

# Efecto del D-004 sobre patrones conductuales en roedores

**Daisy Carbajal Quintana, Vivian Molina Cuevas, Rosa Más Ferreiro y María Lourdes Arruzazabala Valmaña.**

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

Recibido: 19 de mayo de 2006. Aceptado: 31 de octubre de 2006.

Palabras clave: sistema nervioso central, *Roystonea regia*, D-004, hiperplasia prostática.  
Key words: central nervous system, *Roystonea regia*, D-004, prostatic hyperplasia.

**RESUMEN.** El D-004 es un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*) que ha mostrado efectos protectores sobre la hiperplasia prostática (HP) inducida en roedores con testosterona, pero no con dihidrotestosterona y que además, antagoniza respuestas mediadas por los  $\alpha_1$ -adrenoreceptores prostáticos. El D-004 mostró una modesta acción anti-inflamatoria en el modelo de granuloma por algodón, modelo que se acerca más a la condición de inflamación crónica aparejada a la hiperplasia prostática benigna (HPB) en el hombre, lo que podría contribuir, en alguna medida, a su efecto en los modelos de HP. Teniendo en cuenta que los efectos adversos relacionados con el sistema nervioso (SN) están entre los más frecuentes para diversas áreas terapéuticas, es obligado investigar los efectos de las sustancias sobre la función y estructura del SN. La investigación de los efectos sobre patrones conductuales de roedores comúnmente representa la primera etapa de estos estudios. El presente estudio investigó los efectos del tratamiento oral con D-004 (dosis únicas y repetidas) sobre la actividad exploratoria, la respuesta al plato caliente y a las contracciones inducidas con ácido acético (200, 400 y 800 mg/kg), así como sobre la sujeción en varilla rotatoria y la fuerza de agarre en ratones (250, 500 y 1 000 mg/kg). El tratamiento oral con D-004 no modificó la actividad exploratoria, la respuesta al plato caliente y a las contracciones inducidas con ácido acético, así como la sujeción en varilla y la fuerza de agarre. El tratamiento oral con D-004 en el intervalo de dosis indicado no indujo efectos neurotóxicos, ya que no modificó ninguna de las conductas estudiadas.

**ABSTRACT.** D-004 is a lipidic extract obtained from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, showing protective effect on prostatic hyperplasia (PH) induced by testosterone, but not by dihydrotestosterone in rodents and on the other hand, antagonize response mediated by prostatic  $\alpha_1$ -adrenoreceptors. D-004 showed a modest anti-inflammatory action in a granulome cotton pellet induced-inflammation. This experimental model is similar to chronic inflammation that can be present in the man benign prostatic hyperplasia (BPH), contributing this anti-inflammatory effect to the protective results obtained by D-004 in PH models. Taking into account that adverse effects related to nervous system (NS) are more frequent in different therapeutic areas is obligated to research the effect of new substances on function and structure of NS. The researches on rodents conductal pattern commonly represent the first step of these studies. The present study researches the effect of oral treatment with single and repeated doses of D-004 on exploratory activity, hot plate and by acetic acid-induced contractions (200, 400 y 800 mg/kg), as well as in rota rod and force strength (250, 500 y 1 000 mg/kg). The oral treatment of D-004 in the doses range used, did not induce neurotoxic effects because it did not modify the animal behaviour conduct in the assayed tests.

## INTRODUCCION

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es el crecimiento incontrolado del estroma y la glándula prostática, que da lugar a la aparición de síntomas obstructivos del tracto bajo urinario.<sup>1</sup> Aunque su etiología no está totalmente dilucidada, su causa se asocia a los cambios hormonales que ocurren con el envejecimiento. Así, la enzima  $5\alpha$ -reductasa prostática transforma la testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT), metabolito muy activo,<sup>2</sup> promoviendo el crecimiento celular.<sup>2-4</sup> Por tanto, los inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa prostática previenen la progresión de la HPB y sus complicaciones obstructivas.<sup>5</sup> Otros componentes hormonales, como el aumento de los estrógenos prostáticos, contribuyen al desarrollo de la HPB, al aumentar la actividad de sustancias estimulantes del crecimiento celular.<sup>6</sup>

Otros factores independientes de los cambios hormonales también contribuyen al desarrollo de la HPB. En tal sentido, en la próstata hipertrofiada existe un aumento de la población de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.<sup>7</sup> Otro hecho que relaciona estos receptores con la etiología de la HPB es la existencia de diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, mayoritariamente receptores  $\alpha_{1A}$ .<sup>8-11</sup> La denervación de la próstata induce la atrofia de los acinis y disminuye la actividad secretora de la glándula.<sup>12-15</sup> Por tanto, entre las principales opciones farmacológicas para el manejo de la HPB también

se encuentran los antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos.<sup>9</sup>

El uso de la fitoterapia en el tratamiento de la HPB es muy común. En especial, los extractos lipídicos de los frutos de Saw palmetto, palma de la familia *Arecaceae*, se usan para tratar la HPB y se relaciona su eficacia con dos mecanismos fundamentales, la inhibición de la  $5\alpha$ -reductasa prostática y el antagonismo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.<sup>16-21</sup>

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), perteneciente también a las *Arecaceae*, con una composición que presenta similitudes con el extracto del Saw palmetto. Estudios previos han demostrado el efecto profiláctico y terapéutico de la administración oral del D-004 sobre la hiperplasia prostática (HP) inducida con T, no con DHT en ratas,<sup>22-24</sup> lo que sugiere que puede inhibir la enzima  $5\alpha$ -reductasa prostática. Además, el D-004 antagoniza marcadamente *in vitro* la respuesta noradrenérgica mediada por adrenoreceptores  $\alpha_1$  en conducto deferente de rata<sup>25</sup> y antagoniza *in vivo* la reducción del volumen de micción y los cambios histológicos de la próstata inducidos por fenilefrina (Arruzazabala M.L., Más R., Carbajal D., Molina V. Datos de archivo, 2005.).

