

Efecto del D-003 sobre los niveles de endotelemia en no roedores

Sarahí Mendoza Castaño, Miriam Noa Puig, Rafael Gámez Menéndez, Rosa Más Ferreiro

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 25 Ave, Post Box: 6880, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba, E-Mail: dalmer@ip.etcscu.cu.

Recibido: 12 de octubre del 2003

Aceptado: 28 de noviembre del 2002

Palabras clave: D-003, ácidos alifáticos, cera de caña de azúcar, efecto antiplaquetario, ensayo preclínico, modelos animales.

Key words: D-003, aliphatic acids, sugar cane wax, antiplatelet affects, preclinical assay, animal models.

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos de muy alto peso molecular purificada de la cera de la caña de azúcar con acción hipolipemiente y antiagregante plaquetaria. La inhibición de la agregación plaquetaria inducida por el D-003 se relaciona con una disminución de los niveles plasmáticos de tromboxano B₂ (TxB₂) (metabolito estable del TxA₂), y un incremento de los niveles de 6 ceto PgF₁alfa (PGI₂). Teniendo en cuenta que el TxA₂ es un agente vasoconstrictor que puede inducir daño en el endotelio vascular y que el nivel de células endoteliales circulantes (CEC) en el plasma (endotelemia) es un reflejo indirecto de ese daño, el objetivo de este estudio consistió en investigar el efecto del D-003 (200 y 400 mg/kg) sobre el nivel de endotelemia de dos especies no roedoras. Para ello, se realizó una primera experiencia en conejos tratados durante 30 días con D-003 (5 y 100 mg/kg), en la que se investigó el efecto del tratamiento sobre los niveles de endotelemia antes (condiciones basales) y después de la inducción de daño endotelial por inyección intravenosa de citrato de sodio. En la experiencia en perros se investigaron los efectos del tratamiento a largo plazo (6 meses) con altas dosis de D-003 (200 y 400 mg/kg) sobre los niveles basales de endotelemia. El D-003 (5 y 100 mg/kg) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los niveles de CEC en el plasma de conejos en condiciones basales respecto al control en un 57 % y un 60 %, respectivamente, lo que muestra una reducción marcada, pero sin dependencia de la dosis en el rango investigado. La inyección de citrato incrementó significativamente los niveles de endotelemia en todos los grupos, si bien los valores de los grupos tratados fueron significativamente menores que los del control ($p < 0.05$), reflejando inhibiciones del 55.2 % (5 mg/kg) y del 60.2 % (100 mg/kg). Por otra parte, la experiencia en perros mostró que el D-003 (200 y 400 mg/kg) disminuyó los niveles plasmáticos de CEC en un 40.7 % y un 41.6 %, lo que muestra un efecto moderado (< 50 % de inhibición) y no dependiente de las dosis empleadas. En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con dosis repetidas de D-003 disminuye los niveles de endotelemia basal en ambas especies con una intensidad de moderada a marcada, sin que se aprecie dependencia de las dosis y el tiempo de tratamiento en los esquemas investigados. Este hecho, unido a la marcada inhibición del incremento de las CEC en plasma inducida por citrato, sugieren que el D-003 presenta una acción protectora sobre el endotelio vascular en condiciones basales o de daño inducido.

ABSTRACT. D-003 is a mixture of very high molecular weight primary aliphatic acids purified from sugar cane wax with lipid-lowering and antiplatelet effects. The inhibition of platelet aggregation induced by D-003 has been associated with a reduction on plasma tromboxane B₂ (TxB₂) (stable

