

# Efecto de los anti-inflamatorios

## no esteroideos, ibuprofeno, y meloxicam y del acetaminofen en la sobrevivencia de la *Drosophila melanogaster*

*Effect of anti-inflammatory drugs, ibuprofen, acetaminophen and meloxicam and the survival of the Drosophila melanogaster*

José Luis Arcaya<sup>2\*</sup>, Ubalquis Yanfat Salazar<sup>1\*</sup>, Ernesto José Silva<sup>1\*</sup>, Karla Urdaneta K<sup>1\*</sup>, Carlos Mario Tejada<sup>1\*</sup>.

<sup>1\*</sup>Sección de Neuroquímica Clínica. Instituto de Investigaciones Clínicas Dr. Américo Negrette. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

<sup>1</sup>Magister Scientiarum; <sup>2</sup>Médico Cirujano.

Autor de correspondencia:

MSc. José Luis Arcaya Contreras

Profesor Titular - Jefe de la Sección de Neuroquímica Clínica

Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette".

Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

Correo-e: jlarcaya2014@gmail.com

Título corto: Aines y envejecimiento en *Drosophila*

Fuente de financiamiento: Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette".

Recibido: 20/10/2015

Aceptado: 21/11/2015

16

### Resumen

Alteraciones del proceso de inflamación han sido relacionadas con el envejecimiento y con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Amiotrófica Lateral, etc. De hecho, varios autores han propuesto que algunos genes cuya actividad está relacionada con efectos pro-inflamatorios están involucrados en el proceso de envejecimiento. En el presente estudio se determinó el efecto del tratamiento a largo plazo con los antiinflamatorios no esteroideos, ibuprofeno (IBU) y meloxicam (MEL), así como con acetaminofen (ACE) en la sobrevivencia de la *Drosophila melanogaster*. Las concentraciones evaluadas de los fármacos en su mayoría disminuyeron la sobrevivencia en ambos sexos. Estos resultados sugieren un predominio de los efectos adversos de dichos compuestos.

**Palabras clave:** *Drosophila melanogaster*, envejecimiento, meloxicam, ibuprofeno, acetaminofen.

### Abstract

Dysregulation of inflammatory mechanisms are associated to aging and neurodegenerative diseases. Several authors have proposed that genes related to pro-inflammatory effects are involved in aging. In the present study, the effect of long-term treatment with Ibuprofen (IBU), Acetaminophen (ACET) and meloxicam (MEL) was evaluated in *Drosophila melanogaster*. At the concentrations tested these drugs induced in the majority of the cases, a decrease of the lifespan in both sexes. These results suggest that adverse effects of these compounds predominate in this animal model.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, aging, meloxicam, ibuprofen, acetaminophen.

## Introducción

El envejecimiento es un proceso complejo, caracterizado por la acumulación de daño molecular y celular y aumento del riesgo de enfermedad y muerte. Este proceso biológico ha sido asociado con la inducción de un estado inflamatorio de bajo grado. Por ejemplo, estudios recientes han mostrado que algunos genes relacionados con efectos pro-inflamatorios están sobreexpresados durante el envejecimiento<sup>1,2</sup>. Hasta ahora se desconoce si la inflamación está ligada causalmente al envejecimiento o es un epifenómeno de este.

El efecto de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) sobre el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas es controversial, ya que algunos reportes han revelado que su uso prolongado protege las funciones cerebrales y retrasa el deterioro cognitivo tanto en humanos<sup>3-5</sup> como en modelos animales<sup>6,7</sup>. Sin embargo, estudios también han reportado efectos adversos del tratamiento con AINEs como la aspirina<sup>8,9</sup>, mientras que los inhibidores selectivos de la Cox-2, celecoxib y nimesulide y los inhibidores no selectivos, ibuprofeno y flurbiprofeno aceleraron la senescencia en un modelo in vitro en fibroblastos<sup>10</sup>.

