ARAQUIDÓNICO O
SIMILARES) Y LA INDUCCIÓN DE LA GENOTOXICIDAD EN
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

JOSÉ ARMANDO MUÑOZ MOYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MÉXICO, D.F.

MAYO DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/097/09

ASUNTO: Asignación de Sinodales

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
Presente.

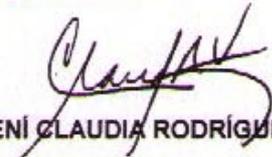
Por este conducto me permito comunicarle como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **M. EN C. JOSÉ ARMANDO MUÑOZ MOYA**, quién desarrolló el Trabajo de Tesis titulado "**Relación entre el metabolismo de compuestos C20 (ácido araquidónico) y la inducción de genotoxicidad en células somáticas de *Drosophila melanogaster***", que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 9 de marzo del año en curso, designó a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado tiene los méritos para obtener el grado de **DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**:

PRESIDENTE	DRA.	MARÍA CRISTINA PÉREZ-AMADOR BARRÓN
PRIMER VOCAL	DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
SEGUNDO VOCAL	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
TERCER VOCAL	DR.	EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ
SECRETARIO	DR.	RAFAEL CAMACHO CARRANZA
SUPLENTE	DR.	MANUEL MIRANDA ANAYA
SUPLENTE	DR.	JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Asimismo, informo a los miembros del jurado, que el Consejo Técnico aprobó el 13 de octubre de 1994 un plazo máximo de 30 días hábiles para que emitan su voto aprobatorio.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F. 12 de marzo del 2009
JEFE DE LA DIVISIÓN


DRA. DENI CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

DCRVASR\gr*



DEDICATORIA

A mi Esposa: Araceli López Pérez

Por brindarme su amor y apoyo durante todos estos años, eres mi ejemplo, Te quiero.

A mis hijos: Demian, Axel y Didier

Por darme alegría y felicidad, sean siempre personas buenas.

A mis nietos

A mi Madre Agustina Moya y a mis hermanos Daniel Antonio Jorge y Guadalupe

Por siempre apoyarme en las buenas y en las malas, los quiero.

A todos mis Amigos

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Patricia Ramos Morales, por su paciencia y comprensión; pero sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo.

A la Maestra Adriana Muñoz y al Biólogo Hugo Rivas Martínez por su asistencia y apoyo técnico.

A los maestros y alumnos del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental y del Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias:
(Adriana, Hugo Rivas, Blanca, Lety, Tulio, Linda, Hugo y a todos los que están o estuvieron).
Mil Gracias.

A los sinodales por sus valiosos comentarios:

Dra. María Cristina Pérez Amador
Dra. Patricia Ramos Morales
Jesús Javier Espinosa Aguirre
Luis Felipe Jiménez García
Rafael Camacho Carranza
Manuel Miranda Anaya
Efraín Tovar Sánchez

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto Programa de Apoyo a proyectos de Innovación y Mejoramiento (PAPIME: EN206803), UNAM. El material biológico utilizado en esta investigación fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Índice

RESUMEN.....	
Abreviaciones.....	
1. INTRODUCCIÓN.....	
1.1 Ácido araquidónico (20:4n-6; ω-6).....	
1.2 Eicosanoides.....	
1.3 Fosfolipasa A ₂ (PLA ₂) en la biosíntesis de eicosanoides (primer paso).....	
1.4 Ciclooxygenasa (COX) en la biosíntesis de eicosanoides (segundo paso).....	
1.5 Vía Lipooxygenasa (LOX) en la biosíntesis de eicosanoides.....	
1.6 Citocromo P450 (P450).....	
1.7 Factores que influyen en la liberación del 20:4n-6 (ω-6).....	
1.8 Especies reactivas del oxígeno generadas durante el metabolismo del 20:4n-6 (ω-6)...	
1.9 Inhibidores de las enzimas participantes en el metabolismo del 20:4n-6 (ω-6).....	
1.10 <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba.....	
1.11 Prueba de mutación y recombinación somáticas.....	
1.12 Justificación.....	
2. OBJETIVO GENERAL.....	
2.1 Objetivos particulares.....	
2.2 Hipótesis.....	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	
3.1 Compuestos Químicos.....	
3.2 Líneas y Cruzas de <i>Drosophila</i>	
3.3 Procedimiento Experimental.....	
3.4 Toxicidad de los tratamientos.....	
3.5. Análisis de las alas.....	
3.6. Extracción de lípidos.....	
3.7. Preparación de los metil ésteres de los ácidos grasos.....	
3.8 Cromatografía gas-líquido.....	
3.9. Análisis Estadístico.....	
4. RESULTADOS.....	
4.1 Lípidos.....	
4.2 Cromatografía.....	
4.3 Toxicidad de los tratamientos.....	
4.4. Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas.....	
5. DISCUSIÓN.....	
6. PERSPECTIVAS.....	
7. CONCLUSIONES.....	
Anexo 1.....	
BIBLIOGRAFÍA.....	
Artículo derivado de la investigación.....	

RESUMEN

Se ha propuesto que el metabolismo del ácido araquidónico (20:4n- ω 6) es un importante mediador en la fisiología y fisiopatología de los mamíferos. Actualmente se explora su participación en diversos aspectos de la biología de los insectos y se han encontrado similitudes sorprendentes entre éstos y los vertebrados. Bajo esta vertiente, en esta tesis se intentó dar respuesta a dos interrogantes. Por una parte se determinó si el 20:4n- ω 6 está presente en las larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* y por la otra, si éste participa en la respuesta de genotoxicidad de la mosca. Se utilizó 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y cortisona (COR) como inductor e inhibidor del 20:4n- ω 6, respectivamente.

Los resultados obtenidos indicaron que el 20:4n- ω 6 sí está presente. El TPA resultó genotóxico para *Drosophila* en todas las concentraciones probadas [0.275-0.56 mM], probablemente por la inducción de enzimas que participan en el metabolismo del 20:4n- ω 6 y por la acción indirecta de especies reactivas de oxígeno (ROS); la administración del TPA también disminuyó el contenido del 20:4n- ω 6, lo que sugiere que probablemente este ácido es utilizado para generar eicosanoides. Con la COR, aunque el contenido de 20:4n-6 disminuyó, no lo hizo la frecuencia de mutación en las concentraciones probadas [0.56-5.6 mM]. Los glucocorticoides (GCC) tienen la capacidad de redistribuir al 20:4n- ω 6 en otros compartimentos, de manera que la disminución del contenido de 20:4n- ω 6 disponible, no necesariamente puede relacionarse con la producción de eicosanoides, como en el caso del TPA, sino que podría haber sido compartimentalizado y en consecuencia, deja de ser sustrato disponible.

En los tratamientos mezcla y secuencial con TPA [0.55 mM] más COR [1.4 y 2.8 mM], la frecuencia de mutación fue menor que la inducida por el TPA sólo lo que indica que probablemente esta ruta metabólica sí está involucrada en la respuesta de genotoxicidad. Se proponen dos posibles mecanismos de acción; en el tratamiento con la mezcla se inhibe el primer paso (Fosfolipasa A₂) y segundo paso (Ciclooxigenasa); en el tratamiento secuencial se inhibe sólo el segundo paso, lo que impide la subsecuente generación de ROS.

Los resultados obtenidos en esta investigación, muestran que el metabolismo del 20:4n-6 sí está implicado en la respuesta de genotoxicidad ya que la frecuencia de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila melanogaster* se modifica de manera significativa en los diferentes tratamientos.

Es necesario continuar con la caracterización de la participación del 20:4n- ω 6 en la respuesta de genotoxicidad y su relevancia en la respuesta inmune de *Drosophila melanogaster* y otros invertebrados.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ácido araquidónico (20:4n-ω6)

El ácido araquidónico (20:4n-ω6; ácido Z, Z, Z, Z-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico; C-20 Δ⁵, Δ⁸, Δ¹¹, Δ¹⁴; AA) se sintetiza a partir del ácido linoleico dando como intermediario al araquinodil-CoA, el cual se utiliza principalmente en la síntesis de fosfolípidos y del 20:4n-ω6, este último se encarga de la biosíntesis de eicosanoides (Mathews y van Holde 1990) (Fig. 1).

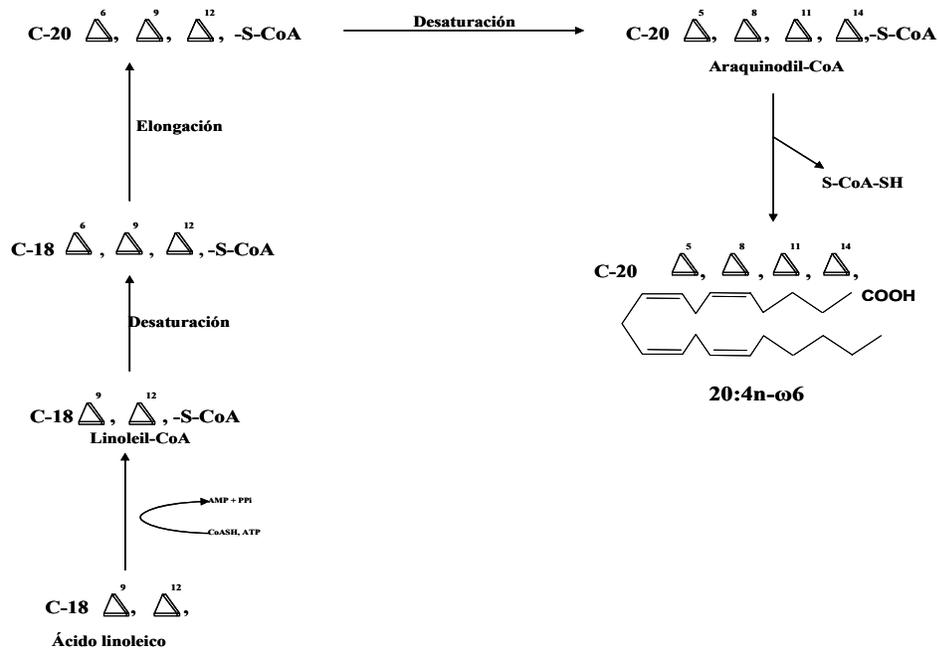


Fig. 1 Síntesis del 20:4n-ω6.

El ácido araquidónico (20:4n-ω6) se encuentra formando parte de la estructura de los fosfolípidos de la membrana, esterificado en la posición *sn*-2, forma que no es sustrato para las enzimas. Se ha propuesto que esta esterificación da sostén a la membrana, fluidez y también funciona como almacén sustrato (Ziboh, 1985).

Aunque también los ácidos dihomo-γ-linolénico (20:3n-ω6) y eicosapentaenoico (20:5n-ω3) son precursores de eicosanoides, el 20:4n-ω6 es el mejor estudiado en mamíferos, y en los que probablemente es el ácido graso poliinsaturado más importante como precursor de eicosanoides, constituye del 25 al 33 % de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Hansen, 1989). El contenido de 20:4n-ω6 en los mamíferos y los insectos terrestres es diferente. Basados en estudios analíticos, de

incorporación y nutricionales, Stanley-Samuelson y Dadd (1983), propusieron que el 20:4n- ω 6 y otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) de 20 carbonos (C20) se encuentran en tejidos lipídicos de todos los insectos. Los PUFAs están en proporciones bajas, menores al 0.1 % de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que explica su aparente ausencia en los insectos terrestres (Howard y Stanley-Samuelson, 1990; Howard *et al.*, 1992). Como ocurre con otros animales acuáticos, los insectos acuáticos mantienen altas proporciones de PUFAs de C20 (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988), sin embargo análisis de PUFAs provenientes de arañas, tarántulas y otros invertebrados terrestres, revelan que estos animales contienen mucho más 20:4n- ω 6 que los insectos terrestres (Uscian y Stanley-Samuelson, 1994). Por otro lado, estudios nutricionales (Stanley-Samuelson y Dadd, 1981; Dadd, 1981; Stanley-Samuelson y Dadd, 1983; Stanley-Samuelson y Dadd, 1984) y de incorporación de ácidos grasos a partir de la dieta (Gadelhak y Stanley-Samuelson, 1994) indican que las células de insectos mantienen activos estos componentes en bajas proporciones.

1.2 Eicosanoides

Eicosanoide, es un término general para todos los metabolitos oxigenados y biológicamente activos de los PUFAs de C20, como el 20:4n- ω 6, ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n- ω 6) y el ácido eicosapentaenoico (20:5n- ω 3) (Corey *et al.*, 1980; Stanley-Samuelson, 1994a; Stanley-Samuelson, 1994b; Stanley y Miller, 1998; Stanley, 2006a) (Fig. 2).

Como las hormonas, debido a su estructura y naturaleza química los eicosanoides ejercen efectos fisiológicos específicos sobre las células blanco, sin embargo difieren de éstas en que pueden actuar localmente o cerca del sitio de origen y son catabolizados extremadamente rápido (Gurr y Harwood, 1991; Smith, 1992; Kelloff *et al.*, 1995; Urade *et al.*, 1995; Stanley, 2000; Stanley, 2006a).

Se conocen tres rutas enzimáticas para la síntesis de eicosanoides:

- 1) **Ciclooxigenasa (COX)**, produce **prostaglandinas (PGs)**, **prostaciclina (PGI₂)** y **tromboxano (TX₂)**.
- 2) Sistema enzimático dependiente del Citocromo **P450 (P450)**, producen ácidos **epoxieicosatrienoicos (EET's)**, ácidos **hidroxieicosatetraenoicos (HETEs)** y ácidos **hidroxiaquiridónico (OH-20:4n- ω 6)**.
- 3) Y varias **lipooxigenasas (LOXs)**, que producen ácidos **hidroxieicosatetraenoicos (HETEs)**,

ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoicos (HPETEs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs) y hepoxilinas (HXs) (Fig. 3).

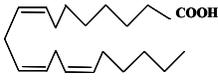
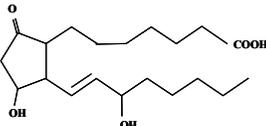
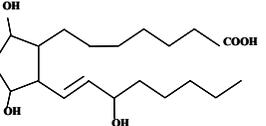
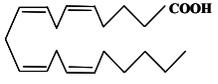
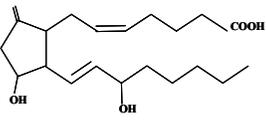
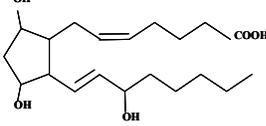
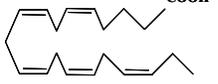
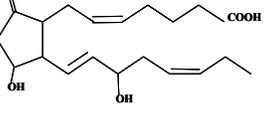
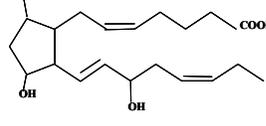
Precursor	Serie E	Serie F
 <p>Ácido dihomo-γ-linolénico 20:3n-ω6 (cis-8, 11, 14)</p>	 <p>E₁</p>	 <p>F_{1α}</p>
 <p>Ácido araquidónico 20:4n-ω6 (cis-5, 8, 11, 14)</p>	 <p>E₂</p>	 <p>F_{2α}</p>
 <p>Ácido eicosapentaenoico 20:5n-ω3 (cis-5, 8, 11, 14,17)</p>	 <p>E₃</p>	 <p>F_{3α}</p>

Fig. 2 Tres ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) precursores de eicosanoides (prostaglandinas, PGs); las series E y F se refieren al grupo hidroxilo o ceto en la posición 9; los números 1, 2 y 3 indican el número de dobles enlaces contenidos en las moléculas. El número seguido de ω , significa la posición del último doble enlace en la cadena alifática.

Además se ha reportado otro mecanismo de síntesis de eicosanoides: los isoprostanos, estos son producidos *in vivo* por la peroxidación no enzimática del 20:4n- ω 6, por un mecanismo catalizado por especies reactivas del oxígeno (ROS), dando lugar a la formación de eicosanoides fuertemente quimiotácticos. El anión superóxido (O⁻) y los radicales hidroxilo (OH[•]) son los posibles radicales activos de esta conversión (Morrow *et al.*, 1990; Rokach *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999a; Roberts *et al.*, 1999b; De Zwart *et al.*, 1999; Roberts y Morrow, 2000; Jahn *et al.*, 2008) (Fig. 4).

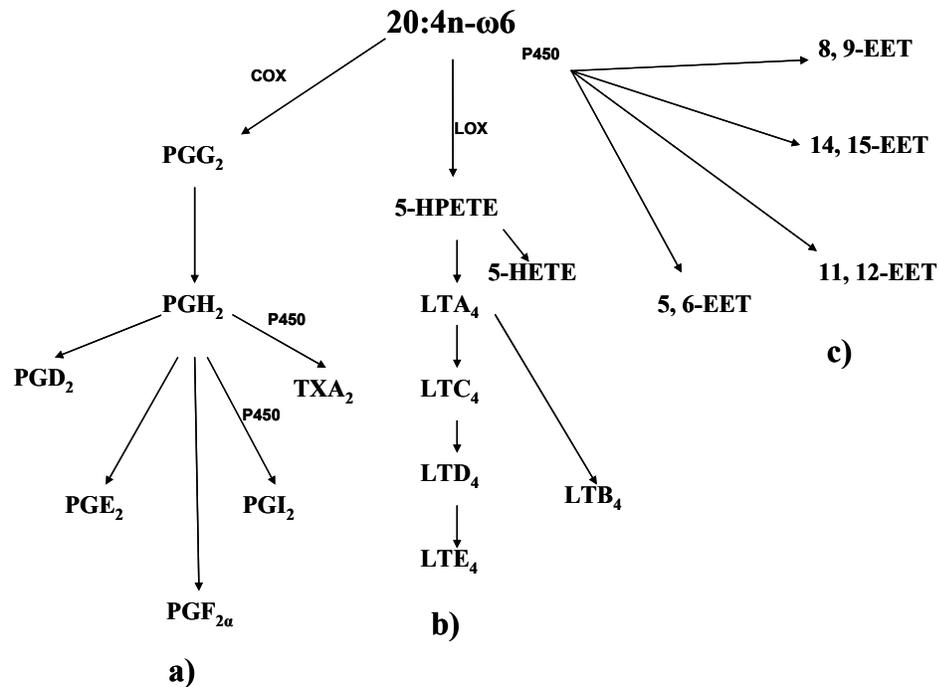


Fig. 3 Vías enzimáticas involucradas en la síntesis de eicosanoides, metabolismo primario: a) Ciclooxigenasa (COX): prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), metabolismo secundario (Citocromo P450); b) 5-lipooxigenasa (5-LOX): ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE), ácido 5-hidroxiperoxicicosatetraenoico (5-HPETE), leucotrienos (LTs) y c) citocromo P450 (P450): ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs).

Las vías biosintéticas y estructuras químicas de estos compuestos se detallan en la figura 5.

Los eicosanoides actúan de diferente modo. En algunas situaciones estimulan la contracción del músculo liso donde las PGs son la señal de inicio, en otras modulan los efectos hormonales en el riñón, donde actúan como autocoides. Las células estimuladas pueden producir PGs, las cuales son transportadas al exterior de las células, donde modulan el nivel de la estimulación a través de la interacción con receptores específicos. Las células pueden influenciar su propia actividad por la expresión de autocoides, este paso constituye uno de los últimos elementos en la regulación de eicosanoides en mamíferos (Fig. 6). Kanai *et al.* (1995), identificaron y caracterizaron un transportador para PGs a través de la célula y de las membranas epiteliales en muchos tejidos de mamíferos.

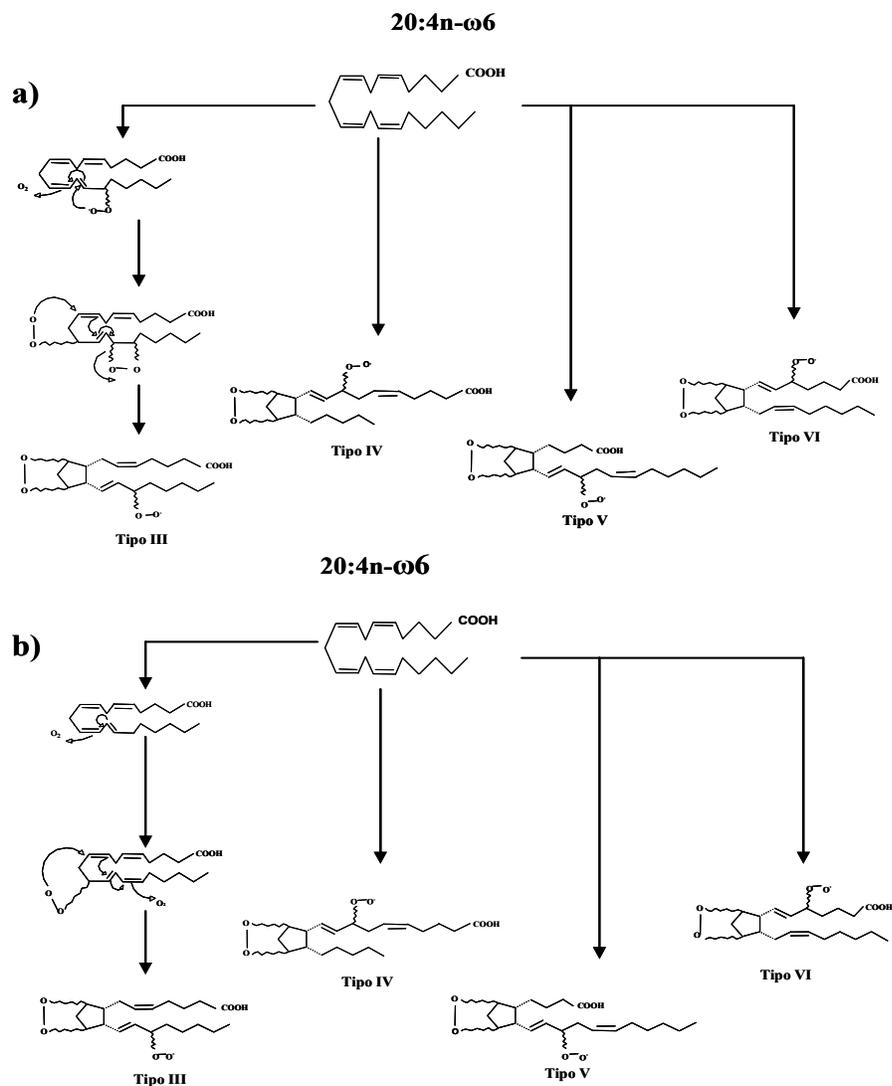


Fig. 4 Los isoprostanos se clasifican en cuatro tipos y pueden ser formados por dos mecanismos diferentes: *a) dioxetano/endoperóxido*, se presenta la formación completa del tipo III, las otras se generan de manera similar, pero la reacción ocurre en diferente posición; *b) endoperóxido*, sólo se presenta la formación del tipo III, las reacciones de los otros tres tipos son similares, pero en diferente posición (modificado de De Zwart *et al.*, 1999).

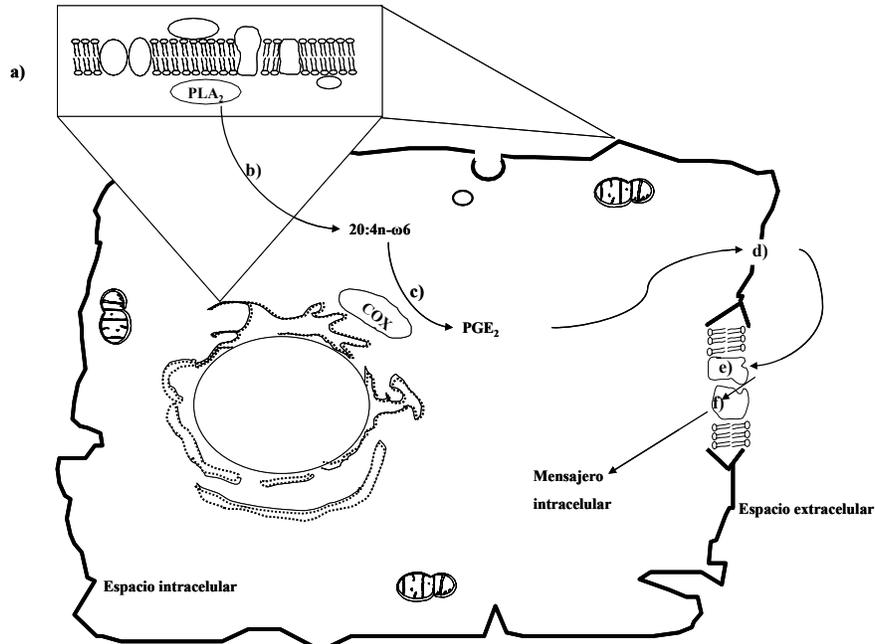


Fig. 6 Elementos que participan en la acción de autocoide de PGE_2 : a) $20:4n-\omega 6$ esterificado en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos de la membrana; b) el $20:4n-\omega 6$ es liberado por la PLA_2 ; c) el $20:4n-\omega 6$ es convertido a PGE_2 por la acción enzimática de COX y de una isomerasa específica; d) la PGE_2 sale de la célula por medio de un transportador específico; e) para ingresar de nuevo, PGE_2 necesita de un transportador que se une a una proteína G; f) la proteína G actúa como proteína efectora aumentando la concentración intracelular del segundo mensajero (modificado de Stanley-Samuelson y Pedibhotla, 1996).

Los elementos que participan en la síntesis de eicosanoides, incluyen: *a)* PUFAs de C20, precursores de los eicosanoides en los lípidos celulares (Hansen, 1989), *b)* las enzimas que liberan el sustrato de los lípidos celulares (Dennis, 1994), *c)* las enzimas oxidantes de los ácidos grasos que producen a los eicosanoides (Needleman *et al.*, 1986), y *d)* receptores para los eicosanoides y mecanismos relacionados en las señales de transducción (Smith, 1989; Smith, 1992; Negishi *et al.*, 1993).

La actividad de los eicosanoides es generalmente reconocida mediante la unión a receptores de membrana que a su vez se acoplan a las proteínas G (Smith, 1989), esto es probable para PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, TXs, y LTs (Fig. 6). Sin embargo un grupo de productos de LOXs, los HETEs son fácilmente esterificados en los fosfolípidos celulares, donde estos pueden actuar a través de los efectos de perturbación de la membrana (Spector *et al.*, 1988). Por otro lado la PGA_2 difiere de la PGE_2 y de la $PGF_{2\alpha}$ porque se localiza en la membrana nuclear e influye directamente sobre la transcripción (Holbrook *et al.*, 1992).

1.3 Fosfolipasa A₂ (PLA₂) en la biosíntesis de eicosanoides (primer paso)

Los eicosanoides pueden ser regulados por la disponibilidad del sustrato. La liberación de los ácidos grasos precursores de los eicosanoides, es comúnmente llevada al cabo por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual por definición, hidroliza el enlace éster en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos, los productos de la hidrólisis de la reacción de PLA₂ son los ácidos grasos libres y los lisofosfolípidos (Dennis, 1994; Dennis, 1997; Stanley, 2006b) (Fig. 7).

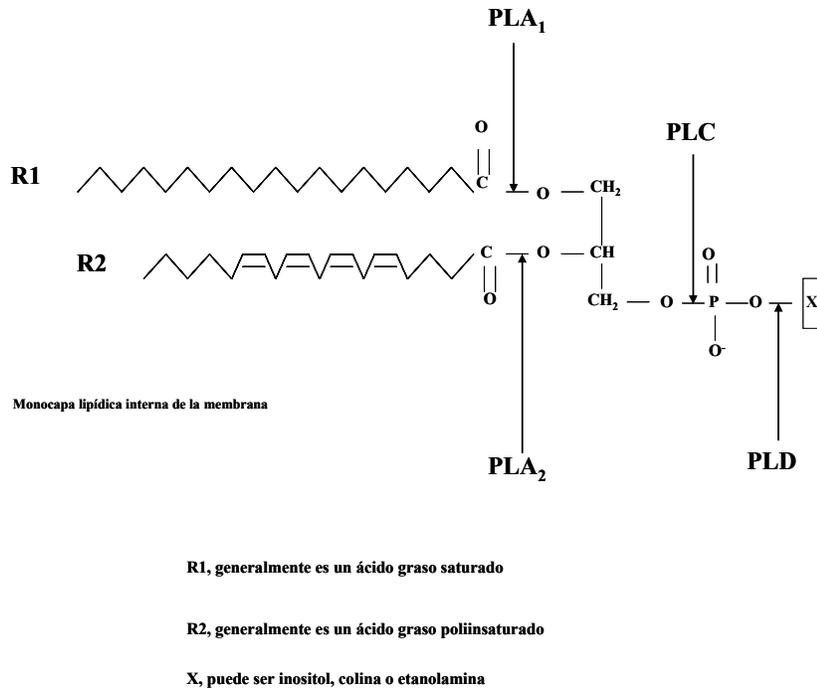


Fig. 7 Las fosfolipasas, son enzimas hidrolíticas que cortan enlaces en los fosfolípidos. La posición de los cortes identifica a las familias y generan productos únicos. PLA₁: generalmente un ácido graso saturado (R1); PLA₂: generalmente el 20:4n-ω6 + ácido lisofosfatídico (precursor del factor activador de plaquetas); PLC: cataliza la reacción fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) para generar los productos inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG); PLD: ácido fosfatídico + colina; X: puede ser inositol, colina o etanolamina.

