

Evidencias preclínicas y clínicas de los efectos beneficiosos del D-004 sobre la hiperplasia prostática benigna

Preclinical and clinical evidence of the effects of D-004 on benign prostatic hyperplasia

Ambar Oyarzábal Yera^a, Vivian Molina Cuevas^a

^a Unidad de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.
ambar.oyarzal@cnic.cu

Recibido: 17 de septiembre de 2019;

Aceptado: 14 de noviembre de 2019;

RESUMEN

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real cubana (*Roystonea regia*), con efectos beneficiosos sobre la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), que contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos de cadena mediana principalmente oleico, láurico, palmítico, y mirístico, seguido por bajas concentraciones de caprílico, cáprico, palmitoleico, esteárico, linoleico y linolénico. El objetivo de este trabajo es presentar, describir y analizar los aspectos más relevantes de las evidencias pre-clínicas y clínicas de los efectos del D-004 sobre la HPB. Se revisaron los 100 artículos publicados sobre el D-004 y toda la documentación de archivo. Se seleccionaron los ensayos preclínicos más representativos de farmacología y toxicología, así como se incluyeron todos los ensayos clínicos. Los estudios farmacológicos preclínicos demostraron que el D-004 previene la hiperplasia prostática inducida por testosterona, así como los cambios urodinámicos inducidos por fenilefrina en roedores. Ambos efectos se asociaron a la inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y al antagonismo de los receptores α_1 -adrenérgicos, respectivamente, así como a efectos pleiotrópicos antioxidantes y anti-inflamatorios. Los estudios de toxicología preclínica demostraron la ausencia de toxicidad asociada al tratamiento. Los ensayos clínicos fase I (voluntarios sanos) demostraron que es seguro y bien tolerado. Los ensayos clínicos fase II realizados en pacientes con Síntomas del tracto bajo urinario (STBU) asociados a HPB demostraron que tiene efectos beneficiosos sobre la entidad clínica HPB/STBU, presentando además efectos antioxidantes asociados a un incremento en la defensa antioxidante endógena, siendo seguro y bien tolerado. En conclusión, el D-004 es una sustancia de origen natural cuyo uso se recomienda en hombres mayores de 50 años con STBU asociados a HPB.

Palabras clave: D-004; antioxidante; HPB/STBU.

ABSTRACT

D-004 is a lipid extract of the fruit of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*), with beneficial effects on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), which contains a reproducible mixture of medium-chain fatty acids mainly oleic, palmitic, lauric, linoleic and myristic, followed by low concentrations of palmitoleic, caprylic, capric, and stearic. The objective of this work is to present, describe and analyze the most relevant aspects of the pre-clinical and clinical evidences of the effects of D-004 on BPH. The 100 articles published on D-004 and all archival documentation were reviewed. The most representative preclinical pharmacology and toxicology trials were selected, as well as all clinical trials were included. Preclinical pharmacology studies showed that D-004 prevents testosterone-induced prostatic hyperplasia, as well as phenylephrine-induced urodynamic changes in rodents. Both effects were associated with the inhibition of 5 α -reductase enzyme activity and with the antagonism of α_1 -adrenergic receptors, respectively, as well as with antioxidant and anti-inflammatory pleiotropic effects. Preclinical toxicology studies demonstrated the absence of toxicity associated with treatment. Phase I clinical trials (healthy volunteers) demonstrated that it is safe and well tolerated. Phase II clinical trials

conducted in patients with lower urinary tract symptoms (LUTS) associated with BPH demonstrated that it has beneficial effects on the clinical entity BPH/LUTS, also presenting antioxidant effects associated with an increase in endogenous antioxidant defense, being safe and well tolerated. In conclusion D-004 is a substance of natural source whose use is recommended in men over 50 years with LUTS associated with BPH.

