

Evaluación genotóxica del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones OF-1

Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Rafael Gámez Menéndez, Ariadne Gutiérrez Martínez, Balía Pardo Acosta, Miriam Noa Puig, Rosa Mas Ferreiro, Dayisell Curveco Sánchez, Haydeé García Cambián y Edy Goicochea Carrero.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba. Correo electrónico: rafael.gamez@cnic.edu.cu

Recibido: 4 de julio de 2008.

Aceptado: 18 de noviembre de 2008.

Palabras clave: D-004, *Roystonea regia*, células germinales, ratones OF-1, genotóxico.

Key words: D-004, *Roystonea regia*, germinal cells, OF-1 mice, genotoxic.

RESUMEN. El D-004, es un extracto hexánico obtenido del fruto de la palma real cubana (*Roystonea regia*), cuya actividad farmacológica ha sido demostrada en distintos modelos experimentales de hiperplasia prostática benigna (HPB). Para drogas con similar efecto como son el Saw palmetto y el Finasteride, se reportan efectos no deseados como la disminución del volumen de eyaculación. El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide constituye actualmente una herramienta muy útil para detectar daños en las células germinales masculinas. Por otro lado, es de fácil reproducción, asegura rapidez en la obtención de los resultados finales y resulta muy económico. Este estudio pretende determinar si el D-004 induce cambios en la frecuencia de aparición de formas anómalas en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones OF-1, tras su administración durante 8 semanas. Se formaron cuatro grupos de 10 animales cada uno: un grupo control disolvente y tres dosis de D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg), que se les administraron durante 5 d consecutivos en la semana. Los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de espermatozoides, ni en la frecuencia de espermatozoides normales y anormales entre los diferentes grupos. Además, no se evidenció mortalidad ni signos clínicos de toxicidad. Se pudo concluir que el D-004 administrado durante el período de espermatogénesis no presenta potencial genotóxico sobre las células germinales masculinas en ratón.

ABSTRACT. D-004, is a hexanic extract obtained from the fruit of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*), which has been pharmacology activity demonstrated in different experimental models of benign prostatic hyperplasia (BPH). Similar effects have Saw palmetto and Finasteride drugs, but they have non desirable's effects as well as the ejaculation volume diminution. At present the sperm morphology assay is a very useful instrument because it detects a damage on the germinal cells in male. This assay has an easy reproduction, it is rapid in obtaining the final results and very economic. This study seeks to determine if the same one induces changes in the frequency of appearance of anomalous forms in the head morphology of the sperm in mice OF-1, administered during 8 weeks. Four groups of 10 animals were treated, a group solvent control and three levels of dose of D-004 (500, 1 000 and 1 500 mg/kg). The the mice were administered in a range of five consecutive days per week. There were not any significant differences in the sperm concentration and frequency of normal and abnormal head shape of sperms among the different groups. Mortality and clinical signs of toxicity were not evidence. These results indicate that the D-004 administered during the period of spermatogenesis doesn't present genotoxic potential on the germinal cells in male mice.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un alargamiento de la fibra muscular y la estructura epitelial de la próstata, glándula masculina situada inmediatamente debajo de la vejiga que da lugar a la obstrucción del flujo urinario y a la aparición de un conjunto de síntomas del tracto urinario bajo (STUB).¹ Aunque la etiopatología de la HPB es multifactorial, los cambios hormonales que ocurren en el hombre que envejece, tales como el aumento en la actividad de la enzima 5 α -reductasa que transforma la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona

(DHT) parece desempeñar un papel fundamental, ya que la DHT, acumulada en la próstata, propicia la liberación de factores de crecimiento que conducen a la hiperplasia del tejido.^{2,3} Por otra parte, un aumento del tono del músculo liso de la próstata, mediado por un aumento de la contribución de los receptores α 1-adrenérgicos, es responsable de los STUB característicos de la HPB.^{4,5}

