

# Estudio comparativo de los efectos del D-004 y sustancias antiinflamatorias sobre la pleuresía inducida por carragenina en ratas

## *Comparative study of the effects of D-004 and anti-inflammatory substances on carrageenan-induced pleurisy in rats*

Ambar Oyarzábal Yera<sup>a</sup>, Vivian Molina Cuevas<sup>a</sup>, Yazmín Ravelo Calzado<sup>b</sup>, Yohani Pérez Guerra<sup>b</sup>, Sonia Jiménez Despaigne<sup>b</sup>.

<sup>a-b</sup> Unidad de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.  
ambar.oyarzal@cnic.cu.

<sup>b</sup> Calidad Regulación y Control, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de septiembre de 2019;

Aceptado: 25 de noviembre de 2019;

### RESUMEN

En las últimas décadas, con el incremento de la expectativa de vida y de la población adulta mayor, la frecuencia de padecimientos de enfermedades inflamatorias ha aumentado a nivel mundial y como consecuencia la prescripción de los antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, su uso ha sido asociado a la ocurrencia de efectos adversos. El D-004, extracto lipídico de los frutos de *Roystonea regia* (palma real cubana) presenta efectos antiinflamatorios demostrados en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica. El objetivo de este trabajo es comparar el efecto antiinflamatorio del D-004 con aspirina (ASA), omega-3 y extracto de semilla de uva (ESU) en el modelo de pleuresía por carragenina en ratas. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 10 grupos: un control negativo sin daño y nueve grupos a los cuales se les indujo la pleuresía mediante la inyección de carragenina: un control positivo tratado con vehículo y ocho con D-004, omega-3 y ESU (200 y 400 mg/kg) y ASA (50 y 150 mg/kg), respectivamente. La administración de dosis orales únicas de D-004, omega-3, ESU y ASA redujo significativamente el volumen de exudado (VE) y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y solo el ESU y la ASA a la mayor dosis redujeron la concentración de proteínas (PT). En conclusión, la administración oral de 200 y 400 mg/kg de D-004, omega-3, ESU y ASA (50 mg/kg) produjo eficacias similares para reducir el VE, mientras el D-004 resultó más eficaz para inhibir la actividad de la MPO con respecto al omega-3 y al ESU. Por su parte, la administración de ASA (150 mg/kg) produjo una eficacia superior sobre ambos indicadores. Sin embargo, solo el ESU y la ASA a las dosis mayores ensayadas fueron eficaces para reducir la concentración de PT, como marcador de permeabilidad vascular.

**Palabras clave:** D-004; ESU; ASA; omega-3; carragenina; inflamación.

### ABSTRACT

In recent decades, with the increase in life expectancy and the elderly population, the frequency of inflammatory disease conditions has increased worldwide and as a consequence the prescription of non-steroidal anti-inflammatory drugs. However, its use has been associated with the occurrence of adverse effects. D-004, lipid extract of the fruits of *Roystonea regia* (Cuban royal palm) has anti-inflammatory effects demonstrated in experimental models of acute and chronic inflammation. The aim of this work is to compare the anti-inflammatory effect of D-004 with aspirin (ASA), omega-3 and grape seed extract (GSE) in the carrageenan pleurisy model in rats. The animals were randomly distributed in 10 groups: a negative control without damage and nine groups to which pleurisy was induced by carrageenan injection: a positive control treated with vehicle and eight with D-004, omega-3 and GSE (200 and 400 mg/kg) and ASA (50 and 150 mg/kg), respectively. The administration of single oral doses of D-004, omega-3, GSE and ASA significantly reduced the exudate volume (EV) and the activity of the myeloperoxidase (MPO) and only GSE and ASA at the highest dose reduced the protein concentration (PT). In conclusion, oral administration of 200 and 400 mg/kg of D-004, omega-3, GSE and ASA (50 mg/kg) produced similar efficacies

to reduce EV, while D-004 was more effective in inhibiting MPO activity with respect to omega-3 and GSE. In turn, the administration of ASA (150 mg/kg) produced superior efficacy on both indicators. However, only GSE and ASA at the highest doses tested were effective in reducing PT concentration, as a marker of vascular permeability.

