

## ***Efectos del D-005, extracto lipídico del fruto de *Acrocomia crisper*, sobre el daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico en ratones***

***Effects of D-005, lipid extract from *Acrocomia crisper* fruits, on acute lung injury induced by oleic acid in mice.***

Licet Mena Valdés<sup>a</sup>, Ambar Oyarzábal Yera<sup>a</sup>, Lorena Fernández San<sup>b</sup>, Vivian Molina Cuevas<sup>a</sup>, Zullyt Zamora Rodríguez<sup>b</sup>, Nelson Merino García<sup>b</sup>, Sandra Rodríguez Salgueiro<sup>b</sup>, Sonia Jiménez Despaigne, José Alberto Medina Pérez.

<sup>a</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

<sup>b</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de septiembre de 2019;

Aceptado: 14 de noviembre de 2019;

### **RESUMEN**

El daño pulmonar agudo/síndrome de distrés respiratorio agudo (DPA/SDRA) es considerado actualmente un serio problema de salud. Sin embargo, hasta el presente no se encuentran disponibles estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento de esta patología. El D-005, extracto lipídico obtenido del fruto de *Acrocomia crisper*, palma endémica de Cuba, protegió del DPA inducido por lipopolisacárido en ratones, asociado, al menos en parte, a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios en tejido pulmonar. El objetivo de este trabajo es evaluar los efectos del D-005 sobre el DPA inducido por ácido oleico (AO) en ratones. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos: un control negativo sin daño y seis grupos a los cuales se les indujo el DPA mediante la inyección de AO: un control positivo tratado con vehículo, cuatro con D-005 (5, 25, 100 y 200 mg/kg) y uno con dexametasona (20 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados como dosis únicas y repetidas. La administración de dosis orales únicas y repetidas de D-005 redujo significativamente el puntaje histológico de daño pulmonar respecto al grupo control positivo (con DPA). Además, redujo marcada y significativamente la actividad enzimática de la mieloperoxidasa, así como las concentraciones de malondialdehído y grupos sulfhidrilos a la vez que restableció la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en tejido pulmonar. En conclusión, el tratamiento con dosis orales únicas y repetidas de D-005 (5, 25, 100 y 200 mg/kg) previno los cambios histopatológicos en el tejido pulmonar dañado evidenciado mediante cambios cuantitativos y cualitativos, lo cual se asoció a un efecto antiinflamatorio y antioxidante que pudiera explicar, al menos en parte, su efecto protector sobre el DPA inducido por AO.

**Palabras claves:** D-005, ácido oleico, daño pulmonar agudo, antioxidante, antiinflamatorio.

### **ABSTRACT**

Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) is currently considered a serious health problem. However, until now no effective therapeutic strategies are available for the treatment of this pathology. D-005, lipid extract obtained from the fruit of *Acrocomia crisper*, endemic palm of Cuba, protected from lipopolysaccharide-induced ALI in mice, associated, at least in part, with its antioxidant and anti-inflammatory effects in lung tissue. The aim of this work is to evaluate the effects of D-005 on ALI induced by oleic acid (OA) in mice. The animals were randomly distributed in seven groups: a negative control without damage and six groups to which ALI was induced by injection of OA: a positive control treated with vehicle, four with D-005 (5, 25, 100 and 200 mg/kg) and one with dexamethasone (20 mg/kg). All treatments were administered as single and repeated doses. The administration of single and repeated oral doses of D-005 significantly reduced the histological score of lung damage with respect to the positive control group (with ALI). In addition, it markedly and significantly reduced the enzymatic activity of myeloperoxidase as well as the concentrations of malondialdehyde and sulfhydryl groups while restoring the activity of the catalase and superoxide dismutase enzymes in lung tissue. In conclusion, treatment with single and repeated oral doses of D-005 (5, 25, 100 and 200 mg/kg) prevented histopathological changes in damaged lung tissue evidenced by quantitative and qualitative changes, which was associated with an anti-inflammatory and antioxidant effect that could explain, at least in part, its protective effect on ALI induced by OA.

**Key words:** D-005, oleic acid, acute lung injury, antioxidant, anti-inflammatory.

## INTRODUCCION

El daño pulmonar agudo (DPA) es una enfermedad frecuente en pacientes hospitalizados con estado crítico de salud donde el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) se considera como un caso particular severo del DPA. El SDRA no solo afecta la calidad de vida de los pacientes, sino que ha sido asociado con elevados índices de mortalidad que varían entre el 30 y 60 %, mientras que en las unidades de cuidados intensivos pediátricos la mortalidad es superior al 50 % (Garza *et al.* 2012; Hou *et al.* 2014; Estenssoro y Dubin, 2016). Por estos motivos, el DPA/SDRA es considerado actualmente como un serio problema de salud.

El DPA/SDRA se caracteriza por signos de hipoxemia, distrés respiratorio, edema pulmonar no cardiogénico, aumento de la permeabilidad vascular y daño endotelial (Liao *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2012).

La fisiopatología del DPA resulta compleja y multifactorial por lo que aún no ha sido del todo dilucidada, si bien se conoce que se desencadena por factores que deterioran el estado funcional de la membrana alveolo-capilar como son: aspiración del contenido gástrico, sepsis, shock hemorrágico, acidosis e inhalación de agentes tóxicos (Tsushima *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2012; Hou *et al.* 2014).

Por otra parte, los procesos de oxidación-inflamación también juegan un rol importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad ya que ocasionan daños a las estructuras celulares del tejido pulmonar debido a la migración transendotelial de neutrófilos, con la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y moléculas pro-inflamatorias, que actúan alterando la barrera endotelial y aumentando su permeabilidad (Lingappan *et al.* 2014).

Sin embargo, hasta el presente no se encuentran disponibles estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento de esta patología. Las estrategias farmacológicas mayormente empleadas, aún con escasas expectativas, se basan en el empleo de corticosteroides, dado su mecanismo antiinflamatorio (Lamontagne *et al.* 2010; Standiford y Ward, 2016) y los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de larga duración por su acción broncodilatadora (Sartori *et al.* 2002), si bien su uso se asocia con diversos efectos adversos, delimitando su indicación en la práctica clínica. Dada la ineficacia de estas terapias farmacológicas, unido a su bajo perfil de seguridad, la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas seguras y eficaces para el tratamiento del DPA/SDRA constituye una problemática actual.

