

Efectos del D-003, mezcla de ácidos alifáticos en el ensayo de aberraciones cromosómicas *in vivo*

Effects of D-003, a mixture of aliphatic acids in a trial of *in vivo* chromosomal aberrations

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^I; Rafael Gámez Menéndez^{II}; Ariadne Gutiérrez Martínez^{III}; Rosa Mas Ferreiro^{IV}; Balía Pardo Acosta^V; Haydee García Cambián^{VI}

^IDoctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

^{II}Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Licenciado en Biología. Investigador Titular. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

^{III}Licenciada en Farmacia. Máster en Ciencias Toxicológicas. Investigadora Agregada. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

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

^VDoctora en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Aspirante a Investigadora. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

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

RESUMEN

El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios de alto peso molecular purificada de la cera de caña de azúcar, cuyo componente principal es el ácido octacosanoico, con efectos antiosteoporóticos, hipolipemiantes y antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue determinar si el tratamiento oral con D-003 durante 14 días induce aberraciones cromosómicas *in vivo* en médula ósea de ratones. Se formaron 5 grupos experimentales (5 ratones/grupo/sexo): un grupo control solvente, tres tratados con D-003 (500, 1 000 y 2 000 mg/kg) y un control positivo tratado con ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.), 24 h antes del sacrificio. El D-003 no

aumentó la frecuencia de aparición de aberraciones (estructurales o numéricas) ni modificó el índice mitótico con respecto a los controles negativos, mientras que la ciclofosfamida, como era esperado sí aumentó ambas frecuencias. En conclusión, el D-003 no presentó potencial genotóxico ni citotóxico sobre las células de la médula ósea de ratones NMRI.

Palabras clave: Aberraciones cromosómicas, ácidos alifáticos primarios, ciclofosfamida, médula ósea, ratones NMRI.

ABSTRACT

The D-003 is a mixture of high-molecular weight primary aliphatic acids purified from the sugar cane wax, whose main component is the octacosanic acid with antiosteoporotic, hypolipidemic and antioxidant effects. The aim of present paper was to determine if the oral treatment with D-003 for 14 days induces *in vivo* chromosomal aberrations in bone marrow of mice. Animals were randomized into 5 groups (5 mice/group/sex): one solvent control group, 3 D-003- treated with Cyclophosphamide (50 mg/kg), intraperitoneal route) 24 hours before sacrifice. D-003 neither increase the frequency of aberrations appearance (Structural or numerical) nor modified the mitotic index with regard to negative controls, whereas the cyclophosphamide increase both frequencies as expected. In conclusion, the D-003 has neither genotoxic potential nor cytotoxic on the bone marrow cells of NMRI mice.

Key words: Chromosomal aberrations, primary aliphatic acids, Cyclophosphamide, bone marrow, NMRI mice.

INTRODUCCIÓN

El D003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificada de la cera de caña (*Saccharum officinarum* L), cuyo componente más abundante es el ácido octacosanoico, y que también contiene los ácidos tetracosanoico, pentacosanoico, hexacosanoico, heptacosanoico, nonacosanoico, triacontanoico, hentriacontanoico, dotriacontanoico, tritriacontanoico, tetracontanoico, pentatriacontanoico y hexacotriacontanoico en menores proporciones.¹

El tratamiento por vía oral con D-003 por corto (90 días)¹ y largo plazo (12 meses)² previno la pérdida ósea y el aumento de la resorción ósea en ratas ovariectomizadas, y también la osteoporosis inducida con corticoides.¹ En mujeres posmenopáusicas con baja densidad mineral ósea, el tratamiento con 10 mg/d de D-003 durante 6 meses redujo la excreción urinaria de desoxipiridolina (DPD)/creatinina, marcador de la reabsorción ósea sin modificar la fosfatasa alcalina hueso específica.³ Los efectos antiosteoporóticos del D-003 se asocian al aumento de la apoptosis de los osteoclastos.¹ Además, en estudios experimentales y clínicos el D-003 ha demostrado producir efectos hipolipemiantes,⁴⁻⁷ antiagregante plaquetarios⁶⁻⁸ y antioxidantes.^{6,9}