**Keywords:** D-004; GSE; ASA; omega-3; carrageenan; inflammation.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales que resulta beneficiosa si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores (Florez, 2014). Los procesos inflamatorios se encuentran involucrados en la patogénesis de diversas enfermedades de evolución crónica como: artritis reumatoidea, aterosclerosis, osteoartritis, asma bronquial, hiperplasia prostática benigna, cáncer, entre otras (Briganti *et al.* 2009; Mc Neill *et al.* 2010; Niknami *et al.* 2010; George y Brightling, 2016; Robinson *et al.* 2016).

En las últimas décadas, con el incremento de la expectativa de vida y de la población adulta mayor, la frecuencia de padecimientos de enfermedades inflamatorias se ha incrementado a nivel mundial. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (aspirina, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, entre otros) representan una de las clases terapéuticas más prescritas para tratar esta entidad patológica. Sin embargo, su uso ha sido asociado a la ocurrencia de efectos adversos fundamentalmente sobre el tracto gastrointestinal, que pueden transitar desde una simple dispepsia hasta la formación de úlceras pépticas cuyas complicaciones pueden conducir a hemorragias e incluso a la muerte (Tsumura *et al.* 2007; Yajima *et al.* 2007; Moore *et al.* 2015; Blumenthal *et al.* 2018).

La aspirina (ASA) es el AINE más representativo de esta clase terapéutica cuya eficacia antiinflamatoria se sustenta por la inhibición inespecífica e irreversible de las isoformas 1 y 2 de la ciclooxigenasa (COX) (Vane y Botting, 2003). No obstante, su uso se ha limitado debido a que se asocia a diversos efectos adversos como: pirosis, dispepsias, gastritis, epigastralgia, diarrea, estreñimiento, úlceras gastroduodenales, hemorragias, nefropatías agudas, insuficiencia renal, sordera, entre otros (Whelton, 1999; Karademir *et al.* 2003; Turajane *et al.* 2009; Lanas, 2010).

Por tal motivo, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas antiinflamatorias seguras y eficaces constituye una problemática actual.

En este sentido, se han desarrollado nuevas sustancias antiinflamatorias de origen natural con mejor perfil de seguridad, dentro de los cuales se destacan el aceite de pescado omega-3 y el extracto de semilla de uva (ESU) (Simopoulos, 2002; Puiggros *et al.* 2005).

El aceite de pescado, rico en ácidos grasos omega-3 [ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA)], presenta propiedades antiinflamatorias mediadas por efecto sobre las prostaglandinas (PG) y citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ ). Los ácidos grasos Omega-3 son ampliamente utilizados en el mundo para tratar los trastornos inflamatorios asociados a patologías crónicas como: colitis, asma, artritis, enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras (Simopoulos, 2002; Swamy *et al.* 2008; Cotogni *et al.* 2011).

El ESU (*Vitis vinifera* L.), un suplemento nutricional ampliamente utilizado en el mundo, presenta propiedades antioxidantes y antiinflamatorias debido a su alto contenido en polifenoles, fundamentalmente flavonoides como la proantocianidina (Puiggros *et al.* 2005; Devi *et al.* 2006; Terra *et al.* 2007; Park *et al.* 2014).

El D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico, linoleico, y mirístico como componentes mayoritarios, mientras el palmitoleico, caprílico, cáprico y esteárico se encuentran en menor proporción (Arruzazabala *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2009).

Estudios previos demostraron los efectos antiinflamatorios del D-004 en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica, los cuales han sido asociados a un mecanismo de acción dual que involucra la inhibición de las actividades enzimáticas de la ciclooxigenasa (COX) y 5-lipooxigenasa (5-LOX) (Menéndez *et al.* 2006; Pérez, 2010; Ravelo *et al.* 2011; Oyarzábal *et al.* 2017). Además, previene la hiperplasia prostática inducida experimentalmente en roedores, así como ejerce efectos antioxidantes. (Arruzazabala *et al.* 2006; 2009; Oyarzábal *et al.* 2011; 2013; 2015).

