

# Interacción de los efectos del policosanol y el aceite de pescado sobre el tiempo de sangrado y la agregación plaquetaria intravascular en ratas

**Vivian Molina, Lourdes Arruzazabala, Daisy Carbajal y Rosa Más.**

Dpto. Farmacología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave 25 y calle 158, Apartado Postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. E-Mail: vivian.molina@cnic.edu.cu

Recibido: 26 de junio de 2008. Aceptado: 26 de septiembre de 2008.

Palabras clave: policosanol, aceite de pescado, tiempo de sangrado, agregación plaquetaria.  
Key words: policosanol, fish oil, bleeding time, platelet aggregation.

**RESUMEN.** El consumo de aceite de pescado ha mostrado reducir los eventos cardiovasculares por lo cual investigar si su administración con terapias concomitantes aporta beneficios adicionales resulta de interés. Estudios experimentales y clínicos han mostrado que la administración conjunta de aceite de pescado y policosanol muestra beneficios añadidos sobre el perfil lipídico y la agregación plaquetaria inducida *ex vivo*. Este trabajo investigó si la terapia combinada aceite de pescado + policosanol mostraba evidencias de interacción farmacológica sobre el tiempo de sangrado (TS) y la agregación plaquetaria intravascular inducida *in vivo* en ratas. Las ratas se distribuyeron en siete grupos: uno control negativo tratado con vehículo al que no se le inyectó colágeno y seis grupos con agregación inducida por colágeno: uno tratado con vehículo (control positivo), uno con aceite de pescado (1 g/kg), dos tratados con policosanol (5 ó 25 mg/kg) y dos con aceite de pescado (1 g/kg) + policosanol (5 ó 25 mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía oral durante cuatro semanas, al término de las cuales se determinó el TS y la agregación plaquetaria *in vivo*. El policosanol, el aceite de pescado y la terapia combinada inhibieron la agregación plaquetaria por colágeno, pero la terapia combinada no produjo efectos mayores que las monoterapias. Ninguna monoterapia modificó significativamente el TS, si bien la terapia combinada aumentó esta variable en una magnitud sugestiva de interacción aditiva. No se observaron manifestaciones hemorrágicas en las ratas tratadas con la terapia combinada, lo que sugiere un bajo riesgo potencial en este sentido.

**ABSTRACT.** Fish oil consumption has shown to reduce cardiovascular events and concomitant administration of substances that provide additional benefits is a matter of interest. Experimental and clinical studies have shown that co-administration with fish oil plus policosanol provides added benefits on serum lipid profile and *ex-vivo* induced platelet aggregation. This work researched whether concomitant therapy with fish oil and policosanol evidenced some pharmacological interaction on both bleeding time (BT) and *in vivo*-induced platelet aggregation in rats. Rats were distributed in seven groups: one negative control treated with vehicle and not injected later with collagen and six groups with collagen-induced intravascular platelet aggregation: one treated with the vehicle (positive control), one with fish oil (1 g/kg), two with policosanol (5 and 25 mg/kg, respectively) and other two groups treated with fish oil (1 g/kg) + policosanol (5 and 25 mg/kg, respectively). Treatments were given orally for four weeks, when BT and platelet aggregation measurements were done. Policosanol, fish oil and combined therapy with both inhibited platelet aggregation to collagen, but the combined therapy did not produce increased effects with regards to monotherapies. No monotherapy modified the BT, whereas the combined therapy increased this variable in such an extent that it suggests an additive interaction. No haemorrhagic manifestations were observed in rats receiving the combined therapy, which suggests a low potential risk in such regard.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de aceite de pescado, rico en ácidos grasos omega 3 (AGΩ-3), reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares,<sup>1-3</sup> y la mortalidad asociada a ellas en poblaciones de elevado riesgo<sup>4</sup> incluyendo sus efectos sobre muerte súbita.<sup>5</sup> En este sentido, ha sido reportado que dicha protección está dada por una acción antiarrítmica y una reducción moderada, pero sostenida de la frecuencia cardíaca considerada hoy día uno de los factores desencadenantes de los síndromes coronarios agudos, muerte súbita incluida.<sup>5,6</sup> Además, otros mecanismos cardioprotectores de los ácidos omega 3 lo constituyen la reducción de la función plaquetaria y el tono vascular, así como de las concentraciones plasmáticas

de triglicéridos (TG) y de los factores de coagulación dependientes de vitamina K.<sup>7</sup>

