

Toxicología especial de la sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispera* (D-005) en ratas *Sprague Dawley*. Morfología de la cabeza del espermatozoide

Special toxicology of lipid substance of fruit of *Acrocomia crispera* (D-005) in *Sprague Dawley* rats. Sperm head morphology

Ariadne Gutiérrez Martínez^{a,*1}, Rafael Gámez Menéndez^{a2}, Rosa Ibis Meneau Hernández^{a3}, Carlos Nodal Flores^{a4}, Isury Bucarano Lliteras^{a5}, Edy Goicochea Carrero^{a6}.

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Grupo de Toxicología, Centro de Productos Naturales. Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Habana, Cuba. ariadne.gutierrez@cnic.cu

Recibido: 19 de octubre de 2020;

Aceptado: 18 de noviembre de 2020;

RESUMEN

El D-005, sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispera* (palma corajo), contiene una mezcla de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico y palmítico y ha mostrado efectos antiinflamatorios y antioxidantes en roedores. El objetivo de este trabajo fue determinar si el D-005 induce cambios en la frecuencia de aparición de formas anómalas en la cabeza del espermatozoide y/o provoca alteraciones en la concentración de espermatozoides. Se usaron ratas *Sprague Dawley* machos, provenientes de un estudio de toxicidad subcrónica (90 días de tratamiento), distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de ocho animales cada uno: un control tratado solo con el vehículo y tres administrados con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg). A las 24 horas de la última administración, a cada animal se le realizó la necropsia y se extrajo el epidídimo derecho para obtener las muestras. Se calculó la concentración de espermatozoides y para el análisis de la morfología de la cabeza del espermatozoide, se siguió el criterio de clasificación basado en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana, sin gancho y dos colas. No ocurrieron muertes ni se detectaron signos de toxicidad. La concentración de espermatozoides de los animales tratados con D-005 fue estadísticamente similar a la del grupo control. Los promedios de espermatozoides normales, anormales totales y de diferentes formas anómalas en los grupos tratados fueron similares a los del grupo control, indicando la inocuidad genotóxica del D-005 sobre las células germinales masculinas. El tratamiento oral con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg) durante el período de espermatogénesis no redujo el número total de espermatozoides ni aumentó la frecuencia de formas anómalas, por lo cual dicha sustancia en estudio no presenta potencial citotóxico ni genotóxico sobre las células germinales masculinas de ratas.

Palabras claves: ácidos grasos; cabeza del espermatozoide; morfología; ratas; toxicología.

ABSTRACT

D-005, lipid substance from the fruit of *Acrocomia crispera* (corajo palm), contains a mixture of fatty acids, mainly lauric, oleic, myristic and palmitic and has shown anti-inflammatory and antioxidant effects in rodents. The objective of this work was to determine if D-005 induces changes in the frequency of appearance of abnormal forms in the sperm head and/or causes alterations in the sperm concentration. Male *Sprague Dawley* rats from an oral subchronic toxicity study (90 days of treatment) were used, randomly distributed into four experimental groups of eight animals each: a control treated only with the vehicle and three administered with D-005 (200, 500 and 1000 mg/kg). Twenty-four hours after the last administration, each animal was necropsied and the right epididymis was extracted to obtain the samples. The sperm concentration was calculated. For the analysis of the morphology of the sperm head, the classification criterion was followed based on normal and abnormal heads that includes amorphous, banana, without hook and two tails. No deaths occurred and no signs of toxicity were detected. The sperm concentration of the animals treated with D-005 were statistically similar to those of the control group. The averages of normal, total abnormal and different abnormal sperm in the treated groups were similar to those of the control group, indicating the genotoxic safety of D-005 on male germ cells. Oral treatment with D-005 (200, 500 and 1000 mg/kg) during the period of spermatogenesis did not reduce the total number of sperm or increase the frequency of abnormal forms, therefore, this substance under study does not have cytotoxic neither genotoxic potential on male germ cells of rats.

Keywords: fatty acids; sperm head, morphology; rats; toxicology.

