

Efecto secuestrador del D-002 sobre radicales hidroxilo en mucosa gástrica

Scavenger effect of D-002 on hydroxyl radicals in the gastric mucosa

Dra. C. Yohani Pérez Guerra, MSc. Ambar Oyarzábal Yera, Téc. Sonia Jiménez Despaigne Dra. C. Vivian Molina Cuevas, Dra. C. Rosa Mas Ferreiro

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el agente causal de la ulceración gástrica está asociado al desequilibrio entre factores agresivos y defensivos que actúan sobre la mucosa gástrica. El D-002, mezcla de seis alcoholes alifáticos primarios superiores purificada de la cera de abejas, produce efectos gastroprotectores mediados por múltiples mecanismos y reducción de la peroxidación lipídica en la mucosa gástrica.

Objetivo: determinar si el D-002 es capaz de capturar el radical hidroxilo añadido *in vitro* o generado *in vivo* en ratas con úlcera gástrica inducida por indometacina.

Métodos: En la experiencia *in vitro* el D-002 se añadió a concentraciones entre 0,9 y 1 000 µg/mL. En la experiencia *in vivo* las ratas se distribuyeron en seis grupos: un control negativo y cinco que recibieron indometacina: un control positivo tratado con el vehículo, tres con D-002 (5, 25, y 100 mg/kg, respectivamente, p.o.) y otro con omeprazol (20 mg/kg i.p.). Los tratamientos se administraron una hora (vehículo y D-002) o 30 min (omeprazol), respectivamente, antes de inducir las úlceras. En ambas experiencias se tomaron alícuotas de mucosa gástrica, y se determinó el daño a la 2-desoxirribosa por el radical hidroxilo.

Resultados: la administración oral del D-002, no *in vitro*, protegió a la 2-desoxirribosa del daño oxidativo de modo marcado, significativo y dependiente de la dosis con respecto al control positivo.

Conclusiones: los resultados indican que la capacidad del D-002 (25 y 100 mg/kg) administrado por vía oral para secuestrar el radical hidroxilo, generado en la mucosa gástrica por la indometacina, pudiera contribuir a sus efectos antioxidantes y gastroprotectores sobre el daño que los antiinflamatorios no esteroideos producen sobre la mucosa gástrica.

Palabras clave: D-002, radical hidroxilo, mucosa gástrica, úlceras gástricas, úlcera por indometacina.

ABSTRACT

Introduction: the etiology of the gastric ulceration is associated to the imbalance between aggressive and defensive factors acting upon the gastric mucosa. D-002, a mixture of 6 higher primary alcohols purified from the beeswax, cause some multiple mechanism-mediated gastroprotective effects and decrease of lipid peroxidation in the gastric mucosa.

Objective: to determine whether D-002 can scavenge the *in vivo* added or *in vivo* generated hydroxyl radical in rats with indometacin-induced gastric ulcer or not.

Methods: For the *in vitro* experiment, D-002 was added at concentrations 0.9 and 1 000 µg/mL For the *in vivo* experiment, the rats were randomized into 6 groups: one negative control, and five indometacin-treated groups as follows a positive excipient-treated control, three under D-002 treatment (5, 25 or 100 mg/kg, respectively, p.o.), and another group treated with Omeprazole (20 mg/kg i.p.). These lines of treatment were given 1 hour (excipient and D-002) or 30 min (Omeprazole) prior to inducing the ulcers. In both experiments, aliquots from the gastric mucosa were taken and the damage infringed to 2-deoxiribose by the hydroxyl radical was determined.

Results: oral administration of D-002, rather than *in vitro* addition, significantly protected 2-desoxiribose from the oxidative damage depending on the dosage as compared to the positive control.

Conclusions: these results indicate that the ability of the orally administered D-002 (25 and 100 mg/kg) to scavenge the hydroxyl radical endogenously generated on the gastric mucosa by indometacin could contribute to its antioxidant and gastroprotective effects against the damage that the non-steroidal anti-inflammatory drugs carry to the gastric mucosa.

