

Efecto anti-inflamatorio de la terapia combinada del D-002 y Lyprinol en un modelo de inflamación crónica.

Zullyt Zamora Rodríguez, Vivian Molina, Licet Mena y Carlos Nodal

Departamento de farmacología y toxicología Experimental. Centro de productos Naturales, CNIC. zullyt.zamora@cnic.edu.cu

Recibido: 29 de septiembre de 2016.

Aceptado: 22 de diciembre de 2016.

Palabras clave: *Granuloma, D-002, Lyprinol, Ratas, antiinflamatorio.*

Key words: *Granuloma, D-002, Lyprinol, rats, anti-inflammatory.*

RESUMEN. El efecto antiinflamatorio del tratamiento combinado de D-002 (mezcla de alcoholes de alto peso molecular) y Lyprinol (ácidos grasos poliinsaturados del mejillón de labio verde (*Perna canaliculus*)), se evaluó mediante el modelo de inflamación crónica inducido por la implantación de la mota de algodón en ratas. Para lo cual, se utilizaron rata macho de la línea Sprague Dawley, divididas en cinco grupos experimentales a los que se les indujo el granuloma por algodón: un control (vehículo), un grupo tratado con D-002 (25 mg/kg), uno con Lyprinol (25 mg/kg), uno con la combinación (D-002 + Lyprinol) y uno con aspirina (150 mg/kg) como sustancia de referencia. Todos los tratamientos (vehículo, D-002, aspirina y Lyprinol) se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (5 mL/kg) dosis repetida, durante seis días, comenzando 24 horas después de inducida la inflamación crónica por granuloma de algodón. Los resultados mostraron que el tratamiento combinado de D-002 con Lyprinol redujo de forma significativa tanto el peso húmedo (13,2 %) como el peso seco (25,68%) del granuloma inducido en las ratas; sin embargo, este efecto no tuvo una interacción de tipo aditiva ya que no fue superior a la sumatoria de los efectos de la monoterapia. Se demostró la efectividad de la terapia combinada D-002 + Lyprinol sobre la formación del granuloma inducido por algodón en ratas.

ABSTRACT. Anti-inflammatory effect of combined treatment of D-002 (mixture of high molecular weight aliphatic alcohols) and Lyprinol (lipid extract from green-lipped mussel (*Perna canaliculus*)), was evaluated in cotton pellet induced chronic inflammatory animal model. For that, male Sprague Dawley rats, divided into five experimental groups that were granulomatous inflammation by cotton pellet were used: control (vehicle), treated with D-002 (25 mg / kg) group, one with Lyprinol (25 mg / kg), one with the combination (D-002 + Lyprinol) and one with aspirin (150 mg/kg) as a reference substance. All treatments (vehicle, D-002, aspirin and Lyprinol) were administered by oral route (5 mL/kg) repeated dose, for six days, beginning 24 hours after chronic inflammation induced by cotton pellet. The results indicated that combined treatment with D-002 and Lyprinol, significantly reduced both, wet weight (13.2%) and dry weight (25.68%) of granuloma induced in rats; however, this effect was not additive interaction type as it was no more than the sum of the effects of monotherapy. The effectiveness of D-002 + Lyprinol combined therapy on the formation of cotton-induced granuloma in rats was demonstrated.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es considerada como una respuesta biológica transitoria del tejido frente a un estímulo nocivo tal como una lesión, antígenos exógenos o endógenos, en el intento de eliminar el estímulo y reparar el tejido dañado para lograr la reparación de este y retornar a la homeostasis.¹ Aunque la inflamación es un mecanismo de defensa positivo del organismo, se considera como la llamada “espada de doble filo” ya que esta reacción de forma prolongada y descontrolada puede ser reconocida como causa de diferentes desórdenes, como la diabetes, alergias, aterosclerosis, obesidad, cáncer y el dolor. Por otra parte, la disfunción inflamatoria que da paso a las enfermedades crónicas, incrementa el costo de la atención médica por parte de la sociedad.^{2,3}

La inflamación como respuesta fisiológica muy compleja posee dos fases: una aguda y otra crónica.⁴ La fase aguda se desencadena cuando el organismo se encuentra con un estímulo dañino, se caracteriza por la presencia de vasodilatación, acentuada permeabilidad, infiltración de neutrófilos y edema.⁵ Esta respuesta inflamatoria aguda, da paso a una inflamación crónica, formada por tejido de proliferación, la formación del granuloma y la fase de reparación.⁶