metabolite of TxA₂) levels and a concomitant increase 6 keto PgF₁alpha (PGI₂) levels. Taking into account that TxA₂ is a vasoconstrictor agent that induces endothelial damage and that the number of plasma circulating endothelial cells (PCEC) is an indirect indicator of such damage, this work investigated the effects of D-003 on PCEC of two non-rodent species the induction of endothelial damage with an endovenous injection of sodium citrate to rabbits. The study conducted in Beagle dogs investigated the effects of long-term (6 months) treatment with high doses of D-003 (200 y 400 mg/kg) on baseline endothelemia. D-003 (5 and 100 mg/kg) significantly lowered ($p < 0.05$) the baseline levels of PCEC in rabbits compared with controls by 57 % and 60 %, respectively, which shows a marked reduction, not related with the doses investigated. Citrate injection significantly increased endothelemia in all groups, but the values of the treated groups were significantly lower than the controls ($p < 0.05$) by 55.2 % (5 mg/kg) and 60.2 % (100 mg/kg). On the other hand, the dog study showed that D-003 (200 and 400 mg/kg) significantly, moderately (inhibition < 50 %) and no dose-dependently reduced ($p < 0.05$) PCEC by 40.7 % and 41.6 %. As a whole, these results indicate that D-003 repeatedly administered moderate to markedly decreases baseline endothelemia levels in both species, being the effects no dose dependent within the investigated dosage schemes. This fact, together with the marked in-

hibition of the increase of PCEC levels induced by sodium citrate, suggests that D-003 exert a protective effect on vascular endothelium in baseline or damage-induced conditions.

INTRODUCCIÓN

El endotelio ha sido reconocido como el principal regulador de la homeostasis vascular. Las células endoteliales (CE), como la capa más interna de los vasos sanguíneos, están estratégicamente ubicadas entre las células sanguíneas y la musculatura lisa de los vasos. La integridad funcional del endotelio es crucial para el mantenimiento del flujo sanguíneo y la capacidad antitrombótica, ya que las CE liberan sustancias vasoactivas que causan contracción o relajación, trombogénesis o fibrinólisis, activación o inhibición de las plaquetas. La pérdida del equilibrio entre la capacidad de inducir la relajación y la contracción vascular evidencia una disfunción endotelial que acompaña al desarrollo de enfermedades vasculares, de modo tal que la hipercolesterolemia (HC), la hipertensión arterial y la diabetes constituyen factores que propician el desarrollo de la disfunción arterial y sus consecuencias, tales como el desarrollo de la aterosclerosis, proceso común subyacente de las enfermedades vasculares coronarias, cerebrales y periféricas.^{1,2}

El deterioro de la función del endotelio vascular se acompaña de modificaciones estructurales que se expresan a través de diferentes indicadores. Entre ellas, los niveles de las carcacas de las CE descamadas en la circulación sanguínea (endotelemia) se reconocen como un indicador indirecto del daño del endotelio vascular.³⁻⁹

El D-003 es una mezcla de ácidos grasos alifáticos de muy alto peso molecular purificada de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L) cuyo principal componente es el ácido octacosanoico, seguido de otros ácidos componentes minoritarios como son triacontanoico, dotriacontanoico y tetracontanoico entre otros.¹⁰

Estudios previos han indicado que el D-003 (5 and 200 mg/kg) administrado durante 30 días redujo de modo significativo y dosis dependiente los niveles colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y el colesterol total (CT) en conejos normo-colesterolémicos^{11, 12} y en voluntarios sanos.¹³ Ha sido demostrado que la acción hipolipemiente del D-003 se asocia a una inhibición de la síntesis de colesterol.¹⁴

Por otra parte, el D-003 (5 and 200 mg/kg) ha mostrado efectos antiagregante plaquetario y antitrombótico en modelos experimentales^{15, 16} y en voluntarios sanos.¹⁷ La inhibición de la agregación plaquetaria producida por el D-003 está relacionada con la reducción de los niveles plasmáticos de tromboxano B2 (TxB2) (metabolito estable del TxA2), y el incremento marcado de los niveles de 6 ceto PgF1alfa (PGI₂).¹⁸ Ha sido referido que el tromboxano A₂, es un agente vasoconstrictor que puede inducir daño endotelial,¹⁹ lo que hace concebible que una sustancia que disminuya los niveles de este metabolito del ácido araquidónico pueda ejercer una acción protectora sobre el endotelio vascular.

