

## Regulación por Dexametasona y Ácido Araquidónico sobre la expresión de una Aldoceto Reductasa/Di-hidrodiol Deshidrogenasa (DDH) en estómagos del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector del dengue en México

Mónica G. Hernández-Estrada<sup>1,3</sup>, Fernando L. García-Gil de Muñoz<sup>1</sup>, Gerardo Hurtado-Sil<sup>2</sup>, Humberto Lanz-Mendoza<sup>2</sup>, Mario H. Rodríguez<sup>2</sup> y Fidel C. Hernández-Hernández<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, (CISEI-INSP) Cuernavaca, Morelos, México. <sup>3</sup>Universidad Simón Bolívar, México.

### Resumen

Las di-hidrodiol deshidrogenasas (DDHs) son enzimas que catalizan la oxidación acoplada a NADP<sup>+</sup> de los trans-di-hidrodiol de hidrocarburos aromáticos convirtiéndolos en catecoles. En mamíferos, estas enzimas participan en la detoxificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) e inactivan hormonas esteroides del torrente sanguíneo. Una de las enzimas más estudiadas de este grupo es la 3 $\alpha$ -hidroxisteroide/di-hidrodiol deshidrogenasa (3 $\alpha$  HSD/DD, 34-37kDa), enzima monomérica o dimérica presente de manera abundante en riñón e hígado de rata, la cual metaboliza andrógenos, glucocorticoides y puede funcionar como una di-hidrodiol deshidrogenasa. En insectos no existen estudios de las DDHs. En este trabajo, se demostró experimentalmente la presencia de la proteína DDH en estómagos del mosquito *Aedes aegypti*, principal transmisor del dengue en México y se describió el efecto de la Dexametasona (Dex), inhibidor de PLA<sub>2</sub> (enzima implicada en la síntesis de prostaglandinas (-PGs-), sobre su expresión. El nivel de producción tanto de la proteína como del RNAm fue inhibido por la aplicación de Dex. Este efecto es parcialmente revertido cuando se adiciona el precursor de PGs, ácido araquidónico (AA). Esta es la primera demostración experimental de que Dex, un anti-inflamatorio esteroideo, puede regular la expresión de la DDH en insectos. Queda pendiente comprobar que el mecanismo de acción sea similar al que ocurre en mamíferos.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, Dihidrodiol deshidrogenasa (DDH), 3 $\alpha$ -Hidroxiesteroide/Dihidrodiol Deshidrogenasa (3 $\alpha$  HSD/DD), Dexametasona (Dex).

### Abstract

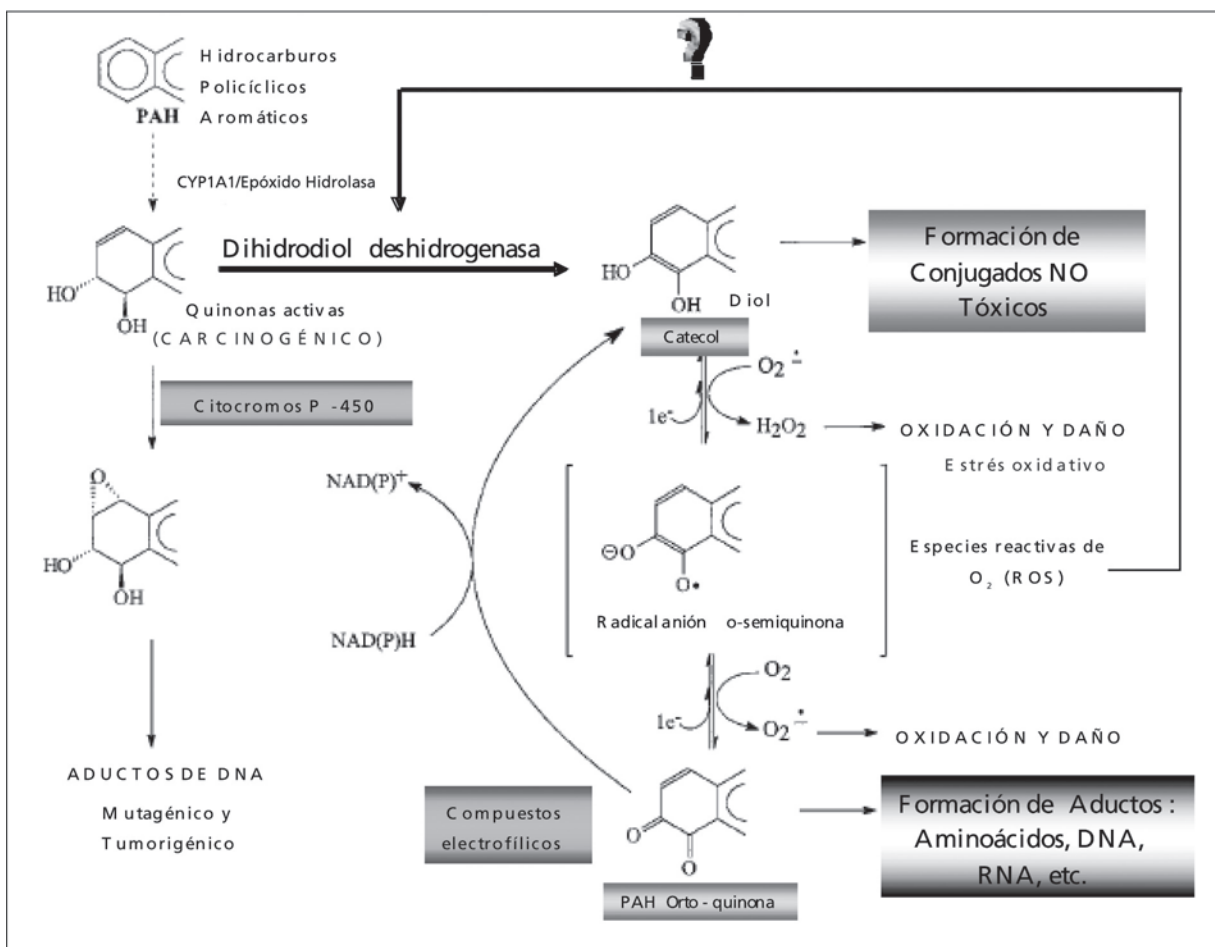
Dihydrodiol dehydrogenases (DDHs) are enzymes catalyzing the NADP<sup>+</sup> linked oxidation of trans-di-hydrodiols of aromatic hydrocarbons rendering the corresponding catechols. In mammals these enzymes participate in detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons and inactivate circulating steroid hormones. The most characterized enzyme of this group is the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/dihydrodiol dehydrogenase (HSD/DD, 34-37kDa), monomeric or dimeric enzyme abundantly expressed in kidney and rat liver that can metabolize androgens, glucocorticoids and functions as dihydrodiol dehydrogenase. In invertebrates, DDHs has been scarcely described. In this work, the presence of DDH in midguts of *Aedes aegypti* mosquito, a major Dengue's vector was demonstrated experimentally and the effect of prostaglandins (PGs) synthesis inhibitor Dexamethasone (Dex, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor) on DDH midgut protein synthesis and transcription is described. The DDH protein production was abolished by Dex and the messenger production decreased at the same time. This effect was reversed by PGs precursor arachidonic acid (AA). This is the first demonstration that a steroidal anti-inflammatory agent (Dex) regulates DDHs in insects, and probably regulatory mechanisms are similar to those described in mammals.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, Dihydrodiol dehydrogenase (DDH), 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid/Dihydrodiol Dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD/DD), Dexamethasone (Dex).

