

Efectos del extracto de alcoholes purificados de la cera de abejas (*Apis mellifera*) en dos modelos de analgesia

Effect of purified alcohols extract from the bee wax (*Apis mellifera*) in two analgesia models

Lilia Fernández Dorta^I; Rosa Más Ferreiro^{II}; Julio César Fernández Travieso^{III}; Caridad Hernández Ortega^{IV}

^IDoctora en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Titular. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

^{II}Doctora en Ciencias Biológicas. Investigadora Titular. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

^{III}Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

^{IV}Técnica en Laboratorio. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El D-002 es una mezcla de 6 alcoholes alifáticos de alto peso molecular purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*). Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos del tratamiento por vía oral con D-002 sobre las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y en el modelo del plato caliente en ratones. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (10-20 animales/grupo): uno control que recibió el vehículo goma acacia/H₂O, tres tratados con D-002 (25, 125 y 250 mg/kg) y uno con aspirina (modelo de contorsiones abdominales) o morfina (plato caliente). El D-002 (25-250 mg/kg) inhibió significativamente las contorsiones inducidas por ácido acético en un 44,5; 44,8 y 47,1 % respectivamente; sin embargo, no modificó la latencia de la respuesta en el modelo del plato caliente. Estos resultados muestran que el tratamiento por vía oral con D-002 (25-250 mg/kg) es capaz de inhibir de forma moderada las contorsiones abdominales por ácido acético sin afectar la respuesta al plato caliente. Esto sugiere que el D-002 ejerce una acción analgésica periférica pero no a nivel central.

Palabras clave: Ácido acético, contorsiones abdominales, plato caliente, analgésico, *Apis mellifera*.

ABSTRACT

The D-002 is a mixture of 6 high molecular weight aliphatic acids purified from bee wax (*Apis mellifera*). The aim of present study was to research the effects of an oral treatment using D-002 on the acetic acid- induced abdominal writhings and in the hot plate model in mice. Animals were randomized distributed to 5 groups (10-20 animals/group): a control one received the Gum Arabic vehicle/H₂O, three received D-002 (25, 125 and 250 mg/kg), and another received aspirin (abdominal contortions model) or morphine (hot plate). The D-002 inhibited the above mentioned writhings in a 44., 44,8 and 47. , respectively; however, not modified the response latency in the hot plate model. These results demonstrate that the D-002 (25-250 mg/kg) oral treatment may to inhibit in a moderate way the above mentioned writhings without to affect the response to hot plate. It suggests that the D-002 exerts a peripheral analgesic action but not a central level.

Key words: Acetic acid, abdominal writhings, hot plate, analgesic, *Apis mellifera*.

INTRODUCCIÓN

El D-002 está constituido por una mezcla de 6 alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular (tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, triacontanol, dotriacontanol and tetratriacontanol) purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*), cuyo componente más abundante lo constituye el triacontanol.¹ El D-002 ha mostrado efectos antiulcerosos²⁻⁵ y antioxidantes⁶⁻⁸ en ratas y humanos, así como efectos antiinflamatorios en estudios experimentales.⁹

En el modelo de pleuresía inducida por carragenina en ratas, el D-002 produjo una reducción modesta del edema y una disminución marcada de los niveles de leucotrieno (LTB₄) presentes en el exudado pleural, mientras que en el modelo de granuloma inducido por implantes de tacos algodón en ratas, el D002 redujo el peso del granuloma.⁹

Tomando en consideración la relación existente entre los procesos de inflamación y dolor, el objetivo de este estudio consistió en evaluar el efecto del D-002 en 2 modelos conductuales (contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y plato caliente) utilizados ampliamente para el tamizaje de sustancias con efecto antinociceptivo.¹⁰⁻¹⁴

METODOS

Animales

Se utilizaron ratones OF1 machos, procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), cuyo peso corporal osciló entre 20 y 30 g. Se les suministró pienso para roedores y agua *ad libitum*. Los animales fueron adaptados durante 15 días a las condiciones del laboratorio (25 ± 2 °C), humedad (65 ± 5 %) y ciclos de luz/oscuridad de 12 h.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con los principios éticos recomendados en los Lineamientos Internacionales y en la República de Cuba para animales de experimentación y con la aprobación del Comité de Ética del Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación

El D-002 fue suministrado por el Departamento de Química (Centro de Productos Naturales, La Habana, Cuba). Se administró en una disolución acuosa de goma acacia a una concentración de 10 mg/mL mediante entubación gástrica (1 mL/200 g de peso corporal) entre las 8:00 y 10:30 a.m., con 2 h de antelación a la realización de las pruebas.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (10-20 animales/grupo): 3 tratados con D-002 (25, 125 y 250 mg/kg), uno control que solo recibió volúmenes equivalentes del vehículo goma acacia-agua y otro que recibió aspirina (100 mg/kg i.p.) en el modelo de contorsiones abdominales o morfina (5 mg/kg i.p.) en el ensayo del plato caliente. Las dosis de D-002 seleccionadas corresponden al intervalo en el cual había mostrado efectos antiinflamatorios,⁹ antiulcerosos²⁻⁵ y antioxidantes⁶⁻⁸ en estudios experimentales.

Procedimiento experimental

Contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. El experimento se realizó según lo descrito por *Collier* y otros¹⁴ Los ratones recibieron por vía i.p. ácido acético (0,6 % en solución salina 10 mL/kg). Se cuantificó el número de contorsiones que ocurrieron en los 15 min siguientes a la inyección de ácido acético.

Ensayo de plato caliente. Se desarrolló mediante una modificación del método de *Holzer* y otros.¹⁵ Los animales se colocaron en el plato caliente (Ugo Basile, Italia), con una temperatura de 57 ± 2 °C en su piso. Se cuantificó la latencia de las respuestas al dolor (lamido de las patas y (o) salto). El ensayo se daba por terminado si el animal no respondía en 60 s.

Análisis estadístico

Para la comparación entre grupos se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguida de un análisis de múltiples comparaciones. Los resultados se presentan como mediana \pm EEM y porcentaje de inhibición en el modelo de contorsiones, mientras que para el caso del plato caliente los resultados se muestran como media \pm DE. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó el paquete de programas Statistics para Windows (Release 4.2, Stat Soft Inc, USA).

RESULTADOS

El pre-tratamiento por vía oral con dosis orales únicas de D-002 (25, 50 y 250 mg/kg) redujo de forma significativa, pero no dependiente de las dosis, las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético en un 44,5; 44,8 y 47,1 % respectivamente. La aspirina produjo una inhibición de las contorsiones abdominales en un 66,4 % ([tabla 1](#)).

Sin embargo, la administración de D-002 (25-250 mg/kg) no modificó la latencia de la respuesta al estímulo doloroso en el modelo de plato caliente, ya que los valores obtenidos en los grupos tratados con D-002 y el control fueron estadísticamente similares. Sin embargo, en el grupo tratado con morfina se incrementó de forma significativa la latencia de salto ([tabla 2](#)).

Tabla 2. Efectos del D-002 sobre la respuesta al estímulo doloroso en el modelo del plato caliente

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Latencia de respuesta (s) [†]
Control	0	6 ± 3
D-002	25	4 ± 1
D-002	125	4 ± 1
D-002	250	5 ± 3
Morfina	5	20 ± 2

[†]p < 0,05 con respecto al grupo control (prueba de Kruskal-Wallis).

Los datos se expresan como media ± DE.

La latencia de la respuesta es el tiempo (s) en el cual los ratones manifiestan la primera respuesta (lamido de la pata y/o salto) al estímulo doloroso.

DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra por primera vez que la administración por vía oral de dosis únicas de D-002 (25-125 mg/kg) produce un efecto analgésico, ya que inhibió las contorsiones abdominales inducidas por la inyección por vía i.p. de ácido acético, si bien no se afectó la respuesta en el modelo del plato caliente. La inhibición de las contorsiones abdominales fue inferior a un 50 % y no mostró dependencia de las dosis, lo que indica que la magnitud del efecto analgésico observado es moderado.