El objetivo del presente trabajo consistió en investigar el posible efecto protector del D-003 sobre el endotelio vascular de dos especies no roedoras a través de sus efectos sobre los niveles plasmáticos de células endoteliales circulantes (CEC) en condiciones basales y de daño endotelial inducido por citrato de sodio.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Los animales fueron adquiridos en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) y se adaptaron durante 14 días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 25 ± 2°C, la humedad entre el 55-60 % y la iluminación en ciclos de 12 horas. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para cada especie preparado en el CENPALAB. Toda la manipulación de los animales se

realizó de acuerdo a los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio y a los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales.

En la experiencia de corto término (30 días) se utilizaron conejos machos F1 adultos jóvenes con un peso corporal entre 1.5 y 2.0 kg, mientras que en la experiencia de largo plazo (9 meses) se utilizaron perros Beagle adultos jóvenes de ambos sexos con un peso corporal entre 9 y 10.5 kg que formaban parte de un estudio de toxicidad crónica del D-003

Administración y dosificación

El D-003 utilizado fue suministrado por el Departamento de Química Farmacéutica del CPN después de corroborar sus especificaciones de calidad. Para su administración, el D-003 se suspendió en un vehículo goma acacia/H₂O (10 mg/ml), preparándose las suspensiones semanalmente de acuerdo al incremento de los pesos por grupos de experimentación.

En ambas experiencias, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos: un grupo control formado por animales tratados con el vehículo Tween 20/agua y 2 grupos tratados con D-003 y se administraron por vía oral con D-003 mediante entubación gástrica a un volumen constante (25 mL/animal), 6 días por semana. En la experiencia en conejos los grupos estuvieron formados por 7 animales, mientras que en la experiencia en perros se utilizaron 6 animales/grupo.

En la experiencia en conejos las dosis seleccionadas fueron 5 y 100 mg/kg, teniendo en cuenta que 5 mg/kg es la menor dosis efectiva del D-003 como hipolipemiente en esta especie¹¹ y como antitrombótico en ratas^{14, 15, 17} y que 100 mg/kg es una dosis lo suficientemente alta (20 veces mayor que la mínima) para poder detectar una relación dosis efecto en ese rango. En la experiencia en perros, sólo se investigó el efecto de dosis altas por tratarse de animales procedentes de

un estudio de toxicología crónica en esa especie.

Cuantificación de células endoteliales.

La cuantificación de las carcasas de las CE en plasma se realizó según la técnica descrita por Hladovec y Rossman,²⁰ para lo cual se les extrajeron muestras de sangre venosa: de la vena marginal de la oreja en el caso de los conejos y de la safena en el caso de los perros. A la sangre se le añadió citrato de sodio al 3,8 % en relación 1/9 (v/v), se centrifugó a 395 g durante 20 min a 4 ° C, obteniéndose plasma rico en plaquetas (PRP). A una alícuota de 1 mL de PRP se le añadieron 0.2 mL de ADP en una concentración de 1 mg/mL. La mezcla se agitó mecánicamente durante 20 min en posición horizontal y se centrifugó a 295 g durante 20 min a 4 ° C con el objetivo de que sedimentaran las plaquetas agregadas. El sobrenadante así obtenido se centrifugó nuevamente a 2100 g durante 20 min a 4 ° C para garantizar la precipitación de las CE. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0.1 mL de solución salina. Esta suspensión fue el punto de partida para el conteo de CE.

Los conteos celulares se realizaron en la cámara de Fuchs Rosenthal y los resultados se expresaron como el valor promedio de cuatro conteos.