A diferencia de los AINEs, el D-004 constituye una nueva sustancia con acción antiinflamatoria que no presenta toxicidad asociada, lo cual ha sido avalado por los estudios de toxicología preclínica (Gámez *et al.* 2005; Gutiérrez *et al.* 2005, 2007, 2008 (a, b), 2011, 2015 (a-c)) y por los ensayos clínicos que han documentado que es una sustancia segura y bien tolerada (López *et al.* 2008, 2009; Rodríguez *et al.* 2010; Guzmán *et al.* 2013 a, b, 2016).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta interesante comparar el efecto antiinflamatorio del D-004 con ASA (AINE clásico), omega-3 y ESU en el modelo de pleuresía por carragenina en ratas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (150-200g) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. La Habana), las cuales fueron adaptadas 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) de la Unidad de Productos Naturales (UPN) perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

Los animales se identificaron mediante pinceladas de solución de ácido pícrico y para el sacrificio se colocaron, en una campana, en atmósfera de halotano hasta morir.

## Administración y dosificación

El D-004 (lote 310909) (Plantas de Producción, CNIC, La Habana, Cuba), el ESU (Extracts, Healing & Medicinal Herbs, Australia) y el omega-3 (Rainbow and Nature Pty Ltd, Australia) fueron preparados en forma de emulsión en Tween-65/H<sub>2</sub>O (2 %) (Vehículo), mientras la ASA (Farmacuba, La Habana, Cuba) fue preparada en forma de suspensión en goma acacia al 1 %. Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral (5 mL/kg).

La carragenina, sustancia inductora de la inflamación, (BDH Chemical Ltd Poole, England) y el citrato de sodio (Caledon Laboratorios Ltd Georgetown, Canadá) se prepararon en disolución salina al 1 y 3,15 %, respectivamente.

Tras culminar la cuarentena, las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 10 grupos experimentales (10 ratas/grupo): un control negativo al cual se le inyectó disolución salina en la cavidad pleural y nueve grupos a los cuales se les indujo la pleuresía mediante la inyección de carragenina: un control positivo tratado con vehículo y ocho con ASA (50 y 150 mg/kg), D-004 (200 y 400 mg/kg), omega-3 (200 y 400 mg/kg), y ESU (200 y 400 mg/kg), respectivamente.

## Inducción del daño

Una hora después de administrados los tratamientos (vehículo, ASA, D-004, omega-3 y ESU) los animales se anestesiaron en atmosfera de halotano y se les realizó una incisión en el dorso lateral para la administración de la carragenina (1 %) en la cavidad pleural mediante la inyección de 0,3 mL de la disolución. Cinco horas después de la inducción de la inflamación las ratas se sacrificaron para la obtención del exudado pleural.

Para obtener el exudado pleural se abrió la cavidad pleural y se añadió 1 mL de citrato de sodio al 3,15 % que se homogenizó con el exudado, el cual se extrajo cuidadosamente utilizando una pipeta automática. Una vez colectado se trasvasó a un tubo plástico graduado.

## Volumen de exudado pleural (VE).

El volumen del exudado colectado se midió en tubos plásticos graduados, para lo cual se le restó el volumen de citrato de sodio añadido (1 mL). El porcentaje de inhibición del edema se calculó según:

$$\text{Inhibición} = 100 - \frac{(\Delta VE_T * 100)}{(\Delta VE_C)}$$

donde:  $\Delta VE_T$  = VE en los animales tratados - VE en los animales controles negativos

$\Delta VE_C$  = VE en los animales controles positivos - VE en los animales controles negativos

Nota: Los exudados contaminados con sangre se desecharon.

♦ Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO)

La cuantificación de MPO se realizó en el exudado pleural según la técnica descrita en el Worthington enzyme manual (1972). Para ello, las muestras se sonicaron por 10seg, se congelaron y descongelaron a una temperatura de -20 a 30 °C, respectivamente, por 3 veces sucesivas. Al culminar la última descongelación, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. por 25 min a 4 °C y se cuantificó la MPO en el sobrenadante. Para ello, se mezcló 625 µL de buffer fosfato (50 mM, 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 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 exudado. 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:

$$U/mg \text{ de proteína} = \Delta A \text{ min.} \times Vol. \text{ cubeta} / 8,3 \times Vol. \text{ muestra} \times 10$$

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).

#### ♦ Proteínas totales

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Marxwell *et al.* 1987).

### Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  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).