En este sentido, extractos naturales o sus metabolitos han sido evaluados en modelos experimentales de DPA/SDRA, refiriéndose por ejemplo que extractos de *Ginkgo biloba* redujeron marcadamente la infiltración de neutrófilos y los niveles de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar de ratas con DPA, logrando una favorable disminución de la permeabilidad vascular y de la migración de leucocitos al fluido bronqueo-alveolar (Sun *et al.* 2002). Por otra parte, algunos polifenoles aislados de extractos naturales como la epigallocatequina-3-galato presente en el té verde (*Camellia sinensis*) y el ácido elágico presente en la granada (*Punica granatum*) demostraron ser efectivos en la depleción de moléculas proinflamatorias y otros marcadores importantes del DPA en ratones (Guimarães *et al.* 2002; He *et al.* 2014). La curcumina, extraída de la *Curcuma Longa*, ejerce efectos

beneficiosos sobre los procesos fisiopatológicos del DPA, según un estudio preclínico en ratas Wistar (Zhe *et al.* 2015).

Los antecedentes previamente mencionados exponen el valor potencial de los efectos beneficiosos de los productos naturales sobre esta patología aún “huérfana” de tratamientos farmacológicos, por lo cual representa un reto actual continuar la búsqueda de sustancias naturales con efectos beneficiosos sobre el DPA/SDRA.

El D-005, extracto lipídico saponificado obtenido del fruto de la Palma Corajo (*Acrocomia crispata*), palma endémica de Cuba, perteneciente a la familia *Arecaceae*, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico mientras el palmitoleico, caprílico, cáprico, y esteárico se encuentran en menores concentraciones (González *et al.* 2014; Sierra *et al.* 2014).

Estudios previos demostraron que la administración oral de D-005 protegió del DPA inducido por lipopolisacárido en ratones (Mena *et al.* 2019) asociado, al menos en parte, a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios en tejido pulmonar. Además, inhibe la ciclooxigenasa-2 y la 5-lipooxigenasa (Pérez *et al.* 2017)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta interesante evaluar los efectos del D-005 sobre el daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico en ratones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos con peso corporal entre 18-20 gramos, provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), los cuales fueron adaptados durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida.

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

### Administración y dosificación

El D-005 (lote S080316; Laboratorio de Química Farmacéutica, CNIC, La Habana, Cuba), se preparó en forma de emulsión en vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O (2 %), tras corroborar sus especificaciones de calidad. (Sierra *et al.* 2014). Por su parte, la dexametasona (DEX) (lote: B0112/015040; Laboratorio Farmacéutico “Reinaldo Gutiérrez”, La Habana, Cuba) se

preparó en solución de goma acacia (1 %). Ambos tratamientos fueron administrados por vía oral (5 mL/kg).

El ácido oleico (AO), sustancia inductora del DPA, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) se preparó en forma de suspensión al 5 % teniendo en cuenta las siguientes proporciones: AO 5 %, etanol 5 % y 90 % etilenglicol y se administró por vía intravenosa (i.v).

Se realizaron dos series experimentales: en la serie experimental 1 el D-005 se administró como dosis única una hora antes de la inducción del daño mientras que en la serie experimental 2 se administró como dosis repetidas durante 14 días, en ambos casos la DEX (sustancia de referencia) se administró como dosis única, una hora antes de inducir el daño.

Tras culminar la cuarentena, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos experimentales (8 animales/grupo): un control negativo sin daño, tratado con los vehículos y seis grupos a los cuales se les indujo el daño con AO: un control positivo tratado con el vehículo (v.o), cuatro tratados con D-005 (5, 25, 100 y 200 mg/kg) y uno con DEX (20 mg/kg), como sustancia de referencia.

### **Inducción del daño pulmonar agudo por ácido oleico**

La inducción del DPA se realizó mediante la inyección i.v de AO (1 µL/g de peso corporal) según lo descrito por Lai *et al.* (2009), previa anestesia de los animales. Dos horas después de administrado el AO los ratones se sacrificaron mediante sobredosis de tiopental (60 mg/kg).

### **Obtención de las muestras**

Se extrajo el bloque pulmonar y se separaron los pulmones: el derecho se conservó en una disolución de formaldehído tamponado al 10 % (v/v), para el posterior análisis histopatológico y el izquierdo se conservó a – 20 ° C para el análisis bioquímico correspondiente.

♦ Procesamiento histológico: los pulmones derechos previamente fijados en formaldehído, se deshidrataron en un procesador automático para tejidos, se incluyeron en parafina y se seccionaron en cortes de 3 µm empleando un micrótopo horizontal. Las muestras se colorearon con la tinción hematoxilina y eosina para la evaluación de los cambios microscópicos.

♦ Procesamiento bioquímico: se tomaron alícuotas de 100 mg del tejido pulmonar y se homogenizaron en baño de hielo con homogenizador de cuchilla, en Buffer fosfato-EDTA (0,1 mol/L, pH 7,2) para las determinaciones de malondialdehído (MDA), grupos sulfhidrilos (SH) enlazados a proteínas y las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Todos los homogenatos se almacenaron a -20 °C, hasta realizar las determinaciones correspondientes.

### **Variables analizadas**

#### **Análisis histopatológico**

El análisis histológico del daño pulmonar se evaluó según el puntaje histológico descrito por He *et al.* (2014), donde los hallazgos significativos fueron: hemorragias, edema, exudado,

necrosis, congestión, infiltración de neutrófilos y atelectasias. La severidad del daño se midió mediante un puntaje histológico según los siguientes criterios: 0: No daño, 1: daño en el 25 % de los campos, 2: daño en el 50 % de los campos, 3: daño en el 75 % de los campos, 4: daño difuso.

### **Determinación de la actividad de la mieloperoxidasa**

La actividad de la MPO se determinó según la técnica descrita en el *Worthington Enzyme Manual* (1972). Para ello, se homogenizaron 100 mg de tejido pulmonar en 1 mL de Buffer fosfato (50 mmol/L) a pH 6 que contenía bromuro de hexadecil trimetilamonio (0,5 %). Una vez homogenizadas se sonicaron por 10 seg, se congelaron (-20 °C) y descongelaron (30 °C), por 3 veces sucesivas. Al culminar la última descongelación, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 25 min a 4 °C y se cuantificó la MPO en el sobrenadante. Para ello, se mezclaron 625 µL de tampón fosfato (50 mmol/L, pH=6), que contenía 0,167 mg/mL de dihidrocloruro de O-dianisidina, con 250 µL de la muestra y 125 µL de peróxido de hidrógeno (0,0005 %). Finalmente, se determinaron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis a 460 nm durante los 2 min siguientes a la reacción.

La actividad de la MPO se refirió como unidad (U)/mg de proteína en el tejido pulmonar. Una U de MPO se definió como la degradación de un µmol de peróxido/minuto a 25 °C, la cual se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$U/mg \text{ de proteína} = \Delta A \text{ min.} \times \text{Vol. cubeta} / 8.3 \times \text{Vol. muestra} \times 10$$

Donde  $\Delta A$  min.: es la variación de la absorbancia, Vol. cubeta: es el volumen final de la cubeta y Vol. muestra: es el volumen de muestra añadido (µL).

