Estudio de la carcinogenicidad del D-004 en ratas Sprague Dawley. Reporte parcial a los 12 meses de estudio

Rafael Gámez-Menéndez,* Ariadne Gutiérrez-Martínez, Miriam Noa-Puig, Rosa Mas-Ferreiro, Maikel Valle-Clara, Isury Bucarano-Lliteras, Edy Goicochea-Carrero, Nilda Mendoza-Hernández, Haydée García-Cambián, Carlos Nodal-Flores y Ernesto Armenteros-Ramos.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. rafael.gamez@cnic.edu.cu

Recibido: 2 de octubre de 2012.

Aceptado: 10 de diciembre de 2012.

Palabras clave: carcinogénesis, hiperplasia prostática benigna, D-004, ácidos grasos, palma real, *Roystonea regia*.

Key words: carcinogenicity, benign prostatic hyperplasia, D-004, fatty acids, royal palm, *Roystonea regia*.

RESUMEN. El D-004, un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) constituido por una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico, similar a la composición de los extractos lipídicos del Saw palmetto. El D-004, ha mostrado ser efectivo en modelos experimentales de hiperplasia prostática, al inhibir la enzima 5 α -reductasa prostática y a su vez, ha mostrado efectos anti-inflamatorios y antioxidantes. El presente trabajo resume los resultados obtenidos a los 12 meses en el estudio de carcinogenicidad a largo plazo del D-004 en ratas, el cual culminará al concluir el tiempo establecido (24 meses). Ratas Sprague Dawley de ambos sexos se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (50 ratas/sexo en cada grupo/grupo): uno control de vehículo y tres grupos tratados con D-004 (500, 1000 y 1500 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos se administraron oralmente por intubación gástrica, cinco días por semana durante 12 meses. Este reporte incluye los resultados de peso corporal, observaciones clínicas, mortalidad y frecuencia de aparición de tumores hasta ese momento. La frecuencia de mortalidad fue tan solo 1 %, las observaciones diarias no revelaron signos indicativos de toxicidad atribuibles al tratamiento. Además, el momento, la frecuencia de aparición y la localización de tumores fueron estadísticamente similares en los animales controles y tratados, para ambos sexos. En conclusión, la administración oral de D-004 (500 - 1500 mg/kg) a ratas durante los primeros 12 meses del estudio no mostró evidencias de toxicidad o carcinogenicidad relacionadas con el tratamiento.

ABSTRACT. D-004 is a lipid extract from the royal palm (*Roystonea regia*) fruits that contains a reproducible mixture of fatty acids, mainly oleic, palmitic, lauric and myristic ones, being similar to the Saw palmetto fatty acids lipid extract. D-004 has been shown to be effective in experimental models of prostate hyperplasia by the inhibiting the prostatic 5 α -reductase enzyme, having antiinflammatory and antioxidant effects as well. The present work summarizes partial results (12 months) of the long term carcinogenicity study of D-004 in rats, which must be completed at the established time (24 months). Sprague Dawley rats of both sexes were distributed randomly into four experimental groups (50 rats/sex by/group): a vehicle control and three treated ones with D-004 at doses of 500, 1000 and 1500 mg/kg, respectively. Treatments were given orally by gastric gavage five days a week during 12 months. This report includes data on mortality, body weight, daily clinical observations and rates of tumor occurrence. Mortality rate was as low as 1 %, daily observations did not reveal toxicity signs attributable to the treatment in any sex. In addition, tumor onset and rates were similar in treated and control groups of both sexes. In conclusion, no evidences of treatment related toxicity or carcinogenicity were found during the first 12 months of oral administration of D-004 (500 - 1500 mg/kg) to rats.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB), enfermedad común en el hombre a partir de los 50 años, cuya frecuencia aumenta con la edad,¹ consiste en una hiperplasia de las

glándulas y el estroma prostático de etiología multifactorial. Una de las causas fundamentales del incremento del tamaño de la próstata con la edad es el aumento de la actividad de la 5 α -reductasa prostática, enzima que transforma la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona (DHT), la cual al unirse a los receptores androgénicos, promueve la proliferación de factores de crecimiento celular.²

