

Efectos del D-003 y el policosanol sobre huesos de ratas ovariectomizadas

Sarahí Mendoza, Miriam Noa, Rosa Mas y Nilda Mendoza.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, calle 198 entre avenidas 19 y 21, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono: (537) 2714200, 2714225, 2714212 e-mail: sarahi.mendoza@cnic.edu.cu

Recibido: 3 de abril de 2007.

Aceptado: 14 de noviembre de 2007.

Palabras clave: osteoporosis, policosanol, D-003, ratas ovariectomizadas.

Key words: osteoporosis, policosanol, D-003, ovariectomized rats.

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos superiores purificada de la cera de caña, cuyo componente mayoritario es el ácido octacosanoico, metabolito activo del policosanol. Por su analogía estructural y metabólica ambas sustancias presentan efectos farmacológicos similares, como inhibir la síntesis de colesterol regulando la actividad de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa, enzima clave de esta ruta, causando efectos hipocolesterolemizantes y antiosteoporóticos, e inhibiendo la peroxidación lipídica, lo que contribuye a sus efectos antiosteoporóticos. Sin embargo, el D-003 ha sido más efectivo que el policosanol como hipolipemiante y antioxidante, lo que sugiere un mayor potencial antiosteoporótico, si bien ningún estudio previo ha comparado sus efectos en modelos de osteoporosis (OP). Este estudio tuvo como objetivo comparar los efectos del D-003 y el policosanol en ratas ovariectomizadas, el modelo que mejor reproduce la OP característica de mujeres post-menopáusicas. Ratas SD hembras se ovariectomizaron y se distribuyeron en cuatro grupos: un control falso-operado, un control positivo y dos tratados con D-003 o policosanol, ambos a 50 mg/kg, respectivamente. Tras tres meses de tratamiento las ratas se sacrificaron y se extrajo su fémur derecho y su quinta vértebra lumbar. Las secciones de hueso se descalcificaron y procesaron para evaluar los efectos sobre variables morfométricas e indicadores de resorción-formación. Ambos tratamientos previnieron la pérdida ósea y el aumento de la resorción ósea inducidas por la ovariectomía, ya que previnieron la disminución en el número y espesor de las trabéculas, y el aumento del espacio inter-trabecular y el número y perímetro de los osteoclastos respecto al control positivo, sin modificar la superficie de osteoblastos, indicador de formación ósea. Los efectos del D-003 sobre todas las variables fueron superiores a los del policosanol, confirmando la hipótesis del estudio.

ABSTRACT. D-003 is a mixture of higher aliphatic acids purified from sugarcane wax, whose main component is octacosanoic acid, an active metabolite from policosanol. Because of their structural and metabolic analogies, both substances have shown similar pharmacological effects, as inhibiting cholesterol synthesis by regulating the activity of hydroxymethyl glutaryl CoA reductase, the key enzyme of this route, leading to cholesterol-lowering and antiosteoporotic effects, as well as to inhibit lipid peroxidation, an effect that also contributes to their antiosteoporotic effects. D-003, however, has shown to be more effective than policosanol as lipid-lowering and antioxidant agent, which suggests that it should have a greater antiosteoporotic potential, but no previous study had compared directly their effects on osteoporosis (OP) models. Therefore, the aim of this study was to compare the effects of D-003 and policosanol on ovariectomized rats, the model that reproduces better the characteristic OP of postmenopausal women. Female SD rats were ovariectomized and distributed into four groups: one false-operated control, one positive control and two treated with D-003 or policosanol, at 50 mg/kg, respectively. After three months on treatment, rats were sacrificed and their right femur and 5th lumbar vertebrae taken. Bone sections were decalcified and processed for assessing the effects on the morphometric variables and bone resorption-formation markers. Both treatments prevented ovariectomy-induced bone loss and increased bone resorption, since they prevented the reduction in the trabeculae number and thickness, and the increase in trabecular gap and osteoclast number and perimeter compared with the positive control, without modifying the osteoblast surface, a bone formation surrogate. The effects of D-003 on all variables were superior to those of policosanol, thus confirming the study hypothesis.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es la enfermedad ósea metabólica más común, caracterizada por una pérdida de masa y resistencia ósea, que provoca un aumento del riesgo de fracturas asociadas. La frecuencia de esta enfermedad aumenta con la edad y se relaciona con causas frecuentes de muerte en ancianos, lo que unido al aumento de la expectativa de vida, convierten la OP en un importante problema de salud.¹⁻⁴

