

Evaluación citotóxica del D-002: una droga con actividad antiulcerosa

Idania Rodeiro, Celia Alemán, Caridad P. Acosta, Rafael Gámez y José L. Alfonso.

Dpto. de Farmacología y Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 2 de octubre de 2002. Aceptado: 12 de diciembre de 2002.

Palabras clave: D-002, citotoxicidad, rojo neutro, MTT, azul de kenacid.
Key words: D-002, cytotoxicity, neutral red, MTT, kenacid blue.

RESUMEN. El D-002 es una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular obtenida de la cera de abejas (*Apis Mellifera*) que presenta moderada actividad antiinflamatoria y efectiva actividad antiulcerosa. En el presente trabajo se evaluaron los posibles efectos citotóxicos de este producto en la línea celular 3T3, fibroblastos de origen murino. Para ello, se emplearon tres de los ensayos de citotoxicidad más utilizados en los estudios de toxicidad *in vitro*: captación de rojo neutro (1 min, 24 y 72 h de exposición), enlace al azul de kenacid (24 y 72 h) y reducción del bromuro de dimetildifeniltetrazolio (MTT) (24 y 72 h). Las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos a razón de $4 \cdot 10^4$ células/mL en los ensayos de 1 min y 24 h de exposición y $2 \cdot 10^4$ células/mL cuando el tiempo de exposición al producto fue de 72 h. Fueron expuestas a concentraciones de D-002: 1 000, 2 000, 4 000, 8 000 y 16 000 $\mu\text{g/mL}$ en el ensayo de 1 min de exposición y a 0,1; 1; 10; 100 y 1 000 mg/mL en las series experimentales de 24 y 72 h. En ninguno de los ensayos realizados se evidenciaron signos tóxicos atribuibles al tratamiento con el producto evaluado. La concentración letal media (CL_{50}) no pudo ser detectada, aun cuando se evaluaron elevadas concentraciones de D-002. Sin embargo, los cultivos expuestos a los controles positivos (ácido ascórbico, NaOH y SDS), sí mostraron los cambios esperados. Estos resultados permiten afirmar que en las condiciones experimentales estudiadas la citotoxicidad del D-002 es prácticamente nula.

ABSTRACT. D-002 is a natural mixture of primary aliphatic alcohols of high molecular weight isolated from beeswax (*Apis Mellifera*) with mild anti-inflammatory activity and effective anti-ulcer effects. The present study was done to evaluate possible cytotoxic effects of this product on 3T3 cells, mouse fibroblasts. Three of the most used test were employed in this evaluation: neutral red (1 min, 24 and 72 h of exposure), kenacid blue dye binding and MTT assay (24 and 72 h). The cells were cultured in 96 well plates, using $4 \cdot 10^4$ cells/mL for exposures of 1 min and 24 h. When exposure time was longer (72 h) a density of $2 \cdot 10^4$ cells/mL was used. The D-002 concentrations evaluated were: 1 000, 2 000, 4 000, 8 000 y 16 000 $\mu\text{g/mL}$ (1 min) and 0.1, 1, 10, 100 y 1 000 mg/mL when time of exposure was 24 or 72 h. No toxicity signs were observed in any experiment after the exposure to the product. The lethal mild concentration (CL_{50}) of D-002 was not detected, even at the high concentrations investigated. Meanwhile, cell cultures exposed to positive control agents (ascorbic acid, NaOH and SDS) showed the expected changes. These results permit to affirm that in the employed experimental conditions the cytotoxicity of D-002 is practically null.