Por otra parte, los síntomas de la enfermedad se encuentran influidos por el aumento del tono de la musculatura lisa de la vejiga y la próstata, regulado por los adrenoreceptores (ADR)- α 1.³

Dentro de la terapia farmacológica destacan los inhibidores de la 5 α -reductasa, los antagonistas de los adrenoreceptores- α 1 y la fitoterapia, fundamentalmente el extracto lipídico de los frutos de Saw palmetto.

Saw palmetto (*Serenoa repens*), la variante fitoterapéutica más empleada para tratar la HPB, actúa mediante mecanismos múltiples que incluyen la inhibición de la actividad de la 5 α -reductasa prostática, el antagonismo de los α 1-ADR, así como efectos antiinflamatorios y antiproliferativos.^{4,5} Ha sido referido que el tratamiento con Saw palmetto produce experiencias adversas leves, como dolor de cabeza, rinitis, mareos, dolor abdominal, náuseas, diarrea y reducción de la libido.⁶

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*, *Arecaceae* fam.), constituido por una mezcla de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico,⁷ que ha mostrado prevenir la HP inducida con T en roedores y que, como Saw palmetto, actúa mediante un mecanismo multifactorial que implica la inhibición de 5 α -reductasa prostática,⁷⁻⁹ el antagonismo de las respuestas mediadas por los α 1-ADR,^{10,11} efectos anti-inflamatorios¹² y antioxidantes.¹³⁻¹⁵ Tal similitud es consistente con la de las composiciones de los extractos lipídicos de los frutos de *Roystonea regia* y *Serenoa repens*, así como con la cercanía taxonómica entre ambas palmas.

En la evaluación toxicológica aguda oral realizada en ratas y conejos, así como de dosis repetidas de D-004 por vía oral durante 8 semanas a ratones NMRI y 3, 6 y 12 meses en ratas SD de ambos sexos no se evidenció toxicidad atribuible al tratamiento en ninguno de los niveles de dosis empleados.¹⁶⁻²⁰

En un estudio de toxicología de la reproducción, tampoco su administración prenatal reveló toxicidad atribuible al tratamiento, no se observó afectación de la función gonadal, la gestación ni la lactancia de las hembras, ni tuvo efectos tóxicos sobre el parto. Fue normal el desarrollo postnatal de las crías F1, incluida su capacidad reproductora. El D-004 no indujo malformaciones externas en las generaciones F1 y F2, ni afectó la viabilidad de las crías.²¹ Por otra parte, el tratamiento con 400 mg/kg a ratas adultas ovariectomizadas no evidenció efectos estrogénicos ni antiestrogénicos.²²

El D-004 no ha revelado acción citotóxica ni genotóxica en ninguno de los estudios realizados dentro de los cuales se incluyen los ensayos de Ames, cometa, de micronúcleos en médula ósea de roedores, aberraciones cromosómicas *in vitro* en linfocitos humanos e *in vivo* en médula ósea de roedores y el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide de roedores.²³⁻²⁷

Teniendo en cuenta que los hallazgos de farmacología experimental y de estudios clínicos Fase II muestran la utilidad del D-004 en el manejo de la hiperplasia prostática benigna,²⁸ lo que implicaría su posible empleo en tratamientos a largo plazo, se decidió evaluar su potencial carcinogénico en ratas Sprague Dawley (SD) tratadas durante 24 meses con el extracto.