Además, el D-004 ha mostrado una modesta acción anti-inflamatoria en el modelo de granuloma por algodón que simula la condición de inflamación crónica aparejada a la HPB,<sup>26</sup> lo que sugiere que este efecto anti-inflamatorio podría contribuir, en alguna medida, al efecto del D-004 en los modelos de HP.

Por otra parte, los estudios toxicológicos no han revelado toxicidad potencial del D-004 asociada al tratamiento, y los estudios del potencial mutagénico han mostrado resultados negativos<sup>26</sup> (y Arruzazabala M.L., Más R., Carbajal D., Molina V. Datos de archivo, 2005; Gámez R., Más R., Noa M. *et al.* Estudios toxicológicos del D004. Datos de archivo, 2005.).

La evaluación de los posibles efectos de cualquier nuevo medicamento en desarrollo sobre otros blancos de acción diferentes a los primarios para la cual se propone, constituye un aspecto relevante. Estos estudios permiten demostrar nuevas acciones o indicaciones, que en ocasiones han llegado a ser más importantes que los inicialmente propuestos, tributando así a la Farmacología; o bien dan información sobre posibles efectos adversos (EA) que se deriven de su acción sobre

esos blancos, aspecto que define a la Farmacología de la Seguridad.

Teniendo en cuenta que entre los EA más frecuentes causados por medicamentos de diversas áreas terapéuticas se encuentran los ejercidos sobre Sistema Nervioso (SN), la evaluación de los efectos de los medicamentos sobre el SN es una parte fundamental de estos estudios. En tal sentido, la evaluación de los efectos sobre diferentes patrones conductuales de roedores es la alternativa más común para el inicio de estos estudios.<sup>27,28</sup>

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el posible efecto del tratamiento oral con D-004 sobre el SN de roedores a través de su acción sobre cinco patrones conductuales: la actividad exploratoria en campo abierto, la respuesta a estímulos dolorosos inducidos en plato caliente y por ácido acético, la capacidad de sujeción y ejecución en una varilla rotatoria, así como la fuerza de sujeción.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Ratas Wistar y ratones OF1 machos, adultos jóvenes, con peso corporal entre (200 ± 20) g (ratas) y entre (20 ± 2) g (ratones) respectivamente, fueron suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los animales se adaptaron a las condiciones de laboratorio, temperatura [(25 ± 3) °C], humedad relativa (86 ± 5) % y ciclos luz/oscuridad de 12 h durante 7 d.

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 (CPN).

Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 08:00 y 12:00 h, en un local aislado de ruidos y temperatura controlada.

### Administración y dosificación

El D-004 fue obtenido en el Departamento de Química del CPN y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. se administró suspendido en un vehículo Tween 65/agua al 2 %, por vía oral, mediante entubación gástrica. Las suspensiones se preparaban inmediatamente antes de ser utilizadas. Los tratamientos orales de dosis repetidas se administraron durante 15 d, al término de los cuales se evaluaron los efectos.

La racionalidad de las dosis seleccionadas se basó en utilizar la dosis efectiva más estudiada y a la cual sus efectos han sido comparados con los del Saw palmetto, finasteride y tamsulosin y la mayor es una dosis utilizada como dosis límite incluso en algunos estudios toxicológicos de dosis repetidas, para determinar su efecto sobre el SNC.

## Ensayos y mediciones realizadas

### Actividad exploratoria en campo abierto

Para estudiar la actividad exploratoria en campo abierto, las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos experimentales. Uno control que recibió el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O y tres tratados con D-004 a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg.

Esta conducta se evaluó según una modificación del método de campo abierto,<sup>29</sup> en el cual se cuantificó el número de paradas (P) y de cruces (C) a través de un círculo central que el animal realiza dentro del dispositivo experimental en un tiempo fijo (6 min). La actividad total se consideró la suma de P + C.

### Coordinación motora

**Sujeción y ejecución motora en varilla rotatoria.** Los animales (ratas) se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales (10 animales/grupo): uno control que recibió el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O, tres tratados con D-004 (250, 500 y 1 000 mg/kg) y uno tratado con diazepam (3 mg/kg).

Este ensayo se realizó en un equipo de rotarod (Ugo Basile, Italia)<sup>30</sup> a una velocidad de 8 r/min. Antes de realizar la experiencia todos los animales se evaluaron en esta prueba para descartar los que presentaban posibles afectaciones que le impidieran ejecutar la maniobra respectiva. Los animales que se mantuvieron sobre el rotarod por 2 min o más fueron utilizados en el experimento.