La *Drosophila melanogaster* es un modelo animal ampliamente utilizado en el estudio del envejecimiento la cual posee actividad ciclooxigenasa<sup>11</sup> al igual que otros invertebrados<sup>12,13</sup>. En este estudio se evaluó el efecto del meloxicam, ibuprofeno y del acetaminofén en la longevidad de la *D. melanogaster*. Los resultados sugieren que el tratamiento a largo plazo con estos fármacos estuvo asociado con un predominio de los efectos adversos, ya que disminuyó significativamente la sobrevivencia de la *Drosophila*.

## Materiales y métodos

**Animales:** Se utilizó la cepa Oregón de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Para todos los experimentos se tomaron inicialmente moscas machos jóvenes 24 horas después de su eclosión de las pupas. Las moscas fueron mantenidas con un ciclo de 12 horas luz 12 horas oscuridad y alimentadas con un medio estándar a base de harina de maíz. Dicho medio estaba compuesto de 0.3 gramos de agar-agar, 5 gramos de harina de maíz, 1.5 gramos de levadura, 5 ml de una solución saturada de azúcar morena, 0.065 gramos de metil parahidroxibenzoato disuelto en 0,5 ml de etanol al 100%, y 43.75 ml de agua. El grupo control era alimentado con medio de cultivo estándar mientras que los grupos tratados fueron mantenidos en medio suplementado con una concentración específica de cada uno de los fármacos como se detalla en la **tabla 1**. Los fármacos eran disueltos en el medio justo antes de dispensar dichos medios en los tubos de cultivo. Cada 3 días las moscas se colocaron en tubos que contenían medio de cultivo fresco.

**tabla 1: concentraciones de los fármacos en el medio de cultivo de drosophila**

Concentracion mg/ml	Meloxicam	Ibuprofeno	Acetaminofen
50	+	-	-
200	-	+	-
500	+	+	+
1000	+	+	+

## Determinación de la sobrevivencia:

Las moscas fueron colocadas en números de cinco por tubos de ensayo, los cuales contenían 2 ml de medio de cultivo. La sobrevivencia fue evaluada simultáneamente en un grupo control y los grupos experimentales cada 3 días en el momento de transferirlas al medio de cultivo fresco. La sobrevivencia era registrada como el número de animales que permanecían vivos cada día en que se realizaba la observación. Las moscas se consideraron muertas cuando no se observaba ningún movimiento al estimularlas mecánicamente con un pincel suave. La Sobrevivencia Promedio se definió como el valor promedio de la edad a la que murió el total de la población.

## Análisis de los datos

Los datos fueron procesados y analizados utilizando el programa Graph Pad Prism. La comparación de los valores de sobrevivencia promedio entre los grupos fue realizada por medio del ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para las comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de la P fue menor de 0,05.

## Resultados

**Efecto de los fármacos en la sobrevivencia de las moscas machos:** El tratamiento con meloxicam (MEL) tuvo un efecto dependiente de la dosis, ya que la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  no afectó la sobrevivencia ( $37,49 \pm 1,83$  días versus  $38,94 \pm 1,01$  días en el grupo control). En contraste, el tratamiento con 500 o 1000  $\mu\text{g/ml}$  de disminuyó la sobrevivencia ( $27,62 \pm 1,19$  y  $31,92 \pm 1,04$  días respectivamente). Por otra parte, el tratamiento con IBU (200 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó significativamente la sobrevivencia con respecto al grupo control ( $30,33 \pm 1,53$  y  $29,53 \pm 1,26$  días versus  $40,66 \pm 0,96$  días respectivamente,  $p < 0,05$ ). En contraste, a la concentración 1000  $\mu\text{g/ml}$  no tuvo efecto significativo ( $37,53 \pm 1,77$  días versus  $40,66 \pm 0,96$  días). Finalmente, el tratamiento con ACET no afectó la sobrevivencia a una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $39,99 \pm 1,72$  versus  $39,28 \pm 0,81$  días en el grupo control), mientras que la concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de ACET aumentó la sobrevivencia ( $45,20 \pm 1,48$  días,  $p < 0,05$ ).

