

## **EFFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DEL D-005 EN EL MODELO DEL GRANULOMA INDUCIDO POR ALGODÓN EN RATAS**

**Ambar, Oyarzábal Yera<sup>1</sup>, Sandra, Rodríguez Salgueiro<sup>1</sup>, María Flavia, Pérez<sup>1</sup>, Giselle, Breña<sup>1</sup>, Laura, Cabrera<sup>1</sup>, José A. Medina<sup>1</sup>, Vivian, Molina Cuevas<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Productos Naturales, Dirección de Investigación, Desarrollo e innovación, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

e-mail: [ambar.oyarzabal@cnic.cu](mailto:ambar.oyarzabal@cnic.cu)

### **Resumen**

**Introducción:** La inflamación crónica constituye un factor etiológico importante en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades crónicas. El D-005, extracto lipídico obtenido del fruto de la palma corajo (*Acrocomia crispera*), ha mostrado efectos antiinflamatorios *in vitro* e *in vivo* en estudios previos. **Objetivo:** Evaluar los efectos de la administración de dosis orales repetidas de D-005 en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas. **Materiales y métodos:** Se emplearon ratas machos Sprague-Dawley, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, las cuales se distribuyeron en siete grupos de 10 ratas/grupo. A todos los animales se les implantaron subcutáneamente dos pellets de algodón estéril en las regiones axilar e inguinal. Los tratamientos: vehículo (Tween 65/H<sub>2</sub>O), D-005 (5, 25, 50, 100 y 200 mg/kg) y aspirina (150 mg/kg) se administraron por vía oral durante 6 días. Una vez concluido el tratamiento se extrajeron los dos granulomas y se emplearon para el análisis del peso húmedo y seco y para la determinación de la densidad de neutrófilos en el tejido granulomatoso. **Resultados:** El D-005 (5-200 mg/kg) redujo moderada y significativamente el peso húmedo y seco del granuloma, así como el edema, respecto al grupo control, desde la dosis menor ensayada siendo el efecto sobre el peso húmedo y el edema dependiente de la dosis. La aspirina, empleada como sustancia de referencia, también mostró efectos antiinflamatorios.

**Conclusiones:** La administración de dosis orales repetidas de D-005 redujo significativamente el peso del granuloma y la infiltración de neutrófilos en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas.

## **Introducción**

La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente, y desencadenada por la activación conjunta de macrófagos y células endoteliales que resulta beneficiosa si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores.<sup>1,2</sup>

El proceso inflamatorio se clasifica de acuerdo a la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria en agudo o crónico. La inflamación aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por la respuesta de las células de la inmunidad innata, las cuales persisten solamente por cortos periodos de tiempo. Durante la inflamación aguda se produce una fase transitoria que se caracteriza por una vasodilatación local y un aumento de la permeabilidad capilar que permite el exudado de fluidos plasmáticos y una fase tardía que se caracteriza por la infiltración de leucocitos, predominantemente neutrófilos y macrófagos hacia el foco inflamatorio. Sin embargo, la persistencia del proceso inflamatorio conduce a la inflamación crónica; la cual se caracteriza por ser una respuesta de duración prolongada (semanas, meses e incluso años) y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos en el sitio de la lesión, aunque también participan eosinófilos, mastocitos, linfocitos y neutrófilos. La proliferación de vasos sanguíneos y la presencia de fibrosis y necrosis tisular son procesos que también caracterizan esta fase.<sup>3,4</sup>

Los procesos inflamatorios se encuentran involucrados en el desarrollo de diversas enfermedades de evolución crónica como la artritis reumatoide, aterosclerosis, osteoartritis, diabetes, entre otras, que afectan la calidad de vida de quienes la padecen, por lo que representan un problema de salud a nivel mundial.<sup>3,5,6</sup>

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) se encuentran entre los medicamentos prescritos más utilizados para tratar la inflamación, dolor y edema, así como también

en la osteoartritis, artritis reumatoide y trastornos musculoesqueléticos. Esta clase heterogénea de fármacos incluye la aspirina, indometacina, naproxeno, ibuprofeno y otros agentes inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), selectivos o no.<sup>7</sup> No obstante, su uso se encuentra asociado a reacciones adversas siendo las más frecuentes las de tipo gastrointestinal, aunque es cada vez más común encontrar complicaciones cardiovasculares como eventos tromboembólicos, infarto del miocardio y eventos cerebrovasculares.<sup>8,9</sup>