El D-004 (DR) (v.o.) y el vehículo, se administraron a las dosis previstas durante 15 d y los animales fueron colocados sobre la varilla rotatoria y observados durante 5 min. Los resultados fueron expresados como el número de animales que cayeron en el tiempo prefijado, así como el tiempo que demoraron en caer en segundos.

**Fuerza de agarre.** Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales: uno control que recibió el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O, tres grupos tratados

con D-004 (250, 500 y 1 000 mg/kg) y un grupo tratado con diazepam (3 mg/kg).

La fuerza muscular se midió mediante un equipo (Ugo Basile, Italia). El animal fue colocado en la superficie de un plato frente a un trapecio de agarre. Se realizó la tracción al animal por la cola permitiendo que el ratón sujetara con sus patas delanteras al trapecio que registró su fuerza de agarre.

#### Evaluación de efecto analgésico

**Respuesta en plato caliente.** En este modelo, las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (12 animales/grupo): uno control tratado por vía oral con el vehículo Tween 65/agua, y tres tratados con D-004 a dosis de 200; 400 y 800 mg/kg. Tras concluir el tratamiento, las ratas se colocaron en un plato caliente (Ugo Basile, Italia) a la temperatura de  $(57 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . El desplazamiento de los animales sobre el plato se observó a través de un cilindro de vidrio de 19 cm de diámetro y 31 cm de altura. El tiempo de reacción se tomó como el tiempo que tardaban en lamerse una de las patas traseras o que intentaran saltar fuera del cilindro. El ensayo finalizó cuando el animal no respondía en un intervalo de 60 s.

#### Contorsiones por ácido acético.

En el modelo de analgesia por ácido acético los ratones se distribuyeron en cinco grupos, como los antes mencionados y uno tratado con aspirina (100 mg/kg), como analgésico de referencia.

Tras concluir el tratamiento, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 0,2 mL de ácido acético (2 %). Al transcurrir 5 min, comenzaron a cuantificarse las contorsiones y estiramientos ocurridos durante 15 min.

#### Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos tratados y el grupo control se realizó mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney; para lo que se empleó el paquete de programas Statistics para Window (Release 4.2; StatSoft Inc, USA).

### RESULTADOS

#### Efectos sobre la actividad exploratoria

La administración oral de D-004 (200 a 800 mg/kg) no modificó la actividad exploratoria de las ratas respecto a la del grupo control, ni en lo relativo a la actividad global, ni sobre sus componentes individuales (P y C) (Tabla 1).

#### Efectos del D-004 sobre la sujeción y ejecución motora de ratones en varilla rotatoria y la fuerza de agarre

La administración de dosis repetidas de D-004 (250, 500 y 1 000 mg/kg) durante 15 d no mostró diferencias significativas en el número de animales que caían de la varilla rotatoria ni afectó el tiempo de sujeción con relación a los animales del grupo control (Tabla 2), así como tampoco modificó la fuerza de agarre (Tabla 3).

Como era de esperar, el tratamiento con diazepam (3 mg/kg) redujo de manera estadísticamente significativa el tiempo de sujeción en la varilla rotatoria y la fuerza de agarre, demostrando la validez de los modelos en las condiciones experimentales.

#### Efectos sobre la respuesta al plato caliente y contracciones por ácido acético

La administración oral de dosis repetidas de D-004 (200 a 800 mg/kg)

**Tabla 1.** Efectos del D-004 sobre la actividad exploratoria ( $X \pm \text{DE}$ ) en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	C	P	C + P
Dosis únicas					
	0	9	35,6 $\pm$ 8,2	16,4 $\pm$ 2,9	52,0 $\pm$ 11,9
D-004	200	9	34,5 $\pm$ 7,1 ns	14,6 $\pm$ 2,9 ns	49,1 $\pm$ 9,96
D-004	400	9	36,1 $\pm$ 8,5 ns	15,8 $\pm$ 3,5 ns	51,9 $\pm$ 11,1
D-004	800	9	34,5 $\pm$ 7,7 ns	13,0 $\pm$ 2,5 ns	47,5 $\pm$ 10,1
Dosis repetidas					
	0	10	46,6 $\pm$ 6,4 ns	19,1 $\pm$ 2,9 ns	65,7 $\pm$ 7,9
D-004	200	9	46,1 $\pm$ 8,2 ns	19,5 $\pm$ 4,5 ns	65,6 $\pm$ 12,4
D-004	400	10	49,2 $\pm$ 8,4 ns	21,5 $\pm$ 3,6 ns	70,7 $\pm$ 10,8
D-004	800	10	42,1 $\pm$ 5,3 ns	22,4 $\pm$ 2,9 ns	64,5 $\pm$ 8,1

X Media. DE Desviación estándar. P Paradas. C Cruces a través del círculo central. P + C Actividad exploratoria total. n.s. Comparación contra el control (Prueba de la U de Mann Whitney).

**Tabla 2.** Efectos del D-004 sobre la sujeción de ratas en la varilla rotatoria.

Tratamiento	Animales que se caen (n)			Tiempo de sujeción (s)
	Dosis (mg/kg)	Basal (Dosis únicas)	30 d (Dosis repetidas)	
Control	0	0	2	283,9 $\pm$ 16,1
D-004	250	0	3	282,2 $\pm$ 13,7
D-004	500	0	2	283,0 $\pm$ 11,3
D-004	1 000	0	2	283,4 $\pm$ 14,8
Diazepam	3	10 <sup>++</sup>	10 <sup>++</sup>	47,5 $\pm$ 7,0 <sup>***</sup>

\*\*\* p < 0,001 Comparación contra el control (Prueba de la U de Mann Whitney).