Por otra parte, la mayoría de los estudios de intervención han mostrado efectos moderados de los AGΩ-3 sobre las variables hemostáticas, y usualmente producen pequeñas prolongaciones del tiempo de sangrado (TS) sin llegar a inducir hemorragias, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedades cardiovasculares.<sup>8-10</sup>

Teniendo en cuenta que los desórdenes trombóticos arteriales se encuentran dentro de las principales causas de morbilidad y mortalidad y que los AGΩ-3 presentan efectos cardioprotectores, la búsqueda de otros agentes que complementen sus efectos beneficiosos sobre la trombosis y la hemostasia, sobre el perfil lipídico u otros

blancos que permitan lograr beneficios adicionales es una base racional para el desarrollo de esquemas de terapias combinadas.

El policosanol es una mezcla de alcoholes alifáticos de alto peso molecular purificada de la cera de caña<sup>11</sup> que posee propiedades hipolipemiantes,<sup>12</sup> y efectos pleiotrópicos dentro de los que sobresalen su acción antiagregante plaquetaria,<sup>13</sup> antioxidante,<sup>14</sup> sus efectos antitrombóticos y anti-isquémicos,<sup>15-17</sup> y su acción estabilizadora de la placa<sup>18</sup> lo que le confiere un potencial efecto anti-aterotrombótico.

Un estudio previo demostró que la administración oral de policosanol + AG $\Omega$ -3 durante 60 d produjo beneficios adicionales sobre el perfil lipídico y la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico (AA) *ex vivo* en conejos,<sup>19</sup> ya que el policosanol redujo significativamente la concentración sérica de colesterol total (CT), del asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y aumentó los del asociado a las de alta densidad (HDL-C) sin modificar los TG; los AG $\Omega$ -3 redujeron los TG sin afectar otras variables del perfil lipídico y la terapia combinada redujo las concentraciones de CT, LDL-C, TG y aumentó las de HDL-C. Tanto el policosanol como los AG $\Omega$ -3 inhibieron significativa y moderadamente la agregación plaquetaria por AA, mientras la terapia combinada prácticamente duplicó la inhibición alcanzada con las terapias individuales.

Un estudio clínico, aleatorizado y a doble ciegas, realizado en pacientes con hipercolesterolemia, demostró el beneficio adicional de la administración durante 21 d de la terapia combinada de policosanol + AG $\Omega$ -3 con relación a la monoterapia de AG $\Omega$ -3 sobre el perfil lipídico y sobre la agregación plaquetaria inducida *ex vivo* por AA y colágeno.<sup>20</sup>

Estos trabajos, sin embargo, no han investigado los efectos de la terapia combinada AG $\Omega$ -3+ policosanol sobre el TS y sobre la agregación plaquetaria inducida *in vivo*. Teniendo en cuenta estos antecedentes el presente trabajo tuvo como objetivo investigar si los AG $\Omega$ -3 y el policosanol mostraban evidencias de interacción farmacológica sobre el TS y la agregación plaquetaria intravascular inducida *in vivo* en ratas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250 a 300 g) procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) las cuales se adaptaron a las condiciones de laboratorio con libre acceso al agua y la comida durante una semana. Las experiencias se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio vigentes en la República de Cuba.<sup>21</sup>

### Administración y dosificación

El policosanol fue suministrado por el Departamento de Química, Centro de Productos Naturales (Ciudad de La Habana, Cuba) después de corroborar sus especificaciones. El policosanol fue suspendido en disolución de Tween 20/agua (2 %). El aceite de pescado (Rainbow & Nature Pty Ltd.; Australia) (120 mg de AG $\Omega$ -3/g de aceite de pescado) fue tomado directamente de las cápsulas, con jeringuilla.

Las ratas se distribuyeron en siete grupos: un control negativo tratado con vehículo de Tween 20/agua (2 %) al que no se le inyectó colágeno y seis grupos con agregación inducida por colágeno (10 animales/grupo): uno tratado con vehículo (control positivo), uno con aceite de

pescado (AP) (1 g/kg), dos tratados con policosanol (5 ó 25 mg/kg) y dos con AP (1 g/kg) + policosanol (5 ó 25 mg/kg).

