

Interacción del D-003 con el diazepam y la aminofilina en roedores

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

Departamento de Farmacología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn.sup@cnic.edu.cu.

Recibido: 29 de marzo de 2007.

Aceptado: 13 de julio de 2007.

Palabras clave: D-003, diazepam, aminofilina, interacción, SNC.

Key words: D-003, diazepam, aminophylline, drug to drug interaction, CNS.

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificada de la cera de caña, con efectos antiagregantes plaquetarios e hipolipemiantes, que previene la neurotoxicidad por ácido kaínico en ratones y la intensidad del infarto cerebral por isquemia y reperfusión en *Mongolian gerbils*, y a dosis elevadas (400 mg/kg) aumenta la actividad exploratoria en roedores. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la posibilidad de que diversos psicofármacos puedan administrarse conjuntamente con el D-003, este estudio investigó los efectos de la administración concomitante de D003 con diazepam (DZP) y aminofilina sobre la sujeción en varilla rotatoria y sobre el sueño inducido por pentobarbital, respectivamente, para lo cual se realizaron dos experimentos, tras determinar las dosis adecuadas de DZP y aminofilina para el estudio de interacción. En el primero, ratas SD machos se distribuyeron en cuatro grupos: uno control, tres tratados con D-003 (400, 600 y 800 mg/kg v.o.) y en el otro, ratones OF1 machos se distribuyeron en tres grupos: uno control y dos tratados con D-003 (400 y 800 mg/kg v.o.) más aminofilina (5 mg/kg, ip.). En ambos, los tratamientos se administraron durante 10 d, al término de los cuales, en el primero, las ratas se inyectaron con DZP (3 mg/kg ip.) y se evaluó su conducta en el ensayo de varilla rotatoria, y en el segundo, los ratones se inyectaron con pentobarbital sódico (45 mg/kg, ip.) y se determinó el tiempo de sueño. El D-003 a 600 y 800 mg/kg, aumentó el tiempo de permanencia de las ratas en la varilla rotatoria, mostrando un antagonismo estadísticamente significativo, del efecto del DZP. La administración conjunta del D-003 y la aminofilina no modificó el tiempo de sueño inducido por pentobarbital. Por tanto, se concluye que hay una interacción del D-003 y el DZP al disminuir los efectos de sedación de esta última y que no existe interacción entre el D-003 y la aminofilina.

ABSTRACT. D-003 is a mixture of higher aliphatic acids purified from sugarcane wax, with antiplatelet and lipid-lowering effects, that has shown to prevent the kainic acid-induced neurotoxicity in mice and the extent of the brain infarction induced by ischemia and reperfusion in *Mongolian gerbils*, while at a high dose (400 mg/kg) increased exploratory activity in mice. Considering this background, and the possibility that diverse psychoactive drugs can be administered together with D-003, this study researched the effects of the concurrent treatment with D003 and diazepam (DZP) or aminophylline on the rotarod test in rats, and on the pentobarbital-induced sleep in mice, respectively, after determining the adequate doses of DZP and aminophylline for the interaction study. Two experiments were conducted, in the first-one, male SD rats were distributed into four groups: a control and three treated with D-003 (400, 600, and 800 mg/kg), while in the second, male OF1 mice were distributed into three groups: a control and two treated with D-003 (400 and 800 mg/kg) plus aminophylline (5 mg/kg, ip). In both experiments the treatments were given for oral route by 10 d, and at treatment completion, rats were injected with DZP (3 mg/kg ip.) and their behavior in the rotarod test was assessed, whereas in the second one, mice were injected with sodium pentobarbital (45 mg/kg, ip.) and sleep duration was measured. D-003 at 600 and 800 mg/kg, moderately, but significantly, increased the time in which rats remained in the rod without falling, antagonizing partially the effect of DZP. Administration of D-003 plus aminophylline did not modify the pentobarbital sleeping time. It is concluded that D-003 produced an interaction with DZP decreasing the sedative effect of diazepam, but not with aminophylline.

