

Longitud del ciclo estral en ratas Sprague Dawley tratadas *in útero* con extracto de *Roystonea regia*

Estrus cycle length in Sprague Dawley rats *in uterus* using *Roystonea regia* extract

Ariadne Gutiérrez Martínez^I; Rafael Gámez Menéndez^{II}; Balía Pardo Acosta^{III}; Gisela Marrero Cofiño^{IV}

^I Máster en Ciencias. Investigador Agregado. Centro de Productos Naturales (CNIC), La Habana, Cuba.

^{II} Doctor en Ciencias. Investigador Auxiliar. CNIC, La Habana, Cuba.

^{III} Doctora en Medicina Veterinaria. CNIC, La Habana, Cuba.

^{IV} Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. CNIC, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El D-004 consiste en una mezcla de ácidos grasos que inhibe significativamente la hiperplasia prostática inducida por testosterona en roedores. El objetivo del presente estudio fue evidenciar los posibles efectos adversos sobre el ciclo estral de hembras F1 expuestas *in útero* al D-004. Se utilizaron ratas Sprague Dawley, distribuidas aleatoriamente en 4 grupos: un control y 3 tratados con D-004 a las dosis de 500, 750 y 1 000 mg/kg; las hembras recibieron la administración de la dosis por vía oral desde 15 días antes del apareo y hasta el fin de la lactancia. A una hembra por camada de la generación F1 se le estudió la citología vaginal y se calculó la longitud aproximada del ciclo, la cual no se vio afectada ya que no existieron diferencias significativas ($p= 0,1537$) entre los grupos tratados y el control. Estos resultados indican que el D-004 no reveló alteraciones del ciclo estral de las crías hembras expuestas *in útero*.

Palabras clave: D-004, ácidos grasos, ratas, ciclo estral.

ABSTRACT

D-004 is a mix of fatty acids inhibiting significantly Testosterone- induced prostatic hyperplasia in rodents. The aim of present paper was to demonstrate the potential

side effects on estrus cycle of F1 female rats exposed *in utero* to D-004. We used Sprague Dawley rats, distributed randomly in 4 groups: a control one and another three treated with D-004 at a dosage of 500, 750 and 1 000 mg/kg; in the female rats we administered the dose by mouth from the 15 days before mating, and up to breast feeding termination. In each female rat by litter of F1 generation, the vaginal cytology was studied, and we estimated the approximate length of cycle, remained un-affected since there were not significant differences ($p= 0,1537$) among treatment groups and the control one. These results show that D-004 fails to reveals alterations in the estrum cycle of female litters exposed in uterus.

Key words: D-004, fatty acids, rats, estrum cycle.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un crecimiento anormal y no maligno de la próstata, motivado por el crecimiento celular excesivo de los elementos estromales y glandulares, prevalece en hombres ≥ 50 años y su frecuencia aumenta con la edad.¹

La etiopatología de la HPB, no del todo dilucidada, es multifactorial, y un factor fundamental se debe a los cambios del metabolismo androgénico prostático durante el envejecimiento que favorecen la acumulación de dihidrotestosterona (DHT)² en las células prostáticas por un aumento de la transformación de la testosterona (T) mediada por la enzima 5 α -reductasa.^{1,2}

El tratamiento de la HPB incluye diferentes opciones, la más generalizada, es la terapia farmacológica,^{3,4} para la cual existen los inhibidores de la 5 α -reductasa prostática y los antagonistas α_1 -adrenérgicos. También se usa ampliamente la fitoterapia, en particular los extractos lipídicos del fruto de *Saw palmetto* (*Serenoa repens*).⁵

La palma real (*Roystonea regia*) es la palmácea más abundante en Cuba y presenta similitudes taxonómicas con *Serenoa repens*, por lo cual era muy probable que el extracto lipídico de sus frutos fuese efectivo en modelos de HPB.