Los tratamientos se administraron por vía oral, mediante entubación gástrica, durante cuatro semanas (6 d/ semana), ya que con este esquema de tratamiento, el aceite de pescado resulta efectivo sobre los indicadores hemodinámicos en ratas.<sup>22,23</sup> Pasadas 24 h de la última administración, las ratas se sometieron al ensayo de determinación del TS y seguidamente, a la inducción de la agregación plaquetaria *in vivo*.

El policosanol se administró a dosis de 5 y 25 mg/kg de acuerdo con datos previos que reportan a 25 mg/kg como la dosis efectiva mínima para inhibir la agregación plaquetaria y la trombosis experimental.<sup>24,14</sup> En el caso del aceite de pescado, se escogió 1 g/kg (equivalente al 5 % en la dieta) por ser ligeramente inferior a la dosis efectiva como antiplaquetario y antitrombótico.<sup>22,23</sup>

### Determinación del tiempo de sangrado

Para la determinación del TS las ratas fueron anestesiadas con tiopental (40 mg/kg) mediante una inyección intraperitoneal y su cola fue sumergida durante 5 min en disolución salina a 37 °C, al final de los cuales se cortó su porción final, estimada a una distancia de 4 mm de su extremo. Una vez realizado el corte, se cuantificó el TS en segundos con un cronómetro digital.<sup>25</sup> Al finalizar este ensayo, se indujo la agregación plaquetaria *in vivo* por inyección intravascular de colágeno.

### Agregación plaquetaria *in vivo*

Para este ensayo se les infundió una disolución de colágeno 60  $\mu$ g/kg mediante una inyección por la vena del pene. Pasados 90 s se procedió a la extracción de sangre de la aorta abdominal y se recolectó en tubos plásticos con EDTA. Se cuantificó la concentración plaquetaria de cada muestra utilizando un analizador automático de hematología (Sysmex Corporation, Kobe, Japón).

### Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney, para lo cual se empleó el paquete comercial Statistica para Window. *A priori*, se fijó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

La inyección intravascular de colágeno a ratas produjo un decremento notable y significativo de la concentración plaquetaria en sangre del grupo control positivo en relación con el grupo control negativo.

El tratamiento oral durante cuatro semanas con aceite de pescado (1 g/kg), policosanol 5 ó 25 mg/kg y con la terapia combinada AP + policosanol (5 ó 25 mg/kg) inhibió moderada, pero significativamente, la caída del conteo plaquetario, sin apreciarse diferencias en el efecto de las monoterapias y el de la terapia combinada (Tabla 1).

El policosanol (5 y 25 mg/kg) y el AP (1 g/kg) aumentaron no significativamente el TS, mientras que la terapia combinada policosanol + AP sí indujo incrementos significativos del TS con relación al grupo control positivo. Los porcentajes de incremento alcanzados por la terapias combinada con AP + policosanol 5 mg/kg (54 %) y con AP + policosanol 25 mg/kg (61 %) mostraron dependencia de las dosis de policosanol y fueron superiores, prácticamente más del doble, que los aumentos no significativos con AP (26 %) y policosanol 5 (24 %) y 25 mg/kg (30 %), lo que indica una interacción entre

ambas sustancias sobre esta variable, presumiblemente de tipo aditivo (Tabla 2).

No se observaron manifestaciones hemorrágicas ni signos clínicos de toxicidad en ningún animal.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la administración oral de policosanol (5 y 25 mg/kg) y aceite de pescado (1 g/kg) a ratas durante cuatro semanas inhibió significativamente la agregación plaquetaria inducida *in vivo* por la inyección intravascular de colágeno. Sin embargo, la administración conjunta de policosanol + aceite de pescado produjo inhibiciones similares a las alcanzadas con cada monoterapia, lo que parece contradecirse con resultados previos de los efectos de esta terapia combinada sobre la agregación plaquetaria inducida *ex vivo* en conejos y en pacientes con dislipidemia.<sup>19,20</sup>