Los estudios de toxicidad oral por dosis únicas y repetidas en roedores no han mostrado toxicidad atribuible al D-003 administrado a dosis de hasta 5 000 y 2 000 mg/kg, respectivamente,^{10,11} y el tratamiento por vía oral con D-003 tampoco indujo toxicidad en perros Beagle.¹²

El D-003 tampoco ha mostrado toxicidad fetal o reproductiva,^{13,14} y la evaluación de su potencial mutagénico y citotóxico en los ensayos de Ames, morfología del espermatozoide y en el ensayo cometa no ha mostrado evidencias de citotoxicidad ni genotoxicidad.¹⁵⁻¹⁷ Sin embargo, hasta el presente no se había explorado la capacidad del D-003 de inducir aberraciones cromosómicas.

El ensayo citogénico *in vivo* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales en condiciones que involucran la respuesta *in vivo*, y que pueden variar según la especie y el tejido.^{18,19}

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar si el tratamiento oral con D-003 durante 14 días induce aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratones NMRI de uno y otro sexos.

MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratones NMRI de uno y otro sexos adultos jóvenes (5-7 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 25-30 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 25 ± 2 °C, la humedad entre 60 ± 10 % y los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 h. El alimento que se les administró a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*.

Administración y dosificación: El lote de D-003 utilizado en el estudio se produjo en las Plantas de productos Naturales (CNIC, Ciudad de La Habana, Cuba) y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. El D-003 se administró suspendido en un vehículo goma acacia/agua (10 mg/ml). Las suspensiones se prepararon semanalmente y las concentraciones se ajustaron según el aumento medio de peso corporal por grupo.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (5 animales/sexo/grupo) que incluyeron tres tratados con D-003 (500, 1 000, 2 000 mg/kg), un control negativo tratado con el vehículo y un control positivo tratado con ciclofosfamida (CF) (50 mg/kg). Los tratamientos (D-003 o vehículo) se administraron mediante intubación gástrica durante 14 días consecutivos, mientras que la CF fue administrada por vía intraperitoneal (i.p.), 24 h antes del sacrificio,²⁰ siempre a la misma hora de 10:00-11:00 a.m. para todos los grupos. La mayor dosis de D-003 utilizada es el doble de la máxima dosis recomendada para estudios de determinación de aberraciones cromosómicas *in vivo* en esquemas de dosis repetidas.^{20,21}

Eutanasia: Fue realizada en el horario comprendido entre las (10:00 a 11:00 a.m), mediante el método de dislocación cervical previa anestesia en atmósfera de éter. Los animales tratados con D-003 y los controles se sacrificaron a las 24 h después

de la última administración, al igual que los tratados con CF a las 24 h de la administración única.

Ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vivo*: En el horario de la mañana (4 horas antes del sacrificio), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (6 mg/kg, vía i.p.). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal. La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCl (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 min. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 30-35 min. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos.²¹ También se calculó el índice mitótico (IM%) (% de metafases en 1 000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles.

Análisis estadístico: Las variables continuas se analizaron con un análisis de varianza ANOVA y las categóricas mediante la prueba de homogeneidad (chi cuadrado). El nivel de significación establecido fue $\alpha = 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6. <http://www.statsoft.com>.

RESULTADOS

El tratamiento con D-003 a las dosis estudiadas, durante 14 días no aumentó el número de células con aberraciones con respecto a los controles, mientras que la administración de dosis únicas i.p. de CF (50 mg/kg) aumentó significativamente el número de células metafásicas con aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. El D-003 tampoco modificó el índice mitótico en relación con el control negativo, mientras la CF produjo una disminución significativa del índice mitótico y un aumento considerable del número de células con poliploidía ([tabla](#)). Una comparación de los datos de todos los animales tratados a los diferentes niveles de dosis, sin tener en cuenta el sexo, vs. los de los controles reveló similares resultados, lo que confirma que a las dosis estudiadas no induce aberraciones cromosómicas ni citotoxicidad en el modelo experimental empleado.