El modelo experimental clásico en el cual se produce un proceso inflamatorio crónico y que permite la evaluación de fármacos con posibles efectos antiinflamatorios es el del granuloma por algodón en ratas.<sup>10,11</sup>

El D-005, extracto lipídico saponificado obtenido del fruto de *Acrocomia crispera*, (Arecaceae, fam), palma endémica de Cuba, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, laúrico y mirístico mientras el palmitoleico, caprílico, cáprico, y esteárico se encuentran en menores concentraciones.<sup>12</sup>

El D-005 inhibe *in vitro* las actividades enzimáticas de la 5-lipooxigenasa (5-LOX) y la COX de manera significativa y dependiente de la dosis, mediante un mecanismo incompetitivo.<sup>13</sup> Asimismo, ha mostrado efectos antiinflamatorios *in vivo* en dos modelos de daño pulmonar agudo inducidos por ácido oleico y por lipopolisacáridos (LPS) en ratones. En el primero, la administración de dosis orales únicas y repetidas de D-005 redujo la infiltración de neutrófilos y disminuyó la actividad enzimática de la mieloperoxidasa. En el modelo de LPS, dosis orales únicas de D-005 disminuyeron la infiltración de neutrófilos y el engrosamiento alveolar.<sup>14,15</sup>

### **Objetivo**

Evaluar el efecto de la administración de dosis orales repetidas de D-005 en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas.

### **Materiales y métodos**

Animales: Se utilizaron ratas Sprague Dawley (200-250 g) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, La Habana) las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones habituales del laboratorio con temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60,0 ± 5,0 %, ciclos

de luz/oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y la comida (pienso estándar para roedores procedente del CENPALAB).

Los animales se identificaron mediante pinceladas de solución de ácido pícrico y para el sacrificio se anestesiaron previamente en atmósfera de halotano y posteriormente se desangraron por la aorta abdominal.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas establecidas en la "Guía Ética para el Manejo de Animales de Laboratorio" (La Habana, Cuba, 1992) y los principios éticos para el uso de animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba, "Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos 039/2004" (CECMED, 2004); así como los aspectos específicos plasmados en el Manual de Calidad y los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Centro de Productos Naturales (CPN) perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

#### Sustancias de estudio y/o referencia

El D-005 (Lote: S080316; Laboratorio de Química Farmacéutica, CPN, CNIC, La Habana, Cuba) se administró en forma de suspensión en Tween 65/H<sub>2</sub>O (2 %) (Vehículo) mientras que la aspirina (sustancia de referencia) se administró en forma de disolución en goma acacia al 1 %.

#### Administración y dosificación

Tras culminar la cuarentena, las ratas se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos (10 ratas/grupo) a las cuales se les indujo la inflamación: un control tratado con el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O (vo), cinco grupos con D-005 (5, 25, 50, 100 y 200 mg/kg) y uno con aspirina (150 mg/kg).

Las dosis de D-005 se seleccionaron teniendo en cuenta resultados previos, mientras que la dosis de aspirina (150 mg/kg) ha resultado efectiva en este modelo de inflamación crónica.<sup>15,17</sup>

#### Diseño experimental

##### Inducción del granuloma por algodón

Las ratas se anestesiaron con tiopental sódico (30 mg/kg, ip) y se les realizó una incisión en la mitad dorso lateral creando un túnel subcutáneo mediante pinzas romas donde se colocaron dos pellets de algodón estéril de 50 mg de peso, uno

hacia la región axilar y el otro hacia la región inguinal.<sup>6</sup> Posteriormente, la herida se suturó y se le aplicó un antiséptico local.

Al día siguiente de la inducción del daño, se formaron aleatoriamente los grupos experimentales y los animales se administraron con los tratamientos (vehículo, D-005 y aspirina) durante 6 días. Un día después de la última administración, los animales se sacrificaron en atmósfera de halotano y se extrajeron los granulomas cuidadosamente. Uno de ellos se utilizó para el análisis del peso húmedo y seco y el otro se suspendió en formaldehído tamponado al 10%, se deshidrató, se incluyó en parafina y se coloreó con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico.