Dentro del proceso inflamatorio, ocurren una serie de eventos moleculares, iniciados por la activación de las células inflamatorias que liberan mediadores que incluyen los eutacoides, citocinas y quimoquinas, responsables del tránsito de una inflamación de fase aguda a crónica.^{7,8} En la inflamación crónica ocurre un daño de las células con la simultánea destrucción y cura del tejido dañado,⁹ durante lo cual, se activa la ciclooxigenasa (COX) para la producción de prostaglandinas (PGs), responsables del dolor, el edema y la fiebre. De esta forma, los fármacos inhibidores de la COX son utilizados como antiinflamatorios (AI).¹⁰

Hasta el presente, las enfermedades inflamatorias son tratadas con fármacos antiinflamatorios convencionales, tales como los antiinflamatorios esteroideos (AIE) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).¹¹ Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos se encuentra asociado a diversas reacciones adversas, como ulceraciones, perforación, irritación gástrica, hematoquesia,^{12,13} estados de inmunodeficiencia y disturbios de la inmunidad humoral,¹⁴ angioedema, fallo hepático, dolor de cabeza, anemia hemolítica, hiperglicemia osteoporosis, entre otros.¹⁵

En tal sentido, el uso de monoterapias con antiinflamatorios duales (inhibidores de lipooxigenasa (LOX) y COX) o en combinación con otros tipos de anti-inflamatorios (glucocorticoides, AINEs y pentoxifilina) ha cobrado auge de modo que reduce la progresión y desarrollo de los procesos inflamatorios crónicos,^{16,17} sin que aparezcan los síntomas comunes de toxicidad gástrica de los AINEs.¹⁸

Considerando, la diversidad de reacciones adversas, que aparecen tras el uso prolongado de los fármacos antiinflamatorios sintéticos, los científicos se encuentran inmersos en la búsqueda de agentes naturales efectivos con baja toxicidad y mejor tolerabilidad, para lo cual, las plantas y otros derivados naturales son una importante fuente de candidatos terapéuticos.^{7,19,20}

El Lyprinol es una mezcla de cinco tipos de lípidos que incluyen esteres esteroides, triglicéridos, ácidos grasos libres y lípidos polares.^{21,22} El efecto AI de este compuesto ha sido evidenciado en diferentes modelos experimentales de inflamación aguda por carragenina, Zymozan, artritis por colágeno tipo II, poliartritis por *Mycobacterium tuberculosis* y en procesos inflamatorios intestinales.²³⁻²⁵ Un estudio *in vitro* (leucocitos polimorfonucleares humanos) evidenció que el mecanismo AI del Lyprinol estuvo mediado por la inhibición dual de la 5-LOX/COX,²⁶ conduciendo a la inhibición de la biosíntesis de leucotrieno (LTB₄)²⁷ y de la síntesis de PGE₂ en macrófagos activados de ratas.²⁸ Ensayos clínicos, evidencian que el Lyprinol reduce el dolor, la hinchazón y la rigidez de las articulaciones de pacientes con artritis²⁹, mostrando mayor eficacia como AI y mejor tolerabilidad gástrica que los AINEs clásicos.³⁰ Se considera que la baja toxicidad gástrica del Lyprinol, es debido a su inhibición mayoritaria de la enzima 5-LOX.³¹

Por tal motivo, la búsqueda de sustancias de origen natural para el tratamiento de los procesos inflamatorios que sean seguras y bien toleradas constituye una problemática actual a pesar del desarrollo vertiginoso de la industria farmacéutica.

El D-002 es una mezcla de 6 alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular obtenida de la cera de abejas (*Apis mellifera*), cuyo componente principal es el triacontanol, y que también contiene dotriacontanol, tetratriacontanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol.³²