## Introducción

Las di-hidrodiol deshidrogenasas (DD, EC 1.3.1.20) son enzimas que catalizan la oxidación de *trans*-di-hidrodiol, acoplada a NADP<sup>+</sup>, de hidrocarburos aromáticos convirtiéndolos en catecoles (figura 1). Estas enzimas han sido descritas en varios tejidos de vertebrados, tales como hígado, riñón, cerebro, corazón, bazo e intestino.

Figura 1. Vía de Activación de las Dihidrodiol deshidrogenasas



Actividad de DDHs en la transformación de compuestos carcinogénicos en Diol para la formación de compuestos no tóxicos u Orto-quinonas que formarán otros aductos. Inducción: algunos autores mencionan que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden regular directamente la actividad de las DDHs (Modificado de Burczynski, Lin y Penning, 1999). a.

Las DDHs existen en tres isoformas: 3 $\alpha$ , 17 $\beta$  y 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, las cuales poseen diferente actividad enzimática como hidroxesteroide deshidrogenasa (HSDs), aldehído reductasa y aldosa reductasa (Higaki, et al., 2002). También pueden tener afinidad al ácido araquidónico AA (Penning T. y Talalay P., 1983). Todas ellas son miembros de la superfamilia de genes aldoceto reductasas (AKR).

La superfamilia AKR presenta una organización genómica conservada. El promotor contiene múltiples elementos de respuesta a esteroides (SREs) que podrían comprender una unidad de respuesta ante diferentes estímulos (Hou, Lin y Penning, 1998) y específicamente en hepatocitos de rata se ha demostrado que los genes AKR son activados transcripcionalmente por glucocorticoides a través de un receptor glucocorticoide (Hou, et al., 1998).

Las DDHs son polifuncionales y se diferencian en su afinidad a sustratos, sensibilidad a inhibidores y efectos de activadores. Estas enzimas son fuertemente inhibidas tanto por anti-inflamatorios esteroideos, como por no esteroideos (NSAIDs) y ciertas PGs (Penning, et al., 2000). Las concentraciones de fármaco requeridas para inhibirlas son similares a las requeridas para inhibir las ciclooxigenasas (Penning, Mukharji, Barrows y Talalay, 1984).

La DDH mayormente caracterizada es la  $3\alpha$ -hydroxisteroide/ di-hidrodiol deshidrogenasa ( $3\alpha$ -HSD/DD, 34-37kDa), enzima monomérica o dimérica de la familia de los citocromos P-450, expresada abundantemente en el citosol de riñón e hígado de rata (Pawlowski, Huizinga y Penning, 1991). Su función biológica es inactivar hormonas esteroides del torrente sanguíneo y contribuir a la detoxificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Durante este proceso producen especies reactivas de oxígeno al reaccionar con las quinonas (figura 2). Estos eventos en vertebrados pueden contribuir al potencial carcinogénico de los PAHs (Khanna, Qin, y Cheng, 1995).

Las DDHs han sido ampliamente estudiadas en vertebrados, pero en insectos existen pocos estudios, particularmente los de los mosquitos *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae*, los cuales son importantes vectores de enfermedades. Sólo existen anotaciones de esta enzima a nivel de genoma y no hay estudios sobre la actividad metabólica y biológica de las DDHs. El sistema inmune de los insectos es fundamental para el control del desarrollo de microorganismos invasores y no se conoce cómo está regulado. En los vertebrados se sabe que las hormonas esteroides y las PGs regulan de manera importante la función del sistema inmune. En los mosquitos se ha descrito que el sistema inmune puede modificar la capacidad vectorial al eliminar a los agentes patógenos que potencialmente pudieran ser transmitidos durante la picadura. Por tanto, conocer cómo opera la regulación del sistema inmune de los mosquitos es importante para comprender cómo pueden transmitir enfermedades. Por estas razones en este trabajo se estudia la presencia y regulación de las DDHs con el objetivo de aportar conocimientos útiles para el diseño de herramientas para el control biológico de los mosquitos y de su papel como vectores de enfermedades.

## Objetivo

Demostrar la presencia y la regulación de la expresión de la DDH en estómagos del mosquito *Ae. aegypti*.