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos con relación a la formación de edema, el incremento en la actividad de la MPO y la concentración de PT en el exudado pleural, inducido por carragenina en ratas, se muestran en la Tabla 1. Como se puede apreciar la inyección de carragenina (grupo control positivo) incrementó de forma significativa ( $p < 0,001$ ) el VE, así como la actividad enzimática de la MPO y la concentración de PT en dicho exudado con respecto al grupo control negativo.

La administración de dosis orales únicas de D-004, Omega-3 y ESU (200 y 400 mg/kg) redujo de modo moderado y significativo el VE y la actividad de la MPO cuando fueron comparados con el grupo control positivo. Por su parte, solo el ESU a la dosis de 400 mg/kg redujo de modo moderado y significativo la concentración de proteínas (Tabla 1).

El omega-3 (200 mg/kg) y el ESU (400 mg/kg) mostraron diferencias significativas sobre la actividad de la MPO (15,9 y 25,6 % de inhibición, respectivamente) comparados con dosis



similares de D-004, el cual alcanzó porcentajes de inhibición de 25 y 31,6, respectivamente (Tabla 1).

Por otra parte, la ASA redujo de modo significativo (comparado con el grupo control positivo) el VE y la actividad de la MPO cuando fue administrado como dosis orales únicas de 50 y 150 mg/kg, respectivamente, mientras que solo la dosis de 150 mg/kg redujo significativamente la concentración de PT. Por su parte, la inhibición alcanzada con la ASA sobre VE (48,6 %) y MPO (41,5%) fue significativamente superior a la del D-004.

## DISCUSION

Los resultados del presente estudio corroboran la eficacia del D-004, administrado oralmente en forma de dosis únicas, para inhibir la inflamación inducida por la inyección intercostal de carragenina en ratas. Así, el tratamiento con 200 y 400 mg/kg de D-004 produjo una reducción moderada pero significativa del VE y la actividad de la MPO, sin afectar las concentraciones de PT en el exudado pleural confirmando así la eficacia antiinflamatoria del D-004 en este modelo, ya que fue muy similar a reportes previos (Oyarzábal *et al.* 2017).

Por su parte, el hecho de que en el grupo control positivo se presentara un incremento en el VE, en la actividad de la MPO y en la concentración de PT respecto al grupo control negativo muestra la validez de este modelo y de los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales.

La inyección intercostal de carragenina en ratas con la consecuente formación de un exudado inflamatorio en la cavidad pleural constituye un modelo experimental de inflamación aguda, ampliamente utilizado en la evaluación de sustancias con potencial efecto antiinflamatorio. Este modelo involucra la activación de las enzimas que participan en el metabolismo del ácido araquidónico: 5-LOX y COX, con mayor aporte de esta última, específicamente de la isoforma tipo 1 (COX-1), ya que el marcado efecto de sus productos sobre la vasodilatación y permeabilidad vascular confieren al exudado formado un origen fundamentalmente vasogénico, (Muller, 2002; Nakano *et al.* 2007; Fausto & Jon Aster, 2009) por lo cual la eficacia de cualquier sustancia en este modelo dependerá de su mecanismo de acción.

Ha sido demostrado previamente que el mecanismo antiinflamatorio del D-004 responde a una inhibición dual sobre 5-LOX y COX, con acción específica sobre COX-2. Así, este mecanismo sustenta la acción antiinflamatoria moderada del D-004 en este modelo, al no involucrar la inhibición de la COX-1, enzima crucial en la génesis de este exudado inflamatorio, mientras que el modesto efecto del D-004 ( $\cong$  31 %) sobre la infiltración de neutrófilos, medido como actividad de la MPO, pudiera responder a la inhibición de la 5-LOX lo cual conduce a una reducción del leucotrieno B<sub>4</sub>, potente agente quimiotáctico de neutrófilos.

Por otra parte, la administración con dosis orales únicas de omega-3 y ESU (200 y 400 mg/kg) (sustancias antiinflamatorias de origen natural), así como de ASA (50 y 150 mg/kg) (AINE clásico) también inhibieron el VE y la actividad de la MPO, mientras solo las dosis más altas de ASA y ESU redujeron las concentraciones de PT.

