

Trabajo Original

Toxicología Experimental

## **Efecto de los anti-inflamatorios no esteroideos, ibuprofeno, meloxicam y del acetaminofen en la sobrevida de la *Drosophila melanogaster*.**

**José Luis Arcaya<sup>1\*</sup>, Ubalguis Yanfat Salazar<sup>2\*</sup>, Ernesto José Silva<sup>2\*</sup>, Karla Urdaneta<sup>2\*</sup>, Carlos Mario Tejada<sup>2\*</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: [jarcaya@yahoo.com](mailto:jarcaya@yahoo.com)

Octubre de 2016

Título corto: Toxicidad de aines en *Drosophila melanogaster*

Fuente de financiamiento: Instituto de Investigaciones Clínicas

"Dr. Américo Negrette".

---

## Resumen

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son medicamentos ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas dolencias. Sin embargo, el uso prologado de dichos fármacos así la ingesta de dosis elevadas de forma aguda está asociados a procesos tóxicos. El uso de modelos de animales vertebrados en la investigación científica ha sido materia de debate en base a consideraciones éticas y económicas. La *Drosophila melanogaster* es un modelo animal utilizado en estudio de los mecanismos etiopatogénicos de diversas enfermedades. En el presente estudio se determinó el efecto del tratamiento a largo plazo con dosis farmacológicas de 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. Este modelo animal puede ser útil en el estudio de los efectos tóxicos de estos medicamentos.

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

---

## Abstract

*Effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs, ibuprofen and meloxicam and acetaminophen on the lifespan of *Drosophila melanogaster*.*

The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used medications for the treatment of several inflammatory diseases. However, the long term use of these drugs or the acute ingestion of high doses is associated to toxic effects. The use of vertebrate animal models in research has been a matter of debate on the basis of ethics and economic considerations. *Drosophila melanogaster* is an animal model used in the study of the ethiopathogenic mechanisms of several diseases. In the present study, the effect of long term treatment with Ibuprofen, Acethaminophen and meloxicam on the lifespan *Drosophila melanogaster* was evaluated. At the concentration tested these drugs induced toxic effects in the majority of the cases, since the lifespan of both sexes was decreased. These results suggest that this animal model may be useful for the study of the adverse effects of these compounds.

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

---

## Introducción

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son el tipo de medicamento de venta libre de mayor uso a nivel global (1). Esta familia de fármacos es muy útil en el tratamiento de la inflamación en enfermedades crónicas como la artritis o la osteoartritis, aunque también tienen importantes efectos anti piréticos y analgésicos. Sin embargo, estos medicamentos también tienen efectos adversos importantes asociados a su uso prolongado o a la ingesta de dosis elevadas de los mismos (2). Estudios previos han demostrado la presencia de actividad enzimática semejante a ciclooxigenasa en *Drosophila* (3) y en otros invertebrados (4, 5).

En estudios previos, nuestro grupo ha reportado el uso de la *Drosophila melanogaster* como modelo animal para el estudio de la toxicidad inducida por cobre (6,7) por manganeso (8) y por paraquato (9).

Otros autores han discutido recientemente, la importancia de la sustitución de modelos de animales vertebrados en la investigación científica por modelos in vitro o por animales invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La conveniencia de esta sustitución está basada en consideraciones éticas y económicas principalmente (10). En este estudio se evaluó el efecto de los AINEs, meloxicam (Mel) e ibuprofeno (Ibu) y del acetaminofén (Ace) en la longevidad de la *Drosophila melanogaster*, como un ensayo piloto para evaluar su utilidad en la investigación del proceso de toxicidad asociada a los AINEs. Los resultados sugieren que la *Drosophila* puede ser utilizada como modelo in vivo para el estudio de los efectos del tratamiento a largo plazo con estos fármacos, ya que se observó una disminución significativa de la sobrevivencia de las moscas tratadas. Estos resultados garantizan la realización de estudios adicionales con la finalidad de investigar los mecanismos bioquímicos asociados a la toxicidad de estos medicamentos así como a posibles intervenciones dirigidas al tratamiento de dicho proceso de toxicidad.

## **Materiales y métodos:**

**Animales:** Se utilizó la cepa Oregon de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Se tomaron moscas 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. 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 fresco.