Tabla. Efectos del tratamiento oral con D-003 (500-2 000 mg/kg) sobre la frecuencia de aberraciones

cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI de uno y otro sexos

| Sexos | IM (%) ^a | Célula con poliploidía ^b | Gaps ^b | Aberraciones/500 células/grupo ^b | | | | No. de con abe |
|--------|---------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| | | | | Cromosómica | | Cromatídica | | |
| | | | | Ruptura | Intercambio | Ruptura | Intercambio | |
| Machos | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|--------------|------|------|-----|------|-------|------|-----|
| neg. | 5,32 ± 0,53 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 1 | 6 |
| g/kg | 3,68 ± 0,46* | 11* | 42** | 8** | 18** | 155** | 13** | 194 |
| D-003 | | | | | | | | |
| g/kg | 5,56 ± 0,52 | 0 | 6 | 0 | 0 | 5 | 1 | 6 |
| g/kg | 4,96 ± 0,27 | 0 | 4 | 0 | 0 | 9 | 1 | 1 |
| g/kg | 4,96 ± 0,50 | 1 | 4 | 0 | 0 | 5 | 1 | 6 |
| Hembras | | | | | | | | |
| neg. | 5,12 ± 0,75 | 1 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 1 |
| g/kg | 4,30 ± 0,97 | 5 | 41** | 0 | 19** | 127** | 22** | 168 |
| D-003 | | | | | | | | |
| g/kg | 4,78 ± 0,63 | 2 | 4 | 0 | 0 | 10 | 2 | 1 |
| g/kg | 4,86 ± 1,48 | 2 | 6 | 0 | 0 | 10 | 3 | 1 |
| g/kg | 4,82 ± 0,79 | 0 | 12 | 0 | 0 | 5 | 1 | 6 |
| Ambos sexos | | | | | | | | |
| neg. | 5,22 ± 0,62 | 1 | 15 | 0 | 0 | 15 | 1 | 1 |
| g/kg | 3,99 ± 0,79* | 16** | 83** | 8** | 37** | 282** | 35** | 362 |
| D-003 | | | | | | | | |
| g/kg | 5,17 ± 0,68 | 2 | 10 | 0 | 0 | 15 | 3 | 1 |
| g/kg | 4,91 ± 1,01 | 2 | 10 | 0 | 0 | 19 | 4 | 2 |
| g/kg | 4,89 ± 0,62 | 1 | 16 | 0 | 0 | 10 | 2 | 1 |

^aMedia ± DE, de un total de 5 000 células por grupo,*p < 0,05; ANOVA.

^b*p < 0,05; **p < 0,01; prueba no paramétrica chi cuadrado.

Comparación contra el control negativo.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que el tratamiento por vía oral con D-003 no aumentó el número de células con aberraciones ni modificó el índice mitótico, lo que muestra una ausencia de citotoxicidad y genotoxicidad compatibles con datos previos.¹⁵⁻¹⁷

Así, el tratamiento con D-003 (500-2 000 mg/kg) durante 14 días no aumentó el número de células con aberraciones con respecto a los controles ni modificó el índice mitótico en relación con el control negativo. Similares resultados se obtuvieron al comparar los datos de todos los animales tratados con las diferentes dosis, sin tener en cuenta el sexo con los de los controles, lo cual reveló que a las dosis estudiadas el D-003 no induce aberraciones cromosómicas ni citotoxicidad en el modelo empleado. Además, los resultados en los grupos tratados estuvieron dentro del rango reportado para esta especie, obteniéndose valores de entre 0-5 % de células con aberraciones de forma espontánea.²²

