

Efectos del D-002 en la úlcera gástrica inducida por aspirina

Effects of D-002 on the gastric ulcer induced by Aspirin

Dra. Vivian Molina Cuevas, MSc. Maikel Valle Clara, MSc. Yazmin Ravelo Calzado, Dra. Daisy Carbajal Quintana, Dra. C. Rosa Mas Ferreiro

Centro de Productos Naturales Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).
La Habana, Cuba .

RESUMEN

Introducción: los antiinflamatorios no esteroideos son muy utilizados para tratar procesos inflamatorios agudos y crónicos, destacándose entre ellos el uso de la aspirina. Su principal limitación, sin embargo, son los efectos adversos gastrointestinales que produce, lo que justifica la búsqueda de nuevas sustancias con efecto antiinflamatorio y sin gastrotoxicidad, como el D-002, mezcla de alcoholes alifáticos primarios purificada de la cera de abejas.

Objetivo: evaluar el efecto del D-002 sobre la gastrotoxicidad inducida por aspirina.

Métodos: *Experimento 1:* las ratas se distribuyeron en 4 grupos: control (vehículo), tratado con D-002 (50 mg/kg), con aspirina (150 mg/kg) y con D-002 más aspirina (50 más 150 mg/kg). *Experimento 2:* las ratas se distribuyeron en 5 grupos: un control negativo y cuatro con úlcera inducida por aspirina (300 mg/kg): un control positivo (vehículo), dos tratados con D-002 (50 y 100 mg/kg), uno con omeprazol (10 mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía oral durante 6 días y se cuantificaron las lesiones gástricas. En el segundo experimento se evaluó además el grado de infiltración de neutrófilos.

Resultados: todos los animales tratados con aspirina, ninguno con D-002, mostraron típicas úlceras gástricas. La administración de D-002 (50 mg/kg) más aspirina (100 mg/kg) produjo menos úlceras (reducción del 67 %) que la monoterapia con aspirina. En el modelo de úlcera por aspirina, el D-002 (50 y 100 mg/kg), además de reducir las úlceras

(70 y 75 %), disminuyó la infiltración de neutrófilos (75 y 82 %, respectivamente). El omeprazol redujo ambas variables en 90 y 92 %, respectivamente.

Conclusiones: el D-002 redujo la gastrotoxicidad por aspirina y la infiltración de neutrófilos típica de esta lesión gástrica en ratas.

Palabras clave: D-002, aspirina, gastrotoxicidad, neutrófilos.

ABSTRACT

Introduction: non-steroidal anti-inflammatory drugs are very useful to treat acute and chronic inflammatory processes, being relevant among them the extended use of Aspirin. Their main limitation, however, are the induced gastrointestinal adverse effects, so it is justified the search of new substances with antiinflammatory effects devoided of gastrotoxicity, as D-002, a mixture of aliphatic primary alcohols purified from bees wax.

Objective: to evaluate the effect of D-002 on the Aspirin-induced gastrotoxicity.

Methods: *Experiment 1:* Rats were distributed into 4 groups: one vehicle control, treated with D-002 (50 mg/kg), one treated with Aspirin (150 mg/kg) and other with D-002 plus Aspirin (50 mg/kg plus 150 mg/kg). *Experiment 2:* Rats were distributed into 5 groups: a negative vehicle and four with Aspirin (300 mg/kg)-induced ulcer: a positive control (vehicle), two treated with D-002 (50 and 100 mg/kg) and one with Omeprazole (10 mg/kg). Treatments were orally administered for 6 days and gastric lesions were quantified. In the second experiment the neutrophil infiltration grade was evaluated too.

Results: all Aspirin-, but none of the D-002-treated animals exhibited typical gastric ulcers. The administration of D-002 (50 mg/kg) plus Aspirin (100 mg/kg) reduced the ulcers (67 % reduction) as compared to Aspirin monotherapy. In the model of Aspirin-induced ulcer, D-002 (50 and 100 mg/kg) reduced the ulcers (70 and 75 %), and also neutrophil infiltration (75 and 82 %, respectively), Omeprazole reduced both variables (90 and 92 %, respectively).

Conclusion: D-002 reduced the Aspirin-induced gastrotoxicity and the characteristic neutrophil infiltration of these gastric lesions in rats.

Key words: D-002, Aspirin, gastrotoxicity, neutrophil.