Aunque se reconocen varios grupos de PLA₂ (Six y Dennis, 2000), éstas son agrupadas en dos grandes categorías (Stanley, 2006b): *a*) la secretora (sPLA₂) incluye enzimas de bajo peso molecular (14 kDa), proteínas estabilizadas por 5-7 puentes bisulfuro, que requieren de concentraciones mM de calcio para su actividad catalítica; son enzimas asociadas con la digestión, procesos inflamatorios y con los venenos de artrópodos y serpientes (Dennis, 1994; Dennis, 1997) y *b*) la intracelular ó citosólica (cPLA₂), incluye enzimas de alto peso molecular (85 kDa) que requieren de

concentraciones μM de calcio. Algunas cPLA₂ son específicas para fosfolípidos que contienen 20:4n- ω 6 en la posición *sn*-2 y están involucradas directamente con la biosíntesis de eicosanoides (Dennis, 1994; Dennis, 1997).

Varias enzimas presentan requerimientos de calcio que varían en su actividad catalítica, algunas PLA₂ requieren de concentraciones mM y μM de calcio, sin embargo, McIntosh *et al.* (1995), descubrieron una PLA₂ (Conodipina-M) del veneno del caracol marino, *Conus magus*, esta sPLA₂ es activada por concentraciones sub μM de calcio. Por otro lado, varias cPLA₂ son activadas por concentraciones μM de este elemento y unas pocas son independientes de él (Dennis, 1994; Dennis, 1997).

Para los insectos, las PLA₂s se clasifican en secretoria (sPLA₂) y celular (cPLA₂), debido a que no se sabe con certeza el origen y la localización celular de las PLA₂s en estos organismos (Stanley, 2006b).

La PLA₂ se encuentra en diversos organismos del reino animal, lo que indica una distribución universal, tiene importantes funciones en las señales de transducción, en la digestión de fosfolípidos, el rearreglo de los fosfolípidos de la membrana celular y en la respuesta inflamatoria (Bowman *et al.*, 1997).

En particular, la cPLA₂ es regulada por: *a*) la translocación a las membranas celulares, *b*) la fosforilación por proteínas cinasas, *c*) en otros casos, una proteína G está involucrada en la activación de PLA₂ y *d*) algunas de estas enzimas son activadas transcripcionalmente, resultando en altos niveles de PLA₂.

En un estudio con la hembra *Thermobia domestica* (Thysanura), Ragab *et al.* (1991), describieron actividad de cPLA₂ en las gónadas. Uscian y Stanley-Samuelson (1993), describieron una cPLA₂ en los cuerpos grasos de *Manduca sexta* (Lepidoptera), que es independiente de calcio. Otra cPLA₂ independiente de calcio, es la de los hemocitos, que exhibe una preferencia para los fosfolípidos que contienen 20:4n- ω 6. La actividad enzimática de las cPLA₂ fueron sensibles a los parámetros usuales determinados en las cPLA₂ de mamíferos como: *a*) concentración de la proteína, *b*) tiempo de incubación, *c*) temperatura y *d*) pH (Uscian y Stanley-Samuelson, 1993).

En ese aspecto, las enzimas son similares a las involucradas en la biosíntesis de eicosanoides en mamíferos (Dennis, 1994).

Uscian *et al.* (1992), reportaron una sPLA₂ digestiva en el intestino medio del escarabajo tigre

Cicendela circumpecta y de la mosca *Asilis sp*; éstas requieren de calcio para su actividad catalítica, las enzimas son pequeñas (22 kDa), similares a la sPLA₂ de mamíferos (14 kDa), Sauer *et al.* (1993), describieron una sPLA₂ en las glándulas salivales de la hembra del ácaro, *Amblyomma americanum*, esta enzima depende de concentraciones μM de calcio y también es similar a muchas sPLA₂ de mamíferos. También se encontró una PLA₂ digestiva en larvas y adultos del mosquito causante de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (Nor Aliza y Stanley, 1998), en cigarras *Megacricada septendecim* y *M. cassini* (Tunaz *et al.*, 1999) y en la cucaracha *Periplaneta americana* (Ali y Hetele, 1997).

La actividad de PLA₂ parece ser un paso crucial en mediar las respuestas hemolíticas (hemocitos) de defensa en los insectos que incluyen nodulación, fagocitosis, microagregación y encapsulación en caso de invasores mayores (Miller *et al.*, 1994; Lavine y Strand, 2002; Stanley y Miller, 2006). Stanley-Samuelson *et al.* (1991), reportaron que la inhibición de la actividad de la PLA₂ en larvas de *M. sexta*, reduce la capacidad de la hemolinfa para combatir las infecciones bacterianas. Por su parte, Merchant *et al.*, 2008, señala que el efecto inhibitorio es revertido al tratar a las larvas con 20:4n- ω 6 exógeno. Resultados similares se encontraron en el escarabajo tenebrio *Zophobas atratus* (Miller *et al.*, 1996) y en el mosquito *Anopheles albimanus* (García Gil de Muñoz *et al.*, 2008) (Fig. 8).



Fig. 8 Los insectos responden a las infecciones formando nódulos. La nodulación inicia cuando los hemocitos (segregan gránulos) atrapan a los agentes patógenos. Los hemocitos liberan químicos inflamatorios y ROS, el proceso se complementa cuando se anclan los fagocitos, formando una capa aplanada al nódulo maduro que posteriormente se melaniza, (de esta manera son visibles en las paredes internas del cuerpo de los insectos) y posteriormente son eliminados.

Tomado de <http://www.bios.niu.edu/miller/nodules.jpg>

1.4 Ciclooxygenasa (COX) en la biosíntesis de eicosanoides (segundo paso)

Las PGs son ácidos carboxílicos con un anillo de cinco carbonos variablemente sustituido en el C-9 y C-11 y dos cadenas alifáticas con una sustitución en el carbono C-15 con uno, dos o tres dobles enlaces (Fig. 1).

El mecanismo de síntesis de las PGs en mamíferos y en muchos invertebrados es similar. La ruta para la síntesis de las PGs involucra a la enzima PGH sintetasa, conocida también como COX, es una proteína glicosilada asociada a la membrana, tiene un peso molecular de 72 kDa, contiene un grupo hemo y presenta dos actividades enzimáticas: *a*) como ciclooxygenasa, que cataliza la formación de PGG₂ a partir del 20:4n-ω6 y *b*) como hidroxiperoxidasa, la cual cataliza la reducción de PGG₂ a PGH₂ (Smith *et al.*, 1991).

Se ha reportado que la actividad de hidroxiperoxidasa de COX utiliza sustratos reducidos como las aminas aromáticas para regresar a su estado nativo, lo que tiene como consecuencia indirecta la activación de mutagénos (Gurr y Harwood, 1991; Herschman, 1994; Honn *et al.*, 1994; Williams y DuBois, 1996).

La ruta de síntesis de las PGs ocurre en el retículo endoplásmico en tres estadios: 1) liberación del 20:4n-ω6 de los fosfolípidos de la membrana mediante PLA₂, 2) oxigenación del 20:4n-ω6 para producir PGG₂ y posteriormente una PGH₂ endoperóxido que es precursora de otras PGs y, dependiendo de las enzimas presentes en la célula, 3) la conversión de PGH₂ a otros prostanoides (Christ-Hazelhof y Nugteren, 1982; Moonen *et al.*, 1982; Negishi *et al.*, 1985; Halushka *et al.*, 1989; Halushka *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 1995; Tanabe y Ullrich, 1995).

En el estadio 1, la liberación del 20:4n-ω6 ocurre como resultado de estímulos específicos (hormonas como la bradiquina, epinefrina y proteasas como las trombinas) o por estímulos inespecíficos (agentes genotóxicos y por especies reactivas del oxígeno) (Kudo, 1991; Gurr y Harwood, 1991). En el estadio 2, el 20:4n-ω6 libre es sustrato de COX en su función de ciclooxygenasa, la que es asociada a una protoporfirina IX, que introduce dos moléculas de O₂, una para formar el anillo y otra para formar un grupo hidroxiperoxi en el C15. La actividad de peroxidasa involucra la reducción de un par de electrones del peróxido, para generar PGH₂, con un grupo hidroxilo en el C15; este paso requiere de triptofano, el cual puede ser reemplazado por compuestos, como el guayacol, hidroquinona o fenol (Van der Ouderaa *et al.*, 1977). En el estadio 3 otras enzimas específicas convierten PGH₂ en otras PGs y TXA₂ (Mathews y Van Holde, 1990; Gurr

y Harwood, 1991; Smith, 1992; Herschman, 1994) (Fig. 5).

La COX es inactivada antes de que todo el sustrato sea convertido al producto. Esto es referido como inactivación “suicida”, y es considerado una propiedad intrínseca de la enzima. La COX es inactivada después de 1300-1400 operaciones catalíticas (Smith *et al.*, 1991; Smith y Marnett, 1991). El paso suicida es una característica de la ciclooxigenasa, porque la actividad de peroxidasa continúa después de que la actividad de ciclooxigenasa se ha desvanecido.

En mamíferos, se han reportado dos formas de COX. Por un lado, COX-1 es la responsable de la biosíntesis de PGs activas en la homeostasis de la fisiología normal. Esta enzima se encuentra en muchos tejidos y es expresada constitutivamente, y actúa a nivel extracelular al interactuar con receptores unidos a proteínas G, localizados en la superficie exterior de las células. La COX-1 libera a PGH₂ dentro del citoplasma, donde es convertida por otras enzimas a otras PGs biológicamente activas; las especies activas que existen en la célula, son asistidas por un transportador (Kanai *et al.*, 1995). Por otro lado, Otto y Smith (1995) descubrieron una enzima diferente a la cual llamaron COX-2, esta enzima produce PGs durante procesos inflamatorios, ovulación y mitogénesis. En contraste a la COX-1, esta isozima no es expresada en muchas células de mamíferos (Smith *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000), sin embargo, puede ser rápidamente inducida en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y folículos ováricos. La COX-2 es inducible y su expresión es de 10 a 18 veces más rápida por agentes proinflamatorios o mitógenos, tales como citocinas y los esteroides de forbol (Fig. 10). La COX-2 está asociada principalmente con la superficie luminal de las membranas nucleares. Puede liberar PGH₂ dentro del núcleo, para ser convertidas a otras PGs, que puedan interactuar con proteínas nucleares e influir en la expresión de genes. Ambas ciclooxigenasas, pueden representar dos pozas independientes de enzimas activas en la misma célula, cada una con funciones biológicas separadas (Otto y Smith, 1995).

Stanley-Samuels, (1994a) detectó la presencia de prostanooides en preparaciones *in vitro* de tejidos de insectos como: grillos (*Acheta domesticus* y de *Teleogryllus. commodus*, *Teleogryllus. ni*), gusano de seda (*Bombyx mori*), langosta (*Locusta migratoria*), mosca doméstica (*Musca domestica*), cucaracha (*P. americana*), mosquito (*A. egypti*), escarabajos (*Tenebrio molitor* y *Z. atratus*), gusano cornudo del tabaco (*M. sexta*) y la mosca de la fruta (*D. melanogaster*).

Mientras que los mecanismos que controlan la localización intracelular de COX en insectos permanecen desconocidos (Ren *et al.*, 1995), en mamíferos se ha determinado que COX está

asociada directamente con el retículo endoplásmico (Otto y Smith, 1995) y siempre se le ha encontrado en fracciones microsomales de homogenados celulares, mientras que COX obtenida de invertebrados, tiene una distribución menos específica (Stanley-Samuelson y Loher, 1986).

En hemocitos del gusano cornudo del tabaco (*M. sexta*), Gadelhak *et al.* (1995) recobraron actividad de PGs en fracciones mitocondriales (5%), microsomales (58%) y en solubles (37%). Similarmente, Pedibhotla *et al.* (1995), en preparaciones de tejidos internos del ácaro, *A. americanum*, detectaron actividad en fracciones microsomales (31%) y citosólicas (69%). A partir de lo anterior se sugiere, que las PGs de ciertos artrópodos (incluyendo insectos) son similares a las de mamíferos.

En otros estudios sobre la biosíntesis de PGs en insectos, se utilizaron cofactores que son necesarios en la biosíntesis de PGs en mamíferos. En preparaciones de los cuerpos grasos de *M. sexta*, Stanley-Samuelson y Ogg (1994), recobraron síntesis de PGs en presencia de glutatión reducido (2.4 mM), hidroquinona (0.25 mM) y hemoglobina (25 µg) de mamífero, pero no en ausencia de éstos. El significado bioquímico de estos estudios implica que estas enzimas son similares a la de mamíferos. Se puede suponer que la biosíntesis de PGs de insectos puede requerir también de estos cofactores (Stanley-Samuelson y Pedibhotla, 1996).

1.5 Vía Lipooxigenasa (LOX) en la biosíntesis de eicosanoides

Otra vía metabólica del 20:4n-ω6, involucra a las LOXs, de las cuales se han determinado seis principales: 5-, 8-, 9-, 11-, 12- y 15-LOX. Cada LOX es nombrada de acuerdo al carbón que oxigenan (Gurr y Harwood, 1991). Sin embargo, algunas LOXs tienen actividades posicionales duales o múltiples (Kuhn y Thiele, 1995) (Fig. 5).

Los productos de las LOXs son rápidamente utilizados en varios sistemas biológicos, los cuales forman otros productos biológicamente activos. Uno de éstos, el 5-HPETE, sirve de sustrato para la biosíntesis de LTs. En mamíferos, los LTs son mediadores inflamatorios en las reacciones de defensa, activan a los leucocitos polimorfonucleares, las células mieloides y los mastocitos. (Meters, 1995) (Fig. 5).

En mamíferos, el LTA₄ puede ser biotransformado a cistenil leucotrienos, también denominados peptidoleucotrienos. Los cistenil leucotrienos, son conocidos como sustancias de reacción lenta de la anafilaxia (Samuelsson, 1983). La principal acción biológica de estos compuestos está implicada con la contracción del músculo liso y se asocia con los sistemas vascular, respiratorio y con el tracto

digestivo de los mamíferos. Los LTs pueden actuar reduciendo la contractilidad del miocardio, el control de secreción de ácidos gástricos, en los bronquiospasmos y en muchos procesos inflamatorios involucrados con el asma (Tan y Spector, 1997). Estas acciones son mediadas a través de receptores específicos de los cuales se conocen dos tipos (Meters, 1995).

Otro grupo de productos de la vía de las LOXs son las hepoxilinas (HXs) (Pace-Asciak y Martin, 1984; Pace-Asciak y Asotra, 1989). Uno de los productos de la 12-LOX, el 12-HPETE es el precursor directo de las HXs. Las HXs son rearrreglos de 12-HPETE, en el cual el hidroperoxi es convertido en epóxido y a un grupo hidroxilo. Serhan (1994), identificó una nueva familia de productos de las LOXs conocidas como lipoxinas (LXs). Las LXs ejercen potentes acciones biológicas en la microcirculación de los vertebrados. Son dos principales: LXA₄ y LXB₄ algunas veces ejercen efectos opuestos, una en la vasoconstricción y la otra en la vasodilatación; estos eicosanoides también estimulan la remodelación de lípidos en los leucocitos polimorfonucleares.

Los LTs y otros productos de las LOXs, han sido poco estudiados en insectos. Por ejemplo, Medeiros *et al.* (2004), descubrieron que productos provenientes de las LOX, como LTB₄ participan en el control de la endocitosis de proteínas de la yema de los ovocitos, al modular los niveles de cAMP en la chinche *Rhodnius prolixus*.

1.6 Citocromo P450 (P450) en la biosíntesis de eicosanoides

El papel del P450 en el metabolismo primario del 20:4n- ω 6 y secundario de los productos de oxidación (incluyendo la vía LOXs, COX y los productos PGs, LTs, HXs, ácidos hidroxipoliénicos y otras oxilipinas) son de gran interés. El sistema dependiente de P450 cataliza la biotransformación del 20:4n- ω 6 y de sus metabolitos a varios derivados oxidados que incluyen a los EETs y HETEs (Ivanov *et al.*, 1999).

Diversos estudios reportados por Ivanov *et al.* (1999) confirman un mecanismo radical de la oxidación por P450. Este incluye dos estadios: abstracción de un átomo de hidrógeno (o electrón) del sustrato y la adición de un átomo de oxígeno (recombinación radical).

El P450 cataliza las reacciones de oxidación, por lo cual requiere de la presencia de un cofactor y de oxígeno, comúnmente, el NADPH es el cofactor y la molécula de oxígeno es aportada por el iodosilbenceno o por el hidropéroxido (Ivanov *et al.*, 1999).

Los hidropéroxidos formados por la oxidación del 20:4n- ω 6 vía LOXs y COX también son sustratos

del P450, el cual homolíticamente y heterolíticamente une los enlaces oxígeno-oxígeno del peróxido. Esta reacción también es llamada "peróxido isomerasa" del P450, y es de gran interés en la bioquímica de los eicosanoides, considerando el mecanismo radical que cataliza el rearrreglo de la endoperóxido de PGH₂ a TXA₂ y PGI₂ (Ivanov *et al.*, 1999) (Fig. 3).

Los análisis de los productos del metabolismo del 20:4n-ω6 dependiente del P450, indican que cataliza tres tipos de reacciones enzimáticas: 1) *Epoxidación* del 20:4n-ω6, la cual resulta en la región estereo isomérica 5-6, 8-9, 11-12, y 14-15-EETs, productos que son hidrolizados a sus correspondientes ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DiHETEs), por una epóxido hidrolasa, 2) *Oxidación* alil y bis-alil, para formar ácidos monohidroxieicosatetraenoicos. El P450 cataliza la generación de isómeros 7-, 10-, 13-, 5-, 8-, 9-, 11-, 12- y 15-HETEs, sin una estereo especificidad detectable y 3) *Hidroxilación* en varias posiciones del 20:4n-ω6, generando ácidos monohidroxieicosatetraenoicos 16-, 17-, 18-, 19- y 20-OH- 20:4n-ω6 (Fig. 5).

Los eicosanoides formados a partir del P450 tienen actividades biológicas como la vasodilatación, vaso constricción renal, en el transporte de iones y en la liberación de péptidos hormonales (somatostatina, leuteinizante, crecimiento, vasopresina, prolactina, insulina y glucagón) (Capdevila *et al.*, 1995).

1.7 Factores que influyen en la liberación del 20:4n-ω6

También el 20:4n-ω6, puede estar relacionado con otros mecanismos para su liberación: Vía fosfolipasa C (PLC) y diacilglicerol lipasa que incrementan el calcio intracelular, éste a su vez incrementa la actividad de PLA₂ (Zenser y Davis, 1992) (Fig. 9).

Otros factores pueden liberar el 20:4n-ω6, por inducir la expresión de PLA₂ y COX, y se dividen en dos categorías: *a*) factores específicos, que son estímulos fisiológicos ante los cuales se libera 20:4n-ω6 de la posición *sn-2* estos pueden ser hormonales (angiotensina, bradiquinina, epinefrina) o proteicos (trombina, complejo Ag-Ac) y *b*) factores inespecíficos, que se producen en condiciones patológicas ante las cuales se observa aumento de 20:4n-ω6 libre (daño mecánico, isquemia, venenos activos sobre membranas, mutágenos, promotores de tumores como el 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), radicales libres y algunos ionóforos de calcio) (Companioni, 1995).

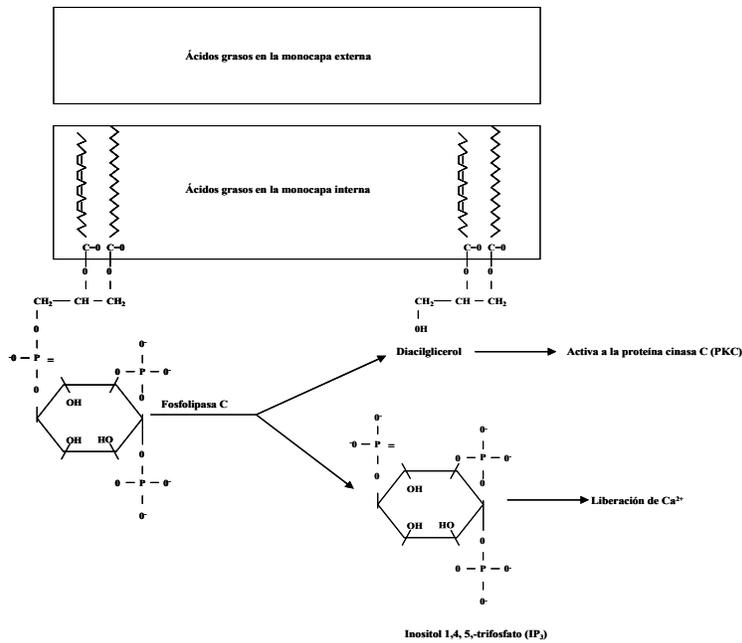


Fig. 9 Relación del 20:4n- ω 6 con otras vías que participan en las señales de transducción (segundos mensajeros).

El TPA, es un éster de forbol que produce la liberación del 20:4n- ω 6 por inducir la expresión y la actividad de PLA₂ (Levine y Hassid, 1977; Li-Stiles, *et al.*, 1995; Li-Stiles, *et al.*, 1997; Gijón y Leslie, 1999; Gijón, *et al.*, 1999), además puede inducir la expresión de COX-2 (forma inducible) que posteriormente puede transformar al 20:4n- ω 6 libre para producir prostanoïdes (Sánchez y Moreno, 1999) (Fig. 10).

En linfocitos humanos se ha establecido que la actividad clastogénica del TPA es causada por un compuesto de bajo peso molecular al cual se le ha denominado factor clastogénico (CF). El CF provoca aberraciones cromosómicas y SCE en varios tipos celulares no expuestos directamente al TPA (Emerit y Cerruti, 1982).

1.8 Especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo del 20:4n- ω 6

En los organismos se generan especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como producto de la reducción parcial del oxígeno molecular, las cuales participan en la fisiopatología de múltiples enfermedades. Entre los sistemas generadores de ROS se encuentra la xantina oxidasa que produce radicales súper óxido (O⁻) y el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) como productos de su acción catalítica. La actividad de la xantina oxidasa se ve incrementada una vez comenzado el daño celular

y tiene relación con el daño endotelial, pues se ha comprobado que esta enzima es la fuente principal de ROS en dicho tejido. En el tejido dañado los leucocitos polimorfonucleares activan la producción de ROS a través de la enzima NADPH oxidasa asociada a la membrana. Este mecanismo aún no está esclarecido, pero se ha planteado que podría estar relacionado con la síntesis de metabolitos del 20:4n- ω 6 y de otras moléculas que median la migración y adhesión de leucocitos polimorfonucleares al endotelio vascular. De esta forma, los polimorfonucleares y el endotelio activado, además de generar ROS, producen derivados proinflamatorios como los LTs y las PGs derivados del 20:4n- ω 6, el factor activador de plaquetas y las interleucinas. Las ROS producen a su vez la peroxidación de los lípidos de membrana, paso que es determinante en el mecanismo de daño endotelial y al DNA. Así mismo producen modificaciones de las proteínas (enzimas, receptores, formadoras de canales) asociadas a estos lípidos, lo que provoca trastornos de los sistemas de transporte, con aumento de permeabilidad para algunos elementos que, como el calcio, producen la activación de PLA₂ (Companioni, 1995).

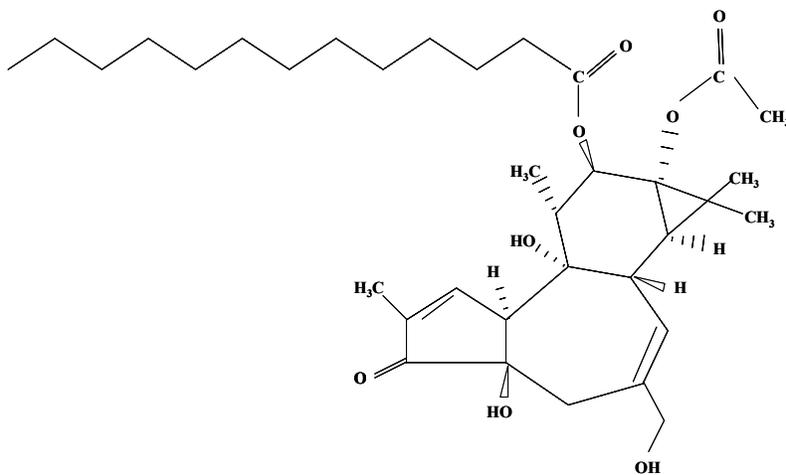


Fig. 10 TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato), inductor de PLA₂ y COX-2.

Existen reacciones del metabolismo del 20:4n- ω 6 que también generan aún más radicales libres por ejemplo, los neutrófilos humanos responden a la administración de lipoxinas formando el O-. Así como en la acción de la COX y las LOXs se producen radicales libres, todo lo anterior conduce a que el daño se incremente durante los eventos isquémicos y por la administración de xenobióticos (Companioni, 1995). En roedores, el TPA induce respuestas inflamatorias en la piel, que incluyen el desarrollo de edema, hiperplasia, inducción de citocinas y enzimas que incrementan la actividad y expresión de la ornitina carboxilasa (ODC), COX-2 y potencian la liberación de ROS

(Murakami *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002).

La COX-2 es indetectable en muchos tejidos sin daño y es transitoriamente inducida por citocinas, factores de crecimiento, oncogenes y por TPA (Prescott y Fitzpatrick, 2000). La sobre expresión de la COX-2 inhibe la apoptosis e incrementa la proliferación, invasión y metástasis de células malignas (Tsuji *et al.*, 1997). Por lo tanto, la supresión de la inducción y la actividad de la ODC y la COX-2 es un paradigma para prevenir la carcinogénesis en distintos órganos (Park *et al.*, 2008).

1.9 Inhibidores de las enzimas participantes en el metabolismo del 20:4n- ω 6

Los inhibidores de PLA₂ (primer paso), tales como los glucocorticoides (GCC) (cortisona, COR) (Fig. 11), inhiben la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de eicosanoides, como sPLA₂ y cPLA₂, al inducir la expresión de proteínas llamadas lipocortinas (también conocidas como anexinas) (Raz *et al.*, 1989; Marnett, 1992; Goppelt-Struebe, 1997; Dennis, 1997; Buckingham y Flower, 1997; Hirose *et al.*, 2007).

Por otro lado, también se ha reportado que la COX-2 (segundo paso) es un blanco potencial de los GCC ya que inhiben la síntesis de prostanoides (Goppelt-Struebe, 1997; Sánchez y Moreno, 1999; Smoak y Cidlowski, 2004; Samuelsson *et al.*, 2007).

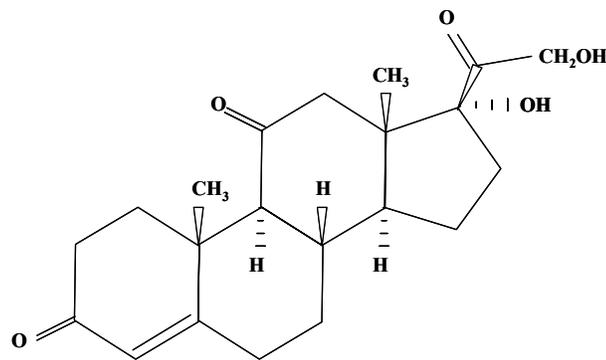


Fig. 11 COR (Cortisona) antiinflamatorio esteroidal (glucocorticoide), inhibidor de PLA₂ y COX-2.

Se conocen además otros compuestos que intervienen en la inhibición de la COX, tales como las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs) (aspirina, ibuprofeno, indometacina, paracetamol, naproxeno y piroxicam, entre otros) y ciertos antioxidantes que son inhibidores efectivos de la

mutagénesis (Day, 1988; Dinarello, 1989; Marnett, 1992).

Otra vía del metabolismo del 20:4n- ω 6 asociado con la mutagénesis y carcinogénesis es el bloqueo de las LOXs que es observado durante la inflamación. Esto sugiere que los productos inmediatos de la actividad las LOXs, los HPETEs y sus precursores HETEs, son casi tan importantes en la promoción de tumores como las PGs.

Compuestos que inhiben la actividad de las LOXs, tales como la vitamina E, la esculetina, y aquellos que son donadores estables de un electrón (curcumina, flavonoides y el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA)), inhiben competitivamente la producción de ROS, y están involucrados en la promoción de tumores en piel de ratón (Zenser y Davis, 1992) (Fig. 12).