¹ 0000-0003-0371-0430

² 0000-0002-6633-8771

³ 0000-0003-4682-1819

⁴ 0000-0001-6385-1265

⁵ 0000-0001-9444-4320

⁶ 0000-0002-2521-0853

INTRODUCCION

La inflamación crónica y el estrés oxidativo constituyen factores etiológicos importantes en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades crónicas como la artritis reumatoidea, aterosclerosis, osteoartritis, asma bronquial, hiperplasia prostática benigna, dermatitis atópica (DA), cáncer, colitis ulcerativa, daño pulmonar agudo (DPA), lesión renal aguda (LRA), entre otras. (Akasaki et al., 2009; Briganti et al., 2009; Galli & Tsai, 2012; Mc Neill, Channon & Greaves, 2010; Niknami et al., 2010; Strober, Fuss & Mannon, 2007; The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000; Zuk & Bonventre, 2016).

El D-005, sustancia lipídica obtenida del fruto de *Acrocomia crispera* (palma corajo), planta endémica de Cuba, de la familia *Arecaceae*, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico y palmítico, mientras el palmitoleico, caprílico, capríco, y esteárico se encuentran en menores concentraciones (González et al., 2015; Sierra et al., 2014).

Se ha reportado que algunos de estos ácidos grasos, como mirístico, esteárico, palmítico, oleico y varios extractos oleosos que contienen estos ácidos grasos inhibieron las actividades de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX) *in vitro* (Chan, Juei-Tang, Chiang-Wen, Chiang-Shan & Chiang-Ye, 1996; Henry, Momin, Nair & Dewitt, 2002; Menéndez, Mas, Pérez & González, 2007; Zhang, Mills, & Fair, 2002). En consonancia con estos datos, un estudio demostró que el D-005 ejerce efectos antiinflamatorios *in vitro* mediante la inhibición dual de las actividades de las enzimas COX-2 y 5-LOX, con mayor afinidad por COX-2 (Pérez et al., 2017).

Estudios precedentes demostraron que el D-005 posee efectos antioxidantes dado su capacidad de reducir significativamente las variables oxidativas: malondialdehído (MDA) y grupos sulfhidrilo en tejido prostático y MDA en plasma, en el modelo de hiperplasia prostática inducida por testosterona en ratas (González et al., 2015; Pérez et al., 2016). Además, otro estudio demostró que dosis orales únicas de D-005 (5-200 mg/kg) protegieron de modo significativo del DPA inducido por lipopolisacáridos en ratones lo cual estuvo asociado, al menos en parte, a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes en tejido pulmonar (Mena et al., 2019).

El tratamiento oral con D-005 (25-400 mg/kg) protegió de los cambios histopatológicos en la corteza renal y en los túbulos proximales en ratas sometidas a isquemia reperusión renal (Oyarzábal et al., 2019). Así mismo, otro estudio también demostró el efecto nefroprotector del D-005 al prevenir el daño tubular inducido por kanamicina en riñones de ratas, lo cual puede estar asociado a su efecto antioxidante (Rodríguez et al., 2020). Estos resultados evidencian que el D-005 ejerce un efecto beneficioso sobre el daño renal agudo.

Por otra parte, en la evaluación de la toxicidad oral por dosis únicas (2 g/kg de peso corporal) en roedores y conejos, el D-005 no produjo mortalidad ni signos tóxicos, por lo cual su toxicidad se puede declarar como no clasificable según el método de las clases (Gutiérrez, Nodal, Bucarano y Goicochea, 2016; Gutiérrez et al., 2016). Los resultados obtenidos en la evaluación del potencial citotóxico, clastogénico y genotóxico del D-005 *in vivo* empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores, mostraron resultados negativos a las dosis de 200, 500 y 1000 mg/kg (Gutiérrez et al., 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta necesario determinar si la administración oral de dosis repetidas (90 días) de D-005 a ratas SD induce cambios en la frecuencia de distribución de formas anormales de la cabeza del espermatozoide y/o provoca alteraciones en la concentración de espermatozoides.

Metodología

Animales

Se emplearon muestras provenientes de ratas Sprague Dawley, adultos jóvenes machos (6-7 semanas), incluidas en un estudio de toxicidad subcrónica con D-005. Las ratas procedían del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), y su peso corporal oscilaba entre 160-210 g al término de la cuarentena (7 días), etapa en la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 20-25° C, la humedad entre 50 y 70 % y ciclos de luz- oscuridad de 12 horas.

