

Efecto *in vitro* del D-002 sobre la actividad enzimática de la 5-lipoxigenasa (5-LOX)

Effect of D-002 on 5-lipoxygenase (5-LOX) enzyme activity *in vitro*

Dra. C. Yohani Pérez Guerra, MSc. Ambar Oyarzábal Yera, MSc. Yasmín Ravelo Calzado, Dra. C. Rosa Mas Ferreiro, Téc. Sonia Jiménez Despaigne, Dra. C. Vivian Molina Cuevas

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el D-002, mezcla de seis alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular purificada de la cera de abejas, ha mostrado efectos antiinflamatorios, sin gastrotoxicidad secundaria, en modelos experimentales. El tratamiento oral con D-002 reduce las concentraciones de leucotrieno B4 (LTB4) en exudados pleurales de ratas con pleuresía por carragenina, sugiriendo que podría inhibir la actividad enzimática de la 5-lipooxigenasa (5-LOX), si bien los mecanismos de la acción antiinflamatoria del D-002 no habían sido aún explorados.

Objetivo: evaluar el efecto *in vitro* del D-002 sobre la actividad de la 5-LOX, utilizando la fracción citosólica de homogenatos de hígado de ratas.

Métodos: las condiciones de ensayo utilizadas fueron las siguientes: fracción citosólica (50 µg de proteína) disuelta en solución reguladora borato 0,2 mol/L (pH 9) y ácido linoleico (7,8-250 mmol/L) como sustrato, ensayándose muestras paralelas incubadas con Tween-20/H₂O (2 %) (vehículo, muestras controles), D-002 (0,9-1 000 µg/mL) o Lyprinol (500 µg/mL) (sustancia de referencia). La actividad enzimática se evaluó mediante el cambio de absorbancia a 234 nm producido por la formación de dienos conjugados y medido en espectrofotómetro UV-visible.

Resultados: la adición *in vitro* del D-002 produjo una inhibición significativa, dependiente de la dosis ($r = 0,980$; $p < 0,001$) ($IC_{50} = 95,34 \mu\text{g/mL}$) e incompetitiva de la actividad de la 5-LOX, cuya inhibición máxima (70 %) se alcanzó con 500 µg/mL.

Conclusiones: con este estudio se demuestra que el D-002 es capaz de inhibir la actividad enzimática de la 5-LOX, efecto que podría explicar, al menos parcialmente, su acción antiinflamatoria en modelos experimentales *in vivo*.

Palabras clave: D-002, antiinflamatorio, inhibición 5-LOX, LTB4, Lyprinol.

ABSTRACT

Introduction: D-002, a mixture of six high molecular weight primary aliphatic alcohols purified from beeswax, has been shown to produce anti-inflammatory effects with no secondary gastrototoxicity in experimental models. Oral treatment with D-002 was effective for lowering the concentrations of B4 leukotriene (LTB₄) in pleural exudates of rats with carragenin-induced pleurisy, suggesting that it could inhibit 5-lipoxygenase (5-LOX) enzyme activity. The mechanisms of the anti-inflammatory action of D-002, however, had not been explored yet.

Objective: to evaluate the effects of D-002 on 5-LOX enzyme activity *in vitro* by using the cytosolic preparations from rat liver homogenates.

Methods: testing conditions were as follows: cytosolic fraction (50 µg of protein) dissolved in 0.2 mol/L borate buffer solution (pH 9) and linoleic acid (7.8-250 mmol/L) as substrate. Parallel samples were incubated with Tween-20/H₂O (2 %) only (vehicle, control samples), D-002 (0.9-1 000 µg/mL) or Lyprinol (500 µg/mL) (reference substance). The enzyme activity, evaluated through the formation of conjugated dienes, was assessed by the absorbance changes at 234 nm (5-lox) measured in a UV-visible spectrophotometer.

Results: the *in vitro* addition of D-002 produced a significant, dose-dependent ($r=0.980$; $p< 0.001$) ($IC_{50}= 95.34$ µg/mL) and uncompetitive inhibition of 5-LOX activity, whose maximal inhibition (70 %) was achieved with 500 µg/mL).

Conclusions: this study demonstrates that D-002 effectively inhibits 5-LOX enzymatic activity, an effect that may partially explain the anti-inflammatory effects of D-002 in experimental models *in vivo*.

Key words: D-002, anti-inflammatory, 5-LOX inhibition, LTB₄, Lyprinol.