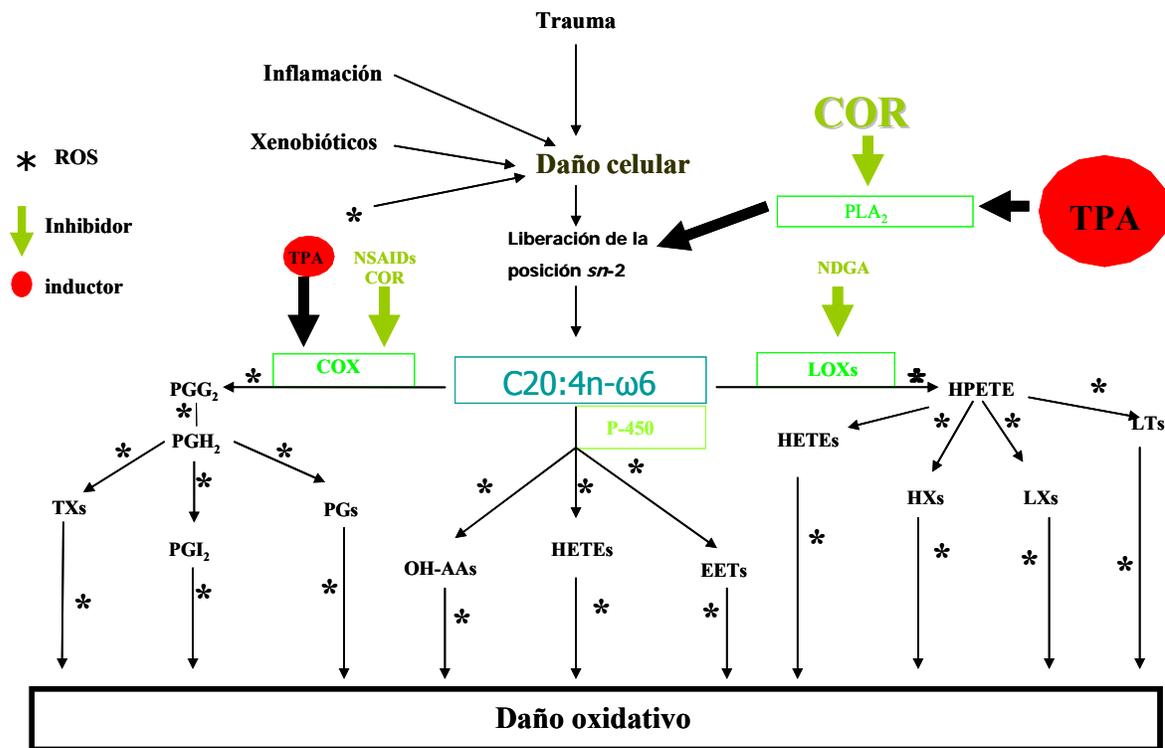


Fig. 12 Metabolismo del 20:4n- ω 6, su inducción (generación de ROS) e inhibición por diferentes agentes.

Así, el metabolismo del 20:4n- ω 6 puede ser importante en la inducción de genotoxicidad ya que en éste las ROS y otros reactivos eletrofilicos pueden formar aductos que se asocian con el rompimiento de la cadena del DNA. Estos procesos pueden ser detenido en varios niveles por:

- la inhibición de la PLA₂;
- la formación de PGG₂ como vía de inhibición de la COX;
- la inhibición de la actividad de peroxidasa;
- la inhibición de las LOXs;
- la prevención de la

formación de reactivos intermediarios y f) el bloqueo de reactivos intermediarios (P. Ej. conjugación GSH) (Raz *et al.*, 1989; Marnett, 1992).

Se considera que los productos del 20:4n- ω 6, especialmente las PGs que actúan como segundos mensajeros están involucrados en las señales de transducción (Smith, 1989; Zenser y Davis, 1992; Earnest *et al.*, 1992), las cuales a su vez están implicadas en la promoción y progresión de tumores. Así, la inhibición del metabolismo del 20:4n- ω 6 puede participar en el control de la mutagénesis y de la carcinogénesis (Goodwin *et al.*, 1977; Goodwin *et al.*, 1978; Marnett, 1992).

En síntesis, los metabolitos del 20:4n- ω 6 participan activamente en el desarrollo del proceso inflamatorio, su acción es a nivel celular y está mediada por la participación de ROS, tanto en la liberación del 20:4n- ω 6, como en la producción de mayor cantidad de especies reactivas, todo lo cual amplifica el daño al DNA (Fig. 12).

1.10 *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba.

Drosophila ha sido empleada durante muchos años en genética básica. Es un organismo modelo con ventajas para la investigación experimental: es prolífico, se mantiene en espacios reducidos, la elaboración del medio de cultivo es económico, el ciclo de vida es relativamente corto (aproximadamente 10 a 25 °C), permite verificar la presencia de daño genético *in vivo* en periodos cortos, también detecta químicos promutágenos y/o procarcinógenos ya que posee un complejo enzimático (P450) cuya acción es muy similar a la fracción S9 de hígado de mamíferos que permite la activación o inactivación de xenobióticos (Rodríguez-Arnaiz y Ramos-Morales, 1992).

Drosophila, ha desempeñado una función dual en el campo de la genética toxicológica: a) para pruebas de corto plazo para identificar carcinógenos y b) como modelo para el estudio de los mecanismos de mutagénesis inducidos por agentes químicos. En este organismo pueden analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas, tanto en células somáticas como en germinales. Hasta finales de los 90s, se habían estudiado entre 700-750 compuestos utilizando la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL, por sus siglas en inglés). Tiene una alta especificidad, cercana a 1, sin embargo, una desventaja de este sistema experimental es su baja sensibilidad (0.27-0.79) para genotóxicos de mamíferos. Así, mientras que una respuesta negativa en *Drosophila* provee pequeña evidencia para genotoxicidad, una respuesta positiva provee una buena evidencia de que el químico es mutágeno y probablemente también podría ser carcinogénico en mamíferos (Vogel *et al.*, 1999).

Se han desarrollado otros ensayos utilizando células somáticas que evalúan esencialmente los mismos eventos genéticos terminales pero en menor tiempo. Dos de estas pruebas han sido empleadas para evaluar todas las clases de genotóxicos químicos: la prueba de manchas en las alas *flr³/mwh* (anexo 1) con más de 400 químicos y la prueba de manchas en los ojos *white/white⁺* con cerca de 220 químicos. De 24 carcinógenos que fueron negativos o no concluyentes en el ensayo SLRL, 22 fueron positivos en uno o en ambos sistemas somáticos. Su mejor rendimiento en comparación con los ensayos de línea germinal es fundamental debido a su bajo costo (no más del 5 al 10 % de lo que se necesita para el ensayo SLRL), permitiendo el uso de concentraciones múltiples y protocolos, así como el uso de distintas líneas con heterogeneidad para la activación de carcinógenos, además que los resultados se obtienen en la primera generación (Vogel *et al.*, 1999).

1.11 Prueba de mutación y recombinación somáticas.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (**Somatic Mutation And Recombination Test, SMART**) también conocida como prueba de manchas en las alas, es una metodología que se basa en el desarrollo de *Drosophila*, de manera que la inducción de alteraciones en la información genética de las células de los discos imagales durante el desarrollo se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas derivadas de la célula madre mutante, constituyendo así un clon celular que se expresará en el cuerpo de la mosca adulta como una mancha mutante distinguible, cuando se utilizan marcadores fenotípicos apropiados (Baker *et al.*, 1978; Graf *et al.*, 1984; Vogel y Zijlstra, 1987). Para una descripción detallada de la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila*, consultar el anexo 1.

1.12. Justificación

En investigaciones realizadas en varios laboratorios del mundo que emplean a *Drosophila* como sistema de prueba para evaluar xenobióticos con potencial genotóxico, se han enfocado con más atención a los mecanismos de activación y desintoxicación (enzimas de fase I y II), pero también pueden estar presentes otras vías que han sido poco estudiadas, como la inducción de la ornitina descarboxilasa (OCD), de la proteína cinasa C (PKC) y del metabolismo del ácido araquidónico (20:4n-ω6) que participa también en la inducción de genotoxicidad en otros modelos biológicos. En esta investigación, se estudió si el metabolismo del 20:4n-ω6 (inducción e inhibición) participa en la frecuencia de mutación y recombinación somática obtenida en las alas de *Drosophila*.

2. OBJETIVO GENERAL

Relacionar el metabolismo del ácido araquidónico (20:4n-ω6) con la respuesta genotóxica en el sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.

2.1 Objetivos particulares

- 1) Obtener los lípidos de larvas tipo silvestre de tercer estadio mediante la técnica de Folch *et al.*, 1957.
- 2) Obtener, cuantificar y determinar el porcentaje de 20:4n-ω6 en larvas de tipo silvestre de tercer estadio mediante cromatografía de gases.
- 3) Comparar el contenido de 20:4n-ω6 en larvas portadoras de marcadores para la inducción de mutación y recombinación somáticas con respecto a las larvas del tipo silvestre.
- 4) Determinar el contenido de 20:4n-ω6, en larvas tratadas con COR y con TPA conforme al objetivo 2.
- 5) Determinar el contenido de 20:4n-ω6, en larvas expuestas a los tratamientos mezcla

(TPA + COR) y secuencial (TPA - COR) conforme al objetivo 2.

- 6) Determinar la inducción de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila* en los tratamientos: TPA, COR, mezcla (TPA + COR) y secuencial (TPA - COR).

2.2. Hipótesis

El 20:4n- ω 6 está relacionado con la respuesta de genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*, por lo que la administración de compuestos que interfieran con las enzimas que participan en el metabolismo del 20:4n- ω 6, modificará la frecuencia de mutación de los organismos expuestos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Compuestos Químicos

12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) [CAS 16561-29-8], Cortisona (COR) [CAS 53-06-5], Metanol [CAS 67-56-1], Cloroformo [CAS 67-66-3], Etanol (EtOH) [64-17-5] de Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. México); Dimetil Sulfóxido (DMSO) [CAS 67-68-5], Sacarosa [CAS 57-50-1] de Baker (J.T. Baker Mallinckrodt Baker S.A. de C.V. México); Celulosa microcristalina de Merck (Merck, D-6100 Darmstadt, Germany). Todos los demás compuestos utilizados en esta investigación fueron de grado reactivo analítico (Sigma).

3.2. Líneas, cruzas y medio de Cultivo utilizado en la prueba mutación y recombinación somáticas (SMART) de *Drosophila*

Se utilizaron las siguientes líneas de *Drosophila*, con marcadores genéticos en el brazo izquierdo del cromosoma 3:

- 1) Hembras *flr*³, el marcador *flr*³ produce tricomas en forma de flama (flare).
- 2) Machos *mwh*, el marcador *mwh*, produce tricomas múltiples (multiple wing hairs) (de 2 a 14 ó más) por célula, comparado con uno por célula en las moscas de tipo silvestre (Lindsley y Grell, 1968; García Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1992). Anexo 1.

Las líneas fueron mantenidas a 25 °C y una humedad relativa al 70 % en frascos con medio de cultivo (compuesto por 10 gr de agar-agar, 72.5 gr de levadura de cerveza, 135 gr de sacarosa y 105.5 gr de harina de maíz por 1000 ml de agua).

La cruce estándar se realizó con hembras vírgenes *flr*³/*TM3*, *Bd*⁸ (abreviado) de 72 h de edad y machos *mwh/mwh* de 48 h para obtener larvas de 72 ± 1 h. Anexo 1.

3.3. Procedimiento Experimental

Con base en el estándar de la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila* y para la caracterización de los ácidos grasos, la edad larvaria propicia para la realización de los tratamientos es alrededor de las 72 h (tercer estadio), porque en esta edad las larvas son de mayor tamaño y debido a la naturaleza de los tratamientos se pueden manejar gentilmente. Se ha mostrado que el metabolismo de la larva de tercer estadio y del adulto son similares (Clark, 1982; Hällström,

1987).

El procedimiento experimental siguió las guías metodológicas descritas por Graf *et al.* (1984). Para obtener larvas de edad similar (72 ± 1 h), los progenitores se transfirieron por 2 h a frascos con medio de cultivo fresco (enriquecido con una gota de levadura fresca para inducir la puesta de huevos). A los tres días se colectaron las larvas de acuerdo con el procedimiento de Nöthinger (1970) y se colocaron en grupos de entre 100 y 150 individuos en tubos de vidrio (2 cm de diámetro y 10 cm de alto) que tenían una gasa nylon en un extremo y un tapón de hule espuma en el otro, posteriormente cada tubo se introdujo en un vaso de precipitado de 10 ml que contenía 0.04 g de celulosa microcristalina y 0.3 ml de la solución a tratar por 1 h. Transcurrida la exposición, los tubos de vidrio se retiraron del vaso y las larvas se enjuagaron con agua corriente. Las larvas de la mitad de los tubos de la misma concentración se colocaron en frascos con medio fresco para que continuaran su desarrollo y la otra mitad se mantuvo en congelación en nitrógeno líquido para los análisis de cromatografía de gases (GC).

Para determinar las concentraciones de TPA (inductor dual de PLA₂ y COX) y de COR (inhibidor dual de PLA₂ y COX), se hizo una búsqueda de las concentraciones que se pudieran emplear en diferentes artículos científicos, además de que se probaron un rango de concentraciones en estudios preliminares.

Las larvas fueron expuestas por 1 h al TPA [0.275-0.555 mM], ó a la COR [0.56-0.5.6] separadamente. Para la siguiente etapa de la investigación se eligieron las concentraciones: 0.55 mM de TPA (se obtiene la mayor frecuencia de mutación) y 1.4 y 2.8 mM de COR (no es genotóxica, inclusive la frecuencia es menor que la mutación espontánea). Para el tratamiento mezcla, 0.15 ml de TPA [1.10 mM] se mezclaron con 0.15 de COR [2.8 o 5.6 mM] para tener una concentración final de 0.55 mM de TPA y de 1.4 o 2.8 mM de COR con las cuales se trataron a las larvas (mezcla, 72 X 1 h). Para comparar el efecto de la mezcla de compuestos, se utilizó el tratamiento secuencial en el cual las larvas fueron expuestas, primero por 1 h al TPA y después 1 h con COR (72 X 1 X 1 h). Transcurrido el tiempo de los tratamientos, las larvas se procesaron como se indicó anteriormente. Para cada lote, se realizó un experimento y tres repeticiones.

3.4. Toxicidad de los tratamientos

El índice de sobrevivencia (IS) es un parámetro que indica si los tratamientos resultaron tóxicos para *Drosophila*. Este índice, está representado como la relación entre el número de moscas adultas

recuperadas en cada tratamiento, entre el número de moscas de los lotes testigos concurrentes, siendo de 1 para estos últimos.

3.5. Análisis de las alas

Las moscas recuperadas se sacrificaron por exceso de anestesia (éter dietílico) y se fijaron con EtOH al 70 %. Las alas se separaron y se montaron en portaobjetos utilizando solución Fauré (Graf *et al.*, 1984). Se analizó cada ala con un microscopio óptico (Nikon, YS100, Japón) a un aumento de 40X. Se registró cada mancha y se agruparon en tres diferentes categorías: 1) manchas chicas sencillas (una o dos células), 2) manchas grandes sencillas (tres o más células), 3) manchas gemelas (con los dos marcadores) y 4) la suma de todas las manchas (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984).

3.6. Extracción de lípidos

Los lípidos fueron extraídos por el procedimiento de Folch *et al.* (1957), que en breve, consiste en homogenizar 500 mg de larvas (Pirex, 16 X 150 mm, Homogenizer, Pot-Elvej-Glass, USA) en 10 ml de cloroformo-metanol 2:1 v/v, al cual se le agregó hidroxitolueno butilado (BHT) al 2 % para minimizar la autooxidación de los PUFAs. Se agitó en un agitador orbital (VSOS-4, órbita de 19 mm, Pro Scientific) por 20 minutos y se filtró con papel Whatman del número 1. Posteriormente se agregó NaCl al 0.9 % (2 ml por 10 ml de muestra) y se agitó con vórtex (Vortex, Genie II) por 10 segundos. Se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm, se desechó la fase superior y después se le agregó metanol-agua 1/1 v/v, teniendo cuidado de no mezclar, se lavó dos veces más y se retiró la fase superior. La fase inferior (cloroformo) donde están los lípidos se evaporó con nitrógeno para concentrar la muestra. El paso de extracción se repitió dos veces más.

3.7. Preparación de los metil éster de los ácidos grasos (Fatty Acids Methyl Esters, FAMES) para ser utilizados en cromatografía de gases (GC)

Los lípidos obtenidos de las larvas de cada tratamiento (30 mg), se prepararon para formar los metil éster de los ácidos grasos (FAMES), agregando el reactivo de metilación (1 ml de metanol más 1 ml HCl 3N + 0.5 ml de hexano) y 1 mg de ácido heptadecanoico como estándar interno. El tubo se selló perfectamente y se agitó con vórtex por 10 segundos, posteriormente se incubó en un termoblock

(Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA) a 90 °C por una hora y se enfrió a temperatura ambiente. Los FAMEs fueron extractados con 1 ml de hexano y el tubo se selló perfectamente. Se agitó con vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, se colectó la fase superior y se evaporó con nitrógeno para concentrar la muestra. Posteriormente se agregó 1 ml de hexano y se tomó 1 µl para el análisis en cromatografía gas-líquido.

3.8. Cromatografía gas-líquido (GC)

Los análisis de GC se realizaron en la Unidad de Investigación en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F.

Las muestras de los FAME's se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo GC5890, Series II (Hewlett Packard Ltd, Cheshire, UK). Los ácidos grasos de las larvas se separaron en una columna capilar Chrompack tipo WCOT CP-Sil 88 (Holge Teknologi AS, Oslo Noruega) (50.0 m de largo X 0.25 mm de diámetro interno X 0.20 µm de espesor X 0.39 mm de diámetro externo). El cromatógrafo se programó a una temperatura inicial de 130 °C por un minuto, con rampas de 3 °C por minuto hasta alcanzar 180 °C, y de 4 °C por minuto hasta alcanzar 200 °C y por último de 1 °C por minuto hasta una temperatura final de 210 °C; después del análisis, la temperatura se incrementó hasta 300 °C durante 5 minutos para limpiar la columna. El instrumento estaba equipado con un detector de ionización de flama el cual estuvo operado a 300 °C. La temperatura del inyector fue 270 °C. Como gas acarreador se utilizó Helio (pureza 99.95 %) con una velocidad de flujo total 1.1 ml/min, la muestra inyectada fue 1 µl por split/splittles. Los picos de los FAME's fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar conocido de 18 auténticos ésteres metílicos (PCS Poly Science Niles, Illinois, USA).

3.9. Análisis Estadístico

Para comparar el contenido de ácidos grasos de cada lote, los porcentajes obtenidos se transformaron a la raíz cuadrada del arcoseno (Zar, 1999), se aplicaron los procedimientos de los modelos lineales generales y un ANOVA. Cuando se encontró un efecto significativo del tratamiento sobre el 20:4n-ω6, se procedió a confirmar las diferencias mediante la comparación de la diferencia mínima significativa de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Zar, 1999).

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW) y la prueba de comparación múltiple de Dunn's

se utilizaron para analizar la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca, se considera que la distribución se modificó cuando se encontraron diferencias significativas a $\alpha = 0.05$ (Zar, 1999). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa de cómputo SPSS 11.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Los datos obtenidos en la prueba de mutación y recombinación somáticas se procesaron con la ayuda del programa de cómputo SMART (Würgler y Frei 1989 no publicado), basado en la prueba de X^2 y el procedimiento de decisión múltiple, para decidir si un resultado es positivo, débil positivo, indeterminado o negativo con un nivel de significancia del 5 % (Frei y Würgler, 1988).

En la figura 13, se muestra en resumen la metodología utilizada para caracterizar y evaluar la participación del 20:4n- ω 6 y la posible respuesta genotóxica en células somáticas de *Drosophila*.

En la figura 14, se observan los diferentes lotes que se utilizaron para caracterizar la posible inducción e inhibición del metabolismo del 20:4n- ω 6 en *Drosophila*.

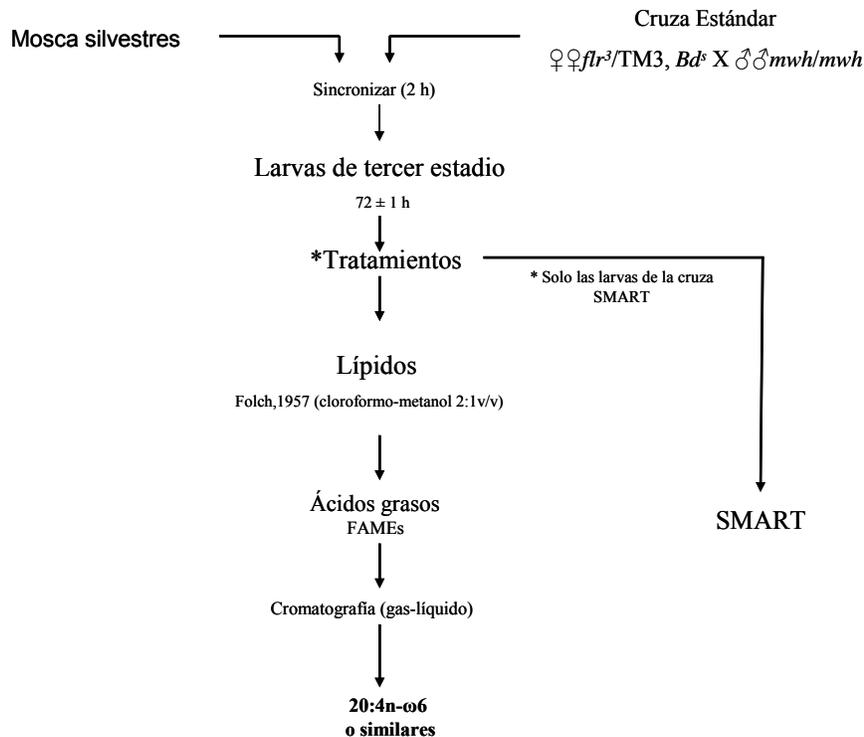


Fig. 13 Resumen de la metodología empleada en la investigación.

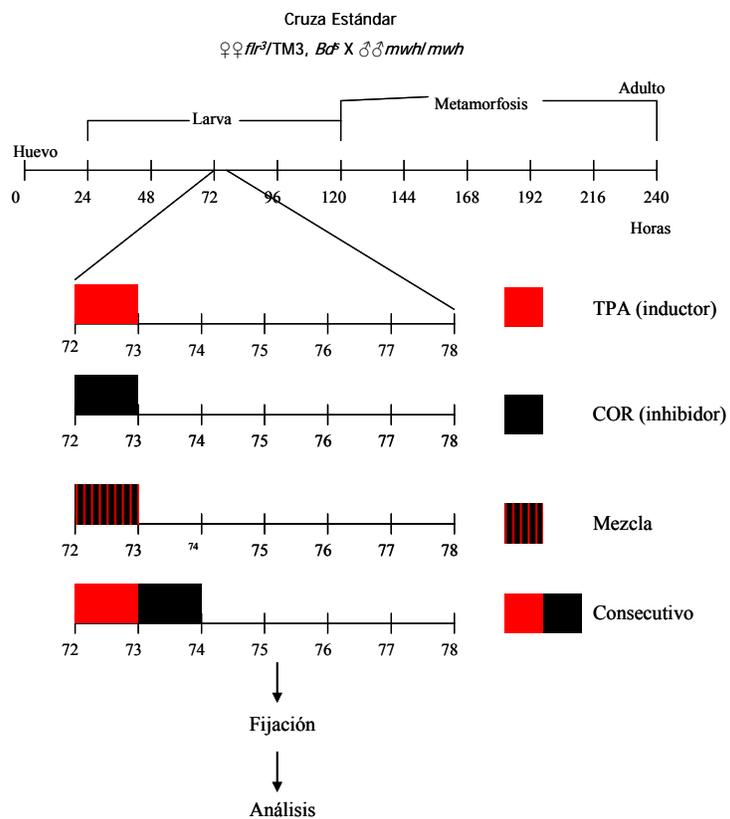


Fig. 14 Lotes experimentales, empleados para caracterizar la participación del 20:4n-ω6 en la inducción de genotoxicidad, inducida por TPA, COR, mezcla (TPA + COR) y secuencial (TPA – COR).

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada repetición, fueron comparados y al no encontrar diferencias entre ellos, se procedió a promediarlos.

4.1 Lípidos

El contenido de lípidos en el medio del cultivo fue de 247.0 mg, las larvas del tipo silvestre tuvieron 384.0 mg, y las larvas provenientes de cruce estándar sin tratamiento contienen 366.5 mg (Tabla I).

Tabla I. Lípidos totales, obtenido del medio de cultivo, larvas de tipo silvestre, de las larvas provenientes de la cruce estándar sin tratar y tratadas con TPA, COR, TPA + COR (mezcla) y TPA - COR (secuencial) \pm error estándar (EE).

Compuesto [mM]	Contenido de lípidos mg/1000 mg de larvas (Folch <i>et al.</i> , 1957)	r	r ²	valor de P
Medio de cultivo	247.0 \pm 8.5			
Tipo silvestre	384.0 \pm 4.5			
Cruce estándar sin tratamiento (♀♀ <i>flr²/TM3;Bd⁺</i> X ♂♂ <i>mwh/mwh</i>)	366.5 \pm 12.5			
DMSO 5 %	395.0 \pm 6.0	-0.984	0.968	0.05
TPA	307.0 \pm 3.0			
0.275	279.0 \pm 10.5			
0.344	262.5 \pm 1.5			
0.413	245.5 \pm 3.5			
0.55				
EtOH 5 %	407.5 \pm 8.5	0.787	0.621	0.05
COR	459.5 \pm 2.5			
0.56	488.0 \pm 17.0			
1.4	569.0 \pm 7.5			
2.8	619.0 \pm 7.0			
5.6				
Mezcla		0.935	0.874	0.05
DMSO 5 % + EtOH 5 %	423.0 \pm 2.8			
DMSO 5 % + COR 1.4	452.0 \pm 9.3			
DMSO 5 % + COR 2.8	458.0 \pm 3.3			
TPA 0.55 + EtOH 5 %	314.5 \pm 5.5	0.999	0.999	0.05
TPA 0.55 + COR 1.4	341.0 \pm 3.5			
TPA 0.55 + COR 2.8	370.0 \pm 2.0			
Secuencial		0.976	0.953	0.05
DMSO 5 % - EtOH 5 %	406.0 \pm 3.4			
DMSO 5 % - COR 1.4	442.0 \pm 8.7			
DMSO 5 % - COR 2.8	458.0 \pm 1.2			
TPA 0.55 - EtOH 5 %	311.0 \pm 4.0	0.984	0.968	0.05
TPA 0.55 - COR 1.4	331.5 \pm 2.5			
TPA 0.55 - COR 2.8	371.0 \pm 6.0			

En las larvas tratadas con TPA, el contenido de lípidos disminuyó de 395.0 mg en el lote testigo [DMSO 5%] a 245.5 mg en la concentración más alta [0.55 mM], la disminución del contenido de lípidos fue dependiente de la concentración ($r=-0.984$, $r^2=0.968$, $p < 0.05$) (Tabla I).

En las larvas tratadas con COR, el contenido de lípidos aumentó de 407.5 mg en el lote testigo [EtOH 5%] a 619.0 mg en la concentración de [5.6 mM], a mayor concentración de COR mayor

cantidad de lípidos ($r=0.787$, $r^2=0.621$, $p < 0.05$) (Tabla I).

Al exponer a las larvas a la mezcla, en el testigo negativo [DMSO 0.5 % + EtOH 5 %] aumentó de 423.0 mg a 458.0 mg en el tratamiento [DMSO + COR 2.8 mM] ($r=0.935$, $r^2=0.874$, $p < 0.05$). En el tratamiento TPA más COR el contenido de lípidos también se incrementó de 314.5 mg en el testigo positivo [TPA 0.55 mM + EtOH 5 %] a 370.0 en el tratamiento [TPA + COR 2.8 mM] ($r=0.999$, $r^2=0.999$, $p < 0.05$) (Tabla I).

En el tratamiento secuencial, el testigo negativo [DMSO 0.5 % - EtOH 5 %] contiene 406.0 mg de lípidos y aumentó a 458.0 mg en la concentración más alta [DMSO - COR 2.8 mM] ($r=0.976$, $r^2=0.953$, $p < 0.05$). El testigo positivo [TPA 0.55 mM - EtOH 5 %] contiene 311.0 mg y en la concentración más alta [TPA - COR 2.8 mM] y aumentó a 371.0 mg de lípidos ($r=0.984$, $r^2=0.968$, $p < 0.05$) (Tabla I).

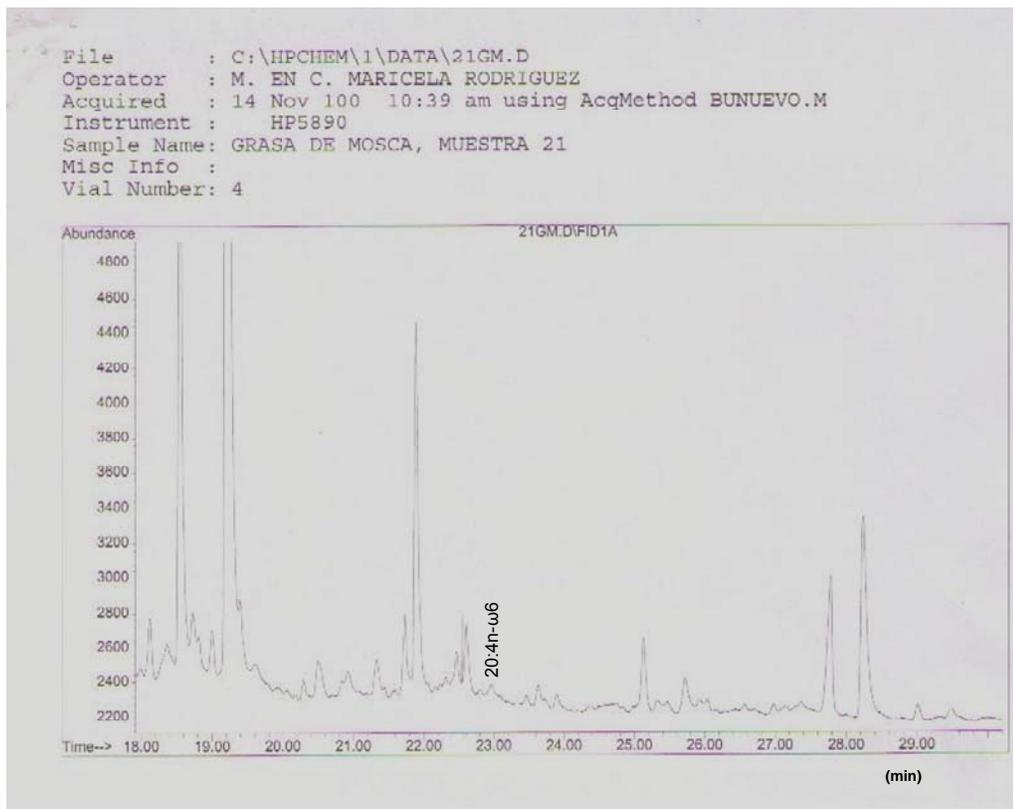


Fig. 15 Cromatograma Gas-líquido de ácidos grasos metil éster de los ácidos grasos (FAMES) de lípidos totales de larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*. El tiempo de retención del 20:4n-ω6 fue de 23 minutos.

