

Efectos del policosanol sobre las enzimas microsomales hepáticas en ratas Sprague Dawley

Idania Rodeiro, Celia Alemán, Rosa Más, Pilar Acosta, María Divina Rodríguez, Rafael Gámez, Maribel Rodríguez y Haydee García.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 10 de agosto de 1998. Aceptado: 29 de octubre de 1999.

Palabras clave: policosanol, enzimas microsomales hepáticas, ratas Sprague Dawley.
Key words: policosanol, hepatic drug metabolizing enzymes, Sprague Dawley rats.

RESUMEN. Se evaluaron los posibles efectos del policosanol, nueva droga con acción hipolipemiante, sobre algunas de las familias de las enzimas microsomales hepáticas de fase I en ratas Sprague Dawley. Durante 30 d los animales recibieron dosis orales de 250, 500 y 1 000 mg/kg de policosanol. Al finalizar el período de tratamiento, se sacrificaron y se les extrajo el hígado para la obtención de la fracción microsomal hepática. En las fracciones obtenidas, se determinó el contenido total del citocromo P-450, el citocromo b_5 y las actividades de las enzimas: citocromo c reductasa dependiente de NADPH, aminopirina desmetilasa, anilina hidroxilasa y la N-dimetilnitrosamina dealquilasa. Además, se evaluaron los efectos del producto sobre la biotransformación del benzo(a)pireno en la prueba de Ames, ensayo que fue empleado como un indicador de la actividad de la familia de isoenzimas P-450 1A. Los resultados permitieron demostrar que la administración oral del policosanol desde 250 hasta 1 000 mg/kg durante 30 d, no modifica el contenido de los citocromos P-450 y b_5 , ni la actividad enzimática de los sistemas estudiados en ratas. Estas determinaciones revelan la actividad de diferentes familias de citocromos que están involucrados en el metabolismo de muchos xenobióticos dentro de los que se encuentran compuestos mutagénicos y cancerígenos. Sin embargo, las fracciones procedentes de los animales del grupo control positivo tratados con fenobarbital y 5,6-benzoflavona, sí mostraron en todos los casos, las diferencias esperadas con respecto al control y a los grupos de tratamiento con policosanol.

ABSTRACT. The effects on drug-metabolizing enzymes (Fase I) in male Sprague Dawley rats of policosanol, a new drug with hypolipemic action, was evaluated. The animals were administered during 30 d with oral doses of policosanol (250, 500 y 1 000 mg/kg). At the end of the treatment they were put to sleep and their livers were used for obtaining the microsomal hepatic fraction. The total content of P450 and b_5 cytochromes, and the activities of the NADPH cytochrome c reductase, aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase and N-dimethylnitrosamine dealkylase were determined in each fraction. The effects of the product on the biotransformation of benzo(a)pyrene, as indicator of P-450 1A isoenzyme family, using the Ames test was also studied. The presented results demonstrate that policosanol administered orally from 250 to 1 000 mg/kg for one month not affect the activities of the hepatic drug metabolizing enzymes investigated in rats. These determinations represent the activity of different families of cytochromes, which are responsible for the metabolism of many xenobiotics like genotoxic and carcinogen agents. However, the fractions obtained from positive controls, animals treated with phenobarbital and 5,6-naphthoflavone, showed the expected significant differences with the control and the rest of the groups.

INTRODUCCION

El policosanol es una mezcla natural de alcoholes alifáticos primarios superiores que se aísla de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.) el cual inhibe la síntesis endógena del colesterol en una de las etapas comprendidas entre el consumo de acetato y la producción del ácido mevalónico a través de una modulación de la enzima HMG CoA reductasa y que incrementa el procesamiento receptor-dependiente de las LDL.^{1,2} Los efectos hipocolesterolemizantes del policosanol han sido demostrados en modelos experimentales,^{3,4} voluntarios sanos y pacientes con hipercolesterolemia tipo I y II.^{5,7}