Key words: D-002, hydroxyl radical, gastric mucosa, gastric ulcer, indometacin-induced ulcers.

INTRODUCCIÓN

Ha sido demostrado que la ulceración gástrica no se debe exclusivamente al aumento de la secreción ácida, sino que resulta del desequilibrio entre factores agresivos (antiinflamatorios no esteroideos AINEs, *Helicobacter pylori*, alcohol, estrés) y defensivos (*mucus* gástrico, microcirculación gástrica, prostaglandinas, entre otros) que actúan en la mucosa gástrica.^{1,2} Los factores agresivos pueden causar daño a la mucosa por diferentes mecanismos en los cuales se encuentran involucradas las especies reactivas de oxígeno (EROs) y el aumento de la peroxidación lipídica (PL), con el consiguiente aumento de la formación de radicales hidroxilo radical, extremadamente tóxico por no existir un mecanismo endógeno de defensa antioxidante capaz de eliminarlo directamente.^{3,4}

Los inhibidores de la bomba de protones, medicamentos muy efectivos en el tratamiento de la enfermedad ácido péptica, no deben su eficacia solo a su conocido

efecto antisecretor derivado de la inhibición de la bomba de protones de las células parietales, sino también a su potente acción antioxidante debida al bloqueo del aumento de la generación del radical hidroxilo, y de los procesos asociados de PL y oxidación de proteínas.^{5,6}

Consecuentemente, diversos estudios han demostrado que compuestos con actividad antioxidante reducen la incidencia y severidad del daño gástrico inducido por factores agresivos,^{7,8} en particular, la capacidad de algunos extractos naturales para capturar el radical hidroxilo en el modelo de úlcera gástrica inducida por indometacina, en el cual se producen altas concentraciones.⁹⁻¹¹

El D-002, mezcla de 6 alcoholes alifáticos primarios purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*), contiene triacontanol como principal componente, así como tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, dotriacontanol y tetratriacontanol.¹² Investigaciones preclínicas han demostrado que el D-002 produce efectos gastroprotectores¹³⁻²⁰ mediados por múltiples mecanismos, como el aumento de la secreción del *mucus* gástrico, mejoría de su composición y reducción de la PL en la mucosa gástrica.¹³⁻¹⁵

De acuerdo con la relación entre este último proceso y los radicales hidroxilos, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar si el D-002 es capaz de capturar dicho radical añadido *in vitro* o generado *in vivo* en ratas con úlcera gástrica inducida por indometacina.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos (150-20 g) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio con libre acceso al agua y la comida. Las experiencias se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio vigentes en la República de Cuba y los procedimientos del Centro de Productos Naturales (CPN).

Administración y dosificación

El D-002, suministrado por las Plantas de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba) y el omeprazol (Astra, Suecia) se prepararon en forma de suspensión en un vehículo goma acacia (10 mg/mL). La indometacina (Quimefa, Cuba) se disolvió en solución de bicarbonato de sodio al 5 %.

Después de culminada la cuarentena, las ratas fueron sometidas a un período de 18 h de ayunas con libre acceso al agua previas a la realización de dos experimentos. El primero evaluó los efectos *in vitro* del D-002 sobre el secuestro del radical hidroxilo en un medio de mucosa gástrica de ratas y el segundo evaluó sus efectos *in vivo* sobre el secuestro de este radical en mucosa gástrica de ratas con úlcera inducida por indometacina.

Para el estudio *in vitro* el D-002 se añadió directamente sobre el medio de mucosa gástrica, mientras que para el estudio *in vivo* el D-002 y el vehículo se administraron

mediante entubación gástrica (5 mL/kg de peso), y el omeprazol (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal (i.p.) antes de inducir las úlceras.

Experimento 1: efectos in vitro del D-002 sobre el secuestro del radical hidroxilo en mucosa gástrica

Los animales se sacrificaron mediante eutanasia, para lo cual se anestesiaron en atmósfera de éter y se desangraron por la aorta abdominal. Seguidamente, se les extrajeron los estómagos y se obtuvieron alícuotas de mucosa gástrica que se homogeneizaron en 1 mL de solución salina fisiológica, a las cuales se añadieron directamente el vehículo (control) o el D-002 (0,9; 3,9; 15,6; 62,5; 250; 500 y 1 000 µg/mL).

