

Evaluación genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, mediante el ensayo de micronúcleos

Genotoxic assessment of D-004, extract from *Roystonea regia* fruit, by means of micronuclei assays

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^I; Ariadne Gutiérrez Martínez^{II}; Rafael Gámez Menéndez^{III}; Balía Pardo Acosta^{IV}; Dayisell Curveco Sánchez^V; Haydeé García Cambián^{VI}

^IDoctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

^{II}Licenciada en Farmacia. Máster en Toxicología Experimental. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

^{III}Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Licenciado en Biología. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

^{IV}Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Aspirante a Investigadora. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

^VTécnico Medio en Farmacia Industrial. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

^{VI}Técnico Medio en Química. Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), que ha demostrado ser eficaz en prevenir la hiperplasia prostática inducida por testosterona y por fenilefrina en modelos experimentales en ratas. El objetivo fue determinar si el D-004 induce cambios en la frecuencia de aparición de micronúcleos al realizar la administración oral a dosis repetida durante 8 semanas. Se formaron 5 grupos experimentales (7 animales/grupo): un grupo control solvente, tres tratados con D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg) y un control positivo tratado con ciclofosfamida. No ocurrieron muertes ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas entre controles y tratados en cuanto a la frecuencia de eritrocitos policromatófilos micronucleados y el índice de citotoxicidad. En conclusión, el D-004 administrado por vía oral a las dosis

empleadas no presenta actividad clastogénica ni citotóxica en médula ósea de ratones OF-1 machos *in vivo*.

Palabras clave: D-004, micronúcleos, hiperplasia prostática, eritrocitos policromatófilos, ratones OF-1.

ABSTRACT

D-004 is a lipid extract from the real palm fruit (*Roystonea regia*), which has demonstrated that is effective to prevent prostatic hyperplasia from testosterone and from phenylephrine in rats' experimental models. Aim of this paper was to determine if D-004 provoke changes in appearance frequency of micronuclei during oral administration of repeated doses for 8 weeks. Five experimental groups were created (7 animals/group): a solvent control-group, three treated with D-004 (500, 1 000, and 1 500 mg/kg), and a positive control-group treated with cyclophosphamide. There were no deaths or clinical signs of toxicity neither significant differences among controls and treated ones as regards the frequency of micronucleated polychromatophils erythrocytes, and the cytotoxic index. In conclusion, D-004 administered per os at doses used has neither clastogenic nor cytotoxic activity in bone marrow male OF-1 mice *in vivo*.

Key words: D-004, micronuclei, prostatic hyperplasia, polychromatophils erythrocytes, OF-1 mice.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un alargamiento de la fibra muscular y la estructura epitelial de la próstata, glándula masculina situada inmediatamente debajo de la vejiga que conlleva a la obstrucción del flujo urinario y a la aparición de un conjunto de síntomas del tracto urinario bajo (STUB).¹ Aunque la etiopatología de la HPB es multifactorial, los cambios hormonales que ocurren en el hombre que envejece, como el aumento en la actividad de la enzima 5 α -reductasa que transforma la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona (DHT) parece desempeñar una función fundamental, ya que la DHT, acumulada en la próstata propicia la liberación de factores de crecimiento que conllevan a la hiperplasia del tejido.^{2,3} Por otra parte, un aumento del tono del músculo liso de la próstata, mediado por un aumento de la contribución de los receptores α 1-adrenérgicos, es responsable de los STUB característicos de la HPB.^{4,5}

El D-004 es un extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*), que consiste en una mezcla de ácidos grasos primarios saturados de cadena lineal, entre 12 y 18 átomos de carbono.² El D-004 administrado por vía oral ha demostrado efecto preventivo y terapéutico en el modelo de hiperplasia prostática (HP) inducida por T en ratas, lo que reduce el aumento del tamaño de la próstata y

los cambios morfológicos característicos de la hiperplasia desarrollada.^{3,4} Por otra parte, el D-004 ha antagonizado las respuestas mediadas por los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos *in vitro* e *in vivo*.⁵ La administración oral de dosis únicas de D-004 (2 g/kg de peso corporal) no evidenció manifestaciones indicativas de toxicidad en ratas y conejos.^{6,7} Resultados consistentes fueron obtenidos en estudios de toxicidad oral por dosis repetidas de 90 días (subcrónico) y 6 meses (crónico) en ratas SD, en los que se administraron dosis de hasta 2 000 y 1 000 mg/kg, respectivamente, sin detectar toxicidad atribuible al D-004 y las mayores dosis no producir efectos adversos detectables (*non observable adverse effect level* - NOAEL).⁶

Estudios previos demostraron que de acuerdo con los resultados de la prueba de Ames y el ensayo cometa en ratones NMRI, el D-004 no presentaba potencial genotóxico.^{8,9} Posteriormente se evaluaron los efectos del D-004 en el ensayo de micronúcleos (MN) realizado según el esquema tradicional, el cual también mostró resultados negativos.¹⁰