INTRODUCCIÓN

Mientras que la inflamación fisiológica, respuesta de los tejidos a la acción deletérea de estímulos nocivos, es un mecanismo de defensa esencial para mantener la homeostasis del organismo, la inflamación patológica se asocia al desarrollo de diversas enfermedades.¹

La inflamación involucra altas concentraciones de ácido araquidónico (AA) liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂, el cual se metaboliza a través de la vía de la ciclooxigenasa (COX), mediada por las isoenzimas COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducible), que produce mediadores como las prostaglandinas (PG), el tromboxano (TX) y la prostaciclina (PGI), y por la vía de las lipoxigenasas (LOX), leucotrienos (LT) inflamatorios (LTB₄, LTC₄, LTD₄).^{2,3}

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), clase terapéutica ampliamente utilizada en el tratamiento de la inflamación aguda y crónica, actúan mediante la inhibición no selectiva de la COX1 y la COX2 (AINEs no selectivos) o selectiva (inhibidores de la COX2).³ En consecuencia, los AINEs interfieren la producción de las PG, mediadores claves en la defensa de la mucosa gastrointestinal, lo que a su vez aumenta el metabolismo del AA por la vía de las LOX y por ende, la formación de LT broncoconstrictores y gastrotóxicos.^{2,3} Estos efectos en su conjunto justifican los numerosos efectos adversos (EA) producidos por los AINEs: gastrototoxicidad, broncoespasmo y nefrotoxicidad, relacionados con la inhibición de la COX-1 (AINEs

no selectivos), y cardiovasculares (fundamentalmente por los inhibidores de la COX- 2).³⁻⁶

En particular, la gastrototoxicidad inducida por los AINEs no solo se debe a la inhibición de la síntesis de PG gastroprotectoras, sino al aumento de LT gastrotóxicos que refuerzan el daño generado por el déficit de PG, detectándose altas concentraciones de LTB₄ en las paredes de las úlceras gástricas inducidas por AINEs, agente que atrae leucocitos a la mucosa y contribuye a aumentar la ulceración.⁷

El D-002, mezcla de seis alcoholes alifáticos primarios (C₂₆, C₂₆, C₂₈, C₃₀, C₃₂, C₃₄) purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*, L), muestra efectos antiinflamatorios demostrados en modelos de inflamación aguda y crónica.⁸⁻¹⁰ Sin embargo, y a diferencia de los AINEs, el D-002 no produce efectos gastrotóxicos, sino que por el contrario, reduce el daño ulcerogénico inducido por diferentes agentes, incluyendo los propios AINEs, mediante un mecanismo que implica un aumento de la secreción del *mucus* gástrico y la reducción de los procesos de peroxidación lipídica en la mucosa gástrica.^{11,12} Este último efecto, además, resulta consistente con los efectos antioxidantes del D-002 demostrados en estudios experimentales y clínicos.¹³⁻¹⁸

Los mecanismos que sustentan el efecto antiinflamatorio del D-002 no habían sido demostrados con anterioridad. Teniendo en cuenta los antecedentes referidos, y en especial, que la administración oral de D-002 redujo marcadamente las concentraciones pleurales de LTB₄ en ratas con pleuresía inducida por carragenina,⁸ resultaba racional suponer que el D-002 inhibiera la actividad de la 5-LOX.

El objetivo del presente trabajo, por tanto, consiste en evaluar el efecto *in vitro* del D-002 sobre la actividad de la 5-LOX, utilizando la fracción citosólica de homogenatos de hígado de ratas.

MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratas Wistar machos (150-200 g) provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana), las cuales se adaptaron durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura 25 ± 2 °C, humedad relativa 60 ± 5 % y ciclos luz/oscuridad de 12 h), con libre acceso al agua y la comida (pienso para roedores, CENPALAB). Tras ayuno de 12 h las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter, se sacrificaron y los hígados se disecaron rápidamente con el objetivo de preparar los homogenatos.

Las experiencias se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio vigentes en la República de Cuba y los procedimientos del Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación: El D-002, suministrado por las Plantas de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba) fue utilizado tras corroborar su identidad y pureza con un método validado de cromatografía gaseosa,¹⁸ suspendiéndose en Tween-20/H₂O (2 %) (0,9; 3,9; 15,6; 62,5; 250, 500 y 1 000 µg/mL). El Lyprinol (sustancia de referencia)¹⁹ Blackmores Ltd, Sydney, Australia) (500 µg/mL) también se suspendió en Tween-20/H₂O (2 %).