Estudios previos han demostrado que el D-002 presentó efecto AI moderado en un modelo de inflamación aguda (pleuresía por carragenina), lo cual estuvo asociado a la reducción en la concentración del LTB₄ en el exudado pleural, así como que presentó marcado efecto AI en un modelo de inflamación crónica (granuloma por algodón).³³ Otros modelos de inflamación aguda como el del xileno en la oreja del ratón,³⁴ el edema plantar inducido por dextran, serotonina e histamina en ratas³⁵ y un estudio comparativo con otros AINEs (naproxeno y aspirina), evidenciaron la acción AI del D-002, en este último caso similar a estos en el modelo del granuloma por algodón.³⁶ Recientemente, se demostró que el D-002 inhibe de forma dual las enzimas 5-LOX y COX,^{37,38} mecanismo AI que lo hace similar en actividad farmacológica a los AINEs, con la diferencia de que no es gastrotóxico. Por otra parte, recientemente se demostró que tanto el D-002 como el Lyprinol no presentaron efectos gastrotóxicos cuando se administraron con esquemas de dosis que resultaron efectivos para inhibir la inflamación en modelos experimentales.³⁹ Por lo que, el objetivo de este estudio es investigar los efectos de la terapia combinada del D-002 y el Lyprinol sobre la formación del granuloma en ratas.

Materiales y métodos

Animales: Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250-300 de peso corporal) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Mayabeque), las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 10%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida. La selección de esta especie se basó en que se caracteriza por ser una de las especies comúnmente utilizada en la evaluación de sustancias con potencial efecto esófago protector. Todos los procedimientos y la manipulación de los animales, se realizaron siguiendo los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio recomendados en los Lineamientos Internacionales y en la República de Cuba, en las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio y en los aspectos específicos plasmados en el Manual de calidad y los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) establecidos en el Centro de Productos Naturales

Sustancias: El D-002 (lote 030040109) obtenido en la Planta de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba), la aspirina (ASA) lote: 90460 fue adquirida de la empresa QUIMEFA, La Habana, Cuba y el Lyprinol, lote: 124441, Procedencia: Blackmores, Australia. El D-002 se preparará en forma de suspensión en un vehículo Tween 20/H₂O mientras el Lyprinol fue disuelto en Tween 65/H₂O (2%). El ASA se preparó en una suspensión con goma acacia al 1%. Los vehículos a emplear fueron seleccionados de acuerdo a las características de la sustancia de estudio y a la inocuidad que éstos poseen.

Descripción de los grupos experimentales

Las ratas se distribuyeron en 5 grupos de 10 animales cada uno a los que se les indujo el granuloma por algodón: un control (vehículo), un grupo tratado con D-002 (25 mg/kg), uno con Lyprinol (25 mg/kg), uno con la combinación (D-002 + Lyprinol) y uno con ASA (150 mg/kg) como sustancia de referencia.

Las dosis de D-002 y Lyprinol se seleccionaron, según las informadas como dosis submáximas en estudios previos en este modelo experimental (datos no reportados), mientras que la dosis de ASA resultó efectivo acorde a reportes previos.³⁶ Todos los tratamientos (vehículo, D-002, ASA y Lyprinol) se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (5 mL/kg), durante 6 días, comenzando 24 h después de inducida la inflamación crónica por granuloma de algodón.

Inducción del granuloma por algodón

Las ratas se anestesiaron con tiopental sódico (30 mg/kg, i.p) y se les realizó una incisión en la mitad dorso lateral creando un túnel subcutáneo mediante pinzas romas donde se colocó un pellet de algodón estéril de 50 mg de peso.³³ Posteriormente, la incisión se suturó y se le aplicó un antiséptico local.

Un día posterior a la última administración (6 días), los animales se sacrificaron en atmósfera de éter y los granulomas fueron extraídos cuidadosamente.

Peso del granuloma

Para la determinación del peso húmedo (PH), 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.

Para la determinación del peso seco (PS) los granulomas se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 horas hasta alcanzar un peso constante. El peso del pellet de algodón (50 mg) se sustrajo del peso del granuloma y el peso seco se utilizó como expresión de la formación del granuloma. El porcentaje de inhibición se expresó tomando como referencia el peso del granuloma del grupo control.

Análisis Estadístico

La comparación entre grupos se realizó con el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. A priori se estableció un nivel de significación $p < 0,05$ para la significación estadística. Los datos se procesaron con el paquete de programas Statistics Software for Windows (Release 4.2 Stat Soft Inc, Tulsa OK, US).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los resultados de la respuesta del efecto de las monoterapias D002 y Lyprinol, ambos aplicados a la dosis de 25 mg/kg; el ASA (150 mg/kg) y la terapia combinada de D-002 más Lyprinol, a iguales dosis que las monoterapias, sobre los parámetros de peso húmedo (PH) y peso seco (PS) del granuloma inducido por algodón en ratas.