Ninguna monoterapia produjo cambios significativos del TS. Ello concuerda con resultados previos relacionados con el policosanol,<sup>26</sup> y si bien ha sido referido que el aceite de pescado rico en AG $\Omega$ -3 aumenta esta variable, la dosis seleccionada (1 g/kg) fue intencionalmente inferior a la dosis efectiva mínima que aumenta este indicador en ratas.<sup>23,24</sup> para investigar su posible interacción con

otro agente antiplaquetario como el policosanol. No obstante, la terapia combinada con policosanol + AP sí aumentó significativamente el TS respecto al control positivo, duplicando prácticamente el valor obtenido con cada monoterapia, lo que sugiere una interacción de tipo aditiva entre el policosanol y los AG $\Omega$ -3 sobre el aumento del TS. Como el efecto aumentó según las dosis de policosanol y no se alcanzó un efecto techo, no es posible precisar el alcance máximo de esta interacción. La ausencia de interacción entre ambos tratamientos sobre la agregación plaquetaria inducida por inyección intravascular de colágeno sugiere que el efecto aditivo sobre el TS está mediado por efectos sobre indicadores del flujo sanguíneo diferentes a la modificación de la función plaquetaria.

En tal sentido, el tratamiento con AG $\Omega$ -3 redujo las concentraciones de los factores II y X dependientes de vitamina K, afectando significativamente el proceso de coagulación en ratas,<sup>27,28</sup> y estudios clínicos han revelado que los AG $\Omega$ -3 reducen la actividad del factor V<sup>29</sup> y del fibrinógeno (factor I), factor de riesgo cardiovascular independiente requerido para la actividad coagulante y para la función plaquetaria, particularmente en sujetos en que estas variables se encuentran elevadas,<sup>30</sup> refiriéndose por algunos autores que los AG $\Omega$ -3 presentan

**Tabla 1.** Efecto del policosanol, el aceite de pescado y la terapia combinada policosanol + aceite de pescado sobre la concentración plaquetaria en sangre total de ratas con agregación plaquetaria inducida *in vivo*.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Conteo de plaquetas ( $\cdot 10^9/L$ ) $\pm$ e.s.m
Control (-)		1053,3 $\pm$ 39,8
Control (+)		598,0 $\pm$ 20,7***
Aceite pescado	1 000	707,5 $\pm$ 33,5 <sup>+</sup>
Policosanol	5	689,1 $\pm$ 35,7 <sup>+</sup>
Policosanol	25	720,1 $\pm$ 29,01 <sup>++</sup>
Policosanol + AP	5 + 1 000	681,1 $\pm$ 17,02 <sup>++</sup>
Policosanol + AP	25 + 1 000	722,4 $\pm$ 26,04 <sup>++</sup>

\*\*\* p < 0,001 Comparación con el grupo control (-).

<sup>+</sup> p < 0,05; <sup>++</sup> p < 0,01 Comparación con el grupo control (+). AP Aceite de pescado.

**Tabla 2.** Efecto del policosanol, el aceite de pescado y la terapia combinada policosanol + aceite de pescado sobre el tiempo de sangrado en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo sangrado (s)	Incremento (%)
Control (-)		343,3 $\pm$ 26,9	
Control (+)		342,5 $\pm$ 25,9	
Aceite pescado	1 000	430,8 $\pm$ 49,4	26
Policosanol	5	424,9 $\pm$ 57,5	24
Policosanol	25	445,8 $\pm$ 42,7	30
Policosanol + AP	5 + 1 000	528,7 $\pm$ 53,7 <sup>++</sup>	54
Policosanol + AP	25 + 1 000	550,3 $\pm$ 54,1 <sup>++</sup>	61

<sup>+</sup> p < 0,05, <sup>++</sup> p < 0,01 Comparación con el grupo control (+). AP Aceite de pescado.

una acción anticoagulante moderada.<sup>29-31</sup> En cambio, el policosanol no afecta los indicadores de coagulación y el TS,<sup>26</sup> y su acción antiplaquetaria se asocia fundamentalmente a una modificación en el balance tromboxano /prostaciclina al reducir las concentraciones plasmáticas y séricos de tromboxano A<sub>2</sub>, mientras aumenta o a lo sumo, no modifica, los de prostaciclina I<sub>2</sub>.<sup>32, 33</sup>