Por su parte, la administración de dosis únicas de CF (50 mg/kg, i.p.) aumentó significativamente el número de células metafásicas con aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, disminuyó el índice mitótico y aumentó el número de células con poliploidía. En los animales tratados (uno y otro sexos) con CF se obtuvo un valor de 362 células con aberraciones (36,2 %), consistente con que su acción mutagénica fundamental se manifiesta por el aumento de

aberraciones estructurales.^{22,23} Estos resultados confirman la acción mutagénica y citotóxica de la CF descrita en estudios *in vivo e in vitro* en roedores²⁰ e *in vitro* en humanos,²⁴ y confiere validez a nuestros resultados.

La mayoría de las aberraciones cromosómicas observadas en este estudio, en particular en los animales tratados con CF, son las de tipo cromatídico, lo que se encuentra condicionado por el hecho de que la primera mitosis celular postratamiento es la fase más sensible para la acción de los mutágenos potenciales²³ y corrobora que en nuestras condiciones de trabajo el comportamiento del modelo fue adecuado.

Es importante comentar que la ausencia de efecto mutagénico y citotóxico del D-003 observada en este estudio no se relaciona con una inadecuada exposición a la sustancia ensayo, ya que en primer lugar, las dosis por vías orales de D-003 entre 5 y 200 mg/kg, inferiores a las utilizadas en el presente estudio, han producido efectos farmacológicos en esta especie,^{1,2,8,9} en la cual ha sido demostrada una absorción cercana al 90 % tras la administración oral de dosis únicas.²⁵ En segundo lugar, el presente estudio utilizó la dosis máxima recomendada (2 000 mg/kg) para este ensayo tanto en esquemas de dosis únicas como repetidas durante 14 días.^{21,26} Esta dosis se recomienda para los ensayos de dosis únicas donde la toma de muestra se realiza entre las 24 y las 48 h postratamiento ya que el tejido diana, que es la médula ósea, contiene una población de células extremadamente proliferativa, de corto ciclo celular y es un tejido muy vascularizado que permite el rápido acceso de las sustancias a evaluar.^{18,19,21} Por tanto, el empleo de esta dosis administrada durante más tiempo descarta que la exposición a la sustancia haya sido insuficiente.

Además, los resultados negativos del presente estudio confirman y extienden los del ensayo Cometa, en el cual el tratamiento con D-003 a dosis de 1 250 mg/kg no provocó daños en los cromosomas de los linfocitos de sangre periférica ni en hepatocitos.¹⁷ En su conjunto, ambos resultados constituyen una fuerte evidencia de que el D-003 no induce daño al ADN de roedores.

El hecho de que el tratamiento oral con D-003, incluyendo la máxima propuesta para este tipo de ensayo (2 000 mg/kg) según las normativas de la OECD,²¹ durante 14 días no haya inducido aberraciones cromosómicas ni citotoxicidad en células de la médula ósea, tiene coherencia con estudios previos¹⁵⁻¹⁷ y confirma la ausencia de efecto genotóxico y citotóxico del D-003.

En conclusión, la administración por vía oral de dosis repetidas de D-003 (500, 1 000 y 2 000 mg/kg) durante 14 días no aumentó la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas (estructurales o numéricas) ni modificó el índice mitótico, lo que indica que no presenta potencial genotóxico ni citotóxico sobre las células de la médula ósea de ratones NMRI de uno y otro sexos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mas R. D-003: A new substance with promising lipid modifying and pleiotropic effects for atherosclerosis management. *Drugs Future*. 2004;29:773-86.
2. Noa M, Mendoza S, Mas R, Mendoza N, Goicochea E. Long-term effects of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, on bones of ovariectomized rats: a one year study. *Die Pharmazie*. 2008;63(6):486-8.