Tabla 1: Efecto de las monoterapias y la terapia combinada de D-002, Lyprinol, ASA y D-002 + Lyprinol sobre los parámetros de peso húmedo y seco del granuloma inducido por algodón en ratas.

Grupos	Dosis	PH (mg)	I (%)	PS (mg)	I (%)
Control (+)	-	1642,05 ± 72,95		334,18 ± 25,45	
D-002	25	1424,57 ± 99,64	13,24	248,33 ± 18,27*	25,68
Lyprinol	25	1500,73 ± 83,62	8,6	302,03 ± 24,42	9,62
ASA	150	1338, 51 ± 60,08 *	18,42	240, 56 ± 15,07*	28,01
D-002 + Lyprinol	25+25	1423, 85 ± 71,55 **	13,28	248,35 ± 14,50**	25,68

PH: Peso Húmedo, PS: Peso seco. Los datos expresan las medias ± error estándar de la media para ambos parámetros (PH y PS), obtenidos de cada uno de los grupos de 10 animales cada uno (n=10). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Comparación vs Control (Ensayo de U de Mann Whitney)

Tal como se observa, el tratamiento con la monoterapia de D-002 redujo de forma moderada (25,68 %) y significativa el PS del granuloma, no siendo de igual forma para el PH, alcanzando una ligera inhibición (13,24%) sin significación estadística. La dosis de Lyprinol ensayada (25 mg/kg), no redujo la formación del granuloma. Sin embargo, la monoterapia de dosis de ASA ensayada, redujo de forma moderada y significativa tanto el PH como el PS (18,42; 28,01%, respectivamente) del granuloma inducido por el algodón. La combinación de la dosis de D-002 +

Lyprinol, redujo de forma moderada y significativa ambos parámetros estudiados (PH y PS) con porcentajes de inhibición de (13,28; 25,68 %, respectivamente) del granuloma inducido en ratas.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio demuestran que el tratamiento con D-002 redujo de forma significativa el peso seco del granuloma. Como fue de esperar, el lyprinol (25 mg/kg), no redujo la formación del granuloma, según resultados de series experimentales anteriores (datos no publicados). Tal resultado, se corresponde con lo demostrado en el modelo de inflamación aguda de pleuresía por carragenia.⁴⁰ donde dosis la de lyprinol (25 mg/kg), no inhibió la formación de exudado pleural, lo cual se encuentra en correspondencia con la fase exudativa (PH) de la formación del granuloma en este caso. Es de destacar que si bien la combinación de D-002 + Lyprinol produjo una reducción significativa del granuloma, no constituyó un efecto de forma aditiva, ya que el porcentaje de reducción alcanzado no fue superior a la sumatoria de los efectos de las monoterapias.

Tal como se esperaba, la implantación subcutánea de una mota de algodón en el dorso lateral de los animales produjo la formación de un granuloma lo que corrobora la validez del modelo experimental utilizado bajo nuestras condiciones de laboratorio. En este estudio se demuestra que la ASA administrada a la dosis de 150 mg/kg redujo de forma moderada y significativa el peso del granuloma, encontrándose en correspondencia con estudios anteriores que evidencian su efectividad en dicho modelo experimental.⁴¹

El modelo de granuloma por algodón ha sido muy utilizado para la evaluación de fármacos sobre las fases transudativa, exudativa y proliferativa de la inflamación crónica.⁴²⁻⁴⁴ La fase transudativa se expresa por el aumento del peso húmedo del pellet durante las primeras 3 horas tras implantar la mota de algodón, la exudativa ocurre entre las 3 y 72 horas y en ella ocurre un aumento prolongado de la permeabilidad vascular, y la proliferativa se caracteriza por el incremento del peso seco del granuloma la cual ocurre entre los 3 y 6 días posteriores a la implantación. Así, el fluido absorbido por el pellet influye grandemente en el peso húmedo del granuloma mientras que el peso seco se correlaciona con la cantidad de tejido granulomatoso formado.⁴⁴