En tal sentido, la acción antiagregante de los AGΩ-3 también remedia parcialmente la del policosanol, ya que ellos reducen la activación plaquetaria mediante la regulación del equilibrio tromboxano/prostaciclina.<sup>34</sup> Sin embargo, este efecto implica la modificación de la composición fosfolipídica de la membrana plaquetaria, al reemplazar al AA 20 : 4 (n-6) de la membrana por ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Debido a que estos ácidos grasos poliinsaturados son liberados de los fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, el tratamiento con AGΩ-3 disminuye la formación de AA y por ende, el nivel de sustrato para la acción de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX)<sup>35</sup> y por ende, reduce la formación de las prostaglandinas pro-inflamatorias y pro-agregantes, los tromboxanos de la serie 2 en las plaquetas y las células vasculares, mientras induce la formación de eicosanoides de la serie 3,<sup>36</sup> considerados anti-inflamatorios y anti-agregantes plaquetarios.

Los resultados del presente estudio discrepan, sin embargo, de datos previos que han mostrado efectos aditivos del AP rico en AGΩ-3 y el policosanol administrados durante ocho semanas sobre la agregación plaquetaria inducida *ex vivo* en conejos<sup>19</sup> y de las ventajas de la terapia policosanol + AGΩ-3 sobre la terapia placebo + AGΩ-3 administrados por seis semanas sobre la agregación plaquetaria en pacientes hipercolesterolémicos.<sup>20</sup> Estas discrepancias aparentes podrían estar relacionadas con diferencias metodológicas entre este estudio y los precedentes. En primer lugar, y como explicación más probable, en el presente estudio se investigaron los efectos sobre la agregación plaquetaria inducida *in vivo* por colágeno en ratas, mientras en los trabajos previos se investigaron los efectos sobre la agregación *ex vivo* inducida por AA en plasma rico en plaquetas (PRP). En segundo lugar, la duración del tratamiento en el presente estudio fue menor (cuatro semanas) que en los anteriores en que se administró durante seis (estudio clínico) y ocho semanas (estudio en conejos).

Por otra parte, los resultados experimentales fueron obtenidos en dos especies cuya sensibilidad a los efectos antiagregantes de la terapia combinada podría ser diferente. Así, mientras los AGΩ-3 modifican los indicadores hematológicos en humanos, no produce un efecto similar en la rata,<sup>37</sup> ya que en esta especie es el EPA y no el DHA el responsable de la modificación de la función plaquetaria. Diferencias de este tipo no pueden ser extrapoladas, pero tampoco descartadas, con relación a otras especies.

A diferencia del modelo de agregación plaquetaria inducida *in vivo* por la inyección intravascular de colágeno en ratas, la determinación del TS es un modelo experimental donde todos los indicadores hemostáticos desempeñan un importante papel. Si bien el primer modelo brinda información de la función plaquetaria en condiciones *in vivo*, donde están presentes todos los componentes de la sangre e incluso el endotelio vascular, el segundo modelo brinda una información más completa del flujo sanguíneo, ya que involucra no sólo a la función plaquetaria, sino a los factores de coagulación, compuestos vasoactivos y otros indicadores que pueden modular el flujo sanguíneo, como la viscosidad y las

condiciones hemoreológicas de la sangre. Por tanto, la interacción aditiva entre AGΩ-3 y policosanol sobre el TS observada sugiere una interacción con repercusión potencial en los mecanismos que regulan la trombosis y la hemostasia.

No obstante, investigaciones futuras deberán confirmar los presentes resultados y dilucidar los mecanismos involucrados y la relevancia del aumento del TS inducido con la administración de policosanol + AGΩ-3.