4.2 Cromatografía de gases

Para determinar si el ácido araquidónico (20:4n-ω6) está participando en la respuesta obtenida en los diferentes tratamientos, se analizó mediante GC. El tiempo de retención del 20:4n-ω6 fue de 23 minutos (Fig. 15). El porcentaje de 20:4n-ω6 mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos con respecto a sus testigos concurrentes.

Tabla II. Porcentaje de 20:4n-ω6, obtenido del medio de cultivo, larvas de tipo silvestre, de las larvas provenientes de la crua progenitora sin tratar y tratadas con TPA, COR, TPA + COR (mezcla) y TPA - COR (secuencial) ± EE.

Compuesto [mM]	Contenido de C20:4n-ω6	F, gl.
Medio de cultivo	0.137 ± 0.041	
Tipo silvestre	0.045 ± 0.004	
Cruza estándar sin tratamiento (♀♀ <i>flr²/TM3;Bd^s</i> X ♂♂ <i>mwh/mwh</i>)	1.150 ± 0.124	
DMSO 5 %	0.979 ± 0.066	F _(4,5) =201.546
TPA 0.275	0.383 ± 0.017***	
0.344	0.344 ± 0.010***	
0.413	0.317 ± 0.003***	
0.55	0.293 ± 0.002***	
EtOH 5 %	1.090 ± 0.020	F _(4,5) =27.166
COR 0.56	0.775 ± 0.010**	
1.4	0.636 ± 0.026**	
2.8	0.612 ± 0.045**	
5.6	0.476 ± 0.061***	
Mezcla		
DMSO 5 % + EtOH 5 %	0.797 ± 0.016	F _(2,3) =260.609
DMSO 5 % + COR 1.4	0.452 ± 0.002***	
DMSO 5 % + COR 2.8	0.366 ± 0.060***	
TPA 0.55 + EtOH 5 %	0.256 ± 0.013	F _(2,3) =126.305
TPA 0.55 + COR 1.4	0.232 ± 0.003**	
TPA 0.55 + COR 2.8	0.186 ± 0.028***	
Secuencial		
DMSO 5 % - EtOH 5 %	0.843 ± 0.011	F _(2,3) =674.419
DMSO 5 % - COR 1.4	0.530 ± 0.001**	
DMSO 5 % - COR 2.8	0.411 ± 0.008***	
TPA 0.55 - EtOH 5 %	0.376 ± 0.005	F _(2,3) =117.759
TPA 0.55 - COR 1.4	0.241 ± 0.017***	
TPA 0.55 - COR 2.8	0.112 ± 0.004***	

ANOVA * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

El medio de cultivo, las larvas de tipo silvestre y larvas de la crua de estándar, presentaron 0.137 %, 0.045 % y 1.150 % de 20:4n-ω6, respectivamente (Tabla II).

En las larvas tratadas con TPA, el contenido de 20:4n-ω6 disminuyó inversamente a la concentración de TPA; en el control [DMSO 5 %] de 0.979 % a 0.293 % en las larvas tratadas con la concentración más alta de TPA [0,55 mM] (F_(4,5)=201.546, p < 0.001) (Tabla II).

Esta reducción del 20:4n- ω 6 también se observó en las larvas tratadas con COR, en el control [EtOH 5 %] de 1.090 % a 0.476 % en la concentración más alta de COR [5.6 mM] y de igual manera los niveles más bajos de 20:4n- ω 6 debido al aumento de la concentración de COR ($F_{(4,5)}=27.166$, $p < 0.001$) (Tabla II).

En los tratamientos negativos, tanto en la mezcla ($F_{(2,3)}=260.609$, $p < 0.001$) como en el secuencial ($F_{(2,3)}=674.419$, $p < 0.001$) también se presenta este fenómeno, donde el contenido de 20:4n- ω 6 disminuye con respecto a los testigos concurrentes (Tabla II).

Esta tendencia también fue similar en los tratamientos mezcla y secuencial tratados con TPA (positivo).

Para la mezcla el contenido de 20:4n- ω 6 disminuyó en el control positivo [TPA 0.55 mM + EtOH 5 %] de 0.256 % a 0.186 % en el tratamiento [TPA 0.55 mM + COR 2.8 mM] ($F_{(2,3)}=126.305$, $p < 0.001$) (Tabla II).

Para el tratamiento secuencial, disminuyó de 0.376 % en el control positivo [TPA 0.55mM - EtOH 5 %] a 0.112 % en el tratamiento [TPA - COR 2.8 mM] ($F_{(2,3)}=117.759$, $p < 0.001$) (Tabla II).

4.3. Toxicidad de los tratamientos

En tratamiento con TPA [0,275 mM] produjo un IS del 0.73, mientras que en el resto de las concentraciones de TPA se obtuvieron IS superiores al 0.80. En los tratamientos con COR, el IS obtenido está en el rango de 0.83-0.93, por lo tanto, COR es menos tóxico que el TPA en las concentraciones probadas. En los controles negativos [DMSO + COR] en los dos protocolos, se obtienen IS mayores al 0.83 (Tabla III).

En los tratamientos mezcla y secuencial se obtienen IS mayores al 0.89 en las concentraciones empleadas, esto sugiere que la interacción TPA más COR reduce la toxicidad.

Tabla III. Índice de sobrevivencia, obtenido de moscas tratadas durante el desarrollo larvario con TPA, COR, TPA + COR (mezcla) y TPA - COR (secuencial) ± EE.

Compuesto [mM]	Índice de sobrevivencia
DMSO 5 %	1
TPA	
0.275	0.73 ± 0.1
0.344	0.81 ± 0.09
0.413	0.82 ± 0.08
0.55	0.85 ± 0.02
EtOH 5 %	1
COR	
0.56	0.93 ± 0.07
1.4	0.84 ± 0.12
2.8	0.84 ± 0.11
5.6	0.83 ± 0.15
Mezcla	
DMSO 5 % + EtOH 5 %	1
DMSO 5 % + COR 1.4	0.88 ± 0.11
DMSO 5 % + COR 2.8	0.84 ± 0.23
TPA 0.55 + EtOH 5 %	1
TPA 0.55 + COR 1.4	0.95 ± 0.05
TPA 0.55 + COR 2.8	0.89 ± 0.05
Secuencial	
DMSO 5 % - EtOH 5 %	1
DMSO 5 % - COR 1.4	0.83 ± 0.06
DMSO 5 % - COR 2.8	0.84 ± 0.05
TPA 0.55 - EtOH 5 %	1
TPA 0.55 - COR 1.4	0.98 ± 0.02
TPA 0.55 - COR 2.8	0.98 ± 0.02

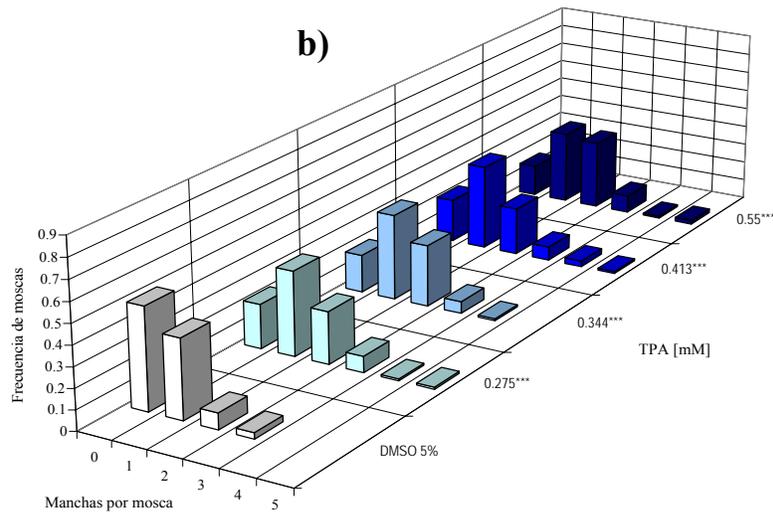
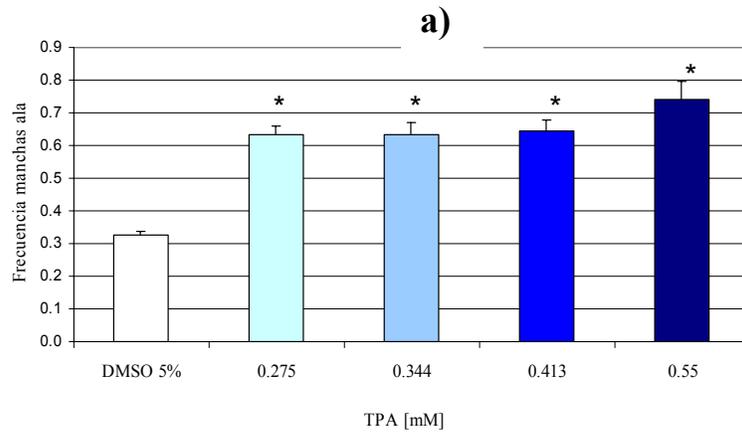
4.4. Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)

En la tabla IV, se presentan los resultados obtenidos para la inducción de mutación y recombinación somáticas. El TPA administrado a larvas de 72 h mostró actividad genotóxica e incrementó la frecuencia de manchas chicas y totales en todas las concentraciones (Fig. 16a) ($p < 0.05$), la de manchas simples grandes en la concentración 0.344 mM, y no indujo manchas gemelas. La proporción de moscas sin manchas fue menor en las moscas tratadas con TPA y el número de manchas se incrementó en todas las concentración probadas (KW, $p < 0.001$) (Fig. 16b).

Tabla IV. Frecuencia de manchas/ala obtenida de moscas tratadas durante el desarrollo larvario con TPA, COR, TPA + COR (mezcla) y TPA - COR (secuencial).

Número de manchas mutantes (manchas/ala)					
Compuesto mM	Número de alas	Manchas chicas m=2	Manchas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
DMSO 5 %	200	59 (0.295)	5 (0.025)	1 (0.005)	65 (0.325)
TPA	200	116 (0.580) +	10 (0.050) i	1 (0.005) -	127 (0.635) +
0.275	200	113 (0.565) +	13 (0.065) +	1 (0.005) -	127 (0.635) +
0.344	200	119 (0.595) +	8 (0.040) i	2 (0.010) -	129 (0.645) +
0.413	200	136 (0.680) +	10 (0.050) i	2 (0.010) -	148 (0.740) +
0.55	200				
EtOH 5 %	200	60 (0.300)	7 (0.035)	0 (0.000)	67 (0.335)
COR	200	54 (0.270) -	11 (0.055) -	2 (0.010) -	67 (0.340) -
0.56	200	54 (0.270) -	5 (0.025) -	1 (0.005) -	60 (0.300) -
1.4	200	53 (0.265) -	10 (0.050) -	1 (0.005) -	64 (0.320) -
2.8	200	59 (0.295) -	8 (0.040) -	1 (0.005) -	68 (0.340) -
5.6	200				
Mezcla					
DMSO 5 % + EtOH 5 %	200	58 (0.290)	7 (0.035)	2 (0.010)	67 (0.335)
DMSO 5 % + COR 1.4	200	55 (0.275) -	5 (0.025) -	4 (0.020) -	64 (0.320) -
DMSO 5 % + COR 2.8	200	61 (0.305) -	4 (0.020) -	2 (0.010) -	67 (0.335) -
TPA 0.55 + EtOH 5 %	200	125 (0.625)	5 (0.025)	1 (0.005)	131 (0.655)
TPA 0.55 + COR 1.4	200	56 (0.280) +	6 (0.030) -	2 (0.010) -	64 (0.320) +
TPA 0.55 + COR 2.8	200	39 (0.195) +	6 (0.030) -	2 (0.010) -	47 (0.235) +
Secuencial					
DMSO 5 % - EtOH 5 %	200	59 (0.295)	6 (0.030)	1 (0.005)	66 (0.330)
DMSO 5 % - COR 1.4	200	53 (0.265) -	5 (0.025) -	2 (0.010) -	60 (0.300) -
DMSO 5 % - COR 2.8	200	55 (0.275) -	6 (0.030) -	0 (0.000) -	61 (0.305) -
TPA 0.55 - EtOH 5 %	200	136 (0.680)	15 (0.075)	0 (0.000)	151 (0.755)
TPA 0.55 - COR 1.4	200	48 (0.240) +	6 (0.030) +	2 (0.010) -	56 (0.280) +
TPA 0.55 - COR 2.8	200	45 (0.225) +	6 (0.030) +	0 (0.000) -	51 (0.255) +

Diagnosis estadística (X^2) de acuerdo a Frei y Würzler (1988) Mut. Res. 203:297-308; -, negativo; +, positivo; i, indeterminado; d, débil positivo; m=, factor de multiplicación; $p < 0.05$.



X^2 , * $p < 0.05$; KW, *** $p < 0.001$

Fig. 16 a) Frecuencia de manchas/ala totales, b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por el TPA. E= 72 X 1 h.

Las moscas tratadas con COR, mostraron frecuencias de manchas por ala similares al lote testigo [EtOH 5 %] (Tabla IV, y Fig. 17a). Tampoco se modificó el número de manchas por mosca (Fig. 17b).

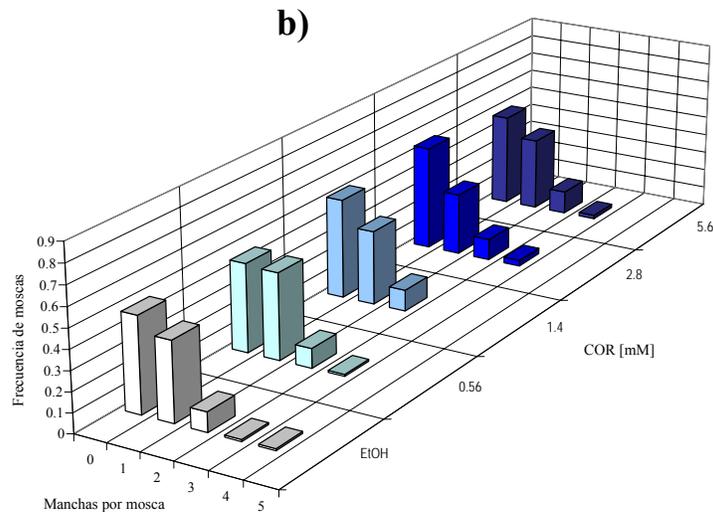
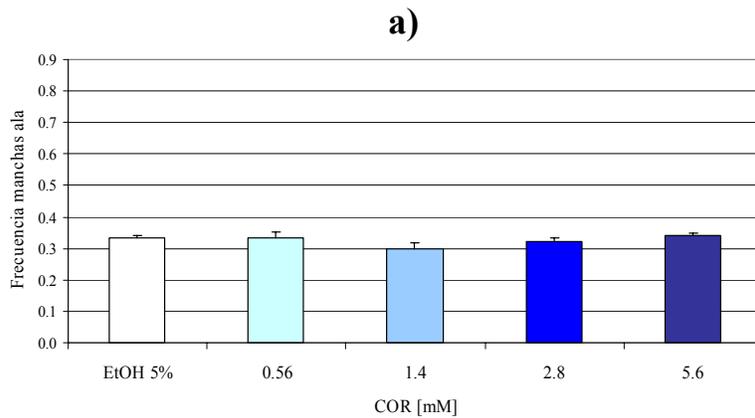


Fig. 17 a) Frecuencia de manchas totales/ala, b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por la COR. E= 72 X 1 h.

En la Tabla IV, se muestran los resultados obtenidos con el testigo negativo (DMSO 5% + EtOH 5%) y los lotes experimentales (DMSO más COR 1.4-2.8 mM). En los dos protocolos mezcla (Fig. 18a) y secuencial (Fig. 19b) no se modificó la frecuencia de manchas de algún tipo, ni se alteró la dispersión del número de manchas por mosca (Fig. 18b y 19b).

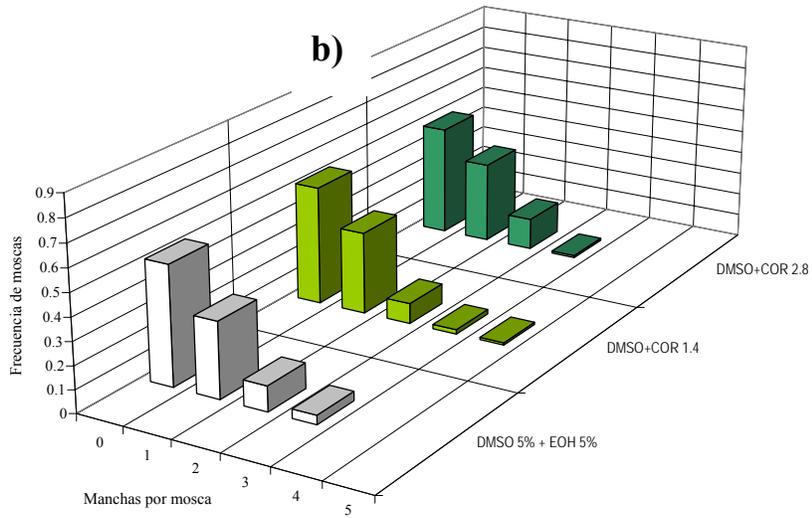
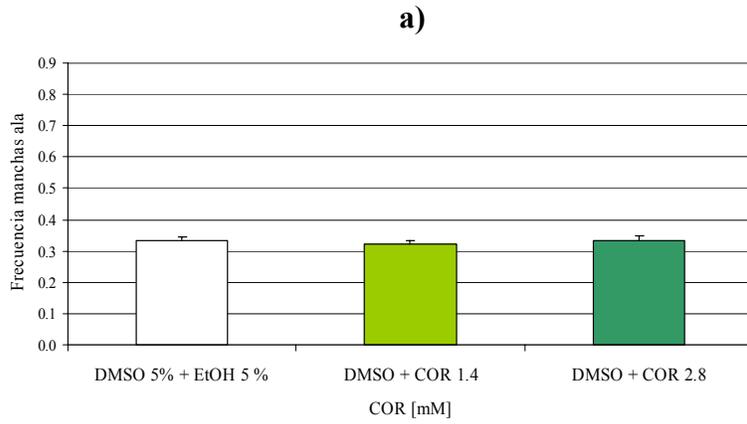
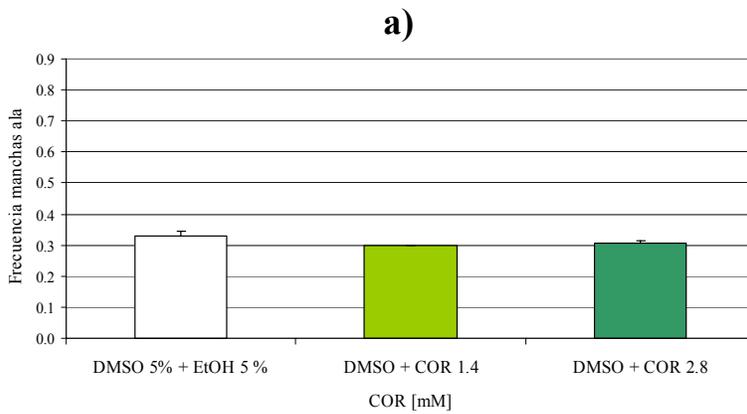


Fig. 18 a) Frecuencia de manchas totales/ala y b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por el tratamiento mezcla DMSO + COR. E= 72 X 1 h.



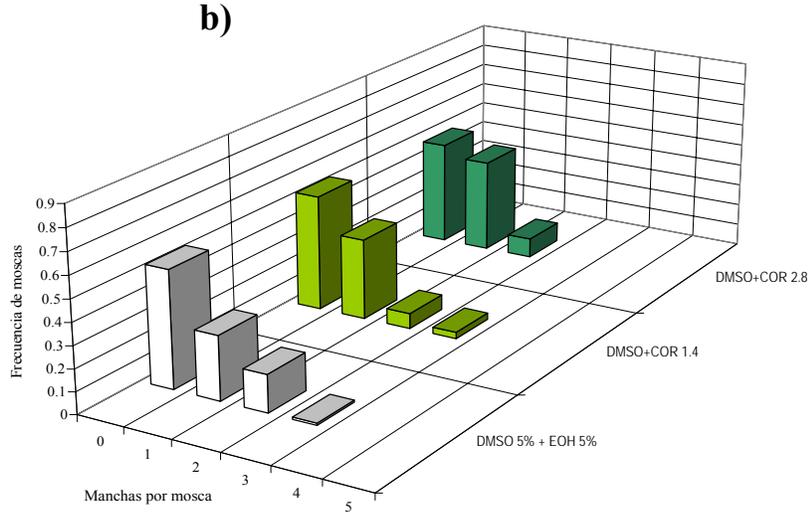
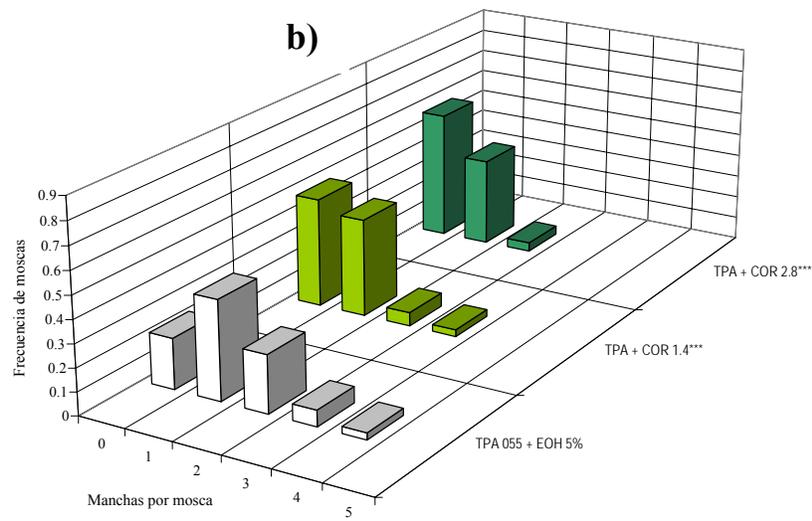
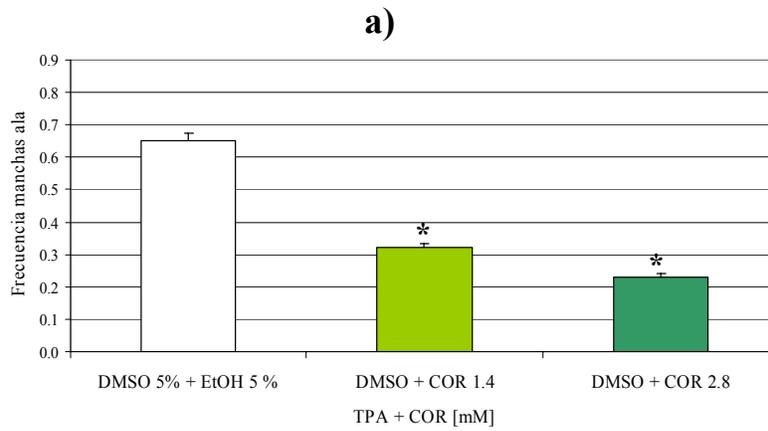


Fig. 19 a) Frecuencia de manchas totales/ala, b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por el tratamiento secuencial DMSO - COR. E= 72 X 1 X 1 h.

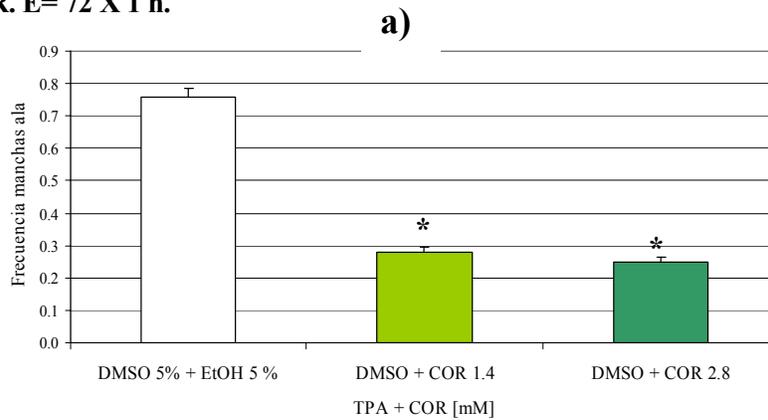
En los lotes experimentales en los que se utilizó la concentración de [0.55 mM] de TPA y de [1.4 y 2.8 mM] de COR, en el tratamiento mezcla, COR disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas y totales inducidas con el TPA (Tabla IV, y Fig. 20a); para manchas chicas de 0.625 en el lote testigo [TPA + EtOH 5 %] a 0.280 y 0.195 en los lotes experimental [TPA 0.55 mM + COR 1.4 y 2.8] respectivamente; de la misma manera, para manchas totales, se reduce la frecuencia de mutación de 0.655 en el testigo positivo a 0.320 y 0.235 en los experimentales ($p < 0.05$). La dispersión en la distribución del número de manchas por mosca también se modificó conforme se incrementó la concentración de COR recobrando mayor número de moscas sin manchas (KW, $p < 0.001$) (Fig. 20b).

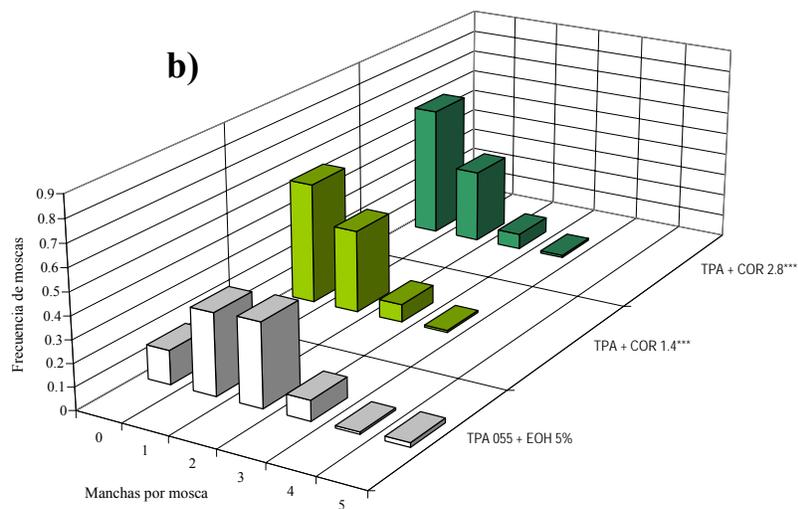
De igual manera como sucedió en la mezcla, en el tratamiento secuencial [TPA 0.55 mM – COR 1.4 y 2.8], la frecuencia de manchas chicas disminuye de 0.680 a 0.240 y 0.225 respectivamente; para manchas totales de 0.755 en el lote testigo [TPA 0.55 mM - EtOH 5%] a 0.280 y 0.255 en las concentraciones [TPA 0.55 mM – COR 1.4 y 2.8 mM], estos resultados indican que la actividad genotóxica del TPA disminuye en presencia de COR ($p < 0.05$) (Tabla IV, y Fig. 21a). La distribución del número de manchas por mosca también se modifica de manera significativa, recobrando más mosca sin manchas (KW, $p < 0.001$) (Fig. 21b).



X^2 , * $p < 0.05$; KW, *** $p < 0.001$

Fig. 20 a) Frecuencia de manchas totales/ala, b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por la mezcla TPA + COR. E= 72 X 1 h.





X^2 , * $p < 0.05$; KW, *** $p < 0.001$

Fig. 21 a) Frecuencia de manchas totales/ala, b) Frecuencia de manchas por mosca, inducidas por TPA - COR (secuencial). E=72 X 1 X 1 h.

Para proponer los posibles mecanismos de acción implicados en la inhibición de la genotoxicidad, se calculó el contenido de 20:4n- ω 6 entre el total de lípidos (20:4n- ω 6 mg/mg lípidos) para cada uno de los tratamientos.