El alimento de los animales fue pienso convencional para roedores proveniente del CENPALAB suministrado a razón de 100 g/kg/día (10% del peso corporal) durante todo el estudio. El acceso al agua fue *ad libitum*

El estudio se desarrolló de acuerdo a las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) vigentes en la República de Cuba, las cuales siguen los principios metodológicos internacionales.

Sustancia de ensayo

Sustancia de ensayo

El D-005, sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispera* (palma corajo), se obtuvo en el Grupo de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales (CPN), tras corroborar su composición por cromatografía gaseosa, con su correspondiente información relativa a la pureza y a las condiciones de estabilidad. Esta sustancia contiene una mezcla de ácidos grasos, principalmente láurico, oleico, mirístico y palmítico, mientras el palmitoleico, caprílico, cáprico, y esteárico se encuentran en menores concentraciones. Los lotes empleados fueron: S161112, S171112 y S181112, que cumplen con las especificaciones de calidad de la sustancia establecida por el Grupo de Química Farmacéutica de la UPN.

Administración y dosificación

Para su administración el D-005 fue preparado en forma de emulsión, dos horas antes de la administración, usando como agente tensoactivo Tween 65 (2%). Las concentraciones se prepararon en función de los valores medios de los pesos corporales por grupos de experimentación.

Los animales se encontraban distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos (ocho animales/grupo): un grupo control, tratado solo con el vehículo Tween 65/agua y tres tratados con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg de peso corporal).

En los grupos tratados con D-005 se seleccionó como dosis mayor, 1000 mg/kg teniendo en cuenta que los resultados previos hacen suponer una toxicidad intrínseca baja para la sustancia y que es la máxima dosis recomendada para estudios subcrónicos a dosis repetidas. Las dosis seleccionadas fueron 8, 20 y 40 veces superiores a la dosis efectiva máxima (25 mg/kg) en modelos de DPA inducido por ácido oleico en ratones, respectivamente. La dosis intermedia se incluyó con el objetivo de establecer relación dosis efecto ante el hallazgo de signos indicativos de toxicidad.

Los tratamientos (vehículo o D-005) se administraron por vía oral por ser la que se propone en humanos, utilizándose para ello entubación gástrica, en un rango volumen/peso que se ajusta a lo recomendado para la especie y a las características oleosas de la sustancia investigada, durante 90 días.

Aunque actualmente la realización de este ensayo no es obligatoria en todas las regulaciones, se recomienda cuando la sustancia a investigar se administre a largo plazo, para lo cual suele

realizarse no de modo independiente, sino para disminuir el número de animales a utilizar en estudios toxicológicos, se suele realizar como parte de otros estudios en los cuales se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo. Por ello, tras comenzar el estudio subcrónico en ratas se decidió realizar este ensayo en muestras de los animales machos incluidos en dicho estudio.

Estudios terminales

Obtención de las muestras: Transcurridas 24 horas de la última administración los animales se anestesiaron con éter y se desangraron hasta morir de acuerdo a un orden aleatorio progresivo. A cada animal se le realizó la necropsia y se extrajo el epidídimo derecho. El epidídimo fue colocado en una placa Petri que contenía 1 mL de solución isotónica de NaCl 0,9 % y se redujeron a pequeños fragmentos mediante unas tijeras. La muestra se homogeneizó con pipetas Pasteur, luego de añadir 2 mL de la solución de NaCl 0,9 %.

Conteo de espermatozoides: El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado al cual se le añadió 0,05 mL de tripsina al 0,25 % con el objetivo de destruir el tejido conectivo y separar los espermatozoides. Una vez transcurridos 3 minutos de tripsinización se realizó una dilución (1:100) del homogenato tripsinizado NaCl- formol al 1 % y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio (Kempinas, & Lamas-Carvalho, 1988), para calcular la concentración de espermatozoides según GEN/CUL/VIA/006 y los resultados se expresan $\times 10^6$ células/mL.

