

**PRODUCTOS NATURALES**

**Efecto del D-004, un extracto del fruto de *Roystonea regia* y omega-3 en el modelo de nado forzado en ratones**

**Effect of D-004, a fruit extract from *Roystonea regia* and Omega-3 in a model of forced swimming in mice**

**Daisy Carbajal Quintana<sup>I</sup>; Yazmín Ravelo Calzado<sup>II</sup>; Vivian Molina Cuevas<sup>III</sup>; Rosa Más Ferreiro<sup>III</sup>; María de Lourdes Arruzazabala Valmaña<sup>IV</sup>**

<sup>I</sup>Licenciada en Biología. Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Productos Naturales. CNIC. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Licenciada en Bioquímica. Centro de Productos Naturales. CNIC. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup>Doctora en Medicina. Centro de Productos Naturales. CNIC. La Habana, Cuba.

---

**RESUMEN**

La depresión se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad de la población adulta y su manejo farmacológico incluye, entre otras opciones alternativas, el uso de la medicina complementaria, como es el caso del aceite de pescado rico en ácidos grasos omega-3 (AG $\omega$ 3). El D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*) que consiste en una mezcla de ácidos grasos, ha mostrado poseer una moderada acción antidepresiva. El objetivo de este trabajo consistió en comparar los efectos del tratamiento oral con D-004, con los AG $\omega$ 3 y con su terapia combinada en el modelo del nado forzado en ratones. Para ello, ratones machos se distribuyeron en 8 grupos: uno control tratado con el vehículo, dos con D-004 (250 y 500 mg/kg), dos con AG $\omega$ 3 (250 y 500 mg/kg), dos con la combinación y uno con imipramina (10 mg/kg i.p.). Todos los tratamientos disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad con respecto al control, sin diferencias entre dosis similares de los respectivos tratamientos. En conclusión, el D-004, los AG $\omega$ 3 y su terapia combinada resultaron igualmente efectivos en reducir el tiempo de inmovilidad de los ratones, sin manifestarse efectos aditivos o sinérgicos con la administración conjunta de ambas sustancias.

**Palabras clave:** D-004, ácidos grasos omega-3, *Roystonea regia*, depresión, nado forzado.

---

## ABSTRACT

Depression is among the major causes of morbidity and mortality of adult population and its pharmacologic management includes among other alternative options, the use of the complementary medicine, e.g. the fish oil rich in Omega-3 fatty acids (AG $\omega$ 3). The D-004, a lipid extract of Real Palm fruits (*Roystonea regia*) consisting of a fatty acid mixture, has a moderate antidepressant action. The aim of present paper was to compare the effects of oral treatment using D-004 with the AG $\omega$ 3 and with its combined therapy in forces swimming in mice. Thus, the male mice were distributed into 8 groups: one as control treated with vehicle, two with D-004 (250 and 500 mg/kg), two with AG $\omega$ 3 (250 and 500 mg/kg), two with the combination, and another with imipramine (10 mg/kg i.p.). All treatments decreased significantly the immobility time regarding the control, without differences among similar dose of respective treatments. We conclude that D-004, the AG $\omega$ 3 and its combined therapy were similarly effective to reduce the immobility time in mice without additive or synergic effects with the combined administration of both substances.

**Key words:** D-004, Omega-3 fatty acids, *Roystonea regia*, depression, forced swimming.

---

## INTRODUCCIÓN

La depresión se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad de la población adulta cuya frecuencia ha ido en aumento en las últimas décadas. Se observa una disminución de la edad de los individuos que presentan depresión; se estima que aproximadamente entre un 10 y 20 % de los pacientes que concurren a las consultas clínicas presentan algún grado de depresión.<sup>1</sup> Además, la depresión es un importante factor de riesgo coronario primario y secundario<sup>2</sup> y se relaciona con una alta frecuencia (40-80 %) de casos de suicidio.<sup>1</sup>

Diversas causas desencadenan la depresión y existen diferentes tratamientos para su manejo, pero su contribución como problema de salud ha ido en ascenso por diversas razones, entre ellas la falta de tratamiento adecuado en los periodos de recaída.<sup>3</sup> Por tal razón, se continúan investigando los factores que propician la persistencia de esta enfermedad, en particular los relacionados con el estilo de vida; se ha planteado que aspectos nutricionales pueden influir en su desarrollo. Entre ellos, una dieta rica en ácidos grasos omega-3 (AG $\omega$ 3) ha sido asociada a una reducción del riesgo de padecer depresión,<sup>4</sup> mientras que su deficiencia se relaciona con trastornos depresivos y con un riesgo aumentado de homicidio, suicidio e integración social subóptima.<sup>5</sup>