### **Determinación de la sobrevivencia:**

Cinco moscas eran colocadas en cada tubo de ensayo, los cuales contenían 2 ml de medio. 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. 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. Ver Tabla 1.

## Resultados

Efecto en la sobrevida de las moscas machos.

El tratamiento con meloxicam tuvo un efecto dependiente de la dosis, ya que la concentración de 0,6 mM no afectó la sobrevida ( $37,49 \pm 1,83$  días versus  $38,94 \pm 1,01$  en el grupo control). En contraste, el tratamiento con las concentraciones de 1,5 y 3 mM, meloxicam disminuyó significativamente la sobrevida ( $27,62 \pm 1,19$  y  $31,92 \pm 1,04$  días respectivamente versus  $38,94 \pm 1,01$  en el grupo control). Por otra parte, el tratamiento con ibuprofeno (2,5 y 1 mM) disminuyó significativamente la sobrevida con respecto al grupo control ( $30,33 \pm 1,53$  y  $29,53 \pm 1,26$  versus  $40,66 \pm 0,96$  días respectivamente,  $p < 0,0001$ ). En contraste, el tratamiento con la concentración 5 mM no tuvo efecto significativo en la sobrevida ( $37,53 \pm 1,77$  días versus  $40,66 \pm 0,96$  días). Finalmente, el tratamiento con acetaminofen no afectó la sobrevida a una concentración de 3 mM ( $39,99 \pm 1,72$  versus  $39,28 \pm 0,81$  días en el grupo control), Sin embargo, a una concentración de 6 mM de acetaminofen aumentó significativamente la sobrevida ( $45,20 \pm 1,48$  días,  $p < 0,05$ ).

Efecto de los fármacos en la sobrevida de las hembras.

El tratamiento con meloxicam disminuyó significativamente la sobrevida de las moscas hembras, siendo mayor dicho efecto en el grupo tratado con 3 mM ( $53,93 \pm 1,22$  en el grupo control versus  $37,45 \pm 2,06$ ), mientras que en los grupos tratados con 0,6 mM y 1,5 mM ( $53,93 \pm 1,22$  en el grupo control versus  $43,32 \pm 2,18$  y  $43,21 \pm 1,87$  respectivamente). Por su parte, el tratamiento con ibuprofeno no afectó significativamente la sobrevida de las moscas hembras a ninguna de las concentraciones evaluadas ( $53,93 \pm 1,22$  en el grupo control versus  $51,40 \pm 1,28$ ,  $50,70 \pm 2,46$  y  $48,95 \pm 1,83$  respectivamente en los grupos tratados con 1 mM, 2,5 mM y 5 mM). Finalmente, el tratamiento con acetaminofen tuvo un efecto marginal que no fue significativo a las dosis evaluadas.

## Discusión

En este estudio se observó un efecto predominantemente negativo del tratamiento con los fármacos inhibidores de ciclooxigenasa. El inhibidor selectivo tipo COX-2, meloxicam disminuyó la sobrevida tanto en las moscas machos como en las hembras. En contraste, el también inhibidor no selectivo de COX-2, ibuprofeno tuvo un efecto significativo en las moscas macho a las concentraciones baja e intermedia, mientras que en las hembras ninguna de las dosis indujo cambios significativos. El principal beneficio que se le atribuye a los inhibidores selectivos con respecto a los no 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 (11). Son necesarios estudios adicionales para determinar los mecanismos de los efectos de este tipo de fármacos.

En un estudio reciente (12) se reportó el efecto de 10 AINEs en la sobrevida de la *Drosophila*. En dicho estudio se observó un aumento de la sobrevida dependiente de la dosis de varios de los AINEs empleados. Nuestros resultados contrastan con lo reportado por estos autores ya que en este estudio se utilizaron dosis elevadas (milimolares) en comparación con las utilizadas por Danilov y cols. En un modelo in vitro, también se reportó efectos adversos del tratamiento con AINEs como la aspirina (13, 14), así como los inhibidores selectivos de la Cox-2, celecoxib y nimesulide y los inhibidores no selectivos, ibuprofeno y flurbiprofeno acelerando la senescencia en fibroblastos humanos en cultivo (15).