En el modelo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético, también llamado modelo de dolor visceral, la inyección de ácido acético produce una inflamación aguda en la zona peritoneal que conlleva a una reacción dolorosa,

debido a una estimulación de las fibras nociceptivas aferentes por la reducción local del pH y la síntesis de mediadores inflamatorios.¹⁰⁻¹⁴

Los mediadores endógenos sensibilizan o estimulan los nociceptores mediante su activación directa, como la histamina, o mediante la sensibilización del nociceptor por acción de otros mediadores.¹⁶ El LTB₄ constituye uno de los mediadores que desencadenan hiperalgesia inflamatoria a través de un mecanismo independiente de la síntesis de PG y dependiente de los leucocitos polimorfonucleados.¹⁷

Por su parte, el plato caliente es un modelo de evaluación de respuesta al dolor que implica componentes a nivel de sistema nervioso central, sensorial y motor, así como su integración, pero que básicamente evalúa efectos antinoceptivos supraespinales, reflejando la actividad de las fibras aferentes sensibles a la temperatura y la actividad de las fibras A y C.¹⁸

Los resultados negativos obtenidos en el ensayo de plato caliente así como los positivos en las contorsiones inducidas por ácido acético no resulta del todo sorprendente, si se tiene en cuenta que la sensibilidad de este último es unas 10 veces mayor que la del ensayo de plato caliente o incluso que la prueba de tracción en la cola,¹⁹ por lo cual la intensidad moderada del efecto analgésico del D-002 pudiera justificar esta diferencia.

Estos resultados sugieren que los efectos analgésicos de dosis únicas del D-002 deben producirse bien por una reducción de la inflamación *in situ* o mediante la inhibición de los receptores al dolor en el sitio de inflamación. Teniendo en cuenta que en el modelo de pleuresía inducida por carragenina en ratas, el D-002 produjo una reducción de las concentraciones de LTB₄ en el exudado pleural,⁹ resulta plausible que sus efectos sobre las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético sean explicados a través de este mecanismo.

Además de no haber afectado la respuesta en el modelo del plato caliente, en estudios previos se ha demostrado que el tratamiento oral con dosis únicas y repetidas de D-002 no afecta la actividad exploratoria ni la sujeción y ejecución en varilla rotatoria, por lo que se descarta que el efecto aquí observado se deba a una acción sedante,²⁰ y se refuerza la idea que el efecto se asocie a la acción antiinflamatoria del D-002.

En tal sentido, el hecho que el D-002 induzca efectos antiinflamatorios y analgésicos moderados en modelos en los cuales el dolor se asocia al desarrollo de un proceso inflamatorio, y que, proteja el daño gástrico inducido por los antiinflamatorios no esteroideos, etanol y por la ligadura del piloro,²⁻⁵ sustenta su valor potencial en el manejo de algunas condiciones inflamatorias, si bien ello debe ser demostrado clínicamente.

Finalmente, estos resultados conminan a investigar si los efectos analgésicos del D-002 también se manifiestan tras el tratamiento con dosis orales repetidas, así como en otros modelos de analgesia con el objetivo de esclarecer los mecanismos implicados en este efecto.