Determinación de la actividad de la 5-LOX en hígado

Obtención de la fracción citosólica: se empleó la metodología de *Tateson* y otros, 1988.²⁰ Las alícuotas de hígado se homogenizaron con un potter en solución reguladora que contenía sacarosa 0.25 mol/L, Tris HCl 50 mmol/L, MgCl 50 mmol/L (relación 1:9, v/v). El homogenato se centrifugó a $2\ 000 \times g$ durante 10 min y posteriormente el sobrenadante se centrifugó nuevamente a $100\ 000 \times g$ durante 1 h. La fracción citosólica se almacenó a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso. Todas estas operaciones se realizaron a $4\ ^\circ\text{C}$.

Ensayo de la actividad de la 5-LOX

La actividad de la 5-LOX se determinó a través de la formación de dienos conjugados mediante la lectura en espectrofotómetro (UV/Visible Genesys 10) a $234\ \text{nm}$.²¹

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: fracción citosólica (50 μg de proteína) disuelta en solución reguladora borato 0,2 mol/L (pH 9) y el sustrato (ácido linoleico) a concentraciones entre 7,8 y 250 mmol/L. Se utilizaron muestras controles a las que se añadió solo Tween-20/H₂O (2 %), D-002 (0,9-1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o Lyprinol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las cuales se preincubaron por 5 min, añadiéndose el sustrato y midiéndose los cambios de absorbancia a $234\ \text{nm}$ cada 1 min durante 10 min. Los resultados se expresan en micromol por minuto por miligramo de proteína (mmol/min/mg), y el grado de inhibición con respecto a las muestras controles. La selección de la dosis para el estudio cinético fue escogida teniendo en cuenta la IC₅₀.

Análisis estadístico

Las comparaciones con el control se realizaron con la prueba de la U de Mann Whitney. El estudio de relación dosis/efecto se realizó mediante el método de regresión lineal y correlación utilizando el programa Primer of Biostatistics (Stanton A, Glantz; copyright (c) 1992, McGraw-Hill, Inc Versión 3.01). *A priori* se estableció un nivel de significación $\alpha = 0,05$ para la determinación de la significación estadística. Los datos se procesaron con el paquete de programas Statistic para Windows (Release 6.0, Stat Soft, Inc USA).

RESULTADOS

La adición *in vitro* del D-002 a la fracción citosólica de homogenato de hígado de rata produjo una inhibición marcada, significativa y dependiente de la dosis ($r = 0,980$; $p < 0,001$), (IC₅₀ = 95,34 mg/mL) de la actividad enzimática de la 5-LOX, alcanzándose la inhibición máxima (70 %) con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no produjo mayor efecto. La adición del Lyprinol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inhibió la actividad enzimática en un 87 % (tabla).

La adición del D-002 (62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) modificó los parámetros cinéticos Km y Vm de la 5-LOX para el sustrato ensayado, y mostró una inhibición de tipo incompetitiva (Fig.).

Tabla. Efectos *in vitro* del D-002 sobre la actividad enzimática de la 5-LOX en fracción citosólica de homogenato de hígado de rata

Tratamiento	Concentraciones (µg/mL)	Actividad enzimática 5-LOX (µmol dienos conjugados/min/mg proteína)	Inhibición (%)
Control	0	9,00 ± 0,03	-
D-002	0,9	8,14 ± 0,12	9
D-002	3,9	7,40 ± 0,08	17
D-002	15,6	5,36 ± 0,01*	40
D-002	62,5	4,71 ± 0,03 *	47
D-002	250	3,97 ± 0,05 *	55
D-002	500	2,68 ± 0,08 *	70
D-002	1 000	2,63 ± 0,7 *	70
Lyprinol	500	1,11 ± 0,001 **	87

(Media ± DE) *p < 0,05; **p < 0,01. Comparación con el control (Prueba de la U de Mann Whitney).

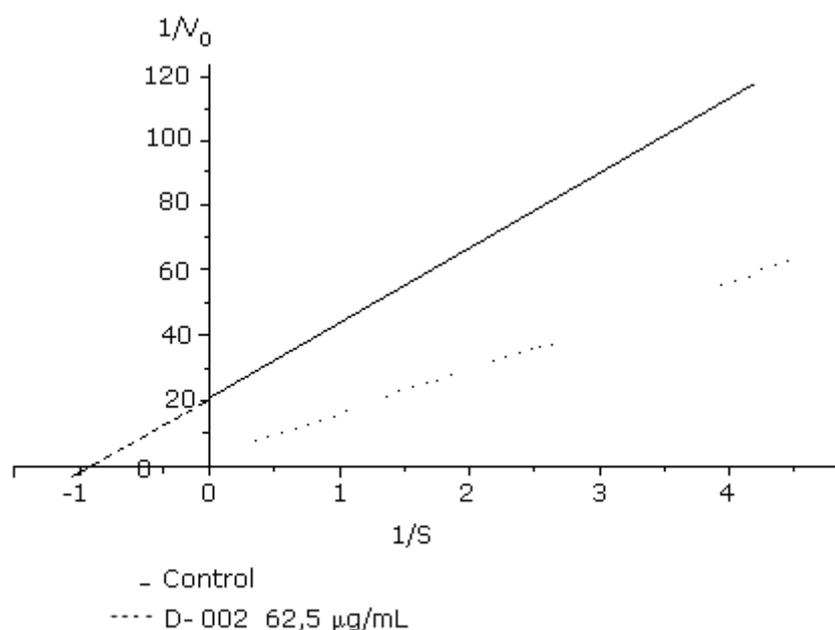


Fig. Representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), gráfico de Lineweaver-Burk).

DISCUSION

El presente estudio demuestra que la adición *in vitro* del D-002 al medio de incubación (0,9-1 000 µg/mL) inhibió la actividad enzimática de la 5-LOX de modo dependiente de las dosis.

Como era esperado, el lyprinol (100 µg/mL), antiinflamatorio dual de referencia de conocido efecto inhibitor sobre la 5-LOX,^{19,22} inhibió la actividad enzimática en un 87 %, lo cual le confiere validez al ensayo de la actividad enzimática en nuestra condiciones experimentales, y por tanto, a los resultados aquí expuestos. No obstante, es de destacar que el modelo para determinar la actividad de la 5-LOX ha sido utilizado por diferentes autores,^{23,24} si bien sería de interés corroborar estos efectos utilizando la 5-LOX aislada de leucocitos polimorfonucleares (PMN).²⁵

El D-002 inhibió la actividad de la 5-LOX (IC₅₀ = 95,34 µg/mL) de modo marcado ya que la inhibición máxima fue de un 70 % a la dosis de 500 µg/mL, comportándose esta como la dosis efectiva máxima, ya que 1 000 µg/mL no produjo mayor efecto, lo que demuestra que a partir de la dosis 500 µg/mL se produce una saturación de la enzima, resultados estos consistentes con sus efectos antiinflamatorios *in vivo*.⁸⁻¹⁰ Los resultados del presente estudio son coherentes con la reducción de las concentraciones pleurales de LTB₄ en ratas con pleuresía inducida por carragenina,⁸ y con los efectos del D-002 sobre marcadores de la peroxidación lipídica.¹²⁻¹⁷ Además, el D-002 redujo el edema causado por la aplicación tópica de xileno en la oreja de ratón y el aumento asociado de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO), lo que sugería que su acción antiinflamatoria debía involucrar la inhibición de la infiltración de neutrófilos, pero ya que la reducción del edema fue más marcada que la reducción de la actividad de MPO, se estimó que otros mecanismos debían estar involucrados.⁹ En tal sentido, la inhibición de la actividad enzimática de la 5-LOX producida por el D-002 es consistente con la reducción de la infiltración de neutrófilos, ya que el LTB₄, potente agente quimiotáctico, induce quimiotaxis de neutrófilos y monocitos en el tejido inflamado.

Además, el presente estudio mostró que el D-002 inhibe la actividad de la 5-LOX afectando tanto la afinidad por el sustrato (K_m) como la velocidad máxima de la reacción (V_m), lo que indica que la inhibición de la actividad enzimática producida por el D-002 es de tipo incompetitiva, o sea interactuando con sitios cercanos, pero no en centro activo, de tal forma que se impide la formación del producto de la reacción.

Sin embargo, aunque este estudio sustenta que la inhibición de la actividad de la 5-LOX es un mecanismo que puede estar relacionado con los efectos antiinflamatorios del D-002, es obvio que aún queda por dilucidar si el D-002 es también capaz de inhibir la actividad de la COX, aspecto no abordado en el presente trabajo. En tal sentido, es posible que el D-002 pudiera actuar como un antiinflamatorio dual, capaz de inhibir tanto la 5-LOX como la COX, lo que le proporcionaría un perfil antiinflamatorio desprovisto de los EA gastrointestinales de los AINEs.²⁶ Esta hipótesis, sin embargo, debe ser dilucidada en estudios ulteriores.

Este estudio demuestra que el D-002 es capaz de inhibir la actividad enzimática de la 5-LOX, efecto que podría explicar, al menos parcialmente, su acción antiinflamatoria en modelos experimentales *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wierda RJ, Geutskens SB, Jukema JW, Quax PH, Van den Elsen P.J. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(6A): 1225-40.
2. Heller A, Koch T, Schmeck J, Van Ackern K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*. 1998; 55: 487-96.

3. Lamarque D. Pathogenesis of gastroduodenal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterol Clin Biol.* 2004;28:18-26.
4. Scanzello CR, Moskowitz NK. The post-NSAID era: what to use now for the pharmacologic treatment of pain and inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10:49-56.
5. Barkin RL, Beckerman M, Blum SL, Clark FM, Koh EK, Wu DS. Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) be prescribed to the older adult? *Drugs Aging.* 2010;27:775-89.
6. Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs: balancing gastrointestinal and cardiovascular risk. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8:73-7.
7. Hudson N, Balsitis M, Everitt S, Hawkey CJ. Enhanced gastric mucosal leukotriene B4 synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut.* 1993;34:742-7.
8. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Mas R. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids.* 1998;59:235-8.
9. Ravelo Y, Molina V, Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Oyarzábal A, et al. Effects of single oral and topical administration of D-002 (Beeswax Alcohols) on xylene-induced ear oedema in mice. *Lat Am J Pharm.* 2010;29:1451-4.
10. Ravelo Y, Molina V, Carbajal D, Fernández L, Fernández J C, Arruzazabala ML, et al. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (beeswax alcohols). *J Nat Med.* 2011;65:330-5.
11. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Mas R. Possible cytoprotective mechanism in rats of D-002 an anti-ulcerogenic product isolated from beeswax. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48: 858-60.
12. Molina V, Valdés S, Carbajal D, Arruzazabala ML, Menéndez R, Mas R. Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with experimentally-induced injury. *J Med Food.* 2001;4:79-83.
13. Menéndez R, Amor AM, González RM, Jiménez S, Mas R. Inhibition of rat microsomal lipid peroxidation by the oral administration of D-002. *Brazil J Med Biol Res.* 2000;33:85-90.
14. Pérez Y, González RM, Amor AM, Jiménez S, Menéndez R. D-002 on antioxidant enzymes in liver and brain of rats. *Rev CENIC Cienc Biol.* 2002;53:3-5.
15. Menéndez R, Mas R, Illnait J, González RM, Amor AM, Jiménez S. Effects of D-002 on lipid peroxidation in older subjects. *J Med Food.* 2001;4:71-7.
16. López E, Illnait J, Molina V, Oyarzábal A, Pérez Y, Jiménez S, et al. Effects of D-002 (beeswax alcohols) on lipid peroxidation in middle-aged and older subjects. *LAMP.* 2008;27:695-703.
17. Rodríguez I, Illnait J, Fernández L, Molina V, Oyarzábal A, Pérez Y, et al. Comparative antioxidant effects of beeswax alcohols and grape seed extract in healthy persons. *LAMP.* 2010;29:255-62.

18. González V, Marrero D, Sierra R. Nuevo método por Cromatografía Gaseosa Capilar para el análisis del ingrediente activo D002. Revista CENIC Cienc Quím. 2008;39:123-4.
19. Dugas B. Lyprinol inhibits LTB4 production by human monocytes. Allerg Immunol 2000;3.2:284-9.
20. Tateson JE, Randall RW, Reynolds CH, Jackson WP, Bhattacharjee P, Salmon JA, et al. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by a novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. Br J Pharmacol. 1988;94:528-39.
21. Abad MJ, Bermejo P, Valverde S, Villar A. Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. Planta Med. 1994;60:228-31.
22. McPhee S, Hodges LD, Wright PF, Wynne PM, Kalafatis N, Harney DW, et al. Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2007;146:346-56.
23. Maiga A, Malterud E, Diallo D, Paulsen B. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (Rubiaceae). J Ethnopharmacol. 2006;104:132-7.
24. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Neri M, Cuccurullo Ch, Giamberardino MA. et al. Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. BBA. 2009;1790:25-30.
25. Fiorucci S, Distrutti E, de Lima OM. Relative contribution of acetylated cyclooxygenase (COX)-2 and 5-lipoxygenase (LOX) in regulating gastric mucosal integrity and adaptation to aspirin. FASEB J. 2003;17:1171-3.
26. Leone S, Ottani A, Bertolini A. Dual acting anti-inflammatory drugs. Curr Top Med Chem. 2007;7:265-75.

Recibido: 28 de noviembre de 2011.

Aprobado: 19 de enero de 2012.

Yohani Pérez Guerra. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yohani.perez@cnic.edu.cu