El contenido 20:4n- ω 6 mg/mg lípidos disminuyó en los tratamientos con TPA de 3.867 a 0.719 (generación de daño genotóxico, induce la actividad y expresión de PLA₂ y COX) y con la COR de 4.442 a 2.946, de igual manera disminuye en los tratamientos negativos, en la mezcla de 3.566 a 1.882 y en el secuencial de 3.236 a 1.676 (Tabla V).

En los tratamientos positivos con TPA, en la mezcla se mantuvo la misma tendencia y disminuyó el contenido de 20:4n- ω 6 de 1.183 a 0.414 (Fig. 22)

En el tratamiento secuencial no hubo cambios aparentes en las dos concentraciones probadas, en el testigo positivo el contenido fue 0.796 de 20:4n- ω 6 y en los tratamientos experimentales 769 y 690 20:4n- ω 6 mg/mg lípidos (Tabla V y Fig. 23).

Tabla V. Contenido de lípidos totales, porcentaje, y contenido de 20:4n-ω6 mg/lípidos totales mg de larvas tratadas con TPA, COR y los tratamientos mezcla y secuencial. (± EE).

Compuesto [mM]	Contenido de lípidos mg/1000 gr de larvas	% 20:4n-ω6 (Cromatografía gas-líquido)	Contenido de 20:4n-ω6 mg 20:4n-ω6 / mg lípidos
Medio de cultivo	247 ± 8.5	0.137 ± 0.041	0.338
Tipo silvestre	348 ± 4.5	0.045 ± 0.004	0.173
Cruza estándar sin tratamiento (♀ <i>ϕ/ϕ</i> / <i>TM3;Bd</i> X ♂ <i>mwh/mwh</i>)	366.5 ± 12.5	1.150 ± 0.124	4.215
DMSO 5 %	395 ± 6.0	0.979 ± 0.066	3.867
TPA			
0.275	307 ± 3.0	0.383 ± 0.017***	1.176
0.344	279 ± 10.5	0.344 ± 0.010***	0.960
0.413	262.5 ± 1.5	0.317 ± 0.003***	0.832
0.55	245.5 ± 3.5	0.293 ± 0.002***	0.719
EtOH 5 %	407.5 ± 8.5	1.090 ± 0.020	4.442
COR			
0.56	459.5 ± 2.5	0.775 ± 0.010***	3.561
1.4	488 ± 17	0.636 ± 0.026***	3.104
2.8	569 ± 7.5	0.612 ± 0.045***	3.482
5.6	619 ± 7.0	0.476 ± 0.061***	2.946
Mezcla			
DMSO 5 % + EtOH 5 %	423 ± 2.8	0.843 ± 0.011	3.566
DMSO 5 % + COR 1.4	452 ± 9.3	0.530 ± 0.001**	2.396
DMSO 5 % + COR 2.8	458 ± 3.3	0.411 ± 0.008***	1.882
TPA 0.55 + EtOH 5 %	314.5 ± 5.5	0.376 ± 0.005	1.183
TPA 0.55 + COR 1.4	341 ± 3.5	0.241 ± 0.017***	0.822
TPA 0.55 + COR 2.8	370 ± 2.0	0.112 ± 0.004***	0.414
Secuencial			
DMSO 5 % - EtOH 5 %	406 ± 3.4	0.797 ± 0.016	3.236
DMSO 5 % - COR 1.4	442 ± 8.7	0.452 ± 0.002 ***	1.998
DMSO 5 % - COR 2.8	458 ± 1.2	0.366 ± 0.050 ***	1.676
TPA 0.55 - EtOH 5 %	311 ± 4.0	0.256 ± 0.005	0.796
TPA 0.55 - COR 1.4	331.5 ± 2.5	0.232 ± 0.003**	0.769
TPA 0.55 - COR 2.8	371 ± 6.0	0.186 ± 0.028***	0.690

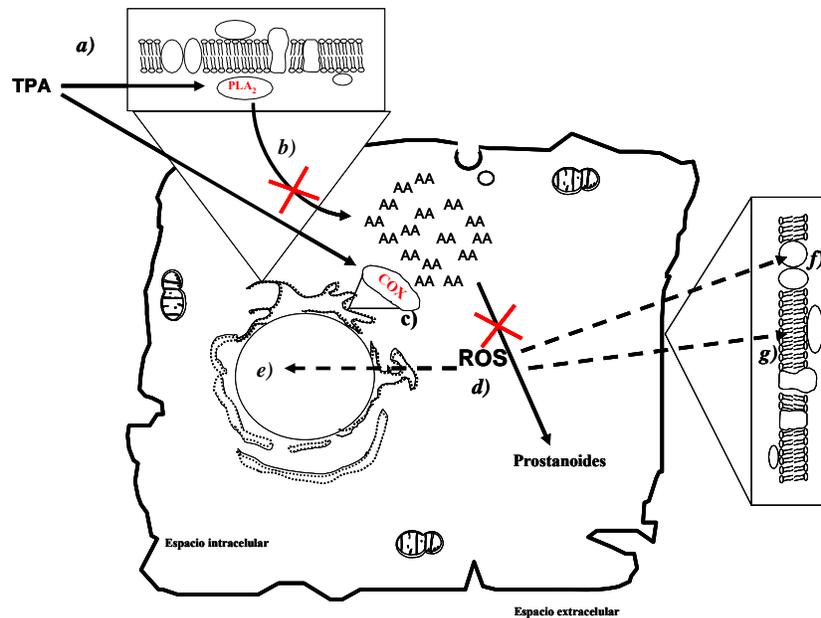


Fig. 22 Mecanismo de acción propuesto para la mezcla. La COR probablemente bloquea la actividad enzimática de PLA₂ (primer paso) y a COX (segundo paso), no se genera daño oxidativo y por lo tanto se refleja en la disminución de frecuencia la mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*.

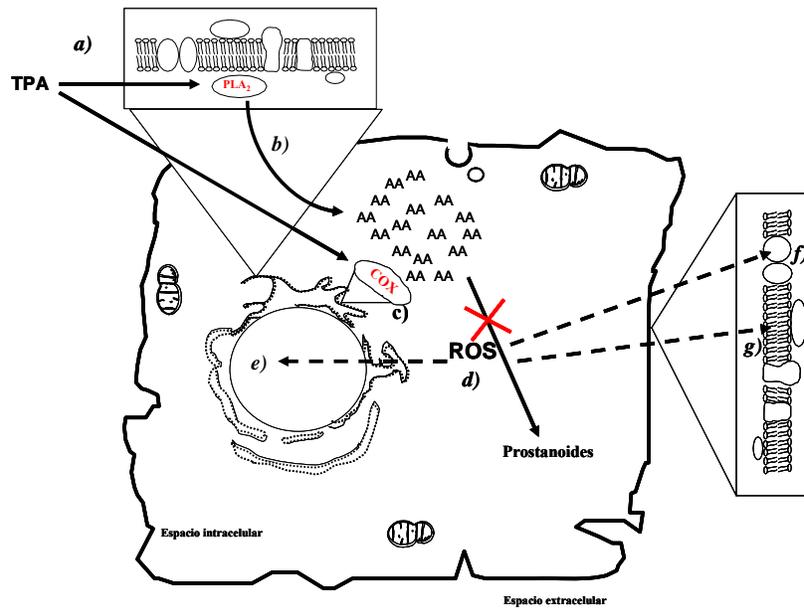


Fig. 23 Mecanismo de acción propuesto para el consecutivo. La COR probablemente bloquea la actividad enzimática de COX (segundo paso), no se genera prostanoides y la consiguiente generación de daño oxidativo y por lo tanto se refleja en la disminución de frecuencia la mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*.

5. DISCUSIÓN

Se ha propuesto que el metabolismo del ácido araquidónico (20:4n- ω 6) es un importante mediador en la fisiología y fisiopatología de los mamíferos, actualmente se está explorando su participación en diversos aspectos de la biología de los insectos y se han encontrado similitudes sorprendentes con los vertebrados. Bajo esta vertiente, investigamos dos eventos relacionados con el 20:4n- ω 6. Por un lado si está presentes en las larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* y por el otro, si participa en la respuesta de genotoxicidad de *Drosophila* utilizando al 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) como inductor y a la cortisona (COR) como inhibidor del metabolismo del 20:4n- ω 6. Varios investigadores han reportado que el 20:4n- ω 6 no está presente en larvas y en adultos de *Drosophila*, pero si se han identificado varios precursores (Yoshioka *et al.*, 1985; Pagés *et al.*, 1986; Chyb *et al.*, 1999). En la presente investigación encontramos 20:4n- ω 6 en todos los tratamientos (TPA, COR, mezcla y secuencial), en larvas de tipo silvestre, en larvas sin tratar provenientes de la cruce estándar y en el medio de cultivo.

Se ha propuesto que el 20:4n- ω 6 se encuentra en bajas proporciones en los tejidos lipídicos de los insectos (menores al 0.1 %). Existe controversia con respecto a la presencia de este ácido, la cual podría estar asociada a la baja resolución de las técnicas utilizadas anteriormente para su caracterización (Stanley, 2000). Estudios nutricionales y de incorporación del 20:4n- ω 6 a partir de la dieta en varios insectos, indican que éste se mantiene en bajas proporciones (Gadelhak y Stanley-Samuelson, 1994) como se encontró con las larvas del tipo silvestre. En las larvas de la cruce estándar, el contenido del 20:4n- ω 6 fue mayor, esto probablemente esté relacionado con diferencias en el metabolismo de las larvas asociado con los marcadores genéticos que portan. En los tratamientos también se registró aumento en el contenido del 20:4n- ω 6, como ha sido reportado a partir de investigaciones realizadas con *Drosophila* en las que se ha mostrado que el 20:4n- ω 6 y otros PUFAs pueden ser incorporados con relativa facilidad a las membranas modificando sus propiedades (McKechnie y Geer, 1993).

En varios estudios de inmunidad en insectos se ha mostrado que el 20:4n- ω 6 es importante en la respuesta inmune celular, en estos estudios se aplicaron conocidos inhibidores farmacéuticos del metabolismo del 20:4n- ω 6, como aquellos que inhiben el primer paso (PLA₂) y el segundo paso (COX y LOX), y se encontró que se reduce la capacidad de los insectos para combatir las infecciones mediante procesos como la fagocitosis, microagregación, nodulación y encapsulación,

estos efectos fueron revertidos al agregar 20:4n- ω 6 exógeno (Bedick *et al.*, 2000; Bedick *et al.*, 2001; Lavine y Strand 2002; Tunaz, 2006; Stanley y Miller, 2006; Büyükgüzel *et al.*, 2007; García Gil de Muñoz *et al.*, 2008). Con respecto a la inmunidad humoral, la activación de estos sistemas en mosquitos (*Anopheles*) implica un reconocimiento de señales que pueden conducir a la síntesis de péptidos antimicrobianos (Ligoxigakis *et al.*, 2002), la melanización (Michel *et al.*, 2006; Lanz-Mendoza *et al.*, 2002) y la producción de ROS (Herrera-Ortiz *et al.*, 2004). En la langosta (*Schistocerca gregaria*), median reacciones en el comportamiento de organismos con reacciones febriles asociadas a infecciones (Bundey *et al.*, 2003).

Así, estas rutas enzimáticas pueden ser funcionales en *Drosophila*, aunque algunos de los genes que codifican para las enzimas que están involucradas en la biosíntesis del segundo paso en *Drosophila* aún no han sido identificadas (Tootle y Spradling, 2008).

Las PLA₂s son enzimas ubicuas (Sato y Frank 2004; Farr *et al.*, 2005; Fujikawa *et al.*, 2005; Stanley, 2006b); en *Drosophila* se clonaron siete distintas PLA₂s, estas enzimas pueden presentar diversidad de funciones, y es probable que algunas de éstas puedan ser semejantes a las de los mamíferos (Valentin y Lambeau, 2000; Ryu *et al.*, 2003). Las PLA₂s están involucradas en la respuesta inmune celular de *Drosophila*. A larvas parasitadas con huevos de la avispa, *Leptopilina boucardi*, se les agregó dexametasona (un fármaco inhibidor de PLA₂), estos organismos perdieron la capacidad de encapsular a los invasores, pero el efecto fue revertido al suministrar 20:4n- ω 6 exógeno a las larvas (Carton *et al.*, 2002).

Al igual que otros organismos, en ambientes naturales *Drosophila* podría verse amenazada por parasitoides de la avispa *L. boucardi*. La respuesta inmune celular asociado con la formación de cápsulas melanocíticas alrededor de los huevos de la avispa dentro del cuerpo se basa en parte en los GCC que regulan la capacidad de las larvas del encapsulado (niveles altos de GCC reducen este proceso), pero también están involucrados altos niveles de ROS que se producen durante la encapsulación y tienen un papel también como mensajeros celulares. La respuesta de defensa de *Drosophila* a infección por parasitoides muestra elementos similares como los de la respuesta de inflamación en mamíferos inducida por TPA (Carton *et al.*, 2002).

Con respecto a las otras enzimas involucradas en el segundo paso en el metabolismo del 20:4n- ω 6 en *Drosophila*, Pagés *et al.*, (1986), comprobaron que existe actividad semejante a COX y LOXs, ya que administraron 20:4n- ω 6 marcado radiactivamente a las moscas y obtuvieron productos también

marcados como PGE₂ y 15, 12, 9, y 8-HETEs característicos de estas enzimas.

Sabiendo que el 20:4n- ω 6 está presente en *Drosophila*, en la siguiente etapa de la investigación fue comprobar su posible participación en la inducción e inhibición de daño genotóxico.

Existen reportes que indican que el TPA no es genotóxico en la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila*, estos resultados son diferentes a los obtenidos en esta tesis y pueden deberse a que las moscas utilizadas tienen constitución genética diferente, así como las concentraciones y el disolvente usado (Tsuda y Takeda, 1987).

La actividad genotóxica encontrada en los tratamientos con el TPA, probablemente sea ocasionada por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se ha reportado que el TPA puede inducir aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (SCE) en varios tejidos debido a la acción de ROS, este efecto puede ser revertido al adicionar superóxido dismutasa y catalasa a los cultivos (Emerit y Cerruti, 1981, 1982; Dzarlieva y Fusenig, 1982; Schawartz *et al.*, 1982; Emerit *et al.*, 1989).

El mecanismo de acción del TPA involucrado en el metabolismo del 20:4n- ω 6, se explica por la inducción de la expresión y actividad de PLA₂ (primer paso en el metabolismo del 20:4n- ω 6) (Leslie, 1997; Gijón y Leslie, 1999; Shimizu *et al.*, 2004; Le Berre *et al.*, 2006). La PLA₂ libera al 20:4n- ω 6 de los fosfolípidos de la membrana (Carton *et al.*, 2002) el cual posteriormente es biotransformado enzimáticamente para generar eicosanoides (Pace-Asciak y Asotra, 1989; Blobaum y Marnett, 2007); durante esta conversión, también se liberan ROS que pueden incrementar la mutagenicidad y la inducción de daño al ADN (Zor *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 2000; Shureiqi *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Fürstenberger *et al.*, 2006; Federico *et al.*, 2007). Otro producto generado por la acción de PLA₂, son los lisofosfolípidos, estos son poderosos detergentes que a bajas concentraciones causan diversas respuestas celulares como cambios en el citoesqueleto, inducen mitogénesis, tienen potente actividad inflamatoria y también pudieran modular la respuesta de genotoxicidad (Venable *et al.*, 1993; Moolenaar *et al.*, 1997).

Los eventos genéticos terminales probables que están involucrados en el efecto mutagénico del TPA, son: recombinación entre los marcadores (*flr*³ y *mwh*), mutación puntual, no disyunción, deleción porque solo se obtuvieron manchas sencillas (un solo fenotipo), el único evento que no se recobró fue el de recombinación entre *flr*³ y el centrómero ya que no se recobraron manchas gemelas

(con los dos fenotipos).

Con base en lo experimentos mencionados anteriormente, es probable que el TPA haya inducido la expresión y la actividad de la PLA₂ liberando al 20:4n-6 y posteriormente éste haya sido biotransformado por COX, (segundo paso en el metabolismo del 20:4n-ω6), ya que también el TPA tiene actividad dual (Boone *et al.*, 1998; Sánchez y Moreno, 1999); durante esta conversión se generan ROS que tienen actividad genotóxica probada y podrían contribuir al incremento en la frecuencia de mutación obtenida (Marks *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007), por ello en las diferentes tratamientos con concentraciones de TPA, el 20:4n-ω6 disminuyó. Estando los organismos bajo este estrés oxidativo y la subsiguiente peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de nuevo se puede potenciar la actividad de la PLA₂ generándose un estado de “feedback” (Cummings *et al.*, 2000).

En resumen, la genotoxicidad del TPA, se puede deber a un mecanismo que involucra al 20:4n-ω6, en la que ROS y los productos aldehídicos de la degradación de PUFAs juegan un papel importante. Estos últimos parecen actuar de nuevo a través de la intermediación de ROS conllevando a un círculo de eventos con posible importancia en la mutagénesis.

La COR en la presente investigación no resultó genotóxica. El contenido de lípidos aumentó drásticamente cuando se les administró la COR a las larvas, este comportamiento se puede deber a que los GCC son capaces de inducir la expresión de genes que están involucrados en el metabolismo de lípidos, además de que producen la movilización y redistribución de los lípidos en el organismo (Sul y Wang 1998; Saether *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Daniel *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2006). Los GCC también estimulan la movilización de ácidos grasos desde los depósitos de los tejido adiposos, donde estos pueden ser utilizados como sustratos para la generación de glucógeno en los cuerpos grasos, o bien ser metabolizados directamente en los músculos para suministrar energía (Amat *et al.*, 2007), probablemente esto suceda por la disminución del 20:4n-ω6 en todas las concentraciones de COR (Barnes, 1995).

Los GCC son drogas con potente actividad antiinflamatoria, esta propiedad ha sido relacionada con la capacidad de inhibir varios tipos de PLA₂s (Flower y Rothwell, 1994), por inducir la síntesis de proteínas llamadas lipocortinas, que se caracterizan por su capacidad de secuestrar calcio y de unirse a los fosfolípidos, de esta manera impide la actividad catalítica de la PLA₂, o que el sustrato esté disponible (Davidson *et al.*, 1987; Oh *et al.*, 2000). Estudios enzimáticos, han mostrado que la

lipocortina-1 inhibe a la cPLA₂ por una interacción específica y dependiendo del tipo celular, la expresión de algunas isoformas de lipocortina puede ser regulada por GCC que podrían impedir que se libere el 20:4n-ω6, evitando la producción posterior de eicosanoides y la generación de daño mediado por ROS (Lim y Pervaiz, 2007). Los resultados obtenidos en la mezcla, la frecuencia de mutación disminuye con respecto a los testigos concurrentes, probablemente por este mecanismo (inhibiendo a PLA₂). También se ha reportado que COX-2 es el blanco potencial de los GCC ya que inhibe la síntesis de prostanoides presentando acción dual (Goppelt-Struebe, 1997; Sánchez y Moreno, 1999; Samuelsson *et al.*, 2007). Los tratamientos en los que se obtienen menores porcentajes de 20:4n-ω6, indican que probablemente COR inhibió a la COX y de manera directa interferiría con la producción de prostanoides y la generación de ROS (Nakamura *et al.*, 2003).

Aparentemente no hay una interacción entre los compuestos empleados, para confirmar dicha respuesta, se empleó un segundo tratamiento en el que las larvas fueron expuestas primero al TPA y posteriormente a la COR (tratamiento secuencial), los resultados obtenidos son similares a los del tratamiento en el que se mezclan los compuestos, aumenta el contenido de lípidos, disminuye el contenido 20:4n-ω6, no es tóxica y disminuye la frecuencia de mutación.

Para proponer los probables mecanismos de acción de la inhibición de la genotoxicidad, en los tratamientos positivos con TPA, en la mezcla se mantiene la misma tendencia, disminuyó el contenido de 20:4n-ω6, para este tratamiento se puede apreciar que sí hubo liberación de 20:4n-ω6 mediante la PLA₂ (porque la frecuencia de mutación se incrementó) y posteriormente fue inhibida por la COR, el poco 20:4n-ω6 libre ya no pudo ser biotransformado por la COX que también fue inhibida (debido a la naturaleza del tratamiento donde los dos compuesto se pusieron al mismo tiempo), por lo tanto se puede observar que el 20:4n-ω6 disminuye, no se generaron eicosanoides, ni daño oxidativo y se ve reflejado en la disminución de la frecuencia de mutación. Por lo cual proponemos para la mezcla que la COR pudo inhibir el primer (PLA₂) y segundo paso (COX) del metabolismo del 20:4n-ω6.

En el tratamiento secuencial no hay cambios aparentes en las dos concentraciones probadas se puede apreciar que el contenido de 20:4n-ω6 no cambia drásticamente en estos tratamientos. Se sugiere para este tratamiento, que la COR no inhibió a la PLA₂ (el primer paso) ya que se mantienen constantes los niveles de 20:4n-ω6 y solo inhibió a COX (segundo paso), no se generaron los prostanoides ni la generación de ROS.

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, proponemos que *Drosophila* y el metabolismo basado en el 20:4n- ω 6 puede ser utilizado de manera alternativa para la búsqueda y detección de actividad antiinflamatoria de derivados de origen vegetal y metabolitos con capacidad antioxidante. Además, el uso de este organismo reduce de manera significativa la inversión económica para la selección de posibles compuestos y permite discriminar entre la actividad antiinflamatorios (antioxidante) y la falta de respuesta debido a la citotoxicidad del tratamiento. Es necesario más trabajo experimental para hacer accesible una concentración-efecto y establecer una curva que se centre en el significado biológico de los tratamientos realizados en ratas, ratones y moscas, para hacer una primera aproximación a la sustitución de los mamíferos para la detección de actividades antiinflamatoria y antioxidante. Además, la regulación de las leyes concernientes a la utilización de animales para la investigación biológica se centra en garantizar que las 3R, reducción, perfeccionamiento y sustitución (Reduction, Refinement and Remplacement) se aplique adecuadamente. Todo uso de animales para la investigación básica o de rutina conlleva la responsabilidad de explorar metodologías alternativas para la investigación, encaminada a reducir o evitar el uso de los mamíferos (ESF, 2001).

Se propone a partir de esta investigación, utilizar al TPA como modelo para inducir respuestas inflamatorias en *Drosophila*, ya que funciona como si fuera un parásito que puede llevar a la producción de citoquinas proinflamatorias o al aumento en la expresión y actividad de las enzimas que favorecen la producción de ROS (Fürstenberger *et al.*, 2006; Federico *et al.*, 2007). En *Drosophila*, algunos genes relacionados con la respuesta inmune que son homólogos a los genes humanos han sido ya identificados (St. John y Xu, 1997; Mackay, 2006), dos genes de ODC actividad (Rom y Kahana, 1993); siete PLA₂s genes (Lambeau y Valentín, 2000); genes con actividad similar a la COX (Tootle y Spradling, 2008), seis genes PKC (Shieh *et al.*, 2002) y dNOS (Ray *et al.*, 2007) genes como los de la vía imd (TNF) y Toll (IL-1) (Engström, 1999; Khush *et al.*, 2001). Los GCC inhiben las reacciones inflamatorias, básicamente porque inhiben las mismas rutas en el proceso inflamatorio inducidas por TPA, como interferir con la PLA₂ y la COX (Samuelsson *et al.*, 2007), la inducción de la expresión de genes anti-inflamatorios (lipocortinas), o de manera indirecta bloqueando las vías y TNF- κ B, y AP-1 (Pfahl, 1993). En concordancia con el modelo propuesto los CCG inhiben la respuesta inmune contra los invasores

en *Drosophila*.

El verdadero alcance de la notable similitud entre los invertebrados y vertebrados que se ha puesto en manifiesto en los últimos años, no sólo entre las proteínas, sino entre todo lo celular, las vías del desarrollo y del comportamiento, la biología de *Drosophila* seguirá dando información a la biología humana y se puede esperar que tengan un impacto directo en nuestra comprensión de la salud humana (Bier, 2005).

6. PERSPECTIVAS

También se propone que se deben de realizar investigaciones a futuro, que podrían confirmar la participación de las enzimas en el metabolismo del 20:4n- ω 6 y su relación con la respuesta genotóxica en *Drosophila* que son inducidas por el TPA e inhibidas por la COR.

- Agregar 20:4n- ω 6 exógeno (rescate) a los tratamientos se esperaría que la inhibición de la frecuencia de mutación se revirtiera (aumentara la frecuencia de mutación).
- Probar inhibidores específicos para cada una de las enzimas involucradas (PLA₂, COX y LOX) en la biosíntesis de los eicosanoides ya que los empleados en la presente investigación tiene acción dual.
- Probar que el 20:4n- ω 6 se biotransforma a eicosanoides (PGs, TXs, LTs, entre otros).
- Terminar de afinar la metodología para caracterizar daño oxidativo (lipoperoxidación) inducido por el TPA, mediante la presencia de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

6. PERSPECTIVAS

También se propone que se deben de realizar investigaciones a futuro, que podrían confirmar la participación de las enzimas en el metabolismo del 20:4n- ω 6 y su relación con la respuesta genotóxica en *Drosophila* que son inducidas por el TPA e inhibidas por la COR.

- Agregar 20:4n- ω 6 exógeno (rescate) a los tratamientos se esperaría que la inhibición de la frecuencia de mutación se revirtiera (aumentara la frecuencia de mutación).
- Probar inhibidores específicos para cada una de las enzimas involucradas (PLA₂, COX y LOX) en la biosíntesis de los eicosanoides ya que los empleados en la presente investigación tiene acción dual.
- Probar que el 20:4n- ω 6 se biotransforma a eicosanoides (PGs, TXs, LTs, entre otros).
- Terminar de afinar la metodología para caracterizar daño oxidativo (lipoperoxidación) inducido por el TPA, mediante la presencia de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

7. CONCLUSIONES

- 1) El ácido araquidónico (20:4n-ω6) está presente en las larvas de tipo silvestre y de la cruce estándar de *Drosophila*.
- 2) El 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) es un inductor del metabolismo del ácido araquidónico, reduce la sobrevivencia de los organismos tratados e induce genotoxicidad en *Drosophila* mediante ROS.
- 3) La cortisona aumenta el contenido de lípidos, disminuye el contenido de 20:4n-ω6, y no es genotóxica para la mosca.
- 4) La cortisona reduce la frecuencia de mutación y recombinación somáticas, inducida por el TPA.
- 5) El tratamiento con la mezcla probablemente inhibe el primer (PLA₂) y segundo paso (COX) de la biosíntesis de eicosanoides (metabolismo de 20:4n-ω6).
- 6) El tratamiento combinado probablemente inhibe el segundo paso en la biosíntesis de eicosanoides.
- 7) El 20:4n-ω6 es importante en la inducción de la genotoxicidad en *Drosophila* ya que los niveles de éste son diferentes en los tratamientos, y se esperaría que al agregar 20:4n-ω6 a los tratamientos (mezcla y secuencia) la frecuencia de mutación se incrementaría.

Anexo 1

Prueba de mutación y recombinación somáticas, bioensayo de alas

La prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila* (Somatic Mutation And Recombination Test, SMART; también conocida como prueba de manchas en las alas), es una metodología eficiente para la detección de la actividad genotóxica de compuestos químicos puros, mezclas complejas, y también es útil para estudios de antigenotoxicidad. Es rápida para evaluar el potencial mutagénico por inducir la pérdida de heterocigosidad, que resulta en la mutación, reordenación cromosómica, rotura de cromosoma o pérdida de cromosomas (Rodrigues *et al.*, 2004). Es un sistema que permite detectar la capacidad de los compuestos para inducir mutación somática y recombinación mitótica. Este tipo de estudios cobra día con día gran importancia debido a que existe correlación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis. Además de ser un sistema relativamente rápido, el número de células del ala por organismo es elevado (24,400 células) (Clements *et al.*, 1988).

Esta metodología se basa en el desarrollo de *Drosophila*, de manera que la inducción de alteraciones en la información genética (pérdida de heterocigosidad) de las células de los discos imagales durante el desarrollo se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas derivadas de la célula madre mutante, constituyendo así un clon celular que se expresará en el cuerpo de la mosca adulta como una “mancha” mutante distinguible, cuando se utilizan marcadores fenotípicos apropiados (Baker *et al.*, 1978; Graf *et al.*, 1984; Vogel y Zijlstra, 1987) (Figs. 24 y 25).

El bioensayo hace uso de líneas con marcadores genéticos recesivos que se ubican en el brazo izquierdo del cromosoma 3:

- 1) Hembras $flr^3/In(3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s$. El marcador flr^3 (3-38.8 unidades de mapa; um) es letal en condición homocigótica a nivel de organismo, pero en células somáticas, altera la apariencia del tricoma en forma de flama, para su mantenimiento se requiere del cromosoma balanceador $TM3$, el cual porta como marcador al alelo Beaded-Serrate (Bd^s) (Adornado-Serrata 3-91.9 um), originalmente llamado Serrata (Ser) es también letal en condición homocigótica ($flr^3/TM3, Bd^s$ abreviado). La constitución genética del balanceador $TM3$ (balanceador en cromosoma tres, con múltiples inversiones, tercera versión), incluye marcadores recesivos ri (radio incompleto, venas del ala interrumpidas), p^p (ojos color durazno), sep (separado, venas posteriores de las alas ausentes), bx^{34e} (ornamentado, ala con

muesca), e^s (cuerpo color ébano) que por encontrarse en heterocigosis no influyen en la respuesta obtenida. El orden de las inversiones de este balanceador son las siguientes: 1A1—1A8|61A2—65E|85E—79E|100C—100F2|92D1—85E|65E—71C|94D—93A|76C—71C|94F—100C|79E—76C|93A—92E1|100F3—100F5.

