

Efecto del extracto lipídico del fruto de la *Roystonea regia* (D-004) sobre los sitios de implantación en ratas SD administradas durante un ciclo reproductivo completo

Ariadne Gutiérrez Martínez, Balía Pardo Acosta, Rafael Gámez Menéndez, Gisela Marrero Cofiño, Haydée García Cambián y Dayisell Curveco Sánchez.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu

Recibido: 15 de septiembre de 2008. Aceptado: 8 de enero de 2009.

Palabras clave: D-004, ratas, sitios de implantación, pérdidas postimplantación.

Key words: D-004, rats, implantation sites, postimplantation loss.

RESUMEN. El D-004 es un extracto lipídico obtenido de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*) (Arecaceae) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos. El tratamiento oral con D-004 inhibe significativamente la hiperplasia prostática inducida por testosterona en roedores. Hasta el momento no se habían estudiado los efectos sobre la reproducción en ratas de este producto, por lo que en este trabajo se reportan los efectos sobre la implantación observados en un estudio de toxicología de la reproducción al administrarlo a esos animales durante un ciclo reproductivo completo. Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultas jóvenes hembras, que se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: un control y tres tratados con D-004 a las dosis de 500, 750 y 1 000 mg/kg, que fueron administradas oralmente desde 15 d antes del apareo y hasta el fin de la lactancia. Durante 21 d, las hembras se aparearon al azar con los machos, la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal fue estimada como evidencia de cópula. Al finalizar el período de gestación, las ratas aparentemente no preñadas fueron sacrificadas para determinar reabsorciones e igual procedimiento, se siguió con las hembras paridas una vez destetadas las crías. También fueron calculadas las pérdidas postimplantación. Todas las variables analizadas fueron similares entre los grupos tratados y el control, ya que no existieron diferencias significativas. Estos resultados demuestran que el D-004, administrado oralmente a ratas Sprague Dawley no induce afectaciones en la capacidad reproductiva, específicamente de los sitios de implantación.

ABSTRACT. D-004 is a lipid extract of the fruits of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) (Arecaceae), which consists of a mixture of fatty acids. Oral treatment with D-004 significantly prevents the prostate hyperplasia induced with testosterone in rodents. So far, the effects had not been studied on the reproduction of this product; therefore, in this work the effects on the implantation observed in a study of toxicology from the reproduction when administering the animals during a complete reproductive cycle are reported. Female young adults Sprague Dawley rats of both sexes were randomly distributed to four groups: a control group; and three groups administered with D-004 at 500, 750 and 1 000 mg/kg, respectively. D-004 was administered orally to female rats two weeks before mating and for the duration of the nursing period. During 21 d, F0 females mating with males. Females were examined daily until mating was confirmed by the presence of copulatory plug or sperm in a vaginal lavage (gestation day 0). The end of gestation, apparently non-pregnant rats, were sacrificed to identify resorptions and the same procedure allowed with dams, after lactation period. Also, the postimplantation loss were calculated. There was no significant difference on the analyzed parameters compared to control group. The present results demonstrate that D-004, orally administered in Sprague Dawley rats did not affect adversely reproductive performance, in particular, the implantation sites.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un crecimiento anormal y no maligno de la próstata que origina síntomas en el tracto urinario en el hombre.¹ La frecuencia de HPB se incrementa con la edad, siendo muy común en hombres ≥ 50 años y en alrededor del 80 % de los hombres mayores de 80 años.^{2,3}

La etiopatología de la HPB no es totalmente conocida, pero depende, al menos parcialmente, de los cambios hormonales que ocurren en el hombre en la medida que este va envejeciendo, particularmente, debido al incremento de la conversión de testosterona (T) en dihidro-

testosterona (DHT) en la próstata, a través de la acción de la enzima 5 α -reductasa.⁴ Además, el incremento del tono de la musculatura lisa en inervaciones adrenérgicas, mediado a través de los receptores α_1 -adrenérgicos en la próstata y la vejiga también contribuyen a la HPB.^{5,6}

Como se conoce, las drogas que se utilizan en el tratamiento de la hiperplasia prostática, bien sea antagonizando los receptores de andrógenos o inhibiendo la biosíntesis de DHT, producen cierto grado de infertilidad que es reversible algún tiempo después que cesa el tratamiento.⁷ Por otra parte, en las ratas machos expuestas prenatalmente se observan afectaciones en indicadores

sensitivos a andrógenos como la distancia anogenital, la retención de las tetillas y el desarrollo de los genitales externos.