Experimento 2: efectos in vivo del D-002 sobre radical hidroxilo generado en mucosa gástrica de ratas con úlcera inducida por indometacina.

Las ratas se distribuyeron en seis grupos (10 ratas/grupo): un control negativo y cinco que recibieron indometacina: un control positivo tratado con el vehículo, tres con D-002 (5, 25 y 100 mg/kg, respectivamente, p.o.) y otro con omeprazol (20 mg/kg i.p.). Los tratamientos se administraron 1 h (vehículo y D-002) o 30 min (omeprazol), respectivamente, antes de inducir las úlceras.

Inducción de la úlcera gástrica por indometacina

Las úlceras gástricas se indujeron por administración oral de indometacina (50 mg/kg) mediante entubación gástrica.²¹ Las ratas se sacrificaron 4 h más tarde en atmósfera de éter, se les extrajeron los estómagos, se cuantificaron las lesiones y se obtuvieron las alícuotas de mucosa gástrica.

Cuantificación de las lesiones: se extrajeron los estómagos, se abrieron por la curvatura mayor y se cuantificaron las lesiones en mucosa gástrica midiendo su longitud con una regla en milímetro, bajo una lupa con amplificación 3x. El índice de úlcera se determinó como la suma total de la longitud de las lesiones (en milímetro) por dos observadores independientes que trabajaron a ciegas.¹⁶

Las alícuotas de mucosa gástrica obtenidas de las ratas de ambos experimentos se utilizaron para realizar las siguientes determinaciones:

Determinación del daño sobre la 2-dexoxiribosa (capacidad de secuestrar el radical hidroxilo)

Para esta determinación se utilizó la técnica descrita por *Burdon y Knippenberg*, 1991,²² donde la inhibición del daño a la desoxirribosa se midió como la formación de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (SRATB). La mezcla de reacción (1,2 mL volumen final) contenía 2,8 mmol/L de desoxirribosa (BDH, Inglaterra), solución reguladora KH₂PO₄/KOH (pH 7,4; 15 mmol/L), FeCl₃ 20 µmol/L, EDTA 100 mmol/L, H₂O₂ 2,8 mmol/L, ácido ascórbico 100 µmol/L y el vehículo o D-002 a las concentraciones utilizadas. Las soluciones de ascorbato y cloruro de hierro III (FeCl₃) se prepararon frescas en agua bidestilada. El EDTA y el FeCl₃ se mezclaron antes de ser añadidos al medio de incubación. Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 h a 37 °C, considerado al inicio de la reacción en el momento en que se adicionó el ascorbato. Posteriormente, se determinó la concentración de SRATB con el fin de investigar si el D-002 posee un efecto secuestrador de radical hidroxilo.

Determinación de SRATB

La determinación de las SRATB se realizó según la técnica de *Ohkawa* y otros, 1979.²³ Para ello, tras la incubación a la mezcla de reacción se le añadió 0,2 mL de SDS al 8,1 %, 1,5 mL de ácido acético al 20 % ajustada a pH 3,5, y 1,5 mL de una solución acuosa de ácido tiobarbitúrico al 0,8 %. La mezcla fue calentada a 95 °C durante 1 h. Con el objetivo de evitar la producción de aducios de ATB, se añadió BHT (1 mmol/L) al medio. Posteriormente se enfriaron las muestras, se añadieron 5 mL de una mezcla n-butanol: piridina (15:1 v/v), se agitó vigorosamente con ayuda de un Vortex y se centrifugó a 4 000 rev/min durante 20 min. Se extrajo la capa orgánica y se leyó a 534 nm en un espectrofotómetro (UV/Visible Genesys 10).

