

Efectos del D-005, extracto lipídico del fruto de *Acrocomia Crispa*, sobre el estrés oxidativo inducido por tetracloruro de carbono en ratas

Effects of D-005, lipid extract of the fruit of *Acrocomia Crispa*, on oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rats

Ambar Oyarzábal Yera^{a1}, Yohani Pérez Guerra^{b2}, Sonia Jiménez Despaigne^{a3}, Vivian Molina Cuevas^{a4}

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas Centro de Productos Naturales Dirección de Investigación Desarrollo e innovación Grupo de Farmacología. Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Habana, Cuba.

^b Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Dirección de Calidad. Ave 25 y 158 # 15202. Cubanacan, Playa, Habana, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 2020;

Aceptado: 16 de febrero de 2021

RESUMEN

El estrés oxidativo se produce por el desbalance entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidantes, el cual a su vez juega un papel importante en el desarrollo y progresión de diversas patologías. El D-005, extracto lipídico de los frutos de *Acrocomia crispera* contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, tales como: oleico, palmítico, láurico, mirístico, palmitoleico, caprílico, capríco, y esteárico que presentan propiedades antioxidantes. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del D-005 administrado como dosis orales únicas sobre el incremento de indicadores de estrés oxidativo inducidos por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos: un control negativo sin daño y seis grupos a los cuales se les administró el CCl₄ (intraperitoneal): un control positivo tratado con vehículo, cuatro con D-005 (5-100 mg/kg), y uno con extracto de semilla de uva (ESU) (250 mg/kg). Los animales del grupo control positivo (con CCl₄) alcanzaron valores significativamente superiores de malondialdehído-marcador de peroxidación lipídica-, grupos sulfhidrilos-marcador de oxidación proteica- y transaminasas séricas-marcador de daño hepático- con respecto a los animales del grupo control negativo (sin daño). El D-005 y el ESU previnieron marcada y significativamente dicho incremento. En conclusión, el D-005 administrado como dosis orales únicas de 5, 25, 50 y 100 mg/kg inhibe la peroxidación lipídica y la oxidación proteica, así como el daño hepático inducidos por CCl₄.

Palabras claves: D-005, peroxidación lipídica, oxidación proteica, antioxidante.

ABSTRACT

Oxidative stress is produced by the imbalance between the substances or factors pro-oxidant and the antioxidant defense mechanisms, which in turn plays an important role in the development and progression of various pathologies. D-005, lipid extract from the fruits of *Acrocomia crispera* contains a reproducible mixture of fatty acids, such as: oleic, palmitic, lauric, myristic, palmitoleic, caprylic, capric, and stearic that have antioxidant properties. The objective of this work is to evaluate the effect of D-005 administered as single oral doses on the increase in indicators of oxidative stress induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. The animals were randomly distributed into seven groups: a negative control without damage and six groups to which CCl₄ was administered (intraperitoneal): a positive control treated with vehicle, four with D-005 (5-100 mg/kg), and one with grape seed extract (ESU) (250 mg/kg). The animals in the positive control group (with CCl₄) reached significantly higher values of malondialdehyde-marker of lipid peroxidation-, sulfhydryl groups-marker of protein oxidation- and serum transaminases-marker of liver damage- with respect to the animals of the negative control group (without damage). D-005 and ESU markedly and significantly prevented this increase. In conclusion, D-005 administered as single oral doses of 5, 25, 50, and 100 mg/kg inhibits lipid peroxidation and protein oxidation, as well as CCl₄-induced liver damage.

Keywords: D-005, lipid peroxidation, protein oxidation, antioxidant.

¹ 0000-0003-3014-5457.

² 0000-0002-3964-2698

³ 0000-0002-8506-426X

⁴ 0000-0003-0706-5547

INTRODUCCION

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) se definen como especies químicas derivadas del oxígeno con características redox suficientes para ser potencialmente reactivas. (León *et al.* 2005; Semchyshyn y Lozinska, 2012; Lushchak, 2014; Halliwell y Gutteridge, 2015).