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) (*Arecaceae*) que contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente de los ácidos oleico, palmítico, láurico, linoleico y mirístico, mientras que los ácidos palmitoleico, caprílico, cáprico y esteárico están presentes en menor concentración.⁸ El tratamiento oral con D-004 inhibe significativamente la hiperplasia prostática (HP) inducida por T, pero no por DHT, e inhibe la 5 α -reductasa prostática.⁹⁻¹³

En las evaluaciones toxicológicas agudas realizadas en especies roedoras y no roedoras, así como en estudios de dosis repetidas en ratas y ratones por vía oral no se demostró toxicidad atribuible al tratamiento con D-004 en ninguno de los niveles de dosis empleados.^{14,15} Por otra parte, en los estudios de genotoxicidad (Ames, ensayo cometa y micronúcleos en médula ósea de roedores) no se encontró actividad genotóxica o citotóxica asociada al tratamiento con D-004.¹⁶⁻¹⁸ De igual modo, el D-004 no mostró potencial estrogénico en el ensayo uterotrópico en ratas.¹⁹

En el contexto de los estudios de toxicología preclínica del D-004, se llevó a cabo un estudio para caracterizar los efectos sobre la reproducción que abarcó todas las etapas del proceso reproductivo, el cual se incluye dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras.²⁰ En este trabajo, se reportan los resultados de dicho estudio en cuanto a los efectos del D-004 sobre los sitios de implantación, observados al administrar el producto a los animales durante un ciclo reproductivo completo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultas jóvenes (8 a 10 semanas) de ambos sexos procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Ciudad de La Habana, Cuba), de peso corporal entre 200 y 250 g.

Los animales se colocaron en jaulas y se adaptaron durante siete días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en (25 \pm 2) $^{\circ}$ C, la humedad entre el 50 y 70 % y la iluminación en ciclos de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para ratas preparado en el CENPALAB. El acceso al pienso y al agua fue *ad libitum*.

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba.

Administración y dosificación

El D-004 se obtuvo en el Departamento de Química Farmacéutica del Centro Productos Naturales, Ciudad de La Habana, tras corroborar su composición por cromatografía gaseosa. La sustancia fue administrada en forma de emulsión aceite-agua, usando como agente vehículo Tween 65 (2 %). Las emulsiones se prepararon diariamente 1 a 2 h antes de la administración. Los ajustes de las dosis se realizaron según el peso corporal semanal.

El producto se administró por vía oral por ser la ruta propuesta para su uso en humanos, a volumen constante (2 mL/kg).

El D-004 se administró a las hembras desde 15 d antes del apareo y hasta el fin de la lactancia (el día 21 post-parto),²⁰ ya que en el caso de las hembras este

esquema simula el consumo humano durante un ciclo reproductivo completo. A los machos se les administró el producto desde 10 semanas antes del apareo hasta que este finalizó. El tratamiento se llevó a cabo una vez al día (5 d por semana) entre 8:30 y 10:30 a.m.

Grupos experimentales

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: un control, tratado solo con el vehículo Tween 65 (2 %) y tres tratados con D-004 a las dosis de 500, 750 y 1 000 mg/kg respectivamente.

Exámenes realizados

Durante 21 d, las hembras F0 se aparearon al azar con los machos en la proporción 2 : 1 ó 1 : 1, a partir de las 4:30 p.m., aproximadamente. A la mañana siguiente, la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal fue estimada como evidencia de cópula, y se consideró que las hembras inseminadas estaban en el día 0 de la gestación.