Keywords: D-004; antioxidant; BPH/LUTS.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una patología frecuente en el hombre que envejece y su incidencia incrementa con la edad, alcanzando un 50% en hombres entre 50 y 60 años de edad y puede llegar a un 90% en hombres de 80 años (Aaron *et al.* 2016; Corona *et al.* 2017). Desde el punto de vista histopatológico consiste en el crecimiento no maligno e incontrolado del tejido prostático que tiende a causar obstrucción urinaria y desarrollar síntomas del tracto bajo urinario (STBU), tales como aumento de la latencia de la micción, disminución del volumen y presión de la micción, nocturia, irritación o incontinencia vesical y retención urinaria. La entidad clínica HPB/STBU afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes (Parson y Kashe, 2008; Sciarra *et al.* 2008).

La etiología y patogénesis de la HPB es multifactorial y no está del todo dilucidada, pero implica fundamentalmente los cambios hormonales y no hormonales que ocurren en el hombre que envejece. El principal cambio hormonal que sustenta el desarrollo de la enfermedad es el incremento de la conversión de la testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa prostática, mientras que el cambio no hormonal de mayor incidencia en la entidad clínica HPB/STBU es el aumento de la inervación simpática a través de los receptores α_1 -adrenérgicos (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) presentes en próstata, vejiga y uretra que conducen a una mayor contracción de estos tejidos (Parson y Kashe, 2008; Sciarra *et al.* 2008; Briganti *et al.* 2009).

Es por estos motivos que el tratamiento farmacológico de esta patología se basa fundamentalmente en el empleo de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa prostática (finasteride, epristeride y dutasteride) y antagonistas de los receptores α_1 -adrenérgicos (tamsulosin, terazosina y doxazosina) así como el empleo de la terapia combinada con ambos tipos de medicamentos. Si bien estas terapias han resultado eficaces en el tratamiento de la HPB/STBU su uso está asociado a la ocurrencia de eventos adversos (Parson y Kashe, 2008; Sciarra *et al.* 2008; Briganti *et al.* 2009; Aaron *et al.* 2016; Corona *et al.* 2017).

Por otra parte, evidencias experimentales y clínicas sustentan el papel del estrés oxidativo y la inflamación en el desarrollo y progresión de la HPB/STBU (Sciarra *et al.* 2008; Briganti *et al.* 2009; Minciullo *et al.* 2015). En este sentido, ha sido demostrado que algunos extractos fitoterapéuticos utilizados en el manejo de la HPB presentan efectos anti-inflamatorios y antioxidantes que pueden contribuir a su eficacia (Belostottskaia *et al.* 2006; Matsumoto *et al.* 2010).

D-004

El D-004 es el extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) perteneciente a la familia Arecaceae. Contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos cuyos componentes mayoritarios son el ácido oleico, láurico, palmítico y mirístico y en menores concentraciones el caprílico, cáprico, palmitoléico, esteárico, linoleico y linolénico (Arruzazabala *et al.* 2008 a). La composición y pureza de cada lote evaluado en los estudios

experimentales y clínicos se determina por un método validado de cromatografía gaseosa en los cuales el total de ácidos grasos es $\geq 85\%$ según especificaciones de calidad (Rodríguez *et al.* 2009).

Las investigaciones sobre el D-004 comenzaron alrededor del año 2002 basado en la analogía en cuanto a origen taxonómico y composición química de este extracto con el extracto lipídico de los frutos del Saw palmetto (ELSP) (Pharmacopeia 2005), la alternativa fitoterapéutica más ampliamente utilizada en el tratamiento de la HPB/STBU (Kennedy, 2007; Curtis, 2008).

Basado en el hecho de que el ELSP actúa mediante un mecanismo multifactorial que involucra los componentes hormonales y no hormonales de la enfermedad, efectos pleiotrópicos (anti-inflamatorios y antioxidantes) y que su perfil de tolerabilidad es mejor que el de los otros tratamientos farmacológicos, y que Cuba presenta restricciones para adquirir los principales medicamentos para tratar la HPB en cantidades suficientes, obtener un nuevo extracto cuya fuente de obtención sea de gran abundancia en nuestro país representa una alternativa de tratamiento para nuestra población.