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento por vía oral con D-002 (25-250 mg/kg) es capaz de inhibir de forma moderada las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético, sin producir efectos antinoceptivos en el modelo del plato caliente. Esto sugiere una acción analgésica periférica pero no a nivel central.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Más R. D-002: Beeswax alcohols. *Drugs of the Future* 2001;26:731-44.
2. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Rodeiro I, Más R, Magraner J. Possible cytoprotective mechanism in rats of D-002, an anti-ulcerogenic product isolated from beeswax. *J Pharm Pharmacol* 1996;48:858-60.
3. Molina V, Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R. Therapeutic effect of D-002 (Abexol®) on gastric ulcer induced experimentally in rats. *J Med Food*. 2005;8:59-62.
4. Hano O, Illnait J, Más R, Fernández L, Piñol F, Fernández J.C. Effects of D-002, a product isolated from beeswax, on duodenal ulcer: a double- blinded placebo-controlled study. *Curr Ther Res*. 2001;62:394-407.
5. Illnait J, Terry H, Más R, Fernández L, Carbajal D. Effects of D-002, a product isolated from beeswax, on gastric symptoms of patients with osteoarthritis treated with piroxicam: a pilot study. *J. Med. Food*. 2005;8:63-68.
6. Molina V, Valdés S, Carbajal D, arruzazabala ML, Menéndez R, Más R. Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with injury induced experimentally. *J Med Food*. 2001;4:79-84.
7. Menéndez R, Más R, Amor AM, Pérez Y, González RM, Fernández JC, et al. Antioxidant effect of D-002 on the in vitro susceptibility of whole plasma in healthy volunteers. *Arch Med Res* 2001;32:436-41.
8. López E, Illnait J, Molina, Oyarzabal A, Fernández L, Pérez Y, et al. Effects of D-002 (beeswax alcohols) on lipid peroxidation in middle-age and older subjects. *Latin Am J Pharmacol*. 2008;27:695-703.
9. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Más R. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids* 1998; 59: 235-238.
10. Chiba S, Nishiyama T, Yoshikawa M, Yamada Y. The Antinociceptive Effects of Midazolam on Three Different Types of Nociception in Mice. *J Pharmacol Sci*. 2009;109:71-7.
11. Stepanovic-Petrovic RMTomic MA, Vuckovic SM, Paranos S, Ugresic ND, Prostran MS, et al. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesth Analg*. 2008;106:1897-903.
12. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*. 2000;387:111-8.
13. Yu WC, Huang GY, Zhang MM Influence of connexin 43 gene knockout on the analgesic effect of acupuncture in visceral pain mice. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2008;33:3-6.
14. Collier HDJ, Dinnen LC, Johnson CA, Scheider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *B J Pharmacol Chemother*. 1968;32:295-310.

15. Holzer P, Jurna I, Gambe R, Lembeck F. Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment. *Eur J Pharmacol.* 1979;58:511-4.
16. Lin CR, Amaya F, Barret L, Wang H, Takada J, Samad TA, et al. Prostaglandin E₂ receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:1096-103.
17. Cunha JM, Sachs D, Canetti CA, Poole SS, Ferreira SH, Cunha FQ. The critical role of leukotriene B₄ in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. *Br J Pharmacol* 2003;139:1135-45.
18. Jinsmaa Y, Okada Y, Tsuda Y, Shiotani K, Sasaki Y, Ambo A, et al. Novel 2'6'-dimethyl-L-tyrosine-containing pyrazinone opioid mimetic mu-agonist with potent antinociceptive activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:432-8.
19. Talarek S, Fidecka S. Role of nitric oxide in benzodiazepines-induced antinociception in mice. *Pol J Pharmacol.* 2002;54:27-34.
20. Fenández L, Fernández JC, Más R, Hernández C. Effects of D-002 on behavioral patterns in mice. *Rev CENIC Cienc Biol.* 2008;39(3):143-7.

Recibido: 8 de diciembre de 2009.

Aprobado: 14 de enero de 2010.

Dra. *Lilia Fernández Dorta*. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6 414. La Habana, Cuba. Correo electrónico: lilia.fernandez@cnic.edu.cu

Tabla 1. Efectos del D-002 sobre las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético

Tratamiento	Dosis	Contorsiones	Inhibición (%)
Control	0	42,0 ± 1,7	
D-002	25	22,5 ± 2,9 ⁺⁺	44,5
D-002	125	22,0 ± 2,7 ⁺	44,8
D-002	250	21,0 ± 2,5 ⁺	47,1
Aspirina	100	15,0 ± 0,8 ⁺⁺⁺	66,4

⁺p < 0, 0001; ⁺⁺p < 0,00001; ⁺⁺⁺p < 0,000001 con respecto al grupo control (prueba de Kruskal-Wallis).

Los datos se expresan como mediana ± EEM y porcentaje de inhibición de contorsiones con respecto al grupo control.