Los estudios toxicológicos preclínicos realizados (agudos, subcrónicos y crónicos) no mostraron toxicidad relacionada con la droga.^{8,9} Tampoco, los estudios de mutagénesis tanto *in vitro* como *in vivo* evidenciaron posibles efectos genotóxicos sobre las células somáticas o germinales.¹⁰

Sin embargo, es conocida la importancia que tiene el estudio de los efectos de las drogas sobre el sistema microsomal hepático, tanto desde el punto de vista toxicológico^{11,12} como clínico.^{13,14} Aún cuando el policosanol no mostró toxicidad en los estudios preclínicos realizados, teniendo en cuenta que esta droga debe administrarse crónicamente a humanos, se decidió investigar sus posibles efectos sobre el sistema microsomal hepático.

El objetivo de este trabajo fue investigar si la administración de dosis orales de policosanol desde 250 hasta 1 000 mg/kg durante 30 d a ratas macho Sprague Dawley modifican la actividad de algunas de las familias de isoenzimas microsoma-les hepáticas involucradas en el metabolismo de muchas drogas y xenobióticos.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley adultas jóvenes (5 a 6 semanas) [Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba], cuyo peso corporal oscilaba entre 150 y 200 g.

Los animales se colocaron en jaulas (cinco ratas por jaula) y se adaptaron durante 7 d a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, la humedad relativa entre el 55 y 60 % y la iluminación durante 12 h. Se les administró pienso convencional para ratas (CENPALAB).

Dosificación y grupos experimentales

En el ensayo se utilizó policosanol en forma de suspensión en un vehículo goma acacia- H_2O (10 mg/mL), tween 20 al 0,4 %. Los animales fueron distribuidos a razón de 12 animales por grupo aleatoriamente en seis grupos experimentales:

- Control negativo (animales que no recibieron tratamiento).
- Control de vehículo.
- Control positivo (animales tratados vía intraperitoneal con compuestos inductores de la fracción microsomal hepática: fenobarbital 30 y 60 mg/kg y 5,6-benzoflavona 80 mg/kg vía intraperitoneal según el Protocolo No. 30 del INVITTOX, 1990.¹⁶
- Tres grupos tratados con policosanol: 250, 500 y 1 000 mg $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

El policosanol fue administrado en todos los casos por vía oral durante 30 d.

Obtención de la fracción microsomal hepática (S_9)

Al concluir el período de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y se procedió a la extracción del hígado para la obtención de la fracción microsomal hepática. Este fue lavado con KCl (0,15 mol/L). Después se tomaron 5 g de hígado por animal para obtener muestras cada tres animales en los diferentes grupos experimentales.

Las muestras de hígado fueron homogenizadas y centrifugadas a 9 000 g durante 10 min.

En una porción del sobrenadante obtenido, se determinó la actividad de las enzimas aminopirina desmetilasa y N-dimetilnitrosamina dealquilasa. La otra porción se centrifugó a 100 000 g durante 1 h. El sedimento resultante fue lavado y resuspendido en una mezcla constituida por Tris-HCl 0,1 mol/L, KCl 0,15 mol/L, EDTA 0,2 mmol/L. Todo el procedimiento experimental fue realizado a 4°C . Las fracciones obtenidas se conservaron a -80°C para su posterior utilización.

Indicadores bioquímicos analizados

Las proteínas totales fueron determinadas por el método de Lowry.¹⁶ En la fracción obtenida a 9 000 g fueron determinadas las actividades enzimáticas de la aminopirina desmetilasa y la N-dimetilnitrosamina dealquilasa¹⁷ y la anilina hidroxilasa.¹⁸ En la fracción obtenida a 100 000 g se determinaron: el contenido del citocromo P-450, el citocromo b_5 ¹⁹ y la NADPH citocromo c reductasa.²⁰

Para evaluar la biotransformación del benzo(a)pireno, indicador de la actividad de la familia A1, fue utilizado el ensayo de Ames.²¹ Se empleó la variante de incorporación en placas empleando la cepa TA38 de la bacteria *Salmonella triphumilium*. Como activadores metabólicos se utilizaron las diferentes fracciones obtenidas en cada grupo experimental.