Análisis estadístico

La comparación de los valores basales de CE en plasma de conejos y los obtenidos después de la inyección con citrato de sodio se determinaron con el test de Wilcoxon para muestras pareadas, mientras que las comparaciones vs el control en cada experiencia se realizaron con el test de la U de Mann Whitney. Los tests utilizados eran de dos colas. Un $\alpha = 0.05$ fue asumido *a priori* para la significación estadística

RESULTADOS

Las Tablas 1 y 2 resumen los resultados del conteo de CE en el plasma de conejos y perros Beagle después de 30 días y 9 meses de tratamiento, respectivamente, con

D-003 a las dosis de 5 y 100 mg/kg (conejos) y dosis de 200 y 400 mg/kg (perros). En ambas experiencias todos los animales llegaron a su término, no apreciándose deterioros en su estado físico, consumo de alimentos y conducta que evidenciara toxicidad asociada al D-003.

El D-003 (5 y 100 mg/kg) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los niveles de CEC en el plasma de conejos en condiciones basales respecto al control en un 57 % y un 60 %, respectivamente, lo que muestra una reducción marcada, pero sin dependencia de la dosis en el rango investigado. La inyección de citrato incrementó significativamente los niveles de endotemia en todos los grupos, si bien los valores de los grupos tratados fueron significativamente menores que los del control ($p < 0.05$), reflejando inhibiciones del 55.2 % (5 mg/kg) y del 60.2 % (100 mg/kg) (Tabla 1).

Por otra parte, la experiencia en perros mostró que el D-003 (200 y 400 mg/kg) disminuyó los niveles plasmáticos de CEC en un 40.7 % y un 41.6 %, lo que muestra un efecto moderado (< 50 % de inhibición) y no dependiente de las dosis empleadas (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El endotelio arterial se encuentra involucrado en la regulación fisiológica del tono vascular y en la transformación estructural de las arterias bajo condiciones patológicas. En condiciones fisiológicas las CE segregan sustancias tales como la prostaciclina y el óxido nítrico, las cuales producen vasodilatación, relajación de las células musculares lisas (CML) y garantizan el tono vascular normal. Las CE dañadas o excesivamente activadas segregan sustancias vasoconstrictoras como el TxA_2 y la endotelina, junto a factores que promueven el crecimiento de las CML.^{1,2} La disfunción del endotelio se caracteriza por el desequilibrio entre los factores constrictores o relajantes que se liberan del endotelio, y tal condición puede ser causa y/o consecuencia de enfermedades vasculares ateroscleróticas.

La disfunción funcional del endotelio precede las alteraciones estructurales de la vasculatura, indicando así el papel protector del endotelio funcionalmente intacto.^{1,2}

De lo anterior resulta evidente la importancia de evaluar el efecto de diferentes factores y procesos sobre la función endotelial, aspecto que se lleva a cabo mediante la investigación del efecto producido sobre diferentes indicadores, directos o indirectos, de la función endotelial. La determinación de los niveles plasmáticos de CEC es un método indirecto de evaluar la función endotelial, que ha sido utilizado en la investigación de los efectos de diferentes procedimientos farmacológicos y no farmacológicos sobre esta variable.³⁻⁹

Por otra parte, teniendo en cuenta que el TxA_2 es uno de los compuestos vasoconstrictores liberados por el endotelio que propician su disfunción, la investigación de los efectos de aquellas sustancias que disminuyan los niveles de este metabolito sobre indicadores de la función endotelial es uno de los enfoques que permite evaluar su posible efecto protector a este nivel. Así, inhibidores de la síntesis del TxA_2 (dazoxiben, levamisol)^{21,22} y antagonistas del TxA_2 (lobenzarit)^{23,24} disminuyen los valores de CEC.

Este estudio demuestra que el D-003 disminuyó de moderada (< 50 %) a marcadamente (> 50 %) el número de CEC en el plasma de dos especies no roedoras en condiciones basales, lo cual sugiere un efecto protector en un estado de equilibrio funcional. Además, el D-003 mostró un marcado (> 50 %) efecto protector frente al daño inducido por citrato en conejos, lo cual indica que en condiciones de factores agresivos al funcionamiento endotelial que remeda parcialmente la condición subyacente en los procesos aterotrombóticos, también está presente su acción protectora en una magnitud similar a la evidenciada en condiciones basales.