**Efecto de los fármacos en la sobrevivencia de las hembras:** El tratamiento con MEL disminuyó significativamente la sobrevivencia, siendo mayor dicho efecto en el grupo tratado con 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $53,93 \pm 1,22$  en el grupo control versus

37,45 ± 2,06), mientras que las concentraciones de 50 µg/ml y 500 µg/ml tuvieron un efecto moderado (43,32 ± 2,18 y 43,21±1,87 resp.). Por su parte, el tratamiento con IBU no afectó significativamente la sobrevivida de las moscas a ninguna de las concentraciones evaluadas (51,40 ± 1,28 días, 50,70 ± 2,46 días y 48,95 ± 1,83 días respectivamente en los grupos tratados con 200 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml). Finalmente, el tratamiento con ACET tuvo un efecto marginal que no fue significativo a las dosis evaluadas (49,89 ± 1,72, y 48,64 ± 2,19 versus 53,93 ± 1,22 días).

## Discusión

El presente estudio es el primer reporte del efecto de los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa 2, meloxicam MEL y del ibuprofeno IBU y el acetaminofén ACET en el envejecimiento de la *Drosophila melanogaster*. Se observó un efecto predominantemente negativo del tratamiento con dichos fármacos. El inhibidor selectivo tipo COX-2, MEL disminuyó la sobrevivida tanto en las moscas machos como en las hembras. En contraste, el IBU tuvo un efecto significativo en las moscas macho a las concentraciones baja e intermedia, mientras que en las hembras ninguna de las concentraciones indujo cambios. Esta diferencia es interesante, ya que el principal beneficio que se le atribuye a los inhibidores selectivos es que producen menos efectos adversos a nivel gastrointestinal. Sin embargo, otros autores han señalado que la inhibición selectiva de la COX-2 puede ocasionar un desbalance como resultado de la inhibición de la acción de la prostaciclina y por consiguiente de la desrepresión de la actividad del tromboxano<sup>14</sup>. Es posible que tales mecanismos estén asociados con las diferencias observadas. Son necesarios estudios adicionales para determinar las bases biológicas de estos efectos inducidos por este tipo de fármacos.

El hallazgo de estos efectos fue inesperado, ya que la teoría inflamatoria del envejecimiento implica un desbalance del sistema inmunitario y aumento en la expresión de mediadores proinflamatorios. Sin embargo, estudios observacionales

y ensayos clínicos han reportado ausencia de efectos beneficiosos<sup>5,15,16</sup> o aún efectos contraproducentes<sup>17,18</sup>. Estudios previos también mostraron que inhibidores no selectivos de la COX, ibuprofeno, aspirina y flurbiprofeno aceleran la senescencia en fibroblastos humanos en cultivo<sup>10</sup>. Sonnen y colaboradores observaron una mayor cantidad de placas neuríticas en el cerebro de individuos con un consumo elevado de AINEs no selectivos durante un período de más de 10 años<sup>19</sup>.

Altas dosis de ACET han sido asociadas con necrosis hepática<sup>20,21</sup>, y con disminución de los niveles de glutatión, de ácido ascórbico y de actividad de la enzima Superóxido dismutasa en el cerebro<sup>22</sup>. Por el contrario, a bajas dosis este fármaco protegió cardiomiocitos sometidos a daño por reperfusión<sup>23</sup>. Por otra parte, algunos estudios han reportado un efecto inductor de estrés oxidativo dependiente de la concentración en hepatocitos de rata en cultivo<sup>24</sup>.

Un hallazgo interesante del presente estudio fue el efecto contrastante del tratamiento con ACET en ambos sexos, aumentando la sobrevivida en los machos y disminuyéndola en las hembras. Estudios previos han demostrado efectos dimórficos de diferentes fármacos y toxinas en organismos como la *Drosophila*<sup>25,26</sup> y en humanos<sup>27</sup>. La toxicidad inducida por ACET en humanos y animales de laboratorio es determinada por la depleción del glutatión, el cual permite la excreción del fármaco metabolizado<sup>28</sup>. Una posible explicación para esta respuesta dimórfica al tratamiento con acetaminofén podría ser diferencias en cuanto a la eficiencia de los mecanismos de detoxificación dependientes de glutatión entre ambos sexos.