Las dosis de benzo(a)pireno empleadas fueron: 10 y 20 mg/placa. Al finalizar el tiempo de incubación (48 h) se contaron las colonias revertantes por placa en un contador de colonias.

Análisis estadístico

Los resultados se compararon, utilizando el programa CSS, mediante la prueba t de Student, $p < 0,05$. En el análisis de los datos provenientes del ensayo de Ames, se utilizó la prueba no paramétrica de la U Mann-Whitney, $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

En este estudio se evaluaron los posibles efectos de la administración de dosis orales repetidas de policosanol hasta 1 000 mg/kg sobre la actividad del sistema microsomal hepático en ratas macho Sprague Dawley.

El policosanol no modificó significativamente el contenido de proteínas de la fracción microsomal procedente de animales tratados con respecto a los controles, lo que permite afirmar que el tratamiento no produce un aumento o disminución de la producción de las enzimas presentes en la fracción (Tabla 1).

Tampoco modificó la actividad de la citocromo c reductasa dependiendo del citocromo P-450, ni el contenido total de los citocromos P-450 y el b_5 , lo cual es un índice de que el producto no interfiere en el flujo de electrones a los citocromos.

Por otro lado, la determinación de la actividad aminopirina desmetilasa resulta un indicador de la función de la familia de citocromos P-450 3A²² y las actividades de las enzimas anilina hidroxilasa y N-dimetilnitrosamina dealquilasa son indicadores de la familia P-450 2E1.^{23,24}

Los resultados demostraron que el policosanol no afecta la actividad de estas familias de isoenzimas encargadas de la biotransformación de compuestos endógenos y muchos xenobióticos.

También fueron estudiados los efectos sobre la actividad de la familia de isoenzimas A1 empleando el ensayo de Ames²¹ en la bacteria *Salmonella typhimurium* (Tabla 2). En este caso, se utilizó la cepa TA38 y el benzo(a)pireno como sustrato. Este es metabolizado por esta familia de isoenzimas a compuestos con actividad mutagénica reconocida que reversion el carácter his⁻ de la bacteria a his⁺.

En ningún caso, la frecuencia de reversión observada a partir de las fracciones procedentes de los animales tratados con policosanol resultó significativamente diferente a la obtenida en los animales controles.

Como es conocido, el fenobarbital es un inductor de las familias de citocromos P-450 2A1, 2B y 3A, mientras que la 5,6-benzoflavona induce a las familias de isoenzimas P-450 1A1, 1A2 y 2A1.²⁵ Las fracciones obtenidas de ratas tratadas con estos inductores mostraron en todos los casos los cambios esperados en la actividad enzimática con respecto a los animales controles.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la administración de dosis orales de policosanol hasta 1 000 mg/kg durante 30 d a ratas Sprague Dawley no modifica la actividad del sistema de monooxigenasas hepáticas depen-

Tabla 1. Efecto de dosis orales repetidas de policosanól sobre el sistema microsomal hepático en ratas macho Sprague Dawley.