INTRODUCCIÓN

El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificada de la cera de caña (*Saccharum officinarum* L.) cuyo principal componente es el ácido octacosanoico, seguido por los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico, tetratriacontanoico, que contiene otros ácidos entre C₂₄ y C₃₆ en menores proporciones.¹ Estudios preclínicos y

clínicos han demostrado que el D-003 produce efectos hipolipemiantes, antioxidantes y antiagregantes marcados y dependientes de las dosis empleadas.²⁻⁹

Los estudios farmacocinéticos han mostrado que tras la administración oral de ácido octacosanoico marcado a ratas, ocurre una amplia distribución de la radiactividad en diferentes tejidos, incluido el cerebro.¹⁰ Por otra parte,

dosis elevadas de D-003 (400 mg/kg) han aumentado modesta, pero significativamente, la actividad exploratoria en ratas,¹¹ hechos que sugerían que al menos algún(os) componentes del D-003 no solo atravesaban la barrera hematoencefálica, sino que producían efectos aparentemente estimulantes sobre el Sistema Nervioso.

Consistente con estos hechos, el D-003 ha mostrado efectos protectores sobre la neurotoxicidad por ácido kaínico, ya que atenúa la reducción de la actividad exploratoria y los daños histológicos inducidos por la administración sistémica de dosis subconvulsivantes de ácido kaínico, como la muerte neuronal inducida por este agente en secciones del hipocampo (CA1 y CA3).¹² Además, el D-003 redujo la intensidad del infarto cerebral inducido por isquemia y reperusión en *Mongolian gerbils*.¹³ Por otra parte, los psicofármacos son medicamentos de amplio uso en la población adulta y el consumo simultáneo de estos con otras drogas aumenta la frecuencia de reacciones adversas. Por tanto, se hace necesario investigar las potenciales interacciones medicamentosas de nuevas drogas en desarrollo, con otras muy utilizadas en la clínica, como los ansiolíticos y los estimulantes del Sistema Nervioso Central, entre otros.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el objetivo de este trabajo consistió en investigar si el D-003 antagonizaba los efectos del diazepam (DZP) en el modelo de ejecución en varilla rotatoria en ratas y los efectos de la aminofilina sobre el sueño inducido por pentobarbital en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250 a 300 g) y ratones OF1 machos (25 a 30 g) procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Ciudad de La Habana) que se adaptaron a las condiciones experimentales de (25 ± 2) °C de temperatura, (60 ± 10) % de humedad relativa y ciclos de luz y oscuridad de 12 h, con libre acceso al agua y la comida durante 7 d. Las experiencias se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y de los principios éticos del manejo de animales.

Administración y dosificación

El D-003 fue suministrado por el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales (Ciudad de La Habana, Cuba) tras corroborar sus especificaciones de calidad y se administró suspendido en un vehículo Tween 20/H₂O (2 %).

El DZP fue suspendido en goma acacia 2 % mientras que la aminofilina y el pentobarbital (Industria Médico Farmacéutica, Ciudad de La Habana) fueron disueltos en agua destilada. El D-003 o el vehículo se administraron en dosis repetidas (DR) por vía oral durante 10 d y 24 h previas al experimento y el DZP y la aminofilina a dosis únicas (DU) por vía ip. 30 min antes del experimento.

Interacción con diazepam

Para la búsqueda de la dosis adecuada de DZP, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: un control negativo administrado con el vehículo (goma acacia 2 % ip.) y tres tratados con DZP (1, 3 y 10 mg/kg ip.) respectivamente teniendo en cuenta que ha sido reportado que dosis de DZP (1 a 10 mg/kg) han sido efectivas en modelos experimentales.^{14,15}

Para los estudios de interacción, los animales se distribuyeron en cuatro grupos: un control negativo,

tratado con el vehículo, un control positivo tratado con el vehículo + DZP (3 mg/kg), y tres tratados con D-003 (400, 600 y 800 mg/kg v.o.), + DZP (3 mg/kg ip.).

Varilla rotatoria

Al inicio todos los animales fueron colocados en la varilla rotatoria (Ugo Basile, Italia) a una velocidad de 8 r/min y solo las ratas que se mantuvieron sobre la varilla por un tiempo ≥ 2 min fueron utilizadas en el experimento (tiempo de permanencia pre-tratamiento). Una vez culminado el tratamiento fueron colocadas nuevamente en la varilla rotatoria y se cuantificó el tiempo transcurrido hasta su caída (tiempo de permanencia post-tratamiento).

Interacción con aminofilina

Se realizó un ensayo para determinar la dosis de aminofilina a emplear en el estudio y para esto los ratones se distribuyeron en cuatro grupos experimentales: un grupo control (vehículo) y tres grupos tratados con aminofilina (5 y 10 mg/kg ip.). Asimismo, fue determinada la dosis de D-003 y los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: un grupo control y dos tratados con D-003 (400 y 800 mg/kg v.o.).