El objetivo de este trabajo es presentar, describir y analizar los aspectos más relevantes de las evidencias preclínicas y clínicas de los efectos del D-004 sobre la HPB.

Evidencias preclínicas

Estudios toxicológicos

Los estudios de toxicología experimental del D-004 no han mostrado toxicidad relacionada con el tratamiento en estudios de toxicidad aguda, subcrónica y crónica. El D-004 a dosis de 2000 mg/kg/día no produjo muertes ni signos de toxicidad, lo que indica que no es una sustancia tóxica. El estudio de toxicidad por dosis orales repetidas (1 año) de D-004 (500-2000 mg/kg/día) en ratas no mostró evidencias de toxicidad. Resultados negativos fueron también obtenidos en estudios de genotoxicidad, endocrinotoxicidad, fertilidad y reproducción, actividad sexual, estudios conductuales en roedores y carcinogénesis (2 años) (Gámez *et al.* 2005; Gutiérrez *et al.* 2005, 2007, 2008 (a, b), 2011, 2015 (a-c); Fernández *et al.* 2005; Carbajal *et al.* 2007; Marrero *et al.* 2007).

Estudios *in vitro*

Diversos estudios *in vitro* han demostrado el mecanismo por el cual el D-004 ejerce sus efectos beneficiosos sobre la salud de la próstata. Así, el D-004 inhibe de manera no competitiva y dependiente de la concentración la actividad enzimática de la 5 α -reductasa en próstata aislada de ratas (Pérez *et al.* 2006 a), enzima responsable de la conversión de la T a DHT, metabolito más activo. Por otra parte, el D-004 no bloqueó la unión de la DHT a sus receptores androgénicos (Pérez *et al.* 2007).

Además, el D-004 inhibe las contracciones inducidas por norepinefrina y fenilefrina en vaso deferente de ratas y en próstata aislada de ratas, respectivamente, lo cual evidencia su efecto antagonista sobre los receptores α_1 -adrenérgicos (Aruzabala *et al.* 2005, 2009), máximos responsables de los síntomas asociados a la HPB.

Estos resultados demuestran el efecto del D-004 sobre las dianas terapéuticas fundamentales de la entidad clínica HPB/STBU.

Por otra parte, el D-004 inhibió *in vitro* la peroxidación lipídica inducida por diferentes agentes [sistema enzimático, sistema no enzimático, adición de nicotinamida adenina difosfato (NADPH)/CCl₄, oxidación de 2-desoxirribosa] y reveló un efecto secuestrador de radicales OH• (Menéndez *et al.* 2007). Estos resultados demuestran el beneficio potencial del D-004 sobre los procesos oxidativos involucrados en la proliferación celular de la próstata y en el remodelado presente en la HPB.

El D-004 inhibió *in vitro* de modo marcado, significativo y dependiente de la concentración la actividad de las enzimas ciclooxigenasa-2 y 5-lipooxigenasa, ambas enzimas involucradas en los procesos inflamatorios (Menéndez *et al.* 2006). Este resultado demuestra que el D-004 presenta el perfil farmacológico de los denominados anti-inflamatorios duales que minimiza la aparición de eventos adversos asociadas a su uso, a la vez que pudiera contribuir a reducir la inflamación prostática que tiene lugar durante el desarrollo de la HPB contribuyendo como un beneficio adicional sobre la salud de la próstata.

Estudios *in vivo*

Farmacocinética

En correspondencia con sus efectos sobre la enzima 5 α -reductasa prostática y los receptores α_1 -adrenérgicos, el estudio farmacocinético demostró que el D-004, administrado como dosis orales únicas y enriquecido con ³H-oleico, se distribuyó rápidamente alcanzando en las primeras ocho horas la mayor acumulación de radioactividad total en el tejido prostático (Pérez *et al.* 2006 b), hecho relevante ya que la próstata es el órgano diana de la HPB.