++ p < 0,01 Comparación contra el control (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

**Tabla 3.** Efectos del D-004 sobre la fuerza de agarre en ratones

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Fuerza de sujeción (g)
Control	0	10	11,0 $\pm$ 4,4
D-004	250	10	10,7 $\pm$ 3,9
D-004	500	10	10,4 $\pm$ 5,7
D-004	1 000	10	10,3 $\pm$ 3,1
Diazepam	3	10	7,1 $\pm$ 4,7 <sup>***</sup>

\*\*\* p < 0,001 Comparación contra el grupo control. Prueba de la U de Mann Whitney.

**Tabla 4.** Efecto del D-004 sobre las respuestas a estímulos nociceptivos.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de reacción (s)
Respuesta en el plato caliente		
Control		7,1 ± 0,49
D-004	200	7,3 ± 0,31
D-004	400	7,7 ± 0,69
D-004	800	7,5 ± 0,40
Contorsiones inducidas con ácido acético		
D-004	200	21,36 ± 4,6
D-004	400	18,33 ± 2,53
D-004	800	16,22 ± 3,28
Aspirina	100	11,33 ± 2,47*

\*  $p < 0,05$  Comparación contra el grupo control (Prueba de la U de Mann Whitney).

no modificó de manera estadísticamente significativa el tiempo de latencia de la respuesta al estímulo nociceptivo ensayado, ni al plato caliente (4A), ni a la inyección i.p. de ácido acético (4B) (Tabla 4), lo que implica que el tratamiento no afecta la respuesta a estos estímulos dolorosos. Dado su efecto analgésico, la aspirina (ASA, 100 mg/kg), sí antagonizó las contracciones por ácido acético.

## DISCUSIÓN

El objetivo fundamental de un estudio neurofarmacológico consiste en determinar la acción farmacológica y el modo de acción de una sustancia cuya actividad fundamental se ejerce sobre el SN cuando se administra en dosis dentro del intervalo dosis respuesta de su acción farmacodinámica. La mayoría de los estudios neurofarmacológicos se orientan hacia el estudio de variables funcionales agudas que suelen ser reversibles.<sup>31</sup>

Los estudios neurotoxicológicos, sin embargo, enfatizan en las alteraciones de las funciones y estructuras del SN producidas por las sustancias en estudio, particularmente administradas a dosis lo suficientemente elevadas, para detectar cualquier efecto deletéreo, independientemente del órgano, proceso o sistema que constituya su blanco primario de acción. Así, en los estudios neurotoxicológicos se insiste en la búsqueda de alteraciones funcionales del tejido nervioso que, por su intensidad y carácter irreversible, sean indicadoras de toxicidad asociada a la sustancia en cuestión y

consideradas como un efecto no deseado.<sup>31,32</sup>

Sin embargo, aún es insuficiente la comprensión de los mecanismos y relaciones estructura/actividad involucradas en la neurotoxicidad, por lo cual no existe una única clasificación de los agentes neurotóxicos en función del daño que inducen, ya que en su mayoría, las acciones de las sustancias neurotóxicas implican daño o disfunción de diferentes partes del SN y no de un blanco de acción aislado.<sup>32</sup> A pesar de ello, los agentes neurotóxicos pueden clasificarse por su sitio predominante de acción primario o secundario, teniendo en consideración si inducen las afectaciones fundamentales siguientes: sensoriales, motoras, periféricas (sensoriales y motoras) y centrales (integrativas o conductuales).<sup>33</sup>

El método generalmente más útil para detectar una posible acción neurotóxica de una sustancia consiste en la observación cuidadosa, sistemática y planificada de los animales durante los estudios de toxicidad a dosis únicas y repetidas. Así, el uso de diferentes métodos de evaluación ha sido utilizado en las observaciones realizadas en los estudios de toxicidad, como etapa inicial de evaluación de la neurotoxicidad potencial de una sustancia.<sup>32-34</sup> La periodicidad de esta evaluación varía en los diferentes ensayos de toxicidad a dosis únicas y repetidas.

Dentro de estos aspectos se encuentra la evaluación de la actividad locomotora del animal que incluye desde la evaluación de su intensidad hasta la detección de afectaciones en

la marcha.<sup>32-34</sup> Además, se evalúan reflejos tales como enderezamiento, agarre, alerta o escape, respuesta al dolor, sujeción en varilla, respuesta de la pupila y la presencia de signos tales como salivación, lacrimación, convulsiones, temblores, piloerección, estereotipias, inactividad general, catalepsia, diarreas, entre otros.

Sin embargo, esto se enriquece con la realización de estudios específicos de conductas espontáneas o provocadas que permiten cuantificar las conductas observadas como eventos acumulados o como porcentaje de animales que realizan una conducta en un tiempo dado.<sup>34</sup> Estos estudios no solo son de gran utilidad, sino que constituyen los métodos de evaluación de primera opción, ya que la conducta es la respuesta integral del organismo ante los diferentes estímulos que sobre él actúan.