- 2) Machos *mwh/mwh*. El marcador *mwh* (*multiple wing hair*) (3-0.0 um) es una mutación recesiva y viable en condición homocigótica que provoca la producción de tricomas múltiples de 2 a 14 por célula, comparado con un tricoma por célula en las moscas de tipo silvestre.

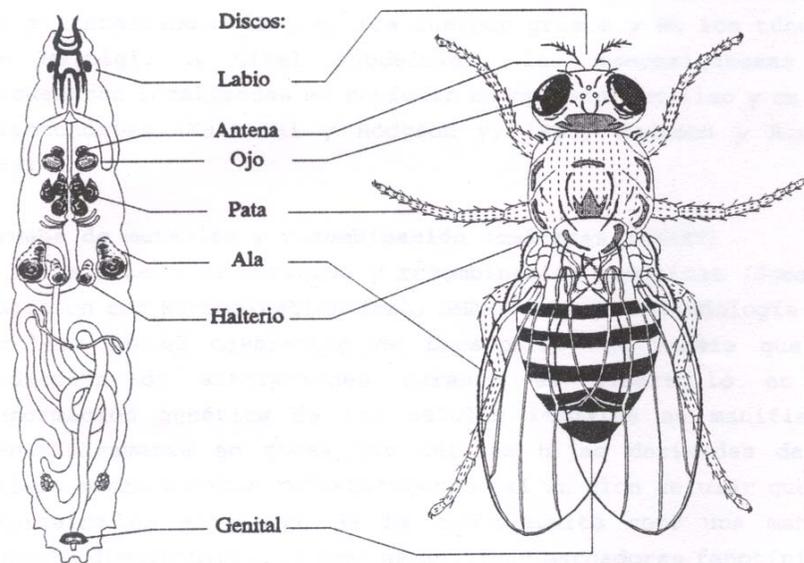


Fig. 24 Los discos imaginales de *Drosophila* por una serie de divisiones mitóticas originan diversas estructuras del adulto.

Para una descripción más detallada de los marcadores genéticos y del cromosoma balanceador consultar Lindsley y Grell, 1968; García Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1992.

La cruce progenitora se realiza con hembras vírgenes $flr^3/TM3$, Bd^s de 72 h de edad y machos *mwh/mwh* de 48 h.

La duración de la etapa sensible para aplicar la prueba es la fase larvaria, permite diseñar protocolos agudos (horas), crónicos (días) o secuenciales que incluyan tratamientos consecutivos o bien combinaciones de éstos: subcrónico-agudo, agudo-subcrónico y mezclas. Lo anterior resulta

importante si se busca establecer la existencia de sinergismo positivo (potenciación), o de sinergismo negativo (antagonismo) entre dos o más sustancias (Casarett, 1975).

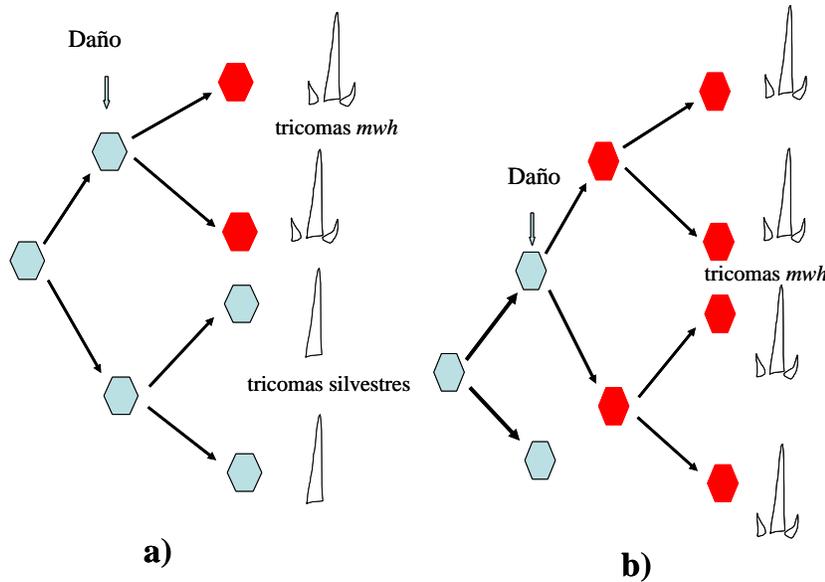


Fig. 25 Producción de clones *mwh* (pelos múltiples) en células de las alas: a) origen de una mancha chica; b) origen de una mancha grande.

De la cruce estándar, se obtienen larvas trasheterocigóticas flr^3/mwh que conforman la mitad de la progenie y la otra mitad consiste en larvas $TM3, Bd^8/mwh$. Durante la metamorfosis, las células que constituyen la hoja del ala forman un proceso unicelular, de manera que la cuantificación de pelos o tricomas es equivalente con las células que les dieron origen (Graf *et al.*, 1984).

Las alteraciones genéticas causan fenotipos reconocibles en las células de las alas, de manera que en un contexto de tricomas silvestres, pueden observarse tricomas que expresan el fenotipo flr^3, mwh o ambos. La recombinación mitótica entre los marcadores mwh y flr^3 genera manchas sencillas mwh . Además las manchas sencillas (un solo marcador) pueden originarse por otros eventos genéticos terminales monitoreados también como pérdida de heterocigocidad, tales como delección, mutación puntual, pérdida de cromosomas y no disyunción (Graf *et al.*, 1984; Vogel *et al.*, 1999). La recombinación mitótica entre flr^3 y el centrómero produce manchas gemelas (los dos marcadores, $mwh-flr^3$), que por su origen son un indicador de recombinación (Fig. 26).

En general, el tamaño de un clon es mayor cuando se induce en larvas jóvenes (24 a 48 h), y de menor tamaño si se producen en larvas de mayor edad (72 o más h); ya que mientras más avanza la edad de la larva se tienen más células blanco que participarán en menos divisiones mitóticas (García

Bellido y Merriam, 1971; Szabad *et al.*, 1983) (Fig. 25).

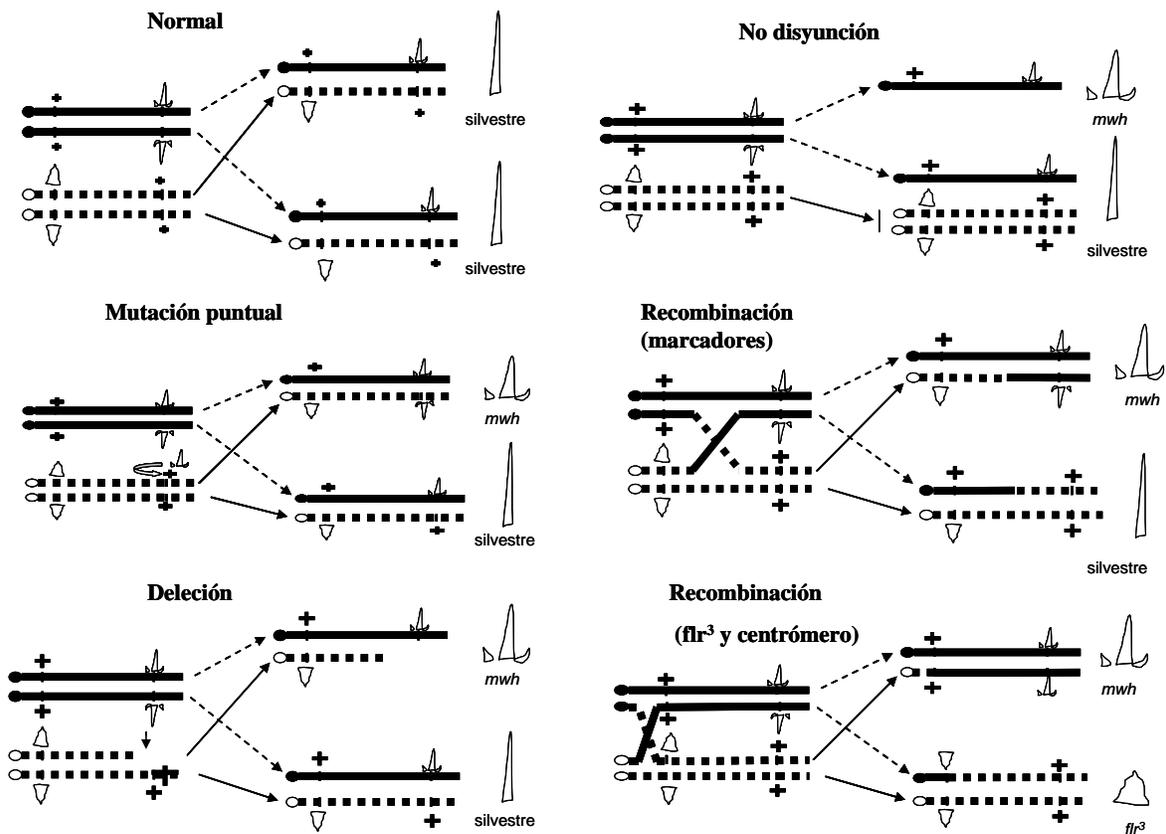


Fig. 26 Eventos genéticos terminales que posiblemente detecta la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) de *Drosophila*. El único evento que realmente sucede es el de recombinación entre *flr³* y el centrómero (genera manchas gemelas).

Análisis de las alas

Las moscas que se recuperan de los tratamientos se sacrifican por exceso de anestesia (éter dietílico) y se fijan Etanol al 70 %. Las alas se separan y se montan en portaobjetos utilizando solución Fauré (30 mg de goma arábica, 20 ml glicerol, 50 mg hidrato de cloral en 50 ml de agua) (Graf *et al.*, 1984). Cada laminilla consta de 40 alas (20 de hembras y 20 de machos) y se analiza la superficie ventral y dorsal de la hoja de cada ala con un microscopio óptico a un aumento de 40X. Cada mancha se registra de acuerdo a la sección del ala en la que se localiza (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984); y se agrupan en tres diferentes categorías: 1) manchas chicas sencillas (una o dos células), 2) manchas grandes sencillas (tres o más

células), 3) manchas gemelas (formada por los marcadores *flr³* y *mwh*) y 4) la suma de todas las manchas (Fig. 27).

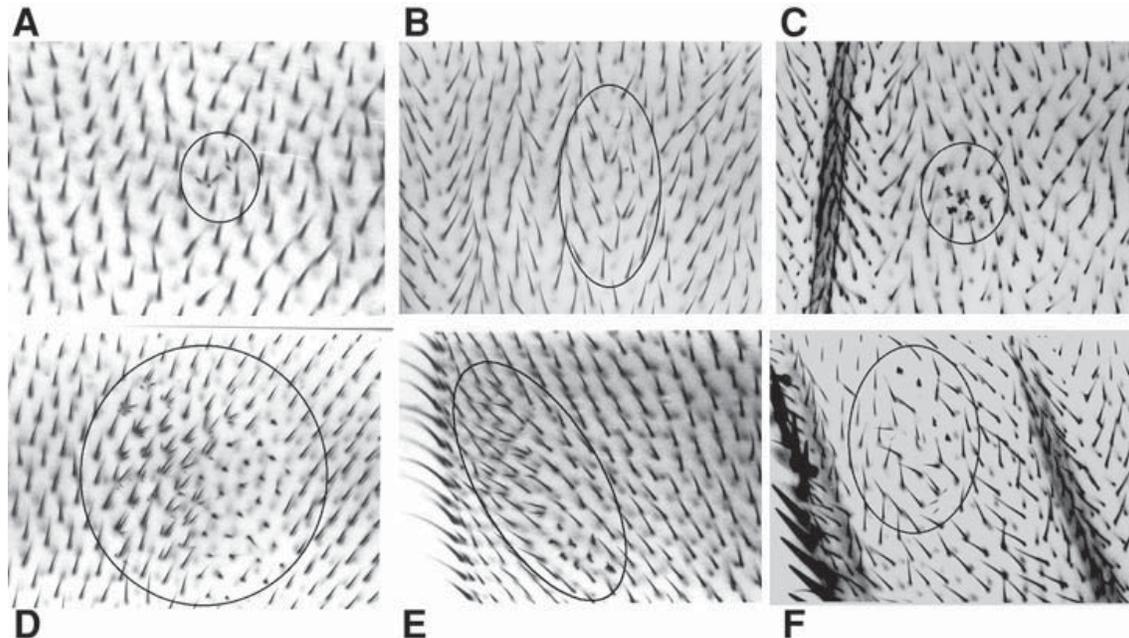


Fig. 27 Diferentes tipos de clones (manchas) y sus variaciones: (A) manchas chica sencilla con dos células que expresan el fenotipo *mwh*; (B) mancha grande sencilla con cinco células expresando el fenotipo *mwh*. (Tenga en cuenta que este tipo de mancha contiene solo un tricoma con tres pelos, junto con cuatro células con dos pelos); (C), mancha grande sencilla con seis células expresando fenotipo *flr³*; (D) mancha gemela de 60 células, 30 células que expresan el fenotipo *mwh* y 30 que expresan el fenotipo *flr³*; (E) mancha gemela con 14 células que expresan el fenotipo *mwh* y 8 células que expresan el fenotipo *flr³*; (F) mancha gemela con 4 células que expresan el fenotipo *mwh* y 4 células que expresan fenotipo *flr³* (Tomado de Rodrigues *et al.*, 2004).

Análisis estadístico

Para la evaluación de los efectos genotóxicos registrados, la frecuencia de manchas por un ala de la serie tratada es comparada con la serie control negativa concurrente (disolvente). Un procedimiento de decisión múltiple se utiliza para decidir si un resultado es positivo, débil positivo, indeterminado o negativo (Frei y Würzler, 1988; Frei y Würzler, 1995).

En experimentos diseñados para evaluar la mutagenicidad de un producto químico determinado, la mayoría de las veces la serie tratada se compara con la serie control para establecer si el compuesto utilizado en el tratamiento debe de ser considerado como mutágeno o no mutágeno.

La formulación de dos hipótesis alternativas permite distinguir entre las posibilidades de resultados: positivos, débil positivo, indeterminado, o resultados negativos de un experimento.

La hipótesis nula (H_0), asume que no hay diferencia en la frecuencia de mutación entre el

control y la serie tratada. El rechazo de la hipótesis nula indica que el tratamiento resultó estadísticamente en aumento de la frecuencia de mutación. La hipótesis alternativa (H_A) postula a priori, que el tratamiento aumentó la frecuencia de mutación comparada con la frecuencia espontánea. Esta hipótesis alternativa es rechazada si la frecuencia de mutación observada es significativamente menor que el aumento de la frecuencia postulada. El rechazo indica que el tratamiento no produce el aumento necesario para considerar al compuesto como mutagénico. Si ninguna de las dos hipótesis es rechazada, los resultados se consideran indeterminados ya que no se puede aceptar, al mismo tiempo, dos hipótesis mutuamente excluyentes. En la aplicación práctica del procedimiento de decisión, se define una hipótesis alternativa específica requerida para que la frecuencia de la mutación en la serie tratada sea m veces la serie control, que luego se utilizará junto con la hipótesis nula. Puede suceder en este caso, que ambas hipótesis hayan sido rechazadas. Esto significaría que el tratamiento tiene un efecto mutagénico débil y conduce a una frecuencia de mutación que es significativamente menor que m veces la frecuencia de control (Frei y Würigler, 1988).

En resumen:

- a) Si se acepta H_0 y H_A es rechazada: negativo. Si H_0 y H_A son aceptados: indeterminado.
- b) Si se rechaza H_0 y H_A es aceptada: positivo. Si H_0 y H_A son rechazadas: débil positivo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Ali, I. y J.E. Hetele (1997) Evidence that free fatty acids in trophocytes of *Periplaneta americana* fat body may be regulated by the activity of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** **27**:681-692.
- ✓ Amat, R., G. Solanes., M. Giralt, y F. Villarroya (2007) SIRT1 is involved in glucocorticoid mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription. **J. Biol. Chem.** **282**:34066-34076.
- ✓ Baker, B.S., A.T.C. Carpenter, y P. Ropoll (1978) The utilization during mitotic cell division of loci controlling meiotic recombination and disjunction in *Drosophila melanogaster*. **Genetics.** **90**:531-578.
- ✓ Barnes, P.J. (1995) Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. **Biochem. Soc. Trans.** **23**:940-945.
- ✓ Bedick, J.C., H. Tunaz., A.R. Nor Aliza., S.M. Putnam., M.D. Ellis, y D.W. Stanley (2001) Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. **Com. Biochem. Physiol. C.** **130**:107-417.
- ✓ Bedick, J.C., R.L. Pardy., R.W. Howard, y D.W. Stanley (2000) Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids. **J. Insect Physiol.** **46**:1481-1487.
- ✓ Bier, E. (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nat. Rev. Genet.** **6**:9-23.
- ✓ Blobaum, A.L. y L.J. Marnett (2007) Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **J. Med. Chem.** **50**:1425-1441.
- ✓ Boone, C., F. Grégoire., L. De Clercq, y C. Remacle (1998) 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) stimulates the adipose conversion of piglet preadipocytes in primary culture. **Cell Mol. Biol.** **44**:1265-1274.
- ✓ Bowman, A.S., C.L. Gengler., M.R. Surdick., K. Zhu., R.C. Essenberg., J.R. Sauer, y J.W. Dillwith (1997) A novel phospholipase A₂ activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). **Exp. Parasitol.** **87**:121-132.
- ✓ Buckingham, J.C. y Flower R.J. (1997) Lipocortin 1: a second messenger of glucocorticoid action in the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Mol. Med. Today** **3**:296-302.
- ✓ Bunday, S., S. Raymond., P. Dean., S.K. Roberts., R.J. Dillon, y A.K. Charnley (2003) Eicosanoid involvement in the regulation of behavioral fever in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **52**:183-92.
- ✓ Büyükgüzel, E., H. Tunaz., D. Stanley, y K. Büyükgüzel (2007) Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. **J. Insect Physiol.** **53**:99-105.
- ✓ Capdevila J.H., D. Zeldin., K. Makita., A. Karara, y J.R. Falck (1995) Cytochrome P450 and Metabolism of arachidonic acid and oxygenated eicosanoids. **En Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry** (P.R. Ortiz de Montellano eds.) Plenum Press. New York. pp 443-471.
- ✓ Carton, Y., F. Frey., D.W. Stanley., E. Vass, y A.J. Nappi (2002) Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. **J. Parasitol.** **88**:405-407.
- ✓ Casarett, L.J. (1975) Origin and scope of Toxicology. **En: Toxicology, the basis science of poison.** (L. J. Casarett y Doull eds.). Nueva York. MacMillan Pub. 3-17 pp.
- ✓ Chen, J.H., C.N. Hales, y E. Ozanne (2007) DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? **Nucleic Acids Res.** **35**:7417-7428.

- ✓ Christ-Hazelhof E. y D.H. Nugteren (1982) Isolation of PGH-PGD isomerase from rat spleen. **Methods Enzymol.** **86**:77-84.
- ✓ Chyb, S., P. Raghu, y R.C. Hardie (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. **Nature** **397**:255-259.
- ✓ Clark A.M. The use of larval of *Drosophila* in screening for soma naturally occurring mutagens. **Mutat. Res.** **92**:89-97.
- ✓ Clements J., D. Howe., M. Phillips, y N.K. Todd (1988) The *Drosophila* wing tests: a comparison of the sensitivity of different strains. **Mutat. Res.** **203**:117-123.
- ✓ Companioni, G.S. (1995) Ácido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. **Rev. Cub. Invest. Biom.** **14**:3-8.
- ✓ Corey, E.J., H. Niwa., J.R. Falck., C. Mioskowski, y A. Marfat (1980) Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoides. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.** **6**:19-25.
- ✓ Cummings, B.S., J. McHowat, y R.G. Schnellmann (2000) Phospholipase A₂s in cell injury and death. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **294**:793-799.
- ✓ Dadd, R.H. (1981) Essential fatty acids for mosquitoes, other insects and vertebrates. **En Current Topics in Insects Endocrinology and Nutrition.** (G. Bhaskaran, S. Friedman, and J.G. Rodriguez, eds.). New York: Plenum Press, pp184-214.
- ✓ Daniel, Z.C., S.E. Richards., A.M. Salter, y P.J. Buttery (2004) Insulin and dexamethasone regulate stearyl-CoA desaturase mRNA levels and fatty acid synthesis in ovine adipose tissue explants. **J. Anim. Sci.** **82**:231-237.
- ✓ Davidson F.F., E.A Dennis., M. Powell, y J.R. Glenney (1987) Inhibition of phospholipase A₂ by “lipocortins” and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipids. **J. Biol. Chem.** **262**:1698-1705.
- ✓ Day, R.O. (1988) Mode of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Med. J. Aust.** **148**:195-199.
- ✓ De Zwart, L.L., J.H Meerman., J.N. Commandeur, y N.P. Vermeulen (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** **26**:202-226.
- ✓ Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Bio l. Chem.** **269**:13057-13060.
- ✓ Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends. Biochem. Sci** **22**:1-2.
- ✓ Dinarello, C.A. (1989) Interleukin-1 and the effects of ciclooxigenase inhibitors on its biological activities. **Bull N. Y. Acad. Med.** **65**:80-92.
- ✓ Ding, X.Z., R. Hennig, y T.E. Adrian (2003) Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. **Mol. Cancer** **2**:10.
- ✓ Dzarlieva, R.T. y N.E. Fusenig (1982) Tumor promoter 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate enhances sister chromatid exchanges and numerical and structural chromosome aberrations in primary mouse epidermal cell cultures. **Cancer Lett.** **16**:7-17.
- ✓ Earnest, D.L., L.J. Hixson., P.R. Finley., G.G. Blackwell., J. Einspahr., S.S Emerson, y D.S. Alberts (1992) Arachidonic acid cascade inhibitors in chemoprevention of human colon cancer: Preliminary studies **En: Cancer**

chemoprevention (L. Wattenberg; M Lipkin; C.W. Boone y G.J. Kelloff eds.) CRC Press. Boca Raton Florida 165 pp.

- ✓ Emerit, I, y P.A. Cerutti (1982) Tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** **79**:7509-7513.
- ✓ Emerit, I. y M. Lahoud-Maghani (1989) Mutagenic effects of TPA-induced clastogenic factor in Chinese hamster cells. **Mutat. Res.** **214**:97-104.
- ✓ Emerit, I. y P.A. Cerutti (1981) Tumor promoter phorbol-12myristate-13acetate induces chromosomal damage via indirect action. **Nature** **293**:144-146.
- ✓ Engström, Y. (1999) Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. **Dev. Comp. Immunol.** **23**:345-358.
- ✓ European Science Foundation (2001) Use of Animals in Research. ESF 2001.
- ✓ Farr, G.A., L.G. Zhang, y P. Tattersall (2005). Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** **102**:17148-17153.
- ✓ Federico, A., F. Morgillo., C. Tuccillo., F. Ciardiello, y C. Loguercio (2007) Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int. J. Cancer** **121**:2381-2386.
- ✓ Flower, R.J. y N.J. Rothwell (1994) Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci.** **15**:71-76.
- ✓ Folch, J., M. Lees, y G.H.S. Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** **226**:497-509.
- ✓ Frei, H. y F.E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutat. Res.** **203**:297-308.
- ✓ Frei, H. y F.E. Würgler (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.** **334**: 247-258.
- ✓ Fujikawa, R., Y. Fujikawa., N. Iijima, y M. Esaka (2005) Molecular cloning, expression, and characterization of secretory phospholipase A₂ in tobacco. **Lipids** **40**:901-908.
- ✓ Fürstenberger, G., P. Krieg., K. Müller-Decker, y A.J. Habenicht (2006). What are cyclooxygenase and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? **Int. J. Cancer** **119**:2247-2254.
- ✓ Gadelhak, G.G. y D.W. Stanley-Samuels (1994) Incorporation of polyunsaturated fatty acids into phospholipids of hemocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** **24**:775-785.
- ✓ Gadelhak, G.G., V.K. Pedibhotla, y D.W. Stanley-Samuels (1995) Eicosanoid biosynthesis by hemocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** **25**:743-749.
- ✓ García Gil de Muñoz, F.L., J. Martínez-Barnette., H. Lanz-Mendoza., M.H. Rodríguez, y F.C. Hernández-Hernández (2008) Prostaglandin E₂ modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of *Anopheles albimanus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **68**:14-25.
- ✓ García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutant in *Drosophila*. **Mol. Gen Genet.** **128**:117-130.
- ✓ García-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila*

melanogaster. **Dev. Biol.** **24**:61-87.

- ✓ Gijón M.A. y C.C. Leslie (1999) Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. **J. Leukoc. Biol.** **65**:330-336.
- ✓ Gijón, M.A., Spencer D.M., A.L. Kaiser, y C.C. Leslie (1999) Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A₂. **J. Cell Biol.** **145**:1219-1232.
- ✓ Goodwin, J.S., A.D. Bankhurst, y R.P. Messner (1977) Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. **J. Exp. Med.** **146**:1719-1734.
- ✓ Goodwin, J.S., R.P. Messner, y G.T. Peake (1978) Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes *in vitro*. Changes with mitogen dose and preincubation. **J. Clin. Invest.** **62**:753-760.
- ✓ Goppelt-Struebe, M (1997) Molecular mechanism involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochem. Pharmacol.** **53**:1389-1395.
- ✓ Graf, U., F.E. Würzler., A.J. Katz., H. Frei., H. Juon., C.B. Hall, y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.** **6**:153-188.
- ✓ Gurr, M.I. y J.L. Harwood (1991) **Lipid Biochemistry**. Chapman & Hall. London. 406 pp.
- ✓ Hällström, I. (1987) Genetic variation in cytochrome P-450dependent demethylation in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Pharmacol.** **36**:2279-2282.
- ✓ Halushka, P.V., C.J. Allan, y K.L. Davis-Bruno (1995) Thromboxane A₂ receptors. **J. Lipids Mediat Cell Signal.** **12**:361-378.
- ✓ Halushka, P.V., D.E. Mais., P.R. Mayeux, y T.A. Morinelli (1989) Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **29**:213-239.
- ✓ Hansen, H.S. (1989) **Linoleic acid-essential fatty acid an eicosanoids precursor** . Bondegaard Trykas. Herlev, Denmark. 129 pp.
- ✓ Herrera-Ortiz, A., H. Lanz-Mendoza, J. Martínez-Barnetche., S. Hernández-Martínez., C. Villarreal-Treviño., L. Aguilar-Marcelino, y M.H. Rodríguez (2004) *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**:893-901.
- ✓ Herschman, H.R. (1994) Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. **Cancer Metastasis Rev.** **13**:241-256.
- ✓ Hirata, M., F. Ushikubi, y S. Narumiya (1995) Prostaglandin I receptor and prostaglandin D receptor **J. Lipid Mediat. Cell Signal.** **12**:393-404.
- ✓ Hirose, Y., K. Tabuchi., K. Oikawa., H. Murashita., S. Sakai, y A. Hara (2007) The effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU486 and phospholipase A₂ inhibitor quinacrina on acoustic injury of the mouse cochlea. **Neurosci. Lett.** **413**:63-67.
- ✓ Holbrook, N.J., S.G. Carlson., A.M. Choi, y J. Fagnoli (1992) Induction of HSP70 gene expression by the antiproliferative prostaglandin PGA₂: a growth-dependent response mediated activation of heat shock transcription factor. **Mol. Cell. Biol.** **12**:1528-1534.
- ✓ Honn, K.V., D.G. Tang., X. Gao., I.A. Butovich., B. Liu., J. Timar, y W. Hagmann (1994) 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** **13**:365-396.