INTRODUCCIÓN

Las úlceras gástricas se caracterizan por la disrupción de la integridad de la mucosa debida al desequilibrio entre factores agresivos (secreción ácida, pepsina, *H. pylori*, antiinflamatorios no esteroideos [AINEs]) y defensivos (secreción de *mucus* y bicarbonato, microcirculación sanguínea, prostaglandinas, factores de crecimiento) que actúan sobre la mucosa gástrica.¹⁻³

Los AINEs, medicamentos utilizados para tratar la inflamación aguda y crónica, son una de las clases terapéuticas más prescritas, cuyo uso aumenta con el incremento de

la expectativa de vida,⁴ pero que producen efectos adversos, fundamentalmente gastrointestinales, que limitan un mayor uso.^{5,6} Tales antecedentes justifican la búsqueda de tratamientos antiinflamatorios que no produzcan gastrotoxicidad.

Las lesiones gástricas producidas por los AINEs se deben a la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), y por ende, de la síntesis de prostaglandinas y de sus efectos gastroprotectores, y al aumento del estrés oxidativo en la mucosa gástrica.⁷ La aspirina es el AINE más utilizado por su uso en la prevención vascular debido a su efecto antiagregante plaquetario, además de sus efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos. Sin embargo, ya que la aspirina es un AINE no selectivo que inhibe irreversiblemente la COX, su consumo reduce la secreción de *mucus* y el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, y aumenta la peroxidación lipídica y la infiltración de neutrófilos, eventos claves en la ulceración gástrica por aspirina.⁸⁻¹³

Aunque todos los factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones hemorrágicas en pacientes que consumen aspirina, aun a dosis bajas, no están bien definidos, se aceptan como tal la existencia de historia previa de úlcera, consumo simultáneo de AINEs, y enfermedad grave concomitante, por lo cual estos casos deben recibir protección gastroduodenal mediante el uso de tratamientos gastroprotectores que atenúen la gastrotoxicidad inducida por AINEs.¹³⁻¹⁵

El D-002, mezcla de 6 alcoholes alifáticos (C₂₄, C₂₆, C₂₈, C₃₀, C₃₂ y C₃₄) obtenida de la cera de abejas ha mostrado producir efectos antiinflamatorios en modelos de inflamación aguda y crónica, documentándose que reduce las cifras de leucotrieno B₄ (LTB₄) (factor quimiotáctico para los neutrófilos) en el exudado pleural en el modelo de pleuresía por carragenina en ratas.¹⁶ Sin embargo, a diferencia de la gastrotoxicidad inducida por los AINEs, el D-002 produce efectos gastroprotectores debido a un aumento de la secreción de *mucus* gástrico, la mejoría de la calidad de este, y la reducción de la peroxidación lipídica (PL) en la mucosa gástrica.¹⁷⁻²¹

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo el de evaluar el efecto del D-002 sobre la gastrotoxicidad inducida por aspirina, tanto al administrarse concomitantemente, específicamente sobre las úlceras gástricas inducidas por aspirina y la infiltración de neutrófilos asociada.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos con peso corporal entre 250 y 300 g suministradas por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) que se adaptaron a las condiciones de laboratorio (temperatura 25 ± 3 °C, humedad relativa 60 ± 5 %, ciclos luz/oscuridad de 12 h) durante 7 días. El alimento (pienso para roedores) y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

El estudio se condujo de acuerdo con las regulaciones vigentes sobre Buenas Prácticas de Laboratorio y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Centro de Productos

Naturales. El protocolo de estos ensayos fue aprobado por el Comité de Ética para el trabajo con animales.

Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 8:00 y 14:00 h en un local aislado de ruidos y temperatura controlada.

Tratamiento y diseño experimental

Administración y dosificación

El D-002 (lote 030040109) suministrado por las plantas de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba) se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. La composición del lote fue 1-tetracosanol (7,1 %), 1-hexacosanol (11,2 %), 1-octacosanol (13,8 %), 1-triacontanol (33,4 %), 1-dotriacontanol (22,1 %) y 1-tetratriacontanol (2,5 %) (pureza 90,0 %).

Para su administración, el D-002, la aspirina y el omeprazol (Quimefa, Cuba) se suspendieron en un vehículo goma acacia/agua al 1 %.

Experimento 1

Las ratas se dejaron en ayunas 16 h previas al experimento, permaneciendo en jaulas individuales con rejillas para evitar la coprofagia. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos (10 ratas por grupo): control (vehículo), uno tratado con D-002 (50 mg/kg), otro con aspirina (150 mg/kg) y otro con D-002 más aspirina (50 más 150 mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía oral mediante entubación gástrica (1 ml/kg de peso).