Una vez determinadas las dosis adecuadas para el estudio de interacción, los animales se distribuyeron en cuatro grupos: un control negativo, tratado con el vehículo, un control positivo, tratado con aminofilina (5 mg/kg), un grupo tratado con D-003 (400 mg/kg v.o.) y otro con aminofilina (5 mg/kg) + D-003 (400 mg/kg).

Inducción del sueño por pentobarbital

Una vez administrados los ratones con D-003 y aminofilina fueron inyectados con pentobarbital sódico (45 mg/kg, ip.) para la inducción de sueño.^{16,17} La duración del sueño de cada ratón fue el intervalo entre la pérdida y la recuperación del reflejo de enderezamiento.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos tratados y el control se realizó mediante la prueba de la U de Mann Whitney, para lo cual se empleó el paquete de programas Statistica para Window (Release 4.2.; StatSoft Inc., USA). Los resultados se expresan como la $X \pm EE$ y el valor α establecido *a priori* fue 0,05.

RESULTADOS

Interacción con diazepam

La administración de DZP en dosis de 3 y 10 mg/kg, disminuyó significativamente ($p < 0,01$) el tiempo de permanencia de las ratas en la varilla rotatoria (Tabla 1). El tratamiento conjunto con D-003 (600 y 800 mg/kg) y DZP (3 mg/kg) produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) del tiempo de permanencia en la varilla con respecto al del grupo DZP, que indica que el D-003 a las dosis mayores ensayadas antagoniza moderadamente el efecto del DZP, mientras que a la dosis de 400 mg/kg no modifica la conducta inducida con el DZP (Tabla 2).

Interacción con teofilina

La aminofilina (5 y 10 mg/kg), no así el D-003 (400 y 800 mg/kg), disminuyó significativamente el tiempo de sueño inducido por pentobarbital (Tabla 3). La administración conjunta de D-003 (400 mgf/kg) y la aminofilina (5 mg/kg) no modificó significativamente el tiempo de sueño respecto a los controles negativo y positivo (Tabla 4).

Tabla 1. Efecto del diazepam en el ensayo de varilla rotatoria.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tat (s) ^a	Tdt (s) ^b
Control negativo	0	355,8 ± 58,0	500,0 ± 0
DZP	1	326,8 ± 45,2	340,1 ± 7,31
DZP	3	338,8 ± 44,1	63,0 ± 14,4 **
DZP	10	347,6 ± 54,7	5,6 ± 1,9 **

DZP (Diazepam). Los resultados se expresan como X ± EE (media ± error estándar).

^aTat tiempo de permanencia en la varilla rotatoria pre-tratamiento. ^bTdt tiempo de permanencia en la varilla rotatoria post-tratamiento.

** p < 0,01 Comparación contra control negativo (Prueba de la U de Mann Whitney).

Tabla 2. Efectos del D-003 y de la interacción con DZP en el ensayo de varilla rotatoria.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Tat (s) ^a	Tdt (s) ^b
Control negativo	–	17	469,4 ± 21,0	447,15 ± 23,8
Control positivo (DZP)	0 + 3	17	457,2 ± 16,3	60,7 ± 7,9****
D-003 + DZP	400 + 3	10	465,2 ± 30,1	55,6 ± 17,5
D-003 + DZP	600 + 3	10	417,2 ± 42,0	114,6 ± 11,5 ++
D-003 + DZP	800 + 3	10	441,5 ± 23,8	139,4 ± 37,2 +

DZP Diazepam. Los resultados se expresan como X ± EE (media ± error estándar).

^aTat tiempo de permanencia en la varilla rotatoria pre- tratamiento. ^bTdt tiempo de permanencia en la varilla rotatoria post-tratamiento. ****p < 0,001 Comparación contra control negativo. + p < 0,05, ++ p < 0,01 Comparación contra control positivo

Tabla 3. Efectos de la aminofilina y el D-003 en el modelo de sueño inducido por pentobarbital.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de sueño (min)
Control (–)	0	54,16 ± 3,6
Aminofilina	5	35,10 ± 4,1 **
Aminofilina	10	32,50 ± 2,3 **
Control (–)	0	44,16 ± 3,6
D-003	400	48,1 ± 3,7
D-003	800	52,5 ± 8,7

Los resultados se expresan como X ± EE (media ± error estándar). ** p < 0,01 Comparación contra control negativo (Prueba de la U de Mann Whitney).