#### Variables analizadas

- **Peso del granuloma:** Para la determinación del peso húmedo de los granulomas, una vez extraídos del animal, se pesaron en una balanza analítica. El peso del pellet de algodón (50 mg) se sustrajo del peso del granuloma húmedo. Para la determinación del peso seco los granulomas se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 horas hasta alcanzar un peso constante. El peso del pellet de algodón se sustrajo del peso seco. El porcentaje de inhibición se expresó tomando como referencia el peso del granuloma del grupo control.
- **Análisis histopatológico:** Se realizó un conteo de neutrófilos en el tejido conectivo localizado entre el área necrótica y el tejido muscular.<sup>18</sup> Para esto, se obtuvieron imágenes de cinco campos histológicos por animal mediante una cámara digital Canon EOS 1000 D#2 acoplada a un microscopio óptico Zeiss Primo Star, utilizando una magnificación de 64 X. Se calculó la densidad de neutrófilos en cada imagen y el resultado se expresó como número de células/mm<sup>2</sup>.

#### Manejo de datos y Análisis Estadístico

Las comparaciones con el control se realizaron mediante el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. A priori se fijó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete comercial Statistic para Windows (Release 4.2, Stat Soft, Inc USA).

El análisis de la relación dosis/efecto se realizó mediante el método regresión lineal y correlación utilizando el programa Origin 8.0.

## **RESULTADOS**

La Tabla 1 muestra los efectos del D-005 (5-200 mg/kg) sobre el peso del granuloma y el edema inducido por el pellet de algodón. El D-005 desde la dosis

menor ensayada inhibió de modo significativo y moderado el peso húmedo y seco del granuloma, así como el edema, respecto al grupo control. El efecto sobre el peso húmedo ( $r=0,9811$ ;  $p=0,003$ ) y el edema ( $r=0,9785$ ;  $p=0,003$ ) fue dependiente de la dosis. La aspirina, empleada como sustancia de referencia, también inhibió moderada y significativamente las tres variables analizadas.

Los efectos del D-005 sobre la densidad de neutrófilos presentes en el granuloma se muestran en la Tabla 2. En el grupo control, el tejido granulomatoso presentó infiltración de neutrófilos, algunos macrófagos, abundantes linfocitos y algunas células plasmáticas. Se observó una alta densidad de neutrófilos, con predominio de neutrófilos con núcleo en banda, aunque también se observaron neutrófilos con núcleo segmentado. La aspirina, como sustancia de referencia, disminuyó la densidad de neutrófilos. Los tratamientos con D-005 (5-200 mg/kg) disminuyeron significativamente las células inflamatorias en el tejido granulomatoso, respecto al grupo control. El efecto se observó desde la dosis más baja evaluada (5 mg/kg) y alcanzó más de un 70 % de inhibición desde la dosis de 25 mg/kg.

## **DISCUSIÓN**

El modelo del granuloma por algodón, ha sido empleado ampliamente para la evaluación de sustancias con efectos antiinflamatorios por ser un modelo clásico de inflamación crónica.<sup>6,10,11</sup> En este sentido, se observó que el implante subcutáneo del pellet de algodón en ratas indujo la formación del granuloma, con la consecuente formación de edema, en los animales del grupo control, y que este fue revertido por la aspirina, AINE empleado como sustancia de referencia.<sup>15-17</sup>

Además, se observó presencia de neutrófilos en el tejido granulomatoso de los animales del grupo control, lo que se corresponde con reportes previos en los cuales se demuestra que durante la inflamación se producen subpoblaciones de neutrófilos de baja densidad, constituidas por neutrófilos inmaduros (con núcleo en banda) y neutrófilos maduros (con núcleo segmentado), a las que se le han atribuido propiedades inmunosupresoras en humanos y en ratones.<sup>18-21</sup> La aspirina disminuyó significativamente la presencia de neutrófilos acorde a sus efectos antiinflamatorios. Estos resultados corroboran la validez del modelo en nuestras condiciones experimentales.