## Método

**Obtención de mosquitos.** Los experimentos se realizaron con mosquitos adultos hembra de la especie *Ae. aegypti*, obtenidos de una colonia cultivada en el insectario del CISEI-INSP Cuernavaca, México. Los mosquitos crecieron bajo condiciones ambientales de 25-28°C de temperatura, 80% de humedad, un ciclo de 12 h luz-oscuridad y fueron alimentados con una solución azucarada al 10% durante el estadio adulto.

**Reactivos.** Todos los reactivos fueron de la mayor calidad posible y se obtuvieron de la compañía Sigma Chem. Co; St Louis MO.

**Cultivo de órganos.** Previo a la disección, los mosquitos fueron anestesiados a 4°C, sus abdómenes fueron lavados con etanol al 70% y secados al aire. Se disectaron grupos de 10 estómagos en 40  $\mu$ l de buffer salino de fosfatos estéril (PBS: 140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.3), e inmediatamente después fueron colocados en diferentes pozos de una multicámara plástica de 24 posiciones para cultivo de tejidos (Nalgene Nunc Co., Naperville, IL) que contenían 50  $\mu$ l de medio Schneider sin suero fetal bovino (Gibco BRL). Los órganos fueron cultivados a temperaturas de 22 – 24° C (Herrera-Ortiz, et al., 2004).

**Efecto de la Dex sobre la presencia de proteínas de estómagos de *Ae. aegypti*.** Los estómagos fueron incubados con Dex 50  $\mu$ g durante 30 min a 20-22°C. Posteriormente los órganos fueron removidos de la solución y se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas: Tosil lisil clorometil cetona (TLCK) 10 mM; tosil fenil alanil clorometil cetona (TPCK) 10 mM y o-fenantrolina 50 Mm (Benyon y Salvesen, 1989). Las muestras se lisaron mecánicamente y se centrifugaron a 14 000 xg durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y a cada muestra se le añadieron 2 volúmenes de acetona fría y se incubaron a 20°C toda la noche. Transcurrido el tiempo fueron centrifugados a 13 000 xg por 30 min. El sobrenadante (fracción soluble) y la pastilla (fracción membranal)

fueron resuspendidas en 30  $\mu$ l de buffer muestra 4X, pH 6.8. La concentración de proteínas de las muestras se midió por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, y Randall, 1951). Las muestras fueron colocadas en un baño de agua hirviendo durante 10 min y se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 12% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). El gel fue teñido con azul de Coomassie y contrastado con solución decolorante (5:4:1 metanol-ácido acético-agua).

**Identificación y análisis de proteínas por MALDI-TOF/MS.** A partir de los geles teñidos se eligió una banda de 37kDa que fue cortada manualmente con una navaja colocada en un tubo de microfuga de 1.5ml, lavada con agua mili-Q, rehidratada con 10-20 $\mu$ l de solución de tripsina (20 ng / $\mu$ l, en 40 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 9% de acetonitrilo) e incubada a 37°C toda la noche. Posteriormente, los geles fueron enviados al laboratorio de proteómica del CISEI-INSP (Cuernavaca, Mor.) donde se realizó una espectrometría de masas por el método MALDI-TOF/MS que proporcionó una colección de fragmentos con su masa molecular (*fingerprint*). La identificación preliminar de la proteína se hizo analizando el *fingerprint* con el programa MASCOT (<http://www.matrix-science.com>) y las bases de datos de proteínas accesibles en el sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La identificación final se hizo comparando con la base de datos de proteínas deducida del genoma de *Ae. aegypti* (<http://aaegypti.vectorbase.org>).

**Efecto de la Dex y el AA sobre la expresión de la DDH en estómagos de mosquitos.** Un grupo de 10 estómagos fue incubado con Dex (50  $\mu$ g/ml) durante 30 min. Otro fue tratado con Dex (50  $\mu$ g/ml) durante 15 min adicionando posteriormente AA (10  $\mu$ g/ml) durante 45 min a 22°C. Un grupo adicional de órganos sin tratamiento fue incluido como control. Los órganos fueron removidos de los cultivos y se procedió a hacer la extracción de RNA total con TRIZOL (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total (1.0  $\mu$ g) fue usado como molde para realizar la reacción de primera cadena de síntesis de cDNA usando la enzima SUPERScript II™ (GIBCO-BRL). Dos  $\mu$ l de cDNA (de un total de 20  $\mu$ l) fueron usados para cada reacción de PCR. Para una reacción de PCR de 50  $\mu$ l se incluyó 0.5  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores específicos diseñados a partir de una región consenso de DDHs, 0.5  $\mu$ l de Tag polimerasa (2U),

2 $\mu$ l de cDNA, 0.5 $\mu$ l de dNTPs, 5 $\mu$ l de Amortiguador de PCR 10x, 5 $\mu$ l de Cloruro de Magnesio (2.5mM) y 33  $\mu$ l de Agua estéril. Las condiciones para la PCR fueron: 94°C por 4 min, 95°C por 1 min, 58°C por 1 min; 72° C por 2 min (35 ciclos) y una extensión final de 72° C por 8 min. El producto resultante de la reacción fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989). La secuencia de los iniciadores para los experimentos de PCR fue la siguiente: CGA GGG AGA GTT GAA CGA AG (DDH-F 5-3') y CTG CTT TCG AAT GTT GTC CA (DDH-R 5-3'). Como control, se amplificó un fragmento de 400 bp correspondiente al gen de actina de *An. albimanus*, el cual se considera de expresión constante, usando los iniciadores: ACA TGG AGA AAA TCT GGC ACC ACA (Act 5-3') y ACA GCT TTT CTT TGA TGT CGC GAA (Act 5-3') (Montero-Solis, et al., 2004). El análisis densitométrico de los productos de PCR se realizó con el Software QuantityOne 4.6 (BioRad). Todas las muestras fueron comparadas con su correspondiente valor de actina. Los valores de todos los tratamientos se graficaron mostrando el porcentaje de abundancia relativa.