Al finalizar el período de gestación las ratas aparentemente no preñadas fueron sacrificadas, sus úteros se colorearon con una disolución (10 %) de sulfito de amonio para determinar sitios de implantación mediante el método de Salewski.²¹ Igual procedimiento se siguió con las hembras paridas una vez destetadas las crías para determinar los sitios de implantación.

También fueron calculadas las pérdidas postimplantación de la forma siguiente:

$$\text{Pérdidas postimplantación} = \frac{SI - FV}{SI}$$

donde:

SI Sitios de implantación.

FV Fetos vivos.

Sitios de implantación

El día del parto se registró el número de crías vivas y muertas para cada una de las camadas.

Tras el parto de las hembras, los machos parentales se sacrificaron, anestesiados bajo atmósfera de éter y posteriormente se desangraron por la aorta abdominal.

Manejo de datos y análisis estadístico

Todas las variables se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.^{22,23}

El análisis estadístico se realizó con el paquete de programas STATISTICA, StatSoft, Inc. (2003), V. 6. (www.statsoft.com) y el nivel de significación establecido fue α 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio ninguna de las ratas mostró signos clínicos de toxicidad (Tabla 1).

El número de sitios de implantación, de fetos vivos y muertos al nacer y las pérdidas postimplantación fueron similares entre los grupos tratados y el control, ya que no existieron diferencias significativas entre ellos.

La implantación es la etapa más crítica en el establecimiento de la gestación y la disminución del número de sitios de implantación está bien correlacionada en animales de experimentación con alteraciones fisiológicas,²⁴ representando un papel determinante las concentraciones de estrógenos y de progesterona en los ovarios para que se logre la implantación en ratas y ratones.²⁵⁻²⁷ El balance hormonal adecuado regula la proliferación y diferenciación de células en el útero y establece el inicio de la implantación.²⁸ Por otra parte, el incremento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis son cruciales para una implantación exitosa, procesos en los cuales

Tabla 1. Efecto de la administración oral de D-004 sobre los sitios de implantación de ratas SD.

Tratamiento [mg/(kg · d)]	Ratas preñadas	Sitios de implantación	Fetos vivos al nacer	Fetos muertos al nacer	Pérdidas post- implantación
Control	20	14,20 ± 0,70	10,70 ± 0.98 ^a	0,90 ± 0.55	0,19 ± 0,04
500	26	13,81 ± 0,65	11,62 ± 0.82	0,19 ± 0,08	0,18 ± 0,04
750	24	15,00 ± 0,68	12,75 ± 0.85	0,29 ± 0.21	0,16 ± 0,05
1000	22	13,95 ± 0,82	10,64 ± 1.21	0,77 ± 0.29	0,21 ± 0,05

^a Media ± error estándar

ha sido demostrada la influencia de los estrógenos y la progesterona en varias especies roedoras.²⁹⁻³¹

Los resultados apuntan a que el tratamiento con D-004 antes y durante la gestación, así como durante la lactancia, no modifica el balance hormonal en ratas adultas, sugiriendo que el proceso de implantación no se ve afectado por alteraciones fisiológicas de estas hormonas, resultados estos que sustentan la ausencia de efectos estrogénicos y antiestrogénicos evidenciados para el D-004 en el ensayo uterotrónico en ratas adultas ovariectomizadas.³²