El D-005 produjo un efecto significativo pero moderado sobre el peso del granuloma y el edema. Si bien, estos efectos resultaron moderados, es de destacar que su

efecto sobre la infiltración de neutrófilos fue marcado y superior al de la aspirina, lo cual se corresponde con la inhibición de la actividad enzimática de la 5-LOX que reduce la formación de leucotrieno B<sub>4</sub>, un potente agente quimiotáctico de neutrófilos.

Teniendo en cuenta los efectos del D-005 aquí demostrados resulta lógico suponer que su acción está mediada por efectos sobre las diferentes fases que se producen en este modelo (exudativa, transudativa y proliferativa), lo cual concuerda con su perfil de acción dual sobre las enzimas COX y 5-LOX.<sup>13</sup> Esta inhibición dual también explica, al menos en parte, su moderado efecto antiinflamatorio ya que esta característica hace que no presente un efecto anti-inflamatorio superior al de los AINE clásicos o a los inhibidores selectivos de la COX-2, pero sí hace que muestren un mejor perfil de seguridad y tolerabilidad.

Este resultado constituye una evidencia del beneficio potencial del D-005 para el tratamiento de diferentes patologías que involucren en su desarrollo y progresión un proceso inflamatorio crónico.

## **CONCLUSIONES**

La administración de dosis orales repetidas de D-005 redujo significativamente el peso del granuloma y la infiltración de neutrófilos en el modelo del granuloma inducido por algodón en ratas.

## **REFERENCIAS**

1. Kunnumakkara AB, Sailo BL, Banik K, Harsha Ch, Prasad S, Chandra Gupta S, Chandra Gupta A, Aggarwal BB. J Transl Med. 2018; 16:14.
2. Abudukelimu A, Barberis M, Redegeld FA, Sahin N and Westerhoff HV. Predictable Irreversible Switching Between Acute and Chronic Inflammation. Front. Immunol. 2018; 9:1596.
3. Kumar V, Abbas A, Aster JC. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 9na Edición. Elsevier España, 2015.
4. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi Sh, Norhaizan ME, Kumar SS. Role of antioxidants and natural products in inflammation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity; 2016.

5. Emelyanov A., Fedoseev G., Krasnoschekova O. et al. Treatment of asthma with lipid extract of New Zealand green-lipped mussel: a randomised clinical trial. *Eur Resp J* 2002; 20(3): 596-600.
6. Niknami M., Vignarajan S., Yau M., et al. Decrease in expression of activity of cytosolic phospholipase A2alpha increases cyclooxygenase-1 action: A cross-talk between key enzymes in arachidonic acid pathway in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1801(7): 731-737.
7. Batlouni M. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(4):538-46.
8. Machado JE, Alzate V, Echeverri L. Estudio Farmacoepidemiológico de uso de Antiinflamatorios No Esteroideos en pacientes de alto riesgo cardiovascular. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013: 626-9.
9. Oscanoa-Espinoza TJ. Seguridad de los anti-inflamatorios no esteroideos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015: 172-9.
10. Muthuraman A, Sood S, Kumar SS. The antiinflammatory potential of phenolic compounds from *Embllica officinalis* L. in rat. *Inflammopharmacol.* 2011; 19: 327-334.
11. Nair V, Kumar R, Singh S, Gupta YK. Investigation into the anti-inflammatory and antigranuloma activity of *Colchicum luteum* Baker in experimental models. *Inflammation* 2012; 35:881-8.
12. González VL; Sierra R; Mas R; Pérez Y; Oyarzabal A; Rodríguez E; Molina V; Gámez R. Compounds from the fruits of *Acrocomia crispera* and *Acrocomia aculeata* for use against oxidative stress and inflammation. Patent WO 2013189467 <http://www.google.com/patents/wo2013189467A2>
13. Pérez Y, Oyarzábal A, Sierra R, Mas R, Molina V, Jiménez S, González V. Inhibition of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) by D-005 (A lipid extract of *Acrocomia crispera* fruits). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2017;16 (3): 319-328
14. Mena L., Oyarzábal A., Fernández L., Molina V., Zamora Z., Merino N., Rodriguez S., Jiménez S., Medina JA. Efectos del D-005, extracto lipídico del fruto de *Acrocomia crispera*, sobre el daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico en ratones. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 2019; 50 (1), 62-80.
15. Mena L., Sierra R., Valle M., Molina V., Rodriguez S., Merino N., Zamora Z., González V., Medina JA. *Acrocomia crispera* fruits lipid extract prevents LPS-induced

acute lung injury in mice. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2019; 18 (1): 16 – 26.