- ✓ Howard, R.W. y D.W. Stanley-Samuelson (1990) Phospholipid fatty acid composition and arachidonic acid metabolism in selected tissues of adult *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** **83**:975-981.
- ✓ Howard, R.W., N.A. Witters, y D. W. Stanley-Samuelson (1992) Phospholipid fatty acid composition and distribution patterns of prostaglandins in malpighian tubules of the yellow mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** **85**:489-498.
- ✓ Ivanov, I.V., N.V. Groza, y G.I. Myagkova (1999) Cytochrome P450-dependent metabolism of arachidonic acid. **Biochemistry (Moscu)** **64**:725-737.
- ✓ Jahn, U., J.M. Galano, y T. Durand (2008) Beyond prostaglandins-chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathway from polyunsaturated fatty acids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **47**:5894-5955.
- ✓ Kanai, N., R. Lu., J.A. Satriano., Y. Bao., A.W. Wolkoff, y V.L. Schuster (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. **Science** **268**:866-869.
- ✓ Kelloff G.J., C.W. Boone., V.E. Steele., R. Judith, y C.C. Sigman (1995) Inhibition of chemical carcinogenesis. **En: Chemical induction of cancer** (J.C. Arcos ed.) Birkhauser Boston pp. 73-109.
- ✓ Khush, R.S., F. Leulier, y B. Lemaitre (2001) *Drosophila* immunity: two paths to NF-kappaB. **Trends. Immunol.** **22**:260-264.
- ✓ Kudo, I. (1991) Mammalian cellular phospholipases A₂ and their physiological roles. **Yakugaku Zasshi** **111**:448-498.
- ✓ Kuhn, H. y B.J. Thiele (1995) Arachidonate 15-lipoxygenase. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.** **12**:157-170.
- ✓ Lanz-Mendoza, H., S. Hernández-Martínez., M. Ku-López., M.C Rodríguez., A. Herrera-Ortiz, y M.H. Rodríguez (2002) superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midguts is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. **J. Parasitol.** **88**:702-706.
- ✓ Lavine, M.D. y M.R. Strand (2002) Insects hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**:1295-1309.
- ✓ Lawson J.A., J. Rokach, y G.A. FitzGerald (1999) Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo*. **J. Biol. Chem.** **274**:24441-24444.
- ✓ Le Berre, L., T. Takano., J. Papillon., S. Lemay, y A.V. Cybulsky (2006) Role of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in the activation of cytosolic phospholipase A₂-α. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** **81**:113-125.
- ✓ Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.** **272**:16709-16712.
- ✓ Levine, L. y A. Hassid (1977) Effects of phorbol-12, 13-diesters on prostaglandin production and phospholipase activity in canine kidney (MDCK) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **79**:477-484.
- ✓ Ligoxigakis, E.K., G.A. Fragkiadakis., A.G. Manganaris., D.J. Vakalounakis, y K.K. Thanassoulopoulos (2002) Isozyme variation in *Verticillium dahliae* isolates from Crete. **Folia Microbiol.** **47**:167-170.
- ✓ Lim, L.H. y S. Pervaiz (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.** **21**:968-975.
- ✓ Lindsley, D.L. y G.G. Zimm (1992) **The genome of *Drosophila melanogaster***. Academic Press. Inc. San Diego Cal. USA. 1132 pp.

- ✓ Lindsley, D.L. y R. Grell (1968) **Genetic variations of *Drosophila melanogaster***. Carnegie Institution of Washington Publication Washington. 472 pp.
- ✓ Li-Stiles, B., H.H. Lo, y S.M. Fischer (1995) Differential activation in keratinocyte phospholipase A₂s by tumor promoters and growth factor. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** **36**:504.
- ✓ Li-Stiles, B., H.H. Lo, y S.M. Fischer (1997) Differential activation of keratinocyte phospholipase A₂s by tumor promoters and other irritants. **Adv. Exp. Med. Biol.** **407**:117-21.
- ✓ Mackay, T.F. y R.R. Anholt (2006) Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** **7**:339-367.
- ✓ Marks, F., K. Müller-Decker, y G. Fürstenberger (2000) A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. **Toxicology** **153**:11-26.
- ✓ Marnett, L.J. (1992) Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res.** **52**:5575-5589.
- ✓ Mathews, C.K. y K.E. van Holde (1990) **Biochemistry** Benjamin/Cummins. USA. 1129 pp.
- ✓ McIntosh, J.M., F. Ghomashchi., M.H. Gelb., D.J. Dooley., S.J. Stoehr., A.B. Giordani., S.R. Naisbitt, y B.M. Olivera (1995) Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. **J. Biol. Chem.** **270**:3518-3526.
- ✓ McKechnie, S.W. y B.W. Geer (1993) Long-chain dietary fatty acids affect the capacity of *Drosophila melanogaster* to tolerate ethanol. **J. Nutr.** **123**:106-116.
- ✓ Medeiros, M.N., L.H. Mendoca., A.L. Hunter., G.O. Paiva-Silva., F.G. Mello., I.P. Henze., H. Masuda., C.M. Maya-Monteiro, y E.A. Machado (2004) The role of lipoxygenase products on the endocytosis of yolk proteins in insects: participation of cAMP. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **55**:178-187.
- ✓ Merchant, D., R.L. Ertl., S.I. Rennard., D.W. Stanley, y J.S. Miller (2008) Eicosanoids mediate insect hemocyte migration. **J. Insect. Physiol.** **54**:215-221.
- ✓ Metters, K.M. (1995) Leukotriene receptors. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.** **12**:413-427.
- ✓ Michel, K., C. Suwanchaichinda., I. Morlais., L. Lambrechts., A. Cohuet., P.H. Awono-Ambene., F. Simard., D. Fontenille., M.R. Kanost, y F.C. Kafatos (2006) Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **103**:16858-63.
- ✓ Miller J.S., R.W. Howard., T. Nguyen., A. Nguyen., R.M.T. Rosario, y D.W. Stanley-Samuelson (1996) Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*. **J. Insect. Physiol.** **42**:3-12.
- ✓ Miller J.S., T. Nguyen, y D.W. Stanley-Samuelson (1994) Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** **91**:12418-12422.
- ✓ Moolenaar, W.H., O. Kranenburg., F.R. Postma, y G.C. Zondag (1997) Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. **Curr. Opin. Cell Biol.** **9**:168-173.
- ✓ Moonen, P., M. Buytenhek, y D.H. Nugteren (1982) Purification of PGH-PGE isomerase from sheep vesicular glands. **Methods Enzymol.** **86**:84-91.
- ✓ Morrow J.D., K.E. Hill., R.F. Burk., T. M. Nammour., K.F. Badr, y L.J. Robert (1990) A series prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. **Proc. Nat.**

Acad. Sci. USA. **87:**9383-9387.

- ✓ Murakami, A., Y. Nakamura., K. Torikai., T. Tanaka., T. Koshiba., K. Koshimizu., S. Kuwahara., Y. Takahashi., K. Ogawa., M. Yano., H. Tokuda., H. Nishino., Y. Mimaki., Y. Sashida., S. Kitanaka, y H. Ohigashi (2000a) Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice, **Cancer Res.** **60:**5059-5066.
- ✓ Murakami, M., H. Naraba., T. Tanioka., N Semmyo., Y. Nakatani., F. Kojima., T. Ikeda., M. Fueki., A. Ueno., S. Oh, y I. Kudo (2000b) Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.** **275:**32783-32792.
- ✓ Nakamura, Y., M. Kozuka., K. Naniwa., S. Takabayashi., K. Torikai., R. Hayashi., T. Sato., H. Ohigashi, y T. Osawa (2003) Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5- lipoxygenase and cyclooxygenases-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radic. Biol. Med.** **35:**997-1007.
- ✓ Needleman P., J. Turk., B.A. Jakschik., A.R. Morrison, y J.B. Lefkowitz (1986) Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.** **55:**69-102.
- ✓ Negishi M., T. Koizumi, y A. Ichikawa (1995) Biological actions of Δ^{12} -prostaglandin J₂. **J. Lipid Media t. Cell Signal.** **12:**443-448.
- ✓ Negishi M., Y. Sugimoto, y A. Ichikawa (1993) Prostanoid receptor and their biological actions. **Prog. Lipid Res.** **32:**417-434.
- ✓ Nor Aliza, A.R. y D.W. Stanley (1998) A digestive phospholipase A₂ in larval mosquitoes, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** **28:**561-569.
- ✓ Nöthinger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large number *Drosophila* larvae. **Dros. Inf. Serv.** **44:**177.
- ✓ Oh, J., H.J. Rhee., S. Kim., S.B. Kim., H. You., J.H. Kim y D.S. Na (2000) Annexin-1 inhibits PMA-induced *c-fos* SRE activation by suppressing cytosolic phospholipase A₂ signal. **FEBS. Lett.** **477:**244-248.
- ✓ Otto, J.C. y W.L. Smith (1995) Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. **J. Lipid Media t. Cell Sig nal.** **12:**139-156.
- ✓ Pace-Asciak, C.R. y J.M. Martin (1984) Hepoxilin, a new family of insulin secretagogues formed by intact rat pancreatic islets. **Prostaglandins, Leukot. Med.** **16:**173-180.
- ✓ Pace-Asciak, C.R. y S. Asotra (1989) Biosynthesis, catabolism, and biological properties of HPETEs, hydroperoxide derivates of arachidonic acid. **Free Radic. Biol. Med.** **7:**409-433.
- ✓ Pagés, M., J. Roselló., J. Casas., E. Gelpí., N. Gualde, y N. Rigaud (1986) Cyclooxygenase and lipoxygenase-like activity in *Drosophila melanogaster*. **Prostaglandins** **32:**729-740.
- ✓ Park, J.H., C.K. Lee., Y.S. Hwang., K.K. Park, y W.Y. Chung (2008) Hemin inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappa B activation and ornithine decarboxylase expression in 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated mouse skin. **Mutat. Res.** **642:**68-73.
- ✓ Pedibhotla, V.K., G. Sarath., J.R. Sauer, y D.W. Stanley-Samuelson (1995) Prostaglandin biosynthesis and subcellular localization of prostaglandin H synthase activity in the lone star tick, *Amblyhoma americanum*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** **25:**1027-1039.
- ✓ Pfahl, M. (1993) Nuclear receptor/AP-1 interaction. **Endocr. Rev.** **14:**651-658.

- ✓ Prescott, S.M. y F.A. Fitzpatrick (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochim. Bio phys. Acta . 1470**:M69-78.
- ✓ Ragab A., J. Durand., C. Bitsch., H. Chap, y M. Rigaud (1991) The lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in reproductive tissues of the firebrat, *Thermobia domestica* (Thysanura). **Insect Biochem. 21**:321-326.
- ✓ Ray, S.S., R. Sengupta., M. Tiso, M.M. Haque., R. Sahoo., D.W. Konas., K. Aulak., M. Regulski., T. Tully., D.J. Stuehr, y S. Ghosh (2007). Reductase domain of *Drosophila melanogaster* nitric-oxide synthase: redox transformations, regulation, and similarity to mammalian homologues. **Biochemistry. 46**:11865-11873.
- ✓ Raz, A., A Wyche, y P. Needleman (1989) Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86**:1657-1661.
- ✓ Ren, Y., D.S. Loose-Mitchell, y R.J. Kulmacz (1995) Prostaglandin H synthase-1: evaluation of C-terminus function. **Arch. Biochem. Biophys. 316**:751-757.
- ✓ Roberts, L.J. y J.D. Morrow (2000) Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. **Free Radic. Biol. Med. 28**:505-513.
- ✓ Roberts, L.J., C.J. Brame., Y. Chen, y J.D. Morrow (1999a) Novel eicosanoids: isoprostanes and related compounds. **Methods. Mol. Biol. 120**:257-285.
- ✓ Roberts, L.J., C.J. Brame., Y. Chen., J.D. Morrow, y R.G. Salomon (1999b) Formation of reactive products of the isoprostane pathway; isolevuglandins and cyclopentenone isoprostanes. **Adv. Exp. Med. Biol. 469**:335-341.
- ✓ Rodrigues, A. H. H., Reguly M.A y M. Lehmann (2006) Wing somatic mutation and recombination test. En *Methods in molecular biology* (D.S. Henderson eds.). Humana Press Inc. Totowa, N.J. pp 389-412.
- ✓ Rodríguez-Arnaiz R. y P. Ramos-Morales (1992) ***Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos.** Serie de Genética: los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 50 pp.
- ✓ Rokach, J., S.P. Khanapure., S.W. Hwang., M. Adiyaman., J.A. Lawson, y G.A. FitzGerald (1997) The isoprostanes: a perspective. **Prostaglandins. 54**:823-851.
- ✓ Rom, E. y C. Kahana (1993) Isolation and characterization of the *Drosophila* ornithine decarboxylase locus: evidence for the presence of two transcribed ODC genes in the *Drosophila* genome. **DNA Cell Biol. 12**: 499-508.
- ✓ Ryu, Y. Y. Oh., J. Yoon., W. Cho, y K. Baek (2003) Molecular characterization of a gene encoding the *Drosophila melanogaster* phospholipase A₂. **Biochem. Biophys. Acta 1628**:206-210.
- ✓ Saether, T., T.N. Tran., H. Rootwelt., B.O. Christophersen, y T.B. Haugen (2003) Expression and regulation of Δ5-desaturase, Δ6 desaturase, stearoyl-Coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. **Biol. Reprod. 69**:117-124.
- ✓ Samuelsson, B. (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science 220**:568-575.
- ✓ Samuelsson, B; R. Morgenstern y P.J. Jakobsson (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. **Pharmacol. Rev. 59**:207-224.
- ✓ Sánchez, T. y J.J. Moreno (1999) Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and araquidonic acid in skin. **Biochem. Pharma. 58**:877-879.
- ✓ Sato, H. y D.W. Frank (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. **Mol. Microbiol. 53**:1279-1290.

- ✓ Sato, T., H. Yamamoto., N. Sawada., K. Nashiki., M. Tsuji., K. Muto., H. Kume., H. Sasaki., H. Arai., T. Nikawa., Y. Taketani, y E. Takeda (2006) Restraint stress alters the duodenal expression of genes important for lipid metabolism in rat. **Toxicology** **227**:248-261.
- ✓ Sauer, J.R., Bowman A.S., M.M. Shipley., C.L. Gengler., M.R. Surdick., M.R. Surdick., J.L. McSwain., C. Luo., R.C. Essenberg, y J.W. Dillwith (1993) Arachidonate metabolism in tick salivary glands. **En Isects Lipids** (D.W. Stanley-Samuels y D.R. Nelson eds.). University of Nebraska Press, Lincon, NE. pp. 99-138.
- ✓ Schwartz, J.L., M.J. Banda, y S. Wolff (1982) 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induces sister chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. **Mutat. Res.** **92**:393-409.
- ✓ Seo, H.J., K.K. Park., S.S. Han., W.Y. Chung., M.W. Son., W.B. Kim, y Y.J. Surh (2002) Inhibitory effects of the standardized extract (DA-9601) of *Artemisia asiatica* Nakai on phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity, papilloma formation, cyclooxygenase-2 expression, inducible nitric oxide synthase expression and nuclear transcription factor kappa B activation in mouse skin, **Int. J. Cancer** **100**:456-462.
- ✓ Serhan, C.N. (1994) Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. **Biochim. Biophys. Acta** **1212**:1-25.
- ✓ Shieh, B.H., L. Parker, y D. Popescu (2002) Protein kinase C (PKC) isoforms in *Drosophila*. **J. Biochem.** **132**:523-527.
- ✓ Shimizu, M., C. Azuma., T. Taniguchi, y T. Murayama (2004) Expression of cytosolic phospholipase A²_α in murine C12 cells, a variant of L929 cell, induces arachidonic acid release in response to phorbol myristate acetate and Ca²⁺ ionophores, but not tumor necrosis factor-α. **J. Pharmacol. Sci.** **96**:324-332.
- ✓ Shureiqi, I.S., D. Chen., R. Lotan., P. Yang., R.A. Newman., S.M. Fischer, y S.M. Lippman (2000) 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cell. **Cancer Res.** **60**:6846-6850.
- ✓ Six, D.A. y E.A. Dennis (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta.** **1488**:1-19.
- ✓ Smith, W.L. (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. **Biochem. J.** **259**:315-324.
- ✓ Smith, W.L. (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **Am. J. Physiol** **263**:F181-191.
- ✓ Smith, W.L. y L.J. Marnett (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochim. Biophys. Acta** **1083**:1-17.
- ✓ Smith, W.L., D.L. DeWitt, y R.M. Garavito (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann. Rev. Biochem.* **69**:145-182.
- ✓ Smith, W.L., P. Borgeat, y Fitzpatrick (1991) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. **En Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes** (D.E. Vance y Vance J.E. eds.) Amersterdam, Elsiever. pp. 297-325.
- ✓ Smith, W.L., R.M. Garavito, y D.L. DeWitt (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J. Biol. Chem.** **271**:33157-33160.
- ✓ Smoak, K.A. y J.A. Cidlowski (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mech. Ageing Dev.** **125**:697-706.
- ✓ Spector A.A., J.A. Gordon, y S.A. Moore (1988) Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs). **Prog. Lipid. Res.** **27**:271-

- ✓ St. John, M.A. y T. Xu (1997) Understanding human cancer in a fly? **Am. J. Hum. Genet.** **61**:1006-1010.
- ✓ Stanley, D.W. (2006a) Prostaglandins and other eicosanoides in insects: biological significance. **Annu. Rev. Entomol.** **51**:25-44.
- ✓ Stanley, D. W. (2006b) The non-venom insect phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta** **1761**:1883-1390.
- ✓ Stanley, D.W. (2000) **Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems**. Princeton University Press. New Jersey 277 pp.
- ✓ Stanley, D.W. y J.S. Miller (1998) Eicosanoids in animal reproduction: what can we learn from invertebrates? En: **Eicosanoids and related compounds in plants and animal** (Rowley, A.F; H. Kuhn y T. Schewe eds) Portland Press. pp. 183-196.
- ✓ Stanley, D.W. y J.S. Miller (2006) Eicosanoids actions in insects cellular immune functions. **Entomol. Ex per. Appli.** **119**:1-13.
- ✓ Stanley, D.W., A.R. Nor Aliza., H. Tunaz., S.N. Putnam., Y. Park, y J.C. Bedick (2002) Eicosanoids in insects biology. **Neotrop. Entomol.** **31**:341-350.
- ✓ Stanley, P.L., S. Steiner., M. Havens, y K.M. Trampusch (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol.** **4**:262-71.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. (1994a) Prostaglandins and related eicosanoids in insects. **Adv. Insect Physiol.** **24**:115-212.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. (1994b) The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. **Amer. Zool.** **34**:589-598.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. y R.H. Dadd (1981) Arachidonic and other tissue fatty acids of *Culex pipiens* reared with various concentrations of dietary arachidonic acid. **J. Insect Physiol.** **27**:571-578.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. y R.H. Dadd (1983) Long-chain polyunsaturated fatty acids: patterns of occurrence in insects. **Insect Biochem.** **13**:549-558.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. y R.H. Dadd (1984) Polyunsaturated fatty acids in the lipids from adult *Galleria mellonella* reared on diets to which only one unsaturated fatty acid had been added. **Insect Biochem.** **14**:321-327.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. y V.K. Pedibhotla (1996) What can we learn from prostaglandins and related and eicosanoids in insects? **Insect Biochem. Mol. Biol.** **26**:223-234.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W. y W. Loher (1986) Prostaglandins in insects reproduction. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **79**:841-853.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W., E. Jensen., K.W. Nickerson., K. Tielbel., C.L. Ogg, y R.W. Howard (1991) Insect immune responses to bacterial infection is mediated by eicosanoids. **Proc Natl. Acad. Sci USA.** **88**:1064-1068.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W., R.A. Jurenka., C. Cripps., G.T. Blonquist, y M. de Renobales (1988) Fatty acid in insects: composition, metabolism, and biological significance. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **9**:1-33.
- ✓ Stanley-Samuelson D.W.; y C.L. Ogg (1994) Prostaglandin biosynthesis by fat body from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **24**:481-491.

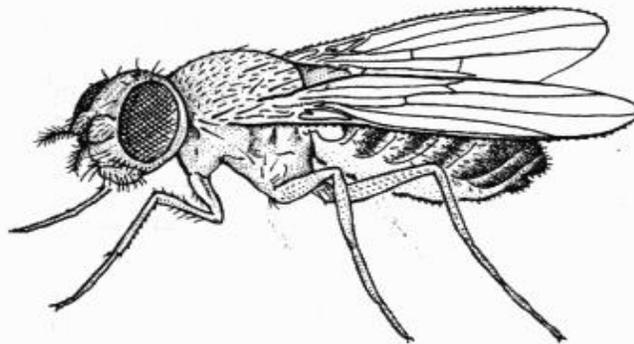
- ✓ Sul, H.S. y D. Wang (1998) Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphateacyltransferase gene transcription. **Ann. Rev. Nutr.** **18**:331-351.
- ✓ Szabad, J; I. Soos., G. Polgar, y G. Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. **Mutat. Res.** **113**:117-133.
- ✓ Tan, R.A. y S.L. Spector (1997) Antileukotriene agents. **Curr. Opin. Pulm. Med.** **12**: 215-220.
- ✓ Tanabe, T. y V. Ullrich (1995) Prostacyclin and thromboxane synthases. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.** **12**:243-255.
- ✓ Tootle, T.L. y A.C. Spradling (2000) *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. **Development.** **135**:839-847.
- ✓ Tsuda, H. y N. Takeda (1987). Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** **189**:375-379.
- ✓ Tsujii, M., S. Kawano, y R.N. DuBois (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **94**:3336-3340.
- ✓ Tunaz, H. (2006) Eicosanoids biosynthesis inhibitors influence mortality of *Pieris brassicae* larvae co-injected with fungal conidia. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **63**:93-100.
- ✓ Tunaz, H.; J.C. Bedick., J.S. Miller., W.W., R. L. Rana, y D.W. Stanley-Samuelson (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of two 17-year periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *M. cassini*. **J. Insect Physiol.** **45**:923-931.
- ✓ Urade, Y., K. Watanabe, y O. Hayashi (1995) Prostaglandin D, E, and F synthases. **J. Lipid Media t Cell Signal** **12**:257-273.
- ✓ Uscian J.M. y D.W. Stanley-Samuelson (1993) Phospholipase A₂ activity in the fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Arch. Insects. Biochem. Physiol.** **24**:187-201.
- ✓ Uscian J.M. y D.W. Stanley-Samuelson (1994) Fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols from selected terrestrial arthropods. **Comp. Biochem. Physiol.** **107B**:371-379.
- ✓ Uscian, J.M; J.S. Miller; R.W. Howard y D.W. Stanley-Samuelson (1992) Arachidonic and eicosapentaenoic acids in tissue lipids of two species of predacious insects, *Cicindela circumpecta* y *Asilis* sp. **Comp. Biochem. Physiol.** **103B**:833-838.
- ✓ Valentin, E. y G. Lambeau (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipase A₂ and their receptors and binding proteins. **Bioch. Biophys. Acta** **1488**:59-70.
- ✓ Van der Ouderaa, F.J., M. Buytenhek., D.H. Nugteren, y D.A. Van Dorp (1977) Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. **Biochim. Biophys. Acta.** **487**:315-331.
- ✓ Venable, M.E., G.A. Zimmerman., T.M. McIntyre, y S.M. Prescott (1993) Platelet-activating factor a phospholipid autacoid with diverse actions. **J. Lipid Res.** **34**:691-702.
- ✓ Vogel, E.W., U. Graf y M.M.J. Nivard (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicator of exposure to carcinogens. **En The use of short-and medium-term test for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation** (D.B. McGregor., J.M. Rice y S. Venitt eds.). IARC Scientific Publications. No. 146. pp 427-470.
- ✓ Vogel, E.W. y J. A. Zijlstra (1987) Mechanistic and metodological aspects of chemically- induced somatic mutation

and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** **182**:243-264.

- ✓ Wang, Y., B.J. Voy., S. Urs., S. Kim., M. Soltani-Bejnood., N. Quigley., Y.R. Heo., M. Standridge., B. Andersen., M. Dhar., R. Joshi., P. Worman., J.M. Taylor., J. Chun., M. Leuze., K. Claycombe., A.M. Saxton, y M. Moustaid-Mousea (2004). The human fatty acid synthase gene and novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. **J. Nutrit.** **134**:1032-1038.
- ✓ Williams, C.S. y R.N. DuBois (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? **Am. J. Physiol** **270**:G393-400.
- ✓ Würgler F.E. y H. Frei (1989) Compute Program SMART PC-Version 2.1. Institute of Toxicology ETH-Z and University of Zuerich, Schwerzenbach, Switzerland. No publicado.
- ✓ Xu, A., L.J. Wu., R.M. Santella, y T.K. Hei (1999). Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. **Cancer Res.** **59**:5922-5926.
- ✓ Yoshioka, T., H. Inoue., T. Kasama., Y. Seyama., S. Nakashima., Y. Nozawa, y Y. Hotta (1985) Evidence that arachidonic acid is deficient in phosphatidylinositol of *Drosophila* heads. **J. Biochem.** **98**:657-662.
- ✓ Zar, J.H. (1999) Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey. USA. 663 pp.
- ✓ Zenser, T.V. y B.B. Davis (1992) Arachidonic acid metabolism. **En: Cellular and molecular targets for chemoprevention** (Steele, V.E; G.D. Stoner; C.W. Boone y G. J. Kelloff eds.) CRC Press. Boca Ratón Florida 225 pp.
- ✓ Ziboh, V.A. (1985) Arachidonic acid metabolism in the skin. **En: Arachidonic acid metabolism and tumor promotion** (Fischer, S.M y T.J. Slaga eds.) Martinus Nijhoff publi. Boston 5-20 pp.
- ✓ Zor, U., E. Ferber., P. Gergely., K. Szücs., V. Dombrádi, y R. Goldman (1993) Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A₂ activation: potentiation by vanadate. **Biochem. J.** **295**:879-888.

Artículo

Drosophila Information Service



**Number
91**

December 2008

Prepared at the
Department of Zoology
University of Oklahoma
Norman, OK 73019 U.S.A.

Figure 4 shows the corrected frequencies of total spots from the two types of progeny. The corrected spot frequencies in experimental series were obtained by subtracting the number of spontaneous spots; hence, the corrected frequencies correspond to an estimate of the mutant spots actually induced by the compound. Using both two markers to identify the progeny phenotype, data show that the corrected frequency of total spots in inversion-free flies was clearly higher than the corrected frequency in inversion-carrier flies.

In the present study, the observed genotoxic effect suggests that CO, in addition to aneuploidogenic activity, is a mutagen that induces spots in the SMART of *Drosophila*. The use of a second marker (ebony) improved the classification of the phenotypes of the progeny analyzed.

More experimental evidence needs to be obtained to explore whether the nicks on the wings induced in treated flies could be associated to aneuploidogenic activity and, in consequence, whether the alteration in the border of wings could be an auxiliary tool to identify compounds with aneuploidogenic activity.

Acknowledgments: To: Biol Hugo Rivas Martinez, who helped with some of the schemes used in this paper; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) and Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME).

References: Clare, M.G., G. Lorenzon, L.C. Akhurst, D. Marzin, J. van Delft, R. Montero, A. Botta, A. Bertens, S. Cinelli, V. Thybaud, E. Lorge 2006, *Mutation Res.* 607: 37-60; Frei, H., and F.E. Würzler 1988, *Mutation Res.* 203: 297-308; Graf, U., F. Würzler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall, and P. Kale 1984, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188; Lindsley, DL, and G. Zimm 1992, *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic, Press, Inc., U.S.A., 1133 p; Lynch D.W., L.S. Ronald, D.H. Ronald, and D.G. Davis 1991, *Terat. Carcinog. and Mutag.* 11: 147-173; Muñoz-Hernández, A., 1997, *Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células somáticas de D. melanogaster*. Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular), Fac. de Ciencias, UNAM, 70 p.



Mammals replacement: *Drosophila* is a reliable option for the screening of anti-inflammatory activity.

Muñoz-Moya, Armando, Patricia Ramos-Morales*, and Adriana Muñoz-Hernández. Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias,

Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, México D.F. CP 04510, MX.; *Correspondence, Tel/Fax (55)-56-22-51-94; e-mail: prm@hp.fciencias.unam.mx.

Introduction

Inflammation induced by chemical, physical, or biological agents implies both vascular and cellular reaction mediated by chemical factors. Chronic inflammation has been associated with several steps preceding cancer as cellular transformation, cellular proliferation, tissue invasion, angiogenesis, and metastasis (Mantovani, 2005). The cancer's risk increases in patients showing inflammatory processes (Ohshima *et al.*, 2003), and in cancerous patients the inflammation accelerates tumor growth and cancer progression.

Methods for screening compounds for anti-inflammatory activity use rodent models, which previously were injected with croton oil or similar agents as swollen inductors. After a period of

time, rodents are given a second injection with the potential anti-inflammatory compound. To determine the anti-inflammatory activity, a compound should produce around a 60% reduction in the weight of ear's discs (mice) or the paw oedema mean (rats) (Falodun *et al.*, 2006; Usman *et al.*, 2008).

Regulatory guidelines concerning the use of animals for biological research focus on ensuring that the 3Rs, Reduction, Refinement and Replacement, are properly applied. All the users of animals for basic or routine research are committed to explore alternative methodologies to reach research aims, but reducing or avoiding the use of mammals (ESF, 2001).

In this report we propose the use of *Drosophila melanogaster* and the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) as a tool for screening compounds for anti-inflammatory activity. *Drosophila*'s biology is well known, sharing more than 60% of its genes with humans. In addition to individual genes, complexes and metabolic pathways are conserved in flies and humans (Mackay and Anholt, 2006).

In *Drosophila*, precursor cells of the wings are genetically determined after embryonic development, proliferate by mitosis during larval stage, and reach their differentiation until metamorphosis, when each one of the cells on the wing blade produces a hair or trichome. Using recessive markers that modify the trichome phenotype, it is possible to determine whether in some of the precursor cells the loss of heterozygosity happened giving rise to a mutant spot in the adult wing. The size of the spot depends on the number of cell cycles occurring after the loss of heterozygosity in the original cell. Events such as point mutation, deletion, non-disjunction, and mitotic recombination can lead to a mutant spot formation (Graf *et al.*, 1984). Even though the SMART is a methodology originally designed for genotoxicity screening, we hypothesized it could be an option for the screening of anti-inflammatory activity, too. In spite of the kind of mutagen that organisms could be exposed to, the genotoxic effect produced depends on: the capacity of the mutagen to alter the genetic material, but also on the oxidative damage associated to the induction of detoxification mechanisms. For years, it's been known that the Reactive Oxygen Species (ROS) have an active role in the mutagenicity and DNA damage induction (Xu *et al.*, 1999).