3. Ceballos A, Mas R, Castaño G. The effect of D-003 (10 mg/day) on biochemical parameters of bone remodelling in postmenopausal women: a randomized, double-blind study. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2005;25:175-86.
4. Gámez R, Mendoza S, Más R, Mesa R. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. *Curr Ther Res.* 2000;61:8-16.
5. Gámez R, Mendoza S, Mas R. Comparison of the cholesterol-lowering effects and toxicity of D-003 and lovastatin on normocholesterolemic rabbits. *Drugs R & D.* 2003;4:219-29.
6. Castaño G, Menéndez R, Más R. Effects of D-003: A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. *Clin Drug Invest.* 2003;23 (3):193-203.
7. Arruzazabala M, Carbajal D, Más R. Effects of D-003, a new compound purified from sugar cane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers: A randomized, double-blind clinical study. *Clinical Drug Invest.* 2002;23(2):107-18.
8. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Más R. D-003 and warfarin interaction on the bleeding time and venous thrombosis experimentally induced in rats. *J Med Food.* 2004;7(2):260-63.
9. Menéndez R, Más R, Perez Y. Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(1):13-21.
10. Gámez R, Más R, Noa M. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. *Toxicol Lett.* 2000;118:31-41.
11. Gámez R, Más R, Noa M. Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. *Drug R& D.* 2002;3:375-86.
12. Gámez R, Más R, Noa M, Menéndez R, García H, Gonzáles J. et al. Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagle dogs. *Drugs under Exp and Clin Res.* 2004;30(2):75-8.
13. Rodríguez MD, Gámez R, González JE. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats. *Fd. Chem Toxicol* 2003; 41:89-93.
14. Rodríguez MD, González JE, Alemán C. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(12):1977-85.
15. Gámez R, Rodeiro I, Fernandez I, Acosta P. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: mixture of very long chain aliphatic acids. *Teratog Carcinog Mutag.* 2002;22:175-81.
16. Gámez R, González JE, Rodeiro I. *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long chain aliphatic alcohols. *J Med Food.* 2001;4:85-92.
17. Gonzalez J, Gámez R, Rodeiro I. Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas *SD* empleando la electroforesis alcalina en células individuales (ensayo cometa). *Revista CNIC Cien Biol.* 2002;33:25-9.

18. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.* 1999; 189:157-65.
19. Carrano A. Chromosomal alterations as markers of exposure and effect. *J Occup. Med.* 1999;28:1112-6.
20. Perry C. Differential toxicities of cyclophosphamide and its Glutathione metabolites to A549 cells. *Toxic In vitro.* 1995;9(1):21-6.
21. OECD. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells TG 475 (Annual Report 2009). Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions, © OECD 2009. p. 7-123. Available from: <http://www.oecd.org/bookshop>
22. Paz y Miño C, Bustamante G, Sánchez M, Leone P. Cytogenetic monitoring in a population occupationally and animals exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect.* 2002;110:1077-80.
23. Ecobichon D. Mutagenesis. The basis of toxicity testing. Boca Ratón, Florida: McGill University, Montreal. De. CRC, INC; 2001. p. 113-36.
24. Kramer P. Genetic toxicology. The *in vitro* and *in vivo* aberration test. *J Pharm Pharmacol.* 2000;4:395-405.
25. Menéndez R, Mas R, Pérez Y, Gonzáles RM, Jiménez S. Cinética de la radioactividad total (RT) tras la administración oral y endovenosa de dosis únicas de ácido 3H-octacosanoico a ratas. *Act Farm Bonae.* 2005;24:48-60.
26. EPA. Pesticides and Toxic Substances (7101), Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. United States Government Printing Office Editions. Washington: IRL Press; 1998. p. 3-4.

Recibido: 8 de diciembre de 2009.

Aprobado: 14 de enero de 2010.

Dr. C. *Daniel Francisco Arencibia Arrebola*. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 e/ 19 y 21 Atabey, Playa, La Habana, Cuba. Apartado Postal 6414. Correo electrónico: rafael.gamez@cnic.edu.cu