El efecto del D-003 no parece depender de las dosis empleadas, al menos dentro de los rangos evaluados, ya que administrado durante corto o largo plazo en ambas series experimentales no se apre-

ciaron diferencias entre los efectos alcanzados con las dosis menores y mayores investigadas. En tal sentido, si bien en el estudio en perros pudiera argumentarse que tal relación puede no manifestarse por tratarse de dosis elevadas y relativamente cercanas entre sí, ya que la mayor dosis (400 mg/kg) resulta sólo el doble de la menor dosis (200 mg/kg) estudiada; en el caso del estudio en conejos el rango 1/20 entre la dosis menor (5 mg/kg) y mayor (100 mg/kg) investigadas es lo suficientemente distante para que tal relación se manifestara, salvo que dosis < 5 mg/kg resulten efectivas en la reducción de este indicador, y que a partir de esta dosis ya el efecto sea máximo. Estudios ulteriores deben investigar los efectos de diferentes dosis de D-003 sobre los niveles plasmáticos de CEC para poder determinar o descartar la dependencia de las dosis de este efecto del D-003.

El efecto observado tampoco parece depender del tiempo de tratamiento, ya que los porcentajes de inhibición alcanzados en la experiencia realizada en perros durante 9 meses resultan moderadamente inferiores que los alcanzados tras una administración de tan sólo 30 días en conejos. Sin

embargo, tal apreciación no constituye aún una conclusión, ya que no puede descartarse el hecho de que el conejo presente como especie una mayor sensibilidad a los efectos del D-003 que el perro. De este modo, estudios que involucren tratamientos de mayor duración en conejos o de menor duración en perros brindarían nuevos elementos para confirmar o descartar este aspecto.

El hallazgo de estos efectos inducidos por el D-003, por tanto, resulta lógico teniendo en cuenta su acción sobre los niveles de Tx_2 y de prostaciclina. Más aún, el D-003 presenta una cercanía estructural y metabólica con los componentes del policosanól, una mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores purificada de la misma fuente.²⁵ Así, no sólo la relación e interconversión de alcoholes y ácidos grasos de muy alta cadena ha sido demostrada en cultivos de fibroblastos,²⁶ sino que ha sido demostrado que el ácido octacosanoico, principal componente del D-003, es un metabolito activo del policosanól.¹⁸

Por ello, una similitud, al menos parcial, de los efectos farmacológicos del D-003 y el policosanól resulta lógica, hecho que ha sido

demostrado en estudios que han investigado los efectos hipolipemiantes y antiagregantes, los cuales han revelado que el D-003 tiende a producir efectos más pronunciados y rápidos que los inducidos por el policosanól. En tal sentido, estudios previos han demostrado que el policosanól reduce las CEC en plasma de ratas Sprague Dawley con daño endotelial inducido por citrato de sodio; en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)²⁷, en conejos con hiperplasia intimal inducida por una abrazadera en la carótida²⁸ y en ancianos con HC y alto riesgo coronario.²⁹

Por ello, los resultados aquí descritos resultan consistentes, si bien se requiere de estudios ulteriores que investiguen la influencia de las dosis y el tiempo del tratamiento, así como la reversibilidad del efecto y su presencia en modelos con daño aterosclerótico presente tales como en las ratas SHR y la hiperplasia de la íntima inducida por diferentes medios.

CONCLUSIONES

En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con dosis repetidas de D-003 disminuye los niveles de endotelemia basal en ambas especies con una intensidad

Tabla 1. Efecto del D-003 sobre los niveles de células endoteliales circulantes (CEC) en conejos

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Número de CEC/mL de PRP			
		Condiciones basales	% de inhibición	Después del daño por citrato	% de inhibición
Control	0	393,6 ± 52,1	-	491,8 ± 50,4 *	-
D-003	5	168,4 ± 34,8 +	57	220,5 ± 26,7 **	55,2
D-003	100	157,0 ± 19,4 +	60	195,7 ± 22,7 **	60,2

PRP: plasma rico en plaquetas

* $p < 0,05$: Comparación con las condiciones basales (Test de Wilcoxon para muestras pareadas).