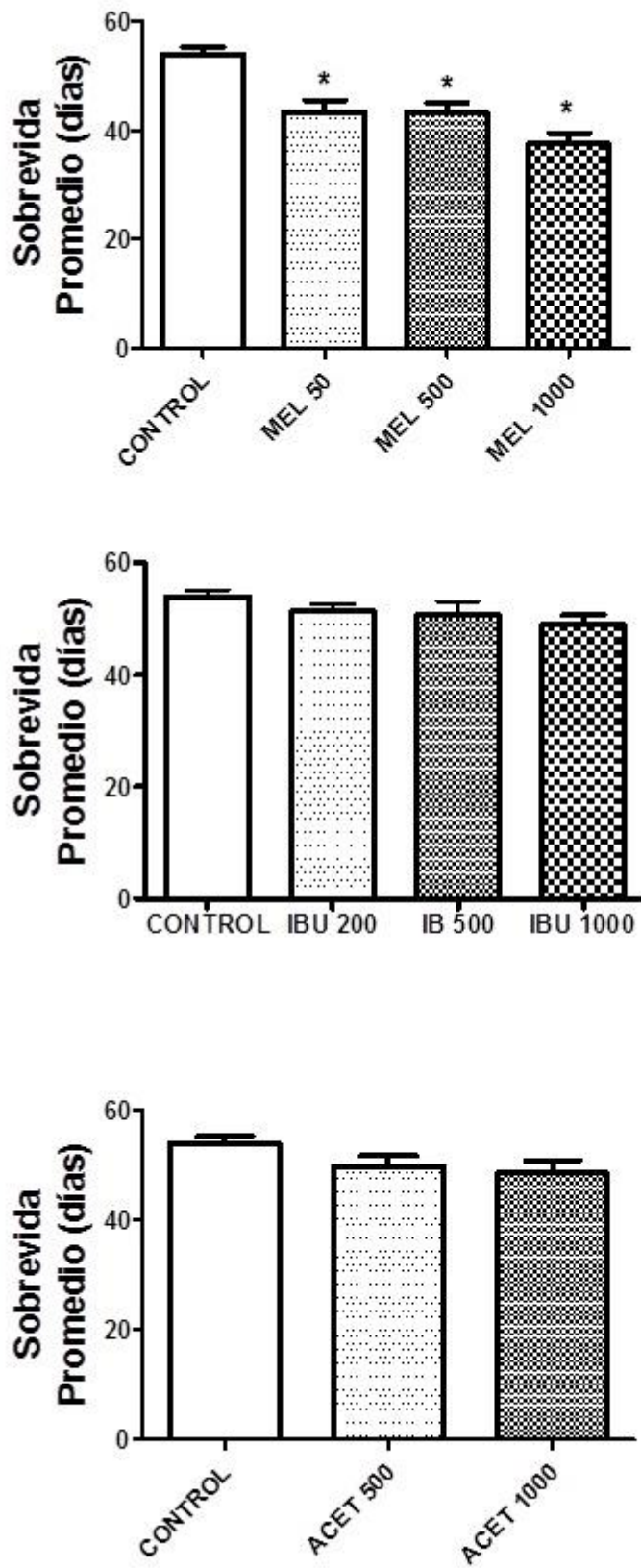
Desde el punto de vista neurológico se ha reportado efectos adversos de fármacos antiinflamatorios como el acetaminofén (16) y de los AINEs (17). Estudios observacionales y ensayos clínicos han reportado ausencia de efectos beneficiosos (18, 19) o aún efectos adversos del tratamiento con dichos fármacos (20, 21). 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 (22).

Estudios previos han demostrado que altas dosis el acetaminofen ha sido asociado con necrosis hepática (23, 24), así como efectos pro-oxidantes en cerebro (25) y en células cultivadas (26). Por el contrario, a bajas dosis este fármaco se ha observado protección de cardiomiocitos sometidos a daño por reperfusión (27).

Un hallazgo interesante del presente estudio fue el efecto contrastante del tratamiento con acetaminofen en ambos sexos, aumentando la sobrevivencia en los machos y disminuyéndola en las hembras. Numerosos estudios han reportado previamente efectos dimórficos a diferentes fármacos y toxinas en diversos organismos (28-30). La toxicidad inducida por acetaminofen en humanos y animales de laboratorio es determinada por la depleción del glutatión, un tripeptido con una función antioxidante importante, el cual permite la excreción del fármaco metabolizado (31). Una posible explicación para esta respuesta dimórfica al tratamiento con acetaminofen podría ser diferencias en cuanto a la eficiencia de los mecanismos de detoxificación dependientes de glutatión entre ambos sexos.