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (Arecaceae) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes. El tratamiento oral con D-004 inhibe significativamente la hiperplasia prostática (HP) inducida por T, no por DHT, e inhibe la 5 α -reductasa prostática.⁶⁻⁸

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.^{9,10} Por otra parte, en la batería de ensayos genotoxicológicos con la utilización del método de Ames, el ensayo cometa y el de micronúcleos en médula ósea de roedores no se encontró actividad genotóxica asociada al tratamiento con D-004.¹¹⁻¹³ Por otra parte, fue realizado un ensayo en ratas

ovarectomizadas tratadas con D-004, en el que se utilizó como control positivo estradiol; en este modelo los resultados del tratamiento con D-004 fueron negativos, no manifestándose acción estrogénica ni antiestrogénica en este modelo.¹⁴

Tomando en cuenta los antecedentes planteados se determinaron los efectos potenciales del D-004 sobre la longitud del ciclo reproductivo de las ratas hembras, llamado ciclo estral. Este ciclo dura 4 d aproximadamente y está formado por las fases siguientes: proestro, estro, metaestro (o diestro I) y diestro (o diestro II).¹⁵ La corta duración del ciclo estral en las ratas permite que esta sea una especie ideal para la investigación de los cambios que se producen durante el ciclo reproductivo.¹⁶ En estudios del sistema reproductivo así como investigaciones sobre la influencia del ciclo estral en funciones no reproductivas,^{17,18} la citología del exudado vaginal es usada para la determinación de las fases del ciclo estral.¹⁹ La caracterización de cada fase está basada en la proporción entre los 3 tipos de células observados en el exudado vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos.

El objetivo del presente estudio consistió en evidenciar los posibles efectos adversos del D-004 sobre la capacidad reproductora de las hembras, en específico sobre el ciclo estral de las crías hembras expuestas *in útero* al D-004.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultas jóvenes (6-10 semanas) de uno y otro sexos procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), de peso corporal entre 150 y 200 g.

Los animales se colocaron en jaulas y se adaptaron durante 7 días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 25 ± 2 °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, 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 1-2 h antes de la administración, y se realizaron los ajustes de las dosis según el peso corporal semanal.

La sustancia 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 posparto), ya que este esquema simula el consumo humano durante un ciclo reproductivo completo. El tratamiento se administró una vez al día (5 d x semana) entre 8:30 y 10:30 a.m.

Grupos experimentales

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales: un control, tratado solo con el vehículo tween 65 (2 %) y 3 tratados con D-004 a las dosis de 500, 750 y 1 000 mg/kg respectivamente. De cada grupo fue seleccionada una hembra de cada camada a la cual se realizó el exudado vaginal. Los animales no seleccionados fueron sacrificados.

Exámenes realizados

Al llegar a las 8 semanas (edad de madurez sexual), la secreción vaginal fue colectada cada mañana durante 12 d, lo que garantizó una muestra de tamaño adecuado para poder observar las fases del ciclo. Para ello se registró la frecuencia relativa de cada una de las fases del ciclo estral teniendo en cuenta que se determinó la fase según la siguiente descripción de los exudados vaginales:

Proestro: predominio de células epiteliales nucleadas.

Estro: presencia de células epiteliales anucleadas fundamentalmente.

Metaestro: existe la misma proporción entre leucocitos, células epiteliales nucleadas y células cornificadas.

Diestro: predominio de leucocitos.

Fue observado al microscopio el material sin teñir, inmediatamente después de realizar el exudado.

Con el fin de obtener indicadores tempranos de daño en la función reproductiva, se calculó la longitud aproximada del ciclo, tomando como referencia el diestro, contando los días entre que comienza esta y su próxima aparición.

En los casos donde hubo ciclicidad en una parte del período y luego se perdió, se anotó la longitud del ciclo cuando lo hubo y se hizo constar que posteriormente se interrumpió.

Al no existir homogeneidad de varianza en la longitud del ciclo estral, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los efectos de los tratamientos eran similares. Para el análisis de la frecuencia de ratas hembras con el ciclo estral posteriormente interrumpido se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher.

El análisis estadístico se realizó con el paquete de programas STATISTICA, StatSoft, Inc. (2003), version 6. <http://www.statsoft.com>, y el nivel de significación establecido fue α 0,05.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que la longitud del ciclo estral no se vio afectada en las hembras de la generación F1 ya que no existieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Longitud del ciclo estral de las hembras F1 (días)

	Control	D-004 (mg/kg)		
		500	750	1 000
Longitud	5,25 ± 0,77 ^a (16)	4,79 ± 0,66 (24)	4,76 ± 0,77 (21)	4,71 ± 0,85 (17)

^a Media ± desviación estándar (número de hembras)

Pocas ratas presentaron ciclos irregulares (dos en cada grupo, excepto en 750 mg/kg que fue solo una), en algunos casos esta irregularidad se caracterizó por mantener la misma fase durante 4-5 d. También se consideraron irregulares aquellos ciclos que no siguieron la secuencia: proestro, estro, metaestro y diestro. La longitud del ciclo estral fue de 4-5 d en más del 90 % de las ratas hembras, de las cuales alrededor del 23 % se le interrumpió posteriormente el ciclo. Esto ocurrió de manera similar en todos los grupos ([tabla 2](#)).

