

# Efectos del D-003 sobre daño endotelial inducido por citrato de sodio en ratas

**Sarahí Mendoza-Castaño, Miriam Noa-Puig, Rosa Mas-Ferreiro, Nora Canosa-Mas, Jorge E. González-Mesa y Eduardo Arango-Tirador.**

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. sarahi.mendoza@cnic.edu.cu

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aceptado: 2 de mayo de 2009.

Palabras clave: D-003, caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), ratas, endotelemia, células endoteliales, daño endotelial, citrato de sodio.  
Key words: D-003, sugar cane (*Saccharum officinarum* L.), rats, endothelemia, endothelial cells, endothelial damage, sodium citrate.

**RESUMEN.** El D-003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos superiores purificada de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con efecto hipolipemiente y antiagregante plaquetario, que disminuye las concentraciones plasmáticas de tromboxano  $B_2$  y aumenta las de prostaciclina, lo que indirectamente sugiere que el D-003 ejerce un efecto beneficioso sobre el endotelio vascular. Teniendo en cuenta que el número de células endoteliales circulantes en plasma (endotelemia) refleja indirectamente el daño endotelial, el objetivo de este estudio fue investigar el efecto del D-003 (5 a 200 mg/kg) sobre la endotelemia en ratas a las que se les indujo daño endotelial con citrato de sodio. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos: un control negativo, tratado solo con el vehículo y cinco grupos inyectados con citrato de sodio: uno tratado con el vehículo (control positivo) y cuatro con D-003 (5, 25, 100 y 200 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos (vehículo o D-003) se les administraron dosis únicas orales mediante entubación gástrica. La inyección de citrato de sodio incrementó significativamente el conteo de células endoteliales circulantes en plasma respecto al control negativo, mientras que el tratamiento con D-003 (5, 25, 100 y 200 mg/kg) disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) y de manera dosis dependiente estos valores en un 23,6; 35,4; 53,3 y 57,1 %, respectivamente. Estos resultados aportan nuevas evidencias de la acción protectora del D-003 sobre el endotelio vascular.

**ABSTRACT.** D-003 is a mixture of higher aliphatic fatty acids purified from the sugarcane wax (*Saccharum officinarum* L.) with cholesterol-lowering and antiplatelet effects that reduces the concentration of thromboxane  $B_2$  and increases those of prostacyclin in plasma, which indirectly suggests that D-003 produces a beneficial effect on the vascular endothelium. Taking into account that the number of plasma circulating endothelial cells (endothelium) indirectly reflects the endothelial damage, the aim of this study was to investigate the effect of D-003 (5 - 200 mg/kg) on the endothelemia in rats with sodium citrate-induced endothelial damage. Animals were randomly distributed into six groups: a negative control, treated only with the vehicle, and five groups injected with sodium citrate: one treated with the vehicle (positive control) and four with D-003 (5, 25, 100 and 200 mg/kg, respectively). Treatments (vehicle or D-003) were administered as oral single doses through gastric gavage. Sodium citrate injection increased significantly ( $p < 0,05$ ) the circulating endothelial cells count compared with the negative control, whereas the treatment with D-003 (5, 25, 100 and 200 mg/kg) decreased significantly ( $p < 0,05$ ) and dose-dependently these values by 23.6, 35.4, 53.3 and 57.1 %, respectively. These results provide new evidences of the protective effects of D-003 on the vascular endothelium.

## INTRODUCCIÓN

El endotelio ha sido reconocido como el principal regulador de la hemostasis vascular por su contribución en la regulación fisiológica del tono de los vasos sanguíneos. Esto se debe a la presencia de las células endoteliales (CE), que se encuentran estratégicamente ubicadas separando las células sanguíneas y la musculatura lisa vascular.<sup>1</sup> Las CE liberan sustancias vasoactivas que causan contracción o relajación, trombogénesis o fibrinólisis, activación o inhibición de las plaquetas. Por tanto, la integridad funcional del endotelio es esencial para el mantenimiento del flujo sanguíneo y la capacidad antitrombótica. La disfunción endotelial da lugar a la pérdida del equilibrio entre la capacidad de inducir la