INTRODUCCION

El D-002 es una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular que se obtiene de la cera de abejas (*Apis Mellifera*). Entre sus componentes mayoritarios se encuentran el triacontanol, octacosanol, dotriacontanol, hexacosanol y el tetracosanol, siendo el tetratriacontanol un componente minoritario. El tamizaje farmacológico de este producto permitió demostrar que el D-002 presenta moderada actividad antiinflamatoria¹ y una efectiva actividad antiulcerosa en diferentes modelos experimentales de úlcera.^{2,3}

Teniendo en cuenta la efectividad antiulcerosa observada en los estudios de farmacología experimental, el D-002 ha sido propuesto como citoprotector de la mucosa gástrica en el tratamiento de las úlceras pépticas y duodenales en el hombre. Ello, unido al hecho de que los agentes antiulcerosos que se encuentran disponibles en el mercado no están exentos de efectos adversos asociados a su uso, el D-002 podría resultar un fármaco de elección si se demostrara, entre otros aspectos, que no provoca reacciones tóxicas inadmisibles para su uso en humanos. En este sentido, para su introducción en la fase de investigación clínica resulta necesario investigar acerca de los posibles efectos tóxicos del producto, para lo cual deben ser realizados los estudios toxicológicos preclínicos.

En el transcurso de la evaluación toxicológica preclínica de un nuevo producto propuesto para su uso en

humanos se investiga su posible toxicidad empleando métodos que aborden la investigación desde diferentes niveles de organización de las estructuras biológicas.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que da lugar a que se produzca un daño que pueda ser detectado.⁴ A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales tanto cultivos primarios, órganos aislados como líneas celulares establecidas.⁵⁻¹⁰

En el presente trabajo se investigó la posible citotoxicidad del D-002 en la línea celular 3T3, para lo cual se realizaron tres ensayos experimentales que brindan información del daño, empleando distintos indicadores de toxicidad celular: captación del rojo neutro, enlace al azul de kenacid y reducción del bromuro de dimetildifeniltetrazolio (MTT).

MATERIALES Y METODOS

Mantenimiento y procedimiento para la obtención del cultivo celular

Se utilizó la línea celular 3T3 (ATCC), donada por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm² con medio DMEM, con suplemento de 0,85 g/L de Na₂CO₃, Hepes 4,3 g/L, glutamina 2 mmol/L y suero bovino fetal al 10 %. Después de recuperadas de la tripsina, se sembraron en placas a razón de 4 · 10⁴ células/pozo en los ensayos de 1 min y 24 h de exposición y 2X10⁴ células/pozo para 72 h y se incubaron toda la noche a 37 °C en atmósfera húmeda.

Composición del D-002

El D-002 utilizado fue suministrado por el laboratorio de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La composición de la mezcla fue la siguiente: triacontanol 26,63 %, octacosanol 17,49 %, dotriacontanol 16,95 %, hexacosanol 15,34 %, tetracosanol 13,24 % y tetratriacontanol 2,23 %.

Exposición a las sustancias de prueba

Las suspensiones de D-002 fueron preparadas en tween 20 al 0,4 % en PBS y después, fueron analizadas por cromatografía gaseosa para corroborar su estabilidad y grado de pureza. En el ensayo de 1 min de

exposición las células fueron expuestas a: 1 000, 2 000, 4 000, 8 000 y 16 000 µg/mL del producto y en las series experimentales de 24 y 72 h a 0,1; 1; 10; 100 y 1 000 µg/mL.

En cada prueba fue realizado un control negativo con el vehículo empleado en la preparación de las suspensiones. Además, se realizaron controles positivos, compuestos que se evaluaron a concentraciones que provocan la muerte del 50 % del cultivo celular.¹¹⁻¹³ En el ensayo de captación del rojo neutro (1 min de exposición) se empleó ácido ascórbico (295 mg/mL). En los ensayos de rojo neutro y azul de kenacid (24 y 72 h) se utilizó SDS 76 µg/mL para 24 h de exposición y 72 µg/mL en los ensayos de 72 h. En el ensayo del MTT el compuesto empleado como control positivo fue NaOH (38 mmol/L).

Ensayo de captación del rojo neutro

Esta prueba fue realizada según el método propuesto por Borenfreund and Puerner¹⁴ con ella se evaluaron los efectos tóxicos del producto a corto (1 min) y largo plazo (24 y 72 h). En el ensayo de 1 min de exposición, cuando el cultivo estuvo confluyente las células fueron incubadas 3 h con el rojo neutro (50 µg/mL). Después de cargadas, se expusieron a los compuestos de prueba durante 1 min. Seguidamente, se liberó al medio la cantidad de rojo neutro que permaneció en las células viables, mediante ácido acético 1 %, etanol 50 % y H₂O 49 %. La densidad óptica (DO) fue medida a 540 nm en un lector de placas Elisa (SUMA).

En los ensayos de 24 y 72 h se procedió de la manera siguiente. A las 24 h de sembradas, las células fueron expuestas a los compuestos de ensayo. Al finalizar cada período de ensayo fueron cargadas con el colorante. Por último, se determinó la cantidad de rojo neutro liberada al medio de manera similar al ensayo de 1 min de exposición.

En todos los casos, la DO obtenida se tomó como índice de la cantidad de rojo neutro captado por las células vivas.

Ensayo de enlace al azul de kenacid

Este ensayo fue realizado según el método descrito por Knox y col.¹⁵ Se utilizaron las células procedentes del ensayo de captación del rojo neutro (24 y 72 h). Al concluir el ensayo anterior, a cada pozo se adicionaron 150 µL de azul de comassie brillante R-250 en ácido acético glacial y se incubaron las células durante 2 h.

Concluido el período de incubación las células se lavaron con etanol 10 %, ácido acético 5 % y 85 % de H₂O y se expusieron a acetato de potasio (1 mol/L). Por último, se procedió a determinar la DO a 600 nm en un lector de placas de Elisa (SUMA). La DO obtenida se tomó como índice de la cantidad de azul de kenacid enlazado a la proteína celular.

Ensayo de reducción del MTT

Este ensayo fue realizado según Mosmann.¹⁶ Al finalizar los períodos de exposición, las células fueron cargadas con el MTT durante 2 h. Seguidamente, se determinó la cantidad de MTT reducido solubilizando las células con 150 µL de DMSO/pozo. Se cuantificaron las placas a 550 nm en un lector de Elisa (SUMA). La DO se tomó como índice de la cantidad de formazán formado a partir de la reducción del MTT.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante la prueba paramétrica ANOVA y el paquete de programas CSS y se fijó un nivel de significación $p < 0,05$. En todos los casos, se procesaron resultados al menos de tres cultivos, que contenían dos réplicas/tratamiento cada una, por lo que se analizaron como mínimo seis réplicas/tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

En ninguna de las concentraciones evaluadas en los ensayos realizados (Tablas 1 y 2) se apreciaron diferencias significativas cuando se comparó con el control negativo. La

Tabla 1. Resultados del ensayo de captación del rojo neutro (1 min de exposición).

Tratamiento	DO _{540 nm}
Control vehículo	0,286 ± 0,03
Control	
+ D-002 (µg/mL)	0,139 ± 0,05*
1 000	0,247 ± 0,03
2 000	0,281 ± 0,05
4 000	0,286 ± 0,03
8 000	0,277 ± 0,03
16 000	0,284 ± 0,04

Porcentaje de inhibición del crecimiento celular relativos al control negativo tween 20 al 0,4 %, los controles positivos (ácido ascórbico, NaOH y SDS) y de las concentraciones de D-002 evaluadas. DO Densidad óptica a 540 nm (X ± DE). Se presentan los resultados de tres placas de cultivo, seis réplicas/tratamiento, * $p < 0,05$ ANOVA.

Tabla 2. Resultados correspondientes a los diferentes ensayos (24 y 72 h).
Ensayo de captación del rojo neutro.