Durante el crecimiento del esqueleto la masa ósea aumenta hasta alcanzar un pico,^{5,6} y una vez que cesa el crecimiento se mantiene más o menos estable, con una tendencia al aumento de la pérdida ósea con el envejecimiento. En todo momento se producen microfracturas imperceptibles a nuestros sentidos, y el hueso dañado es reemplazado por hueso nuevo. Este acoplamiento entre la destrucción (resorción) y la formación se conoce como remodelado óseo y contribuye a conservar un esqueleto sano. Sin embargo, el proceso de resorción ósea por los

osteoclastos (OC) es mucho más rápido que la formación de hueso por los osteoblastos (OB), por lo que un aumento del remodelado por cualquier causa puede provocar pérdida de masa ósea.³ Tal es el caso de la deficiencia de estrógenos, causa de la OP primaria más común, la post-menopáusica.^{3,7}

Los medicamentos antiosteoporóticos van encaminados a restablecer el equilibrio perdido y se clasifican en inhibidores de la resorción (antiresortivos), o estimuladores de la formación (anabólicos) o ambos, de los cuales los primeros son los más utilizados. Entre los antiresortivos, los aminobifosfonatos (N-BF) son los más utilizados,¹ y actúan inhibiendo la farnesilpírofosfosintetasa, enzima involucrada en la vía de síntesis común de isoprenoides y colesterol. Los isoprenoides, farnesil y geranilgeranilpírofosfos, son requeridos para la activación por prenilación de proteínas funcionales de los Oc. Al inhibir la prenilación, los Oc no son viables y mueren por apoptosis, lo que sustenta el efecto antiresortivo.⁸

Resulta interesante que la activación de los Oc y la síntesis de colesterol transcurran por una misma vía, lo que explica que las drogas que inhiben la síntesis de colesterol presenten efectos antiosteoporóticos.⁹ El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos superiores purificada de la cera de caña,¹⁰ cuyo componente mayoritario es el ácido octacosanoico, metabolito activo del policosanol.¹¹ El D-003, al igual que el policosanol, inhibe la síntesis del colesterol regulando la actividad de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, enzima clave de la ruta de síntesis.^{12,13}

Teniendo en cuenta lo anterior, la relación estructural entre alcoholes y ácidos de alto peso molecular¹⁴ y la similitud estructural y metabólica del D-003 y el policosanol¹⁵ resulta lógico que sus efectos farmacológicos sean similares. En tal sentido, ambas sustancias presentan efectos hipocolesterolemizantes y antiosteoporóticos, e inhiben la peroxidación lipídica (PL),^{10,15} lo que contribuye a sus efectos antiosteoporóticos.¹⁶⁻¹⁹ Tanto el policosanol¹⁶ como el D-003,¹⁷⁻¹⁹ administrados por 3 meses a ratas ovariectomizadas (ovx) han prevenido la pérdida ósea y el aumento de la resorción ósea inducido por la ovariectomía, sin modificar los marcadores de formación ósea y los efectos antiresortivos se han asociado con un aumento en la apoptosis de Oc. La magnitud de los efectos del D-003 ha sido similar a la del alendronato y el estradiol, y mayor que los de la pravastatina.¹⁷⁻¹⁹ Sin embargo, el D-003 ha sido más efectivo que el policosanol como hipolipemiante y antioxidante,^{15,20,21} lo que sugiere un mayor potencial antiosteoporótico, si bien ningún estudio previo ha comparado sus efectos en modelos de osteoporosis.