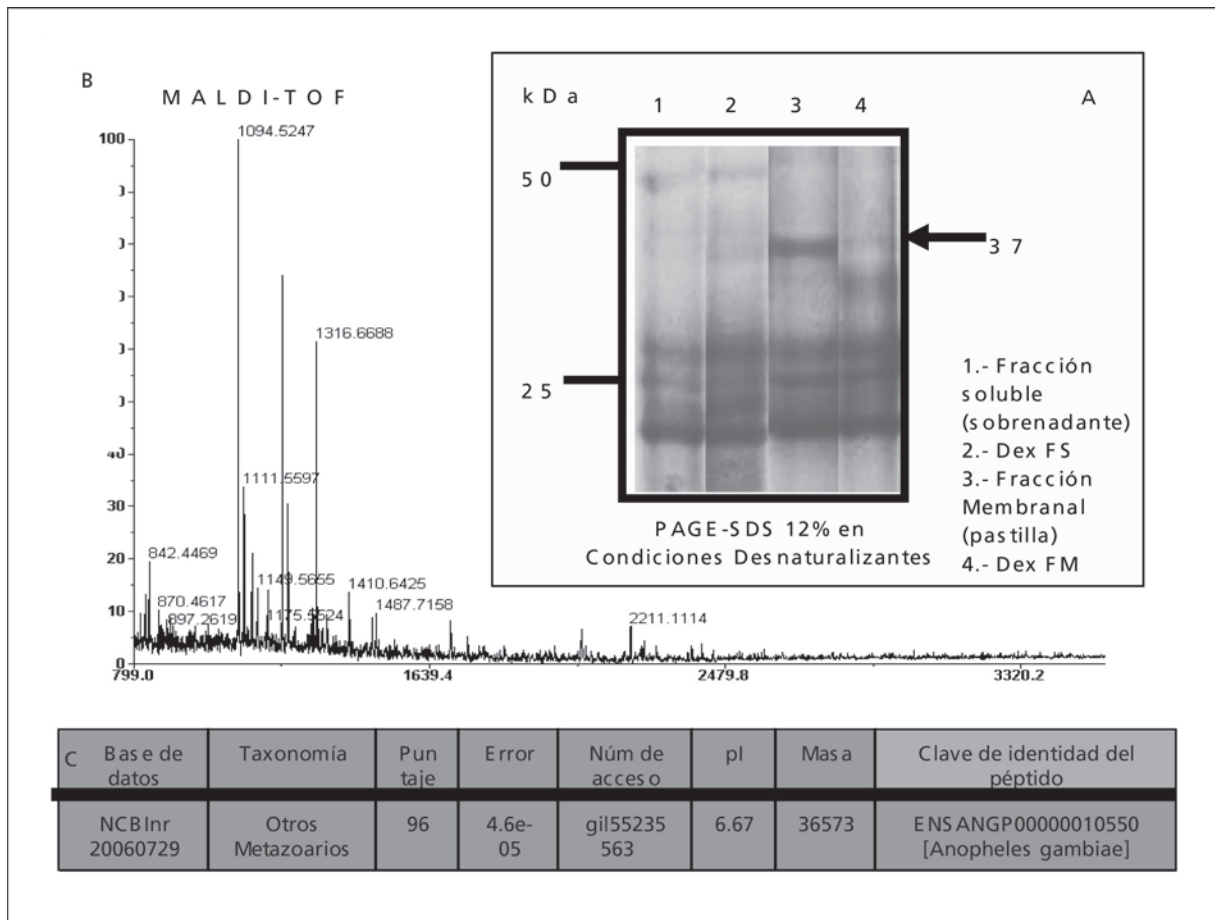
**Amplificación y clonación del cDNA parcial de DDH.** El producto amplificado fue clonado y secuenciado mediante el uso del Kit de clonación TOPO<sup>®</sup> TA (Invitrogen Co, Carlsbad, CA). El producto fue secuenciado en ambas direcciones por el Departamento de Secuenciación del CISEI-INSP, Cuernavaca, México.

**Análisis de secuencias.** Las similitudes de las secuencias de aminoácidos deducidas del cDNA parcial de DDH fueron analizadas usando el servidor en línea del Centro de Información Nacional de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la base de datos de Vectorbase (<http://aaegypti.vectorbase.org>). Posteriormente se realizaron alineamientos de las secuencias usando el programa CLUSTALW (v.3.2), disponible en San Diego Supercomputer Center (<http://www.sdsc.edu>).

## Resultados

**Proteínas diferenciales expresadas bajo el efecto de Dex y espectrometría de masas de una proteína de 37kDa.** En la electroforesis de las proteínas de estómagos, se observó una banda de tamaño aproximado a 37kDa (proveniente de la fracción soluble de los extractos) que en el tratamiento con Dex está ausente. Los iones masa obtenidos por MALDI-TOF/MS identifican esta proteína por su tamaño molecular y su punto isoeléctrico (pI) como una Dihidrodiol deshidrogenasa dimérica (figura 2).