En conclusión, este trabajo demuestra que tanto el policosanol como los AGΩ-3 inhiben la agregación plaquetaria inducida *in vivo* por colágeno, sin que la terapia combinada AGΩ-3 + policosanol mejore este efecto. En cambio, la terapia combinada, pero no las respectivas monoterapias, aumentaron el TS en una magnitud que indica una interacción aditiva que pudiera resultar útil en el manejo de los desórdenes trombóticos arteriales, ya que podría implicar un mejoramiento del flujo sanguíneo global. La terapia combinada no indujo manifestaciones hemorrágicas, lo que sugiere un bajo riesgo potencial en este sentido. No obstante, estos resultados deben ser confirmados en estudios ulteriores que incluyan diferentes dosis y tiempos de tratamiento, así como los mecanismos de acción subyacentes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dyerberg J., Bang H.O. and Hjorne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **Am. J. Clin. Nutr.**, **28**, 958-66, 1975.
2. Bang H.O., Dyerberg J. and Nielsen A.B. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west-coast Eskimos. **Lancet**, **i**, 1143-1145, 1971.
3. Kromhout D., Bosschleter E.B. and de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. **N. Engl. Med.**, **312**, 1205-9, 1985.
4. Marckmann P. and Gronback M. Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. **Eur. J. Clin. Nutr.**, **53**, 585-90, 1999.
5. Albert C.M., Campos H., Stampfer M.J., Ridker P.M., Manson J.E., Willett W.C. *et al.* Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. **N. Engl. J. Med.**, **346**, 1113-8, 2002.
6. Dallongeville J. and Yarnell J. Fish consumption is associated with lower heart rates. **Circulation**, **108**, 820-5, 2003.
7. Vanschoonbeek K., De Maat M.P.M. and Heemskerk J.W.M. Fish Oil consumption and Reduction of arterial disease. **J. Nutr.**, **133**, 657-660, 2003.
8. Wojenski C.M., Silver M.J. and Walker J. Eicosapentaenoic acid ethyl ester as an antithrombotic agent comparison to an extract of fish oil. **Biochim. Biophys. Acta**, **1081**, 33-38, 1991.
9. Roulet M., Frascarole P., Pilet M. and Chapuis G. Effects of intravenously infused fish oil on platelet fatty acid phospholipid composition and on platelet function in postoperative trauma. **J. Parenter Enteral. Nutr.**, **21**, 296-301, 1997.
10. De Caterina R., Giannessi D., Mazzone A., Bernini W., Lazzarini G., Maffei S., Cerri M., Salvatore L. and Weksler B. Vascular prostacyclin is increased in patients ingesting omega 3 polyunsaturated fatty acids before coronary artery bypass graft surgery. **Circulation**, **82**, 428-438, 1990.
11. Laguna A., Magraner J., Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R. and García M. A mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmacological uses, USA Patent 5.663.156, 1997.
12. Castaño G., Mas R., Fernández L., Illnait J., Mesa M., Alvarez E., *et al.* Comparison of the efficacy and tolerability of policosanol with atorvastatin in elderly patients with type II Hypercholesterolemia. **Drugs Aging**, **20**, 155-63, 2003.
13. Arruzazabala M.L., Molina V., Mas R., Fernández L., Carbajal D., Valdés S., *et al.* Antiplatelet effects of policosanol 20 and 40 mg/d in healthy volunteers and dyslipidemic patients. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **29**, 891-7, 2002.