Este estudio tuvo como objetivo comparar los efectos del D-003 y el policosanol en ratas ovx, el modelo que mejor reproduce la OP característica de mujeres post-menopáusicas.²²

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon 32 ratas hembras Sprague Dawley, de tres meses de edad y peso entre 200 y 220 g. Las ratas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura [(25 ± 2) °C], humedad (60 a 70 %) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h, fueron observadas diariamente durante la cuarentena (15 d), al término de la cual, de resultar aptas, comenzaban los estudios, en los cuales se mantuvo acceso libre al agua y la comida (pienso de roedores del Centro Nacional de Animales para Laboratorio). Los estudios se desarrollaron siguiendo las reglas éticas para el manejo de animales de laboratorio y las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Administración y dosificación

El D-003 y el policosanol utilizados fueron suministrados por el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales, tras corroborar sus especificaciones de calidad y se administraron en forma de suspensiones en un vehículo Tween 20/H₂O (2 %), preparadas semanalmente, tras confirmar su estabilidad, con concentraciones ajustadas según el aumento de peso.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (ocho ratas/grupo): uno falso operado al que se le simuló la operación sin extirpar los ovarios (control negativo), un control ovx, ambos grupos tratados por vía oral solo con el vehículo y dos tratados con D-003 y policosanol, a dosis de 50 mg/kg, respectivamente.

Se escogió 50 mg/kg por ser la dosis de D-003 empleada en los estudios comparativos con alendronato y estradiol,^{17,18} la cual es 50 veces mayor que la dosis mínima efectiva de D-003 para reducir las concentraciones de colesterol en conejos²⁰ y producir efectos antioxidantes en ratas.²³

Los tratamientos se administraron mediante entubación gástrica, diariamente (5 a 6 d por semana) en la mañana (8:00 a 10:00 a.m.), durante tres meses a partir del procedimiento quirúrgico. La última dosis se administró entre las 16 y 20 h antes del sacrificio.

Inducción de osteoporosis

La osteoporosis por déficit de estrógenos se indujo mediante ovariectomía bilateral, tras anestesar a las ratas con tiopental (50 mg/kg), vía endovenosa.¹⁶⁻¹⁹

Variables estudiadas

Las variables de eficacia primaria fueron los indicadores morfométricos de pérdida ósea (número, espesor y separación trabecular) y los de resorción ósea (número y superficie de osteoclastos). Como variables secundarias se evaluaron los cambios en la superficie de osteoblastos, marcador de formación.

Análisis de las variables

Al culminar 3 meses de tratamiento, las ratas se anestesiaron y sacrificaron, y se tomaron muestras del cuerpo de la quinta vértebra lumbar y del fémur derecho. Para la toma de las muestras los tejidos adherentes se extrajeron con cuidado, con escarpelo y tijeras. La quinta vértebra lumbar se separó a través del disco intervertebral. Se tomaron muestras del cuello y de la región distal del fémur derecho, cortando a través de la línea intertrocanteriana, para crear una base ancha y lisa para la adecuada posición del cuello del fémur antes de la inclusión. La porción distal se tomó a 0,5 cm del extremo distal del fémur. Las muestras se procesaron según el procedimiento de Mosekilde,²⁴ en el cual se descalcifican en EDTA sal ácida disódica (10 %) 0,5 mol/L (pH 7,4) a 40 °C durante cuatro semanas, se incluyen en parafina, se cortan a 4 µm de grosor y se colorean con hematoxilina y eosina. Los valores de estos indicadores se derivaron de medidas primarias de áreas y perímetros²⁵ y los datos se analizaron y procesaron utilizando la versión 3,3 del sistema cubano Digipat.²⁶

Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de la U de Mann Whitney. Para la significación estadística se fijó a *priori* un nivel de $\alpha = 0,05$. Las pruebas se realizaron con los paquetes de programas Statistica sobre Window.

RESULTADOS

La ovariectomía redujo el número (Tb N) y espesor (Tb Esp) de las trabéculas y aumentó significativamente

el espacio inter-trabecular (Tb Sp) respecto al grupo control negativo (Tabla 1). Tanto el D-003 como el policosanol previnieron significativamente los cambios inducidos por la ovariectomía, siendo los efectos del D-003 superiores a los del policosanol.