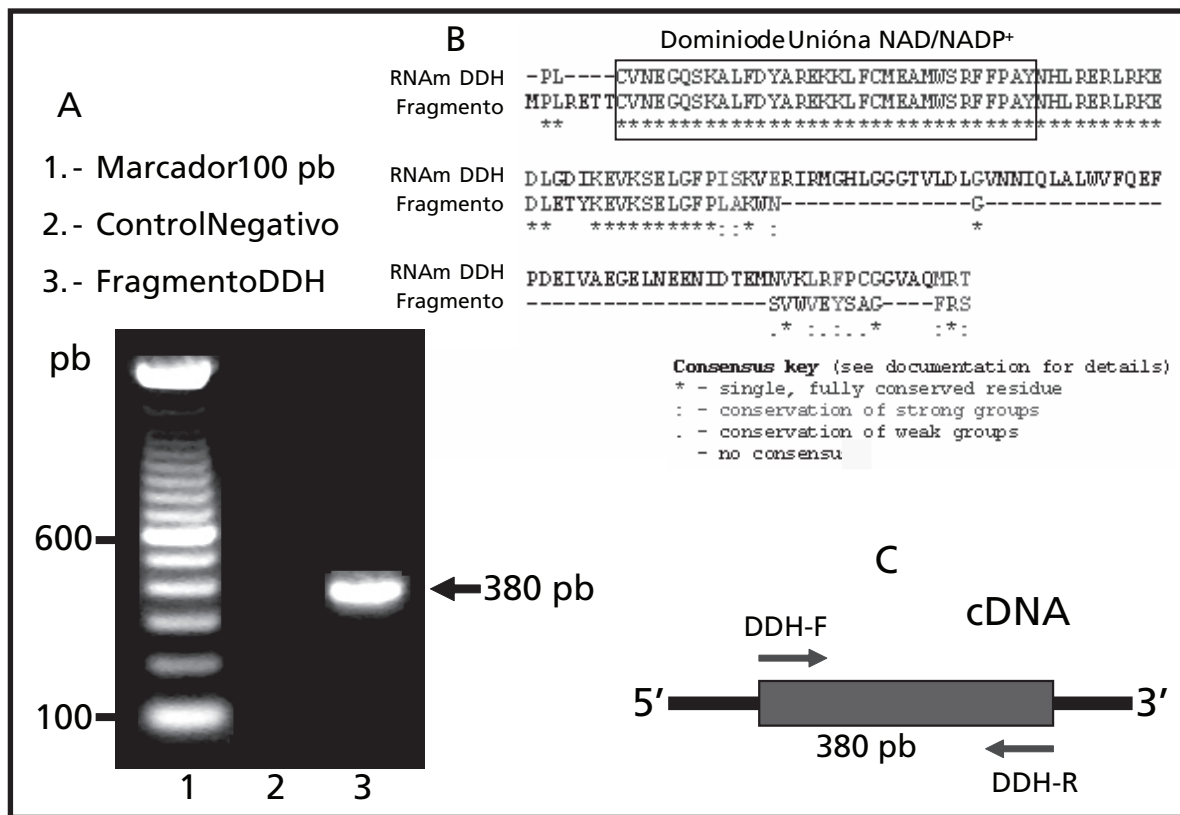
Figura 2. Análisis electroforético y espectrometría de masas de la proteína identificada de 37kDa.



En la electroforesis (A) se observa que una proteína de 37 kDa desaparece por efecto del inhibidor de síntesis de prostaglandinas (Dex). Esta proteína fue identificada por MALDI-TOF/MS (B) como una dihidrodiol deshidrogenasa dimérica con las características típicas que se muestran en la tabla (C).

**Amplificación, clonación y secuenciación de un fragmento del gen DDH.** Una vez identificada la DDH como la proteína con expresión diferencial bajo efecto de Dex, se procedió a confirmar la identidad y expresión de la DDH a nivel de ácidos nucleicos. Para esto se amplificó por PCR un fragmento de cDNA usando iniciadores deducidos a partir de la base de datos del genoma de *Ae. aegypti*. Se obtuvo el frgamento del tamaño esperado de 380 nucleótidos (figura 3). La secuencia mostró del 95-98% de identidad con la DDH descrita en anotaciones para *Ae. aegypti* (número de acceso EAT 48646) y con su posible ortólogo en *An. gambiae* (número de acceso EAA15029.2). El producto de traducción del fragmento amplificado correspondió al dominio de unión a NAD/NADP+, característico de estas enzimas.

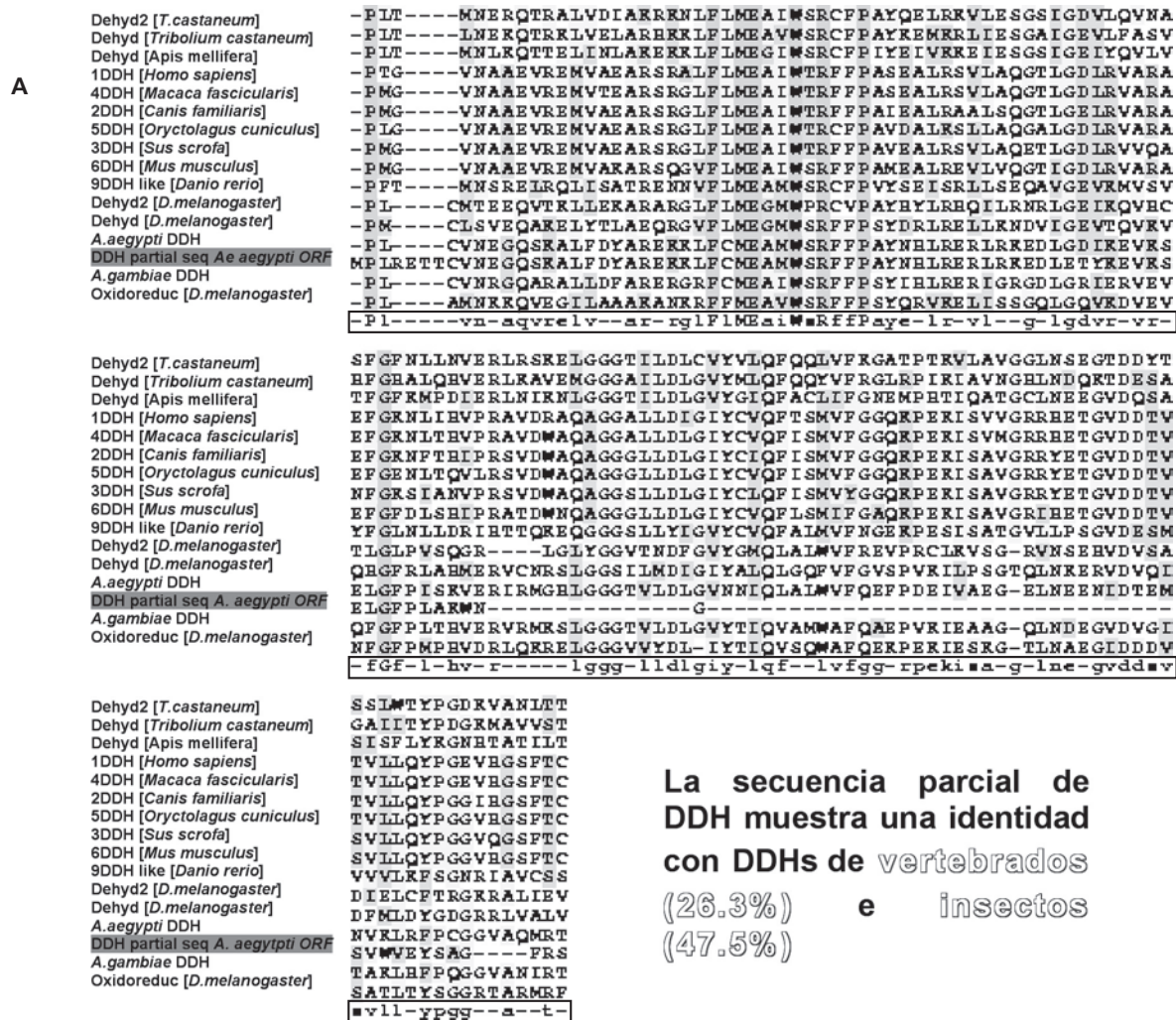
Figura 3. Secuencia de aminoácidos de la DDH en estómagos de *Ae.aegypti*.