### **Determinación de malondialdehído**

La determinación de MDA se realizó según la técnica descrita por Ohkawa *et al.* (1979). Para ello el homogenato de pulmón se trató con 0,2 mL de dodecil sulfato de sodio (8,1 %), 1,5 mL de ácido acético (20 %, pH 3,5) y 1,5 mL de disolución de ácido tiobarbitúrico (0,8 %) y se calentó a 95 °C. Con el objetivo de evitar la producción de peroxidaciones adicionales que puedan constituir un error en la determinación durante el proceso de calentamiento se adicionó hidroxil tolueno butilado (1 mmol/L) al medio. Posteriormente, las muestras se colocaron a temperatura ambiente y se les adicionó 5 mL de n-butanol:piridina (15:1 v/v). Posteriormente, se agitaron vigorosamente con la ayuda de un vortex, se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 20 min, se tomó 1 mL de la capa orgánica y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis a 534 nm. Para los cálculos de los niveles de MDA se construyó una curva patrón con MDA bis (dimetil acetal). Los valores de MDA se reportaron como nmol de MDA/mg de proteína.

### **Determinación de grupos sulfhidrilos enlazados a proteínas**

La determinación de grupos SH se realizó mediante la técnica descrita por Hu (1994), para lo cual se tomó una alícuota de 200 µL de la muestra (homogenato de pulmón), se le añadió 600 µL de buffer TRIS-EDTA 20 mmol/L, pH 8,2; 40 µL de 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) 10 mmol/L y 3,16 mL de etanol absoluto. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 min. La



absorbancia del sobrenadante se leyó a 412 nm en espectrofotómetro UV-vis. Se hizo un blanco con DTNB y el total de grupos SH se calculó usando una absortividad de 13,600 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> y se expresó en mmol/L.

### **Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa**

La actividad de la SOD se determinó por el método modificado de Marklund y Marklund (1974), para lo cual se tomaron 100 µL de homogenato de pulmón y se añadieron 2,8 mL de la disolución amortiguadora Tris-HCl (60 mmol/L, pH 8,2), 50 µL de EDTA (60 mmol/L) y 50 µL de pirogallol (7,37 mmol/L), se mezcló bien y se esperó 10 segundos de reacción. Posteriormente, se leyó la diferencia de densidad óptica en 1 min a 420 nm en un espectrofotómetro UV-vis. La actividad de la SOD se expresó en U mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

### **Determinación de la actividad de la catalasa**

La actividad de la CAT se determinó por el método modificado de Aebi (1974), en el que se monitoreó la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm durante 5 min en espectrofotómetro UV-vis. A 10 µL de muestra (homogenato de pulmón) se añadieron 2,89 mL de buffer fosfato de potasio 50 mmol/L (pH 7,4). La reacción comienza al añadir 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para un volumen final de 3 mL a 25 °C. La actividad se calculó por el coeficiente de extinción molar (43,6 x 10<sup>-3</sup>) y se expresó en U/min mg de pt x 10<sup>-1</sup>.

### **Análisis Estadístico**

Los datos se expresaron como la media ± error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney. A priori se fijó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete comercial *Statistic* para *Windows* (Release 6.0; StatSoft, Tulsa, OK, USA).

El análisis de relación dosis/efecto se realizó mediante el método de regresión lineal y correlación utilizando el programa *Primer of Biostatistic* (Stanton A, Glantz; copyright (c) 1992, McGraw-Hill, Inc Versión 3.01)

## **RESULTADOS**

La Tabla 1 muestra los efectos de dosis orales únicas y repetidas de D-005 (5-200 mg/kg) sobre el puntaje histológico del daño pulmonar inducido por AO en ratones. La inyección i.v de AO provocó un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) del puntaje histológico en los animales del grupo control positivo respecto a los del control negativo.

El D-005 administrado como dosis únicas y repetidas, a las dosis de 25, 100 y 200 mg/kg, redujo significativamente el puntaje histológico alcanzando  $\cong 70$  y 91 % de inhibición, respectivamente, respecto al grupo control positivo (con DPA), mientras que la dosis menor ensayada (5 mg/kg) no produjo un efecto significativo sobre esta variable. El efecto alcanzado con el D-005 sobre el puntaje histológico resultó no dependiente de la dosis.

La DEX (20 mg/kg), sustancia de referencia, disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el puntaje histológico alcanzando  $\cong 80$  % de inhibición.

En la Figura 1 se representa el daño histológico, inducido por la inyección i.v del AO, en los animales del grupo control positivo respecto al grupo control negativo. El tejido pulmonar de los animales del control negativo mostró una estructura normal de los alveolos, con paredes finas y presencia ocasional de macrófagos en el espacio alveolar (Fig. 1 A y B). En el grupo control positivo se observó la presencia de infiltrado inflamatorio de PMN, con una localización perivascular o intramural (Fig. 1 C y D).

La Figura 2 muestra los efectos de los tratamientos (D-005 y DEX), sobre el daño histológico pulmonar inducido por AO. Los grupos tratados con D-005 (200 mg/kg) (Fig. 2 A y B) y DEX (20 mg/kg) (Fig. 2 C y D) mostraron una notable disminución del daño histológico.

Los efectos de la administración oral de D-005 (5-200 mg/kg), dosis únicas y repetidas, sobre la actividad enzimática de la MPO y los niveles de MDA en tejido pulmonar de ratones con DPA inducido por AO se muestran en la Tabla 2. La inducción del DPA produjo un incremento significativo de la actividad enzimática de la MPO y de las concentraciones de MDA en el tejido pulmonar del control positivo respecto al control negativo.

El D-005 (5 mg/kg) administrado como dosis única no modificó los niveles de MPO, si bien administrado como dosis repetidas alcanzó un 53,8 % de inhibición respecto al control positivo. El resto de las dosis ensayadas redujeron marcada y significativamente la actividad enzimática de la MPO alcanzando la mayor inhibición a las dosis de 200 y 100 mg/kg administradas como dosis únicas y repetidas, respectivamente.

El efecto sobre el incremento de MDA se alcanzó desde la dosis menor ensayada (5 mg/kg) administrada como dosis única y repetida alcanzando un porcentaje de inhibición de  $\cong 100$  en ambos casos.

El análisis dosis-efecto en ambas variables arrojó un comportamiento no dependiente de la dosis.

La DEX (20 mg/kg), sustancia de referencia, redujo significativamente la actividad enzimática de la MPO y los niveles de MDA respecto a los animales del grupo control positivo.