Los indicadores de resorción ósea también se modificaron. La ovariectomía produjo un aumento del número y la superficie de osteoclastos respecto al grupo control negativo, mientras ambos tratamientos (D-003 y policosanol) previnieron significativamente estos cambios respecto al grupo control. Los efectos del D-003 resultaron significativamente mayores que los del policosanol.

Tanto en los indicadores morfométricos como en los de resorción (Tablas 1 y 2), la superioridad de los efectos

del D-003 respecto a los del policosanol se manifiesta en las tres estructuras óseas estudiadas.

Sin embargo, ninguno de los tratamientos modificó los cambios inducidos por la ovariectomía sobre la superficie de osteoblastos (Tabla 3).

DISCUSION

Este estudio demuestra que tanto el D-003 como el policosanol administrados a 50 mg/kg durante 3 meses a ratas ovx previnieron los cambios morfométricos y el aumento de la resorción ósea inducidos por la ovariectomía en las tres estructuras óseas estudiadas: cuello del fémur, fémur distal y quinta vértebra lumbar.

La rata ovx bilateralmente constituye el modelo estándar recomendado para evaluar agentes con efecto

Tabla 1. Efectos del D-003 y el policosanol sobre huesos de ratas ovx. Estudio morfométrico.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Tb (Cantidad/mm)	Tb Esp (μ m)	Tb Sp (μ m)
Cuello del fémur				
Control negativo	0	7,40 \pm 0,30*	84,30 \pm 0,82*	191,33 \pm 3,49*
Control positivo	0	4,23 \pm 0,22	56,06 \pm 1,02	351,90 \pm 3,41
Policosanol	50	6,23 \pm 0,35*	75,50 \pm 1,20*	220,70 \pm 5,44*
D-003	50	6,93 \pm 0,21* ⁺	80,53 \pm 1,75* ⁺	209,66 \pm 5,05* ⁺
Fémur distal				
Control negativo	0	1,70 \pm 0,36*	94,10 \pm 1,53*	200,00 \pm 5,88*
Control positivo	0	0,60 \pm 0,30	75,60 \pm 1,53	370,46 \pm 2,57
Policosanol	50	1,03 \pm 0,17*	90,96 \pm 0,96*	214,60 \pm 3,26*
D-003	50	1,40 \pm 0,49* ⁺	92,53 \pm 1,06* ⁺	204,70 \pm 3,80* ⁺
Quinta vértebra lumbar				
Control negativo	0	3,40 \pm 0,21*	86,43 \pm 0,78*	215,13 \pm 2,94*
Control positivo	0	2,26 \pm 0,34	73,03 \pm 0,63	257,63 \pm 4,31
Policosanol	50	3,40 \pm 0,30*	81,36 \pm 1,51*	212,90 \pm 1,11*
D-003	50	3,86 \pm 0,17* ⁺	85,76 \pm 0,60* ⁺	205,93 \pm 0,60* ⁺

Los resultados se expresan como X \pm DE. X media. DE desviación estándar. Tb trabéculas. Tb Esp espesor de trabéculas. Tb Sp Separación de trabéculas. * p < 0,001 Comparaciones vs. control positivo.

⁺ p < 0,05 Comparación con policosanol (Prueba de la U de Mann Whitney).