La comparación de iguales dosis de D-004 con omega-3 y ESU mostró eficacias similares para reducir el VE, mientras el D-004 resultó más eficaz para inhibir la actividad de la MPO. De modo distintivo, solo la dosis mayor ensayada de ESU redujo la concentración de PT, efecto que fue estadísticamente significativo no solo respecto al grupo control positivo sino al D-004 y que concuerda con la inhibición inespecífica de la COX reportada por otros autores (Raman *et al.* 2008).

El hecho de que D-004, ESU y omega-3 inhibieran la actividad de la MPO indica que su mecanismo antiinflamatorio involucra la inhibición de la infiltración de neutrófilos. En tal sentido, el D-004 inhibe la 5-LOX y la consecuente reducción en la formación del leucotrieno B4, lo que pudiera explicar su mayor eficacia sobre esta variable.

En contraste a este resultado, las tres sustancias ejercieron eficacias similares sobre el VE, lo cual sugiere que el mecanismo antiinflamatorio de ESU y omega-3 involucra otros mecanismos independientes a sus efectos sobre la modulación de la migración de neutrófilos. En tal sentido, ha sido documentado que los ácidos grasos omega-3 modulan las prostaglandinas (PG) y citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ ) (Wu *et al.* 2016), mientras que la actividad antiinflamatoria del ESU ha sido asociada a efectos inhibitorios sobre la COX (de modo inespecífico sobre ambas isoformas 1 y 2) (Raman *et al.* 2008).

Por otra parte, al comparar el D-004 a las dosis ensayadas con la menor dosis de ASA (50 mg/kg) mostró una eficacia similar para reducir el VE y la actividad de la MPO, mientras que la dosis mayor de ASA (150 mg/kg) produjo una mayor eficacia sobre ambos indicadores. El efecto distintivo de la ASA sobre la concentración de PT responde a la reducción de la permeabilidad vascular, de modo similar a lo obtenido con la mayor dosis de ESU.

La mayor eficacia antiinflamatoria obtenida con ASA, AINE clásico que inhibe inespecíficamente la COX, pero con radio preferencial sobre COX-1 (Botting, 2010), está en concordancia con el papel relevante de esta isoforma enzimática en la formación del edema pleural típico de este modelo.

**Tabla 1.** Efectos del D-004, omega-3, ESU y ASA sobre la formación de edema, el incremento en la actividad de la MPO y la concentración de PT en el exudado pleural.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	VE (mL)	% I	MPO (U/mg de proteína)	% I	PT (mg/mL)	% I
Control negativo (vehículo)	0	0,01 ± 0,01***	-	0,37 ± 0,16 ***	-	0,90 ± 0,17 ***	-
Control positivo (vehículo + C)	0	1,45 ± 0,03	-	43,58 ± 1,84	-	19,21 ± 0,96	-
D-004 + C	200	1,08 ± 0,06 ***	25,7	32,79 ± 0,68 ***	25,0	19,10 ± 0,98	0,6
D-004 + C	400	0,95 ± 0,06 ***	34,7	29,93 ± 0,97 ***	31,6	18,76 ± 0,95	2,5
Omega-3 + C	200	1,12 ± 0,06 **	22,9	36,70 ± 1,25 * <sup>a</sup>	15,9	19,57 ± 0,87	2,0
Omega-3 + C	400	1,07 ± 0,05 ***	26,4	32,01 ± 0,80 ***	26,8	19,10 ± 1,35	0,6
ESU + C	200	1,08 ± 0,06 ***	25,7	35,35 ± 1,27 **	19,0	18,16 ± 0,86	5,7
ESU + C	400	1,07 ± 0,10 **	26,4	32,51 ± 0,84 *** <sup>a</sup>	25,6	15,34 ± 1,04 * <sup>a</sup>	21,1
ASA + C	50	1,07 ± 0,05 ***	26,4	31,58 ± 1,94 **	27,8	17,19 ± 1,03	11,0
ASA + C	150	0,75 ± 0,03 *** <sup>d</sup>	48,6	25,64 ± 1,26 *** <sup>c</sup>	41,5	15,10 ± 1,52*	22,5

VE volumen de exudado, MPO mieloperoxidasa, PT proteínas totales, % I porcentaje de inhibición, C carragenina Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Comparación vs grupo control (+).<sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ . Comparación vs dosis similares de D-004 <sup>c</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup>  $p < 0,01$ . Comparación ASA (150 mg/kg) vs D-004 (400 mg/kg) Prueba de la U de Mann Whitney