Las ERO se generan continuamente en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas por lo que constituyen componentes normales de células y tejidos (León *et al.* 2005; Brandes *et al.* 2014; Lushchak, 2014; Halliwell y Gutteridge, 2015). Teniendo en cuenta que las ERO tienen una alta reactividad e interaccionan con diversas estructuras celulares como proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico (ADN) modificando la estructura y función de las mismas (León *et al.* 2005; Nair *et al.* 2007); los sistemas biológicos han desarrollado toda una serie de mecanismos de defensa antioxidante para prevenir la formación de estas ERO o disminuir su efecto perjudicial sobre la célula (De Zwart *et al.* 1999; León *et al.* 2010; Li *et al.* 2013; Halliwell y Gutteridge, 2015; Caverzan *et al.* 2016).

El desbalance entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidantes conlleva al estrés oxidativo (Muller *et al.* 2007), el cual juega un papel importante en el desarrollo y progresión de diversas patologías (León *et al.* 2005; Li *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2015; Mohammad *et al.* 2016).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y como parte de la adopción de estilos de vida más sanos el consumo de suplementos nutricionales antioxidantes ha cobrado auge en las últimas décadas y la evaluación de sustancias con potenciales efectos antioxidantes es un tema de actualidad.

El extracto de semilla de uva (ESU) (*Vitis vinifera L.*) es un producto natural rico en polifenoles, comúnmente utilizado como suplemento nutricional por sus propiedades antioxidantes. El tratamiento oral con ESU previene el daño hepático inducido en ratas: por isquemia y reperfusión; con tamoxifeno y tetracloruro de carbono (CCl₄) (Shirli *et al.* 2008; El-Beshbishy *et al.* 2010; Sharma *et al.* 2012). Además, ejerce efectos antioxidantes en plasma y en tejido hepático de ratas diabéticas (Chis *et al.* 2009; Giribabu *et al.* 2015).

El D-005, extracto lipídico saponificado obtenido del fruto de la palma corajo (*Acrocomia crispera*), palma endémica de Cuba, de la familia *Arecaceae*, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico mientras el palmitoleico, caprílico, capríco, y esteárico se encuentran en menores concentraciones (González *et al.* 2015; Sierra *et al.* 2015).

Diversos estudios han demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido palmítico y el linoleico tienen la capacidad de secuestrar *in vitro* radicales libres (Chan *et al.* 1996; Steenkamp *et al.* 2006). Por otra parte, ha sido descrito los efectos antioxidantes del ácido oleico (Duval *et al.* 2002). En consonancia con estas evidencias extractos de origen natural que contienen estos ácidos en su composición química poseen propiedades antioxidantes (Chan *et al.* 1996; Hass *et al.* 1999; Steenkamp *et al.* 2006; Wang *et al.* 2010; Menéndez *et al.* 2005, 2007; Oyarzábal *et al.* 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del D-005 administrado como dosis orales únicas sobre el incremento de indicadores de estrés oxidativo inducidos por CCl₄ en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos (150-250 g de peso corporal) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales fueron adaptadas durante siete días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 5 % y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas establecidas en la “Guía Ética para el Manejo de Animales de Laboratorio” (La Habana, Cuba, 1992) y los principios éticos para el uso de animales de laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba, “Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos 039/2004” (CECMED, 2004); así como los aspectos específicos plasmados en el Manual de Calidad y los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Centro de Productos Naturales (CPN) perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba. El protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CPN.

Administración y dosificación

El D-005 (Lote S-190213) (Laboratorio de Química Farmacéutica, CPN, CNIC, La Habana, Cuba) se preparó en forma de suspensión en Tween-65/H₂O (2%) mientras que el ESU (Extracts, Healing & Medicinal Herbs, Australia), utilizada como sustancia de referencia, se disolvió en goma acacia al 1%. Ambos tratamientos se administraron como dosis orales únicas (5 mL/kg).

El CCl₄, sustancia inductora del daño hepático y del estrés oxidativo, se preparó en forma de suspensión en aceite de soya (20%) y se administró por vía intraperitoneal (1 mL/kg).