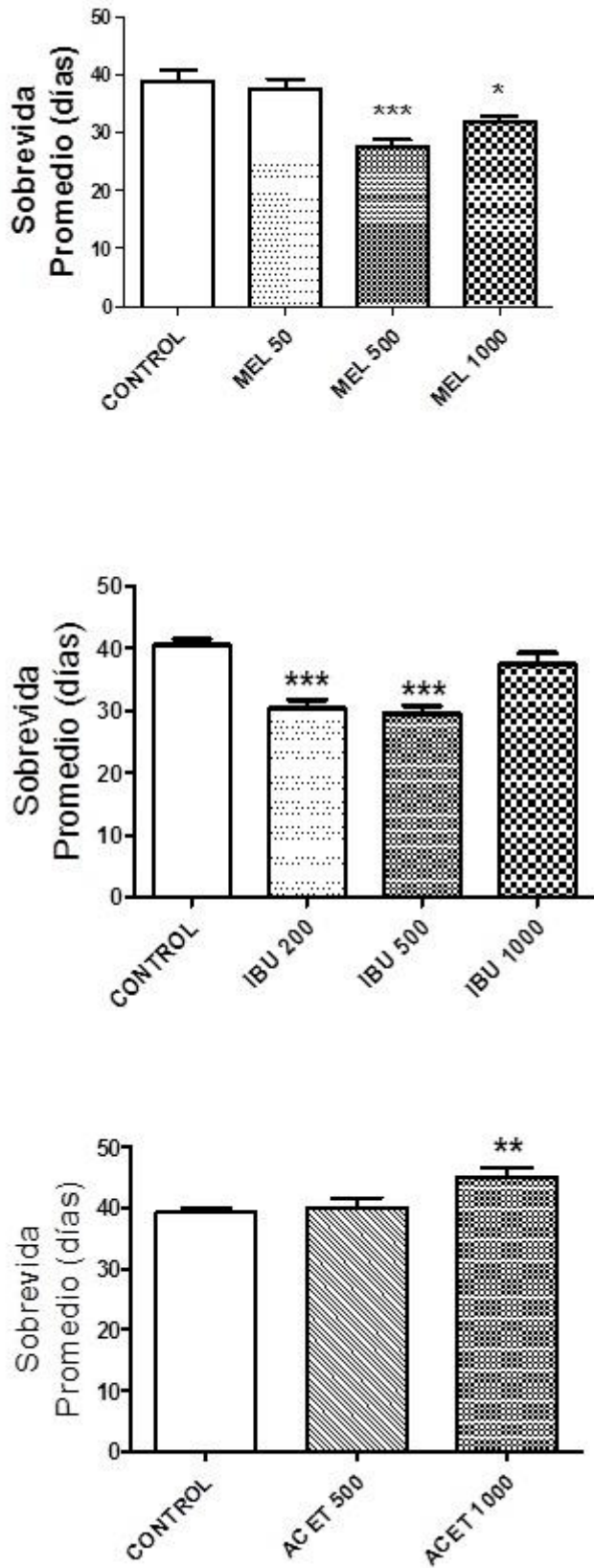
En conclusión, la respuesta de la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* fue dependiente de la dosis utilizada. En general, los fármacos evaluados disminuyeron la sobrevivencia en ambos sexos. Estos resultados indican que la *Drosophila melanogaster* podría ser útil como modelo animal para estudiar los mecanismos implicados en la toxicidad de los AINEs y por consiguiente de posibles intervenciones para dicha toxicidad.