El D-004 es un extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*) perteneciente a la familia de las Palmáceas,⁶ que consiste en una mezcla de ácidos grasos primarios saturados de cadena lineal, entre 12 y 18 átomos de carbono.² El D-004 administrado por vía oral

ha demostrado efecto preventivo y terapéutico en el modelo de hiperplasia prostática (HP) inducida por testosterona en ratas, reduciendo el aumento del tamaño de la próstata y los cambios morfológicos característicos de la hiperplasia desarrollada.^{3,4} Por otra parte, el D-004 ha antagonizado las respuestas mediadas por los receptores α 1-adrenérgicos *in vitro* e *in vivo*.⁵ La administración oral de dosis únicas de D-004 (2 g/kg de peso corporal) no evidenció manifestaciones indicativas de toxicidad en ratas y conejos.^{7,8} Resultados consistentes fueron obtenidos en estudios de toxicidad oral por dosis repetidas de 90 d y 180 d en ratas Sprague Dawley (SPRD), en los que se administraron dosis de hasta 2 000 y 1 000 mg/kg p.c., respectivamente, sin detectarse toxicidad atribuible al D-004 y en los que se concluyó además, que las dosis mayores no producían efectos adversos detectables.⁷

Estudios previos empleando el ensayo de Ames, ensayo cometa y micronúcleos en ratones, demostraron que el D-004 no presenta potencial genotóxico.⁹⁻¹¹

El presente estudio se realizó tomando en consideración que el D-004 tiene una probada actividad terapéutica en los modelos de hiperplasia prostática benigna y que para drogas con similar efecto como son el Saw palmetto y el Finasteride, se reportan efectos no deseados como la disminución del volumen de eyaculación.¹²

Asimismo, pretendió determinar si el D-004 induce cambios en la frecuencia de aparición de formas anómalas en la morfología de la cabeza del espermatozoide, basados en la fácil reproducción del ensayo, la rapidez en la obtención de los resultados, su bajo costo y su provechosa utilidad para detectar daños en las células germinales masculinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones machos OF-1 adultos jóvenes (6 a 7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura (25 ± 2) °C, humedad relativa (60 ± 10) % y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie), fue *ad libitum*.

Administración y dosificación

El D-004 se suspendió en tween 65 (2 %) dos horas antes de la administración y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratones/grupo), cuatro grupos experimentales: un grupo control (tween 65 en H₂O 2 %) y tres tratados con D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg p.c.). Los tratamientos (D-004 y vehículo) se administraron mediante entubación gástrica (2 mL/kg p.c.) 5 d a la semana, en el horario de 10:30 a 11:30 a.m., durante un período de ocho semanas. La dosis menor de D-004 empleada fue 500 mg/kg, la cual ha demostrado ser efectiva en los modelos HP en roedores y dos niveles superiores submúltiplos de este (1 000 y 1 500 mg/kg p.c.).^{13,14}

Exámenes realizados

Observaciones clínicas, peso corporal y consumo de alimentos

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30 y 10:30 a.m. y en el horario de la tarde de 3:00 a 4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general

del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias y de los sistemas nervioso, cardiovascular y gastrointestinal; además, el estado de la piel, el pelo, la coloración de las mucosas y los ojos. El peso corporal se controló al inicio (peso del animal antes de comenzar el tratamiento activo) y semanalmente, mientras que el consumo de alimentos, dos veces a la semana durante toda la experiencia.

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical pasadas 24 h de la última administración. Se realizó la extracción de ambos epidídimos, los cuales se redujeron a pequeños fragmentos mediante unas tijeras y fueron depositados en placas Petri que contenían 2 mL de disolución isotónica de NaCl 0,9 %. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur.

Conteo de espermatozoides

El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25 %, transcurridos cinco minutos se realizó una dilución del homogenato tripsinizado en NaCl - formol 1 % (1 : 10) y se colocó en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó en ambos lados de la cámara al microscopio.^{15,16}

Morfología del espermatozoide

Al tubo que contenía la dilución del homogenato ya diluido, se le añadieron cinco gotas de eosina 1 % y se le dejó reposar por cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto. Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana y sin gancho, así como espermatozoides con dos colas.^{15,17}

Necropsia y exámenes histopatológicos

Se sometieron a este estudio todos los animales, se examinó el contenido de las cavidades abdominal, torácica y craneana. Se pesaron la próstata, los testículos y los epidídimos antes de tomarse muestras, las cuales se fijaron en formaldehído 10 %, estabilizado y posteriormente, fueron incluidas en parafina, seccionadas y coloreadas con hematoxilina y eosina para su análisis en un microscopio Olympus BH-2. Los criterios que se utilizaron en el examen histopatológico correspondieron a la observación de los posibles daños en el epitelio germinativo testicular, epididimario, estroma y glándulas de la próstata.