Efectos sobre la hiperplasia prostática inducida en roedores

El tratamiento oral con D-004, administrado en un rango de dosis entre 50 y 800 mg/kg, inhibió la hiperplasia prostática (HP) inducida por T, no por DHT en roedores intactos y castrados (ratas y ratones) (Arruzazabala *et al.* 2004; Carbajal *et al.* 2004; Noa *et al.* 2005), resultado que se explica por su efecto sobre la actividad de la enzima 5 α -reductasa prostática y su ausencia de efecto sobre el enlace de la DHT a sus receptores (Pérez *et al.* 2006 a; Pérez *et al.* 2007).

Otros estudios evaluaron los efectos antioxidantes del D-004 en plasma y tejido prostático de ratas con HP inducida por T a la vez que corroboraron sus efectos sobre el aumento de tamaño de la próstata, observándose que ambos efectos se manifiestan a las mismas dosis, e incluso el efecto antioxidante en ratas con HP es superior al alcanzado en ratas aparentemente sanas y que este efecto se asocia a una estimulación de la actividad enzimática de la catalasa y de la capacidad antioxidante total del plasma (Pérez *et al.* 2008; Pérez *et al.* 2010). Además, un estudio realizado durante 60 días demuestra la persistencia de tales efectos en el tiempo (Oyarzábal *et al.* 2011). Por otra parte, un estudio comparativo D-004 *versus* extracto de semilla de uva, vitamina E, Ibuprofeno y Celecoxib, sustancias con probados efectos anti-inflamatorios y/o antioxidantes, corrobora los efectos del D-004 sobre el aumento de tamaño (hipertrofia) de la próstata y sobre la peroxidación lipídica en ratas con HP por T. Además, demuestra por primera vez el efecto anti-inflamatorio del D-004 en este modelo (determinado por la actividad de la mieloperoxidasa) (Oyarzábal *et al.* 2013). Es de destacar que, en este estudio las sustancias con probados efectos antioxidantes y anti-inflamatorios no mostraron efecto sobre el aumento de tamaño de la próstata.

Efectos sobre los cambios urodinámicos inducidos por fenilefrina en ratas

La administración oral de D-004 a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg previene los cambios urodinámicos y la HP atípica inducida por fenilefrina en ratas, en correspondencia con su antagonismo de los receptores α_1 -adrenérgicos, mostrando ser moderadamente más efectivo que el ELSP (Arruzazabala *et al.* 2005, 2006, 2008 b, 2009). Los efectos preventivos del D-004 sobre los cambios urodinámicos inducidos por fenilefrina se corroboran en un estudio comparativo D-004 *versus* extracto de semilla de uva y vitamina E, sustancias con probados efectos antioxidantes, si bien es de destacar que ambas sustancias no modificaron el volumen total de micción (variable primaria de eficacia de cambios urodinámicos). Además, este estudio constituye la primera evidencia de los efectos antioxidantes del D-004 en este modelo al disminuir la generación de malondialdehído (marcador de peroxidación lipídica) en tejido prostático y vejiga, así como de grupos carbonilos (marcador de daño sobre proteínas) en próstata (Oyarzábal *et al.* 2015).

Efectos antioxidantes y antiinflamatorios

Basado en la contribución del estrés oxidativo y la inflamación en el desarrollo de la HPB/STBU y las evidencias de los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del D-004 en tejido prostático, se evaluó y profundizó en tales efectos en diversos modelos experimentales.

Los estudios que evaluaron los efectos antioxidantes *in vivo* del D-004 (50-800 mg/kg) demostraron su capacidad para prevenir la peroxidación lipídica en plasma, hígado, cerebro y próstata de ratas aparentemente sanas, así como proteger la oxidación de las proteínas e incrementar la capacidad antioxidante total del plasma (Menéndez *et al.* 2005; Pérez *et al.* 2008). Efectos similares fueron obtenidos en ratas ovariectomizadas, en las cuales se produce un desequilibrio del estado Redox a favor de la producción de radicales libres (Pérez *et al.* 2005).