Diseño experimental

Tras culminar la cuarentena, las ratas se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos experimentales (10 ratas/grupo): un control negativo tratado oralmente con Tween 65/H₂O (2 %) (vehículo) y aceite de soya (intraperitoneal) y seis grupos a los cuales se les indujo el daño mediante la administración de CCl₄ (intraperitoneal): un control positivo tratado con vehículo, cuatro con D-005 (5, 25, 50 y 100 mg/kg) y uno con ESU (250 mg/kg).

La administración de los tratamientos se realizó una hora antes de la inducción del daño hepático mediante una inyección intraperitoneal única de CCl₄. Transcurridas 18 horas los animales se anestesiaron en atmósfera de halotano para la obtención de las muestras.

Obtención de las muestras

Las muestras de sangre se tomaron de la aorta abdominal y se colectaron en dos tubos: uno con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético –EDTA-) y otro sin anticoagulante”. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para obtener los sueros y plasmas, los cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso para cuantificar la actividad de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) así como variables oxidativas. Paralelamente, se colectaron muestras del tejido hepático (0,5g) que se homogenizaron en buffer Tris 150 mmol/L a pH 7,4 y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

- ✓ Determinación de las concentraciones séricas de transaminasas (ALT y AST)

Se determinaron con el juego de reactivos de la Firma Spinreact. La lectura se realizó a 340 nm, y los valores se reportaron como U/L.

Variables analizadas

✓ **Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB)**

Se realizó según la técnica de Ohkawa *et al.* (1979). Para ello, la mezcla de reacción (plasma u homogenato de hígado) se trató con 0,2 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) (8,1 %), 1,5 mL de ácido acético (20 %, pH 3,5) y 1,5 mL de una solución acuosa de ácido tiobarbitúrico (0,8 %) y se calentó a 95 °C. Con el objetivo de evitar la producción de peroxidaciones adicionales que pudieran constituir un error en la determinación durante el proceso de calentamiento se adicionó hidroxil tolueno butilado (1 mmol/L) al medio. Después de terminar este paso, las muestras se enfriaron y se les adicionó 5 mL de una mezcla n-butanol:piridina (15:1 v/v). Posteriormente, se agitaron vigorosamente con la ayuda de un vortex, se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min, se tomó la capa orgánica y se leyó su absorbancia a 534 nm en un espectrofotómetro. Para los cálculos de los niveles de SRATB se construyó una curva patrón con MDA bis (dimetil acetal). Los valores de MDA se reportaron como nmol de MDA/mg de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Marxwell *et al.* 1978).

✓ **Determinación de grupos sulfhidrilos (SH)**

Se realizó mediante la técnica descrita por Hu (1994), para lo cual se tomó una alícuota de 200 µL de la muestra (plasma u homogenato de hígado), se le añadió 600 µL de buffer TRIS-EDTA 20 mmol/L pH 8,2, 40 µL de ácido 5,5-ditio-bis- (2-nitrobenzoico) –DTNB- 10 mmol/L y 3,16 mL de etanol absoluto. Se incubó 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000 g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 412 nm. Se hizo un blanco con DTNB y el total de grupos SH se calculó usando una absorptividad de 13,600 cm⁻¹M⁻¹ y se expresó en mmol/L.

Manejo de datos y Análisis Estadístico

Las comparaciones con el control se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney. A priori se estableció un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete comercial Statistic para Windows (Release 6.0; StatSoft, Tulsa, OK, USA).

El análisis de relación dosis/efecto se realizó mediante el método de regresión lineal y correlación utilizando el programa Origin 8.0 (Origin Lab Corporation; USA, Version 8).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los efectos de la administración de dosis orales únicas de D-005 (5-100 mg/kg) sobre los niveles séricos de las transaminasas (ALT y AST). Los animales del grupo control positivo (con CCl₄) alcanzaron valores significativamente superiores con respecto a los animales del grupo control negativo (sin daño). Las dosis de D-005 comprendidas entre 25 y 100 mg/kg redujeron marcada y significativamente la actividad de ambas enzimas, mientras la dosis de 5 mg/kg no produjo efectos significativos sobre estas variables. El efecto fue dependiente de la dosis sobre ALT ($r=0,9841$ y $p=0,015$) y AST ($r=0,9565$ y $p=0,043$) donde en esta última la dosis efectiva media (DE₅₀) fue de 17,6 mg/kg. Por su parte, la sustancia de referencia (ESU; 250 mg/kg) también redujo de modo marcado y significativo las concentraciones de ALT y AST.