Tabla 4. Efecto de la interacción del D-003 (400 mg/kg po) y la aminofilina (5 mg/kg ip.) en el modelo de sueño inducido por pentobarbital.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de sueño (s)
Control (–)	0	53,0 ± 7,23
Control (+) (Aminofilina)	5	30,5 ± 5,07 *
D-003	400	46,5 ± 4,20
D-003 + Aminofilina	400 + 5	35,7 ± 6,70 *

Los resultados se expresan como X ± EE : (media ± error estándar).

* p < 0,05 Comparación contra control negativo (Prueba de la U de Mann Whitney).

DISCUSION

Este estudio demuestra que el D-003 administrado a dosis elevadas (600 y 800 mg/kg) antagonizó moderadamente el efecto inducido por el DZP en la varilla rotatoria, sin modificar el efecto de la aminofilina en el sueño inducido por pentobarbital.

Las benzodiazepinas son los ansiolíticos más prescritos en la clínica y el DZP es un clásico representante de esta clase terapéutica que ha sido ampliamente utilizado en el manejo de la ansiedad, pese a producir efectos no deseados, como sedación, relajación muscular, ataxia, amnesia y potenciación del efecto del etanol y los barbitúricos.¹⁸ El DZP a determinadas dosis produce pérdida del movimiento coordinado y relajación muscular por una acción central independiente de su efecto sedante,¹⁹ que involucra un refuerzo de la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, a través del receptor GABA_A subtipo $\alpha 1$.²⁰

Por sus efectos, el DZP se utiliza con frecuencia como droga de referencia en la evaluación preclínica de los efectos de sustancias con potenciales efectos tranquilizantes-sedantes, así como para explorar la posible neurotoxicidad de nuevas sustancias, como parte de los estudios de la llamada farmacología de la seguridad. Uno de los modelos más utilizados con este objetivo es el de ejecución y sujeción de roedores en varilla rotatoria, en el cual la administración de DZP a roedores disminuye el tiempo de permanencia de los roedores en dicha varilla.^{21,22}

Este trabajo demuestra que el D-003 no refuerza el efecto relajante muscular del DZP,^{23,24} expresado a través de la disminución del tiempo de permanencia de las ratas en la varilla rotatoria, y que, por el contrario, previno este efecto de modo moderado y dependiente de las dosis al aumentar el tiempo de permanencia en la varilla con respecto al grupo tratado con DZP. Este resultado es consistente con el aumento de la actividad exploratoria inducida por D-003 a dosis de 400 mg/kg,¹¹ y con la atenuación que causa sobre la disminución de la actividad exploratoria inducida por dosis subconvulsivantes de ácido kaínico en roedores.¹²

La aminofilina es un estimulante del SNC del grupo de las metilxantinas que resulta muy utilizada en la práctica por sus efectos relajantes sobre la musculatura lisa, fundamentalmente la bronquial y disminuye la duración del sueño inducido por dosis únicas de pentobarbital.²⁵ Teniendo en cuenta que el D-003 aumenta la actividad exploratoria de ratones en campo abierto, e incluso antagoniza la disminución de esta actividad inducida por ácido kaínico, resultaba de interés investigar si podía reforzar los efectos de la aminofilina sobre el sueño inducido por dosis únicas de pentobarbital, debido a una interacción farmacológica.

La aminofilina, como se esperaba de su acción estimulante, disminuyó el tiempo de sueño inducido por pentobarbital, efecto que no fue modificado por la administración conjunta del D-003, lo que descarta una interacción entre ambas sustancias que se manifieste en este ensayo.

Las interacciones droga-droga involucran las interacciones que tienen lugar entre dos o más fármacos sobre un receptor y las modificaciones sobre sus respectivas farmacocinéticas, ambas con implicaciones en los efectos subsiguientes, por lo que pueden alterar el beneficio terapéutico esperado y generar reacciones adversas como consecuencia de la administración simultánea de dos o

más sustancias. Las interacciones farmacocinéticas pueden deberse a más de una causa, si bien la más frecuente es la relacionada con los procesos de metabolización, que de forma general, se agrupan en reacciones Fase I (oxidación, reducción o hidrólisis) que producen la inactivación, activación o conversión de la molécula en otra sustancia activa (beneficiosa o tóxica) o inactiva; y las reacciones Fase II, en que el fármaco o un metabolito se acopla a un sustrato endógeno (ácido glucurónico, acético o sulfúrico) para facilitar su excreción.