Por otra parte, diversos estudios experimentales y clínicos han referido el efecto beneficioso del tratamiento con AG $\omega$ 3 en el manejo de la depresión y otros desórdenes psiquiátricos,<sup>6-11</sup> y en particular, estos efectos han sido demostrados en el ensayo del nado forzado en roedores,<sup>12</sup> un clásico modelo experimental para evaluar la actividad antidepressiva de una sustancia.<sup>13,14</sup>

El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), constituido por una mezcla de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, láurico, linoleico y mirístico, que previene la hiperplasia prostática (HP) inducida por testosterona y fenilferina en roedores,<sup>15-17</sup> entre cuyos mecanismos se incluye la inhibición de la 5  $\alpha$ -reductasa prostática.<sup>18</sup> Ya que ha sido referido que los inhibidores de esta enzima pueden inducir depresión,<sup>19</sup> un trabajo previo investigó si el D-004 podía reforzar conductas depresivas en roedores, encontrando, en cambio, que producía un moderado efecto antidepressivo.<sup>20</sup>

Conforme a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo consistió en comparar los efectos de los AG $\omega$ 3 de aceite de pescado, el D-004 y su terapia combinada en el modelo de nado forzado en ratones.

## MÉTODOS

**Animales.** Ratones OF1 machos de peso corporal entre 30 y 35 g fueron suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) y se adaptaron a las condiciones de laboratorio (temperatura 25  $\pm$  3  $^{\circ}$ C, humedad relativa 60  $\pm$  5 %, ciclos luz/oscuridad de 12 h) durante 7 días. El alimento (pienso para roedores CENPALAB, La Habana, Cuba) y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

El estudio fue conducido de acuerdo con las regulaciones cubanas vigentes sobre el uso de animales de laboratorio, así como a las Buenas Prácticas de Laboratorio y a los Procedimientos para el manejo de los animales del Centro de Productos Naturales (CPN). Un Comité de Ética independiente aprobó el uso de los animales en este estudio.

### Administración y dosificación

El D-004 fue obtenido en el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales (CPN, La Habana, Cuba) y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. El D-004 está compuesto por ácidos grasos, como oleico, palmítico, láurico, y mirístico entre los mas abundantes y el linoleico, linolénico, caprílico, cáprico, palmitoleico y esteárico en menor proporción. El AG $\omega$ 3 (Rainbow and Nature Pty Ltd, Australia) está compuesto por ácido docosahexanoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA). Ambos se suspendieron en Tween 65-H<sub>2</sub>O (2 %), mientras la imipramina (Imefa, Cuba), sustancia de referencia, se preparó en goma acacia/agua (1 %).

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos (11 animales/grupo): un grupo control que recibió el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O, dos tratados con D-004 (250, 500 mg/kg), dos con AG $\omega$ 3 (250, 500 mg/kg), dos con la terapia D-004 más AG $\omega$ 3 (ambos a 250 mg/kg) y D-004 más AG $\omega$ 3 (ambos a 500 mg/kg) y un grupo con imipramina (20 mg/kg). Excepto la imipramina, la cual se inyectó por vía i.p. 30

min previos al ensayo, según referencias previas, los otros tratamientos se administraron por vía oral, mediante entubación gástrica, durante 10 días.<sup>11, 20</sup>

### **Efectos sobre la conducta de nado forzado**

Los animales se colocaron en un cilindro de cristal de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, que contenía agua a una altura de 6 cm.<sup>13</sup> Transcurridos los primeros 2 min de actividad vigorosa, se registró la duración de la inmovilidad de los ratones en los 4 min siguientes empleando un cronómetro digital (precisión 1 s). El tiempo de inmovilidad registrado en segundos, fue aquel en que los ratones permanecían flotando, realizando solo movimientos ligeros que les permitieran mantener la cabeza fuera del agua.

### **Análisis estadístico**

Las comparaciones entre grupos se realizaron con el ensayo de Kruskal Wallis (comparaciones entre todos los grupos) y la prueba de la U de Mann Whitney (comparaciones vs. grupo control); se utilizó el paquete de programas Statistics para Window (Release 4.2; StatSoft Inc, USA).