Tabla 2. Efectos del D-003 y el policosanol en indicadores de resorción ósea en ratas ovx.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Oc (Cantidad/mm)	OCs/BS (%)
Cuello del fémur			
Control negativo	0	0,44 \pm 0,01*	5,41 \pm 0,14*
Control positivo	0	0,70 \pm 0,01	8,93 \pm 0,20
Policosanol	50	0,49 \pm 0,01*	5,48 \pm 0,20*
D-003	50	0,43 \pm 0,01* ⁺	5,24 \pm 0,14* ⁺
Fémur distal			
Control negativo	0	0,90 \pm 0,11*	4,04 \pm 0,24*
Control positivo	0	1,83 \pm 0,18	6,63 \pm 0,20
Policosanol	50	1,03 \pm 0,14*	4,18 \pm 0,18*
D-003	50	0,88 \pm 0,12* ⁺	3,89 \pm 0,13* ⁺
Quinta vértebra lumbar			
Control negativo	0	0,26 \pm 0,20*	1,12 \pm 0,13*
Control positivo	0	0,46 \pm 0,32	1,55 \pm 0,05
Policosanol	50	0,29 \pm 0,30*	0,82 \pm 0,03*
D-003	50	0,23 \pm 0,22*	0,60 \pm 0,02* ⁺

Los resultados se expresan como X \pm DE. X media. DE desviación estándar. OCs/BS: superficie de Oc/superficie ósea. * p < 0,001 Comparaciones vs. control positivo.

⁺ p < 0,05 Comparación con policosanol (Prueba de la U de Mann Whitney).

Tabla 3. Efectos del D-003 y el policosanól sobre la superficie de Ob en ratas ovx.

Grupo	Dosis (mg/kg)	OBs/BS (%)
Cuello del fémur		
Control negativo	0	24,47 ± 0,29*
Control positivo	0	54,11 ± 1,56
Policosanól	50	53,17 ± 1,30
D-003	50	53,21 ± 1,23
Fémur distal		
Control negativo	0	13,05 ± 0,26*
Control positivo	0	37,20 ± 1,22
Policosanól	50	35,71 ± 1,01
D-003	50	35,96 ± 1,07
Quinta vértebra lumbar		
Control negativo	0	32,23 ± 0,17*
Control positivo	0	66,31 ± 1,76
Policosanól	50	66,08 ± 1,60
D-003	50	66,33 ± 1,38

Los resultados se expresan como X ± DE. X media. DE desviación estándar. OBs/BS: superficie de Ob/superficie ósea.

* p < 0,05 Comparación con el control positivo (Prueba de la U de Mann Whitney)

preventivo potencial sobre la OP, porque reproduce gran parte de las características de la pérdida ósea trabecular inducida por la post-menopausia en la mujer.^{22,27} Así, la pérdida ósea por deficiencia de estrógenos en el esqueleto de la rata se produce por un aumento del remodelado óseo, en que la resorción supera a la formación ósea, y precisamente el cuello del fémur, el fémur distal y la quinta vértebra lumbar son las estructuras más utilizadas para estudiar efectos de tratamientos antiresortivos, ya que la rata y el hombre muestran cambios similares en la masa y estructura de estos huesos, en particular, en el cuello del fémur.^{22,27}

Los animales del grupo control ovx mostraron los cambios histomorfométricos óseos descritos en la rata ovx, como disminución del espesor y número de trabéculas, y aumento de su separación, consecuencias de un aumento del número y superficie de Oc, también corroborado en el estudio, lo que sustenta la validez del modelo en las condiciones estudiadas y reafirma que los efectos observados sean atribuibles a los tratamientos.

Los resultados obtenidos son consistentes con los de estudios previos que han mostrado que tanto el D-003 como el policosanól previenen la pérdida y la resorción ósea en el hueso trabecular de la rata ovx¹⁶⁻¹⁹ lo que representa un efecto pleiotrópico beneficioso in vivo sobre este blanco extravascular. El hecho que ambas sustancias prevengan los cambios microestructurales inducidos por la ovariectomía en el hueso de las ratas y a la vez prevengan el aumento de la resorción, al prevenir el aumento del número y superficie de osteoclastos con respecto a los controles ovx, sin modificar la superficie de osteoblastos, indicador de formación ósea, indica que sus efectos antiosteoporóticos son esencialmente antiresortivos.