Los efectos anti-inflamatorios *in vivo* del D-004, administrado a dosis de 100, 200, 400 y 800 mg/kg, fueron evaluados en modelos de inflamación aguda (edema por xileno en oreja de ratón y pleuresía por carragenina en ratas) y crónica (granuloma por algodón en ratas) demostrando que presenta un efecto anti-inflamatorio moderado (Menéndez *et al.* 2006; Ravelo *et al.* 2011; Oyarzábal *et al.* 2017). En el estudio del modelo de pleuresía por carragenina, la reducción del volumen de exudado pleural alcanzado tras la administración oral de D-004, estuvo relacionado a la disminución de los indicadores de oxidación sobre lípidos (malondialdehído) y proteínas (grupos sulfhidrilos) en el exudado pleural, sugiriendo su beneficio sobre el restablecimiento del balance redox. (Oyarzábal *et al.* 2017).

Estos resultados se encuentran en correspondencia con los efectos antioxidantes y anti-inflamatorios demostrados *in vitro*.

Evidencias clínicas

Basado en las evidencias pre-clínicas de farmacodinamia y toxicología, se procedió a la evaluación del D-004 en ensayos clínicos con el objetivo de demostrar su seguridad y tolerabilidad, así como sus efectos sobre la entidad clínica HPB/STBU.

Los ensayos clínicos se realizaron bajo la aprobación de sus protocolos por el Comité de Ética e Investigación Clínica del centro médico donde se realizó y por el Centro Estatal de Control de los Medicamentos (CECMED) de la República de Cuba. La conducción de los

estudios se realizó de acuerdo con los principios éticos de las declaraciones de Helsinki en sus sucesivas versiones y las regulaciones cubanas de Buenas Prácticas Clínicas. Todos los sujetos otorgaron su consentimiento escrito tras informarles acerca de los objetivos y características de la investigación en la primera consulta.

Los dos primeros ensayos clínicos Fase I se realizaron a doble ciegas y aleatorizados con placebo. Se incluyeron hombres voluntarios sanos entre 20 y 55 años de edad, con un puntaje de síntomas prostáticos (IPSS) ≤ 5 y con valores de antígeno específico de próstata (*PSA siglas de su nombre en inglés, Prostate Specific Antigen*) < 4 ng/mL. Se consideraron como criterios de salida del estudio, la ausencia de voluntariedad para continuar participando en el estudio por cualquier razón o experiencia adversa (EA) que lo requiriese (clínicas o respaldadas por análisis complementarios); incumplimientos o infracciones mayores del protocolo, tales como falta de adhesión a la ingestión del tratamiento > 5 días durante el estudio o consumo de medicaciones con efecto reconocido sobre la HPB o ambos.

El primer estudio incluyó dos etapas, la primera (I) que investigó los efectos de dosis únicas (hasta 960 mg), con un período ulterior de seguimiento de 14 días tras la administración y la segunda (II) que investigó los efectos de dosis repetidas hasta 960 mg/d administradas durante 21 días. El resultado fue satisfactorio ya que el D-004 a dosis de 320 a 960 mg, únicas o repetidas por 21 días, fue bien tolerado por los sujetos incluidos en el estudio, sin provocar eventos adversos características de esta clase terapéutica, como hipotensión postural o cambios en las concentraciones séricas del PSA, la testosterona o el estradiol, y la inclusión del grupo control (placebo) refuerza y valida estos resultados (López *et al.* 2008).