**FIGURA 1**

**FIGURA 2**



**TABLA 1: Concentraciones (mm) de los fármacos en el medio de cultivo de *Drosophila***

CONCENTRACION	MELOXICAM	IBUPROFENO	ACETAMINOFEN
	3	5	6
	1,5	2,5	3
	0,6	1	1,5

---

## Referencias bibliográficas

1. Crofford, L. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Research & Therapy*; 2013. 15(S3):S2
2. Ghosh R, Alajbegovic A, Gomez A. NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. *Oxidative. Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 25 pages.
3. Pagés M, Roselló J, Casa J, Gelpí E, Gualde N, Rigaud M. Cyclooxygenase and lipoxygenase-like activity in *Drosophila melanogaster*. *Prostaglandins*; 1986. 32(5):729-740.
4. Stanley-Samuelson DW, Pedibhotla VK. What can we learn from prostaglandins and eicosanoids in insects? *Insect Biochem Mol Bio*; 1996. 26:223-224.
5. Stanley D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu Rev. Entomol*; 2006. 51:25-44.
6. Arcaya JL, Tejada CM, Salazar U, Silva EJ, Urdaneta K, Varela K. Copper intoxication decreases lifespan and induces neurologic alterations in *Drosophila melanogaster*. *Invest Clin*; 2013. 54(1):47-57.
7. Arcaya JL, Salazar U, Morales L, Moncada Y, Bonilla E. Lower sensitivity to copper toxicity in female *Drosophila melanogaster*. *Retel*; 2014.
8. Mora M, Bonilla E, Medina-Leendertz S, Bravo Y, Arcaya JL. Minocycline increases the activity of superoxide dismutase and reduces the concentration of nitric oxide, hydrogen peroxide and mitochondrial malondialdehyde in manganese treated *Drosophila melanogaster*. *Neurochem Res*; 2014. 39(7):1270-1278.
9. Medina-Leendertz S, Paz M, Mora M, Bonilla E, Bravo Y, Arcaya JL, Terán R, Villalobos V. Longterm melatonin administration alleviates paraquat mediated oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Invest Clin*; 2014. 55(4):352-364.

- 10.**Doke y Dhawale. Alternatives to animal testing: a review. Saudi Pharmaceutical journal; 2015. 23(3)223-229
- 11.**Wright JM. The double-edged sword of COX-2 selective NSAIDs; 2002. 167(10):1131-1137
- 12.**Danilov A, Shaposhnikov M, Shevchenko O, Zemskaya N, Zhavoronkov A and Moskalev A. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on *Drosophila melanogaster* longevity. Oncotarget; 2015. 6(23):19428-19444
- 13.**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. 23:135-143.
- 14.**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. 31:1487-1493
- 15.**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. Mech Ageing Dev; 2008. 129(12):706-13.
- 16.**Józwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. Acta Pol Pharm; 2014. 71(1):11-23.
- 17.**Krijthe BP, Heeringa J, Hofman A, Franco OH, Stricker BH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of atrial fibrillation: a population-based study. BMJ Open; 2014. 4(4):e004059
- 18.**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. 3(1)e1475.

- 19.**Reines SA, Block GA, Morris JC, et al. Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology*; 2004. 62:66 –71.
- 20.**Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, et al. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA*; 2003. 289:2819–2826.
- 21.**Thal LJ, Ferris SH, Kirby L, et al. A randomized, doubleblind, study of rofecoxib in patients with mild cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology*; 2005. 30:1204–1215.
- 22.**Sonnen JA, Larson EB, Walker RL, Haneuse S, Crane PK, Gray SL, Breitner JC, MONTine TJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are associated with increased neuritic plaques. *Neurology*; 2010. 75(13): 1203-1210.
- 23.**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. 67:322–328.
- 24.**James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*; 2003. 31:1499–1506
- 25.**Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine*; 2007. 14:129–135.
- 26.**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.
- 27.**Hadzimiralis 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.
- 28.**Mennecozzi M, Landesmann B, Palosaari T, Harris G, Whelan M. Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro? *PLoS One*; 2015. 10(4):e0122786

- 29.**Soleimani Asl S, Mehdizadeh M, Hamed Shahraki S, Artimani T, Joghataei MT. Sex differences in MDMA-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Funct Neurol*; 2015. 30(2):131-137.
- 30.**Lu YF, Jin T, Xu Y, Zhang D, Wu Q, Zhang YK, Liu J. Sex differences in the circadian variation of cytochrome p450 genes and corresponding nuclear receptors in mouse liver. *Chronobiol Int*; 2013. 30(9):1135-43.
- 31.**Gum SI, Cho MK. Recent updates in acetaminophen hepatotoxicity: the role of nrf2 in hepatoprotection. *Toxicol Res*; 2013. 3:165-172

**Recibido: 25/11/16**

**Aceptado: 1/12/16**