El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar de forma preliminar los efectos del D-004 sobre la mortalidad, la inducción de carcinogenicidad temprana y otros indicadores de toxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas SD de ambos sexos (75 - 110 g) de siete semanas de edad, provenientes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), las cuales se colocaron en cajas de poliplast para roedores con tapas de acero inoxidable (tres ratas/jaula) y se mantuvieron en cuarentena durante siete días, para su adaptación a las condiciones experimentales [temperatura 20 a 25 °C, (60 ± 10) % de humedad relativa y ciclos de luz y oscuridad de 12 h].

Posteriormente, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (50 animales/sexo en cada grupo/grupo).

Los animales tuvieron acceso libre al agua. Como alimento se suministró pienso convencional para roedores proveniente del CENPALAB, el cual se administró en función del peso corporal promedio a razón de 10 % del peso durante las primeras 13 semanas. A partir de la semana 14, la cantidad administrada a los animales se restringió al 80 % de la que se debía suministrar según su peso, de acuerdo con el esquema anterior, siguiendo lo recomendado para estos estudios.²⁹

La eutanasia se practicó a todos los animales que manifestaron deterioro de salud notable, incluida pérdida de peso mayor de un 10 % durante el estudio, para lo cual se anestesiaron en atmósfera de éter y fueron posteriormente desangrados.

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba, en los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) no Clínico y Medioambiental (Regulación 39- 2004, Centro para el Control Estatal de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos) y en los aspectos específicos del Manual de Calidad y los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Centro de Productos Naturales (CPN) y contó con la aprobación del Comité de ética de este último para el trabajo con animales.

Administración y dosificación

El D-004 fue suministrado por el departamento de Química Farmacéutica de CPN, tras corroborar sus especificaciones de calidad, mediante un método validado de cromatografía gaseosa.³⁰

Para su administración, la sustancia fue preparada diariamente en forma de emulsión, en un vehículo Tween 65 (2 %), de amplio uso en la industria farmacéutica y carente de toxicidad asociada. El método de preparación de la sustancia se encuentra validado, así como las emulsiones resultantes.³¹

El D-004 se administró por vía oral por ser esta la ruta propuesta para su uso terapéutico, una vez al día (entre 9:00 y 11:30 a.m.) (5 d/semana), frecuencia aceptada para estos estudios cuando la forma de administración es por intubación gástrica.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: uno control de vehículo y tres grupos tratados con D-004 (500, 1000 y 1500 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos se administraron oralmente por intubación gástrica (2 mL/kg). La concentración de las emulsiones fue ajustada semanalmente de acuerdo con la ganancia de peso corporal.

La dosis mayor estudiada, que resulta 300 veces superior a la dosis propuesta para su uso en humanos (320 mg/d, aproximadamente 4,6 mg/kg), se seleccionó de acuerdo con la mayor recomendada para estos estudios cuando no hay evidencias previas de genotoxicidad ni toxicidad de la sustancia en estudios crónicos.^{29,32}

VARIABLES ANALIZADAS

Signos clínicos y aparición de tumores. Análisis de la mortalidad

Los animales se observaron diariamente en tres momentos mediante una inspección minuciosa de cada animal: en la mañana (8:30 a 11:30 a.m.), luego en la tarde entre las 2:00 y 3:00 p.m. y finalmente, entre las 5:00 y 6:00 p.m. momento en que se registró cualquier cambio en la condición vital de cada animal.

Estas observaciones perseguían detectar cualquier signo clínico de toxicidad, así como la posible aparición temprana de tumores palpables y animales moribundos o mortalidad o ambos.

La incidencia total de animales con tumores, el período de latencia hasta la aparición de tumores, el tipo de tumor y la mortalidad (%) fueron determinadas por grupo de tratamiento.

Peso corporal.

El peso corporal se controló al inicio (día previo al comienzo del tratamiento), semanalmente durante las primeras 13 semanas y mensualmente desde la semana 14 hasta los 12 meses.

Consumo de alimentos

El consumo de alimentos se controló dos veces por semana durante las primeras 13 semanas y una vez al mes a partir de la semana 14.