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el D-004, un extracto lipídico de los frutos de la *Roystonea regia*, administrado oralmente a ratas Sprague Dawley no induce afectaciones sobre los sitios de implantación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wilt T, Ishani A. and Mac Donald R. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. Cochrane Database Syst. Rev. [CD001423] 2002 (3).
- Fong YK, Milani S and Djavan B. Natural history and clinical predictors of clinical progression in benign prostatic hyperplasia. Curr. Opin. Urol. 2005;15:35-8.
- Austin O and Ricer RE. Prostate cancer screening: an appraisal of the PSA test. Fam Pract Recert. 1996;18:81-91.
- Bartsch G, Rittmaster RS and Klocker H. Dihydrotestosterone and the role 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. Urologe A. 2002;41:412-24.
- Kevin M and Slawin MD. The Medical Therapy of Prostatic Symptoms Study: What Will We Learn? Rev Urol. 2003;(5):S36-41.
- Lepor H, Tang R and Shapiro E. The alpha-adrenoceptor sub-type mediating the tension of human prostatic smooth muscle. Prostate. 1993;22:301-7.
- Wise LD, Minsker DH, Cukierski MA, Clark RL, Prahalada S, Antonello JM *et al.* Reversible decreases of fertility in male Sprague-Dawley rats treated orally with finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor. Reprod Toxicol. 1991;5:337-46.
- Laguna A, Rodríguez E, Mas R, Carbajal D, Arruzazabala L, Molina V and González V. Pharmaceutical composition and procedure for the prevention and treatment of prostate hyperplasia and prostatitis obtained from the fruits of *Roystonea regia* (Cuban royal palm). Cuba. Patent No. CU23256, 2003.
- Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E and González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. Drugs Exptl Clin Res. 2004;30:227.
- Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Rodríguez E and González V. 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. 2004;65:505.
- Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Noa M, Carbajal D and Mendoza N. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. Drugs R &D. 2006;7:233-41.
- Noa M, Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R and Molina V. Effect of D004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. Int J Tissue React. 2005;27:203-11.
- Arruzazabala ML, Mas R, Carbajal D and Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on *in vitro* and *in vivo* effects mediated by alpha-adrenoceptors in rats. Drugs R &D. 2005;6:281-9.
- 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;31:101-8.
- 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;38:99-102.
- Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D y García H. Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2005, 36 Especial.
- Marrero G., Gutiérrez A., Gámez R., Pardo B y 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;38:200-3.
- Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, y 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 Especial.
- Pardo B, Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Mendoza S, Noa M, *et al.* Estudio de los posibles efectos estrogénicos del D-004. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2007;38:103-6.
- International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility. 2005;ICH S5(R2).
- Salewski E. Farbmethode zum markroskopischen nachweis von implantatconsstellen am uterus der ratter naunyn schmuderbergs. Arch Pharmacol. 1964;247:367.
- Wier PJ and Ventre JR. Statistical analyses of reproductive and developmental toxicology studies. Drug Inf J. 1990;24:395-405.
- Gad SC and Weil C. Statistical for Toxicologist. In: Hayes W, editor. Principles and Methods of Toxicology, Chapter 15. 2nd Ed. Raven Press, New York. 1989;p.435-83.
- Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation. In: Greep RO, Astwood EG and Geiger SR. editors. Handbook of Physiology. Vol.II, Part. 2. American Physiological Society, Washington DC. 1973;p.187-215.
- Psychoyos A. Hormonal control of ovoidimplantation. Vitam Horm. 1973;31:201-56.
- McCormack JT and Greenwald GS. Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17 β levels on day 4 of pregnancy in the mouse. J Reprod Fertil. 1974;41:297-301.

27. Heap RB, Flint AP, Hartmann PE, Gadsby JE, Staples LD, Ackland N and Hamon M. Oestrogen production in early pregnancy. *J Endocrinol.* 1981;89:77P-94P.
28. Huet H, Andrews GK and Dey SK. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology.* 1989;125:1683-90.
29. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;(1):27-31.
30. Halder JB, Zhao X, Soker S, Paria BC, Klagsbrun M, Das SK and Dey SK. Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis.* 2000;26:213-24.
31. Hyder SM and Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.* 1999;13:806-811.
32. Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Noa M, Mas R, Goicochea E, Curveco D, Mendoza N and García H. Evaluation of D-004 in mature ovariectomized rat uterotrophic assays. *Lat Am J Pharm.* 2008;27:710-5.