## **RESULTADOS**

El tratamiento oral con dosis repetidas de D-004 (250 y 500 mg/kg) disminuyó el tiempo de inmovilidad de los ratones con respecto al control negativo en un 36 % y un 25 %, respectivamente ([tabla](#)), mientras la administración de AG $\omega$ 3 (250 y 500 mg/kg) produjo similares reducciones 31 y 24 %, respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre dosis similares del D-004 y el AG $\omega$ 3. El tratamiento con la terapia combinada también redujo significativamente el tiempo de inmovilidad, si bien los efectos no fueron superiores a los observados con similares dosis de cada terapia independiente.

La imipramina (20 mg/kg i.p.), utilizada como fármaco de referencia, disminuyó el tiempo de inmovilidad en un 45 %.

## **DISCUSIÓN**

El presente estudio demuestra que el tratamiento oral con D-004 y con AG $\omega$ 3, ambos administrados a dosis de 250 y 500 mg/kg durante 10 días, redujeron moderadamente (inhibición inferior al 50 %) el tiempo de inmovilidad de los ratones en el ensayo de nado forzado, que los efectos de similares dosis de ambos tratamientos fueron comparables y que la terapia combinada con ambas sustancias no modificó la magnitud de estos efectos. Si bien se observa un menor efecto con la administración de dosis superiores, resulta evidente que la dosis de 250 mg/kg produce un efecto máximo, ya que una dosis superior no mostró una inhibición mayor del tiempo de inmovilidad como podría esperarse. Por otra parte, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas dosis de ninguno de los agentes evaluados. Los efectos del D-004 y de los AG $\omega$ 3 aquí mostrados son consistentes con reportes previos que han demostrado los efectos antidepresivos de ambas sustancias en este modelo, ya que los AG $\omega$ 3 reducen el tiempo de inmovilidad de los ratones y similares resultados se obtuvieron con el D-004, el cual

produjo un moderado efecto antidepresivo, lo que disminuye el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado y en el de suspensión por la cola en ratones, sin afectar la actividad exploratoria, la fuerza de agarre y la ejecución en varilla rotatoria.<sup>20,21</sup> Este estudio compara por primera vez los efectos de ambas sustancias y demuestra que con similares dosis y esquema de tratamiento los efectos que producen en este modelo no difieren entre sí.

Por otra parte, la administración conjunta de ambas sustancias a las 2 dosis ensayadas (250 y 500 mg/kg) no modificó la respuesta, lo que descarta que a estas dosis se produzcan efectos de reforzamiento de la eficacia (aditivos o sinérgicos) o efectos antagónicos.

Los mecanismos involucrados en los efectos de los AG $\omega$ 3 en la etiología y tratamiento de la depresión son controversiales. Así, el ácido docosahexaenoico (DHA) desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la estructura y función cerebral, su deficiencia se vincula a una reducción del contenido de las prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico y en consecuencia, a una disminución de los factores neurotróficos o a alteraciones del flujo cerebral que propician la depresión.<sup>22,23</sup> No obstante, también se ha asociado a una reducción del número de receptores a la serotonina, neurotransmisor implicado en los estados de ánimo,<sup>24</sup> ya que ha sido demostrado que un adecuado consumo de AG $\omega$ 3 puede ayudar a prevenir los síntomas de la depresión por suministrar al cerebro este importante mediador.

Aunque no existe una explicación por la que el D-004 produzca el efecto antidepresivo observado en el modelo de nado forzado y en el de suspensión por la cola, resultado obtenido al tratar de evaluar un posible reforzamiento de la conducta depresiva,<sup>21</sup> se ha considerado como plausible relacionarlo con su contenido de ácido láurico, uno de los componentes más abundantes del D-004, ya que ha sido reportado que altas concentraciones de este ácido graso se asocian con bajo riesgo de depresión.<sup>25</sup>

Considerando que los mecanismos que justificaran los efectos antidepresivos de ambas sustancias eran diferentes, al desarrollar este estudio esperamos que la terapia combinada con D-004 y AG $\omega$ 3 pudieran producir un efecto al menos aditivo, lo que no se encontró a las dosis ensayadas, si bien no podemos descartar que se produzca al ensayar dosis menores, por lo cual experiencias ulteriores deberán evaluar esta posibilidad así como profundizar en los mecanismos que sustentan el efecto antidepresivo del D-004.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rouillon F. Epidemiology of mood disorders. *Rev Prat.* 2008;58:361-365.
2. Blumenthal JA. Depression and coronary heart disease: association and implications for treatment. *Cleve Clin J Med.* 2008;75 Suppl 2:S48-53.
3. Andrews G. Reducing the burden of depression. *Can J Psychiatry.* 2008;53:420-7.