El segundo ensayo clínico corroboró la seguridad y tolerabilidad del D-004 a la dosis de 320 mg/día, administrado durante 6 semanas. Además, demostró por primera vez los efectos antioxidantes del D-004 en hombres sanos al prevenir la peroxidación lipídica (determinada mediante los niveles plasmáticos de malondialdehído y peróxidos totales) y la oxidación proteica (determinada mediante las concentraciones plasmáticas de grupos sulfhidrilos), así como incrementar la capacidad antioxidante total del plasma (López *et al.* 2009). Estos resultados son consistentes con los hallazgos obtenidos en los estudios experimentales previamente descritos.

Teniendo en cuenta que el ELSP es el agente fitoterapéutico más ampliamente usado para tratar la entidad clínica HPB/STBU y la similitud entre este extracto y el D-004, se realizó un tercer ensayo clínico, a doble ciegas y aleatorizado, donde se compararon ambos tratamientos. Los criterios de inclusión y de salida del estudio fueron similares a los estudios anteriores. Los tratamientos (D-004 y ELSP) se administraron a la dosis de 320 mg/día, durante 8 semanas, siendo seguros y bien tolerados. La comparación estadística entre los efectos antioxidantes de ambos tratamientos no arrojó diferencias significativas corroborando su eficacia para prevenir la peroxidación lipídica y la oxidación proteica, así como incrementar la capacidad antioxidante total del plasma. En este estudio se demuestra por primera vez el efecto del D-004 sobre la estimulación de la actividad de la catalasa (enzima del sistema antioxidante endógeno) en hombres sanos, enzima del sistema antioxidante endógeno (Rodríguez *et al.* 2010). Este resultado sugiere que los efectos antioxidantes de D-004 involucra los mecanismos antioxidantes endógenos.

Una vez demostrada la seguridad y tolerabilidad del tratamiento oral con D-004 y sus efectos antioxidantes en voluntarios sanos se hacía evidente evaluar sus efectos sobre los STBU asociados a HPB.

En este sentido se realizaron tres ensayos clínicos en pacientes con HPB/STBU donde se comparan los efectos del D-004 y el ELSP. Los tres estudios se realizaron a doble ciegas y aleatorizados. Se incluyeron hombres ≥ 50 años de edad con moderado IPSS ≥ 7 y < 19 y se administraron los tratamientos durante 8 semanas y 4 y 6 meses según el estudio (Guzmán *et al.* 2013 a, b, 2016).

El tratamiento oral con D-004 y ELSP (320mg/día), durante ocho semanas, previene los STBU, evaluado mediante el IPSS, a la vez que ejerce un efecto beneficioso adicional sobre el daño oxidativo en plasma de pacientes con HPB; ya que inhibe la peroxidación lipídica y la oxidación proteica e incrementa la actividad de la catalasa. Además, corroboró la seguridad y tolerabilidad de ambos extractos (Guzmán *et al.* 2013 a). Los efectos del D-004 y el ELSP sobre el IPSS fueron evaluados tras su administración durante 4 y 6 meses confirmándose su eficacia para prevenir los STBU asociados a HPB, así como su seguridad y tolerabilidad (Guzmán *et al.* 2013 b, 2016).

Un ensayo clínico fase III abierto y aleatorizado durante 6 meses comparó la eficacia y seguridad del D-004 (320 mg/día) con la terazosina (5 mg/día) en pacientes con HPB/STBU. El D-004 redujo significativamente el IPSS, con mayor eficacia que la terazosina, así como disminuyó significativamente el tamaño promedio de la próstata. Ambos tratamientos redujeron el volumen residual post-micción (determinado mediante ultrasonografía) y resultaron seguros, si bien el D-004 fue mejor tolerado que la terazosina (Guzmán *et al.* 2019).

CONCLUSIONES

Los estudios preclínicos demuestran que el D-004 ejerce un beneficio potencial sobre la salud de la próstata basado en un mecanismo multifactorial que involucra como efectos principales la inhibición de la enzima 5α reductasa prostática y el antagonismo sobre las respuestas mediadas por los receptores α_1 adrenérgicos. Por otra parte, ejerce efectos pleiotrópicos antioxidantes y antiinflamatorios que no representan la diana principal para prevenir la entidad clínica HPB/STBU pero que proporcionan un efecto beneficioso adicional. Además, los estudios toxicológicos demuestran la ausencia de toxicidad asociada al tratamiento.