La Tabla 3 muestra los efectos de la administración de dosis repetidas de D-005 (5-200 mg/kg) sobre el daño oxidativo a proteínas (grupos SH) y sobre la actividad de enzimas del sistema antioxidante endógeno (CAT y SOD) en ratones con DPA inducido por AO. La inyección i.v de AO produjo un incremento significativo ( $p<0,05$ ) de las concentraciones de grupos SH, así como una depleción de la actividad enzimática de la SOD ( $p<0,01$ ) y la CAT ( $p<0,05$ ) en el tejido pulmonar de los animales del grupo control positivo respecto a los animales del grupo control negativo. Por su parte, la DEX (20 mg/kg), sustancia de referencia, mostró una marcada y significativa reducción de los niveles tisulares de grupos SH alcanzando un 64,96 % ( $p<0,05$ ) de inhibición. Además, restituyó significativamente la actividad enzimática de la SOD (63,36 % de restitución;  $p<0,05$ ) y la CAT (54,59 % de restitución;  $p<0,01$ ) respecto al control positivo.

El D-005, a las dosis de 5, 25, 100 y 200 mg/kg, disminuyó los niveles tisulares de grupos SH asociados a proteínas de forma marcada y significativa ( $p<0,05$ ) con porcentajes de inhibición de 52,9; 57,2; 63,2 y 65,8, respectivamente (Tabla 3). Además, incrementó significativamente

( $p < 0,05$ ) la actividad enzimática de la SOD y la CAT alcanzando un 65,2 y 66,6 % de restitución, respectivamente. Los efectos alcanzados tras la administración oral de dosis repetida de D-005 sobre los marcadores de daño oxidativo (grupos SH, SOD y CAT) fueron no dependientes de la dosis.

## DISCUSION

Los resultados del presente estudio muestran la eficacia del D-005, administrado oralmente en forma de dosis únicas y repetidas, para inhibir el DPA inducido por AO.

De acuerdo con reportes previos la inyección intravenosa de AO indujo DPA en los ratones del grupo control positivo con una diferencia significativa respecto al control negativo, evidenciado en un incremento del puntaje histológico y en cambios cualitativos observados al microscopio. En tal sentido, el tejido pulmonar mostró cambios, desde una estructura normal de los alveolos, con paredes finas y presencia ocasional de macrófagos en el espacio alveolar del grupo control negativo hasta la presencia de infiltrado inflamatorio de PMN, con una localización perivascular o intramural en el grupo control positivo. Este resultado corrobora la validez del modelo en nuestras condiciones experimentales ya que la presencia de neutrófilos en el espacio alveolar e intersticial y el engrosamiento de las paredes alveolares constituyen rasgos relevantes que demuestran la ocurrencia de un DPA (Guimarães *et al.* 2002; Lai *et al.* 2009; Matute *et al.* 2011). Además, los neutrófilos son las primeras células que migran hacia el tejido pulmonar ante un estímulo y su excesivo reclutamiento contribuye al daño tisular y al proceso inflamatorio asociado a la administración intrapulmonar de AO en ratones (Maniatis *et al.* 2008; Gonçalves *et al.* 2012).

La administración oral de DEX a la dosis de 20 mg/kg, empleada como sustancia de referencia, redujo el incremento del puntaje histológico del daño pulmonar, con respecto al grupo control positivo, alcanzando  $\cong 80$  % de inhibición. Este resultado, conjuntamente con los daños observados sobre el tejido pulmonar, con DPA inducido por AO, sustenta la validez del modelo desarrollado en nuestras condiciones experimentales.

Por su parte, la administración de dosis orales únicas y repetidas de D-005 redujo el puntaje histológico del daño pulmonar inducido por AO, respecto a los animales del grupo control positivo.

El D-005 a la dosis de 5 mg/kg, administrado como dosis orales únicas y repetidas, no produjo ningún efecto significativo sobre el puntaje histológico por lo que en ambos casos la dosis de 25 mg/kg resultó ser la dosis mínima efectiva; a su vez se comportó como la dosis máxima efectiva ya que las dosis mayores ensayadas (100 y 200 mg/kg) no produjeron un efecto superior. El D-005, administrado como dosis únicas, alcanzó un 69,7 % de inhibición sobre el puntaje histológico, mientras que a dosis repetidas el efecto alcanzado fue superior (91 % de inhibición), con un comportamiento no dependiente de la dosis en ambos casos.

Estos resultados se encuentran en correspondencia con un estudio previo que demostró que el D-005 administrado a dosis orales únicas protege el tejido pulmonar del daño inducido por lipopolisacáridos (Mena *et al.* 2019).

Teniendo en cuenta el papel del proceso inflamatorio en el desarrollo y progresión del DPA donde las enzimas 5-LOX y COX-2 juegan un rol importante, la inhibición de la actividad de



dichas enzimas disminuye el daño sobre la capa epitelial o endotelial que se deriva del proceso inflamatorio que debilita la estructura de la membrana alvéolo-capilar (Liu *et al.* 2013). Estas enzimas intervienen en la formación de mediadores del ácido araquidónico. La 5-LOX metaboliza este ácido hacia la formación de leucotrienos, dentro de los cuales se encuentra el leucotrieno B<sub>4</sub>, un potente agente quimiotáctico que promueve el reclutamiento de macrófagos y mastocitos al espacio alveolar. La COX-2 (isoforma inducible de la ciclooxigenasa) se expresa en las células inflamatorias donde metaboliza el ácido araquidónico hacia la formación de prostaglandinas, como la PGE<sub>2</sub> implicada en la activación y degranulación de mastocitos (liberan proteasas y quimocinas responsables del aumento de la permeabilidad vascular), así como la prostaciclina, un potente vasodilatador del endotelio pulmonar (García de Lorenzo *et al.* 2000).

En este sentido, el hecho de que el D-005 inhibe la actividad de las enzimas 5-LOX y COX-2 (Pérez *et al.* 2017), podría explicar, al menos en parte, su efecto protector sobre el tejido pulmonar aquí demostrado.

Si bien la demostración del efecto del D-005 sobre la actividad enzimática de la 5-LOX y COX-2 no forma parte de este trabajo, resulta interesante conocer que la inhibición simultánea de estas enzimas le confiere al D-005 las ventajas de los antiinflamatorios duales en cuanto a su perfil de seguridad y tolerabilidad (Charlier y Michaux, 2003; Coruzzi *et al.* 2007). Por tanto, la inhibición dual reportada como mecanismo antiinflamatorio del D-005 representa un beneficio potencial para el manejo de una enfermedad frecuente en pacientes hospitalizados con estado crítico de salud como es el DPA (Hou *et al.* 2014).

Durante el desarrollo del DPA/SDRA ocurre la infiltración de neutrófilos, reclutados por la liberación de quimiocinas o componentes del sistema del complemento (Repine, 1992). Estos neutrófilos estimulados liberan diversas enzimas entre las que se encuentra la MPO. Por este motivo, la enzima MPO ha sido asociada directamente con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado y constituye un marcador bioquímico ampliamente usado para corroborar la presencia de infiltrado inflamatorio en los tejidos (Klebanoff, 1999; Kato, 2016; Aratani, 2018).