Las Tablas 2 y 3 resumen los efectos del D-005 sobre los niveles de MDA y grupos SH en plasma y tejido hepático, respectivamente. El grupo control positivo mostró un incremento significativo sobre ambas variables respecto al grupo control negativo tanto en plasma como en tejido hepático. El D-005 redujo marcada y significativamente los valores de MDA y de grupos SH a las dosis comprendidas entre 25 y 100 mg/kg, si bien la dosis de 5 mg/kg no modificó estos valores. Sin embargo, el efecto sobre MDA en plasma resultó dependiente de la dosis ($r=0,9583$ y $p=0,042$) siendo la $DE_{50}=13,2$ mg/kg. Por su parte, el ESU (sustancia de referencia) redujo de modo marcado y significativo los niveles de MDA y de grupos SH tanto en plasma como en tejido hepático.

Tabla 1. Efectos del D-005 sobre las concentraciones séricas de las transaminasas

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	ALT (U/L)	I (%)	AST (U/L)	I (%)
Control negativo (Vehículo)	-	35,2 ± 1,48****	-	68,7 ± 1,96****	-
Control positivo (Vehículo + CCl ₄)	-	61,7 ± 4,94	-	110,1 ± 5,45	-
D-005 + CCl ₄	5	58,9 ± 3,65	10,6	101,5 ± 5,65	20,8
D-005 + CCl ₄	25	47,1 ± 1,32*	55,1	90,7 ± 6,67*	46,9
D-005 + CCl ₄	50	41,0 ± 2,18**	78,1	75,7 ± 4,52**	83,1
D-005 + CCl ₄	100	40,0 ± 1,87**	81,9	75,8 ± 4,02**	82,9
ESU + CCl ₄	250	39,3 ± 2,47***	84,5	72,3 ± 3,65***	91,3

ALT alanino aminotransferasa; AST aspartato aminotransferasa; CCl₄ tetracoloruro de carbono; ESU extracto de semilla de uva; I Inhibición Media ± EEM (error estándar de la media) * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.001$. Comparación vs grupo Control Positivo Test de la U de Mann Whitney

Tabla 2. Efectos del D-005 sobre los niveles plasmáticos de MDA y grupos SH

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (μmol/mL)	I (%)	-SH- (mmol/L)	I (%)
Control negativo (Vehículo)	-	31,22 ± 1,89****	-	0,27 ± 0,03***	-
Control positivo (Vehículo + CCl ₄)	-	62,80 ± 6,23	-	0,69 ± 0,09	-
D-005 + CCl ₄	5	60,61 ± 5,87	6,9	0,67 ± 0,07	4,8
D-005 + CCl ₄	25	42,29 ± 6,03*	64,9	0,40 ± 0,05*	69,0
D-005 + CCl ₄	50	36,17 ± 3,28**	84,3	0,36 ± 0,05**	78,6
D-005 + CCl ₄	100	36,73 ± 3,78**	82,5	0,36 ± 0,04**	78,6
ESU + CCl ₄	250	31,60 ± 2,35***	98,9	0,32 ± 0,04***	88,1

CCl₄ tetracoloruro de carbono; ESU extracto de semilla de uva; I Inhibición; MDA malondialdehído; -SH- grupos sulfhidrilos Media ± EEM (error estándar de la media) * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.001$. Comparación vs grupo Control Positivo Test de la U de Mann Whitney.