Al transcurrir 4 h, las ratas se anestesiaron con éter, se les abrió el abdomen por su curvatura mayor, se expuso el estómago, lavándose con solución salina, y se procedió a cuantificar las úlceras gástricas.

Experimento 2

Las ratas se distribuyeron en 5 grupos: un control negativo y cuatro con úlcera inducida por aspirina (300 mg/kg): un control positivo (vehículo), dos tratados con D-002 (50 y 100 mg/kg), uno con omeprazol (10 mg/kg) por vía oral. A la hora, se administró una dosis de aspirina (300 mg/kg) por vía oral y a las 5 h posteriores las ratas se sacrificaron y se procedió según se describió previamente.

En ambos experimentos se cuantificaron las lesiones gástricas. En el segundo experimento se evaluó además el grado de infiltración de neutrófilos.

Cuantificación de las lesiones

Las lesiones de la mucosa gástrica se cuantificaron macroscópicamente por dos observadores independientes a ciegas, después de haber comprobado la similitud de sus observaciones. y los resultados se expresaron como la suma total de la longitud de las lesiones (en milímetro).²²

Histología

Una vez cuantificadas las úlceras, los estómagos se fijaron en formaldehído (10 %) (BDH, Poole, Dorset, England), se deshidrataron en etanol, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones transversas de 4 mm, las cuales fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Se examinaron 10 imágenes por animal en un microscopio Olympus BH2 .

Las lesiones se identificaron como erosiones del epitelio acompañadas de infiltrados inflamatorios. Los neutrófilos se contaron en la sección transversal, de acuerdo al método de *Nygard* y otros.²³ La media del conteo de neutrófilos se determinó en 3 secciones por animal y por grupo.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos tratados y el control se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney, estableciendo un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los datos se procesaron con el paquete de programas Statistic para Windows. (Release 6,1; StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

La [tabla 1](#) muestra el efecto de los tratamientos sobre la mucosa gástrica de ratas. La administración por vía oral de aspirina (150 mg/kg), pero no la de D-002 (50 mg/kg), aumentó el número de lesiones en la mucosa gástrica de ratas al compararse con el grupo control, mientras la terapia combinada (D-002 más aspirina) redujo la presencia de lesiones en un 67 % con respecto al grupo tratado con aspirina.

La administración de D-002 (50 y 100 mg/kg) a ratas a las que se indujeron úlceras por aspirina redujo el índice de úlceras en un 70 y 75 %, respectivamente, y el omeprazol (10 mg/kg) en un 91 % ([tabla 2](#)). El D-002 (50 y 100 mg/kg) redujo la infiltración de neutrófilos por área ulcerada en un 75 y 82 %, respectivamente, y el omeprazol en un 91 %, con respecto al grupo control positivo ([tabla 3](#)).

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que, a diferencia de la aspirina (150 mg/kg), el tratamiento con D-002 (50 mg/kg) no sólo no produjo lesiones gástricas, sino que su administración conjunta con aspirina redujo la gastrototoxicidad por aspirina (67 %), y que a dosis de 50 y 100 mg/kg disminuyó las úlceras inducidas por aspirina (70 y 75 %, respectivamente), y la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica (75 y 82 %, respectivamente).

El hecho que el omeprazol, tratamiento de referencia, haya reducido el índice de úlceras y la infiltración de neutrófilos en un 90 %, aproximadamente (91 y 92 %, respectivamente), concuerda con datos de la literatura y confiere validez al modelo en

nuestras condiciones, y por ende, a los resultados obtenidos. Por otra parte, estos resultados son compatibles con los efectos gastroprotectores descritos del D-002.¹⁷⁻²¹

Los neutrófilos son la mayor fuente celular de mediadores inflamatorios y pueden liberar especies reactivas de oxígeno (EROS) como peróxido de hidrógeno y aniones superóxidos, altamente citotóxicas.²⁴ En particular, mientras la acumulación de neutrófilos en la mucosa gástrica afecta la microcirculación y promueve la ulceración,²⁵ su reducción promueve la curación de las úlceras gástricas en ratas.²⁶

El hecho que el D-002 haya reducido la acumulación de neutrófilos en el modelo de úlcera por aspirina, es compatible con el hecho de que haya disminuido la concentración de LTB₄, factor quimiotáctico para neutrófilos, en el exudado pleural modelo de pleuresía por carragenina.¹⁶ Por otra parte, sugiere que el efecto gastroprotector del D-002 pudiera involucrar una acción sobre la vía de la 5-lipoxigenasa (LOX).