Aunque este estudio no pretendía abordar la causa de las posibles interacciones entre el D-003 con el DZP y la aminofilina, no se esperaba que fueran de tipo farmacocinético, ya que el DZP y la aminofilina se metabolizan a través del sistema microsomal hepático P450, que es el utilizado en el metabolismo y detoxificación de un gran número de xenobióticos. Así, la aminofilina incluso se utiliza como droga tipo para predecir interacciones farmacocinéticas con este sistema,²⁶ y el DZP inhibe la isoenzima CYP450 2C19.

Por tanto, sustancias que inhiban las enzimas hepáticas del sistema citocromo P450 deben mostrar un elevado potencial de interacciones farmacocinéticas. En el caso del DZP tales interacciones pueden producir una sedación aumentada y prolongada. Sin embargo, el D-003 no actúa sobre las diferentes isoformas de las enzimas CYT P-450,²⁷ consistente con su estructura química, ya que ha sido demostrado que los ácidos alifáticos de muy larga cadena, como ocurre con los componentes del D-003, se metabolizan exclusivamente a nivel peroxisomal hepático.²⁸ Por tanto, la posibilidad de interacción farmacocinética con compuestos metabolizados por el sistema P450, como la aminofilina y el DZP, es baja.

De ello, se infiere que el moderado antagonismo que el D-003 ejerce sobre los efectos del DZP en el modelo de varilla rotatoria, consistente además con sus efectos estimulantes sobre la actividad exploratoria en roedores,¹¹ se deba a interacciones farmacológicas que podrían involucrar de algún modo, una acción sobre el receptor GABA_A subtipo $\alpha 1$, responsable del efecto sobre la actividad motora inducida por el DZP.²⁰

Sin embargo, es preciso notar que todos los efectos del D-003 sobre los patrones conductuales en roedores se manifiestan a dosis relativamente elevadas (≥ 400 mg/kg),^{11,12} a diferencia de sus efectos antioxidantes, antitrombóticos y antiosteoporóticos, manifiestos desde dosis de 5 mg/kg.²⁹⁻³¹ Por tanto, los efectos aquí observados parecen ser consecuencia de efectos inespecíficos sobre blancos secundarios, aspecto que ulteriores trabajos deberán investigar.

CONCLUSIONES

El D-003 administrado a dosis altas (400 y 800 mg/kg.) antagonizó moderadamente el efecto del DZP sobre la permanencia de las ratas en la varilla rotatoria, sin modificar el efecto de la aminofilina sobre el sueño por pentobarbital en ratones.

BIBLIOGRAFIA

1. González L., Marrero D., Laguna A., *et al.* (Laboratorios DALMER S.A). A mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, PAT CU 35/97, 1997.
2. Menéndez R., Mas R., Pérez J., González R.M., and Jiménez S. Oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids, prevents casein-induced endogenous hypercholesterolemia in rabbits. *Canadian J. of Physiology Pharmacology*, 82, 22-9, 2004.