relajación y la contracción vascular, lo cual representa la base del desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.<sup>2</sup> En tal sentido, existen múltiples factores que propician el daño endotelial, tales como la hipertensión arterial (HTA), hipercolesterolemia (HC), la diabetes, el tabaquismo, el estrés por fricción (*shear-stress*), entre otros, que propician el desarrollo de la disfunción arterial y sus consecuencias, tales como la aterosclerosis, proceso común subyacente de las enfermedades arteriales coronarias, cerebrales y periféricas.<sup>1-5</sup>

Además de los métodos que directamente evalúan la función endotelial,<sup>6-8</sup> existen indicadores indirectos fácilmente medibles que permiten evaluar el deterioro del endotelio vascular. El nivel de las carcacas de las

CE descamadas presentes en la circulación sanguínea (endotelemia) se reconoce como indicador indirecto del daño del endotelio vascular.<sup>2</sup> Entre los modelos experimentales utilizados con este fin, ha sido descrito que la administración de citrato de sodio *in vivo* produce daño endotelial y descamación del endotelio, de modo que las células endoteliales así liberadas (células endoteliales circulantes) se cuantifican como indicador del daño.<sup>9</sup>

El D-003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos superiores purificada de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cuyo principal componente es el ácido octacosanoico ( $C_{28}$ , 35,4 %), y que también contiene los ácidos: tetracosanoico ( $C_{24}$ , 0,5 %), pentacosanoico ( $C_{25}$ , 0,6 %), hexacosanoico ( $C_{26}$ , 2,8 %), heptacosanoico ( $C_{27}$ , 2,6 %), nonacosanoico ( $C_{29}$ , 1,6 %), triacontanoico ( $C_{30}$ , 17,2 %), hentriacontanoico ( $C_{31}$ , 1,0 %), dotriacontanoico ( $C_{32}$ , 7,9 %), tritriacontanoico ( $C_{33}$ , 1,0 %), tetratriacontanoico ( $C_{34}$ , 8,8 %), pentatriacontanoico ( $C_{35}$ , 0,4 %) y hexacotriacontanoico ( $C_{36}$ , 2,8 %).<sup>10</sup>

El D-003 posee efectos hipolipemiantes demostrados en estudios experimentales,<sup>11,12</sup> y clínicos,<sup>13-16</sup> caracterizados por una reducción de las concentraciones de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y del colesterol total (CT) y un aumento de las de colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), sin modificar los triglicéridos. La acción reductora del colesterol del D-003 es asociada a una inhibición de la síntesis de colesterol, mediante la regulación de la actividad de la enzima HMGCoA reductasa.<sup>17</sup>

Por otra parte, evidencias experimentales<sup>18,19</sup> y clínicas<sup>20-23</sup> sustentan los efectos como antiagregante plaquetario del D-003, que se relacionan con la reducción de las concentraciones plasmáticas de tromboxano  $B_2$  ( $TxB_2$ , metabolito estable del  $TxA_2$ , agente vasoconstrictor liberado por las plaquetas y el endotelio vascular), y el aumento marcado de las concentraciones de prostaciclina ( $PgI_2$ , agente vasodilatador liberado por el endotelio).<sup>19,21</sup>

Todos estos antecedentes indirectamente sugieren un efecto beneficioso del D-003 sobre el endotelio vascular, que fue demostrado en especies no roedoras. El D-003 redujo el número de células endoteliales circulantes (CEC) en plasma de perros y conejos.<sup>24</sup> No obstante, dado que la rata es la especie en que se ha sustentado el modelo del daño endotelial por citrato de sodio<sup>9</sup> y en la cual se han desarrollado los estudios de los efectos como antiagregante plaquetario del D-003, resulta importante obtener evidencias de su efecto protector sobre el endotelio en esta especie, por lo cual el objetivo del presente trabajo consistió en investigar el efecto del D-003 sobre las concentraciones de CEC en plasma de ratas después de un daño endotelial inducido por citrato de sodio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 48 ratas *Sprague Dawley* machos adultas jóvenes ( $160 \pm 20$  g), adquiridas en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) que se adaptaron durante 14 d a las condiciones del laboratorio, temperatura ( $25 \pm 2$ ) °C, humedad entre el 55 y 60 % e iluminación en ciclos de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para roedores preparado en el CENPALAB. Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento durante toda la experiencia.