Análisis histopatológico

Se realizó la necropsia a todos los animales muertos por eutanasia o espontáneamente, evaluándose *in situ* la presencia de lesiones macroscópicas en órganos y cavidades. En este reporte, se incluyen las observaciones macroscópicas de los animales necropsiados y su diagnóstico presuntivo según su apariencia y las observaciones diarias. Por tal razón, de modo preliminar se utilizó la denominación de “tumores palpables” en los animales vivos con tal manifestación y la de “tumores” para aquellos que fueron confirmados por la necropsia.

El momento de la detección de masas o tumores palpables constituyó la primera fecha de registro y detección. El resultado histopatológico brindó el criterio definitivo de clasificación.

Evidencia temprana de carcinogenicidad asociada al D-004

En este reporte el aumento significativo de la frecuencia total de tumores (por sexo o en total) y una disminución del tiempo de supervivencia de animales tratados con respecto a los controles se consideró como una evidencia temprana de carcinogenicidad relacionada con el tratamiento, tal como establecen los lineamientos para este tipo de estudio.³²

Análisis estadístico

La comparación de las variables continuas (ganancia en peso corporal y consumo de alimentos) se realizó de manera independiente para cada sexo mediante un análisis de varianza (ANOVA), en caso de detectarse significación, se aplicaron métodos específicos de comparación entre grupos como la prueba Tukey o la Duncan.

Por su parte, las variables categóricas se analizaron mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Las pruebas utilizadas fueron de doble cola. Un $\alpha = 0,05$

se asumió *a priori* para la significación estadística. Los resultados se analizaron con el paquete de programas *Statistica* para *Windows*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Signos clínicos y aparición de tumores

Las observaciones diarias no revelaron signos indicativos de toxicidad, ya que los pocos hallazgos clínicos registrados durante el estudio aparecieron en animales de todos los grupos, consistentes en eventos aislados de lesiones por mordeduras, cambio en las deposiciones (color o consistencia) y tumores en los animales que murieron o se sacrificaron antes del año, así como tumores palpables en algunos de ellos que aún permanecían en estudio. La frecuencia de aparición de tumores palpables presentes en animales que aún continuaban en el estudio resultó baja y consistente con esta especie y línea, de acuerdo con los resultados de otros estudios y de los propios reportes históricos.^{20,32,33} Se detectaron lesiones nodulares palpables, presumiblemente de tipo tumoral, en 14 animales que continuaban en el estudio: 12 hembras (dos controles, cuatro de 500 mg/kg, cuatro de 1000 mg/kg y dos de 1500 mg/kg) y dos machos del grupo de 1 500 mg/kg (Tabla 1).

Tabla 1. Total de animales vivos con tumores palpables al término del primer año de estudio

Grupos	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
		Nódulos		
Control	0	0/49 (0,0 %)	2/49 (4,1 %)	2/ 98 (2,0 %)
	500	0/50 (0,0 %)	4/49 (8,2 %)	4/ 99 (4,0 %)
D-004	1000	0/50 (0,0 %)	4/50 (8,0 %)	4/100 (4,0 %)
	1500	2/49 (4,1 %)	2/50 (4,0 %)	4/ 99 (4,0 %)

Análisis de la mortalidad

La frecuencia de mortalidad fue muy baja (1 %) para un estudio crónico, evidencia indirecta de que las condiciones del estudio fueron adecuadas, además demostraron la baja toxicidad del D-004 por la administración de dosis orales repetidas a largo plazo (1 año), lo que concordó con los resultados del estudio crónico en ratas tratadas con dosis de hasta 2000 mg/kg,²⁰ y con otros estudios toxicológicos previos realizados en roedores.¹⁶⁻²⁰ Así, durante el primer año del estudio ocurrieron cuatro muertes: dos machos (un control, uno tratado con 1 500 mg/kg) y dos hembras (un control, una tratada con 500 mg/kg), sin diferencias significativas entre animales tratados y controles (Tabla 2). De las muertes, tres fueron espontáneas, mientras que a la hembra control fue necesario realizarle la eutanasia por presentar un estado general depauperado, con reducción relevante del peso corporal. Debido a la baja frecuencia de muertes, no fue necesario realizar el análisis de supervivencia (Modelo de Regresión de Cox). La primera muerte ocurrió en un macho control a los 10 meses y 1 semana, tiempo en el cual comienza a manifestarse espontáneamente la aparición de tumores benignos y malignos en esta especie y línea.^{32,33}