Por su parte, los estudios clínicos corroboraron la eficacia del D-004 para tratar la entidad clínica HPB/STBU, demostrando que es seguro y bien tolerado.

Por tanto, el D-004 es una sustancia de origen natural que constituye una alternativa terapéutica para el tratamiento de la entidad clínica HPB/STBU, más segura y eficaz que los tratamientos convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aaron, L.T., Franco, O., & Hayward, S.W. (2016). Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of BPH. *Urologic Clinics*, 43(3), 279-288.
- Arruzazabala, M.L., Carbajal, D., Más, R., Molina, V., González, V., & Rodríguez, E. (2004). Preventive effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on testosterone-induced prostate hyperplasia in intact and castrated rodents. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 30, 227-233.
- Arruzazabala, M.L., Más, R., Carbajal, D., & Molina, V. (2005) Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban Royal palm fruit, *in vitro* and *in vivo* effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. *Drugs R&D*, 6, 281-289.

- 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 R&D.*, 7(4), 233-241.
- 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. (a)
- Arruzazabala, M.L., Molina, V., Más, R., & Carbajal, D. (2008) Effects of D-004, tamsulosin and the combined therapy D-004 plus tamsulosin on urodynamic changes induced with phenylephrine in rats. *Arzneimittelforschung*, 58, 81-85. (b)
- 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.
- Belostottskaia, L.I., Nikitchenko, I.V., Gomom, O.N., Chaika, L.A., Bondar, V.V., & Dziuba, V.N. (2006) Effect of biologically active substances of animal and plant origin on prooxidant-antioxidant balance in rats with experimental prostatic hyperplasia. *Eksperimental'naiia i Klinicheskaiia Farmakologiia*, 69(4), 66-68.
- 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, 865-871.
- Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., Más, R., Molina, V., Rodríguez, E., & González, V. (2004) Effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruit, on inhibiting prostatic hyperplasia induced with testosterone or dihydrotestosterone in a rat model: A randomized, controlled study. *Current Therapeutic Research*, 65, 505-514.
- Carbajal, D., Molina, V., Mas, R., & Arruzazabala, M.L. (2007) Efecto del D-004 sobre patrones conductuales en roedores. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(1), 12-17.
- Corona, G., Tirabassi, G., Santi, D., Maseroli, E., Gacci, M., Dicuio, M., et al. (2017) Sexual dysfunction in subjects treated with inhibitors of 5 α -reductase for benign prostatic hyperplasia: a comprehensive review and meta-analysis. *Andrology*, 5, 671-678.
- Curtis, N., Shoskes, D., & Moyad, M. (2008) Nutraceutical in prostate disease: the urologist's role. *Reviews Urology*, 10(3), 192-206.
- Fernández, I., Gámez, R., Gutiérrez, A., & García, H. (2005) Evaluación genotóxica *in vivo* del D-004 en el ensayo de micronúcleos en médula ósea en ratones. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36 (Especial).
- 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.
- Gutiérrez, A., Marrero, G., Gámez, R., Fernández, I., Curveco, D., & García, H. (2005) Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36 (Especial).
- 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 CENIC 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., 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., 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., 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)
- 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).
- 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., Fernández, J.C., Pedroso, M.L., Fernández, L., Illnait, J., Mendoza, S., et al. (2019) Efficacy and tolerability of *Roystonea regia* lipid extract (D-004) and terazosin in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia: a 6-month study. *Therapeutic Advances in Urology*, doi:11:1756287219854923.
- Kennedy, D. (2007) Pharmacology of Saw Palmetto. *Journal of Urology*, 139(5), 1118-1124.
- López, E., Illnait, J., Ramírez, 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. *Revista 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.
- Marrero, G., Gutierrez, A., Pardo, B., Gámez, R., & Curveco, D. (2007) Evaluacion del efecto genotoxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de celulas individuales en gel (ensayo cometa). *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 38(3), 200-203.
- Matsumoto, S., Hanai, T., Matsui, T., Tanaka, M., & Uemura, H. (2010) Evi prostat suppresses urinary oxidative stress in a rabbit model of partial bladder outlet obstruction and in patients with benign prostatic hyperplasia. *Phytotherapy Research*, 24(2), 301-303.
- Menéndez, R., Más, R., Pérez, Y., González, R.M., & Jiménez, S. (2005) Estudio de los efectos de la administración oral de D-004 (50-800 mg/kg de peso) sobre la peroxidación lipídica en ratas. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 36, 28-35.
- 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.
- Menéndez, R., Más, R., Pérez, Y., & González, R.M. (2007) In vitro effect of D-004, a lipid extract of the ground fruits of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*), on rat microsomal lipid peroxidation. *Phytotherapy Research*, 21(1), 89-95.

