

Efecto del D-002 en modelos experimentales de anafilaxia

Daisy Carbajal,* María de Lourdes Arruzazabala, Vivian Molina y Suria Valdés.

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

Recibido: 7 de septiembre del 2000. Aceptado: 16 de noviembre del 2000.

Palabras clave: cera de abejas, alcoholes alifáticos, anafilaxia, leucotrienos, broncoconstricción.
Key words: beeswax, aliphatic alcohols, anaphylaxia, leukotrienes, bronchoconstriction.

RESUMEN. El D-002 es una mezcla de alcoholes alifáticos aislada y purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*). Ha sido demostrado que posee un efecto protector de la mucosa gástrica en modelos de úlcera inducida por diversos agentes como la aspirina, la indometacina y el etanol, así como un moderado efecto antiinflamatorio acompañado de una disminución de los niveles de LTB₄. Los leucotrienos desempeñan un papel importante en el daño de la mucosa gástrica y también se encuentran presentes en las reacciones inflamatorias y en la anafilaxia. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el D-002 en modelos de anafilaxia. La administración intraperitoneal de D-002 (5 y 25 mg/kg) a cobayos sensibilizados por inyección de albúmina de huevo produjo una disminución de la broncoconstricción inducida por este antígeno. También estas dosis variaron la respuesta en la anafilaxia cutánea pasiva (ACP) al disminuir el área de las manchas que se producen en la piel de las ratas por la inyección de albúmina de huevo en azul de Evans. Sin embargo, la administración de D-002 en el mismo intervalo de dosis no protegió a los cobayos de la mortalidad inducida por el shock retardado ni modificó el tiempo de sobrevivencia. Los resultados indican que el efecto antianafiláctico del D-002 se produce a través de reacciones en las que los leucotrienos desempeñan un mayor papel (broncoconstricción por antígeno y ACP) no así, en el shock anafiláctico *in vivo*, en el cual se encuentran involucrados otros mediadores tales como PAF, TXB₂, serotonina y catecolaminas.

ABSTRACT. D-002 is a natural product isolated and purified from beeswax which consists of a well-defined mixture of higher primary aliphatic alcohol. An anti-ulcer effect of D-002 has been demonstrated in different experimental models. It prevents gastric damage in ethanol, indomethacin and aspirin induced-ulcer. Moreover a mild anti-inflammatory effect and a diminished LTB₄ level in pleural exudate was observed. Leukotrienes play an important role in the damage of gastric mucose and they are present in the inflammatory reactions and anaphylaxia too. The intraperitoneal administration of D-002 (5 and 25 mg/kg) to guinea pigs sensitized with egg albumin produced a diminished bronchoconstriction induced by antigen. This doses diminished in passive cutaneous anaphylaxia (PCA) the spot produced in rat skin by injection of egg albumin in Blue Evans. Nevertheless, the same doses of D-002 administered did not protect passively sensitized guinea pigs from mortality or time of survival. These results show that the anti-anaphylactic effect of D-002 was produced in reactions where leukotrienes play an important role (bronchoconstriction by antigen and PCA) not in the anaphylactic shock *in vivo* where other mediators like PAF, TXB₂, serotonin and catecholamines are involved.

INTRODUCCION

El D-002 es una mezcla de alcoholes alifáticos aislada y purificada de la cera de las abejas (*Apis mellifera*). Ha sido demostrado que el D-002 posee un efecto protector en modelos de úlceras inducidas por etanol, ASA e indometacina,¹ así como un marcado efecto antiinflamatorio en el modelo del granuloma por algodón y un moderado efecto en el modelo de la pleuresía por carragenina, en el cual disminuyó significativamente los niveles de LTB₄ en el exudado pleural.²

Ha sido reportado el importante papel que desempeñan los leucotrienos (LT) en el daño de la mucosa gástrica^{3,4} en reacciones inflamatorias^{5,6} y en la anafilaxia.^{7,8}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del D-002 sobre modelos experimentales de anafilaxia.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Cobayos albinos machos (300-400 g), ratones Balb-C machos (20-30 g) y ratas hembras Sprague Dawley (180-200 g) obtenidos del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana), fueron mantenidos en condiciones de laboratorio con libre acceso al agua y la comida una semana antes del experimento. Al culmi-

*Correspondencia.

nar el período de adaptación, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales para cada serie.