14. Menendez R., Mas R., Amor A.M., Gonzalez R.M., Fernandez J.C., Rodeiro I., *et al.* Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification *in vitro*. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **50**, 255-62, 2000.
15. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., Molina V. and Valdes S. Effect of policosanol on experimental thrombosis models. **Prostagl. Leuk. Essent. Fatty Acids**, **50**, 249-51, 1994.
16. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Valdes S., Noa M., Mas R., *et al.* Effect of policosanol on cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**, 1269-76, 1999.
17. Ortega LL., Sánchez J., Mas R., Fernández L., Mendoza S., Gámez R., *et al.* Effects of policosanol on patients with ischemic stroke: a pilot open study. **J. Med. Food.**, **9**, 378-85, 2006.
18. Noa M. and Mas R. Protective effects of policosanol on atherosclerotic plaque on aortas in monkeys. **Archives Med. Res.**, **36**, 441-447, 2005.
19. Gámez R., Mas R., Arruzazabala M.L., Mendoza S. and Castaño G. Effects of Concurrent Therapy with Policosanol and Omega-3 Fatty Acids on Lipid Profile and Platelet Aggregation in Rabbits. **Drugs R.D.**, **6**, 11-19, 2005
20. Castaño G., Arruzazabala M.L., Fernández L., Mas R., Carbajal D., Molina V., Illnait J., Mendoza S., Gámez R., Mesa M. and Fernández J. Effects of combination treatment with policosanol and omega-3 fatty acids on platelet aggregation: A randomized, double-blind clinical study. **Curr. Ther. Res.**, **67**, 174-192, 2006.
21. Buró Regulatorio para la protección de la Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Cuba. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Mediambiental. Regulación 39/2004.
22. Somova L., Moodley K., Channa M.L. and Nadar A. Dose-dependent effect of dietary fish-oil (n-3) polyunsaturated fatty acids on *in vivo* insulin sensitivity in rat. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, **21**, 275-8, 1999.
23. Song J. and Wander R.C. Effects of dietary selenium and fish oil (MaxEPA) on arachidonic acid metabolism and hemostatic function in rats. **J. Nutr.**, **121**, 284-92, 1991.
24. Arruzazabala M.L., Carbajal D., Mas R., García M. and Fraga V. Effect of policosanol on platelet aggregation in rats. **Thrombosis Research**, **69**, 321-327, 1993.
25. Dejana E., Villa S. and Gaetano G. Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. **Thromb. Haemost.**, **48**, 108, 1982
26. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Valdés S. and Mas R. Interaction policosanol-warfarina on bleeding time and thrombosis in rats. **Pharmacological Research**, **38**, 89-91, 1998.
27. Leray C., Wiesel M.L., Freud M., Cazenave J.P. and Gachet C. Long chain n-3 fatty acids specifically affect rat coagulation factors dependent on vitamin K. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **21**, 459-465, 2001.
28. Mori Y., Nobukata H., Harada T., Kasahara T. and Tajima N. Long term administration of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester improves blood coagulation abnormalities and dysfunction of vascular endothelial cells in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **Endocr. J.**, **50**, 603-11, 2003.
29. Shahar E., Folsom A.R., Wu K.K., Dennis B.H., Shimakawa T., Conlan M.G., Davis C.E. and Williams O.D. Associations of fish intake and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with a hypocoagulable profile. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Arterioscler. Thromb.**, **13**, 1205-1212, 1993.
30. Oosthuizen W., Vorster H.H., Jerling J.C., Barnard H.C., Smuts C.M., Silvis C.M., Silvis N., Kruger A. and Venter C.S. Both fish and olive oil lowered plasma fibrinogen in women with high baselin fibrinogen levels. **Thromb. Haemost.**, **72**, 557-562, 1994.
31. Juan H. and Sametz W. Fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid increases bleeding time in the rat by interaction with sympathetic transmitters. **Agents Actions**, **28**, 130-6, 1989.
32. Arruzazabala M.L., Carbajal D., Molina V., Valdés S. and Mas R. Effect of policosanol on cerebral ischemia in Mongolian gerbils: Role of prostacyclin and thromboxane A. **Prostagl. Leuk. Essent. Fatty Acids**, **49**, 695-697, 1993
33. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Valdés S., and Mas R: Effect of policosanol on platelet aggregation and serum levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. **Prostagl. Leuk. Essent. Fatty Acids**, **58**, 61-64, 1998.
34. Nieuwenhuys C.M., Feijge M.A., Offermans P.F., Kester A.D., Hornstra G. and Heemkerk J.W. Modulation of rat platelet activation by vessel wall derived prostaglandin and platelet - derived thromboxane effects of dietary fish oil on thromboxane-prostaglandin balance. **Atherosclerosis**, **154**, 355-66, 2001.
35. Hornstra G. The significance of fish and fish oil enriched food for prevention and therapy of ischaemic cardiovascular diseases. In: The role of fats in Human Nutrition (Vergroesen, E.G., ed.) Academic Press, New York, NY, 152-235, 1989
36. Needleman P., Raz A., Minkes M.S., Ferrendelli J.A. and Sprecher H. Triene prostaglandins, prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **76**, 944-48, 1979.
37. Bruckner G.G., Lokesh B., German B. and Kinsella J.E. Biosynthesis of prostanoids, tissue fatty acid composition and thrombotic parameters in rats fed diets enriched with docosahexaenoic (22 : 6 n-3) or eicosapentaenoic (20 : 5 n-3) acids. **Thromb. Res.**, **15**, 479-97, 1984.