+ $p < 0,05$: Comparación con el grupo control (Test de la U de Mann Whitney)

Los valores representan la media ± desviación estándar

Tabla 2. Efecto del D-003 sobre los niveles de células endoteliales circulantes (CEC) en perros

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Número de células/mL de PRP	% de inhibición
Control	0	300,2 ± 45,8	-
D-003	200	177,9 ± 22,1 +	40,7
D-003	400	175,3 ± 71,6 +	41,6

PRP: plasma rico en plaquetas

+ $p < 0,05$, Comparación con el grupo control (Test de la U de Mann Whitney).

Los valores representan la media ± desviación estándar

de moderada a marcada, sin que se aprecie dependencia de las dosis y el tiempo de tratamiento en los esquemas investigados. Este hecho, unido a la marcada inhibición del incremento de las CEC en plasma inducida por citrato, sugiere que el D-003 presenta una acción protectora sobre el endotelio vascular en condiciones basales o de daño inducido.

REFERENCIAS

- Luscher T.F. and Barton M. Biology of the endothelium. **Clin Cardiol**, **20** (Suppl. II), II-3, 1997.
- Haller H. Endothelial function. General Considerations. **Drugs**, **53** (Suppl 1), 1997
- Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V., and Fabian J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. **Klin Wochenschr**, **56**, 1033, 1978.
- Friman M., Noa M., Quintela A. Células endoteliales circulantes: Aislamiento y cuantificación. **Rev Cub Invest Biomed**, **9**, 138, 1990.
- Casacó A., Carbajal D, Friman M, and Noa M. Interference of levamisole with Forssman Shock. **Thromb Res**, **59**, 629, 1990.
- Hladovec J, Kornalik F. Antithrombotic activity of an unsaturated fatty acid preparation. **Thromb Res**, **58**, 505, 1990.
- Davis J.W., Shelton L., Eigenberg D.A., Hignite C.E., Watanabe I.S. Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. **Clin. Pharmacol. Ther**, **37**, 529, 1985.
- Davis J.W., Shelton L., Eigenberg D.A., Hignite C.E. Lack of effect of aspirin on cigarette smoke-induced increase in circulating endothelial cells. **Haemostasis**, **17**, 66, 1987.
- Davis J., Lewis H.D., and Francis-Oliver A. Prevention of exercise-induced endothelium by isradipine in men with angina pectoris. **Cardiology**, **84**, 375, 1994.
- González L, Marrero D., Laguna A. et al. A mixture of primary fatty acids of high molecular weight obtained from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. RSA Patente 98-2744, Laboratorios Dalmer SA, december 30, 1998.
- Gámez R., Mendoza S., Más R., et al. Dose-dependent cholesterol lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. **Curr Ther Res**, **61**, 8, 2000
- Mendoza S., Gámez R., Noa M., Más R., Castaño G. The effects of D-003 and policosanol on the lipid profile and endothelial cells in normocholesterolemic rabbits: a head to head comparison. **Curr Ther Res**, **62**, 209, 2001.
- Castaño G, Más R, Fernández L, Fernández JC, Illnait J, Gámez R., et al: Assesment of the effects of D-003, a new antiplatelet and lipid lowering compound in healthy volunteers. **Drug R&D**, **3**, 2002 (en prensa)
- Menéndez R., Mas R., Amor A.M., et al. Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Atherosclerosis**, **151**, 131, 2000.
- Molina V., Arruzazabala M. L., Carbajal D., Más R., Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. **Pharmacol Res**, **42**, 137, 2000.
- Molina V., Arruzazabala M. L., Carbajal D., and Más R. D-003, a new compound with effects on arachidonic acid metabolites. **Prost Leuk Essent Fatty Acids**, **67**, 19, 2002.
- Arruzazabala ML, Carbajal D, Más R, Molina V, Castaño G, Gámez R, et al. Effects of D-003, a New Compound Purified from Sugarcane Wax, on Platelet Aggregation in Healthy Volunteers: A Randomised, Double-Blind Study. **Clin Drug Invest**, 2002 (en prensa).
- Mas R. Policosanol. **Drugs of the Future**, **25**, 569, 2000.
- De Clerck F, Loots W, Somers Y, Van Gorp L, Verheyen A, Wouters L. Thromboxane A₂ - induced vascular endothelial cell damage and respiratory smooth muscle cell contraction: Inhibition by flunarizine, a Ca-Overload blocker. **Arch Int Pharmacodyn et Ther**, **274**, 4, 1985.
- Hladovec J. and Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. **Thromb Res**, **3**, 665, 1973.
- Hladovec J. Antithrombotic drugs in thrombosis models. Boca Ratón, Florida, CRC Press, 1989.
- Arruzazabala ML, Carbajal D, García M. Levamisole: un inhibidor de la enzima tromboxano sintetasa. **Rev Lat de Tromb y Hemos**, **III**, 19, 1990.
- Friman M., Noa M., Pauste H., Quintela A., Illnait J Effect of CNIC-4 (lobenzarit) on circulating endothelial cells of rats. **Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Research Diagnostics and Treatment. Proceedings of the 6th International Dresden Lipid Symposium**, 1988.
- Carbajal D., and González R. Efecto del CNIC-4 (Lobenzarit) como antagonista del Tx A₂. **Rev CENIC Cienc Biol**, **21**, 2, 1990.
- Laguna A., Magraner J., Hernández J., Carbajal D., Arruzazabala ML., Más R. and García M. A mixture of higher aliphatic alcohol, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. US Patente. Lab. Dalmer SA.
- Rizzo E., Craft D., Dammann A., and Phillip M. Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for a fatty alcohol cycle. **J Biol Chem**, **262**, 17412, 1987.
- Noa M., Más R., Mesa R. Effect of policosanol on circulating endothelial cells in experimental models in Sprague Dawley rats and rabbits. **J Pharm Pharmacol**, **49**, 999, 1997.