Peso corporal y consumo de alimento

El aumento de peso fue mayor en los machos que en las hembras, lo cual concordó con los resultados previos obtenidos por los autores en esta especie.³³⁻³⁶ No se detectaron

Tabla 2. Mortalidad (%) ocurrida durante el primer año de estudio

Grupos	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
Control	0	1/50 (2,0 %)	1/50 (2,0 %)	2/100 (2,0 %)
	500	0/50 (0,0 %)	1/50 (2,0 %)	1/100 (1,0 %)
D-004	1000	0/50 (0,0 %)	0/50 (0,0 %)	0/100 (0,0 %)
	1500	1/50 (2,0 %)	0/50 (0,0 %)	1/100 (1,0 %)

diferencias significativas de peso entre animales tratados y controles, ni tendencias con las dosis (Tabla 3). De modo consistente, el consumo de alimentos fue similar en animales tratados y controles en ambos sexos, así como mayor en los machos que en las hembras.

Tabla 3. Efectos del tratamiento crónico (1 año) con D-004 sobre el peso corporal de ratas SD

Grupos	Dosis (mg/kg)	Machos	
		Inicial	Final
Control	0	92,2 ± 12,0	543,6 ± 57,0
	500	92,2 ± 10,0	536,5 ± 62,4
D-004	1000	92,2 ± 11,0	531,0 ± 51,8
	1500	92,2 ± 9,1	538,1 ± 64,9
		Hembras	
D-004	0	89,2 ± 7,6	334,4 ± 32,7
	500	89,2 ± 10,3	339,5 ± 39,2
	1000	89,2 ± 9,9	337,1 ± 37,1
	1500	89,2 ± 9,9	335,9 ± 43,4

Análisis anátomo-patológico

El análisis microscópico de los animales que murieron antes de los 12 meses de tratamiento, bien espontáneamente o por eutanasia, no reveló diferencias significativas en la incidencia de lesiones tumorales entre los animales tratados y controles (Tabla 4). La necropsia del primer animal muerto (macho control) reveló la presencia de sangre, así como de varias tumoraciones en la cavidad peritoneal, que interesaban además, órganos como estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, riñón, vejiga y vesículas seminales, cuyo diagnóstico microscópico clasificó de histiocitoma maligno. Este tipo de tumor del tejido celular subcutáneo muestra un patrón histológico caracterizado por numerosas células redondeadas, como células histiocíticas y zonas de necrosis rodeadas por células en “empalizada”. El hecho de que apareciera en uno solo de los animales del estudio (1/200; 0,5 %) coincidió con la baja frecuencia de aparición reportada (0,9 - 5 % en machos y 1,4 - 2 % en hembras).³⁴ El análisis macroscópico al segundo animal, una hembra control, a la cual se le practicó la eutanasia, evidenció un aumento del tamaño de la hipófisis, lo que fue diagnosticado microscópicamente como adenoma de hipófisis, además de presentar hiperplasia de las células claras de la tiroides y pequeñas zonas hemorrágicas en el colon. Un tercer animal (hembra del grupo tratado con 500 mg/kg)

también murió por esta causa, además de presentar adrenales y pulmones congestivos. El adenoma de hipófisis resulta una lesión muy común en ratas de esa edad,³²⁻³⁶ por lo que la frecuencia de aparición en los animales bajo estudio (2/400; 0,5 %) se encontró por debajo de lo esperado.³⁵