El presente estudio constituye el primer reporte de que el D-004 administrado como dosis orales únicas o repetidas (200 y 800 mg/kg) no afecta la actividad exploratoria, considerada como la conducta espontánea del animal ante un medio que le resulta novedoso y es una de las más utilizadas en la evaluación de efectos sobre el SN central.<sup>34</sup> Esta conducta incluye dos componentes: las paradas del animal, que se vinculan más específicamente a la conducta exploratoria o inquisitiva frente a un nuevo escenario que revela la respuesta coordinada central frente a dicho estímulo y que involucra parte del estado de alerta del animal ante lo desconocido. Por otra parte, los cruces a través del círculo central, si bien también se relacionan con los desplazamientos necesarios para abarcar el universo de exploración del animal, son una expresión más directa de la actividad locomotora del animal.

La ausencia de afectación de la respuesta de plato caliente por el tratamiento con D-004 indica que este no produce afectación de los eventos sensitivos y motores implicados en esta respuesta.

En los animales el dolor no puede evaluarse de modo directo, sino a través de sus respuestas a los estímulos dolorosos. Mucho de lo que se conoce acerca de los mecanismos del dolor se deriva de los modelos de nocicepción somática e hiperalgesia en roedores.<sup>35-37</sup> Las pruebas de algometría inflamatoria se basan en el análisis de la conducta ocasionada directamente por los procesos inflamatorios como el modelo de

constricción abdominal en ratón y la incapacidad de la articulación en ratas.<sup>35</sup> La respuesta en conductas dependientes de inflamación pueden ser disparadas indirectamente por un estímulo secundario exógeno y los más frecuentemente usados son los de naturaleza mecánica o térmica.

En modelos basados en los estímulos térmicos como la clásica prueba del plato caliente se mide la latencia de las respuestas defensivas producidas por el calor de intensidad constante, modelo utilizado para la evaluación de analgésicos que actúan a nivel central, tales como los opioides, pero no permite detectar los efectos analgésicos de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), tales como los inhibidores de la ciclooxigenasa.<sup>35</sup>

En tal sentido, para distinguir entre una acción central analgésica o periférica se utiliza el modelo de contracciones por ácido acético, método simple y confiable que permite una evaluación rápida de analgésicos con acción periférica como los AINE, ya que la contracción abdominal que se produce y se cuantifica se encuentra relacionada con la sensibilización de receptores nociceptivos a las prostaglandinas. Por tal razón, la aspirina, utilizada como sustancia de referencia, sí protegió las contracciones por ácido acético, debido a la inhibición de la ciclooxigenasa. Estos resultados confirman además, la validez del modelo en las condiciones empleadas. Los resultados del estudio del D-004 en este modelo están en correspondencia con la ausencia de efecto anti-inflamatorio evaluado en el modelo de pleuresía por carragenina, modelo muy dependiente de prostaglandinas.

Finalmente, el D-004 tampoco afectó los eventos involucrados en la coordinación y ejecución motora requeridos en el ensayo de la varilla rotatoria y la fuerza de agarre.

En su conjunto, estos resultados indican, que en las pruebas ensayadas, el D-004 no indujo efectos neurotóxicos, en apreciación compatible con los resultados de los estudios toxicológicos que no han evidenciado afectaciones en las conductas espontáneas de los animales ni aparición de conductas bizarras, ni afectaciones histológicas en las estructuras del SN.

## CONCLUSIONES

El D-004 administrado por vía oral en dosis únicas y repetidas a roedores no modificó ninguno de los

patrones conductuales investigados: actividad exploratoria en campo abierto, respuesta a estímulos nociceptivos (plato caliente y contracciones por ácido acético), la sujeción en una varilla rotatoria y la fuerza de agarre.