En correspondencia con la presencia de infiltrado inflamatorio de PMN en el tejido pulmonar de los animales del grupo control positivo, se obtuvo un incremento de la actividad enzimática de la MPO, de acuerdo a reportes de la literatura (Bhargava *et al.* 2013).

El comportamiento de la DEX como sustancia de referencia corrobora una vez más la validez de los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales ya que redujo significativamente la actividad enzimática de la MPO respecto a los animales del grupo control positivo. (Huang *et al.* 2014).

La administración oral de D-005 como dosis únicas (5 mg/kg) no produjo ningún efecto significativo sobre la actividad enzimática de la MPO mientras que las dosis de 25, 100 y 200 mg/kg mostraron porcentajes de inhibición de 66,7, 77,8 y 83,3, respectivamente. El efecto observado fue no dependiente de la dosis, siendo 25 mg/kg la dosis mínima efectiva. De modo similar, el D-005 administrado como dosis repetidas inhibió de manera no dependiente de la dosis la actividad enzimática de la MPO, si bien en este caso no pudimos caracterizar la dosis mínima efectiva ya que 5 mg/kg (dosis menor ensayada) alcanzó un 53,85 % de

inhibición estadísticamente significativo. La dosis de 100 mg/kg resultó ser la dosis máxima efectiva ya que 200 mg/kg no produjo un efecto superior.

La administración oral de D-005 con el esquema de dosis repetidas produjo la mayor eficacia sobre la MPO a la dosis de 100 mg/kg (92,3 % de inhibición), siendo ligeramente superior a la mayor eficacia alcanzada con el esquema de dosis únicas a 200 mg/kg (83 % de inhibición). Además, la administración repetida de D-005 fue efectiva desde la menor dosis ensayada de 5 mg/kg, mientras que esta dosis no fue efectiva tras su administración aguda.

Por tanto, la administración oral del D-005 en esquema de dosis repetidas produjo una reducción de la actividad de la MPO, como marcador inflamatorio en tejido pulmonar, con mayor potencia y eficacia a la alcanzada con dosis únicas.

Teniendo en cuenta, que la administración oral de dosis únicas y repetidas de D-005 disminuyó la actividad enzimática de la MPO en tejido pulmonar y que los procesos inflamatorios constituyen un factor etiológico importante en el desarrollo del DPA (Bernard *et al.* 1994; Mena *et al.* 2019); el efecto del D-005 sobre la MPO pudiera explicarse al menos en parte, por su efecto antiinflamatorio demostrado *in vitro* (Pérez *et al.* 2017).

El estrés oxidativo dado por el desbalance de prooxidantes y antioxidantes juega un importante papel en la iniciación, desarrollo y progresión del DPA (Chow *et al.* 2003) ya que los pulmones son órganos susceptibles al estrés oxidativo que se deriva de respuestas inflamatorias (Rahman y Adcock, 2006). El proceso inflamatorio es una fuente bien documentada de generación de ERO ya que células como los neutrófilos producen agentes oxidantes como el  $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ , y  $HOCl$ , los cuales son los responsables del daño tisular asociado con la inflamación crónica donde la enzima MPO es una de las principales fuentes de estas ERO (León *et al.* 2005).

En este contexto, ha sido demostrado que el DPA inducido por AO (Chow *et al.* 2003) genera un incremento del estrés oxidativo basado en la activación de los neutrófilos, los cuales a su vez son considerados como la mayor fuente de ERO donde la MPO juega un papel primordial ya que cataliza la producción ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso que a su vez da origen al oxígeno singlete, y ambas ERO, participan en el desarrollo de la lesión pulmonar (Kato, 2016).

Resulta entonces relevante el efecto de la administración oral a dosis únicas y repetidas del D-005 sobre la disminución de la actividad de la enzima MPO, considerando que no solo reduce el proceso inflamatorio, sino que indirectamente reduce la liberación de las ERO antes mencionadas, pudiendo adjudicarse además como un posible mecanismo antioxidante del D-005.

La inyección de AO, en ambas series experimentales, provocó un incremento significativo de las concentraciones de MDA, marcador de PL, en el tejido pulmonar de los animales del control positivo respecto al control negativo, el cual fue inhibido significativamente por la sustancia de referencia (DEX). Estos resultados se asemejan a los reportes de otros autores lo que corrobora la validez de nuestro modelo experimental (Guimarães *et al.* 2002; Lai *et al.* 2009) y se encuentran en correspondencia con la presencia de PMN y el incremento de la MPO, observados en el grupo control positivo, y su papel en la producción de ERO descrita anteriormente.

La administración de dosis orales únicas y repetidas de D-005 (5-200 mg/kg) redujo significativamente las concentraciones de MDA en el tejido pulmonar dañado.

La evaluación del D-005 con el esquema de dosis única mostró una reducción significativa de las concentraciones de MDA en tejido pulmonar, desde la menor dosis ensayada de 5 mg/kg (50 % de inhibición), por lo que no se pudo caracterizar la dosis efectiva mínima. La mayor eficacia alcanzada con este esquema de dosis fue de un 96,4 % de inhibición con la dosis de 100 mg/kg, la cual se comportó como la dosis efectiva máxima ya que la dosis superior ensayada de 200 mg/kg no produjo efecto adicional.

Por su parte, la administración de D-005 con el esquema de dosis repetidas también resultó efectiva desde la dosis de 5 mg/kg (69,6% de inhibición) por lo que tampoco se pudo caracterizar en este caso la dosis mínima efectiva. La dosis de 200 mg/kg alcanzó la mayor eficacia, tras este esquema de administración, ya que el efecto alcanzado fue de  $\cong 100$  %.

Por tanto, la administración oral de D-005 con el esquema de dosis repetidas produjo un efecto ligeramente superior y total al alcanzado con el esquema de dosis únicas sobre esta variable de estrés oxidativo. Sin embargo, el hecho de que no se pudiera caracterizar la dosis mínima efectiva en ninguna de las dos series experimentales constituyó una limitante en el análisis de la potencia, por lo que estudios ulteriores deberán evaluar dosis menores a las aquí ensayadas en aras de completar esta caracterización.

Este resultado evidencia el efecto del D-005 para inhibir la PL, ya que el MDA es uno de los productos finales de la cascada de daño oxidativo que se produce en los lípidos de las membranas celulares, que a su vez es un metabolito altamente tóxico capaz de reaccionar con las proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos modificando su estructura y función (León *et al.* 2005).

Basado en el hecho de que las ERO que se generan durante el DPA y la propia actividad prooxidante del MDA producen un daño oxidativo a nivel pulmonar que involucra a las proteínas y las enzimas del sistema antioxidante endógeno, resultaba interesante profundizar en los efectos del D-005 sobre estos marcadores del balance redox.

Por tales motivos, se evaluaron los efectos del D-005 sobre las concentraciones de grupos SH como marcador de daño oxidativo a proteínas, y sobre las actividades enzimáticas de la SOD y CAT como enzimas del sistema antioxidante endógeno, tras su administración oral a dosis repetidas.