Producto de amplificación de 380 pb (A) el cual fue clonado y secuenciado corroborando por su marco de lectura que identificó a una DDH (B). Esquema de la región que flanquean los iniciadores diseñados para la búsqueda del mensajero de DDH (C).

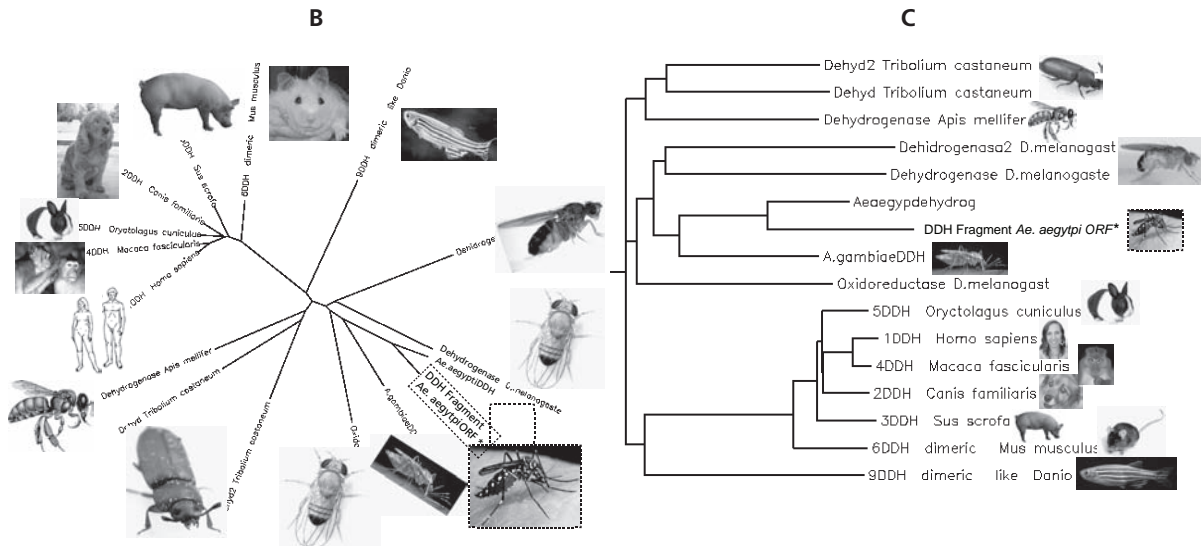
**Comparación de DDHs de diferentes organismos y análisis filogenéticos.** En la secuencia del fragmento de cDNA de DDH, se identificó un marco de lectura abierto que codificó para una proteína con 129 aminoácidos. La secuencia parcial de DDH identificada mostró un porcentaje de identidad de 26.3% con vertebrados y de 47.5% con insectos (figura 4A). Se construyeron dendogramas con y sin raíz, donde se observó que la DDH de *Ae aegypti* es divergente a las DDHs de vertebrados (figura 4B). La secuencia parcial de la DDH de *Ae aegypti* estuvo comprendida entre la DDH de *An. gambiae* y las DDHs de *D. melanogaster* pero en un grupo independiente (figura 4C).

Figura 4(a). Alineamiento múltiple de diversas DDHs descritas.



(A) Alineamiento de los aminoácidos conservados entre las diferentes DDHs (Boxshade). En un sombreado se resalta el fragmento de 380 pb identificado en *Ae. aegypti*. La región consenso se encuentra indicada por un recuadro.

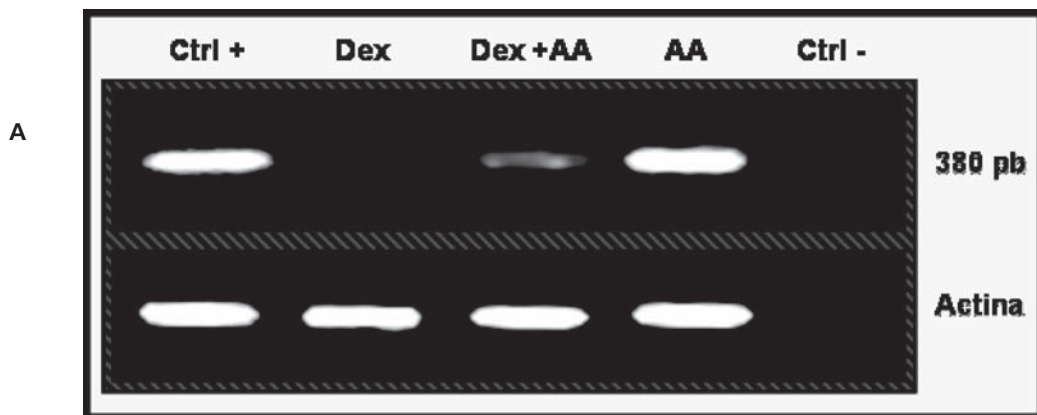
Figura 4 (b) (c).