Los niveles de SRATB se calcularon según las concentraciones de malondialdehído (MDA), para lo que se construyó una curva patrón con malondialdehído bis (dimetil acetal). Los valores de MDA se informaron como nmol de MDA/mg de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado.²⁴

Análisis estadístico

Las comparaciones con el control se hicieron utilizando la prueba de la U de Mann Whitney. *A priori* se estableció un nivel de significación $\alpha = 0,05$ para la determinación de la significación estadística. Los datos fueron procesados de acuerdo con el paquete de programas Statistic para Windows. (Release 6.0, Stat Soft, Inc USA). El estudio de relación dosis/efecto se realizó mediante el método de regresión lineal y correlación utilizando el programa Primer of Biostatistics (Stanton A, Glantz; copyright (c) 1992, McGraw-Hill, Inc Versión 3.01).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los efectos del experimento *in vitro*. Como se observa, la adición de D-002 no fue capaz de proteger significativamente la oxidación de la 2-desoxirribosa en mucosa gástrica.

Todas las ratas del grupo control positivo, pero ningún control negativo, mostraron la presencia de úlceras gástricas inducidas por indometacina. La administración por vía oral de indometacina no solo indujo las úlceras características, sino que aumentó significativamente la oxidación de la 2-desoxirribosa provocada por el radical hidroxilo en la mucosa gástrica con respecto al grupo control negativo (tabla 2).

El pretratamiento por vía oral con D-002 disminuyó de forma marcada, significativa y dependiente de la dosis ($p = 0,027$; $r = 0,999$) el índice de úlcera con respecto al grupo control positivo, de manera que resultaron efectivas las dosis de 25 y 100 mg/kg, no la de 5 mg/kg.

Tabla 1. Efectos *in vitro* del D-002 sobre la oxidación de la 2-desoxirribosa en mucosa gástrica

D-002 (µg/mL)	Oxidación de la 2-desoxirribosa (µmol de MDA/mg de proteína)	Inhibición (%)
Control	20,36 ± 0,011	-
0,9	20,13 ± 0,011	1
3,9	20,13 ± 0,028	1
15,6	18,53 ± 0,017	8
62,5	18,52 ± 0,037	9
250	18,30 ± 0,057	10
500	17,61 ± 0,023	13
1 000	16,01 ± 0,51	21

(Media ± DE). Comparación con el control (prueba de la U de Mann Whitney). La tabla fue construida con los valores promedio de tres experimentos independientes realizados en triplicado.

Tabla 2. Efectos sobre el índice de úlcera y el daño oxidativo a la 2-desoxirribosa inducido por el radical ·OH en la mucosa gástrica de ratas con úlcera por indometacina

Grupos	Índice de úlcera (mm)	I (%)	Oxidación de la 2-desoxirribosa (µmol de MDA/mg proteína)	I (%)
Control negativo	0		0,31 ± 0,04	
Control positivo	21,45 ± 4,63 ^{***}		0,82 ± 0,05 ^{***}	
D-002 (5 mg/kg)	11,71 ± 2,16	45	0,71 ± 0,05	21
D-002 (25 mg/kg)	8,49 ± 0,82 ^{**}	60	0,57 ± 0,08 [*]	49
D-002 (100 mg/kg)	5,24 ± 1,04 ^{***}	75	0,46 ± 0,05 ^{***}	70
Omeprazol (20 mg/kg)	1,55 ± 0,93 ^{****††}	93	0,31 ± 0,03 ^{****†}	100

I: Inhibición; (Media ± DE), 10 animales por grupo.

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

†p < 0,05; †† p < 0,01. Comparación con omeprazol 30 mg/kg (prueba de la U de Mann Whitney).

El omeprazol (20 mg/kg), sustancia de referencia, redujo de modo marcado y significativo el índice de úlcera (93 %) respecto al control positivo, efecto significativamente mayor que el de la dosis mayor de D-002 (100 mg/kg) (75 % de inhibición). Además, el tratamiento por vía oral con D-002 protegió del daño oxidativo a la 2-desoxirribosa de modo marcado, dependiente de la dosis (p = 0,019; r = 1) y significativo en relación con el control positivo. El omeprazol (20 mg/kg) inhibió del daño oxidativo a la 2-desoxirribosa al 100 %, de modo más efectivo que la dosis mayor de D-002 (100 mg/kg) (70 % de inhibición).