En la práctica clínica no resulta infrecuente la administración conjunta de diferentes AINEs, hecho que aumenta el riesgo de complicaciones gástricas, sobre todo en pacientes que requieren terapia por largo plazo, y en ancianos.^{27,28} Con el objetivo de evitar esta problemática se ha promovido el uso de agentes gastroprotectores, fundamentalmente los inhibidores de la bomba de protones, para reducir el daño gastrointestinal inducido por los AINEs, ya que con tal fin no se recomienda el uso de los antagonistas del receptor H₂ (H₂RA), dado las dosis requeridas y la ausencia de datos suficientes sobre su eficacia para tal indicación, y el misoprostol, aunque efectivo, produce una elevada tasa de efectos secundarios (dolor abdominal o diarrea en hasta un 20 % de los pacientes) y requiere de una dosificación incómoda (3-4 veces/24 h).^{29,30}

Los presentes resultados son por tanto, alentadores, y sugieren que el tratamiento con D-002 podría ser útil en prevenir la gastrotoxicidad inducida por aspirina, ya que la magnitud de los efectos observados resulta apreciable. Estudios ulteriores que investiguen diferentes esquemas de tratamiento y el efecto sobre diversos marcadores de daño gástrico deberán completar los presentes resultados, y se requiere el desarrollo de diversos estudios clínicos para delimitar su posible relevancia clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramakrishnan K, Salinas RC. Peptic ulcer disease. Am Fam Physician. 2007;76:1005-13.
2. Lamarque D. Pathogenesis of gastroduodenal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Gastroenterol Clin Biol. 2004;28:C18-26.
3. Allen A, Flemström G. Gastroduodenal *mucus* bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. Am J Cell Physiol. 2005;288:C1-19.
4. Tsumura H, Tamura I, Tanaka H, Chinzei R, Ishida T, Masuda A. Prescription of non-steroidal anti-inflammatory drugs and co-prescribed drugs for mucosal protection:

analysis of the present status based on questionnaires obtained from orthopaedists in Japan. Intern Med. 2007;46:927-31.

5. Whittle BJ. Gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Fundam Clin Pharmacol. 2003;17:301-13

6. Fernández Lanás A. NSAID-induced gastrointestinal damage: current clinical management and recommendations for prevention. Chin J Dig Dis. 2006;7:127-33.

7. Lamarque D. Pathogenesis of gastroduodenal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Gastroenterol Clin Biol. 2004;28:C18-26.

8. Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van Der Voort IR. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. Aliment Pharmacol Ther. 2001;15:677-87.

9. Sener-Muratoglu G, Paskaloglu K, Arbak S. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. Dig Dis Sci. 2001;46:318-30.

10. Fries JF, Bruce B. Rates of serious gastrointestinal events from low dose use of acetylsalicylic acid, acetaminophen, and ibuprofen in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2003;30:2226-33.

11. Jainu M, Devi S. Attenuation of neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines by *Cissus quadrangularis*: a possible prevention against gastric ulcerogenesis. J Herb Pharmacother. 2005;5:33-42.

12. Jainu M, Mohan V, Devi S. Protective effect of *Cissus quadrangularis* on neutrophil mediated tissue injury induced by aspirin in rats. J Ethnopharmacol. 2006;104:302-5.

13. Yajima H, Yamao J, Fukui H, Takakura Y. Up-to-date information on gastric mucosal lesions from long-term NSAID therapy in orthopaedic outpatients: a study using logistic regression analysis. J Orthop Sci. 2007;12:341-6.

14. Hyllested M, Jones S, Pedersen JL, Kehlet H. Comparative effect of paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management: a qualitative review. Br J Anaesth. 2002;88:199-214.

15. Kalra BS, Shalini, Chaturvedi S, Tayal V, Gupta U. Evaluation of gastric tolerability, antinociceptive and antiinflammatory activity of combination NSAIDs in rats. Indian J Dent Res 2009;20:418-22.

16. Carbajal D, Molina V, Valdés S. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids. 1998;59:235-8.

17. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Más R. Anti-ulcer activity of higher primary alcohols of beeswax. J Pharm. Pharmacol. 1995;47:731-3.