## BIBLIOGRAFÍA

- Madsen M., Bruskewit T. Benign prostatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. **Curr. Opin Nephrol. Hipert.**, **4**, 455-459, 1995.
- Bartsch G., Rittmaster R.S., Klocker H. Dihydrotestosterone and the role of 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, **61**, (4 Suppl. 1), 2-7, 2003.
- Carson C., Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, **61**, (4 Suppl. 1), 2-7, 2003.
- Deslypere J.P., Young M., Wilson J.D. *et al.* Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **88**, 15-22, 1992.
- Boyle P., Gould A.L., Roehrborn C.G. Prostate volume predicts outcome of treatment of benign prostatic hyperplasia with finasteride: meta-analysis of randomized clinical trials. **Urology**, **48**, 398-405, 1996.
- Barry M.J., Roehrborn C.G. Benign prostatic hyperplasia. **BMJ**, **323**, 1042-1046, 2001.
- Yamada S., Ashizawa N., Ushijima H. *et al.* Alpha-1 adrenoceptors in human prostate: characterization and therapeutic alteration in benign prostatic hypertrophy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **24**, 326-332, 1987.
- Kawabe K., Ueno A., Takimoto Y. *et al.* Use of an alpha-blocker, YM-12617, in the treatment of benign prostatic hypertrophy. YM617 clinical study group. **J. Urol.**, **144**, 908-915, 1990.
- Jonlar M., Riehm M., Bruskewitz R.C. Benign prostatic hyperplasia: Current pharmacological treatment. **Drugs**, **47**, 66-71, 1994.
- Baumgarten H.G., Falck B., Holstein A.F. *et al.* Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: A fluorescence microscopic and fluorimetric study. **Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.**, **90**, 81-95, 1978.
- Lepor H., Tang R., Meretyk S., Shapiro E. Alpha-1-adrenoceptor subtypes in the human prostate. **J. Urol.**, **149**, 640-642, 1993.
- Lepor H., Tang R., Meretyk S., Shapiro E. Binding and functional properties of alpha-1-adrenoceptors in different regions of the human prostate. **J. Urol.**, **150**, 253-256, 1993.
- Acosta S., Dissey N., Pierzynowski S. *et al.* Neuroendocrine cells and nerves in the prostate of the guinea pig: Effects of peripheral denervation and castration. **The Prostate**, **46**, 191-199, 2001.
- Wang J.M., McKenna K.E., McVary K.T., Lee C. Requirement of innervation for the maintenance of structural and functional integrity in the rat prostate. **Biol. Reprod.**, **44**, 1171-1176, 1991.
- Martínez-Piñero L., Dahiya R., *et al.* Pelvic plexus denervation in rats causes morphologic and functional changes of the prostate. **J. Urol.**, **150**, 215-218, 1993.
- Plosker G.L., Brodgen R.N. *Serenoa repens* (Permixon). A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in benign prostatic hyperplasia. **Drugs Aging**, **9**, 379-395, 1996.
- Gerber G.S., Zagaja G.P., Bales G.T., *et al.* Saw palmetto (*Serenoa repens*) in men with urinary tract symptoms: effects on urodynamic parameters and voiding symptoms. **Urology**, **51**, 1003-1007, 1998.
- Carraro J.C., Raynaud J.P., Koch G. *et al.* Comparisons of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1098 patients. **Prostate**, **29**, 231-40, 1996.
- Marks E. Effects of Saw palmetto herbal blend in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.**, **163**, 1451-1456, 2000.
- Goepel M., Hecker U., Kregel S., *et al.* Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha 1 adrenoceptors *in vitro*. **Prostate**, **38**, 208-215, 1999.
- Gutierrez M., Garcia de Boto M.J., Cantabrana B., Hidalgo A. Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from *Sabal serrulata* fruit on smooth muscle. **Gen. Pharmacol.**, **2**, 171-176, 1996.
- Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. *et al.* Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. **Drugs Exptl. Clin. Res.**, **XXX**, 227-234, 2004.
- Carbajal D., Arruzazabala M.L., Más R. *et al.* Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostate hyperplasia induced with testosterone and dihydrotestosterone in rats. **Curr Ther. Res. Clin. & Exptl.**, **65**, 505-514, 2004.
- Carbajal D., Molina V., Más R., Arruzazabala M.L. Therapeutic Effect Of D-004. A Lipid Extract From Roystonea Regia Fruits, On Prostate Hyperplasia Induced In Rats. **Drugs Exptl. Clin. Res.**, **31**, 193-7, 2005.
- Arruzazabala M.L., Más R., Carbajal D., Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by a adrenoceptors in rats. **Drugs R.D.**, **6**, 281-9, 2005.
- Alder S., Candrian R., Elsner J. *et al.* Neurobehavioral screening in rats: A

- validation study. **Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.**, **8**, 279-289, 1986.
27. Tilson H. Behavioral indices of neurotoxicity. ¿what can be measured? **Neurotoxicol. Teratol.**, **28**, 427-443, 1987.
29. Fernández L., Pérez H., Más R. *et al.* Efectos de *Justicia pectoralis* sobre la conducta exploratoria en ratones. En: Estudios Avanzados en Neurociencias. Editorial CENIC, Ciudad de La Habana, 257-264, 1987.
29. Holzer P., Jurna I., Gambe R. *et al.* Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment, **Eur. J. Pharmacol.**, **58**, 511-514, 1979.
30. Coughenour L., Mac Lean J., Parker R. A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior**, **6**, 351-353, 1977.
31. Chang L.W., Slikker W. *Neurotoxicology: Approaches and Methods*. Academic Press, San Diego, 1995.
32. Gad S.C. *Neuro and Behavioral Toxicology Testing*. En *Product Safety Evaluation Handbook*. Ed. Gad S.C. Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 223-242, 1999.
33. Mitchel C.L., Tilson H.A. Behavioral toxicology in risk assessment: Problems and research needs. **Crit. Rev. Toxicol.**, **10**, 265-274, 1982.
34. Shillito E.E. A method for investigating the effect of drugs on the exploratory behavior of mice. **Br. J. Pharmacol.**, **40**, 113-116, 1970.
35. Le Bars D., Gozariu M. & Cadden S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, **5**, 597-652, 2001.
36. Tonussi C.R. & Ferreira S.H. (Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor-mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eu. J. Pharmacol.**, **326**, 61-6, 1997.
37. Hunskaar S., Berge O.G. & Hole K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Res.**, **21**, 101-108, 1986.

## OFERTAS DOCENTES CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR

El Centro Nacional de Investigaciones Científicas es una institución multicéntrica y de carácter multidisciplinario perteneciente al Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, dedicada a la investigación científica con un elevado desarrollo en las áreas de las ciencias naturales, biomédicas y tecnológicas.