Tabla 4. Hallazgos microscópicos en los animales muertos durante el primer año de estudio

Grupos	Sexo	Tipo de muerte	Hallazgos microscópicos	Tiempo de vida (días)
Control	M	Espontánea	Histiocitoma maligno de tejido celular subcutáneo	312
Control	H	Eutanasia	Adenoma de hipófisis, hiperplasia de células claras de la tiroides, pequeñas zonas hemorrágicas en el colon	313
500	H	Espontánea	Adenoma de hipófisis, adrenales congestivas, Pulmones congestivos con áreas hemorrágicas	352
1500	M	Espontánea	Sarcoma indiferenciado (quístico) de tejido celular subcutáneo	359

La cuarta muerte ocurrió en un macho tratado con 1500 mg/kg el que presentaba una tumoración aledaña a la extremidad posterior derecha, la que diagnosticada microscópicamente como un sarcoma indiferenciado (quístico) constituido por áreas sólidas y quísticas. Las áreas sólidas eran moderadamente celulares, con células pequeñas, redondeadas, fusiformes, en una matriz pálida con fibras colágenas y reticulares con zonas de fibrosis y fibroblásticas. Los espacios quísticos, estaban revestidos por células redondas cuboidales sugestivas de epitelio, pero sin membrana basal. Además, eran de diferentes tamaños y contenían hematíes. También se observaron focalmente algunos vasos grandes dilatados de paredes finas. Este tipo de tumor ha sido descrito, pero con baja frecuencia de aparición espontánea en ratas SD.³²⁻

³⁶ La cantidad de animales portadores de tumores que fueron determinantes para la vida de estos al año de tratamiento se pudo clasificar como bajo (4/400; 1,0 %), dos de los cuales fueron animales controles.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que la administración oral de D-004 (500 - 1500 mg/kg) a ratas SD durante los primeros 12 meses del estudio no provoca signos clínicos de toxicidad, ni inducen incrementos de la mortalidad, ni evidencian signos de carcinogenicidad temprana relacionadas con el tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol.* 2009;55:864-75.
2. Zhu YS, McGinley JL. 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann NY Acad Sci.* 2009;1155:43-56.
3. Dhingra N, Bhagwat D. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. *Indian J Pharmacol.* 2011;43(1):6-12.

4. Debruyne F, Koch G, Boyle P, Da Silva FC, Gillenwater JG, Hamdy FC, Perrin P, Teillac P, Vela-Navarrete R, Raynaud JP. Comparison of a phytotherapeutic agent (Permixon) with an alpha-blocker (Tamsulosin) in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a 1-year randomized international study. *Eur Urol.* 2002;41:497-506.
5. Abe M, Ito Y, Oyunuzul L, Oki- Fujino T, Yamada S. Pharmacological Relevant receptor Binding Characteristics and 5-reductasa inhibitory activity of free fatty acids contained in Saw Palmetto Extract. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(4):646-50.
6. Agbabiaka TB, Pittler MH, Wider B, Ernst E. *Serenoa repens* (Saw palmetto): a systematic review of adverse events. *Drug Saf.* 2009;32:637-47.
7. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D. Composition changes of lipid extract of *Roystonea regia* fruits of different ripening stages influence their effects on testosterone-induced prostate enlargement in rats. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(1):41-5.
8. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exptl Clin Res.* 2004; 2004;(XXX):227-34.
9. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostate hyperplasia induced with testosterone and dihydrotestosterone in rats. *Curr Ther Res Clin & Exptl.* 2004;65:505-14.
10. Arruzazabala ML, Más R, Carbajal D, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by adrenoceptors in rat *Drugs R&D.* 2005;6:281-28.
11. Arruzazabala ML, Mas R, Pérez Y. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruit, on prostate phenylephrine induced contraction of isolated rat prostate strips *in vitro*. *Rev Cub Farm.* 2009;43:1-9.
12. Menéndez R, Carbajal D, Mas R. Efecto 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. *Acta Farm Bonaerense.* 2006;25(2):213-8.
13. Menéndez R, Mas R, Pérez Y, González RM. *In vitro* Effects of D-004, a lipid extract of the Ground fruits of the Cuban Royal Palm (*Roystonea regia*), on rat microsomal lipid peroxidation. *Phytother Res.* 2007;21:89-95.
14. Pérez Y, Molina V, Mas R, Menéndez R. *Ex vivo* antioxidant effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on rat prostate tissue. *Asian J Androl.* 2008;10(4):659-66.
15. López E, Molina V, Illnait J, Oyarzábal A, Fernández L, Mas R, *et al.* Antioxidant effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on plasma of healthy men. *Asian J. Androl.* 2009;11:385-92.
16. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, *et al.* Toxicología aguda del D-004 en conejos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2007;38(2): 99-102.
17. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, *et al.* Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(3):101-8.
18. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Marrero G, *et al.* Oral subchronic toxicity of a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in mice. *Drug Chem Toxicol.* 2008;31:217-28.
19. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, *et al.* Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res* 2005;31(3):101-8.