28. Noa M, Más R, and Mesa R. Effect of policosanol on intimal thickening in rabbit cuffed carotid artery. **Int J Cardiol**, 67, 125, 1999.
29. Castaño G, Más R, Arruzabala ML, and Noa M. Effects of policosanol and pravastatin on lipid profile, platelet aggregation and endothelium in older hypercholesterolemic patients. **Int J Clin Pharmacol Res**, XIX, 105, 1999.



“R-tester” es un grupo radicado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) que le brinda servicios especializados en protección contra la corrosión con el fin de elevar la durabilidad, confiabilidad y tiempo de vida útil de todo tipo de materiales metálicos y no metálicos, recubrimientos protectores, equipos, accesorios y otros, que serán utilizados en instalaciones construidas en Cuba. Además de prestar asesoramiento técnico y dar certificación de calidad de los productos.

La fortaleza de “R-tester” es su personal altamente calificado y la experiencia acumulada durante más de 30 años de investigaciones y de estudios constantes para caracterizar el comportamiento corrosivo de materiales y diagnosticar su durabilidad en nuestras condiciones climáticas. Son los creadores del **“Mapa de la Agresividad Corrosiva de la Atmósfera de Cuba”**

“R-tester” oferta servicios especializados en:

- Evaluación y caracterización de la agresividad corrosiva de la atmósfera.
- Pronósticos del comportamiento corrosivo de materiales, instalaciones, piezas, artículos constructivos y otros.
- Ensayos acelerados en cámaras.
- Selección de materiales óptimos resistentes a la corrosión en el ambiente de Cuba.
- Asesoría técnica y consultoría especializada.
- Ensayos mediante técnicas electroquímicas de avanzada seguras y rápidas.
- Evaluación y certificación de materiales metálicos y polímeros.
- Evaluación de la calidad del aire para la obtención de licencia ambiental.

En la realización de los servicios se utilizan normas y metodologías cubanas e internacionales así como procedimientos especiales desarrollados por el grupo.