Trabaja a ciclo completo, es decir, realiza investigación, desarrollo, producción y comercialización de sus resultados científicos. La formación de recursos humanos es también parte integrante de su misión.

El 53,7 % de su claustro de investigadores lo constituyen doctores en ciencias y el 23 %, maestros en ciencias en diferentes especialidades.

Está debidamente facultado por el Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, para ejercer la actividad de pregrado, postgrado y capacitación y ha formado en actividades de postgrado a más de 25 000 profesionales del país. Ha sido una verdadera incubadora de centros científicos y cuenta en su haber con la creación de siete importantes instituciones en el curso de su desarrollo histórico.

Temas frecuentes de trabajo en las modalidades de los diferentes cursos que oferta:

- 📖 Tecnologías para la fabricación de equipos médicos de última generación.
- 📖 Tecnología láser en cirugía.
- 📖 Equipos médicos para el diagnóstico de enfermedades.
- 📖 Equipos médicos para el diagnóstico microbiológico.
- 📖 Aspectos generales sobre la ozonoterapia. Equipos médicos para ozonoterapia.
- 📖 Equipos para el tratamiento de agua y aguas residuales de las instalaciones hospitalarias y farmacéuticas.
- 📖 Gestión ambiental.
- 📖 Control de la calidad en laboratorios de ensayo.
- 📖 Bioética: un puente sobre educación y diversidad.
- 📖 Condiciones generales acerca de la metodología en la investigación científica.
- 📖 La Didáctica y sus componentes: herramienta para la formación de investigadores.

Para mayor información:

Departamento de Docencia, Dirección de Capital Humano.

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Teléfono (53) 7 208 2553. Correo electrónico: [dpto.postgrado@cnic.edu.cu](mailto:dpto.postgrado@cnic.edu.cu)

Avenida 25 No.15202 esquina a Calle 158, Playa, Apartados Postales 6412 y 6414, Código Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

COMUNICACION CORTA

# Estudio de laboratorio del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) y su posible utilización para el control de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)

Maureen I. Leyva, Juan E. Tacoronte,\* Agustín Navarro, Domingo Montada, Avilio Bello\*\*\* y María C. Marquetti.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista "Novia del Mediodía" km 6½, Apartado Postal 601, La Lisa, Ciudad de La Habana. \*Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas, Ministerio de la Industria Básica. \*\*Instituto Superior Pedagógico "Rafael María de Mendive", Pinar del Río, Cuba.

Recibido: 17 de noviembre de 2006. Aceptado: 26 de diciembre de 2006.

Palabras clave: plantas, aceite esencial, *Pimenta racemosa*, actividad plaguicida, insectos, *Musca domestica*.  
Key words: plants, essential oil, *Pimenta racemosa*, insecticide activity, insects, *Musca domestica*.

*Musca domestica* Linnaeus (1758), es uno de los insectos más ampliamente distribuido en el mundo y posee gran potencial en la transmisión de parásitos patógenos al hombre.<sup>1</sup> Entre las principales enfermedades transmitidas por este vector se encuentran la disentería, las diarreas infantiles, el cólera, la helmintosis, entre otras, lo que unido a su estrecha relación con el hombre le confiere gran importancia en la salud pública y desde el punto de vista higiénico ambiental.<sup>2</sup>

Para el control de esta especie se han utilizado diversos métodos; entre los cuales se pueden citar el uso de insecticidas químicos en forma adulticida o larvicida, lo que ha traído aparejado la aparición de resistencia.<sup>2</sup> Esto ha conducido a la búsqueda de nuevos compuestos que resulten menos tóxicos como es el caso de los productos naturales de origen vegetal. Es por eso de gran importancia comenzar ensayos con nuevos compuestos que podrían ser usados individualmente o combinados con otros insecticidas como alternativas para ese fin.

Cuba posee una extensa y variada flora, de la cual se han reportado 138 especies de plantas biosintetizadoras de sustancias con actividad plaguicida, lo cual ha sido comprobado en 51 de estas especies pertenecientes a las familias *Meliaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae* y *Myrtaceae*.<sup>3</sup>

*Pimenta racemosa* (Will) J.W. Moore (Myrtales: Myrtaceae) es un árbol de 18 m de altura, presente en Sur América, las Antillas y Cuba, donde se distribuye en la provincia de Pinar del Río y la región oriental. Ha sido muy utilizado en la carpintería y ebanistería. Sus hojas destiladas producen un aceite esencial de olor a especia. No se conoce ningún reporte publicado sobre su posible actividad biológica en *Musca domestica* y no existen antecedentes de estudios similares realizados con esta planta en el campo de la Salud Pública en Cuba. Por esta razón, este trabajo se propuso estudiar en el laboratorio la posible actividad biológica del aceite esencial foliar de esta planta sobre *M. domestica*.

Hojas de *P. racemosa* fueron colectadas en la provincia de Pinar del Río y su aceite esencial extraído por el método de hidrodestilación.<sup>4</sup> Se realizaron bioensayos de laboratorio con una cepa de terreno nombrada "Bentré", estabilizada en el propio laboratorio y susceptible a Lambda-cialotrina (17 ppm), Permetrina (35 ppm), Metil Pirimifos (170 ppm) y Propoxur (840 ppm).