Conclusión: La respuesta de la sobrevivida de *Drosophila melanogaster* fue dependiente de la dosis utilizada. En general, los fármacos evaluados disminuyeron la sobrevivida en ambos sexos. Estos resultados sugieren un predominio de los efectos adversos de los fármacos utilizados y recalcan la necesidad de evaluar la relación riesgo-beneficio en el tratamiento a largo plazo con estos compuestos.

Figura 1: Efecto de los fármacos en la sobrevida de las moscas macho. Las moscas fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los fármacos meloxicam (MEL), ibuprofeno (IBU) o acetaminofén (ACET) en el medio de cultivo.

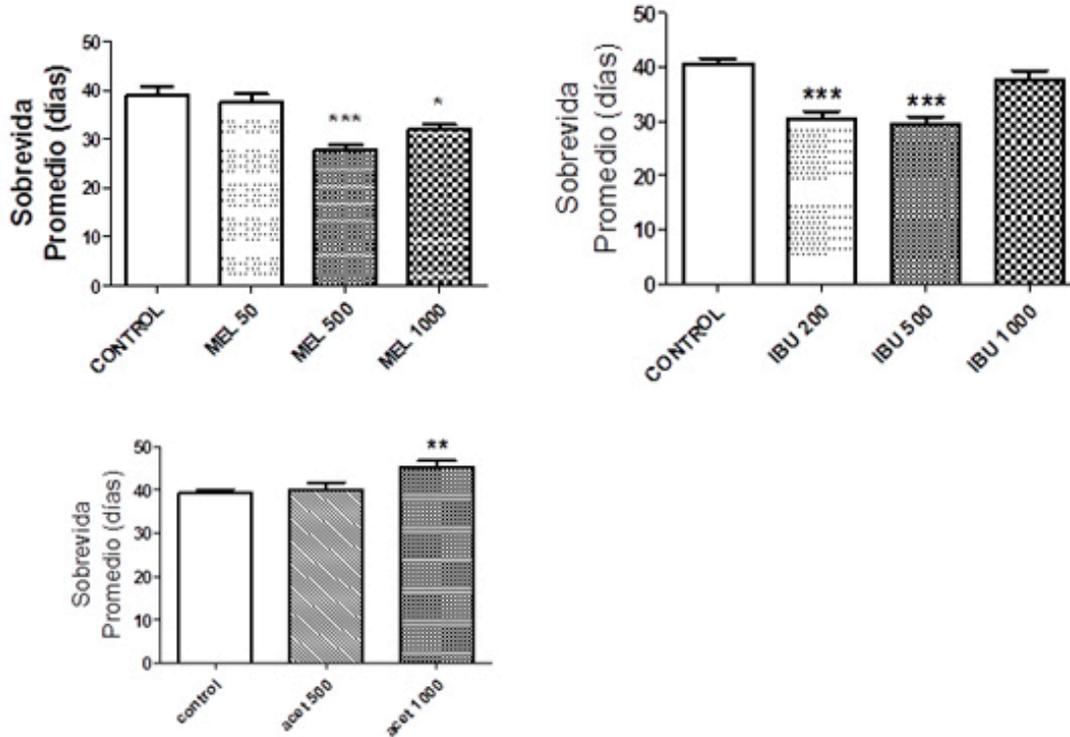
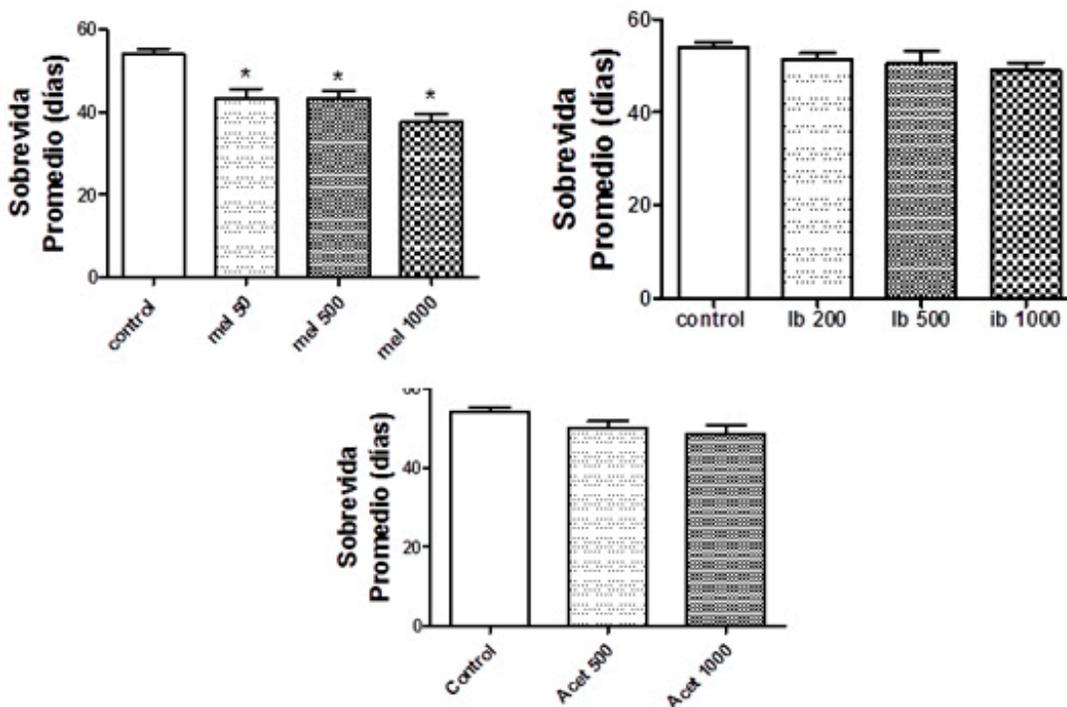