- Minciullo, P.L., Inferrera, A., Navarra, M., Calapai, G., Magno, C., & Gangemi, S. (2015) Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Urologia Internationalis*, 94, 249-254.
- Noa, M., Arruzazabala, M.L., Carbajal, D., Más, R., & Molina, V. (2005) Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruits, on hystological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *International Journal of Tissue Reactions*, 27(4), 203-211.
- 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., 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 Antioxidants 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.
- Oyarzábal, A., Molina, V., Ravelo, Y., Pérez, Y., & Jiménez, S. (2017) Effects of D-004, a lipid extract of the Roystonea regia fruits, on carrageenan-induced pleurisy in rats. *BAOJ Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 046.
- Parsons, J.K., & Kashe, C. (2008) Physical activity, benign prostatic hyperplasia, and lower urinary tract symptoms. *European Urology*, 53:1228–1235.
- Pérez, Y., Menéndez, R., Gámez, R., González, R.M., & Más, R. (2005) Efectos de la administración oral de D-004 (400 mg/kg) sobre la peroxidación lipídica en ratas ovariectomizadas *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 36(No especial).
- Pérez, Y., Menéndez, R., Más, R., & González, R.M. (2006) In Vitro effect of D-004, a lipid extract of the fruit of the Cuban royal palm (Roystonea regia), on prostate steroid 5 α -reductase activity. *Current Therapeutic Research*, 67(6), 396-405. (a)
- Pérez, Y., Menéndez, R., Más, R., & González, R.M. (2006) Plasma levels, tissue distribution and excretion of radioactivity after single-dose administration of (3H)-oleic acid added to D-004, a lipid extract of the fruit of Roystonea regia in rats. *Current Therapeutic Research*, 67(6), 406-419. (b)
- Pérez, Y., Menéndez, R., Más, R., & González, R.M. (2007) Efecto in vitro del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real, sobre receptores androgénicos de tejido prostático. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3), 177-199.
- Pérez, Y., Molina, V., Más, R., Menéndez, R., González, R.M., Oyarzábal, A., et al. (2008) Ex vivo antioxidant effects of D-004, a lipid extract from Roystonea regia fruits, on rat prostate tissue. *Asian Journal of Andrology*, 10(4), 659-666.
- Pérez, Y., Oyarzábal, A., Molina, V., Jiménez, S., Curveco, D., & Más, R. (2010) Estudio del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con hiperplasia prostática inducida por inyección de testosterona. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(2), 221-230.
- Pharmacopeia Convention (2005): Saw palmetto extract. In: Expert Committee. United States pharmacopeia forum: (DSB) dietary supplement: botanicals. Rockville, Md.: Pharmacopeia Convention 28 (2): 425. (USP28-NF23).
- 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.
- 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.
- Sciarra, A., Mriotti, G., Saliccia, S., Gómez, A.A., Monti, S., Toscano, V., et al. (2008) Prostate growth and inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 254-260.