## CONCLUSIONES

La administración oral de 200 y 400 mg/kg de D-004, omega-3, ESU y ASA (50 mg/kg) produjo eficacias similares para reducir el VE, mientras el D-004 resultó más eficaz para inhibir la actividad de la MPO con respecto al omega-3 y al ESU. Por su parte, la administración de ASA (150 mg/kg) produjo una eficacia superior sobre ambos indicadores. Sin embargo, solo el ESU y la ASA a las dosis mayores ensayadas fueron eficaces para reducir la concentración de PT, como marcador de permeabilidad vascular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arruzazabala, M.L., Más, R., Molina, V., Noa, M., Carbajal, D., & Mendoza, N. (2006) Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs in R&D.*, 7(4), 233-241.
- Arruzazabala, M.L., Más, R., Pérez, Y., Ravelo, Y., Molina, V., & Carbajal, D. (2009) Effect of D-004, a lipid extract from royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on phenylephrine-induced contractions of isolated rat prostate. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(3), 1-9
- Arruzazabala, M.L., Molina, V., Carbajal, D., Más, R., González, V., Rodríguez, E., *et al.* (2008) Composition changes of lipid extracts of *Roystonea regia* fruits of different ripening stages influence their effects on testosterone-induced prostate enlargement in rats. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 41-45.
- Blumenthal, K.G., Lai, K.H., Huang, M., Wallace, Z.S., Wickner, P.G., & Zhou, L. (2018) Adverse and hypersensitivity reactions to prescription nonsteroidal anti-inflammatory agents in a large healthcare system. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(3), 737-743.
- Botting, RM. (2010) Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacological Reports*, 62, 518-525.
- Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N., Gallina, A., Salonia, A., Bianchi, M., *et al.* (2009). Benign prostatic hyperplasia and its aetiologies. *European Urology Supplements*, 8(13), 865-871.
- CECMED. (2004) Resolución 39 del año 2004. *Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental*.
- Cotogni, P, Muzio, G., Trombetta, A., Ranieri, V.M., & Canuto, R.A. (2011) Impact of the omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio on cytokine release in human alveolar cells. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35(1), 114-121.
- Devi, A., Jolitha, A.B., & Ishii, N. (2006) Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defence in the brain of adult rats. *Medical Science Monitor*, 12(4), 24-29.
- Fausto, M.D & Jon Aster, M.D. (2009) *Acute and chronic inflammation*, 8th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Florez, J. (2014) *Farmacología Humana*, 6ta edición, Masson, S.A., Barcelona, España

- Gámez, R., Más, R., Noa, M., Menéndez, R., García, H., Rodríguez, Y., *et al.* (2005) Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs under experimental and clinical research*, 31(3), 101-108.
- George, L. & Brightling, Ch. E. (2016) Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Chronic Disease.*, 7(1), 34-51.
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Más, R., Noa, M., Pardo, B., Goicochea, E., *et al.* (2007) Toxicología aguda del D-004 en conejos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(2), 99-102.
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Más, R., Noa, M., Pardo, B., Marrero, G., *et al.* (2008) Oral subchronic toxicity of a lipid extract from *Roystonea regia* fruits in mice. *Drugs and Chemical Toxicology*, 31, 217-228. (a)
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Más, R., Noa, M., Valle, M., Oyarzábal, A., *et al.* (2015) Evaluación de la toxicidad de la terapia combinada D-004 + tamsulosin en ratas. *Revista CNIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 42-50. (b)
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Noa, M., Más, R., Arencibia, D., Pardo, B., *et al.* (2011) One-year oral toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in Sprague Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2855-2861.
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Noa, M., Más, R., Nodal, C., Valle, M., *et al.* (2015) Carcinogenicity potential of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in Sprague Dawley rats: a 24 months study. *International Journal of Toxicology*, 34, 138-150. (c)
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Noa, M., Más, R., Pardo, B., Valle, M., *et al.* (2008) Evaluation of D-004 effects in the uterotrophic assay in mature ovariectomized rats. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(5), 710- 715. (b)
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Noa, M., Valle, M., Oyarzábal, A., Pérez, Y., *et al.* (2015) Toxicological Evaluation of the combined therapy D-004 and finasteride in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(2), 58-62. (a)
- Gutiérrez, A., Marrero, G., Gámez, R., Fernández, I., Curveco, D., & Garcia, H. (2005) Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36 (Especial).
- Guzmán, R., Fragas, R., Illnait, J., Más, R., Fernández, L., Pedroso, M., *et al.* (2013) Effects of *Roystonea regia* (D-004) and *saw palmetto* lipid extracts in men with symptomatic benign prostatic hiperplasia. *IOSR Journal of Pharmacy*, 3(6), 7-14. (b)
- Guzmán, R., Illnait, J., Más, R., Fernández, L., Pedroso, M., Fernández, J.C., *et al.* (2016) Efficacy and tolerability of *Roystonea regia* (D-004) and *Saw palmetto* lipid extracts in men with symptomatic benign prostatic hiperplasia: a 24 weeks study. *Gazzetta Medica Italiana*; doi 10.23736/S0393-3660.16.03226-5.
- Guzmán, R., Illnait, J., Más, R., Pérez, Y., Fernández, L., Mendoza, S., *et al.* (2013) Comparative effects of *Roystonea regia* (D-004) and *Saw palmetto* lipid extracts on blood oxidative variables in men with benign prostate hyperplasia (BPH). *IOSR Journal of Pharmacy*, 3(7), 1-8 (a).