Figura 2: Efecto de los fármacos en la sobrevida de las moscas hembra. Las moscas fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los fármacos meloxicam (MEL), ibuprofeno (IBU) o acetaminofén (ACET) en el medio de cultivo.



## Referencias

- 1.- Cribbs DH., Berchtold NC., Perreau V., Coleman PD., Rogers J., Tenner AJ., Cotman CW. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J. Neuroinflammation*. 2012 Jul; 9(179):1-18.
- 2.- Nikas JB. Inflammation and immune system activation in aging: a mathematical approach. *Sci.Rep.* 2013 Nov; 3:3254
- 3.- McGeer PL., McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging*. 2007 May; 28:639–647
- 4.- In t Veld BA., Launer LJ., Hoes AW., Ott A., Hofman A., Breteler MM., Stricker BH. NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging*. 1998 Nov-Dec; 19:607-611.
- 5.- Arvanitakis Z., Grodstein F., Bienias JL., Scheinelder JA., Wilson RS., Kelly JF., Evans DA., Bennett DA. Relation of NSAIDs to incident AD, change in cognitive function, and AD pathology. *Neurology*. 2008 June; 70; 2219-2225.
- 6.- Lim GP., Yang F., Chu T., Chen P., Beech W., Teter B., Tran T., Ubeda O., Ashe KH., Frautschy SA., Cole GM. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000 Aug; 20:5709–5714.
- 7.- Yan Q., Zhang J., Liu H., Babu-Khan S., Vassar R., Biere AL., Citron M., Landreth G. Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2003 Aug; 23:7504–7509
- 8.-Cornelius C., Fastbom J., Winblad B., Viitanen M. Aspirin, NSAIDs, risk of dementia, and influence of the apolipoprotein E epsilon 4 allele in an elderly population. *Neuroepidemiology* 2004 May-June; 23:135–143.
- 9.- Hebert R., Lindsay J., Verreault R., Rockwood K., Hill G., Dubois MF. Vascular dementia: incidence and risk factors in the Canadian Study of Health and Aging. *Stroke* 2000 Jul; 31:1487–1493
- 10.- Kim SR., Park JH., Lee ME., Park JS., Park SC., Han JA. Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. 2008 Dec; *Mech Ageing Dev*. 129(12):706-13.
- 11.- Pagés M., Roselló J., Casa J., Gelpí E., Gualde N., Rigaud M. Cyclooxygenase and lipooxygenase-like activity in *Drosophila melanogaster*. *Prostaglandins*. 1986 Nov; 32(5):729-740.
- 12.- Stanley-Samuelson DW., Pedibhotla VK. What can we learn from prostaglandins and eicosanoids in insects? *Insect Biochem Mol Bio*. 1996 Mar; 26:223-224.
- 13.- Stanley D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu Rev. Entomol*. 2006. 51:25-44.
- 14.- Wright JM. The double-edged sword of COX-2 selective NSAIDs. *CMAJ*. 2002 Nov; 167(10):1131-7.