Este ensayo es uno de los incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH),^{11,12} es fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea.^{12,13} Este sistema permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.¹³

Dada la importancia del ensayo de MN y aprovechando la estrategia de integración de estudios toxicológicos para de esta forma cumplimentar con 2 objetivos fundamentales, el adiestramiento del personal nuevo en el laboratorio y la reducción del número de animales a utilizar en las investigaciones, para aprovechar al máximo su uso (principio de las "3R"), este estudio tuvo como objetivo confirmar la ausencia de potencial genotóxico del D-004 administrado en un amplio rango de dosis, por más tiempo (8 semanas), con diferentes condiciones experimentales al anterior, en muestras de ratones machos incluidos en un estudio subagudo.

MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratones machos OF-1 adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena que se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura 25 ± 2 °C, humedad relativa 60 ± 10 % y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie) fue *ad libitum*.

Administración y dosificación: El D-004 se suspendió en Tween 65 (2 %) 2 h antes de la administración y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente (7 ratones/grupo) 5 grupos experimentales: un grupo control de vehículo (Tween 65 al 2 %), tres tratados con D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg) y un control positivo tratado con ciclofosfamida (N,N-bis (cloruro de etilo)-N', O-esterdiamida del ácido fosfórico propinel) (CF) (mutágeno de reconocida potencia validado para este ensayo). Los tratamientos D-004 y vehículo se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg) durante 8 semanas, 5 días en la semana en el horario comprendido de 10:00 a 11:00 a.m. La ciclofosfamida se administró en dosis única (50 mg/kg) por vía intraperitoneal 48 h

previas al sacrificio en el horario de 10:00 a 11:00 a.m., según se establece para el ensayo.¹⁴

La dosis menor de D-004 empleada fue 500 mg/kg, la cual ha demostrado ser efectiva en los modelos HP en roedores y 2 niveles superiores múltiples de este (1 000 y 1 500 mg/kg).^{15, 16}

Ensayo de micronúcleos de médula ósea de ratón: Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 3 mL de suero bovino fetal. La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 rev/min durante 10 min, y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5 % durante 12-15 min. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por 3 observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas".

Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos.¹⁷ Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1, 2 y > 2 MN en cada grupo.

Eutanasia: Fue realizada en el horario comprendido entre las 10:00 a 11:00 a.m., mediante el método de dislocación cervical con previa anestesia en atmósfera de éter. Los animales tratados con D-004 y los controles se sacrificaron a las 24 h después de la última administración y los tratados con ciclofosfamida a las 48 h de la administración.

Análisis estadístico: La frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza ANOVA. El número total de MN y el número de EP con 1, 2 y > 2 MN se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado. El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el empleo del Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

No ocurrieron muertes durante el estudio ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. No hubo diferencias significativas entre grupos tratados y controles en cuanto al índice de citotoxicidad (EP/EN), frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados ([tabla 1](#)) y número de EP con 1, 2 o más MN ([tabla 2](#)); no resultó así para los grupos tratados con CF para los cuales sí se encontró diferencia significativa.

Tabla 1. Número total de eritrocitos poli y normocromáticos, índice de citotoxicidad y porcentaje de EP con micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	EP	EN	EP/EN	MN-EP (%)
Control vehículo	-	7	1045 ± 11,9	955 ± 11,9	1,1 ± 0,02	0,14 ± 0,05
D-004	500	7	1068 ± 21,6	932 ± 21,6	1,2 ± 0,05	0,17 ± 0,06
D-004	1 000	7	1067 ± 26,0	933 ± 26,0	1,1 ± 0,06	0,16 ± 0,04
D-004	1 500	7	1056 ± 32,8	944 ± 32,8	1,1 ± 0,07	0,19 ± 0,03
CF	50 ^a	7	965 ± 22,7*	1035 ± 22,7*	0,9 ± 0,04*	1,69 ± 0,27*

^aAdministración única por vía ip.
 Determinaciones en 2 000 células/animal.
 *p < 0,05 (comparación con el control, ANOVA).
 Media; DE desviación estándar

Tabla 2. Número total de micronúcleos y de eritrocitos policromáticos con uno, dos o más de 2 micronúcleos en médula ósea de ratones OF-1

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	MN	PCE 1 MN	PCE 2 MN	PCE +2 MN
Control	-	7	20	15	4	1
D-004	500	7	24	17	7	0
D-004	1000	7	22	14	7	1
D-004	1500	7	27	20	6	1
CF	50 ^a	7	236*	158*	62*	16*

^aAdministración única por vía ip.
 Determinaciones en 2 000 EP.
 *p < 0,05 (comparación con el control, prueba de chicuadrado).