Administración y dosificación

El D-002 fue utilizado tras comprobar el cumplimiento de sus especificaciones de calidad. El producto fue suspendido en vehículo Tween 20-H₂O (2 %) y se le administró a un grupo de los animales por vía i.p. (1, 5 y 25 mg/kg) 1 h antes del experimento, mientras el grupo control recibió volúmenes equivalentes del vehículo por la misma vía.

Serie 1. Broncoconstricción inducida por antígeno

Los cobayos fueron sensibilizados mediante inyección subcutánea de albúmina de huevo (10 mg) y 15 d después, se les administró el D-002. Pasada 1 h, fueron anestesiados por vía i.p. con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y preparados para el registro de presión endotraqueal según la clásica prueba de Konzett y Rossler.⁹

Una cánula fue insertada en la tráquea del animal para realizar la ventilación mediante una bomba de respiración (Hugo Sachs Elektronic) a 55 respiraciones/min con un volumen de 3 a 4 mL. La presión traqueal fue registrada mediante un transductor de presión LPU-0,1 A, conectado a un polígrafo Nihon Kohden.

A continuación de la preparación quirúrgica, los animales fueron pretratados por vía e.v. con indometacina (1 mg/kg), mepiramina (2,5 mg/kg), atropina (1 mg/kg) y propranolol (0,05 mg/kg) y 5 min después, se indujo la broncoconstricción anafiláctica por inyección endovenosa de albúmina de huevo (0,5 mg/kg).

Serie 2. Anafilaxia cutánea pasiva (ACP)

Ratones Balb-C fueron sensibilizados mediante inyección de 1 mg de albúmina de huevo adsorbido sobre 1 g de gel de hidróxido de aluminio y recibieron tres inyecciones booster a intervalos de 2 semanas. Pasados 7 d de la última inyección, los ratones se desangraron y se preparó un pool de sueros que se guardó a -20 °C.

Las ratas fueron afeitadas en la región dorsal, donde 24 h después, se les inyectó por vía subcutánea 0,1 mL de diluciones seriadas del suero de ratón desde 1:20 hasta 1:160. Pasadas 24 h, se les administró el D-002 y después de 1 h, la reacción en la piel fue provocada por inyección e.v.

de 1 mL de una disolución de albúmina de huevo (10 mg/mL) en Azul de Evans 0,5 %. A la hora, las ratas fueron sacrificadas, la piel de la espalda separada e invertida y la reacción azul positiva fue medida.¹⁰

El título de ACP se tomó como el recíproco de la mayor dilución a la que se obtuvo reacción azul positiva al menos en dos ratas.

Serie 3. Shock anafiláctico retardado *in vivo*

Los cobayos fueron sensibilizados mediante tres inyecciones intraperitoneales de disolución de albúmina de huevo al 5 % en los días 1, 3 y 5. Pasados 21 d, el D-002 fue administrado a los cobayos y 1 h después, preparados para la inducción de la anafilaxia. Para ello, se anestesió localmente la zona ventral del cuello con procaína 2 %, 2 mL/kg. Seguidamente, se aisló la vena yugular por donde se inyectó una disolución de mepiramina (100 µg/kg) y 5 min más tarde, fue inyectada la albúmina de huevo 10 mg/kg. El tiempo de supervivencia fue registrado.

Análisis estadístico

En el modelo de broncoconstricción inducida por antígeno, los porcentajes de broncoconstricción máxima obtenidos en el tiempo en los animales tratados con D-002 fueron comparados con los de los animales controles mediante la prueba de la U de Mann Whitney.

En el modelo del ACP las áreas (cm²) de la reacción azul positiva de los animales tratados con D-002 fueron comparadas con las de los animales controles mediante la prueba de la U de Mann Whitney.

En el shock anafiláctico *in vivo* el porcentaje de mortalidad se comparó mediante la prueba de la probabilidad exacta de Fisher y los tiempos de supervivencia (min) mediante la U de Mann Whitney.

RESULTADOS

En la figura 1 y las tablas 1 y 2 se observan los resultados del D-002 sobre la broncoconstricción inducida por antígeno, el ACP y el shock anafiláctico *in vivo* respectivamente.

Los resultados se expresan como el porcentaje de respuesta máxima en el tiempo.

Se observó que el D-002 (5 y 25 mg/kg) disminuye significativamente la broncoconstricción inducida por antígeno, mientras que la dosis de 1 mg/kg no resultó efectiva en este modelo (Fig. 1).

Anafilaxia cutánea pasiva

En la reacción del ACP, el D-002 (1 mg/kg) no modificó significativamente las áreas (cm²) de ninguna de las reacciones azules positivas, mientras que las áreas correspondientes a los títulos de 40, 80 y 160 en los animales tratados con D-002 (5 y 25 mg/kg) fueron disminuidas significativamente con relación a las

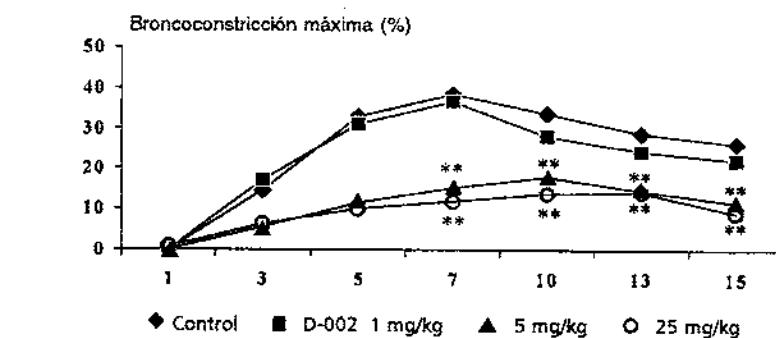


Fig. 1. Efecto del D-002 sobre la broncoconstricción inducida por antígeno.

Tabla 1. Efecto del D-002 sobre la anafilaxia cutánea pasiva.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Título			
		20	40	80	160
Control					
D-002	1	3,20 ± 0,87	2,49 ± 0,82	1,59 ± 0,50	0,98 ± 0,43
	5	3,66 ± 0,89	2,28 ± 0,57	1,77 ± 0,98	0,66 ± 0,52
	25	2,64 ± 0,88	1,35 ± 0,90*	0,48 ± 0,46**	0,18 ± 0,40*

*p < 0,05; **p < 0,01. Prueba de la U de Mann Whitney.

Tabla 2. Efecto del D-002 en el shock anafiláctico *in vivo*.

ratamiento	Dosis	n	Mortalidad	Tiempo de sobrevivencia
	(mg/kg)		(%)	(min)
Control		11	64,7	33,3 ± 4,0
D-002	1	6	60,0	32,1 ± 3,21 n.s.
	5	6	54,5	25,8 ± 1,85 n.s.
	25	7	77,7	25,4 ± 2,67 n.s.

n.s. No significativo.

áreas de los animales no tratados. (Tabla 1).

Shock anafiláctico retardado *in vivo*

El D-002 no modificó la mortalidad (%), ni el tiempo de sobrevivencia con relación al grupo control en el shock anafiláctico (Tabla 2).

DISCUSION

La reacción anafiláctica se inicia cuando el antígeno se une a su anticuerpo específico sobre la membrana de mastocitos y basófilos, y esto induce la liberación de varios mediadores químicos, tales como histamina, factor activador de plaquetas (PAF), adenosina, serotonina, kinina, prostaglandinas y tromboxano A₂, así como los leucotrienos; lo cual causa edema, constrictión de las vías aéreas e infiltración de granulocitos.¹¹

Los leucotrienos son una familia de mediadores lipídicos derivados del metabolismo del ácido araquidónico mediante la enzima 5-lipoxigenasa (L.O.) y son generados principalmente por células inflamatorias. El leucotrieno B₄ (LTB₄) es un potente agente quimiotáctico de leucocitos por lo que desempeña un importante papel en la inflamación,¹² mientras los péptido-leucotrienos LTC₄, LTD₄, LTE₄, tienen potentes acciones que incluyen contracción de la musculatura lisa, estimulación de la secreción de mucus e incremento de la permeabilidad vascular¹³⁻¹⁵ por lo que tienen un papel relevante en la patofisiología del asma, y se han detectado elevados niveles de péptido-LT en la circulación de sujetos asmáticos.¹⁶ Ha sido reportado que inhibidores de la 5-LO y(o) antagonistas de LT son beneficiosos agentes utilizados en el tratamiento del asma bronquial.¹⁷

En el modelo experimental de la broncoconstricción inducida por antígeno en curieles, la administración de una disolución con anticolinérgico, antihistamínico, inhibidor de ciclooxigenasa y β-bloqueador ga-

rantiza que la inducción de la broncoconstricción sea mediada específicamente por los LTC₄ y LTD₄.

Los resultados demuestran que el D-002 (5 y 25 mg/kg) disminuye significativamente la broncoconstricción en este modelo.

En el modelo del PCA en ratas, la reacción anafiláctica localizada en la piel está caracterizada por un importante aumento de la permeabilidad vascular (PV) con la consecuente extravasación de líquido que da lugar a la formación de la mancha azul. Ha sido reportado que los péptidos-LT causan dilatación de las venulas postcapilares incrementando la PV en la piel,^{1,2} lo que explica su importante papel en la reacción del ACP.

El D-002 (5 y 25 mg/kg) disminuyó significativamente el área (cm²) de las manchas azules con relación a los animales del grupo control en este modelo.

En cambio, en el shock anafiláctico *in vivo*, el D-002 administrado en el mismo intervalo de dosis no protegió de la mortalidad ni modificó el tiempo de sobrevivencia.

Estos resultados indican que el efecto antianafiláctico del D-002, se manifestó en los dos primeros modelos. En tal sentido, en la broncoconstricción inducida por antígeno en cobayos la reacción anafiláctica es mediada exclusivamente por leucotrienos y en el modelo de anafilaxia cutánea pasiva, si bien interviene la liberación de diversos mediadores esto se produce localmente y no por vía sistémica.

En cambio, en el shock anafiláctico *in vivo* tiene lugar una liberación sistémica y masiva de muchos mediadores tales como péptidos-LT, Pg y TxA₂, así como catecolaminas, PAF y serotonina, lo cual le otorga una dimensión que no resulta inhibida por la administración del D-002 en el intervalo de dosis estudiada.

Así, los resultados de este estudio sugieren que el D-002 ejerce su acción antianafiláctica a través de una inhibición parcial sobre la LO

y(o) antagonismo al receptor de LTC₄ y LTD₄, lo cual no resulta suficiente para proteger de la mortalidad en el shock anafiláctico *in vivo*.

Además, es conocido que el PAF representa una familia de mediadores fosfolipídicos de estructura general estrechamente relacionados que presenta propiedades broncoconstrictoras,^{11,18} siendo reportada la importancia de este mediador en el shock anafiláctico en cobayos¹⁹ y en ratas.²⁰

Sin embargo, Underwood y col. (1992)²¹ demostraron que el PAF endógeno no está involucrado en la hiperreactividad inducida por antígeno en cobayos.

Por lo tanto, no se puede descartar un posible antagonismo del D-002 en el receptor al PAF y ulteriores estudios deben dilucidarlo.

BIBLIOGRAFIA

1. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., and Más R. .Anticancer activity of higher primary alcohols of beeswax . *J. Pharmacy and Pharmacol.*, 47, 731, 1995.
2. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R., and Maganner J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostaglandin Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 59, 30, 1998.
3. Konturek S.J. Brzozowski T. Drozdowicz D. and Beck G. Role of leukotrienes in acute gastric lesions induced by ethanol, taurocholate, aspirin, platelet activating factor and stress in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 33, 808, 1988.
4. Konturek S.J., Brzozowski T., Drozdowicz D., Garlicki J. and Beck G. Role of leukotrienes and platelet activating factor in acute gastric mucosal lesions in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 164, 285, 1989 .
5. Bray M.A. Leukotrienes in inflammation. *Agents and Actions*, 19, 10, 1986.
6. Salmon J.A. and Garland L.G. Leukotriene antagonists and inhibitors of leukotriene biosynthesis as potential therapeutic agents. *Progress in Drug Research*, 37, 40, 1991.
7. Lam S. Chan H., Leriche J.C., Chan-Yeung M. and Salari H. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 81, 711, 1988.
8. Sakuma Y., Tsunoda H., Katayama S., Abe S., Yamatsu I. and Katayama Y. Determination of plasma leukotrienes in antigen-induced bronchoconstrictive guinea pigs. *Prostaglandins*, 41, 315, 1991.
9. Konzett H. and Rossler R. Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronchialmuskulatur. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 195, 71, 1940.

10. Watanabe N. and Ovary Z. Antigen and antibody detection by *in vivo* methods, a reevaluation of passive cutaneous anaphylaxis reactions. *J. of Immunological Methods*, **14**, 381, 1977.
11. Barnes P.J., Chung K.F. and Page C.P. PAF closely mimics the pathology of asthma. *Trend. Pharmacol. Sci.*, **8**, 285, 1987.
12. Czarntzki B.M. and Ronenbach T. Chemotaxis of human neutrophils and eosinophils towards LTB₄ and its 20-omega oxidation products *in vitro*. *Prostaglandins*, **31**, 851, 1986.
13. Samuelson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**, 568, 1983.
14. Drazen J.M., Austen K.F., Lewis D.A., Clark D.A., Goto G., Marfat A. and Corey E.J. Comparative airway and vascular activity of leukotriene C4 and D *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 4 345, 1998.
15. Maron Z., Shelhamer J.H., Bach M.K., Morton D.R. and Kaliner M. Slow reacting substances, leukotrienes C4 and D4 increase the release of mucus from human airway. *Pharmacol. Rev.*, **40**, 449, 1987.
16. Sampson A.P., Evans J.M., Garland L.G., Piper P.J. and Costello J.F. The generation and metabolism of leukotrienes in the ionophore-stimulated blood of normal and asthmatic subjects. *Pulmonary Pharmacology*, **3**, 111, 1990.
17. Ford-Hutchinson A.W. Inhibition of leukotriene biosynthesis. *Advances in the Understanding and Treatment of Asthma*, **629**, 133, 1991.
18. Vargaftig B.B. and Braquet P.G. PAF-acether today relevance for acute experimental anaphylaxis. *Br. Med. Bull.*, **43**, 312, 1987.
19. Darius H., Lefer D.J., Smith J.B. and Lefer A.M. Role of platelet activating factor-acether in mediating guinea pig anaphylaxis. *Science*, **232**, 58, 1986.
20. Damas J. Involvement of PAF-acether in the anaphylactic shock in the rat. *Journal of Lipid Mediators*, **1**, 161, 1989.
21. Underwood S. L., Lewis S.A. and Raeburn D. RP 59227, a novel PAF receptor antagonist: effects in guinea pig models of airway hyperreactivity. *European Journal of Pharmacology*, **210**, 97, 1992.

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

UNIVERSIDAD 2002

3^{RA} CONVENCION INTERNACIONAL DE EDUCACION SUPERIOR

4 al 8 de febrero del 2002.

TEMAS PRINCIPALES:

- La formación del profesional.*
- Enseñanzas específicas: Pedagogía, Medicina, Ingeniería, Arquitectura, Ciencias Agropecuarias, Ciencias Sociales y Humanidades, Ciencias Exactas y Naturales, Artes, Diseño, Educación Física y Deportiva.*
- La formación ambiental.*
- La superación pedagógica de los docentes y la formación de directivos.*
- La formación de posgrado.*
- La investigación científica en las universidades.*
- La extensión universitaria.*
- Los problemas sociales de la educación superior.*
- La gestión de las instituciones de educación superior.*
- Las nuevas tecnologías de la información y las comunicaciones.*
- La cooperación internacional.*
- El papel de los gremios en las universidades.*
- El papel de las organizaciones estudiantiles.*

La Convención está dirigida a:

- Profesores y estudiantes universitarios.*
- Profesores de la enseñanza secundaria.*
- Investigadores vinculados a instituciones de educación superior.*
- Directivos universitarios.*
- Funcionarios de instituciones y organizaciones asociadas a la educación superior.*

Cuota de inscripción: Delegados \$200,00 USD; Acompañantes: \$150,00 USD; Estudiantes: \$100,00 USD.

Toda solicitud de información adicional, notificación de participación y envío de resúmenes, debe ser dirigida a la Secretaría Ejecutiva de la Convención:

Dr. Rafael Vigoa Hernández, Secretario Ejecutivo

UNIVERSIDAD 2002

Calle 23 No. 565, esquina a Calle F, El Vedado, Código Postal 10400, La Habana, Cuba.

Telefax: (53) (7) 55 2359. Fax: 55 3477. Email: ofieven@reduniv.edu.cu; dct@reduniv.edu.cu