18. Carbajal D, Molina V, Noa M, Valdés S, Arruzazabala ML, Aguiar A, et al. Effects of D-002 on gastric *mucus* composition in ethanol-induced ulcer. *Pharmacol Res.* 2000;42:329-32.
19. Carbajal D, Molina V, Valdés S. Possible cytoprotective mechanism in rats of D-002 an anti-ulcerogenic product isolated from beeswax. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:858-60.
20. Carbajal D, Molina V, Noa M, Valdés S. Effects of D-002 on gastric *mucus* composition in ethanol-induced ulcer. *Pharmacol Res.* 2000;42:329-32.
21. Molina V, Valdés S, Carbajal D. Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with experimentally-induced injury. *J Med Food.* 2001;4:79-83.
22. Ohara A, Sugiyama S; Hoshino H. Reduction of adverse effects of indomethacin by anti-allergic drugs in rat stomachs. *Arzneim-Forsch Drug Res.* 1992;42:1115-8.
23. Nygard G, Amthony A, Piasecki C, Trevethick M, Hudson M, Dhilon A, et al. Acute indomethacin-induced jejunum injury in the rat. Early morphological and biochemical changes. *Gastroenterology* 1994;106:567-75.
24. Cheng CL, Koo MWL. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* 2000;67:2647-53.
25. Bou-Abboud CF, Wayland H, Panlsen G, Guth PH. Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. *Dig Dis Sci.* 1988;33:872-7.
26. Shimizu N, Watanabe T, Arakawa T, Fujiwara Y, Higuchi K, Kuroki T. Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumour necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. *Dig.* 2000;6:157-64.
27. Paul AD, Chauhan CK. Study of usage pattern of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) among different practice categories in Indian clinical setting. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;60:889-92.
28. Lanas A, García-Rodríguez LA, Arroyo MT, Gomollon F, Feu F, González- Pérez A, et al. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut.* 2006;55:1731-8.
29. Rostom A, Dube C, Wells G, Tugwell P, Welch V, Jolicoeur E, et al. Prevention of NSAID-induced gastroduodenal ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; CD002296.
30. Lanas A, Hunt R. Prevention of anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal damage: benefits and risks of therapeutic strategies. *Ann Med.* 2006;38:415-28.

Recibido: 2 de julio de 2011.
Aprobado: 8 de agosto de 2011.

Vivian Molina Cuevas. Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: vivian.molina@cnic.edu.cu

Tabla 1. Efecto del D-002, la aspirina y la combinación en la mucosa gástrica de ratas

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de úlcera (mm) (Mean $\pm$ EEM)	Inhibición (%)
Control	-	0 $\pm$ 0	-
Monoterapias			
D-002	50	0 $\pm$ 0	-
Aspirina	150	7,03 $\pm$ 1,6 ****	-
Terapia combinada			
D-002 más aspirina	50 + 150	2,30 $\pm$ 0,6 *** +	67

Inhibición (%) comparada con las monoterapias.

*** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$ Comparación con el grupo control.

+ Comparación con la aspirina (prueba de la U de Mann Whitney).

[Regresar](#)

Tabla 2. Efecto del D-002 y el omeprazol en el modelo de úlcera inducida por aspirina

Tratamientos	Índice de úlceras (mm)	Inhibición (%)
Control negativo	0+++	-
Control positivo (vehículo)	64 ± 15,0	-
D-002 (50 mg/kg)	19 ± 5,0 +	70
D-002 (100 mg/kg)	16 ± 4,0 +++†	75,0
Omeprazol (10 mg/kg)	6 ± 1,1 +++	91

+ p < 0,05; ++ p < 0,01; +++p < 0,001. Comparación con el control positivo.

†p < 0,05. Comparación con omeprazol (prueba de la U de Mann Whitney).

[Regresar](#)

Tabla 3. Efecto del D-002 y el omeprazol sobre el número de neutrófilos en el modelo de úlcera inducida por aspirina

Tratamiento	Neutrófilos por área ulcerada	Inhibición %
Control negativo	0 ^{***}	-
Grupo tratado con aspirina		
Control positivo (vehículo)	148,28 ± 7,9	-
D-002 (50 mg/kg)	37,41 ± 3,85 ^{***}	75
D-002 (100 mg/kg)	25,03 ± 2,84 ^{***}	82
Omeprazol (10 mg/kg)	11,23 ± 3,82 ^{***}	92

^{***}p < 0,001. Comparación con el control positivo (prueba de la U de Mann Whitney).
 Datos se expresan como media ± EEM.

[Regresar](#)