DISCUSIÓN

El índice EP/EN, indicador de la proliferación celular en médula ósea, fue estadísticamente similar en los grupos tratados con D-004 y en el control, lo que indica ausencia de efecto citotóxico del tratamiento a todas las dosis: las células continuaban su fase normal de diferenciación, proliferación y maduración en la médula ósea. Sin embargo, los valores de este índice en los ratones tratados con CF fueron estadísticamente significativos al compararlo con los controles y tratados.

La frecuencia de aparición de EP con MN se comportó de forma similar para los grupos tratados con D-004 y para el control. En este último los valores son consistentes con lo reportado para esta especie y con nuestros datos históricos.^{18,19} El grupo control positivo (CF) mostró una frecuencia de EP con MN alta y mayor que en los restantes grupos, lo que representa una evidencia de rupturas cromosómicas o daño en el aparato del huso mitótico; el incremento de la frecuencia de los MN es consecuencia directa de la acción de mutágenos.²⁰

El número de EP con 1, 2 o más MN también fue similar en los grupos tratados y control, y mayor en los animales tratados con CF. El aumento encontrado en el grupo tratado con (CF) evidencia la acción citotóxica y clastogénica de este mutágeno de referencia a la dosis y vía de administración empleada²¹ y la fiabilidad, sensibilidad del modelo empleado para el objetivo propuesto.²²

Resultados similares obtuvieron *Hedde* y *Cimino* en 1991, al utilizar dentro de sus estudios genotóxicos la ciclofosfamida como control positivo y evaluarlo como un potente agente en la formación de micronúcleos.²³

En conclusión, el D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg) administrado por vía oral durante 8 semanas no presenta actividad clastogénica ni citotóxica en médula ósea de ratones OF-1 machos *in vivo*, resultados que concuerdan con los datos de estudios de genotoxicidad precedentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Madsen B. Benign prostatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. *Curr Opin Nephrol Hypert.* 1995;5:455-9.
2. Laguna A, Rodríguez E. (Assignees Laboratorios DALMER S.A) 2003. Pharmaceutical composition and procedure for the prevention and treatment of prostate hyperplasia and prostatitis obtained from the fruits of *Roystonea regia* (Cuban royal palm). (CUB Pat/2003).
3. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res.* 2004;30:227-34.
4. Noa M, R Mas. Effect of D004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Int J Tissue React.* 2005;27:203-11.
5. Arruzazabala ML, Mas R, Carbajal D. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on in vitro and in vivo effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. *Drugs RD.* 2005;6:281-9.
6. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, et al. Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(3):101-8.
7. Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, et al. Toxicología aguda del D-004 en conejos. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2007;38(2):99.
8. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2005;36 Especial.
9. Marrero G, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa). *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2007;38(3):200-3.
10. Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, García H. Evaluación genotóxica in vivo del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2005;36 Especial.

11. Cox SH, Ann M. Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing. 2nd ed. North Carolina: Revised and Expanded. Research Triangle Park; 1999. p. 178-9.
12. Schmid W. The micronucleus assay. *Mutation Res.* 1975;24:9-11.
13. Alamone MF. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Molecular Mutagenesis.* 1994;23:239.
14. Junior F, Pachierotiti F, Shimada H, Sutuo S, Vannier B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res.* 1994;4:293-312.
15. Boyle P, Gould AL, Roehrborn CG. Prostate volume predicts outcome of treatment of benign prostatic hyperplasia with finasteride: meta-analysis of randomized clinical trials. *Urology.* 1996;48:398-405.
16. Small JK, Bombardelli E, Morazzoni P. *Serenoa repens* (Bartram). *Fitoterapia.* 1997;68:99-113.
17. Hayashi M, Tice R, MacGregor JT, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M, et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res.* 1993;5:120-34.
18. MacGregor JT, Tucker JD, Eastmond DA, Wyribek AJ. Integration of Cytogenetic assays with toxicology studies. *Environ Molecular Mutagenesis.* 1995;25:328.
19. Gámez R, Fernández I, Acosta P.C, Alemán C, Rodeiro G, Rodríguez M, et al. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas.* 2000;31(3):211-6.
20. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1981;31:9-15.
21. Mac Gregor JT, Wehr CM, Gould DH. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen.* 1999;2:509-14.
22. Richold M, Ashby J, Bootman J, Chandley A, Gatehouse D, Henderson L. In Vivo Cytogenetics Assay, Basic Mutagenicity test. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, 1990. p. 115-41.
23. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present and Future. *Environ Molecular Mutagenesis.* 1991;18:277-9.

Recibido: 12 de enero de 2009.

Aprobado: 17 de febrero de 2009.

Dr. M. V. *Daniel Francisco Arencibia Arrebola*. Centro de Productos Naturales. Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu