

Efecto del D-003 sobre el infarto del miocardio inducido por ligadura y reperfusión de la coronaria en ratas.

Daisy Carbajal, Vivian Molina, Lourdes Arruzazabala, Rosa Más

Departamento de Farmacología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
Correspondencia: Dr. D. Carbajal, Centro de Productos Naturales, CNIC, 25 Ave, Post Box: 6880 Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. E-Mail: dalmer@ip.etcscu

Recibido: 27 de noviembre de 2002

Aceptado: 17 de diciembre de 2002

Palabras clave: D-003, ácidos alifáticos, caña de azúcar, infarto del miocardio, ratas.

Key words: D-003, aliphatic acids, sugar cane, myocardial infarction, rats.

RESUMEN: El D-003 es una mezcla natural de ácidos alifáticos aislada y purificada de la cera de la caña de azúcar. Posee efectos antiagregante plaquetario y antitrombótico, de la misma manera que disminuye los niveles plasmáticos y séricos de tromboxano B₂ (TxB₂), mientras incrementa marcadamente los niveles de PGI₂ en ratas. El objetivo de este estudio consistió en investigar el efecto del D-003 en un modelo de ligadura y reperfusión de la coronaria en ratas. Ratas Sprague Dawley machos fueron administrados con D-003 a las dosis de 5, 25 y 200 mg/kg por vía oral. Seguidamente se les realizó una traqueotomía y fueron mantenidas con respiración asistida. La arteria coronaria descendente anterior izquierda fue ocluida y el período de isquemia fue de 10 minutos, al término del cual se retiró la oclusión comenzando la reperfusión durante otros 10 min. Una vez finalizada la reperfusión se extrajo la sangre de la vena cava para la determinación de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin fosfoquinasa (CPK), marcadoras del daño cardíaco. La administración oral de dosis únicas (25 y 200 mg/kg) de D-003 produjeron una disminución estadísticamente significativa y de manera dependiente de la dosis de los niveles de LDH y CPK. La dosis de 5 mg/kg no disminuyó ninguna de las enzimas cuantificadas. Teniendo en cuenta estos resultados y el incremento de los niveles de PGI₂ que produce, se sugiere que el D-003 puede ser de utilidad en la prevención del infarto del miocardio.

ABSTRACT: D-003 is a natural mixture of primary aliphatic acids of higher molecular weight isolated and purified from sugar cane wax. D-003 possesses antiplatelet and antithrombotic effects associated to decreased thromboxane B₂ (TxB₂) and increased prostacyclin (PGI₂) serum levels effects. The main of this study is investigating the possible protective effect of D-003 on the infarction of myocardium induced by ischemia and reperfusion of coronary artery in rats. For that male Sprague Dawley rats received D-003 at doses of 5, 25 and 200 mg/kg by oral route. After 1 hour the rats were anesthetized and immediately the tracheotomy was carried out in order to keep it with assisted respiration at 2cc ambient air for each 100g of corporal weight. The thorax of rats were opened and the left descendent anterior coronary artery was localized, occluded during 10 min and reperfused during another 10 min. When finished the reperfusion time the blood was extracted from cava vein for determining deshidrogenase lactate (LDH) and creatin phosphokinase (CPK) enzymes. The oral administration of single doses of D-003 (25 and 200 mg/kg) produced a significant reduction in the activity of LDH and CPK. The dose of 5 mg/kg didn't reduce the levels of neither enzymes quantified. Taking into account these results and the increasing of the PGI₂ serum levels induced by the

administration of D-003, it suggests that D-003 could be useful in the prevention of myocardial infarction.

INTRODUCCION

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y en Cuba, siendo las enfermedades coronarias la secuela de un proceso aterosclerótico caracterizado por la acumulación de lípidos, Ca⁺⁺ y plaquetas fundamentalmente en la intima arterial.¹

El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificados a partir de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cuyo principal componente es el ácido octacosanoico seguido por los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico, tetra- triacontanoico. Además, están presentes como componentes minoritarios los ácidos hexacosanoico, nonacosanoico, hentriacontanoico, titriacontanoico, pentatriacontanoico y hexatriacontanoico.²

Ha sido demostrado que el D-003 posee efectos antiagregante plaquetario tanto en animales de experimentación³ como en voluntarios sanos⁴ así como un efecto antitrombótico en ratas.³ También produce un incremento del tiempo de sangramiento y de los niveles de PGI₂, así como una disminución de los niveles de TxB₂ en suero y plasma estimulado por colágeno.⁵ Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo

consistió en la evaluación preliminar del efecto protector del daño cardíaco inducido por oclusión y reperfusion de la arteria coronaria en ratas mediante la cuantificación de enzimas marcadoras de daño como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatin fosfokinasa (CPK).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 250-300 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) que fueron adaptados durante 7 días a las condiciones de laboratorio con libre acceso al agua y la comida.

Administración y dosificación

El D-003 fue suspendido en una disolución Tween 20/H₂O (2 %). La administración del D-003 se realizó por vía oral mediante intubación gástrica (5ml/kg) en esquemas de dosis única. Los animales del grupo control recibieron volúmenes equivalentes del vehículo.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos experimentales (8 animales por grupo):

- 1) grupo *Sham* (operado y no ligado),
- 2) Grupo Control (operado, ligado y administrado con el vehículo),
- 3, 4 y 5) Grupo D-003 (5, 25 y 200 mg/kg) respectivamente (grupos

operados, ligados y administrados con la sustancia de ensayo).

Pasados 90 min del tratamiento se procedió a la inducción del infarto por I-R.

Inducción del infarto del miocardio por isquemia-reperfusion.

Las ratas fueron anestesiadas con tiopental (40 mg/kg i.p.). Seguidamente se les realizó una traqueotomía y fueron mantenidas con respiración asistida mediante una bomba de respiración Ed colora para especies menores a razón de 2 cc de aire ambiental por cada 100 g de peso. Se les abrió el tórax por una toracotomía del lado izquierdo, se localizó la arteria coronaria descendente anterior izquierda, la cual fue ligada con una seda negra trenzada calibre 6-0 montada en una aguja atraumática. La arteria fue ocluida anudando la seda sobre un tubo de plástico de 1 cm de largo para evitar desgarrar la arteria, el período de isquemia fue de 10 minutos, al termino del cual se retiro la oclusión comenzando la reperfusion durante otros 10 min.

Determinación de la CPK

Una vez finalizada la reperfusion se extrajo la sangre de la vena cava, se centrifugó a 2500 rpm y se obtuvo el suero para la determinación de la CPK mediante kit

diagnóstico (Linear Chemicals, España). A la cubeta se añadieron 150 µl del reactivo y 20 µl de la muestra, se agitó y leyó a 340 nm a partir de los 2 primeros minutos y 3 veces más cada 1 min para un total de 4 lecturas. Los datos fueron expresados en Unidades/Litro.

Determinación de LDH.

Para la determinación de LDH, en el suero obtenido, 50 µl del mismo fueron añadidos en la cubeta con 1,5 ml de la mezcla (TRIS 50 nmol/L, Piruvato 0,6 mmol/L y NADH 0,18 mmol/L), se agito y leyó a 340 nm a partir del primer minuto 3 veces más cada 1 min para un total de 4 lecturas. Los datos fueron expresados en Unidades/Litro

Análisis estadístico.

Se realizaron las comparaciones entre grupos utilizando el test no paramétrico de la U de Mann Whitney, fijándose *a priori* un nivel de significación de $\alpha=0.05$.

RESULTADOS.

Como se observa en la Tabla 1 la administración oral de dosis únicas de 25 y 200 mg/kg de D-003 produjeron una disminución estadísticamente significativa y de manera dosis dependiente de los niveles de LDH y CPK. La dosis de 5 mg/kg no disminuyó los niveles de ninguna de las enzimas cuantificadas.

Tabla 1

Efecto del D-003 sobre las enzimas LDH y CPK en suero de ratas con isquemia y reperfusion coronaria.

Tratamiento	Dosis (mg /kg)	n	LDH U/L	CPK U/L
Sham		8	27,9 ± 3,9	637,5 ± 85,6
Control		8	68,0 ± 5,0 +++	1366,3 ± 68,5 +++
D-003	5	8	56,3 ± 10,0	1121,3 ± 111,4
	25	8	43,6 ± 9,04 *	1080,7 ± 148 *
	200	8	34,1 ± 6,07 **	950,7 ± 54,3 **

+++ p<0.001 Comparación vs Sham * p <0.05, ** p< 0.01 Comparación vs control. Test de la U de Mann Whit

DISCUSIÓN

La isquemia miocárdica es un estado en el cual el flujo sanguíneo al miocardio no es suficiente para proveer de sangre a las células, lo que impide el aporte de oxígeno y otros substratos metabólicos, así como favorece la acumulación de catabolitos en el tejido afectado.

Cuando un corazón es sujeto a la isquemia seguida de reperfusión ocurre una clásica respuesta inflamatoria, hay una alteración de la microcirculación, exudación de plasma en el espacio intersticial y acumulación de polimorfonucleares (PMN) y monocitos en el sitio del daño. Los PMN juegan un papel crucial en la iniciación del daño por reperfusión, estos se derivan de los radicales libres y causan ruptura de la membrana, contribuyendo a la disfunción y a la necrosis miocárdica después de la reperfusión.^{6,7,8}

Por otra parte, las plaquetas son también importantes células que pueden agravar el daño de la isquemia del miocardio.

Debido a este fenómeno se extiende el área de necrosis miocárdica con la consecuente liberación de enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatin fosfoquinasa (CPK), produciéndose además una variedad de sustancias potencialmente deletéreas como leucotrienos, enzimas lisosomales, y radicales libres de oxígeno los que pueden causar un daño posterior a las células ya dañadas.

Está bien establecido que la cuantificación de los niveles séricos de CPK es un índice de daño celular que se corresponde con el tamaño del infarto después de realizada la isquemia y reperfusión⁹ siendo uno de los métodos más exitosos para medir el daño miocárdico.¹⁰

Existen evidencias consistentes que muestran que mediadores vasodilatadores producidos por las células endoteliales como la prostaciclina tienen efecto antiagregante plaquetario.¹¹ La prostaciclina es un potente vasodilatador y un agente citoprotector.¹² Así, ha sido demostrado que la prostaciclina administrada *in vivo* reduce el daño isquémico cardíaco¹³ y la trombosis

coronaria¹⁴ en modelos experimentales.

Es conocido que análogos de la prostaciclina como el iloprost¹⁵ y el beraprost^{16,17} producen una reducción del tamaño del infarto y una reducción de los niveles de LDH. La administración de iloprost reduce el daño celular durante la isquemia probablemente por preservar la integridad de la membrana¹⁸.

Por otra parte, ha sido demostrado que los radicales libres se encuentran involucrados en la patogénesis de ciertas enfermedades¹⁹ entre las que se encuentran los desórdenes cardiovasculares. El conocimiento, caracterización y comparación de las diferentes propiedades antioxidantes de algunas drogas que actúan sobre el sistema o cardiovascular permiten el incremento del arsenal terapéutico.²⁰

Teniendo en cuenta que el tratamiento oral con D-003 a ratas redujo significativamente los niveles séricos de las enzimas marcadoras del daño cardíaco (LDH y CPK) en el modelo de isquemia y reperfusión cardíaca, así como que el D-003 incrementa los niveles de PgI₂ en suero y además posee un efecto antioxidante²¹, los resultados de este trabajo sugieren que el D-003 tiene un efecto potencial en la prevención del infarto del miocardio.

No obstante, estudios histológicos serán necesarios para corroborar la protección del daño.

REFERENCIAS

1. Karvonenev M.J. Prevention of cardiovascular disease among elderly. **Bull WHO**, **66**: 7-14, 1988.
2. González L., Marrero D., Laguna A., et al (Laboratorios DALMER S.A.). A mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax. CU Patente 35/97, 1997.
3. Molina V, Arruzazabala ML, Carbajal D, Más R and Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D-003. **Pharmacological Research**, **42**, 137-143, 2000.
4. Arruzazabala ML, Carbajal D, Más R, Molina V, Castaño G, Gámez R. Effects of D-003, a

New Compound Purified from Sugarcane Wax, on Platelet Aggregation in Healthy Volunteers: A Randomised, Double-Blind Study. **Clinical Drug Investigation**, 2002. (en prensa).

5. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Mas R. D-003 a potential antithrombotic compound isolated from sugar cane wax with effects on arachidonic acid metabolites. **Prost Leuk Essent Fatty Acids**, 2002. (En prensa).
6. Szekely-A; Heindl-B; Zahler-S; Conzen-PF; Becker-BF. S(+)-ketamine, but not R(-)-ketamine, reduces postischemic adherence of neutrophils in the coronary system of isolated guinea pig hearts. **Anesth Analg**, **88**, 1017-24, 1999.
7. Kuzuya T., Fuji H, Hoshida S., Kitabatake A, and Tada M. Neutrophil-induced myocardial cell damage and active oxygen metabolites. **Jpn Circ J**, **55**, 1127-31, 1991.
8. Lefer A.M., Campbell B., Scalia R., and Lefer D.J. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. **Circulation**, **98**, 1322-8, 1998.
9. Roberts R., and Ishikawa Y. Enzymatic estimation of infarct size during reperfusion. **Circulation**, **58** (Suppl 1), 183-89, 1983
10. Evans R.G., Val-Meijos J.E., Kulevich J., Fischer V.W., Meuller H.D. Evaluation of a rat model for assessing interventions to salvage ischemic myocardium: effects of ibuprofen and verapamil, **Cardiovasc Res**, **19**, 132-138, 1985.
11. Noll G. and Luscher T.F. The endothelium in acute coronary-syndromes. **Eur Heart J**, **19** (Suppl C), 30-38, 1998.
12. Prosdociami M., Finessoi M., Banzatto N., Zanetti A., Gaetano G. and Dejana E. Prostacyclin release in the coronary circulation during sustained stimulation *in vitro* and *in vivo* experimental

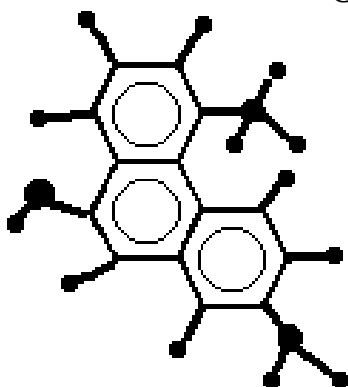
- systems. **Thrombosis and haemostasis**, **59**, 180-5, 1988.
13. Lefer A.M., Ogletree M.L., Smith J.B., Silver M.J., Nicolaou K.C., Barnette W.E. and Gasic C.P. Prostacyclin: a potentially valuable agent for preserving myocardial tissue in acute myocardial ischemia. **Science**, **200**, 52-54, 1978.
 14. Adderley S.R. and Fitzgerald D.J. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, **274**, 5038-46, 1999.
 15. Maulik M., Seth S.D., Manchanda S.C. and Maulik S.K. Lack of any additional benefit in combining aspirin with iloprost in a canine model of myocardial reperfusion injury. **Prostaglandins**, **53**, 291-303, 1997.
 16. Ueno Y., Miyauchi Y and Nishio S. Beraprost sodium protects occlusion/reperfusion injury in the dog by inhibition of neutrophil migration. **Gen Pharmacol**, **25**, 427-432, 1994.
 17. Tanaka H., Matsui S. and Shigenobu K. Cardioprotective effects of beraprost sodium against experimental ischemia and reperfusion as compared with propranolol and diltiazem. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, **99**, 321-7, 1998.
 18. Katircioglu S.F., Saritas Z., Ulus A.T., Yamak B., Yucel D. and Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. **Prostaglandins oth**
 19. **Lipid Mediat**, **55**, 51-65, 1998.
 20. Fejes S., Kery A., Blazovics A., Lugasi A., Lemberkovics E., Petri G. and Szoke E. Investigation of the *in vitro* antioxidant effect of Petroselinum crispum (Mill.) Nym. ex A. W. Hill. **Acta Pharm Hung**, **68**, 150-6, 1998.
 21. Silva J.M., Filipe P.M., Fernández A.C. and Manso C.F. Antioxidant effect of drugs used in cardiovascular therapy. **Rev Port Cardiol**, **17**, 495-503, 1998.
 22. Menéndez R, Más R, Amor AM et al. 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**, **12**, 1- 8, 2001

ANALISIS ELEMENTAL ORGANICO SERVICIO ANALITICO

La Dirección de Química del Centro Nacional de Investigaciones Científicas le brinda su servicio de Análisis Elemental Orgánico.

Composición cuantitativa de C, H, N, S y halógenos en moléculas orgánicas.

Calidad garantizada en los análisis.



Precios moderados:

USD

C/H (duplicado)	30.00
C/N (duplicado)	30.00
S (duplicado)	17.00
Cl, Br (duplicado)	17.00

Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa, Apartado postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfonos: 21 1235; 21 8066 ext. 294, E-mail: xray@infomed.sld.cu; marbot@quimica.cneuro.cu