El hecho, que la terapia combinada (D-002 + Lyprinol) haya reducido el peso seco del granuloma con una eficacia similar a la de la monoterapia con D-002 y superior a la del Lyprinol pudiera estar relacionado con la similitud mecanística (inhibidores duales de la 5-LOX/COX) que existe entre ambos productos. Dicha acción limita la formación de metabolitos que participan en las distintas fases de la inflamación tal como la fase proliferativa donde las prostaglandinas (producidas por la vía de la COX) juegan un importante papel, lo que pudiera ser un factor clave en este modelo si tenemos en cuenta que el efecto de la terapia combinada resultó superior sobre el peso seco del granuloma (alrededor de un 25 % de inhibición) en relación al peso húmedo (alrededor de un 13 %), encontrándose en correspondencia con lo alcanzado por el ASA como fármaco de referencia (peso seco 28 % inhibición) y peso húmedo (18 % de inhibición). Adicionalmente, consideramos que si bien la combinación de ambos productos (D-002 y Lyprinol), no tuvo una actividad AI adicional a la monoterapia, tampoco ocasionó una interacción negativa. Considerado, que el efecto AI de ambos productos comparte mecanismos similares, no descartamos la posibilidad de que, el uso de dosis superiores con esquemas terapéuticos prolongados, pudieran alcanzar una acción AI adicional a los reportados en este estudio, lo cual será evaluado en estudios posteriores.

CONCLUSIÓN

Se demostró la efectividad de la terapia combinada D-002 + Lyprinol sobre la formación del granuloma inducido por algodón en ratas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Egger G. In search of a germ theory equivalent for chronic disease. *Preventing Chronic Disease*. 2012; 9:110301.
2. Mizuno Y, Jacob RF, Preston MR. Inflammation and the development of atherosclerosis-effects of lipid-lowering therapy. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(5):351-8.
3. CIHR Canadian Institutes of Health Research. Inflammation in chronic disease initiative.[consultado 20 de noviembre de 2015] 2012, <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/44070.html>.
4. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008; 454: 436-44
5. Huang MH, Wang BS, Chiu CS, Amagaya S, Hsieh WT, Huang SS, *et al*. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of Xanthii Fructus extract. *J Ethnopharmacol*. 2011; 135(2):545-52.
6. Eddouks M, Chattopadhyay D, Zeggwagh NA. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; Article ID 142087, 14 pages.[Consultado 12 de octubre de 2015] <http://dx.doi.org/10.1155/2012/142087>
7. Chattopadhyay D, Arunachalam G, Mandal AB, Sur Tapas K, Mandal SC, Bhattacharya SK. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Mallotus peltatus* leaf extract. *J Ethnopharmacol*. 2002; 82(2-3): 229-37.
8. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 α . *J Experimental Medicine*. 1993; 178(1), 63-72.

9. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical Exp Immunology*. 2007; 147(2): 227–35.
10. Gaddi A, Cicero AFG, Pedro EJ. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch Gerontol Geriatr*. 2004; 38(3):201-12.
11. Su S, Wang T, Duan JA, Zhou W, Hua YQ, Tang YP, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. *J Ethnopharmacol*. 2011; 134(2):251-8.
12. Laine L, Smith R, Min K, Chen C, Dubois RW. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24(5):751-67.
13. Roth SH. Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs*. 2012;72(7):873-79.
14. Simon RA. Prevention and treatment of reactions to NSAIDs. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003;24(2):189-98.
15. Rodrigo L, de Francisco R, Pérez-Pariente JM, Cadahia V, Tojo R, Rodriguez M, *et al.* Nimesulide-induced severe hemolytic anemia and acute liver failure leading to liver transplantation. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(11):1341-43.
16. Russell AL. Piroxicam 0.5% topical gel compared to placebo in the treatment of acute soft tissue injuries: a double-blind trial comparing efficacy and safety. *Clin Invest Med*. 1991;14(1):35-43.
17. Ginsberg F, Famaey JP. Double-blind, randomized crossover study of the percutaneous efficacy and tolerability of a topical indomethacin spray versus placebo in the treatment of tendinitis. *J Int Med Res*. 1991; 19(2):131-36.
18. Sandelin J, Harilainen A, Crone H, Hamberg P, Forsskåhl B, Tamelander G. Local NSAID gel (eltenac) in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Scand J Rheumatol*. 1997;26(4):287-92.
19. Tag H, Das AK, Loyi H. Anti-inflammatory plants used by the Khamti tribe of Lohit district in eastern Arunachal Pradesh, India. *Natural Product Radianc*. 2007; 6(4): 334-40.
20. Chattopadhyay D, Khan MTH. Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses. *Biotechnol Annu Rev*. 2008; 14:297-348.
21. Murphy KJ, Mooney BD, Mann NJ, Nichols PD, Sinclair AJ. Lipid, FA, and sterol composition of New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*). *Lipids*. 2002; 37(6): 587-95.
22. Treschow AP, Hodges LD, Wright PFA, Wynne PM, Kalafatis N, Macrides TA. Novel anti-inflammatory ω -3 PUFAs from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 2007;147(4):645-56.
23. Whitehouse MW, Macrides TA, Kalafatis N, Betts WH, Haynes DR, Broadbent J. Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ green-lipped mussel. *Inflammopharmacology*. 1997;5(3):237-46.
24. Doggrell SA. Lyprinol—Is It a Useful Anti-Inflammatory Agent? *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 307121.
25. Tenikoff D, Murphy KJ, Le M, Howe PR, Howarth GS. Lyprinol (stabilised lipid extract of New Zealand green-lipped mussel): A potential preventative treatment modality for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2005;40 (4): 361-65.
26. McPhee S, Hodges LD, Wright PF, Wynne PM, Kalafatis N, Harney DW, *et al.* Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2007;146(3):346-56.
27. Dugas B. Lyprinol inhibits LTB4 production by human monocytes. *Allerg Immunol (Paris)*. 2000; 32:284-89.
28. Halpern GM. Anti-inflammatory effects of a stabilized lipid extract of *Perna canaliculus* (Lyprinol) *Allergie et Immunologie*. 2000; 32 (7): 272-75.
29. Doggrell SA. Lyprinol—is it a Useful Anti-inflammatory Agent?, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2009; 1-8.
30. Cho SH, Young BJ, Sang ChS, Hyung BP, Ki YB, Dong ChL, *et al.* Clinical Efficacy and Safety of Lyprinol®, a Patented Extract from New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna Canaliculus*) in Patients with Osteoarthritis of the Hip and Knee: Multicenter Clinical Trial with a 2 Months Treatment Period. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2003;35(6):212-16.
31. Wallace JL, Del Soldato P. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2003; 17 (1):11-20.
32. Mas R. D-002: A product obtained from beeswax. *Drugs of the Future*, 2001; 26:731.
33. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Más R, Magraner J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1998;59(4):235-38.
34. Ravelo Y, Molina V, Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Oyarzábal A, *et al.* Effects of single oral and topical administration of D-002 (beeswax alcohols) on xylene- induced ear edema in mice. *Lat J Pharm*. 2010; 29(8):1451- 54.

35. Carbajal D, Ravelo Y, Molina V, Más R, Arruzazabala L. Effect of D-002 on Models of Acute Inflammation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2013; 21(2): 62-67.
36. Molina V, Ravelo Y, Carbajal D, Más R, Arruzazabala ML. 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.
37. Pérez Y, Oyarzábal A, Ravelo Y, Mas R, Jiménez S, Molina V. Inhibition of COX and 5-LOX enzymes by D-002 (beeswax alcohols). *Current Topics in Nutraceuticals Research.* 2014; 12(1/2): 13-18.
38. Pérez Y, Ambar O, Ravelo Y, Más R, Jiménez S, Molina V. Efecto in vitro del D-002 sobre la actividad de la enzima 5-LOX en hígado de ratas. *Revista Cubana Farm.* 2012;46(2):259-66
39. Ravelo Y, Molina V, Carbajal D, Más R, Zamora Z. Gastroprotective effects of D-002 (beeswax alcohols) and Lyprinol ® on experimentally-induced gastric ulceration in rats. *Rev Cubana Farm.* 2015; 49(3): (en prensa).
40. Ravelo YC, Molina VC, Pérez YG, Oyarzábal AY, Jiménez SD, Mas RF. Anti-Oedema Effects of D-002 and Lyprinol on the Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2013; 23(1): 24-28.
41. Nandal S, Dhir A, Kuhad A, Sharma S, Chopra K. Curcumin potentiates the anti-inflammatory activity of cyclooxygenase inhibitors in the cotton pellet granuloma pouch model. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009;31(2):89-93.
42. Rajeswari R, Thejomoorthy P, Mathuram LN, Narayana KVS. Anti-Inflammatory Activity of Cassia Fistula Linn. Bark Extracts In Sub-Acute Models Of Inflammation In Rats. *Veterinary & Animal Sciences.* 2006; 2(5):193-97.
43. Cuman RK, Bersani-Amadio CA, Fortes ZB. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflammation Res* 200; 150: 460-64.
44. Swingle KF, Shideman FE. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 1972;183(1):226-34.