Los animales con DPA inducido por AO mostraron un incremento significativo de las concentraciones de grupos SH, así como una depleción de las actividades enzimáticas de la SOD y la CAT en el tejido pulmonar dañado respecto a los animales del grupo control negativo (sin daño). Estos resultados se corresponden con los hallazgos descritos por Zhao *et al.* (2016).

Por su parte, la DEX, sustancia de referencia, redujo significativamente las concentraciones de grupos SH a la vez que restituyó significativamente la actividad enzimática de la SOD y la CAT respecto a los animales del grupo control positivo.

La administración de dosis orales repetidas de D-005 a la dosis de 5 mg/kg disminuyó significativamente los niveles tisulares de grupos SH asociados a proteínas (53% de inhibición), por lo que no se pudo definir la dosis mínima efectiva sobre este parámetro. La dosis de 100 mg/kg fue la dosis efectiva máxima (63,2 % de inhibición), ya que la dosis superior ensayada de 200 mg/kg produjo una eficacia muy similar (65,8 % de inhibición).

El D-005 administrado como dosis repetidas restituyó significativamente la actividad enzimática de la SOD y la CAT desde la dosis de 5 mg/kg, por lo que no se pudo definir la dosis mínima efectiva, ya que no se evaluaron dosis inferiores. La mayor eficacia del D-005 para restituir la actividad de la SOD se obtuvo con las dosis de 100 y 200 mg/kg alcanzado porcentajes de restitución muy similares de 65,2 y 68,2 %, respectivamente, por lo que la dosis efectiva máxima fue definida como 100 mg/kg. Sin embargo, si bien los efectos sobre la actividad de la CAT mostraron una restitución significativa de la actividad enzimática, en este caso no se pudo definir la dosis efectiva máxima debido a que la mayor dosis ensayada de 200 mg/kg provocó el mayor porcentaje de inhibición y no se evaluaron dosis superiores.

El efecto del D-005 sobre las enzimas SOD y CAT sugiere que el efecto antioxidante del D-005 sobre el tejido pulmonar dañado puede estar dado por una estimulación del sistema antioxidante endógeno, si bien estudios ulteriores deberán profundizar en sus efectos sobre otras enzimas de este sistema.

Una vez demostrado que el D-005 inhibe la generación de MDA (marcador de PL) y grupos SH asociados a proteínas de (marcador de oxidación proteica) y restituye la actividad de las enzimas SOD y CAT (marcadores del sistema antioxidante endógeno) en tejido pulmonar dañado, podemos plantear que el efecto antioxidante del D-005 ejerce un beneficio adicional, que pudiera en parte, explicar el hecho de que el D-005 previene el DPA inducido por AO en ratones.

Teniendo en cuenta que el estado de oxidación-inflamación asociado al DPA se caracteriza por un debilitamiento de la estructura de la membrana alvéolo-capilar, que propicia la infiltración de PMN, la activación de enzimas oxidantes (como la MPO), secreción de citocinas y producción de moléculas de adhesión, así como de ERO, y que el D-005 previno la infiltración de PMN, disminuyó la actividad enzimática de la MPO y restableció el balance redox, resulta lógico suponer que el efecto alcanzado por el D-005 sobre el DPA inducido por AO puede estar basado en un mecanismo que abarca sus efectos antioxidante y antiinflamatorio.

Estos resultados representan las primeras evidencias del efecto del D-005 sobre el DPA inducido por AO en ratones, por lo que estudios posteriores deberán profundizar en la caracterización de este efecto, así como en el mecanismo de acción que lo sustenta.

**Tabla 1.** Efectos del D-005 sobre el puntaje histológico del daño pulmonar en ratones con daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Dosis únicas Puntaje histológico	% I	Dosis repetidas Puntaje histológico	% I
Control negativo (vehículo)	0	0,28 ± 0,18**	-	0,00 ± 0,00 **	-
Control positivo (vehículo + AO)	0	1,83 ± 0,75	-	1,11 ± 0,20	-
D-005 + AO	5	1,28 ± 0,28	35,5	0,80 ± 0,41	27,3
D-005 + AO	25	0,71 ± 0,28 *	72,3	0,11 ± 0,11 **	91
D-005 + AO	100	0,75 ± 0,25 *	69,7	0,10 ± 0,10 **	91
D-005 + AO	200	0,75 ± 0,25 *	69,7	0,12 ± 0,12 **	91
DEX + AO	20	0,57 ± 0,29 *	81,3	0,33 ± 0,16 *	75,8

AO ácido oleico, DEX dexametasona, I inhibición Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) \* $p < 0,05$ ;

\*\* $p < 0,01$  Comparación vs grupo control (+). Prueba de la U de Mann Whitney.



**Tabla 2.** Efectos del D-005 sobre la actividad enzimática de la mieloperoxidasa y los niveles de malondialdehído en tejido pulmonar de ratones con daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Dosis únicas			
		MPO (U/mg pt)	I (%)	MDA (nmol/mg pt)	I (%)
Control negativo (vehículo)	-	0,05 ± 0,01 **	-	0,43 ± 0,25 **	-
Control positivo (vehículo + AO)	-	0,23 ± 0,04	-	0,71 ± 0,53	-
D-005 + AO	5	0,20 ± 0,04	16,7	0,57 ± 0,06 *	50,0
D-005 + AO	25	0,11 ± 0,01 *	66,7	0,51 ± 0,04 *	71,4
D-005 + AO	100	0,09 ± 0,01 **	77,8	0,44 ± 0,03 **	96,4
D-005 + AO	200	0,08 ± 0,01 **	83,3	0,49 ± 0,03 **	78,6
DEX + AO	20	0,10 ± 0,01 *	72,2	0,51 ± 0,05 *	71,4
Dosis repetidas					
Control negativo (vehículo)	-	0,07 ± 0,02 *	-	1,52 ± 0,10 **	-
Control positivo (vehículo + AO)	-	0,33 ± 0,09	-	3,77 ± 0,50	-
D-005 + AO	5	0,15 ± 0,06*	53,8	2,20 ± 0,12 **	69,8
D-005 + AO	25	0,10 ± 0,04 *	88,5	1,88 ± 0,11 **	84
D-005 + AO	100	0,08 ± 0,01 *	92,3	1,66 ± 0,12 **	93,8