- 15.- de Jong D., Jansen R., Joefnagels W., Jellesma-Eggenkamp M., Verbeek M., Borm G., Kremer B. No effect of one-year treatment with indomethacin on Alzheimer's disease progression: a randomized controlled trial. *Plos One*. 2008 Jan ; 3(1)e1475.
- 16.- Reines SA., Block GA., Morris JC., Liu G., Nessly ML., Lines CR., Norman BA., Baranak CC. Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology* 2004; Jan, 62:66 –71.
- 17.- Aisen PS., Schafer KA., Grundman M., Pfeiffer E., Sano M., Davis KL., Farlow MR., Jin S., Thomas RG., Thal LJ. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003 Jun; 289: 819–2826.
- 18.- Thal LJ., Ferris SH., Kirby L., Block GA., Lines CR, Yuen E., Assaid C., Nesly ML., Norman BA., Baranak CC, Reines SA. A randomized doubleblind study of rofecoxib in patients with mild cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1204–1215.
- 19.- Sonnen JA., Larson EB., Walker RL., Haneuse S., Crane PK., Gray SL., Breitner JC., MOnline TJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are associated with increased neuritic plaques. *Neurology*. 2010 Sep; 75(13): 1203-1210.
- 20.- Gujral JS., Knight TR., Farhood A., Bajt ML., Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci*. 2002 Jun; 67:322–328.
- 21.- James LP., Mayeux PR., Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003 Dec; 31:1499–1506
- 22.- Nencini C., Giorgi G., Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine*. 2007;14:129–135.
- 23.- Hadzimichalis NM., Baliga SS., Golfetti R., Jaques KM., Firestein BL., Merrill GF. Acetaminophen-mediated cardioprotection via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore-induced apoptotic pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H3348–H3355.
- 24.- Roušar T., Kučera O., Křiváková P., Lotková H., Kandár R., Mužáková V., CERVINKOVÁ Z. Evaluation of Oxidative Status in acetaminophen-treated rat hepatocytes in culture. *Physiol. Res*. 2009. 58: 239-246.
- 25.- Devineni AV., Heberlein U., Acute ethanol responses in *Drosophila* are sexually dimorphic. *Proc.Natl. Acad Sci. USA*. 2012. 109(51): 21087-21092.
- 26.- Arcaya JL., Salazar U., Morales L., Moncada Y., Bonilla E. Lower sensitivity to copper toxicity in female *Drosophila melanogaster*. *Revista de toxicología en línea*. 2014 Feb. 22-36.
- 27.- Miller MA, Weafer J., Fillmore MT. Gender differences in alcohol impairment of simulated driving performance and driving-related skills. *Alcohol Alcohol*. 2009. 44(6) 586-593.
- 28.- Gum SI, Cho MK. Recent updates in acetaminophen hepatotoxicity: the role of nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol Res* 2013. 3:165-172