Tabla 3. Efectos del D-005 sobre los niveles de MDA y grupos SH en homogenato de hígado

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA ($\mu\text{mol/mL}$)	I (%)	-SH- (mmol/L)	I (%)
Control negativo (Vehículo)	-	$4,60 \pm 0,05^{****}$	-	$0,45 \pm 0,05^{****}$	-
Control positivo (Vehículo + CCl_4)	-	$28,11 \pm 0,16$	-	$0,89 \pm 0,06$	-
D-005 + CCl_4	5	$26,70 \pm 0,03$	6,0	$0,82 \pm 0,04$	15,9
D-005 + CCl_4	25	$20,72 \pm 0,11^{***}$	31,4	$0,72 \pm 0,02^{**}$	39,5
D-005 + CCl_4	50	$10,75 \pm 0,07^{***}$	73,8	$0,57 \pm 0,02^{**}$	72,7
D-005 + CCl_4	100	$10,76 \pm 0,07^{***}$	73,8	$0,58 \pm 0,05^{**}$	70,4
ESU + CCl_4	250	$5,03 \pm 0,07^{***}$	98,2	$0,52 \pm 0,01^{***}$	84,1

*CCl₄ tetracloruro de carbono; ESU extracto de semilla de uva; I Inhibición; MDA malondialdehído; -SH- grupos sulfhidrilos Media \pm EEM (error estándar de la media) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$. Comparación vs grupo Control Positivo Test de la U de Mann Whitney.*

DISCUSION

En este trabajo se evaluaron los efectos del D-005, administrado como dosis orales únicas (5-100 mg/kg), sobre el incremento de marcadores de peroxidación lipídica (MDA) y oxidación proteica (grupos SH) inducidos por CCl_4 en ratas.

Como se esperaba el grupo control positivo mostró un aumento significativo en la actividad de las transaminasas séricas, lo que demuestra que hubo un daño a nivel del tejido hepático que afectó su funcionalidad. Además, se incrementaron los niveles de MDA y los grupos SH en plasma y homogenatos de hígado con respecto al grupo control negativo. El incremento de los niveles de MDA y grupos SH observado en este estudio concuerda con reportes previos de la relación entre estas variables y la hepatotoxicidad inducida por CCl_4 , ya que la generación del radical triclorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) el cual reacciona rápidamente con el oxígeno formando el radical peróxido triclorometil ($\text{CCl}_3\text{COO}\cdot$) es capaz de atacar los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y desencadenar la peroxidación lipídica y/o dañar las proteínas que presentan en su estructura grupos SH (León *et al.* 2005; Favari *et al.* 2013). Por este motivo, el empleo del CCl_4 como inductor del estrés oxidativo constituye un modelo experimental validado y ampliamente utilizado para evaluar sustancias con posibles efectos antioxidantes (Favari *et al.* 2013; Adewale *et al.* 2014; Laouar *et al.* 2017; Goodla *et al.* 2019). Por su parte, el ESU, sustancia de referencia, redujo marcada y significativamente todas las variables analizadas, corroborando así sus efectos antioxidantes y hepatoprotectores demostrados anteriormente. (Belviranli *et al.* 2015; Hassan *et al.* 2016; Katsuda *et al.* 2015; Khazri *et al.* 2016).

Estos resultados son similares a los reportes de otros autores, y por ello le confieren validez al modelo experimental y a los hallazgos obtenidos en este estudio sobre los efectos del D-005.

El D-005 redujo de modo marcado y significativo el incremento de la actividad de la ALT y AST, inducido por CCl_4 , siendo 25 mg/kg la dosis mínima efectiva para ambas variables ya que la dosis de 5 mg/kg no produjo efectos significativos. Por su parte, la dosis de 100 mg/kg alcanzó el mayor porcentaje de inhibición (81,9 %) sobre la actividad de la ALT, mientras que el efecto alcanzado sobre la AST con la misma dosis (82,9 %) no fue superior al alcanzado con 50 mg/kg (83,1 % de inhibición) por lo que esta se comportó como la dosis

máxima efectiva sobre esta variable. Este resultado demuestra el efecto hepatoprotector del D-005 ante el daño inducido por el CCl₄.