(B) Dendrograma sin raíz de las DDHs. (C) Dendrograma con raíz. En ambas se resalta con línea punteada la ubicación del fragmento de DDH identificado en *Ae. aegypti*.

**Expresión del RNAm de DDH en estómagos de mosquitos adultos hembras.** El RNAm de la DDH de *Ae. aegypti* fue detectado en estómagos de mosquitos alimentados con azúcar. Con ello se muestra que el RNA mensajero de DDH está expresado basalmente en estómagos. El tratamiento con Dex durante 30 min inhibió la expresión de este mensajero (figura 5A), mostrando un rango menor al 16% de abundancia relativa (figura 5B). Al adicionar a los extractos AA (precursor de la síntesis de PGs) durante 45 min se observó la recuperación parcial del mensajero de DDH hasta un 43% de abundancia relativa (figura 5B). El tratamiento sólo con AA no tuvo ningún efecto en el mensajero 30 min post-tratamiento. La producción de RNAm de actina se mantuvo constante en todos los tratamientos (figura 5A).

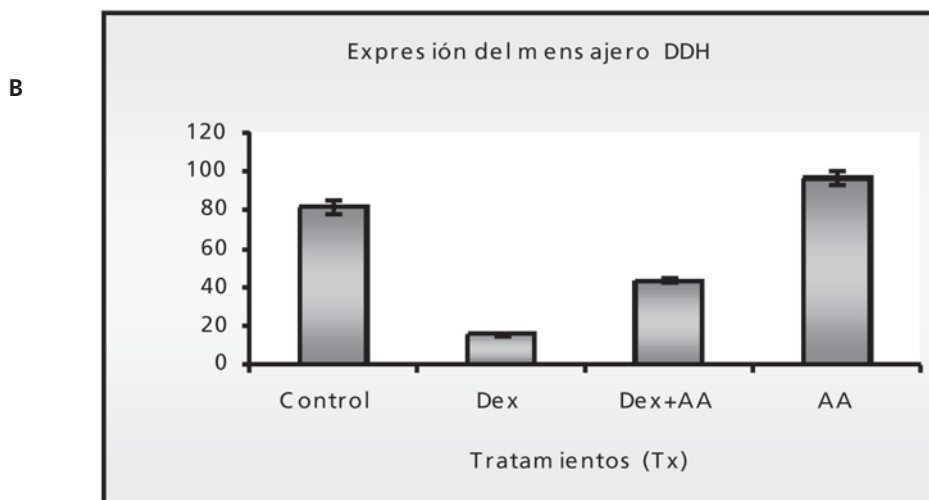
Figura 5(A). RT-PCR y Cuantificación densitométrica del RNAm de DDH.





- Penning, T.M, Mukharji I, Barrows S y Talalay P. (1984). Purification and properties of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biochem J* 15:601-11 pp.
- Penning, T.M y Sharp, R.B. (1987). Prostaglandin dehydrogenase activity of purified rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 148:646-52 pp.
- Penning, T.M. y Sharp, R.B. (1990). Characterization of dihydrodiol dehydrogenase in human liver and lung. *Carcinogenesis* 11:1203-8 pp.
- Penning T.M. (1993). Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chemical Biological Interactions* 89:1-34.
- Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N y Ratnam K. (2000). Human 3alpha- dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351:67-77 pp.
- Possanni, L.D., James, A.A. y De la Cruz Hernandez-Hernandez, F. (2004). Identification and characterization of gp65, a salivary-gland-specific molecule expressed in the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Insect Mol Biol* 13: 155-64 pp.
- Sambrook, J, Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Gel electroforesis of DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, EUA. Capitulo 6.
- Tomkins, G.M. (1956). A mammalian 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 218:437-47 pp.

Figura 5(B). RT-PCR y Cuantificación densitométrica del RNAm de DDH.



(A) Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del producto de PCR de una DDH en estómagos bajo diferentes tratamientos. Control positivo (Ctrl.+), Dexametasona (Dex), Dexametasona más ácido araquidónico (Dex + AA), ácido araquidónico (AA) y control negativo (Ctrl.-).

(B) Análisis densitométrico mostrando los diferentes tratamientos y su abundancia relativa porcentual respecto al control constitutivo de actina para cada tratamiento.

## Discusión


En vertebrados, se han encontrado múltiples isoformas de DDHs en diferentes especies (Arimitsu, et al., 1999). Estas enzimas están expresadas en tejidos específicos y pueden catalizar hormonas esteroides en un estado temprano de su metabolismo y suprimir la formación de epóxidos (potentes carcinogénicos) en la detoxificación de PAHs (Penning y Talalay, 1983). En las abejas hembras se ha mostrado que la DDH se encuentra presente en diferentes estadios de su desarrollo y tiene variaciones en su expresión, y se sugiere que podrían estar implicadas en la desactivación de hormonas esteroides o en la detoxificación de productos (Evans y Wheeler, 2001).