4. Kamphuis MH, Geerlings MI, Tijhuis MA, Kalmijn S, Grobbee DE, Kromhout D. Depression and cardiovascular mortality: a role for n-3 fatty acids? *Am J Clin Nutr.* 2006; 84: 1513-7.
5. Hibbeln JR. From homicide to happiness —a commentary on omega-3 fatty acids in human society. Cleve Award Lecture. *Nutr Health.* 2007; 19: 9-19.
6. Williams AL, Katz D, Ali A, Girard C, Goodman J, Bell I. Do essential fatty acids have a role in the treatment of depression? *J Affect Disord.* 2006; 93: 117-23.
7. Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH. Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 2002; 159: 477-9.
8. Su KP, Huang SY. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003; 13: 267-71.
9. Sublette ME, Hibbeln JR, Galfalvy H, Oquendo MA, Mann JJ. Omega-3 polyunsaturated essential fatty acid status as a predictor of future suicide risk. *Am J Psychiatry.* 2006; 163: 1100-2.
10. da Silva TM, Munhoz RP, Álvarez C, Naliwaiko K, Kiss A, Andreatini R, et al. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. *J Affect Disord.* 2008; 111(2-3); 351-9.
11. Lakhwani L, Tongia SK, Pal VS, Agrawal RP, Nyati P, Phadnis P. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. *Acta Pol Pharm.* 2007; 64: 271-6.
12. Fedorova I, Salem NJr. Omega-3 fatty acids and rodent behaviour Prostagl. *Leukotr & Essential Fatty Acids.* 2006; 75: 271-89.
13. Porsolt RD, Anton G, Deniel M, Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978; 47: 379-91.
14. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology.* 1984; 83: 1-16.
15. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R. 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 Clin & Exptl.* 2004; 65: 505-14.
16. Noa M, Arruzazabala ML, Carbajal, D. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Int J Tiss React.* 2005; 198: 203-12.
17. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exptl Clin Res.* 2005; 31: 193-7.

18. Pérez Y, Menéndez R, Mas R, González R. In vitro effect of D-004, a lipid extract from the Cuban Royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on the activity of prostate steroid 5-alpha reductase. *Curr Ther Res Clin &Exptl*. 2006;67: 396-405.
19. Rahimi-Ardabili B, Pourandarjani R, Habibollahi P, Mualeki A. Finasteride induced depression: a prospective study. *BMC Clin Pharmacol*. 2006;6: 7.
20. Carbajal D, Ravelo Y, Molina V, Mas R, Arruzazabala ML. D-004, a lipid extract from royal palm fruit, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Physiol Biochem Behav*. 2009;92(3):465-8.
21. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Efecto del D-004 sobre patrones conductuales en roedores. *Rev CNIC*. 2007;38:12-7.
22. Stahl LA, Begg DP, Weisinger RS, Sinclair AJ. The role of omega-3 fatty acids in mood disorders. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9:57-64.
23. Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry*. 2003;48:195-203.
24. Logan AC. Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. *Altern Med Rev*. 2003;8:410-25.
25. Irmisch G, Schläfke D, Richter J. Relationships between fatty acids and psychophysiological parameters in depressive inpatients under experimentally induced stress. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006;74(2):149-56.

Recibido: 18 de septiembre de 2009.  
Aprobado: 21 de octubre de 2009.

Dra. C. *Daisy Carbajal Quintana*. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Ave 25 y 158, Cubanacán, Playa. CP 6990, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [cpn.sup@cnic.edu.cu](mailto:cpn.sup@cnic.edu.cu)

**Tabla.** Efecto del D-004 en el modelo de nado forzado en ratones

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (s)	Inhibición (%)
Control	0	11	164,5 ± 8,0	-
D-004	250	10	105,4 ± 14,0**	36
D-004	500	11	123,2 ± 10,7*	25
AGω3	250	11	113,0 ± 13,0*	31
AGω3	500	12	125,4 ± 8,0**	24
D-004 más AGω3	250 más 250	12	110,6 ± 11,8*	33
D-004 más AGω3	500 más 500	13	121,8 ± 10,2*	26
Imipramina	10	12	90,5 ± 8,7***	45

Los valores se expresan como Media ± desviación estándar.

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. Comparación con el grupo control.

Prueba de la U de Mann Whitney.