De modo similar, el D-005 (5-100 mg/kg) previno de modo marcado y significativo el incremento de los niveles de MDA y grupos SH inducidos por CCl₄ en plasma y homogenato de hígado, siendo 25 mg/kg la dosis mínima efectiva ya que 5 mg/kg no produjo efectos significativos sobre estas variables. La dosis de 50 mg/kg alcanzó los mayores porcentajes de inhibición, comportándose como la dosis máxima efectiva.

Los resultados obtenidos sugieren que el D-005 a las dosis ensayadas produce un efecto beneficioso significativo sobre el estrés oxidativo y el daño hepático inducido por CCl₄, que pudiera estar dado por el ya conocido efecto antioxidante de los ácidos grasos que están presentes en el D-005, (González *et al.* 2015; Sierra *et al.* 2015) como por ejemplo se reporta que los ácidos palmítico, oleico y linoleico, son capaces de secuestrar *in vitro* los radicales libres e *in vivo* de inhibir la peroxidación lipídica. (Chan *et al.* 1996; Steenkamp *et al.* 2006, Wang *et al.* 2010; Menéndez *et al.* 2005, 2007; Oyarzábal *et al.* 2019)

CONCLUSIONES

El D-005 administrado como dosis orales únicas de 5, 25, 50 y 100 mg/kg protege la peroxidación lipídica y la oxidación proteica, así como el daño hepático inducidos por CCl₄.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adewale, O.B., Adekeye, A.O., Akintayo, C.O., Onikanni, A., & Sabiu, S. (2014) Carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage in experimental Sprague Dawley rats: Antioxidant potential of *Xylopia aethiopica*. *J Phytopharmacol*, 3(2), 118-123.
- Belviranlı, M., Gökbıl, H., Okudan, N., & BÜYÜKBAŞ, S. (2015) Effects of grape seed extract on oxidative stress and antioxidant defense markers in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci*, 45(3), 489-495.
- Brandes, R.P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014) Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *J Mol Cell Cardiol*, 73, 70–79.
- Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S.P. (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 1-6.
- Chan P., Juei-Tang Ch., Chiung-Wen T., Chiang-Shan N. y Chuang-Ye H. (1996) The *in vitro* antioxidant activity of trilinolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. *Life Sciences*, 59: 2067-2073.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., & Vermeulen, N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 202-226.
- Duval, C., Augé, N., Frisach, M.F., Casteilla, L., Salvayre, R. & Nègre-Salvayre, A. (2002) Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase. *Biochem J*, 367, 889–894.
- El-Beshbishy, H.A., Mohamadin, A.M., Nagy, A.A., & Abdel-Naim, A.B. (2010) Amelioration of tamoxifen-induced liver injury in rats by grape seed extract, black seed extract and curcumin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(3), 280-288.
- Favari, L., Arce, C., Ortiz, J., Pérez, S.P., Soto, C., & Meléndez, M.E. (2013) Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 44(4), 53-61.