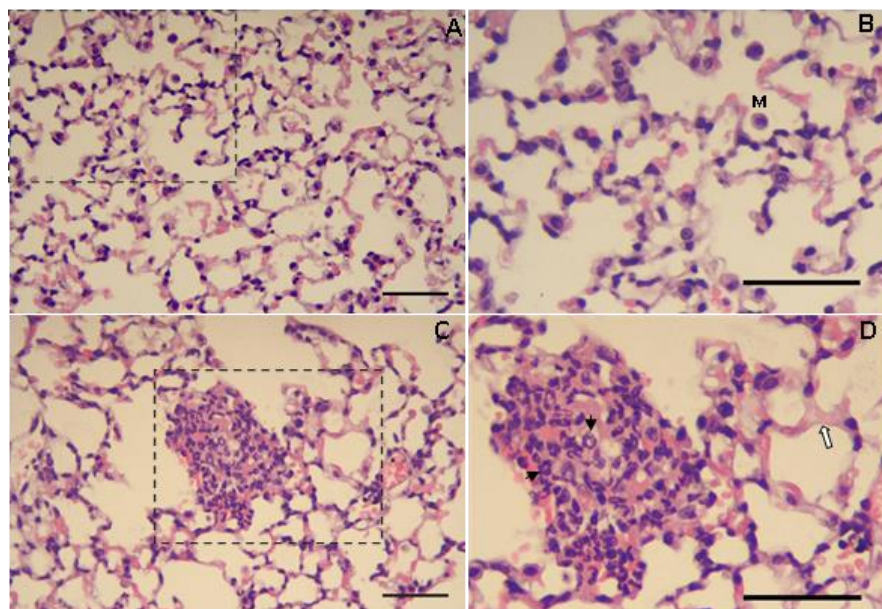
D-005 + AO	200	0,11 ± 0,04 *	84,6	1,52 ± 0,09 **	100
DEX + AO	20	0,10 ± 0,04 *	88,5	1,84 ± 0,12 **	85,8

AO ácido oleico, DEX dexametasona, I inhibición, MDA Malondialdehído, MPO Mieloperoxidasa, pt proteína Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  Comparación vs grupo control (+). Prueba de la U de Mann Whitney.

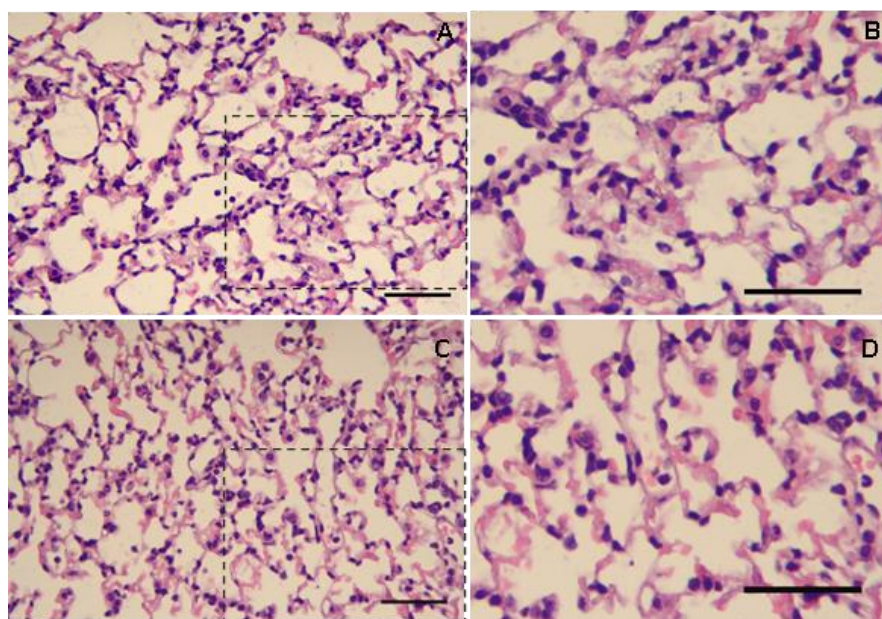
**Tabla 3.** Efectos de dosis repetidas de D-005 sobre las concentraciones de grupos sulfhidrilos y actividad enzimática de SOD y CAT en tejido pulmonar de ratones con daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	SH (mmol/L)	I (%)	SOD (U mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	R (%)	CAT (U/min mg pt x 10 <sup>-1</sup> )	R (%)
Control negativo	-	0,83 ± 0,14 *	-	8,11 ± 1,28 **	-	6,54 ± 0,14 *	-
Control positivo	-	2,00 ± 0,22	-	2,76 ± 0,04	-	1,96 ± 0,18	-
D-005	5	1,38 ± 0,09 *	52,9	5,24 ± 1,03 *	46,3	3,64 ± 0,42 **	36,6
D-005	25	1,33 ± 0,08 *	57,2	5,39 ± 0,71 *	49,1	3,64 ± 0,42 **	47,3
D-005	100	1,26 ± 0,04 *	63,2	6,25 ± 0,89 *	65,2	4,13 ± 0,44 **	54,5
D-005	200	1,23 ± 0,08 *	65,8	6,41 ± 0,41 **	68,2	5,01 ± 0,56 **	66,6
DEX	20	1,24 ± 0,07 *	64,9	6,15 ± 0,77 *	63,3	4,46 ± 0,30 **	54,6

CAT catalasa; DEX dexametasona, I inhibición, pt proteína; R restitución, SH sulfhidrilos, SOD superóxido dismutasa Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  Comparación respecto al grupo control positivo Prueba estadística (U de Mann Whitney).



**Figura. 1.** Secciones histológicas de pulmón de ratones (tinción de hematoxilina y eosina. 40 X). A y B): control negativo, paredes alveolares finas y presencia ocasional de macrófagos (M) en el espacio alveolar. C y D): control positivo, zona amplia de polimorfonucleares neutrófilos (cabezas de flecha) y paredes alveolares engrosadas (flecha blanca). Los rectángulos con líneas discontinuas en A y C encierran las regiones que se han ampliado en B y D, respectivamente. Barras = 50  $\mu$ m.



**Figura. 2.** Secciones histológicas de pulmón de ratones (tinción de hematoxilina y eosina. 40 X). A y B): D-005, disminución del grosor de las paredes alveolares y ausencia de neutrófilos. C y D): DEX, disminución del grosor de las paredes alveolares y