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio y los lineamientos de Buenas Prácticas de Laboratorio de la República de Cuba.<sup>25</sup>

## Administración y dosificación

El D-003 fue suministrado por el Departamento de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales (Ciudad de La Habana, Cuba)<sup>26</sup> y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. Para su administración, el D-003 se suspendió en un vehículo tween 20 al 2 % en  $H_2O$  destilada.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos (8 animales/grupo): un control negativo, tratado solo con el vehículo y cinco grupos inyectados con citrato de sodio: uno tratado con el vehículo (control positivo) y cuatro con D-003 (5, 25, 100 y 200 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos (vehículo o D-003) se administraron como dosis únicas orales mediante entubación gástrica (1 mL/kg).

## Inducción experimental del daño endotelial

A las dos horas de administrado el D-003, las ratas recibieron una inyección de citrato de sodio (1,5 %, 2 mL) por la vena peneana. Transcurridos cinco minutos, se extrajo sangre de la vena cava abdominal y se realizó la cuantificación de CEC en plasma.<sup>9,27</sup>

## Cuantificación de células endoteliales

La cuantificación de las carcacas de las CEC en plasma se realizó según la técnica descrita por Hladovec y Rossman,<sup>27</sup> para lo cual se les extrajeron muestras de sangre de la vena cava abdominal. A la sangre se le añadió citrato de sodio al 3,8 % en relación 1 : 9 (v/v), se centrifugó a 395 g durante 20 min a 4 °C, con lo que se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP). A una alícuota de 1 mL de PRP se le añadieron 0,2 mL de ADP en una concentración de 1 mg/mL. La mezcla se agitó mecánicamente durante 20 min en posición horizontal y se centrifugó a 295 g durante 20 min a 4 °C con el objetivo de que sedimentaran las plaquetas agregadas. El sobrenadante así obtenido, se centrifugó nuevamente a 2 100 g durante 20 min a 4 °C para garantizar la precipitación de las CEC. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0,1 mL de disolución salina. Esta suspensión fue el punto de partida para el conteo de CEC.

Los conteos celulares se realizaron en la cámara de Fuchs Rosenthal en un microscopio Olympus BH2 (40x) y los resultados se expresaron como el valor promedio de cuatro conteos.

## Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de la U de Mann Whitney. Un  $\alpha = 0,05$  fue asumido *a priori* para la significación estadística.

El análisis de la relación dosis efecto se realizó utilizando la prueba de regresión lineal.

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de programas Statistica V. 6.

## RESULTADOS

La inyección de citrato de sodio incrementó significativamente la endotelemia respecto al control negativo (Tabla 1). El tratamiento con D-003 (5, 25, 100 y 200 mg/kg) la disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) y de manera dosis dependiente ( $R = 0,980\ 7$ ) en un 23,6; 35,4; 53,3 y 57,1 %, respectivamente.

## Discusión

El presente estudio demuestra que el tratamiento oral con dosis únicas de D-003 reduce de manera dosis dependiente el aumento de la endotelemia inducido por la inyección de citrato de sodio. El hecho de que esta

inyección haya aumentado significativamente la cantidad de CEC con respecto al control negativo sustenta la validez del modelo en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo y que los efectos del D-003 aquí referidos sean realmente atribuibles al tratamiento.

Estos resultados son consistentes con referencias previas de los efectos del D-003 sobre la hiperplasia intimal inducida en conejos,<sup>28</sup> ya que la disfunción endotelial es precisamente la etapa inicial del desarrollo del proceso aterosclerótico,<sup>1-5</sup> y con resultados en especies no roedoras que mostraron que el D-003 reducía la cantidad de CEC en perros y conejos,<sup>24,28,29</sup> sin que tal reducción resultara dependiente de las dosis.