- Hassan, F.A., Mahrose, K.M. & Basyony, M.M. (2016) Effects of grape seed extract as a natural antioxidant on growth performance, carcass characteristics and antioxidant status of rabbits during heat stress. *Archives of Animal Nutrition*, 70(2), 141-154.
- González, V.L., Sierra, R.; Mas, R., Pérez, Y., Oyarzabal, A., Rodríguez, E., *et al.* (2015) Compounds from the fruits of *Acrocomia crisper* and *Acrocomia aculeata* for use against oxidative stress and inflammation. Cuba. Patent WO 2013189467 <http://www.google.com/patents/wo2013189467A2>
- Goodla, L., Manubolu, M., Pathakoti, K., Jayakumar, T., Sheu, J. R., Fraker, M., *et al.* (2019) Protective effects of *ammannia baccifera* against CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Int J Environ Res Public Health*, 16(8), 1440.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015) Free radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. Published to Oxford Scholarship Online: October
- Hass, M.A., Nowak, D.M., Leonova, E, Levin, R.M. & Longhurst, P.A. (1999) Identification of components of *Prunus africana* extract that inhibit lipid peroxidation. *Phytomedicine*, 6(5), 379-388.
- Chis, I.C., Ungureanu, M.I., Marton, A., Simedrea, R., Muresan, A., Postescu, I.D *et al.* (2009) Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 6(3), 200-204.
- Katsuda, Y., Niwano, Y., Nakashima, T., Mokudai, T., Nakamura, K., Oizumi, S., *et al.* (2015) Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential. *PLoS One*, 10(8), e0134704.
- Khazri, O., Charradi, K., Limam, F., El May, M. V., & Aouani, E. (2016) Grape seed and skin extract protects against bleomycin-induced oxidative stress in rat lung. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 242-249.
- Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J.C. *Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*. 9na Edición. Elsevier España, 2015
- Laouar, A., Klibet, F., Bourogaa, E., Benamara, A., Boumendjel, A., Chefrour, A., *et al.* (2017) Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(3), 263-269.
- León, O.S. 1ra. Biomarcadores redox. Valor diagnóstico y aplicaciones clínicas, 2010.
- León, O.S. Balance antioxidante pro oxidante: salud enfermedad. 2005.
- Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2013) Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(6), 313-319.
- Lushchak, V.I., Semchyshyn, H.M., & Lushchak, O.V. (2012) "Classic" methods for measuring of oxidative damage: TBARS, xyleneol orange, and protein carbonyls. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd. 448-457.
- Marxwell, M.A., Haas, S.M, Beiber, L.L., & Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206-210.
- Menéndez, R., Mas, R., Pérez, Y. & González, R.M. (2007) *In vitro* effect of D-004, a lipid extract of the ground fruits of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*), on rat microsomal lipid peroxidation. *Phytotherapy Research*, 21(1), 89-95.
- Menéndez, R., Más, R., Pérez, Y., González, R.M. & Jiménez, S. (2005) Estudio de los efectos de la administración oral de D-004 (50-800 mg/kg de peso) sobre la peroxidación lipídica en ratas. *Rev CENIC. Cienc Biol*, 36(num. Especial), 28-35.
- Hu, M.L. (1994) Measurement of protein Thiol Groups and Glutathione in plasma. *Methods in enzymology*. 233, 380-382.

- Mohammad, R.M., Afsaneh M.T., Mahmoud B., & Mahmoud R.K. (2016) The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 825–831.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), 477-503.
- Nair, U., Bartsch, H., & Nair, J. (2007) Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(8), 1109–1120.
- Giribabu, N., Kumar, K., Swapna, S., Muniandy, S., & Salleh, N. (2015) *Vitis vinifera* (Muscat Variety) Seed Ethanolic Extract Preserves Activity Levels of Enzymes and Histology of the Liver in Adult Male Rats with Diabetes. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. doi: [10.1155/2015/542026](https://doi.org/10.1155/2015/542026)
- Ohkawa, O., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Oyarábal, A., & Molina, V. (2019) Evidencias preclínicas y clínicas de los efectos beneficiosos del D-004 sobre la hiperplasia prostática benigna. *Rev CENIC. Cienc Biol*, 50(3), 202-212.
- Sehirli, O., Ozel, Y., Dulundu, E., Topaloglu, U., Ercan, F., & Sener, G. (2008) Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytotherapy Research*, 22(1), 43-48.
- Semchyshyn, H.M., & Lozinska, L.M. (2012) Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase. *FEMS Yeast Research*, 12(7), 761–773.
- Sharma, S. K., & Vasudeva, N. (2012) Hepatoprotective activity of *Vitis vinifera* root extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(5), 933–937.
- Sierra, R., González, V.L., Morales, C.L., Marrero, D., Vicente, R., Tamame, D. *et al.* (2015) D-005, nuevo ingrediente activo obtenido a partir de los frutos de *Acrocomia crispera*, Cuba. *Rev CENIC. Cienc. Quím.* 46 (Número especial), 100-101.
- Steenkamp, V., Gouws, M.C., Gulumian, M., Elgorashi, E.E. & Van Staden, J. (2006) Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 71-75.
- Lushchak, V.I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Wang, D., Li, Y. Hou, G., Wang, P. Zhang, J., Laudon, V. *et al.* (2010) *Pygeum africanum*: effect on oxidative stress in early diabetes-induced bladder. *International Urology and Nephrology*, 42(2), 401-408.