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la adición *in vitro* del D-002 a homogenatos de mucosa gástrica no modificó la oxidación de la 2-desoxirribosa, mientras que su administración por vía oral protegió a la 2-desoxirribosa del daño oxidativo producido por el radical hidroxilo en la mucosa gástrica de ratas con úlcera inducida por indometacina.

El resultado negativo del estudio *in vitro* indica que el D-002 añadido directamente al medio no presenta efecto secuestrador directo. En este caso, el Fe^{3+} responsable de desencadenar el proceso oxidativo, se añade acompañado con el EDTA, permanece en solución y al añadir H_2O_2 , se generan los radicales hidroxilos que reaccionan con la 2-desoxirribosa.²⁵ Por tanto, si la sustancia a evaluar no inhibe este proceso en presencia de EDTA, se infiere que no es capaz de la quelación directa de los radicales hidroxilos.

En cambio, la administración por vía oral del D-002 a dosis de 25 y 100 mg/kg redujo significativamente el índice de úlcera en un 60 y un 75 %, respectivamente, con respecto al grupo control positivo, lo que concuerda con reportes previos que muestran que la administración oral del D-002 a ratas protege contra las úlceras gástricas inducidas por AINEs, efecto que involucra un aumento de la secreción de *mucus* gástrico, una mejoría de su calidad y una reducción de la PL en la mucosa gástrica.²⁶⁻³⁰

De modo consistente, la administración por vía oral del D-002 protegió a la 2-desoxirribosa del daño oxidativo infringido por el radical $\text{OH}\cdot$ de modo marcado y dependiente de la dosis. Teniendo en cuenta que el radical hidroxilo produce daño oxidativo de lípidos y proteínas, la capacidad del D-002 para secuestrar *in vivo* estos radicales en mucosa gástrica pudiera ser uno de los mecanismos que sustenta sus efectos antioxidantes y que explica su efecto protector sobre la mucosa gástrica.

Una explicación plausible de que el D-002 sea capaz de secuestrar la generación del radical hidroxilo en la mucosa gástrica de ratas con úlcera por indometacina, pudiera deberse a que los alcoholes alifáticos primarios saturados de cadenas largas que lo constituyen se transformen en sus respectivos ácidos, como se ha demostrado para alcoholes de larga cadena, incluidos algunos de los que componen al D-002.^{31,32} Por tal razón, es posible que los alcoholes de alto peso molecular del D-002 se transformen en estructuras más reactivas,³³⁻³⁵ capaces de capturar al radical hidroxilo. En tal sentido, el hecho que el D-002 sea capaz de capturar el radical hidroxilo *in vivo*, no *in vitro*, pudiera depender de que la transformación requerida para ello sea metabólica, a nivel de peroxisomas,³³⁻³⁵ y no simplemente química. No obstante, estudios ulteriores deberán corroborar esta hipótesis.

Pese a que diversos estudios experimentales y clínicos han documentado los efectos antioxidantes del D-002, esta investigación es la primera que informa que su administración por vía oral permite el secuestro del radical hidroxilo generado por la indometacina en la mucosa gástrica. El omeprazol, sustancia de referencia utilizada en el estudio *in vivo*, fue capaz de inhibir totalmente (100 % de protección) el daño sobre la 2-desoxirribosa generado por el radical hidroxilo, resultado coherente con estudios que demuestran que su efecto antiulceroso no se debe solo a su acción inhibitoria sobre la bomba de protones ($\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$) de las células parietales, sino además a sus efectos antioxidantes, incluida su acción sobre el radical hidroxilo.^{9,36}

El efecto protector del tratamiento por vía oral con D-002 (100 mg/kg) (70 % de inhibición) sobre el daño a la 2-desoxirribosa por el radical hidroxilo fue menor que el del omeprazol (20 mg/kg) (100 % de inhibición), de modo consistente con la

reducción del índice de úlceras con ambos tratamientos: 75 % con D-002 100 mg/kg, 93 % con omeprazol 20 mg/kg. No obstante, las reducciones logradas con el D-002, aún y cuando no se pueda confirmar que sean las máximas por no haber investigado dosis mayores y no haber obtenido efectos estacionarios, son marcadas (≥ 70 %), lo que permite considerar tales efectos no solo estadísticamente significativos, sino fisiológicamente relevantes.