El D-003 ha mostrado efectos reductores de colesterol superiores a los del policosanól,^{20,21} consistente con sus

efectos sobre la síntesis de colesterol.^{12,13} Además, el D-003 administrado a 50 mg/kg, previene la PL en lipoproteínas y tejidos de ratas,²³ para lo cual el policosanól requiere dosis mayores.^{28,29} De modo consistente, en este estudio el D-003 fue más efectivo que el policosanól, lo que puede deberse, en parte, a que sus efectos reductores del colesterol y antioxidantes sean mayores que los del policosanól,^{10,20,21} dado el papel que la vía del mevalonato desempeña en el desarrollo de la OP,³⁰ y a que los lípidos oxidados propician la descalcificación ósea al inhibir la diferenciación y la actividad de células osteogénicas e inducir la migración de monocitos, los que se transforman en osteoclastos en el tejido óseo.³¹ Así, sustancias antioxidantes, como la ipriflavona y la Vitamina E, han prevenido la resorción ósea y han estimulado la formación ósea en animales alimentados con dieta rica en grasa, respectivamente.^{1,32}

Por otra parte, el hecho que los efectos del D-003 *in vivo* sean mayores que los del policosanól puede deberse a que el D-003 presenta una mayor absorción, biodisponibilidad y distribución tisular³³ que el policosanól, lo que puede repercutir en una mayor biodisponibilidad ósea. No obstante, los estudios farmacocinéticos no investigaron la distribución en hueso, lo que limita conclusiones al respecto.

Por otra parte, si se tiene en cuenta que otros ácidos, aunque insaturados y de menor tamaño molecular, como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 presentan efectos antiresortivos en modelos de OP, es plausible que los ácidos de alto peso molecular que conforman al D-003 también ejerzan efectos antiosteoporóticos.³⁴

Por otro lado, que el D-003 y el policosanól no hayan modificado la superficie de Ob, se corresponde con lo esperado de estudios previos en que se han obtenidos similares resultados¹⁶⁻¹⁹ lo que indica que los efectos antiosteoporóticos de los tratamientos en este modelo no se encuentren mediados por un aumento de la formación ósea. Precisamente es el aumento de la resorción ósea, y no el decremento de la formación, la característica fundamental de la OP por ovariectomía en ratas,²² por lo cual un efecto preventivo relevante en este modelo fundamentalmente brinda información de sus efectos sobre la resorción ósea.^{22, 27}

CONCLUSIONES

El D-003 y el policosanól, ambos administrados a dosis de 50 mg/kg por vía oral, durante 3 meses, fueron efectivos en prevenir la pérdida y la resorción ósea en ratas ovx, y los efectos del D-003 fueron superiores a los del policosanól en las tres estructuras óseas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kanis J.A., Delmas P., Burckhardt P. *et al.* Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. **Osteoporosis Int.**, **7**, 390, 1997.
2. Delmas P. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet**, **359 (9322)**, 2018, 2002.
3. Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. **J. Clin. Invest.**, **115**, 3318, 2005.
4. National Institute of Health Consensus. Development Panel on osteoporosis: Prevention, Diagnosis and Therapy. **JAMA**, **285**, 785, 2001.
5. Lafita J. Physiology and bone physiopathology. **An. Sist. Sanit. Navar.**, **26 (Suppl. 3)**, 7, 2003.
6. Mora S. and Gilsanz V. Establishment of peak bone mass. **Endocrinol. Metab. Clin. Nutr. Am.**, **32**, 39, 2003.
7. Raisz L. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin. Chem.**, **45**, 1353, 1999.
8. Luckman S.P., Hughes DE., Coxon FP. *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit mevalonate pathway and prevent post-transcriptional prenylation of GTP-binding

- proteins, including Ras. **JBMR**, **13**, 581, 1998.
9. Bauer D.C. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. **Osteopor. Int.**, **14**, 273, 2003.
10. Mas R. D-003: A new substance with promising lipid modifying and pleiotropic effects for atherosclerosis management. **Drugs of the Future**, **29**, 773, 2004.
11. Menéndez R., Marrero D., Mas R. *et al.* *In vitro* and *in vivo* study of octacosanol metabolism. **Arch. Med. Res.**, **36**, 113, 2005.
12. Menéndez R., Mas R., Amor A.M. *et al.* Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Pharmacol. Res.**, **44**, 299, 2001.
13. Menéndez R., Amor A.M., Rodeiro I. *et al.* Policosanol modulates HMG CoA reductase activity in cultured fibroblasts. **Arch. Med. Res.**, **32**, 8, 2001.
14. Rizzo E., Craft D., Dammann A. and Phillip M. Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for a fatty alcohol cycle. **J. Biol. Chem.**, **262**, 17412, 1987.
15. Mas R. Policosanol. **Drugs of the Future**, **25**, 569, 2000.
16. Noa M., Mas R., Mendoza S. *et al.* Policosanol prevents bone loss in ovariectomized rats. **Int. J. Pharmacol. Clin. Res.**, **30**, 117, 2004.
17. Mendoza S., Noa M., Mas R. and Mendoza N. Effects of D-003 (5-200 mg/kg), a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones and bone cell apoptosis in ovariectomized rats. **Int. J. Tiss. React.**, **XXVII**, 213, 2005.
18. Noa M., Mas R., Mendoza S. *et al.* Effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones from ovariectomized rats. **Drugs Exptl. Clin. Res.**, **30**, 35, 2004.
19. Mendoza S., Noa M. and Mas R. A comparison of the effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, and pravastatin, on bones and osteoclasts apoptosis of ovariectomized rats. **Drugs Exptl. Clin. Res.**, **31**, 181, 2005.
20. Mendoza S., Gámez R., Noa M. *et al.* Comparison of the effects of D-003 and policosanol on lipid profile and endothelial cells in normocholesterolemic rabbits. **Curr. Ther. Res.**, **62**, 209, 2001.
21. Castaño G., Mas R., Fernández L. *et al.* A comparison of the effects of D-003 and policosanol (5 and 10 mg/day) in patients with type II hypercholesterolemia: a randomized, double-blinded study. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **31**, Suppl., 31-44, 2005.
22. Division of Metabolic and Endocrine Drug Products. Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Food and Drugs Administration, FDA 1994.
23. Menéndez R., Mas R., Pérez Y. *et al.* Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **80**, 13, 2002.
24. Mosekilde L., Danielsen C. and Knudsen B. The effect of aging on bone mass and biochemical properties of mature rats. **Bone**, **14**, 1, 1993.
25. Parfitt A., Drezner M., Glorieux F. *et al.* Bone histomorphometry: standarization of nomenclature, symbols and units. **J. Bone Miner. Res.**, **2**, 595, 1987.
26. Coro R.M. y Borrajero I. Digipat: Un sistema cubano para morfometría de imágenes. **Rev. Latinoam. Patol.**, **39**, 9, 1996.
27. Turner A.S. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. **Eur. Cells Mat.**, **1**, 66, 2001.
28. Fraga V., Menéndez R., Amor A.M. *et al.* Effect of policosanol on in vitro and in vivo rat liver microsomal lipid peroxidation. **Arch. Med. Res.**, **28**, 355, 1997.
29. Menéndez R., Fraga V., Amor A.M. *et al.* Oral administration of policosanol inhibits in vitro copper ion-induced rat lipoprotein peroxidation. **Physiol. Beh.**, **67**, 1, 1999.
30. Ishimi Y. The role of the mevalonate pathway in osteogenic cells. **Clin. Calcium**, **12**, 631, 2002.
31. Parhami F., Morrow A., Balucan J. and Tintut Y. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**, 680, 1997.
32. Xu H., Watkins B. and Seifert M. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. **Calc. Tissue Int.**, **57**, 551, 1987.
33. Menéndez R., Mas R., Pérez Y. *et al.* Cinética de la radiactividad total (RT) tras la administración oral y endovenosa de dosis únicas de 3H-octacosanoico a ratas. **Acta. Farm. Bonaerense**, **24**, 48, 2005.
34. Watkins B.A., Li Y., Lippman H.E. *et al.* Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblasts function and bone metabolism. **Prostag. Leuk. Essent. Fatty Acids**, **68**, 387, 2003.