Tratamiento	DO _{540 nm}	
	24 h	72 h
Ensayo de captación del rojo neutro.		
Control vehículo	0,257 ± 0,03	0,281 ± 0,03
Control + D-002 (µg/mL)		
0,1	0,136 ± 0,03*	0,156 ± 0,38*
1	0,234 ± 0,03	0,286 ± 0,03
10	0,232 ± 0,01	0,282 ± 0,03
100	0,230 ± 0,01	0,277 ± 0,03
1 000	0,228 ± 0,01	0,281 ± 0,02
	0,223 ± 0,01	0,286 ± 0,03
Ensayo de enlace al azul de kenacid.		
Control vehículo	0,391 ± 0,06	0,338 ± 0,04
Control + D-002 (µg/mL)		
0,1	0,242 ± 0,09*	0,190 ± 0,09*
1	0,391 ± 0,06	0,337 ± 0,02
10	0,387 ± 0,05	0,344 ± 0,04
100	0,394 ± 0,04	0,336 ± 0,02
1 000	0,393 ± 0,06	0,333 ± 0,04
	0,398 ± 0,04	0,336 ± 0,03
Ensayo de reducción del MTT.		
Control vehículo	0,516 ± 0,05	0,571 ± 0,05
Control + D-002 (µg/mL)		
0,1	0,214 ± 0,16*	0,372 ± 0,15*
1	0,516 ± 0,05	0,534 ± 0,03
10	0,564 ± 0,03	0,580 ± 0,02
100	0,519 ± 0,01	0,532 ± 0,03
1 000	0,548 ± 0,05	0,543 ± 0,05
	0,504 ± 0,08	0,537 ± 0,08

Porcentaje de inhibición del crecimiento celular relativos al control negativo (tween 20 al 0,4 %), los controles positivos (ácido ascórbico, NaOH y SDS) y de las concentraciones de D-002 evaluadas.

DO Densidad óptica (X ± DE).

Se presentan los resultados de tres placas de cultivo, seis réplicas/tratamiento, * p < 0,05 ANOVA.

concentración de D-002 que produce la muerte del 50 % de las células no pudo ser detectada.

Las concentraciones máximas empleadas (16 000 µg/mL en el ensayo de 1 min de exposición y 1 000 µg/mL en el resto de los ensayos) resultaron las más elevadas que podían ser evaluadas debido a la baja solubilidad del producto. Estudios preliminares permitieron observar que por encima de esos valores se producen precipitados en el medio de incubación, así como que el D-002 se adhiere a las paredes de los pozos provocando interferencias en los resultados. No obstante, cuando se evalúa la citotoxicidad de una sustancia empleando estos ensayos, los límites utilizados en cada prueba se consideran adecua-

dos para emitir un criterio de toxicidad.^{11-13,17}

En todos los casos, los compuestos empleados como controles positivos resultaron significativamente diferentes al control (Tablas 1 y 2) y se comprobó que el efecto provocado por ellos en cada serie experimental y períodos de exposición evaluados fueron comparables con lo referido en la literatura.¹¹⁻¹³

Este estudio fue realizado evaluando los efectos del D-002 en la línea celular 3T3. Esta es una línea celular obtenida de embrión de ratón suizo albino, bien establecida y caracterizada que ha sido ampliamente utilizada en este tipo de pruebas.⁷⁻⁹ Además, se utilizaron diferentes criterios indicativos de la viabilidad celular, siendo estos ensayos de

los más recomendados para predecir la toxicidad *in vitro* de los compuestos y drogas.^{8, 9, 18-20}

El rojo neutro es un colorante catiónico débil que penetra a las células a través de las membranas por difusión pasiva y es almacenado en los lisosomas. En este caso independientemente de su mecanismo de acción, si el compuesto que se evalúa interfiere en el proceso de división y multiplicación celular, se reducirá el número de células del cultivo lo que podrá ser detectado al determinar la cantidad del colorante retenido por las células vivas.¹²

Por otro lado, el azul de kenacid tiene la capacidad de enlazarse a las proteínas celulares, por lo que determinando la cantidad de colorante retenido por las células vivas es posible emitir un criterio de proliferación celular, ya que afectaciones en el número de células del cultivo se revelan en el contenido de proteínas.¹³

En el caso del ensayo del MTT, este compuesto es reducido por la succinicodehidrogenasa mitocondrial a formazán, lo que conduce a que se produzca un cambio de coloración en el medio, que puede ser cuantificado y tomado como índice de la integridad de las mitocondrias, del estado energético y la actividad funcional de las células.¹⁴

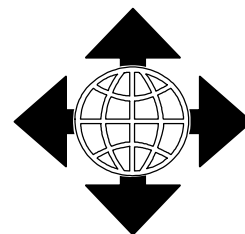
Los resultados obtenidos en estas series experimentales demuestran la ausencia de citotoxicidad del D-002 en las condiciones experimentales ensayadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R. and Magraner J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from bees wax. **Prostaglandins, Leukotrienes, Essential Fatty Acids**, 59, 235-238, 1998.
2. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L. and Más R. Effect of D-002: an active product isolated from beeswax on experimental induced ulcers. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, 47, 731-733, 1995.
3. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Rodeiro I., Más R. et al. Possible mechanism cytoprotective of D-002. An antiulcerogenic product isolated from beeswax. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, 48, 858-860, 1996.
4. Babich H. and Bourenfreund E. Fathead Minnow FHM cells for use in vitro cytotoxicity assays of aquatic pollutants. **Ecotoxicological Environmental Safety**, 14, 78-87, 1987.
5. Hawksworth G.M. Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies. **Human Experimental Toxicology**, 13, 568-573, 1994.

6. Fautrel A. A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat liver cells. **Toxicology In Vitro**, 5, 543-547, 1991.
7. Knox P, Uphill P, Fry J.R., Benford J. and Balls M. The FRAME multicentre project on *in vitro* cytotoxicology. **Food Chemical Toxicology**, 24, 457-463, 1986.
8. Riddell R.L., Clothier R.H. and Balls M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assay. **Food Chemical Toxicology**, 24, 469-471, 1986.
9. Cordier A.C. *In vitro* strategy for the safety assessment of drugs. *In vitro* Methods in Toxicology, Academic Press, London, 21-27, 1992.
10. Fentem J.H. The use of human tissues in *in vitro* toxicology. Stirling, 28/29 april 1993, Summary of general discussions. **Human Experimental Toxicology**, 13, 445-449, 1994.
11. INVITTOX Protocol. The FRAME cytotoxicity test (neutral red assay), 3a, 1990.
12. INVITTOX Protocol. The FRAME cytotoxicity test (kenacid blue), 3b, 1992.
13. INVITTOX Protocol. The assay of MTT, 17, 1990.
14. Borenfreund E. and Puerner J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, 24, 119-124, 1985.
15. Knox P, Uphill P, Fry J., Bendford D. and Balls M. The Frame multicentre project on *in vitro* cytotoxicity. **Food Chemical Toxicology**, 24, 457-463, 1986.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, 65, 55-63, 1983.
17. Tadao O. Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE. **Toxicology in Vitro**, 16, 69-79, 2002.
18. Straughan D., Fentem J. and Balls M. Replacement alternative and complementary *in vitro* methods in pharmaceutical research. *In vitro* Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, Chapter 1, Academic Press, 1-13, 1997.
19. Lovschall H., Eiskjaer M. and Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. **Toxicology in Vitro**, 16, 63-69, 2002.
20. Da Silva Melo P., Duran N. and Haun M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznodazole on V79 cells. **Toxicology Letters**, 116, 237-242, 2000.

¿BUSCA PUBLICIDAD?



La Revista CENIC Ciencias Biológicas le puede ayudar eficazmente a difundir su mensaje, así como a viabilizar sus contactos y propiciar intercambios y relaciones futuras con la comunidad científica nacional e internacional y sus instituciones respectivas.

Aproveche esta oportunidad que a módicos precios le ofrece para que su mensaje viaje y llegue con ella, a su círculo especializado de lectores.

TARIFAS (USD)

\$200	\$100	\$70	\$120	\$50	\$150	\$300	\$350
P	1/2P	1/3P	2/3P	1/4P	3/4P	2P	2P CENTRALES
\$850				\$500			
CONTRACUBIERTA (cuatricomía)				REVERSO DE CUBIERTA O DE CONTRACUBIERTA (cuatricomía)			

La contratación por un año (tres números) de este servicio, le proporciona como beneficio adicional, un descuento del 15 %.

Dirija su solicitud a:

Editorial CENIC

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.