presencia de escasos neutrófilos. Los rectángulos con líneas discontinuas en A y C encierran las regiones que se han ampliado en B y D, respectivamente. Barras = 50  $\mu$ m.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con dosis orales únicas y repetidas de D-005, (5, 25, 100 y 200 mg/kg) previno los cambios histopatológicos en el tejido pulmonar dañado evidenciado mediante cambios cuantitativos y cualitativos, lo cual se asoció a un efecto antiinflamatorio y antioxidante que pudiera explicar, al menos en parte, su efecto protector sobre el DPA inducido por AO.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1974) Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press: New York and London, pp 673–677.
- Aratani, Y. (2018) Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.*, 640, 47-52.
- Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., *et al.* (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.*, 149(3), 818-824.
- Bhargava, R., Altmann, C.J., Andres, A., Webb, R.G., Okamura, K., Yang, Y., *et al.* (2013) Acute lung injury and acute kidney injury are established by four hours in experimental sepsis and are improved with pre, but not post, sepsis administration of TNF- $\alpha$  antibodies. *PLoS One*, 8(11), e79037.
- Charlier, C. & Michaux, C. (2003) Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal antiinflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(7-8), 645-659.
- Chow, C.W., Herrera, M.T., Suzuki, T., & Downey, G.P. (2003) Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 29(4), 427-431.
- Coruzzi, G., Venturi, N., & Spaggiari, S. (2007) Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed.*, 78(2), 96-110.
- Estenssoro, E. & Dubin, A. (2016) Síndrome de distrés respiratorio agudo. *Medicina (Buenos Aires)*, 76(4), 235-241.
- García de Lorenzo, M., López, J.M., & Sánchez, M.C. (2000) Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva*, 24(8), 353-360.
- Garza, A., Hernández, C.D., & Cantú, D. (2012), Prevalencia del Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda en una unidad de cuidados intensivos pediátrica polivalente. *Med Univ.*, 14(54), 11-15.
- Gonçalves, C.F., Burth, P., Silva, A.R., Younes, M., Castro, H.C., & Castro, M.V. (2012) Leptospira and inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2012, 11pages.
- González, V.L., Sierra, R., Mas, R., Pérez, Y., Oyarzábal, A., Rodríguez, E., *et al.* (2014) Compounds from the fruits of *Acrocomia crispera* and *Acrocomia aculeata* for use against oxidative stress and inflammation. Patent No. wo2013189467.
- Guimarães, C.L., Trentin, P G., & Arae, G. (2002) Endothelin ETB receptor-mediated mechanisms involved in oleic acid-induced acute lung injury in mice. *Clinical Science*. 103, 340-344.



- He, Z., Chen, X., Wang, S., & Zou, Z. (2014) Toll-like receptor 4 monoclonal antibody attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Exp Ther Med.*, 8(3), 871-876.
- Hou, S., Ding, H., Yin, X., Song, J., Landén, N.X., & Fan, H. (2014) Therapeutic Effect of Intravenous Infusion of Perfluorocarbon Emulsion on LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. *PLoS One*, 9(1), e87826.
- Hu, M.L. (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. En: L. Packer (eds): *Methods in enzymology*. pp. 380-385. Academic Press Inc.
- Huang, B., Wang, D.X., & Deng, W. (2014) Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats. *Int J Clin Exp Med.*, 7(12), 4698.
- Kato, Y. (2016) Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J Clin Biochem Nutr.*, 58(2), 99-104.
- Klebanoff, S.J. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 111(5), 383-389.
- Lai, J.P., Bao, S., Davis, I.C., & Knoell, D.L. (2009) Inhibition of the phosphatase PTEN protects mice against oleic acid-induced acute lung injury. *Br. J. Pharmacol.*, 156(1), 189-200.
- Lamontagne, F., Briel, M., Guyatt, G.H., Cook, D.J., Bhatnagar, N., & Meade, M. (2010) Corticosteroid therapy for acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and severe pneumonia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Critical Care*, 25(3), 420-435.
- León, O.S., Martínez, G., Candelario, E.J., García, I., Bilbao, T., & Ledesma, L. (2005) Fuentes y mecanismos generadores de especies reactivas de oxígeno. En: Balance Antioxidante- Prooxidante: *Salud y enfermedad*. pp. 14-34 Primera edición.
- Liao, Z., Dong, J., Wu, W., Yang, T., Wang, T., Guo, L., *et al.* (2012) Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Respir Res.*, 13(1), 110.
- Lingappan, K., Srinivasan, C., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X.I., & Moorthy, B. (2014) Analysis of the transcriptome in hyperoxic lung injury and sex-specific alterations in gene expression. *PLoS One*, 9(7), e101581.
- Liu, R., Luo, J., Li, J., Ma, Q., Sun, J., Li, Y., *et al.* (2013) Protective mechanisms of sevoflurane against one-lung ventilation-induced acute lung injury: role of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 33(5):625-30.
- Maniatis, N.A., Kotanidou, A., Catravas, J.D., & Orfanos, S.E. (2008) Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascular Pharmacology*, 49(4-6), 119-133.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *The FEBS Journal*, 47(3), 469-474.
- Matute, G., Frevert, C.W., & Martin, T.R. (2008) Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.*, 295(3), L379-L399.
- Mena, L., Sierra, R., Valle, M., Molina, V., Rodriguez, S., Merino, N., *et al.* (2019) Acrocomia crispa fruits lipid extract prevents LPS-induced acute lung injury in mice. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.*, 18(1), 16-26
- Ohkawa, O., Ohishi, I., & Yagi, K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95(2), 351-358.
- Pérez, Y., Oyarzábal, A., Sierra, R., Mas, R., Molina, V., Jiménez, S., *et al.* (2017) Inhibition of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) by D-005 (A lipid



- extract of *Acrocomia crispa* fruits). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.*, 16(3), 319-328.
- Rahman, I. & Adcock, I.M (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.*, 28(1), 219-242.
- Repine, J.E. (1992) Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. *The Lancet*, 339(8791), 466-469.
- Sartori, C., Allemann, Y., Duplain, H., Lepori, M., Egli, M., Lipp, E., *et al.* (2002) Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med.*, 346, 1631–1636.
- Sierra, R.C., González, V.L., Rodríguez, E.A., Marrero, D., Vicente, R., & Morales, CL. (2014) Estudio fitoquímico de los frutos de *Acrocomia crispa*, palma endémica cubana. *Rev CENIC Ciencias Químicas*, 45, 41-47.
- Standiford, T. & Ward, P. (2016) Therapeutic Targeting of Acute Lung Injury and ARDS Theodore J. 1 and Peter A. *Transl Res.*, 167(1), 183–191.
- Sun, R., Zhang, H., Si, Q., & Wang, S. (2002) Protective effect of Ginkgo biloba extract on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in D-galactose aging rats. *Zhonghua JieHeHeHuXi Za Zhi*, 25(6): 352–355.
- Tsushima, K., King, L.S., Aggarwal, N.R., Gorordo, A.D., & D'Alessio, F.R. (2009) Acute Lung Injury Review. *Intern Med.*, 48: 621-630.
- Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New Jersey). Worthington Enzyme Manual, 1972, pp. 43-45.
- Zhao, Z., Xu, D., Li, S., He, B., Huang, Y., Xu, M., *et al.* (2016) Activation of Liver X Receptor Attenuates Oleic Acid–Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *The American journal of pathology*, 186(10), 2614-2622.
- Zhe, F., Jihong, Y., Yang, L., Xiaowei, H., Huizhu, Sh., & Xiaofeng, T. (2015) Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF-Kb. *Int J Clin Exp Pathol.*, 8(4), 3451-3459.
- Zhou, X., Dai, Q., & Huang, X. (2012) Neutrophils in acute lung injury. *Front Biosci.*, 17, 2278-2283.