16. Carbajal D, Molina V, Valdés S, et al. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostagl. Leukotr. Essent. Fatty Acids* 1998; 59 (4): 235-238.

17. Vivian Molina, Yazmín Ravelo, Daisy Carbajal, Rosa Más and María de Lourdes Arruzazabala. Anti-inflammatory and Gastric Effects of D-002, Aspirin and Naproxen and their Combined Therapy in Rats with Cotton Pellet-Induced Granuloma. *Lat J Pharm* 2011; 30 (9), 1709-13, 2011

18. Rizvi, W., Fayazuddin, M., Singh, O., Syed, S. N., Moin, S., Akhtar, K., & Kumar, A. Anti-inflammatory effect of *Fumaria parviflora* leaves based on TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and antioxidant potential. *Avicenna journal of phytomedicine*, 2017; 7 (1), 37-45.

19. Rosales, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiol* 2018 9, 113.

20. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M., & Scapini, P. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends in Immunol* 2019; 40(7), 565-583.

21. Yang, P., Li, Y., Xie, Y., & Liu, Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *Journal of Immunology Research*, 2019, Article ID 8016254, 18 p.

## Anexos

**Tabla 1.** Efectos del D-005 sobre el peso del granuloma y el edema

| <b>Tratamiento</b> | <b>PH (mg)</b>   | <b>I (%)</b> | <b>PS (mg)</b>  | <b>I (%)</b> | <b>Edema (mg)</b> | <b>I (%)</b> |
|--------------------|------------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|--------------|
| Control (vehículo) | 1185,2 ± 85,8    | -            | 221,0 ± 16,5    |              | 984,1 ± 82,6      | -            |
| D-005 5 mg/kg      | 994,0 ± 72,1 **  | 16,1         | 178,8 ± 28,4 *  | 19,1         | 815,2 ± 62,7 **   | 17,2         |
| D-005 25 mg/kg     | 970,8 ± 19,7 **  | 18,1         | 168,5 ± 16,7 *  | 23,8         | 802,3 ± 18,9 **   | 18,5         |
| D-005 50 mg/kg     | 965,2 ± 45,1 **  | 18,6         | 169,7 ± 19,9 *  | 23,2         | 795,5 ± 28,3 *    | 19,2         |
| D-005 100 mg/kg    | 945,2 ± 46,7 **  | 20,2         | 161,3 ± 17,6 ** | 27,0         | 783,9 ± 32,0 *    | 20,3         |
| D-005 200 mg/kg    | 945,9 ± 29,0 **  | 20,2         | 166,3 ± 11,2 ** | 24,7         | 771,8 ± 23,8 **   | 21,6         |
| aspirina 150 mg/kg | 925,5 ± 24,1 *** | 21,9         | 154,9 ± 11,2 ** | 29,9         | 783,0 ± 38,8 *    | 20,4         |

*I inhibición, PH peso húmedo, PS peso seco*

*Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)*

*\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 Comparación respecto al grupo control*

*Test de la U de Mann Whitney*

**Tabla 2.** Efectos del D-005 sobre la densidad de neutrófilos.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Densidad de neutrófilos (neutrófilos/mm<sup>2</sup>)</b> | <b>Inhibición (%)</b> |
|--------------------|---|-----------------------|
| Control (vehículo) | 49,13 ± 7,67  | -                     |
| D-005 5 mg/kg      | 21,00 ± 4,13**  | 57,25                 |
| D-005 25 mg/kg     | 14,38 ± 2,03 ***  | 70,74                 |
| D-005 50 mg/kg     | 14,35 ± 1,65 ***  | 70,79                 |
| D-005 100 mg/kg    | 13,96 ± 2,29 ***  | 71,58                 |
| D-005 200 mg/kg    | 13,31 ± 1,19 ***  | 72,91                 |
| aspirina 150 mg/kg | 16,33 ± 1,88 ***  | 66,77                 |

*Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)*

*\*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Comparación respecto al grupo control*

*Test de la U de Mann Whitney*