Tabla 2. Frecuencia de ratas hembras con el ciclo estral posteriormente interrumpido

	Control	D-004 (mg/kg)		
Dosis		500	750	1 000
Frecuencia	3/16	9/24	6/21	0/17

DISCUSIÓN

Algunos parámetros reproductivos en animales son de gran sensibilidad en experimentos toxicológicos. De ellos, el ciclo estral es de particular interés ya que puede brindar información acerca de la respuesta del órgano reproductivo y del entorno hormonal que influye sobre el ciclo. De ahí que los resultados obtenidos sustentan resultados previos, donde el D-004 no mostró actividad estrogénica ni antiestrogénica en un modelo de ratas ovariectomizadas.¹⁴

Por otra parte, se puede afirmar que la ausencia de efecto no debe estar relacionada con la no exposición en útero ya que es conocido que la placenta actúa como una barrera que deja pasar de forma selectiva los distintos nutrientes ajustándose perfectamente a las necesidades del nuevo feto, y durante el período prenatal los ácidos grasos no son sintetizados en la placenta, llegan al feto atravesando la barrera placentaria.²⁰

La administración oral de D-004 a ratas SD de ambos sexos no reveló alteraciones del ciclo estral de las crías hembras expuestas *in útero* al D-004, a ninguno de los niveles de dosis empleados.

En conclusión, la administración oral de D-004 a ratas Sprague Dawley de uno y otro sexos no reveló alteraciones del ciclo estral de las crías hembras expuestas *in útero* al D-004, a ninguno de los niveles de dosis empleados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clinton JJ. Benign prostatic hyperplasia (BPH)-diagnosis and treatment. JAMA. 1994;271:151-2.
2. Mc Carthy M. BPH guidelines. Lancet. 1994;343:473-4.
3. Oesterling JE. Benign Hyperplasia: Medical and minimally invasive treatment options. New Engl J Med. 1995;332:99-109.
4. Geller J, Kirschenbaum A, Lepor H, Levine AC. Therapeutic controversies: clinical treatment of benign prostatic hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80:745-56.
5. Boyle P, Robertson C, Lowe F, Roehrborn C. Updated meta-analysis of clinical trials of Serenoa repens extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. BJU Int. 2004;93(6):751-6.
6. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, 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;30:227-34.
7. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Rodríguez E, 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.
8. Arruzazabala ML, Más R, Molina V, Noa M, Carbajal D, 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.
9. Gámez R, Más 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(3):101.
10. Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, et al. Toxicología aguda del D-004 en conejos. Revista CENIC, Ciencias Biológicas. 2007;38(2):99-102.
11. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el ensayo de Ames por incorporación directa a placa. Revista CENIC, Ciencias Biológicas. 2005;36(Especial).
12. Marrero G, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, 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(3)200-3.

13. Gutiérrez A, Fernández I, Gámez R, 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).
14. Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Noa M, Más R, Goicochea E, et al. Evaluation of D-004 in Mature Ovariectomized Rat Uterotrophic Assays. *Lat Am J Pharm*. 2008; 27(5): 710-5.
15. Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E & Neil J. (eds.). *Physiology of reproduction* New York: Raven Press; 1988. p. 1893-928.
16. Marcondes FK, Miguel K, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav* 2001; 74(4-5): 435-40.
17. Rodríguez MLV, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995; 73: 602-7.
18. Chateau D, Geiger JM, Samama B, Boehm N. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity. *Skin Pharmacol*. 1996; 9: 9-16.
19. Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology*. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1975: 260-5.
20. Bourre J. Roles of Unsaturated Fatty Acids (Especially Omega-3 Fatty Acids) in the Brain at Various Ages and during Ageing. *J Nutr Health Aging*. 2004; 8(3): 163-74.

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aprobado: 7 de abril de 2009.

M.C. *Ariadne Gutiérrez Martínez*. Centro de Productos Naturales (CNIC). Calle 198 e/ 21 y 19 , Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu