

Efecto *in vitro* del D-003 sobre la actividad enzimática de la 5-lipoxigenasa (5-LOX)

Effect *in vitro* of D-003 on 5-lipoxygenase (5-LOX) enzyme activity

Dra. C. Yohani Pérez Guerra, MSc. Ambar Oyarzábal Yera, 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-003, mezcla de ácidos alifáticos primarios superiores purificada de la cera de la caña, inhibe la síntesis de colesterol. Trabajos recientes han demostrado que el D-003 resulta efectivo en modelos experimentales de osteoartritis y que inhibe la actividad de las enzimas COX1 y COX2, preferentemente la COX1, sin producir gastrotoxicidad. Ha sido referido que los inhibidores duales de las enzimas COX y 5-LOX presentan efectos antiinflamatorios desprovistos de gastrotoxicidad o que incluso, pueden resultar gastroprotectores. De acuerdo con estos antecedentes, el D-003 podría ser un inhibidor dual de dichas enzimas.

Objetivo: investigar el efecto *in vitro* del D-003 sobre la actividad enzimática de la 5-LOX, utilizando la fracción citosólica de leucocitos polimorfonucleares de ratas.

Métodos: se utilizaron las condiciones de ensayo 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), D-003 (0,6-6 000 µg/mL) o extracto de *Perna canaliculus* (50 µg/mL) (sustancia de referencia). Se evaluó la actividad enzimática mediante el cambio de absorbancia a 234 nm producido por la formación de dienos conjugados y medido en espectrofotómetro UV-visible.

Resultados: la adición de D-003 produjo una inhibición dosis dependiente de la actividad enzimática de la 5-LOX ($r = 0,975$; $p < 0,05$) ($CI_{50} = 23,06 \mu\text{g/mL}$) *in vitro*. La magnitud de esta inhibición fue moderada, ya que la inhibición máxima, alcanzada a partir de 1 250 µg/mL, resultó de solo un 30 %.

Conclusiones: el estudio demuestra que el D-003 es capaz de inhibir la actividad enzimática de la 5-LOX *in vitro*, pero moderadamente.

Palabras clave: D-003, alcoholes alifáticos primarios superiores, inhibición de 5-LOX, lipooxigenasas.

ABSTRACT

Introduction: D-003, a mix of higher primary aliphatic acids purified from sugarcane, inhibits cholesterol synthesis. Recent studies have demonstrated that D-003 is effective in experimental models of osteoarthritis and inhibits the enzymatic activities of COX1 and COX2, mainly that of COX1, without causing gastrotoxicity. It has been mentioned that the dual inhibitors of COX and 5-LOX enzymes present with anti-inflammatory effects and no gastrotoxicity or even they can have gastroprotective actions. According to this background, D-003 could be a dual inhibitor of COX and 5-LOX enzymes.

Objective: to study the effects of D-003 on the enzymatic activity of 5-LOX *in vitro*, by using the cytosolic fraction of polymorphonuclear leukocytes of rats.

Methods: the following testing conditions were used: cytosolic fraction (50 µg of protein) dissolved into 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), D-003 (0,6-6 000 µg/mL) or green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) extract (50 µg/mL) (reference substance). The enzymatic activity, evaluated by the conjugated diene formation, was assessed by the absorbance changes at 234 nm (5-LOX) measured in a UV-visible spectrophotometer.

Results: by adding D-003, produced a dose dependent ($r = 0,975$; $p < 0,05$) (IC₅₀ = 23,06 µg/mL) *in vitro* inhibition of 5-LOX enzyme activity. The size of the inhibition was moderate, since the maximal inhibition, achieved from 1 250 µg/mL) on was only 30 %.

Conclusions: this study demonstrates that D-003 may inhibit *in vitro* the 5-LOX enzymatic activity, but in a moderate way.

Key words: higher primary aliphatic acids, D-003, 5-LOX inhibition, lipooxygenases.

INTRODUCCIÓN

El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios superiores purificada de la cera de caña (*Saccharum officinarum* L) que contiene el ácido octacosanoico (C₂₈) como principal componente, y los ácidos C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅ y C₃₆ en menores proporciones.¹

El D-003 inhibe la síntesis de colesterol a través de una regulación indirecta de la actividad de la enzima HMG CoA reductasa,^{2,3} produciendo efectos reductores del colesterol. Estudios experimentales y clínicos han demostrado que el D-003 también inhibe la peroxidación lipídica (PL).⁴⁻⁷

Trabajos recientes han demostrado que el D-003 resulta efectivo en modelos experimentales de osteoartritis,^{8,9} y que inhibe la actividad de las enzimas cicloxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2), preferentemente la COX1,¹⁰ sin que existan evidencias de gastrotoxicidad asociadas a su uso.^{4-7,8-12}

Como es conocido, los efectos gastrotóxicos de los inhibidores de la COX no solo resultan de la interrupción de la síntesis de prostaglandinas (PG), sino del corrimiento concomitante del metabolismo del ácido araquidónico hacia la vía de las lipoxigenasas (LOX),¹³ produciendo leucotrienos gastrotóxicos cuya acción refuerza la causada por el déficit de PG.^{14,15}

Ha sido referido que los inhibidores duales de las enzimas COX y 5-LOX presentan efectos antiinflamatorios desprovistos de gastrotoxicidad o que incluso, pueden resultar gastroprotectores.¹⁶⁻¹⁸ De acuerdo con estos antecedentes, el D-003 podría ser un inhibidor dual de las enzimas COX y 5-LOX.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo consistió en investigar si la adición de D-003 inhibe la actividad enzimática de la 5-LOX *in vitro* en preparaciones citosólicas de leucocitos polimorfonucleares (PMN) de ratas.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos (150-200 g) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales se adaptaron durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura $25 \pm 2^\circ \text{C}$, humedad relativa $60 \pm 5\%$ 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 diseccionaron rápidamente con el objetivo de preparar los homogenados.

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-003, 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,¹⁹ suspendiéndose en Tween-20/H₂O (2 %) (0,6; 4,8; 19,5; 78,1; 312,5; 1 250; 2 500; 5 000; 5 500; 6 000 µg/mL). La sustancia de referencia (extracto lipídico de *Perna canaliculus*, Sydney, Australia) (50 µg/mL) también se suspendió en Tween-20/H₂O (2 %).

Determinación de la actividad de la 5-LOX

Obtención de la fracción citosólica de PMN. Con este objetivo se utilizó la metodología descrita por *Boyum*,²⁰ para lo cual se tomó una muestra de sangre con anticoagulante (EDTA 100 µL/1 µL, se diluyó con un volumen similar de solución salina fisiológica

(volumen final 10 mL) y 6 mL de esta sangre diluida se colocaron en un tubo de centrifuga. Sobre su superficie se añadieron cuidadosamente 3 mL de una solución de Nycondenz (d= 1,077 g/mL) preparada en solución amortiguadora Tris HCl 5 mmol/L; pH 7,2 y NaCl 0,44 % (p/v).

Posteriormente, este gradiente se centrifugó a 800 x g durante 30 min a 20 °C, en un rotor de ángulo fijo. Las células mononucleadas que aparecieron como una banda en la interfase Nycondenz-plasma se colectaron con una pipeta y transfirieron a un tubo de centrifuga más pequeño, al cual se añadió un volumen similar de solución amortiguadora PBS 50 mmol/L/EDTA 1 mmol/L, pH 7,4. Esta mezcla se centrifugó nuevamente a 400 x g durante 10 min y el sedimento obtenido se lavó con un volumen similar de solución amortiguadora mencionado. El sedimento, resuspendido en la misma solución amortiguadora, se utilizó en la preparación cruda de la enzima.

Para la obtención de la fracción citosólica se empleó la metodología descrita por *Tateson*.²¹ Para ello, los polimorfonucleares (PMN) se sonicaron a razón de tres ciclos de 30 s a la potencia submáxima. El homogenizado obtenido se centrifugó a 2 000 x g durante 10 min, y posteriormente el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100 000 x g durante 1 h y la fracción citosólica se almacenó a -20 °C hasta ser utilizada para determinar la actividad de la enzima 5-LOX. Todas estas operaciones fueron realizadas garantizando una temperatura de 4 °C.

Ensayo de la actividad de la 5-LOX

La actividad enzimática se determinó a través de la formación de los dienos conjugados mediante la lectura en espectrofotómetro (UV/Visible Genesys 10) a 234 nm.¹⁴

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: fracción citosólica (50 µg de proteína) disuelta en solución amortiguadora borato 0,2 mol/L (pH 9,0) 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-003 (0,6-6 000 µg/mL) o extracto de *Perna canaliculus* (50 µg/mL), las cuales se preincubaron por 5 min, añadiéndose el sustrato y midiéndose los cambios de absorbancia a 234 nm cada 1 min durante 10 min. Los resultados se expresarán en mmol/min/mg proteína, y el grado de inhibición con respecto a las muestras controles.

Análisis estadístico

Las comparaciones con el control se efectuaron 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 tabla muestra los efectos de la adición *in vitro* del D-003 a la fracción citosólica de leucocitos PMN sobre la actividad de la 5-LOX. Como se observa, el D-003 produjo una inhibición dependiente de la dosis ($r = 0,975$; $p < 0,05$), no estadísticamente significativa de la actividad de la 5-LOX, que alcanzó un 31 % de inhibición, a partir de la dosis 1 250 $\mu\text{g/mL}$. En estas experiencias se utilizó el Lypirinol (50 $\mu\text{g/mL}$) como control de referencia el cual modificó la actividad de la enzima con un 88 % de inhibición.

Tabla. Efectos de la adición del D-003 sobre la actividad enzimática de la 5-LOX

Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad enzimática ($\mu\text{mol dienos conjugados/min/mg proteína}$)	Inhibición (%)
Control	7,42 \pm 0,005	-
D-003		
0,6	6,71 \pm 1,285	4
1,2	6,32 \pm 0,880	7
4,8	6,02 \pm 0,460	11
19,5	5,85 \pm 0,371	15
78,1	5,67 \pm 0,040	19
312,5	5,29 \pm 0,115	23
1 250	5,16 \pm 0,250*	28
5 000	5,12 \pm 0,320*	30
5 500	5,12 \pm 0,455*	31
6 000	5,13 \pm 0,465*	31
Extracto de <i>Perna canaliculus</i>		
50	0,89 \pm 0,251***	88

(Media \pm DE), * $p < 0,05$. Comparación con el control (prueba de la U de Mann Whitney).

Como se observa, la adición de D-003 produjo una inhibición significativa, dosis dependiente de la actividad enzimática de la 5-LOX ($r = 0,975$; $p < 0,05$) ($\text{CI}_{50} = 23,06 \mu\text{g/mL}$) *in vitro*. La magnitud de esta inhibición fue moderada, ya que la inhibición máxima, alcanzada a partir de 1 250 $\mu\text{g/mL}$, fue de solo un 30 %. En cambio, la adición del extracto de *Perna canaliculus* (50 $\mu\text{g/mL}$) inhibió marcadamente (88 %) la actividad de la enzima.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la adición del D-003 al medio de incubación (0,6-6 000 $\mu\text{g/mL}$) produce una inhibición significativa, dependiente de las dosis de la actividad enzimática de la 5-LOX *in vitro*, que resulta moderada.

En efecto, la magnitud de la máxima inhibición de apenas un 30 %, así como la alta concentración requerida para lograrlo, indica que el efecto del D-003 sobre esta enzima es limitado. Esta apreciación se refuerza por el hecho de que, como era esperado, la adición del extracto de *Perna canaliculus* (50 µg/mL), sustancia de referencia de reconocido efecto inhibitorio sobre la COX y la 5-LOX,^{18,22} inhibió marcadamente (88 %) la actividad enzimática, lo que confiere validez al ensayo en nuestras condiciones experimentales y por tanto, a los resultados expuestos, pero muestra que el efecto inhibitorio del D-003 sobre la 5-LOX es inferior al que produce *in vitro* sobre las enzimas COX-1 y COX-2, el cual alcanza inhibiciones de un 88 % y un 54 %, respectivamente.⁷

En este estudio se puede observar que a partir de la concentración de 1 250 µg/mL el efecto del extracto se hace constante ocurriendo la saturación de la enzima, lo que nos sugieren plantear como hipótesis que los componentes del extracto pudieran ejercer una inhibición de tipo competitiva sobre la enzima compitiendo con otros sustratos por el centro activo de la misma.

Aunque la inhibición de la actividad enzimática de la 5-LOX por el D-003 pudiera asociarse, al menos en parte, a su capacidad de reducir la PL en modelos experimentales en rata,^{5,23} la magnitud de sus efectos antioxidantes *in vivo* es mucho mayor que la que debe esperarse de los efectos aquí observados. Aunque no contamos con explicación convincente para argumentar esta aparente diferencia, podría especularse que en condiciones *in vitro* no existen las condiciones requeridas para lograr un mayor efecto, o bien que esta enzima no es el único blanco sobre el cual el D-003 inhibe la PL. Lo moderado de este efecto, sin embargo, no limita el sustento de su eficacia en los modelos de osteoartritis,^{5,6} el cual parece depender básicamente de la inhibición de COX 1 y COX2.⁷

A modo de conclusión, este estudio demuestra que el D-003 es capaz de inhibir la actividad enzimática de la 5-LOX *in vitro*, pero de forma moderada.

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. Menéndez R, Mas R, Amor AM, Gonzalez RM, Jimenez S. Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. *Pharmacol Res*. 2001;44:299-304.
3. Menéndez R, Mas R, Pérez Y, Amor AM, Gonzalez RM, Jimenez S. 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;80:13-21.
4. Castaño G, Menéndez R, Mas R, Amor AM, Fernandez J, Fernandez L, et al. Effects of D-003 on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. *Clin Drug Invest*. 2003;23:193-203.
5. Mendoza S, Noa M, Valle M, Mas R, Mendoza N. Effects of D-003 on formaldehyde induced osteoarthritis in rats. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2012;16:21-4.

6. Mendoza S, Noa M, Valle M, Mas R, Mendoza N. Effects of D-003 on monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2012 (Forthcoming).
7. Pérez Y, Mas R, Oyarzábal A, Molina V, Jimenez J. Effects of policosanol (sugar cane wax alcohols) and D-003 (sugarcane wax acids) on cyclooxygenase (COX) enzyme activity *in vitro*. *Current Top Nutr Res*. 2012 (Forthcoming).
8. Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Pérez Y, González RM, et al. Acute and subchronic oral toxicity of D-003 in rats. *Toxicol Letters*. 2000;118:31-41.
9. Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Pérez Y, González RM, et al. Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. *Drugs R&D*. 2002;3:375-86.
10. Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Pérez Y, González RM, et al. Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagledogs. *Drugs Exp Clin Res*. 2004;30:75-88.
11. Gámez R, Noa M, Mas R, Pardo B, Pérez Y, González RM, et al. Long-term carcinogenicity of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, in Sprague Dawley rats: a 24 months study. *Food Chem Tox*. 2007;45:2352-8.
12. Ceballos A, Castaño G, Mendoza S, González J, Mas R, Fernandez J, et al. Effect of D-003 (10 mg/day) on the bone mineral density of the lumbar spine and femoral neck in postmenopausal women: a randomized, double-blinded study. *Korean J Intern Med*. 2011;26:168-78.
13. Lamarque D. Pathogenesis of gastroduodenal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004;28:18-26.
14. 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.
15. Nakamori Y, Komatsu Y, Kotani T, Kojima S, Takeuchi K. Pathogenic importance of cysteinyl leukotrienes in development of gastric lesions induced by ischemia/reperfusion in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333:91-8.
16. Cicero AF, Derosa G, Gaddi A. Combined lipoxigenase/cyclo-oxygenase inhibition in the elderly: the example of licofelone. *Drugs Aging*. 2005;22:393-403.
17. Singh VP, Patil CS, Kulkarni SK. Effect of licofelone against NSAIDs-induced gastrointestinal ulceration and inflammation. *Indian J Exp Biol*. 2005;43:247-53.
18. Coulson S, Vecchio P, Gramotnev H, Vitetta L. Green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) extract efficacy in knee osteoarthritis and improvement in gastrointestinal dysfunction: a pilot study. *Inflammopharmacology*. 2012;20:71-6.
19. Mendez E, Marrero D, Gonzalez V, Vicente R, Mas R. GC determination of long chain fatty acids that compose D003 in 5 mg film coated tablets. *J Pharm Biomed Analysis*. 2003;31:613-20.
20. Boyum A. In iodinated density gradient media. A practical approach. IRL Press. 1983;2:147-70.

21. Tateson JE, Randall RW, Reynolds .H. Jackson W. Selective inhibition of arachidonate 5-ipoxygenase by a novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. Br J Pharmacol. 1988;94:528-39.
22. Dugas B. Lyprinol inhibits LTB4 production by human monocytes. Allerg Immunol. 2000;32:284-9.
23. Pérez Y. Mas R. González R.M. Jiménez J. Molina V. Effects of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids, and policosanol on *in vivo* lipid peroxidation in rats. *Arzneim Forsch Drug Res.* 2008;58:126-30.

Recibido: 23 de marzo de 2013.

Aprobado: 29 de mayo de 2013.

Yohani Pérez Guerra. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yohani.perez@cnic.edu.cu