Análisis estadístico

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza. Los resultados se distribuyeron normalmente (normalidad, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov). Se comprobó la dependencia entre las observaciones y que presentaban homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por lo cual, todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación, establecido fue α 0,05. Todos los análisis se realizaron mediante el paquete de programas estadísticos Statsoft for Windows, StatSoft, Inc. (2003), STATISTICA V. 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No ocurrieron muertes ni manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad en ninguno de los grupos

tratados con D-004 a ningún nivel de dosis. El análisis estadístico no mostró diferencias en el peso corporal (Tabla 1) y el consumo de alimento entre animales tratados y controles.

La relación peso de órgano/peso corporal no se afectó por el tratamiento con D-004 para los órganos estudiados (próstata, testículos y epidídimos) a ningún nivel de dosis (Tabla 2). De igual modo, no se encontraron lesiones macroscópicas o microscópicas en estos órganos en ninguno de los grupos estudiados.

En el análisis del conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer se apreció que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los tratados con D-004 en cuanto a la concentración de espermatozoides (Tabla 3), lo cual indica que el producto no ejerce influencia en la fase de producción y maduración de los espermatozoides. En todos los grupos tratados, se encontraron cantidades aceptables de espermatozoides

en igual volumen. Al analizar el promedio de espermatozoides normales y anormales conjuntamente con los que presentan las diferentes formas anómalas, tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los tratados con D-004 (Tabla 4), hecho que subraya la inocuidad genotóxica del D-004 sobre las células germinales masculinas. El esquema de tratamiento utilizado permitió estudiar las células que durante la diferenciación y el desarrollo estuvieron en contacto con el extracto en estudio o sus metabolitos.¹⁷ Durante la necropsia y el análisis histopatológico no se encontró ningún hallazgo indicativo de lesión o daño tanto en controles como en los tratados con D-004.

Los resultados negativos obtenidos en este ensayo demuestran que el extracto estudiado no interfiere en ninguna de las etapas del proceso de diferenciación de las células germinales de ratones en ninguna de las dosis estudiadas.

Tabla 1. Peso corporal de ratones OF-1.

| Grupo | Dosis (mg/kg) | Peso inicial (g) | Peso final |
|---------|---------------|------------------|--------------|
| Control | — | 27,91 ± 2,01 | 33,20 ± 2,20 |
| D-004 | 500 | 27,90 ± 1,68 | 31,57 ± 1,78 |
| D-004 | 1 000 | 27,91 ± 1,59 | 31,77 ± 2,28 |
| D-004 | 1 500 | 27,92 ± 1,56 | 31,55 ± 1,69 |

n.s, $p \geq 0,05$ Comparación con el control (ANOVA). Los resultados se expresan como X media ± desviación estándar.

Tabla 2. Efecto del D-004 sobre el peso de órganos.

| Peso relativo de los órganos ^a | | | | | | | |
|---|---------------|----|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Grupo | Dosis (mg/kg) | n | Peso | | Testículo | | |
| | | | sacrificio | Próstata | Derecho | Izquierdo | Epidídimos |
| Control | — | 10 | 32,87 ± 2,40 | 0,05 ± 0,02 | 0,35 ± 0,03 | 0,34 ± 0,05 | 0,26 ± 0,04 |
| D-004 | 500 | 10 | 29,86 ± 2,67 | 0,05 ± 0,02 | 0,38 ± 0,04 | 0,37 ± 0,06 | 0,27 ± 0,06 |
| D-004 | 1 000 | 10 | 30,98 ± 2,67 | 0,04 ± 0,01 | 0,32 ± 0,10 | 0,35 ± 0,06 | 0,26 ± 0,05 |
| D-004 | 1 500 | 10 | 30,79 ± 2,37 | 0,05 ± 0,01 | 0,35 ± 0,07 | 0,33 ± 0,06 | 0,26 ± 0,06 |

¹(Peso órgano/Peso corporal en el día del sacrificio) x 100. n.s, $p \geq 0,05$ Comparación con el control (ANOVA). Los resultados se expresan como X media ± desviación estándar.

Tabla 3. Efecto del D-004 en la concentración de espermatozoides.

| Grupo | n | Dosis (mg/kg) | Concentración ¹ (células/mL) ($\cdot 10^6$) |
|---------|----|---------------|--|
| Control | 10 | — | 1,92 ± 0,36 |
| D-004 | 10 | 500 | 1,79 ± 0,19 |
| D-004 | 10 | 1 000 | 1,77 ± 0,30 |
| D-004 | 10 | 1 500 | 1,81 ± 0,22 |

¹Concentración en millones de espermatozoides ($\cdot 10^6$) células/mL. n.s, $p \geq 0,05$ Comparación con el control (ANOVA). Los resultados se expresan como X media ± desviación estándar.