En conclusión, la adición *in vitro* de D-002 (0,9-1 000 mg/mL) a la mucosa gástrica no protegió a la 2-desoxirribosa del daño oxidativo, mientras que su administración por vía oral (25 y 100 mg/kg) fue efectiva en proteger a la 2-desoxirribosa del daño producido por el radical hidroxilo, generado en mucosa gástrica de ratas con úlcera inducida por indometacina. Así, la capacidad del D-002 para secuestrar *in vivo* el radical hidroxilo pudiera ser uno de los mecanismos de sus efectos antioxidantes y gastroprotectores sobre el daño que los AINEs producen sobre la mucosa gástrica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lamarque D. Pathogenesis of gastroduodenal lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004;28:C18-26.
2. Erkin B, Dokmeci D, Altaner S, Turan FN. Gastroprotective effect of L-carnitine on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats: a preliminary study. *Folia Med (Plovdiv)*. 2006;48:86-9.
3. Farias-Silva E, Cola M, Calvo TR, Barbastefano V, Ferreira AL, De Paula Michelatto D, et al. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Med*. 2007;73:1241-6.
4. Kountouras J, Chatzopoulos D, Zavos C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology*. 2001;48:743-51.
5. Ramakrishnan K, Salinas RC, Peptic Ulcer Disease. *Am Fam Physician*. 2007;76:1005-1013.
6. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davies JP, Field SO, Hanchar A. Mild irritants prevent gastric necrosis through «adaptive cytoprotection» mediated by prostaglandins. *J Physiol*. 1983;245:G113-G21.
7. Naito Y, Yoshikawa T. Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin-induced gastropathy. *Redox Rep*. 2006;11:243-53.
8. Augusto AC, Miguel F, Mendonca S, Pedrazzoli J, Gurqueira SA. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*. 2007;40:615-22.
9. Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E. A Novel Antioxidant and Antiapoptotic Role of Omeprazole to Block Gastric Ulcer through Scavenging of Hydroxyl Radical. *J Biol Chem*. 2003;278:10993-1001.
10. Yeo M, Kwak MS, Kim DK, Chung IS, Moon BS, Song KS, et al. The novel acid pump antagonists for anti-secretory actions with their peculiar applications beyond acid suppression. *J Clin Biochem Nutr*. 2006;8:1-8.