The tumor promoter 12-*O*-tetradecanoil phorbol-13-acetate (TPA) produces inflammatory effects in the skin of rodents, being used in a routine way to induce paw oedema in rats or ear's inflammation in mice for the screening of anti-inflammatory compounds (Park *et al.*, 2008). Inflammation response implies oedema and hyperplasia, but also the induction of pro-inflammatory enzymes and cytokines; increasing the expression and activity of Ornithine Decarboxylase (ODC), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Phospholipase-2 (PLA₂), Protein Kinase C (PKC), Nitric Oxide Synthase (iNOS), and others. During this process, reactive oxygen species (ROS) are liberated (Murakami *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002). In the 1980's, several reports showed that DNA damage as chromosomal aberrations can be induced by free radicals reactions and ROS indirectly produced by TPA (Emerit and Cerutti, 1982; Emerit and Lahound-Maghani, 1989).

On the other hand, glucocorticoids (GCC) have been effective in reducing the inflammation reaction in a wide spectrum of diseases, including allergic diseases as asthma, arthritis, and autoimmune disturbances, among others. Frequently GCC are the more effective therapies accessible, but their use is restricted due collateral negative effects (Barnes, 1995). In the cells, GCC activate the glucocorticoids receptors (GRs), GRs regulate directly the transcription of around 10 to 100 particular genes (Gronemeyer, 1992; Beato, *et al.*, 1995); however, many more genes could be indirectly regulated through the interaction with other transcription factors. GR activated forms a homodimer, which joins to DNA on consensus sequences named glucocorticoids response elements (GRE), which located in the 5' side upstream of promoter region of genes responding to GCC. The GR-GRE association modifies the rate transcription and results in the induction or repression of genes. Since numerous genes without GRE can be restrained by GCC, it has been suggested that

other mechanisms could be involved (Barnes, 1998). GR can interfere with the protein synthesis reducing the mRNA stability through increasing the specific ribonuclease transcription, which nicked mRNA in the region rich in AU sequences in the 3' side untranslated and hence shortening the lifetime of mRNA. In summary, GCC can control the inflammation by inhibiting numerous steps of the inflammatory process, *i.e.* increasing the transcription of anti-inflammatory genes (Lipocortin-1, β_2 -adrenoreceptor, receptor antagonist IL-1, and IL-1R2) or decreasing the transcription of inflammatory genes (Cytokines, Quimiokinas, iNOS, COX-2, PLA₂, Endothelin-1, and adhesion molecules, among others) (Barnes, 1996; Barnes and Adcock, 1993).

In this paper we show that the SMART can be an alternative methodology for the screening of anti-inflammatory activity based on the genetic damage induced by oxyradicals associated with the inflammation reaction induced by TPA.

Materials and Methods

Chemical compounds

12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) [CAS 16561-29-8], Cortisone (COR) [CAS 53-065], and Ethanol (EtOH) [64-17-5] were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química, MX); Dimethyl sulfoxide (DMSO) [CAS 67-68-5] from Baker (Baker Mallinckrodt Baker, MX); and microcrystalline cellulose from Merck (Merck, Germany). All other compounds used were equivalent to analytic grade of Sigma.

Strains, crosses and culture medium used for the SMART of *Drosophila*

D. melanogaster strains with genetic markers in the left arm of chromosome 3 were used, including 1) females *flr*³/In(3LR)TM3, *ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s*, abbreviated (*flr*³/TM3, *Bd^s*). The gene marker *flr*³ (3-38.8, map units m.u.) is lethal when homozygous at organismal level, but at somatic cell level it alters the trichome form showing it as a flame. The maintenance of *flr*³ gene requires the balancing chromosome TM3, which carries as marker the allele Beaded-Serrate *Bd^s* (3-91.9 m.u.), originally called Serrate (*Ser*), dominant and also lethal when homozygous. 2) *mwh/mwh* males. Multiple wing hair marker, *mwh* (3-0.0 m.u.), is recessive and in homozygotes allows the production of multiple trichomes (2 to 14 or more) compared with one trichome by cells on wild-type flies. For a detailed marker description refer to Lindsley and Zimm (1992). The flies were maintained at 25°C on flasks with standard medium (composed of 10g of agar-agar, 72.5g of baker yeast, 135g of sucrose, and 105g of corn flour each 1000 ml water).

Parental cross was done with 72 hr old *flr*³/TM3, *Bd^s* virgin females and 48 hr old *mwh/mwh* males.

Experimental procedure

Egg collection was done by transferring the parental cross to flasks with fresh standard medium (enriched with a drop of fresh baker yeast) for 2 hr and withdrawing the parental flies afterwards. Three days later, larvae of 72 ± 1 hr were recovered by floating in a 20% sucrose solution (Graf *et al.*, 1984; Nöthiger, 1970) and put in groups of 100-150 into glass tubes (2 cm diameter, 10 cm high) with a nylon cloth on one extreme. After this, every tube was introduced in a 10 ml glass container with 0.4 g of cellulose (powder) and 0.3 ml of the solution to be assayed for one hour. After the exposure time the larvae were gently washed with tap water at room temperature and transferred to flasks with fresh standard media to continue their development. In order to choose

the concentrations for the combined treatment, both TPA and COR were assayed separately. For TPA, larvae were exposed for 1 hr to the 0.275–0.55 mM TPA dissolved in 5% DMSO solution. In independent experiments, larvae were exposed for 1 hr to 0.56–5.6 mM COR dissolved in 5% Ethanol solution (EtOH). For the combined treatment, larvae were exposed for 1 hr to 5% DMSO or 0.55 mM TPA, gently washed with tap water, and exposed for 1 hr to 5% EtOH or 1.4, 2.8 mM COR, afterwards washed again and transferred to flask with fresh standard medium to continue their development. For each assay, each experiment was performed at least two times.

Wing analysis

The flies recovered were sacrificed by anesthesia excess with diethyl ether and fixed in 70% EtOH. Wings from ten females and ten males were mounted by couples on glass slides using Fauré solution (Graf *et al.*, 1984). Ventral and dorsal wing surfaces were observed at 40× with an optical microscope (Nikon, YS100, Japan), and each one of the mutant spots was scored according to the wing section where it was located (García-Bellido and Merriam, 1971). The spots were grouped in three categories: 1) simple small spots (one or two cells affected), 2) simple large spots (three or more cells affected), and 3) twin spots (formed by the *flr*³ and *mwh* markers). The final sample size scored was 200 wings.

Statistical analysis

The frequency of spots from experimental and control series was compared according to the multiple decision procedure of Frei and Würgler (1988). A significant increase in the frequency of spots is obtained whether the frequency of spots in experimental series is *m* (multiplication factor) times the frequency of that from the control flies. For the small spots and the sum of all the spots *m* = 2, and for large and twin spots which happen with low frequency, *m* = 5 (Frei and Würgler, 1995). To compare the dispersion on the distribution of the number of spots-per-fly the non-parametrical test of Kruskal-Wallis and the Multiple Comparison Dunn's Test were used. A change in the distribution is considered when significant differences were found at *p* < 0.05. Statistical analysis was performed on SPSS 11.0 software (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Results

Survival index

To determine the toxicity after treatment, a survival index (IS) was obtained as the average of the number of flies recovered from experimental series compared with the total of flies in their concurrent control (which was considered 100%). Toxicity associated to treatments was rather moderate. Flies treated as larvae with 0.275 mM TPA showed an IS of 73%, while all other TPA treatments produced IS above 80%. On COR treatments the survival indices obtained were in the range of 83–93%. Then, COR was less toxic than TPA in the concentrations assayed. On the other hand combined treatments had a similar 98% survival index; which shows the TPA-COR interaction which decreases the toxicity induced by TPA (Table 1).

Table 1. Survival Index (average \pm estandar error), Frequency of spots per wing in *flr³/mwh* + flies treated as larvae with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), Cortisone (COR) and the combined treatment with TPA - COR..

[mM] Compound	Survival Index (SI)	Spots per wing				
		Number of Wings	Small Spots m=2 b	Large Spots m=5 b	Twin Spots m=5 b	Total Spots m=2 b
(72 X 1 hr) DMSO 5% TPA	1	200	59 (0.29)	5 (0.03)	1 (0.005)	65 (0.32)
0.275	0.73 \pm 0.10	200	116 (0.58) +	10 (0.05) i	1 (0.005) -	127 (0.63) +
0.344	0.81 \pm 0.09	200	113 (0.56) +	13 (0.06) +	1 (0.005) -	127 (0.63) +
0.413	0.82 \pm 0.08	200	119 (0.60) +	8 (0.04) i	2 (0.01) -	129 (0.64) +
0.55	0.85 \pm 0.15	200	136 (0.68) +	10 (0.05) i	2 (0.01) -	148 (0.74) +
(72 X 1 hr) EtOH 5 % COR	1	200	60 (0.30)	7 (0.04)	0 (0.000)	67 (0.34)
0.56	0.93 \pm 0.07	200	54 (0.27) -	11 (0.05) -	2 (0.01) -	67 (0.34) -
1.4	0.84 \pm 0.12	200	54 (0.27) -	5 (0.03) -	1 (0.005) -	60 (0.30) -
2.8	0.84 \pm 0.11	200	53 (0.26) -	10 (0.05) -	1 (0.005) -	64 (0.32) -
5.6	0.83 \pm 0.15	200	59 (0.29) -	8 (0.04) -	1 (0.005) -	68 (0.34) -
Combined (72 X 1 X 1 hr)						
TPA 0.55 - EtOH 5 %	1	200	136 (0.68) +	15 (0.08) +	0 (0.000) -	151 (0.75) +
TPA 0.55 - COR 1.4	0.98 \pm 0.02	200	48 (0.24) -	6 (0.03) -	2 (0.01) -	56 (0.28) -
TPA 0.55 - COR 2.8	0.98 \pm 0.02	200	45 (0.22) -	6 (0.03) -	0 (0.000) -	51 (0.25) -

b. Statistical diagnosis according to Frei y Wurgler (1988) Mutat. Res. 203:297-308; -, negative; +, positive; i, inconclusive; m = multiplication factor; p = 0.05.

Wing SMART

D. melanogaster SMART results are summarized in Table 1. TPA had genotoxic activity and increased significantly the frequency of small and total spots at all concentrations assayed (Figure 1a). The increase of large spots was only observed after a concentration of 0.344 mM TPA ($p < 0.05$). The genotoxicity of this treatment modifies the distribution of the number of spots per fly. The spotless fly proportion was smaller on TPA-treated flies, and the number of spots-per-fly was significantly increased at all concentrations tested ($p < 0.001$) (Figure 1b). Instead COR did not show genotoxic activity at any concentration assayed (Figure 2a) and, hence, the spots-per-fly number remained the same (Figure 2b).

On treatment TPA - COR the frequency of small and total spots was smaller when COR concentration was increased (1.4 and 2.8 mM), from 0.28 to 0.25, respectively. Comparing these results with the spot frequency on TPA control (0.75) indicates the amelioration of TPA genotoxic activity when COR is present (Table 1, Figure 3a). In addition the spot-per-fly number distribution was modified and more flies without spots were recovered ($p < 0.001$) (Figure 3b).

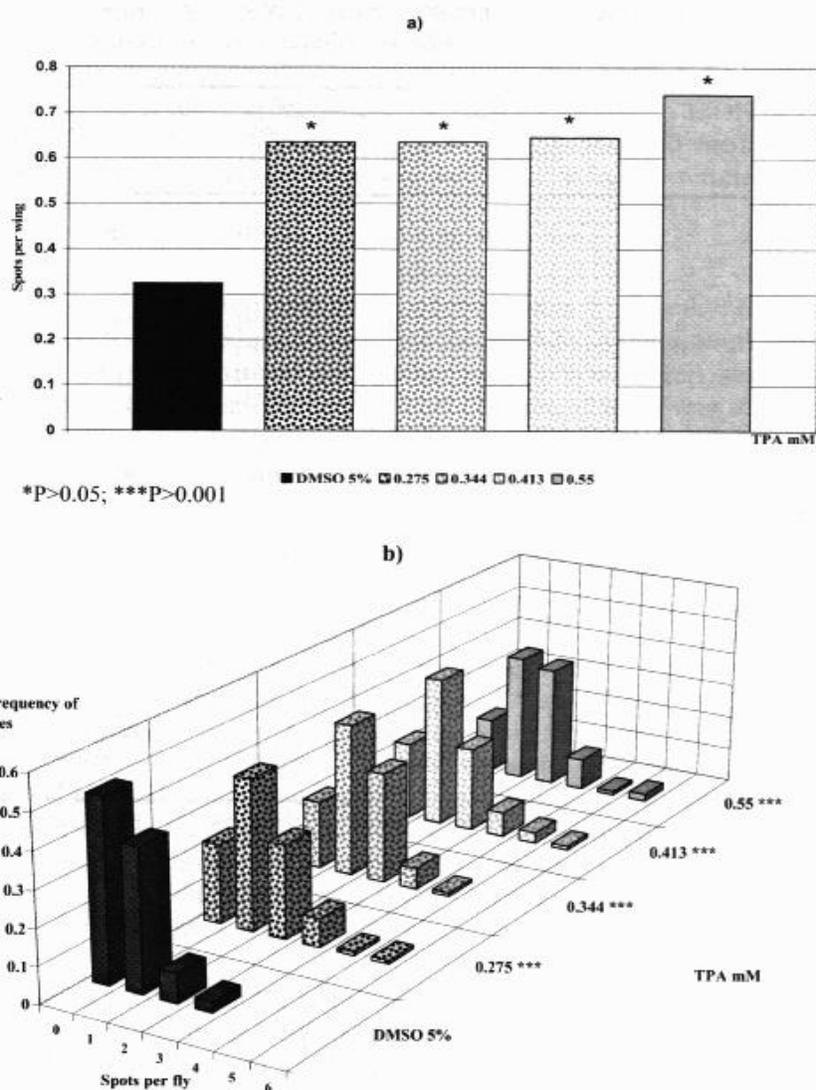


Figure 1. a) Frequency of total spots, and b) spots per fly distribution from flies exposed to TPA.

Discussion

In this report, we try to show that *Drosophila melanogaster* can be used for the screening of compounds with anti-inflammatory activity, taking advantage that for years it has been accepted that factors producing ROS can indirectly induce genotoxic damage. Another side, GCC are effective reducers of inflammation in mammals.

In *Drosophila*, the ROS inducer TPA shows low toxicity for exposed larvae, but increases the frequency of spots in the wings at all the concentrations assayed ($p < 0.05$). This effect was reported

previously by Emerit and Lahound-Maghani (1989) and is consistent with the induction of SCE in V79-4 Chinese hamster lung fibroblasts (Kinsella and Radman, 1978). Another side, Tsuda and Takeda (1987) reported that 0.1 to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TPA failed to increase the frequency of spots in the wings in flies exposed during larval development; however, the TPA's solvent, the form of larval exposure, and the cross employed then were different.

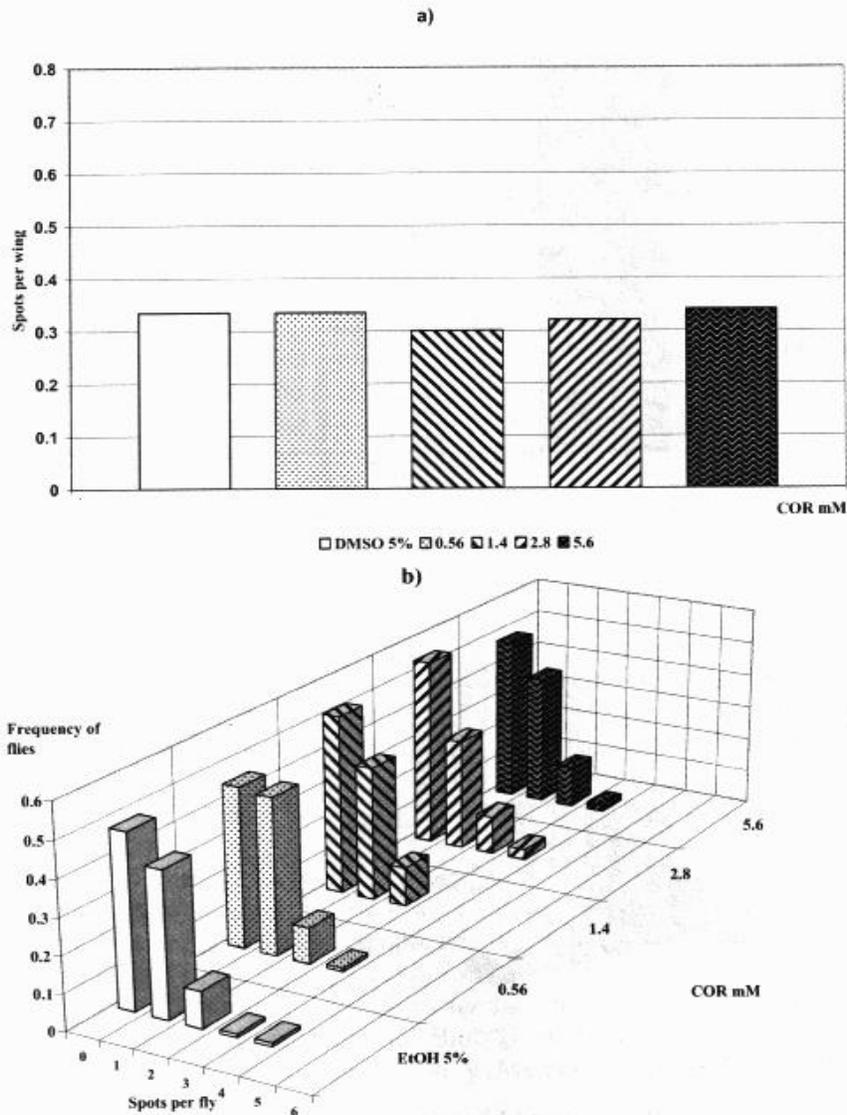


Figure 2. a) Frequency of total spots, and b) spots per fly distribution from flies exposed to COR.

The steroidal hormone COR was found negative in the SMART and affects slightly the SI of exposed flies. Results about the genotoxic activity of steroidal hormones are rather controversial

(Joosten *et al.*, 2004). In the present study we put cytotoxicity away as the explanation for the lack of effect based on the frequency of spots, which were similar in experimental and control series. That the presence of COR did not affect larvae development was confirmed through the distribution of the number of spots per fly, which was like that in the control series, too.

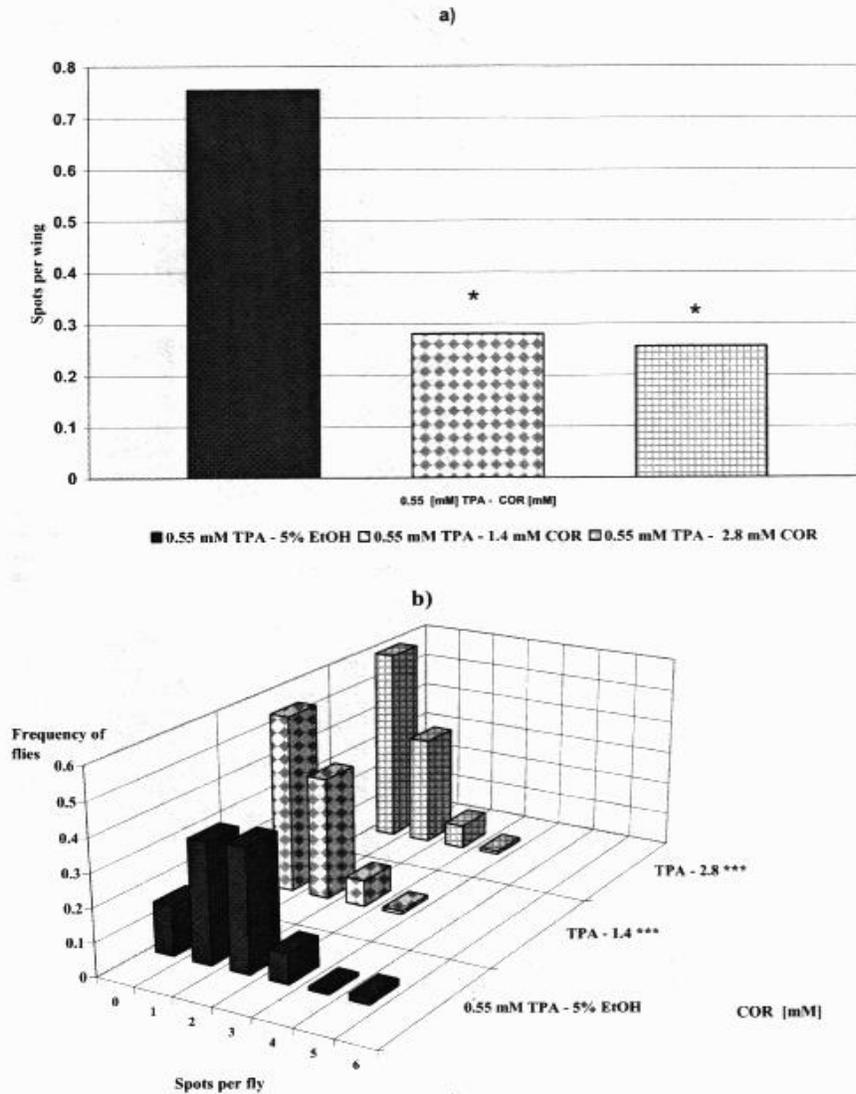


Figure 3. a) Frequency of total spots, and b) spots per fly distribution from flies exposed to TPA - COR.

In contrast, the SI from flies exposed to the combined treatment was higher, suggesting that COR diminished the TPA toxicity. The same was true for the frequency of spots on the wings, which were significantly lower after COR was given as the second part of the combined treatment. Again,

the distribution of the number of spots per fly confirmed that more spotless flies were recovered from TPA-COR treatments contrasting with the spotless flies recovered from TPA-EtOH (Figure 3b).

Like other organisms, in natural environments *Drosophila* could be threatened by parasitoids as the wasp *Leptopilina boulardi*. The innate cellular immune response associated with the formation of melanotic capsules around the eggs of the intrahemocoelic wasp is based partially on glucocorticoids (GCC) which regulate the larvae encapsulation capacity (high levels of GCC reduce the formation of capsules), but also is based in high levels of reactive intermediates of oxygen (ROIS) and nitrogen (RNIS), which are produced during encapsulation and have a role as cellular messengers, too. In summary, the defense response of *Drosophila* to parasitoid infection shows similar elements to those from the inflammation response in mammals (Carton *et al.*, 2002).

In the methodology used, TPA like the wasp infection could turn the production of pro-inflammatory cytokines on or increase the expression and activity of enzymes favoring ROS production (Fürstenberger *et al.*, 2006; Federico *et al.*, 2007). In *Drosophila*, some genes related to the immune response that are homologues to human genes have been already identified (Mackay, 2006; St. John and Xu, 1997), two genes for ODC activity (Rom and Kahana, 1993), seven different PLA₂s genes (Valentin and Lambeau, 2000), genes with activity similar to COX and LOXs (Pages *et al.*, 1986), six PKC genes (Shieh *et al.*, 2002), and dNOS (Ray *et al.*, 2007). On the other hand GCC could inhibit the inflammatory reaction in several ways: interfering with PLA₂ and COX function (Samuelsson *et al.*, 2007), inducing the expression of anti-inflammatory genes (lipocortins), or in an indirect manner blocking pathways like NF- κ B and the protein activator-1 (AP-1) (Pfahl, 1993). In concordance the GCC dexametasone inhibits the immune response against the parasitoids in *Drosophila*.

Our results showed that *Drosophila* and the SMART could be effective alternatives for the screening of anti-inflammatory activity from plant derivatives and metabolites with antioxidant capacity. In addition, this experimental procedure reduces in a significant manner the economic inversion for the screening of potential compounds and makes it possible to discriminate between anti-inflammatory (antioxidant) activity and the lack of response due to cytotoxicity of the treatment. More experimental work is needed to make accessible a concentration-effect curve focused to establish the biological meaning of treatments performed in rats, mice, and flies; but, this can be the first approach to the replacement of mammals for the screening of anti-inflammatory and antioxidant activities.

Conclusion

The use of *Drosophila melanogaster* as a model for the characterization of the anti-inflammatory and antioxidant potential of compounds is reliable through the SMART because of the capacity of ROS to induce genetic damage and the similarity in the function of genes implied in the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* and the inflammation reaction in mammals.

Acknowledgements: Authors thanks to: Biol. Hugo Rivas Martinez, for technical support. Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), DGAPA.

References: Barnes, P.J., and I.M. Adcock 1993, Trends Pharmacol. Sci. 14: 436-441; Barnes, P.J., 1995, N. Engl. J. Med. 332: 868-875; Barnes, P.J., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97: 159-168; Barnes, P.J., 1998, Clin. Sci. 94: 557-572; Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz 1995, Cell 83: 851-858; Carton, Y., F. Frey, D.W. Stanley, E. Vass, and A.J. Nappi 2002, J. Parasitol. 88: 405-407; Emerit, I., and P.A. Cerutti 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 7509-7513; Emerit, I., and M. Lahoud-Maghani 1989, Mutat. Res. 214: 97-104; European Science Foundation 2001, Use of Animals in Research. ESF 2001; Falodun, A., L.O. Okunrobo, and N. Uzoamaka 2006, African J. of

Biotechnology 5(6): 529-531; Federico, A., F. Morgillo, C. Tuccillo, F. Ciardiello, and C. Loguercio 2007, *Int. J. Cancer* 121: 2381-2386; Frei, H., and F.E. Würzler 1988, *Mutat. Res.* 203: 297-308; Frei, H., and F.E. Würzler 1995, *Mutat. Res.* 334: 247-258; Fürstenberger, G., P. Krieg, K. Müller-Decker, and A.J. Habenicht 2006, *Int. J. Cancer* 119: 2247-2254; García-Bellido, A., and J.R. Merriam 1971, *Dev. Biol.* 24: 61-87; Graf, U., F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, and P.G. Kale 1984, *Environ. Mut.* 6: 153-188; Gronemeyer, H., 1992, *FASEB J.* 6: 2524-2529; Joosten H.F.P., F.A.A. van Acker, D.J. van den Dobbelsteen, G.J.M.J. Horbach, and E.I. Krajnc 2004, *Toxicol. Letters* 151: 113-134; Kinsella, A.R., and M. Radman 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(12): 6149-6153; Lindsley, D.L., and G. Zimm 1992, *The Genome of Drosophila melanogaster*, 2nd edition, Academic Press; Mackay, T.F., and R.R. Anholt 2006, *Annu. Rev. Hum. Genet.* 7: 339-367; Mantovani, A., 2005, *Nature* 435: 752-753; Murakami, A., Y. Nakamura, K. Torikai, T. Tanaka, T. Koshiba, K. Koshimizu, S. Kuwahara, Y. Takahashi, K. Ogawa, M. Yano, H. Tokuda, H. Nishino, Y. Mimaki, Y. Sashida, S. Kitanaka, and H. Ohigashi 2000, *Cancer Res.* 60: 5059-5066; Nöthiger, R., 1970, *Dros. Inf. Serv.* 44: 177; Ohshima, H., M. Tatemichi, and T. Sawa 2003, *Arch. Biochem. Biophys.* 417: 3-11; Pagés, M., J. Roselló, J. Casas, E. Gelpí, N. Gualde, and M. Rigaud 1986, *Prostaglandins* 32: 729-740; Park, J.H., K.L. Chang, S.H. Young, K.K. Park, and W.Y. Chung 2008, *Mutat. Res.* 642: 68-73; Pfahl, M., 1993, *Endroc. Rev.* 14: 651-658; Ray, S.S., R. Sengupta, M. Tiso, M.M. Haque, R. Sahoo, D.W. Konas, K. Aulak, M. Regulski, T. Tully, D.J. Stuehr, and S. Ghosh 2007, *Biochem.* 46: 11865-11873; Rom, E., and C. Kahana 1993, *DNA Cell Biol.* 12: 499-508; Samuelsson, B., R. Morgenstern, and P.J. Jakobsson 2007, *Pharmacol. Rev.* 59: 207-224; Seo, H.J., K.K. Park, S.S. Han, W.Y. Chung, M.W. Son, W.B. Kim, and Y.J. Surh 2002, *Int. J. Cancer* 100: 456-462; Shieh, B.H., L. Parker, and D. Popescu 2002, *J. Biochem.* 132: 523-527; Tsuda, H., and N. Takeda 1987, *Mutat. Res.* 189: 375-379; Usman, H., A.H. Yaro, and M.M. Garba 2008, *Trends in Medical Res.* 3(1): 10-15; Valentin, E., and G. Lambeau 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 59-70; Xu, A., L.J. Wu, R.M. Santella, and T.K. Hei 1999, *Cancer Res.* 59: 5922-5926.

Call for Papers

Submissions to *Drosophila Information Service* are welcome at any time. The annual issue now contains articles submitted during the calendar year of issue. Typically, we would like to have submissions by mid-December to insure their inclusion in the regular annual issue. but articles can be accepted for this volume until 31 December. Details are given in the Guide to Authors or on the DIS web site: www.ou.edu/journals/dis.

Reprints from Back Issues

We are gradually archiving back issues on our website. Until that is done, you are invited to request a pdf copy of an article from an old issue by emailing Jim Thompson at jthompson@ou.edu. There is no cost for this service.