Tabla. 4. Efecto del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

| Grupo | Dosis (mg/kg) | Normales | Anormales | Amorfos | Bananas | Sin gancho | Dos colas |
|---------|---------------|----------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Control | — | 475,40 ± 4,64 | 24,60 ± 4,64 | 13,10 ± 4,45 | 1,25 ± 0,54 | 10,00 ± 2,58 | 0,25 ± 0,26 |
| D-004 | 500 | 473,60 ± 8,38 | 26,40 ± 8,38 | 13,25 ± 5,68 | 1,80 ± 1,74 | 11,15 ± 3,87 | 0,20 ± 0,26 |
| D-004 | 1 000 | 473,20 ± 7,13 | 26,80 ± 7,13 | 13,10 ± 3,63 | 1,35 ± 0,91 | 12,30 ± 5,27 | 0,05 ± 0,16 |
| D-004 | 1 500 | 470,40 ± 10,11 | 29,60 ± 10,11 | 16,45 ± 5,78 | 2,10 ± 1,17 | 10,90 ± 5,73 | 0,15 ± 0,34 |

Determinaciones en 500 células/animal. n.s, $p \geq 0,05$ Comparación con el control (ANOVA). Los resultados se expresan como X media ± desviación estándar.

CONCLUSIONES

La administración oral de dosis repetidas de D-004 (500, 1 000 y 1 500 mg/kg p.c.), durante ocho semanas a ratones OF-1 no indujo afectaciones en cuanto a mortalidad, observaciones clínicas, peso corporal, consumo de alimentos, peso de los órganos sexuales y su análisis histopatológico.

El D-004 administrado por vía gástrica durante un ciclo espermatogénico completo no ocasionó cambios en la concentración de espermatozoides, ni incrementó la frecuencia de formas anómalas. Estos resultados permiten plantear que el D-004 no presenta actividad genotóxica sobre las células germinales masculinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Madsen B. Benign prostatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. **Curr. Opinion Neprol. Hypert.**, 5, 455, 1995.
- Laguna A and Rodríguez E. (Assignees Laboratorios DALMER S.A) 2003. Pharmaceutical composition and procedure for the prevention and treatment of prostate hyperplasia and prostatitis obtained from the fruits of *Roystonea regia* (Cuban royal palm). (CUB Pat/2003).
- Arruzazabala M.L., Carbajal D., Mas R., Molina V., Rodríguez E. and González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. **Drugs Exp. Clin. Res.**, 30, 227, 2004.
- Noa M. and R Mas. Effect of D004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. **Int. J. Tissue Reaction.**, 27, 203, 2005.
- Arruzazabala M.L., Mas R., Carbajal D. and Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. **Drugs R.D.**, 6, 281, 2005.
- Roig J.T. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. Ed. Científico Técnica, Cuba, 703, 1991.
- Gámez R., Mas R., Noa M., Menéndez R., García H., Rodríguez Y., *et al.* Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, 31, 101, 2005.
- Gutiérrez A., Gámez R., Mas R., Noa M., Pardo B., Goicochea E., *et al.* Toxicología aguda del D-004 en conejos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 38, 99, 2007.
- Gutiérrez A., Marrero G., Gámez R., Fernández I., Curveco D. y García H. Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 36, Número Especial, 2005.
- Marrero G., Gutiérrez A., Gámez R., Pardo B. y Curveco D. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa). **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 38, 200, 2007.
- Gutiérrez A., Fernández I., Gámez R., y García H. Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 36, Número Especial, 2005.
- McGuffin M., Hobbs C., Upton R. and Goldberg A. American Herbal Product Association's Botanical Safety Handbook., eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 107, 1997.
- Boyle P., Gould A.L. and Roehrborn C.G. Prostate volume predicts outcome of treatment of benign prostatic hyperplasia with finasteride: meta analysis of randomized clinical trials. **Urology**, 48, 398, 1996.
- Small J.K., Bombardelli E. and Morazzoni P. *Serenoa repens* (Bartram). **Fitoterapia**, 68, 99, 1997.
- Wyrobek A.J. and Bruce W.R. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection., United Kingdom edition published, second edition, Vol. 2, England, 135, 1978.
- Kempinas W.G. and Lamano-Carvalho, T.L. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. **Lab. Animals**, 22, 154, 1998.
- Mitchell A.D. Genetic Toxicology Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook. Ed. Gad S.C.; Marcel Dekker, Inc. U.S., 167, 1999.