Nuestros resultados muestran la primera evidencia experimental de la presencia de las enzimas DDH en estómagos de hembras de mosquitos adultos de *Ae. aegypti*. En los mamíferos está descrito que los fármacos anti-inflamatorios, tanto esteroideos (SAIDs) como no esteroideos (NSAIDs), tienen efecto inhibitorio sobre las DDHs, particularmente la  $3\alpha$ -HSD (Hou et al., 1998). La inhibición de la  $3\alpha$ -HSD y de la ciclooxigenasa ocurre a concentraciones muy similares y existe correlación entre el potencial de inhibición de la DDH y el potencial terapéutico de estos fármacos (Penning et al., 1984). Nosotros mostramos que en estómagos de *Ae. aegypti* se produce DDH y es inhibida por la presencia de Dex, sugiriéndonos que existe un efecto similar al que se ha descrito en mamíferos (Penning et al., 1987). La inhibición de un tipo de DDH:  $3\alpha$ -HSD tanto por los SAIDs como por los NSAIDs y la relación que existe con sus actividades farmacológicas, sugiere la probabilidad de que en insectos también estén implicadas en la modulación de procesos tipo inflamatorio (Penning y Talalay 1983).

La gran similitud existente en los cDNAs descritos para las isoformas de DDHs en humanos, ratas y ratones, señala que existen genes ancestrales comunes. Por ejemplo, los genes que se describen para la  $3\alpha$ -HSD/DDH, que son miembros de la subfamilia AKR1 (Hung y Penning, 1999). En insectos la existencia de DDHs sugiere que estas enzimas están también conservadas en invertebrados y que probablemente tienen un ancestro común. Por otra parte se ha comprobado que la  $3$ -HSD/DDH en mamíferos está regulada por la Dex, y por el regulador transcripcional NF- $\kappa$ B (Penning, 1993). En algunos trabajos de líneas celulares de hígado, se ha señalado que los miembros de la familia NF-1 de factores de transcripción regulan fuertemente la expresión

constitutiva para la inactivación de hormonas esteroideas. Nosotros observamos que en el nivel de RNAm, la DDH presenta un comportamiento similar a lo descrito anteriormente y que probablemente las vías y los elementos de respuesta que participan (como NF-1, C/EBP, elemento de respuesta glucocorticoide GRE) son muy similares (Hung y Penning, 1999; Hou et al., 1998).

## Conclusión

El estudio de la actividad biológica de las DDHs en mosquitos vectores ayudará a comprender los mecanismos moleculares implicados en la detoxificación y el metabolismo de los PAHs y otros compuestos de características químicas similares como algunos pesticidas, insecticidas (productos químicos usados para el control de vectores) y hormonas esteroideas. Por otra parte, la regulación de la presencia y función de hormonas seguramente influye la respuesta inmune de los insectos, lo cual afecta en cómo ocurre la defensa ante diferentes agentes invasores, incluyendo aquéllos que pueden ser transmitidos al ser humano durante la picadura, por lo que estudios como éste serán útiles en el diseño de métodos de control de la transmisión de enfermedades. 

## Referencias

- Arimitsu, E., Aoki, S., Ishikura, S., Nakanishi, K., Matsuura, K y Hara, A. (1999). Cloning and sequencing of the cDNA species for mammalian dimeric dihydrodiol dehydrogenases. *Biochem J* 342:721-8 pp.
- Benyon, R.J. y Salvensen, G. (1989). Commercially available protease inhibitors. *A Practical Approach: Proteolytic Enzymes*. Oxford, UK. 241-249 pp.
- Evans, J.D. y Wheeler, D.E. (2001). Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol* 2: RESEARCH0001.
- Heredia, VV., Kruger, R.G. and Penning, T.M. (2003). Steroid-binding site residues dictate optimal substrate positioning in rat 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (3alpha-HSD or AKR1C9). *Chem Biol Interact* 143-144:393-400 pp.
- Herrera-Ortiz, A., Lanz-Mendoza, H., Martinez-Barnetche, J., Hernandez-Martinez, S., Villarreal-Trevino, C., Aguilar-Marcelino, L. y Rodríguez, M.H. (2004). *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem Mol Biol* 34:893-901 pp.
- Higaki, Y., Kamiya, T., Usami, N., Shintani, S., Shiraishi, H., Ishikura, S., Yamamoto, I. y Hara, A. (2002). Molecular characterization of two monkey dihydrodiol dehydrogenases. *Drug Metab Pharmacokinet* 17:348-56 pp.
- Hou, Y.T., Lin, H.K. y Penning, T.M. (1998). Dexamethasone regulation of the rat 3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase gene. *Mol Pharmacol* 53:459-66 pp.
- Hung, C.F. y Penning, T.M. (1999). Members of the nuclear factor 1 transcription factor family regulate rat 3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (3alpha-HSD/DD AKR1C9) gene expression: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Mol Endocrinol* 13:1704-17 pp.
- Khanna, M., Qin, K.N. y Cheng, K.C. (1995). Distribution of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and molecular cloning of multiple cDNAs encoding structurally related proteins in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:41-6 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.I. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75 pp.
- Michael E. Burczynski, Hseuh-Kung Lin, y Trevor M. Penning. (1999). Isoform-specific Induction of a Human Aldo-Keto Reductase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrophiles, and Oxidative Stress: Implications for the Alternative Pathway of PAH Activation Catalyzed by Human Dihydrodiol Dehydrogenase. Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer Research* 59: 607-614 pp.
- Montero-Solis C., Gonzalez-Ceron L., Rodriguez M.H., Cirerol B.E., Zamudio F., Possanni L.D., James A.A y De La Cruz Hernández-Hernández. (2004). Identification and characterization of gp65, a salivary-gland-specific molecule expressed in the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Insect Mol. Biol* 13: 155-164 pp.
- Pawlowski, J., Huizinga, M. y Penning, T.M. (1991). Isolation and partial characterization of a full-length cDNA clone for 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: a potential target enzyme for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Agents Actions* 34:289-93 pp.
- Penning, T.M. y Talalay, P. (1983). Inhibition of a major NAD(P)-linked oxidoreductase from rat liver cytosol by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents and by prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4504-8 pp.