20. Gutiérrez A, Gámez R, Noa M, Mas R, Arencibia D, Pardo B, *et al.* One year oral Toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in Sprague Dawley rats. *Food Chem Tox.* 2011;49:2855-61.
21. Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Mas R, Noa M, Marrero G. Effects of in utero exposure to D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in the male rat. Comparison with Finasteride. *J Med Food.* 2011;14(12):1663-69.
22. Gutiérrez A, Gámez R, Noa M, Mas R, Pardo B, Valle M, *et al.* Evaluation of D-004 in Mature Ovariectomized Rat Uterotrophic Assays. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(5):710-5.
23. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. () Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2005;36 (Número Especial).
24. Marrero G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Curveco D. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (ensayo cometa). *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2007;38(3):200-3.
25. Fernández I, Gámez R, Gutiérrez A, García H. Evaluación Genotóxica *in vivo* del D-004 en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea en Ratones. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2005;36(Número Especial).
26. Gutiérrez A, Gámez R, Arencibia D, Pardo B, García H. Evaluación del potencial genotóxico del D-004, para inducir aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2010;41(Número Especial).
27. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Rev Toxicol.* 2009;26:127-30.
28. López E, Illnait J, Ramírez Y, Hollands I, Mendoza S, Fernández L. 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* 2008;39(1):33-43.
29. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2006. Test No. 451: Carcinogenicity Studies.
30. Sierra R, Rodríguez E, González V, Marrero D, Vicente R. Estudios preliminares de estabilidad de un extracto lipídico de frutos de *Roystonea regia* (D-004) en frascos de vidrio ámbar. *Revista Cubana de Farmacia.* 2010;44(3):360-6.
31. Sierra R, Rodríguez E, González V, Marrero D, Vicente R, Velázquez C. Desarrollo y validación de un método por CG para la determinación de D004 en emulsiones. *Revista CENIC Ciencias Químicas.* 2008,39(3):122-5.
32. ICH Committee. Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. ICH harmonized tripartite guideline. having reached step 4 of the ICH process at the ICH steering committee meeting on 27 october 1994.
33. Alemán CI, Mas R, Rodeiro I. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Animals.* 1998;32:457-66.
34. Keenan KP, Smith PF, Hertzog P The effects of overfeeding and dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival and early pathology biomarkers of aging. *Toxicol Pathol.* 1994;22:300-15.
35. Nakazawa M, Tawaratani T, Uchimoto H, *et al.* Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Exp Anim.* 2001;50:99-103.
36. Johnson MD, Gad SC. The rat. In: Gad SC, ed. *Animal models in toxicology.* 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2007:p.147-275.