3. Castaño G., Mas R., Fernández L., Illnait J., Mendoza S., Gámez R., Fernández J., and Mesa M. A comparison of the effects of D-003 and policosanol (5 and 10 mg/d) in patients with Type II hypercholesterolemia: a randomized, double-blinded study. **Drugs Exptl. Clin. Res.** **XXX**, (Suppl.), 31-44, 2005.
4. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Mas R. and Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D-003. **Pharmacological Research**, **42**, 137-143, 2000.
5. Arruzazabala M.L., Molina V., Carbajal D., Fernández L., Mas R., Illnait J., Castaño G., Fernández J. and Mendoza S. A randomised, double-blinded clinical study of the effects of policosanol (D-003), a new substance purified from sugar cane wax, on platelet aggregation and plasma levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. **Pharmacological Research**, **24**, 55, 2004.
6. Arruzazabala M.L., Molina V., Carbajal D., Fernández L., Mas R., Castaño G., Illnait J., Mendoza S. Effects of D-003, a mixture of very long chain fatty acids purified from sugar cane wax, at 5 and 10 mg/d on platelet aggregation in healthy volunteers. **Int. J. Pharmacol. Clin. Res.**, **25**, 29-39, 2005.
7. Menéndez R., Mas R., Amor A.M., Ledón N., Pérez Y., González R.M., Rodeiro I., Zayas M. and Jiménez S. Inhibition of rats lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **12**, 1-8, 2001.
8. Castaño G., Menéndez R., Más R., Ledón N., Fernández J.C., Pérez J.L., González R.M., and Lescay M. Effects of D-003: A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 193-203, 2003.
9. Castaño G., Mas R., Fernández L., Illnait J., Fernández J., Mendoza S., Gámez R., Mesa M., López E. and Álvarez E. Effects of D-003 (5 - 40 mg/day) on lipid profile of patients with Type II hypercholesterolemia: a Phase II clinical study. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 789-802, 2003.
10. Menéndez R., Más 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**, 48-60, 2005.
11. Fernández L., Fernández J.C., Mas R. *et al.* Efectos del D-003 sobre patrones conductuales de roedores, **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **36**, 121-126, 2005.
12. Carbajal D., Noa M., Molina V., Mas R. and Arruzazabala M.L. Effect Of D-003 On Sub-Convulsive Dose of Kainic Acid In Rats. **Drugs R.D.**, **5**, 331-6, 2004.
13. Molina V., Noa M., Arruzazabala M.L., Carbajal D. and Más R. Effect of D-003, a mixture of very long chain aliphatic acids purified from sugarcane wax, on cerebral ischemia in *Mongolian gerbils*. **J. Med. Food**, **8**, 482-7, 2005.
14. Volke V., Soosaar A., Koks S., Vasar E. And Mannisto P.T. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **351**, 287-90, 1998.
15. A.H. Tang, S.R. Franklin, C.S. Himes and P.M. Ho Behavioral effects of U-78875, a quinoxalinone anxiolytic with potent benzodiazepine antagonist activity. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **259**, 248-254, 1991.
16. Sonavane G.S., Palekar R.C., Kasture V.S., Kasture S.B. Anticonvulsant and behavioural actions of *Myristica Fragans* seeds. **Indian Journal of pharmacology**, **34**, 332-338, 2002.
17. Erden B.F., Ulak G., Yildiran G. and Gacar N. The effect of 7-nitro indazole on pentobarbital-induced sleep in mice. **Pharmacological Research**, **36**, 265-268, 1997.
18. Shafaghi B., Naderi N., Tahmasb L. and Kamalinejad M. Anxiolytic Effect of Echium amoenum L. in Mice. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, **1**, 37-41, 2002.
19. Tsuda M., Suzuki T., Misawa M. and Nagase H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **307**, 7-14, 1996.
20. McKernan R.M., Rosahl T.W., Reynolds D.S., Sur C., Wafford K.A., *et al.* Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α_1 subtype. **Nature Neuroscience**, **3**, 587-592, 2000.
21. Morimoto S. and Kito G., Rotarod method in young rats and the antidepressive effect: is the rotarod method capable of evaluating antidepressive effects? **Nippon Yakurigaku Zasshi**, **104**, 39-49, 1994.
22. Helton D.R., Tizzano J.P., Monn J.A., Schoepp D. and Kallman M.J. An Anxiolytic and Side-Effect Profile of LY354740: A Potent, Highly Selective, Orally Active Agonist for Group II Metabotropic Glutamate Receptors. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **284**, 651-660, 1998.
23. Griebel G., Perrault G., Letang V., Granger P., Avenet P., Schoemaker H. and Sanger D.J. New evidence that the pharmacological effects of benzodiazepine receptor ligands can be associated with activities at different BZ receptor subtypes. **Psychopharmacology**, **146**, 205-213, 1999.
24. Rudolph U., Crestani F., Benke D., Brunig I., Benson J.A., Fritschy J.M., Martin J.R., Bluethmann H. and Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific aminobutyric acidA receptor subtypes. **Nature**, **401**, 796-800, 1999.
25. Hosseinzadeh H. and Nassiri M. Asl2 Anticonvulsant, sedative and muscle relaxant effects of carboxoxolone in mice. **BMC Pharmacology**, **3**, 3-9, 2003.
26. Galli E y Feijoo L. Citocromo P-450 y su importancia clínica. Revisión actualizada. **Revista de Neuro-Psiquiatria**, **65**, 187-201, 2002.
27. Gámez R., Rodeiro I., González J., and García H. Effects of D003 on hepatic drug metabolizing enzyme activities in rats. **J. Med Food Winter**, **7**, 482-6, 2004.
28. Singh I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. **Mol Cell Biochem** **167**, 1-29, 1997.
29. Noa M., Mas R., Mendoza S., Gámez R., Mendoza N. Effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones of ovariectomized rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **30**, 35-41, 2004.
30. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D. *et al.* Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. **Pharmacol. Res.**, **42**, 137-143, 2000.
31. Menéndez R., Mas R., Perez 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**, 13-21, 2002.