11. Oluwole FS, Ayo JA, Omolaso BO, Emikpe BO, Adesanwo JK. Methanolic extract of *Tetracera potatoria*, an antiulcer agent increases gastric *mucus* secretion and endogenous antioxidants. Niger J Physiol Sci. 2008;23:79-83.
12. Mas R. D-002: A product obtained from beeswax. Drugs of the Future. 2001;26:731-44.
13. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Mas R. Anti-ulcer activity of higher primary alcohols of beeswax. J Pharm Pharmacol. 1995;47:731-33.
14. Carbajal D, Molina V, Valdés S, Arruzazabala ML, Rodeiro I, Mas R, et al. Possible cytoprotective mechanism in rats of D-002 an anti-ulcerogenic product isolated from beeswax. J Pharm Pharmacol. 1996;48:858-60.
15. Carbajal D, Molina V, Noa M, Valdés S, Arruzazabala ML, Aguiar A, et al. Effects of D-002 on gastric *mucus* composition in ethanol induced ulcer. Pharmacol Res. 2000;33:85-90.
16. Molina V, Valdés S, Carvajal. Arruzazabala ML, Mas R. Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with experimentally-induced injury. J Med Food. 2000;4:79-83.
17. Hano O, Illnait J, Mas R, Fernández L, Piñol F, Fernández J. Effects of D-002, a Product Isolated from Beeswax, on Duodenal Ulcer: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Curr Ther Res. 2001;62:394-407.
18. Illnait J, Terry H, Mas R, Fernández L, Carbajal D. Effects of D-002, a product isolated from beeswax, on gastric symptoms of patients with osteoarthritis treated with piroxicam: a pilot study. J Med Food. 2005;8:63-8.
19. Fernández L, Terry H, Quiñones AM, Díaz B, Hernández ML, Illnait J, et al. Effects of Abexol® in middle-aged and older subjects: an open follow-up. Rev CENIC Cien Biol. 2008;39:3-8.
20. Rodríguez I, Illnait J, Terry H, Mas R, Fernández L, Fernández JC, et al. Effects of Abexol® (beeswax alcohols) on gastrointestinal symptoms of middle-aged and older subjects assessed Rev CENIC Cien Biol. 2009;40:147-54.
21. Ohara A, Sugiyama S, Hoshino H. Reduction of adverse effects of indomethacin by anti-allergic drugs in rat stomachs. Arzneim-Forsch Drug Res. 1992;42:1115-8.
22. Burdon RH, Knippenberg PH. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 22. Techniques in Free Radical Research. Amsterdam: Elsevier; 1991;3:50-5.
23. Ohkawa Y, Ohishi J, Yagi K. Assay fo lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95:351-8.
24. Maxwell MA, Haas SM, Beiber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. Anal Biochem. 1987;87:206-9.
25. Gutteridge JM, Halliwell B. The deoxyribose assay: and both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. Biochem J. 1988;253:932-3.

26. Menéndez R, Amor AM, González RM, Jiménez S, Mas R. Inhibition of rat microsomal lipid peroxidation by the oral administration of D-002. Brazil J Med Biol Res. 2000;33:85-90.
27. Menéndez R, Pérez Y, González RM, Amor AM, Jiménez S, Mas R. Antioxidant effects of D002 on the *in vitro* susceptibility of whole plasma in healthy volunteers. Arch Med Res. 2001;32:436-41.
28. Menéndez R, Mas R, Illnait J, Pérez Y, Amor AM, Fernández J, González RM. Effects of D002 on lipid peroxidation in older subjects. J Med Food. 2001;4:81-6.
29. López E, Illnait J, Molina V, Oyárbal A, Fernández L, Pérez Y, et al. Effects of D-002 (beeswax alcohols) on lipid peroxidation in middle-aged and older subjects. LAJP. 2008;27:695-703.
30. Rodríguez I, Illnait J, Molina V, Oyárbal A, Fernández L, Fernández J, et al. Comparative antioxidant effects of beeswax alcohols and grape seed extract in healthy persons. LAJP. 2010;29:255-62.
31. Rizzo E, Craft D, Dammann A. Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for a fatty alcohol cycle. J Biol Chem. 1987;262:17412-9.
32. Kabir Y, Kimura S. Tissue distribution of (¹⁴C)-octacosanol in liver and muscle of rats after serial administration. Ann Nutr Metab. 1995;39:279-84.
33. Kabir Y, Kimura S. Metabolism of octacosanol in liver and muscle of rat. Acta Alimentaria. 1995;4:39-44.
34. Menéndez R, Marrero D, Mas R, González RM. *In vitro* and *in vivo* study of octacosanol metabolism. Arch Med Res. 2005;6:113-9.
35. Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Activation of AMP-kinase by Policosanol Requires Peroxisomal Metabolism. Lipids. 2011;46:311-21.
36. Kim JM, Choi SM, Kim DH, Oh TY, Ahn BO, Kwon JW, et al. Combined use of omeprazole and a novel antioxidative cytoprotectant for the treatment of peptic ulcer. Facilitation of ulcer healing in experimental animals. Arzneimittelforschung. 2005;55:387-93.

Recibido: 12 de octubre de 2011.

Aprobado: 25 de noviembre de 2011.

Yohani Pérez Guerra. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yohani.perez@cnic.edu.cu