El hecho de que en el presente estudio el efecto encontrado sea dosis dependiente refuerza que sea atribuible al tratamiento, a diferencia de los estudios previos, lo cual puede deberse quizás a diferencias entre los diseños experimentales empleados o simplemente a diferencias entre especies.

El presente estudio no tuvo como objetivo dilucidar los posibles mecanismos subyacentes en este efecto, ni aporta elementos en este sentido. No obstante, teniendo en cuenta que el presente estudio solo investigó los efectos de la administración aguda de D-003 y que los otros efectos de esta sustancia, demostrados con similar esquema de dosificación, se relacionan con su acción antiagregante plaquetaria y con el aumento de las concentraciones de prostaciclina y la reducción de las concentraciones de  $TxA_2$  y del cociente  $TxA_2$ /prostaciclina, lo que teóricamente produce una acción beneficiosa sobre el endotelio, es plausible concebir que ello constituya la base fisiológica de este efecto, ya que ha sido descrito que inhibidores de la síntesis del  $TxA_2$  (levamisol)<sup>30</sup> y antagonistas del  $TxA_2$  (lobenzarit)<sup>31,32</sup> disminuyen la cantidad de CEC.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con dosis orales únicas de D-003 (5 a 200 mg/kg) disminuye significativamente la endotelemia en ratas con daño endotelial inducido por citrato de sodio de modo dependiente de las dosis, lo que aporta nuevas evidencias de la acción protectora del D-003 sobre el endotelio vascular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blann A, Woywodt A, Bertolini F, *et al.* Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemos.* 2005;93:228-35.
- Boos Ch, Lip G, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1538-47.
- Sato Y. Current Understanding of the Biology of Vascular Endothelium. *Cell Struct Funct.* 2001;26(1):9-10.

- Rodríguez D, Valdemira F, Alvarez E, Rodríguez D. Arterial dysfunction and nonmodifiable coronary risk factors. *Correo Científico Médico de Holguín.* 2002;6(3).
- Blann A. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2004;33:256-61.
- Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic AS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of non-invasively-determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1769-75.
- Vita JA. Endothelial function and clinical outcome. *Heart.* 2005; 91(10):1278-9.
- Felmeden DC, Spencer CGC, Belgore FM, Blann AD, Beevers DG, Lip GY. Endothelial damage and angiogenesis in hypertensive patients: relationship to cardiovascular risk factors and risk factor management. *Am J Hypertension.* 2003;16(1):11-20.
- Casacó A, Carbajal D, Friman M, Noa M. Interference of levamisole with Forssman Shock. *Thromb Res.* 1990;59:629-37.
- Mas R. D-003. *Drugs of the Future.* 2004;29:773-86.
- Mendoza S. Efectos hipolipemiantes y antiosteoporóticos del D-003. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2007;38:31-2.
- Gámez R, Mendoza S, Mas R, *et al.* Dose-dependent cholesterol lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. *Curr Ther Res.* 2000;61:460-8.
- Castañó G, Mas R, Fernández L, Fernández JC, Illnait J, Gámez R, *et al.* Assessment of the effects of D-003, a new antiplatelet and lipid lowering compound in healthy volunteers. *Drugs R & D.* 2002;3:337-48.
- Castañó G, Menéndez R, Mas R, Ledón N, Fernández JC, Pérez Y, González RM. Effects of D-003, a new hypocholesterolemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. *Clin Drug Invest.* 2003;23:193-203.
- Castañó G, Mas R, Fernández L, Illnait J, Fernández J, Mendoza S, *et al.* Effects of D-003 on lipid profile of patients with Type II hypercholesterolemia: A Phase II clinical study. *Clin Drug Invest.* 2003;23:789-802.
- Castañó G, Mas R, Fernández L, Illnait J, Mendoza S, Gámez R *et al.* A comparison of the effects of D-003 and policosanol (5 and 10 mg/d) in patients with type II hypercholesterolemia: a randomized, double blinded study. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31:31-44.
- Menéndez R, Mas R, Amor AM, Rodeiro I, González RM, Alfonso JL. 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.
- Molina V, Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. *Pharmacol Res.* 2000;42:137-143.
- Molina V, Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R. D-003, a new compound with effects on arachidonic acid metabolites. *Prostagl Leuk Essent Fatty Acids.* 2002;67(1):19-24.
- Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Castañó G. Effects of D-003, a new compound purified from sugar cane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers. A randomised double-blind clinical study. *Clinical Drug Invest.* 2003;23:107-18.