- Karademir, S., Oğuz, D., Senocak, F., Ocal, B., Karakurt, C., & Cabuk, F. (2003) Tolmetin and salicylate therapy in acute rheumatic fever: Comparison of clinical efficacy and side-effects. *Pediatrics Internacional*, 45(6), 676-679.
- Lanas, A. (2010) Gastrointestinal bleeding associated with low-dose aspirin use: relevance and management in clinical practice. *Expert Opinion on Drug Safety*, 10(1), 45-54.
- López, E., Illnait, J., Ramirez, Y., Hollands, I., Mendoza, S., Fernández, L., *et al.* (2008) Estudio fase I de la tolerabilidad del D-004, un extracto lipídico del fruto de la palma real (320-960 mg/d) en voluntarios sanos. *Rev CENIC, Ciencias Biológicas*, 39(1), 33-43.
- López, E., Molina, V., Illnait, J., Oyarzábal, A., Fernández, L., Más, R., *et al.* (2009) Antioxidant effects of D-004, a lipid extract from the *Roystonea regia* fruits, on the plasma of healthy men. *Asian Journal of Andrology*, 11, 385-392.
- Marxwell, M.A., Haas, S.M., Beiber, L.L., & Tolbert, N.E. (1987) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87, 206-209.
- Mc Neill, E., Channon, K.M., & Greaves, D.R. (2010) Inflammatory cell recruitment in cardiovascular diseases: murine models and potential clinical applications. *Clinical Science*, 118(11), 641-655.
- Menéndez, R., Carbajal, D., Más, R., Pérez, Y., Molina, V., Arruzazabala, M.L., *et al.* (2006) Efectos del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*), sobre el granuloma inducido por algodón en ratas y sobre la lipoxigenasa presente en leucocitos polimorfonucleares (PMNs). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(2), 213-218
- Moore, N., Pollack, Ch., & Butkerait, P. (2015) Adverse drug reactions and drug-drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2015(11), 1061-1075.
- Muller W.A. (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation*, 82, 521-533.
- Nakano, M., Denda, N., Matsumoto, M., Kawamura, M., Kawakubo, Y., Hatanaka, K., *et al.* (2007) Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression in the late phase of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 559(2-3), 210-218.
- Niknami, M., Vignarajan, S., Yau, M., Hua, S., Witting, P.K., Kita, Y., *et al.* (2010) Decrease in expression of activity of cytosolic phospholipase A2alpha increases cyclooxygenase-1 action: A cross-talk between key enzymes in arachidonic acid pathway in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(7), 731-737.
- Oyarzábal, A., Jiménez, S., Curveco, D., Pérez, Y., Molina, V., & Más, R. (2011) Effects of oral treatment (60 days) with D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on rat prostate hyperplasia and oxidative markers. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30(2), 368-372.