	Proteínas totales (mg/mL)	NADPH citocromo reductasa (nmol citocromo c · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	Citocromo P-450 (nmol/mg)	Citocromo b ₅ (nmol/mg)
Control (-)	24,0 ± 0,9	13,6 ± 2,5	0,37 ± 0,05	0,44 ± 0,04
Control (+)	29,8 ± 0,1*	29,2 ± 4,4*	1,78 ± 0,06*	0,76 ± 0,05*
Control vehículo	25,6 ± 0,4	15,6 ± 1,6	0,41 ± 0,04	0,48 ± 0,04
250 mg/kg	27,1 ± 3,2	17,7 ± 3,9	0,40 ± 0,04	0,53 ± 0,05
500 mg/kg	25,8 ± 2,8	15,1 ± 2,5	0,38 ± 0,05	0,51 ± 0,02
1 000 mg/kg	28,5 ± 3,8	14,2 ± 3,4	0,39 ± 0,02	0,43 ± 0,05
	Aminopirina desmetilasa (nmol formaldehído · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	N-dimetilnitrosamina dealkilasa (nmol p-aminofenol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	Anilina hidroxilasa (nmol p-aminofenol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	
Control (-)	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
Control (+)	0,42 ± 0,06*	0,14 ± 0,02*	0,22 ± 0,04*	
Control vehículo	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	
250 mg/kg	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	
500 mg/kg	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	
1 000 mg/kg	0,10 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,02	

(Media ± error estándar); *p < 0,05.

Tabla 2. Evaluación del efecto del policosanól sobre la actividad de las monooxigenasas hepáticas en el ensayo de Ames.

Fracción S ₉	Cepa TA38	
	10 µg/placa	20 µg/placa
S ₉ obtenida de animales no tratados.	22,0 ± 1,7	24,3 ± 0,6
S ₉ obtenida de animales inducidos.	47,0 ± 6,2*	77,3 ± 2,1*
S ₉ obtenida de animales administrados con vehículo.	19,7 ± 0,6	23,3 ± 0,6
S ₉ obtenida de animales tratados con 250 mg/kg.	18,3 ± 4,0	23,6 ± 0,6
S ₉ obtenida de animales tratados con 500 mg/kg.	21,3 ± 1,2	23,0 ± 1,0
S ₉ obtenida de animales tratados con 1 000 mg/kg.	20,3 ± 1,1	22,6 ± 0,6

dientes del citocromo P-450 evaluadas en este ensayo.

BIBLIOGRAFIA

- Menéndez R., Fraga V., Sotolongo V., Amor A., del Río A., González R., Jiménez S. y Más R. Efecto de la administración oral del policosanól sobre el metabolismo lipídico de ratas normocolesterolémicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 24, 16, 1993.
- Menéndez R., Fernández I., Del Río A., González R., Fraga V., Amor A., Jiménez S. and Más R. Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances LDL processing in cultured human fibroblasts. *Biological Research*, 27, 199, 1994.
- Arruzazabala L., Carbajal D., Más R., Illnait J. y Laguna A. Efectos del policosanól sobre el perfil lipídico de conejos normocolesterolémicos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 11, 80, 1992.
- Arruzazabala L., Carbajal D., Más R. y García M. Efectos del Ateroximol (PPG) sobre los niveles de colesterol en perros Beagle. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 22, 60, 1992.
- Hernández E., Illnait J., Castaño G. and Más R. Effect of Ateromixol (policosanól) on serum lipids and lipoproteins in healthy volunteers. *Current Therapeutic Research*, 51, 568, 1992.
- Pons P., Más R., Illnait J., Fernández L. and Fernández J.C. Efficacy and safety of Ateromixol (policosanól) in patients with primary hypercholesterolemia. *Current Therapeutic Research*, 53, 265, 1992.
- Aneiros E., Más R., Calderón B., Illnait J., Fernández L., Castaño G. and Fernández J.C. Effects of successive dose increase of policosanól on the lipid profile and tolerability of treatment. *Current Therapeutic Research*, 54, 304, 1993.
- Alemán C., Más R., Hernández C., Rodeiro I., Noa M., Menéndez R. and González R. Acute, subchronic, chronic toxicology of policosanól in rats. *Toxicology Letters*, 8th International Congress of Toxicology, 1992.
- Alemán C., Más R., Hernández C., Rodeiro I., Noa M., Menéndez R. and Jimenez S. A 12 month study of policosanól oral toxicity in Sprague Dawley rats. *Toxicology Letters*, 70, 77, 1994.
- Rendón A., Rodríguez M., Lopez M., Más R. and Fernández S. Policosanol: an study of its genotoxicity and teratogenicity in rodents. *Toxicology Letters*, 8th International Congress of Toxicology, 1992.
- Conney A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacological Reviews*, 19, 317, 1967.
- Parke D.V. Toxicological consequences of enzymes induction and inhibition. *Drug Toxicity*, 3, Taylor and Francis, London, 130-150, 1979.
- Hunter J. and Chasseaud L.F. *Progress in Drug Metabolism*, Wiley, London, 129-191, 1992.

14. Breckenridge A.M. and park B. Enzyme induction and inhibition. Comprehensive Medicinal Chemistry, 5, Pergamon, Oxford, 205-217, 1990.
15. FRAME. Invitox Protocol. The ERGATT/FRAME data bank of *in vitro* techniques in toxicology. The Ames test. No. 30, 1990.
16. Lowry O.H., Rosebrough J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Research*, 193, 265, 1951.
17. Weibel E.R., Staubli W., Gnagi H.R. and Hess F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on liver cell. *Journal Cell Biology*, 42, 68, 1969.
18. Imai Y and Sato R. A gel-electrophoretically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *Journal Biochemical*, 60, 417, 1966.
19. Omura T. and Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemo-protein nature. *Journal Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964.
20. Phillips A. and Langdon R. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization and kinetic studies. *Journal Biol. Chem.*, 237, 2652, 1962.
21. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. and Lee F.D. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Process Natural Academic Science*, 70, 281, 1973.
22. Bauer C., Corsi C., Paolini M. Stability of microsomal monooxygenases in murine liver S_9 fractions derived from phenobarbital and beta naphthoflavone induced animals under various long term conditions of storage. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 14, 13, 1994.
23. Van de Wiel J.A., Fijneman P.H., Teeuw K.B., Van Ommen B., Noordhoek J., Bos R.P. *Alcohol*, 10, 397, 1993.
24. Kwak M.K., Kim S.G., Kwak J.Y., Novak R.F., Kim N.D. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 expression by organosulfur compounds allylsulfide, allylmercaptan and allylmethylsulfide in rats. *Biochemical Pharmacology*, 47, 531, 1994.
25. Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biology*, 10, 1, 1991.

DIAGNOSTICO NEUROCOGNITIVO AUTOMATIZADO



DIANA

SISTEMA DE TAREAS PARA EL DIAGNOSTICO DEL COMPORTAMIENTO HUMANO NORMAL Y PATOLOGICO.

Una de las vertientes actuales en la investigación del funcionamiento del cerebro humano es la administración de tareas que evalúen las funciones cognitivas del individuo. Teniendo en cuenta las demandas y necesidades de los especialistas en este campo, NEURONIC pone a su disposición, este nuevo paquete de programas que incluye una amplia variedad de tareas y aplicaciones diseñadas con ese fin.

Características:

- Conserva lo peculiar y típico que distingue a cada una de las tareas cognitivas y neurofisiológicas incorporadas y ofrece, la mayor sencillez de operación y facilidad.
- Incluye 27 tareas o pruebas que exploran los seis principales dominios o sistemas de funciones cognitivas y algunas funciones afectivas.
- Ofrece una opción para configurar los parámetros básicos de administración (tiempo de presentación de los estímulos, intervalos entre estímulos, criterios de tolerancia para el tiempo de reacción, etcétera).
- Brinda posibilidades de administrar las tareas aisladamente o de configurarlas selectivamente en grupos.
- Posibilita definir sesiones de entrenamiento para la administración de cada tarea a partir de las instrucciones para la ejecución.
- Registra los parámetros relacionados con la calidad de la ejecución por ensayos y niveles de dificultad, así como los tiempos de reacción. Para cada tarea ofrece un resumen con la descripción estadística de los resultados.



Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal: 16041, La Habana, Cuba.
Teléfonos: (537) 33 6568, 21 7442, 21 7390. Fax: (537) 33 6707. Correo electrónico: neuronica@cneuro.edu.cu