**Tabla 1.** Efecto del D-003 sobre los valores de endotelemia en ratas.

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | CEC (células/mL de PRP) | Inhibición (%) |
|-------------|---------------|-------------------------|----------------|
| Control -   | —             | 277,34 ± 32,84**        | —              |
| Control +   | —             | 677,73 ± 32,20          | —              |
| D-003       | 5             | 517,57 ± 27,92*         | 23,6           |
| D-003       | 25            | 437,50 ± 26,41*         | 35,4           |
| D-003       | 100           | 361,32 ± 33,46*         | 53,3           |
| D-003       | 200           | 291,01 ± 46,50**        | 57,1           |

PRP Plasma rico en plaquetas. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 Comparación con el grupo control + (Prueba de la U de Mann Whitney). Los valores representan la media ± desviación estándar. ap < 0,05. Relación dosis-efecto (Prueba de regresión lineal).

21. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Fernández L, Mas R, Illnait J, *et al.* A randomised, double-blinded clinical study of the effects of policosanoic (D-003), a new substance purified from sugar cane wax, on platelet aggregation and plasma levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. *Int J Pharm Res.* 2004;24:55-63.
22. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Fernández L, Mas R, Castaño G, *et al.* Effects of D-003, a mixture of very long chain fatty acids purified from sugar cane wax, at 5 and 10 mg/d on platelet aggregation in healthy volunteers. *Int J Pharmacol Clin Res.* 2005;25:29-39.
23. Arruzazabala ML, Molina V, López E, Castaño G, Fernández L, Carbajal D, *et al.* Effects of D-003, a mixture of sugarcane wax acids, on platelet aggregation in hypercholesterolemic patients: a dose-titration, randomised, placebo-controlled trial. *Arzn Forsch Drug Res.* 2008;58:376-84.
24. Mendoza S, Noa M, Gámez R, Mas R. Efecto del D-003 sobre los niveles de endotelemia en no roedores. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2003;34:13-8.
25. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Cuban Code of Good Laboratory Practices. Regulation 39/04. Cuba: MINSAP; 2004.
26. González L, Marrero D, Laguna A, *et al.*, inventors; Laboratorios Dalmer, SA, assignee. A mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax. Cuba patent PAT CU 35/97.1997.
27. Hladovec J, Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb Res.* 1973;3:665-74.
28. Noa M, Mendoza S, Mas R. Effect of D003 on intimal thickening and circulating endothelial cells in rabbit cuffed carotid artery. *J Med Food.* 2005;8:237-41.
29. Mendoza S, Gámez R, Noa M, Mas R, Castaño G. The effects of D-003 and policosanol on the lipid profile and endothelial cells in normocholesterolemic rabbits: a head to head comparison. *Curr Ther Res.* 2001;62:209-20.
30. Arruzazabala ML, Carbajal D, García M. Levamisol: un inhibidor de la enzima tromboxano sintetasa. *Rev Iberoamericana de Trombosis y Hemostasis.* 1990;III:19-21.
31. Friman M, Noa M, Pauste H, Quintela A, Illnait J. Effect of CNIC-4 (lobenzarit) on circulating endothelial cells of rats. *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Research Diagnostics and Treatment. Proceedings of the 6th International Dresden Lipid Symposium; Dresden, Germany; 1988.*
32. Carbajal D, Milián V, González R y Arruzabala M de L. Estudio preliminar del ácido carboxifenilcloroantranílico como antagonista del tromboxano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 1990;21(2-3):165-167.