- Oyarzábal, A., Molina, V., Ravelo, Y., Pérez, Y., & Jiménez, J. (2017) Effects of D-004, a lipid extract of the *Roystonea regia* fruits, on carrageenan-induced pleurisy in rats. *BAOJ Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 46, 1-8.
- Oyarzábal, A., Pérez, Y., Jiménez, S., Más, R., & Molina, V. (2013) Effects of D-004, antioxidant and anti-inflammatory substances on testosterone-induced prostate hyperplasia in rats. *Oxidant and Antioxidant Medical Science*, 2(3), 181-186.
- Oyarzábal, A., Pérez, Y., Molina, V., Más, R., Ravelo, Y., & Jiménez, S. (2015) Effects of D-004, vitamin E and grape seed extract on phenylephrine-induced urodynamic impairment in rats. *Translational Andrology and Urology*, 4(4), 391-397.
- Park, M., Cho, H., Jung, H., Lee, H., & Hwang, K. T. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. *Journal of food biochemistry*, 38(3), 259-270.
- Pérez, Y. (2010) Mecanismos que sustentan la eficacia del D-004, extracto lipídico del fruto de la palma real, en modelos experimentales de hiperplasia de próstata. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(1), 83-84.
- Puiggros, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C, Arola, L, & Salvadó, MJ. (2005) Grape seeds proanthocyanidine prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal Agriculture Food Chemical*, 53(15), 6080-6086.
- Raman, P., Dewitt, D.L., & Nair, M.G. (2008) Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytotherapy Research*, 22(2), 204-212.
- Ravelo, Y., Molina, V., Jiménez, S., Oyarzábal, A., Pérez, Y., & Más R. (2011) Effect of oral administration of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on xylene-induced ear oedema in mice. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30(9), 1744-1748.
- Robinson, W. H., Lepus, Ch.M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., *et al.* (2016) Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 580-592.
- Rodríguez, E., Marrero, D., González, V., Sierra, R., & Adames, Y. (2009) Validación de un método por cromatografía de gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 40(1), 17-22.
- Rodríguez, I., Molina, V., Illnait, J., Oyarzábal, A., Mendoza, S., Fernández, L., *et al.* (2010) Comparison of the antioxidant effects of lipid extracts of *Roystonea regia* (D-004) and *Saw palmetto* on blood oxidative variables of healthy men. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(7), 1185-1192.
- Simopoulos, A.P. (2002) Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Journal American College Nutrition*. 21(6), 495-505.
- Swamy, M.V., Citineni, B., Patlolla, J.M., Mohammed, A., Zhang, Y., & Rao, C.V. (2008) Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. *Nutrition and Cancer*, 60(1), 81-89.

- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J.M., Arola, L., Ardèvol, A., *et al.* (2007) Grape seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55(11), 4357-4365.
- Tsumura, H., Tamura, I., Tanaka, H., Chinzei, R., Ishida, T., Masuda, A., *et al.* (2007) Prescription of non-steroidal anti-inflammatory drugs and co-prescribed drugs for mucosal protection: analysis of the present status based on questionnaires obtained from orthopaedists in Japan. *Internal Medicine*, 46(13), 927-931.
- Turajane, T., Wongbunnak, R., Patcharatrakul, T., Ratansumawong, K., Poigampetch, Y., & Songpatanasilp, T. (2009) Gastrointestinal and cardiovascular risk of non-selective NSAIDs and COX-2 inhibitors in elderly patients with knee osteoarthritis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92(6), S19-S26.
- Vane, J.R. & Botting, R.M. (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*, 110, 255-258.
- Whelton, A. (1999) Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *American Journal of Medicine*, 106(5), 13S-24S.
- Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New Jersey). Worthington enzyme manual, 1972, pp. 43-45.
- Wu, Y. Q., Dang, R. L., Tang, M. M., Cai, H. L., Li, H. D., Liao, D. H., *et al.* (2016). Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alleviates doxorubicin-induced depressive-like behaviors and neurotoxicity in rats: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Nutrients*, 8(4), 243
- Yajima, H., Yamao, J., Fukui, H., & Takakura, Y. (2007) Up-to-date information on gastric mucosal lesions from long-term NSAID therapy in orthopaedic outpatients: a study using logistic regression analysis. *Journal of Orthopaedic Science*, 12(4), 341-346.