Se realizaron tres bioensayos para cada una de las dosificaciones probadas, utilizando cuatro réplicas en cada caso y los controles correspondientes a (25± 2) °C y (70± 10) % de humedad relativa. Se utilizaron 25 ejemplares hembras de 3 a 6 d de edad por réplica, los que fueron alimentados con leche en polvo y agua con azúcar, según metodología de la OMS.<sup>5</sup>

Se probaron cuatro dosificaciones (2,5; 0,5; 0,05 y 0,025%), las cuales fueron disueltas en butanona y aplicadas después tópicamente a razón de 1 µL de disolución en el tórax de los insectos previamente anestesiados con hielo. Los controles de cada dosis probada fueron tratados con 1 µL de butanona.

Correspondencia:

Maureen I. Leyva Silva

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista "Novia del Mediodía" km 6 ½ Apartado 601, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 53-7-204 6051 y 53-7-202 0633. Correo electrónico: maureen@ipk.sld.cu

La determinación de la mortalidad se realizó a las 24 h y se utilizó un programa computarizado (Probit-Log<sup>6</sup>) para la obtención de las DL<sub>50</sub> y DL<sub>95</sub>. Es de destacar que no fue necesario utilizar la fórmula de Abbot para corregir los resultados correspondientes a la determinación de la mortalidad, ya que esta resultó menor del 5 % en los controles (Tabla 1).

Se obtuvo la ecuación de la recta

$$y = 5,84 + 2,15 x$$

cuya pendiente reveló que la cepa de *Musca domestica* estudiada presen-

ta susceptibilidad al aceite esencial de *P. racemosa*.

Los resultados permitieron adoptar una dosis diagnóstico de 2 µg/insecto al 0,96 % del aceite esencial de *P. racemosa* como patrón de referencia para la vigilancia de la susceptibilidad de poblaciones de este vector ante formulaciones de este aceite, así como recomendar su utilización como alternativa al empleo de los insecticidas convencionales, a los cuales la especie de insecto estudiada ha mostrado resistencia como parte del manejo integrado para su control en distintas partes del mundo.

Actualmente, se trabaja en la elaboración de formulaciones del aceite esencial para su aplicación en el terreno y se estudian sus efectos sobre los indicadores poblacionales de *Musca domestica*.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Greenberg B. Flies and diseases. Princeton, N.J. Princeton University. 1-2, 1973.
2. Keiding J. House-fly. Biology and control. Vector Control Series. WHO/VBC/86.937, 1986.
3. Aguilera L., Tacoronte J.E., Leyva M., Navarro A., Bello A., Marquetti M.C. Actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* (Familia: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) Memorias del Congreso Latinoamericano de Etnomedicina. Venezuela, Caracas, 2001.
4. Bello A., Pino J., Marbot R., Urquiola A. y Agüero J. Componentes volátiles de plantas de la familia Myrtaceae de la región occidental de Cuba. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **32**, 143-7, 2001.
5. Organización Mundial de la Salud. Instrucciones para determinar la resistencia y(o) susceptibilidad de *Musca domestica*. WHO/VBC 81.813, 1985.
6. Raymond M. Presentation d'un programme d'analyse Log-Probit pour micro-ordinateur. Cah ORSTOM. **Ser Ent. Med. et Parasitol.**, **22**, 117-21, 1985.

**Tabla 1.** Mortalidad y dosis letales (DL<sub>50</sub> y DL<sub>95</sub>) calculados para el aceite esencial de *Pimenta racemosa* en *Musca domestica*.

(%)	Mortalidad (%)	DL <sub>50</sub> LC 95 %	DL <sub>95</sub> LC 95 %	b <sup>1</sup>	χ <sup>2</sup>
0,025	66,7	0,009	0,24	2,15	1,0
0,05	83,3	0,002 2 a 0,017 6	0,132 a 0,98		
0,5	96,7				
2,5	100,0				

<sup>1</sup> Pendiente de la línea de regresión.

Se reportan valores promedio de mortalidad, así como las dosis letales (DL) y sus límites de confianza respectivos (LC).

## RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

### DESARROLLO DE UN LABORATORIO VIRTUAL EN DISCIPLINAS SELECCIONADAS DE LA CARRERA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

Colectivo de la Universidad Central de Las Villas "Marta Abreu", Universidad de Oriente, Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, Instituto Superior Politécnico "José A. Echevarría", Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" y Centro Universitario de las Tunas.

La creación de un laboratorio virtual en la carrera de Ciencias Farmacéuticas ha sido de suma importancia para el cumplimiento de objetivos y habilidades a formar en las asignaturas previstas en el plan de estudios. Como resultado del proyecto, ya se dispone de un conjunto de programas especializados para la simulación de prácticas de laboratorio en las asignaturas de Farmacología, Bioquímica General, Anatomía y Química Farmacéutica.

Asimismo, se digitalizaron videos que se emplean con esos mismos propósitos en la disciplina de Tecnología Farmacéutica. Igualmente, se aplican programas especializados en clases prácticas y seminarios de asignaturas tales como: Farmacocinética, Bioquímica General y Biología Celular.

El laboratorio virtual posibilita la realización simulada de numerosas prácticas de laboratorio y aporta otros muchos materiales didácticos. Su contenido es utilizado en todo el país en la carrera de Ciencias Farmacéuticas en los Centros de la Educación Superior del Ministerio de la Educación Superior.