2.4.3 Morfología de la cabeza del espermatozoide: Para realizar el análisis de la morfología de la cabeza del espermatozoide, al tubo que contenía la dilución del homogenato se le añadieron 5 gotas de eosina al 1%, dejándolo reposar por 5 minutos. Posteriormente, se procedió a depositar una gota sobre una lámina seca, se colocó el cubreobjeto y se secaron los bordes de la lámina. Se prepararon 2 láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides totales. El criterio de clasificación a seguir es el planteado por Wyrobek y Bruce (Wyrobek & Bruce, 1978) basado en cabezas normales y anormales que incluye amorfa, banana, sin gancho y dos colas.

Tanto el conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer como el conteo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se realizó “a ciegas” utilizando un microscopio Zeiss.

Análisis estadístico

La comparación estadística de los datos de conteo de espermatozoides y su morfología se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación establecido fue α 0,05. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

También se realizó la comparación de los resultados con los de los controles negativos y positivos históricos del laboratorio.

Resultados y discusión

El tratamiento con dosis de hasta 1000 mg/kg no afectó la proliferación de células germinales en ratas dado que el número promedio de espermatozoides por cuadro y la concentración de espermatozoides de los animales tratados con D-005 fueron estadísticamente similares a los del grupo control, lo cual indica que el D-005 no ejerce acción citotóxica durante la gametogénesis (Tabla 1). Los valores de espermatozoides obtenidos en los controles son similares a los de un estudio previo ($40,8 \pm 4,3$). Igual ocurrió con la concentración de espermatozoides ($2,04 \pm 0,2$). En cambio, estos datos mostraron que

los animales administrados con ciclofosfamida (CF), utilizado como control positivo, presentaron una reducción significativa de la concentración de espermatozoides, con valores entre 0,78 y 1,19 x 10⁶ células/mL (Arencibia et al., 2009), al compararlos con los resultados del presente ensayo.

Tabla 1. Efectos del D-005 sobre la concentración de espermatozoides (X ± DE) en ratas SD, vía oral

Grupo	Dosis (mg/kg)	Promedio de espermatozoides por cuadro	de Concentración *(10 ⁶) células/mL
Control	-	39,39 ± 7,51	1,97 ± 0,37
	200	35,90 ± 7,57	1,79 ± 0,38
D-005	500	36,75 ± 4,73	1,84 ± 0,24
	1 000	35,12 ± 2,82	1,76 ± 0,14

*X media; DE desviación estándar, *Concentración en millones de espermatozoides (x10⁶) células/mL*

De igual modo, los promedios de espermatozoides normales, anormales totales y por diferentes formas anómalas en los grupos tratados fueron similares a los del grupo control (Tabla 2), por lo que el tratamiento con D-005 no incrementó la frecuencia de formas anómalas con relación al control, indicando la inocuidad genotóxica del D-005 sobre las células germinales masculinas de ratas. Ello se diferencia de los efectos de la CF observados en un estudio previo, que se caracterizan por presentar entre 16 y 20 % de espermatozoides anormales (determinaciones en 500 células/animal) (Arencibia et al., 2009).

La CF aumenta las formas anómalas de la cabeza del espermatozoide con respecto a los controles, lo que evidencia su citotoxicidad y genotoxicidad en este modelo (Johnson, J., 1998; Wyrobek, A.J., 1983). Ha sido demostrado que los metabolitos de la CF interactúan con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo su producción y maduración, lo que caracteriza su efecto mutagénico. Dado que el citoesqueleto de las células de Sertoli está estrechamente relacionado con la morfología celular, diferenciación, movimiento, transducción de señales y espermatogénesis, se ha planteado la hipótesis de que la producción de acroleína (uno de los principales metabolitos tóxicos de la CF) podría provocar daño celular, al provocar estrés oxidativo en las células de Sertoli (Monsees et al., 2000), interfiriendo con el sistema de defensa antioxidante de los tejidos. Por tanto, este metabolito juega un papel importante en el daño celular inducido por la CF (Liu et al., 2012).

Tabla 2. Efectos del tratamiento oral con D-005 (90 días) sobre la morfología (%) de la cabeza del espermatozoide (X ± DE) en ratas SD.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
Control	-	95,94 ± 1,29	4,06 ± 1,29	0,12 ± 0,16	3,01 ± 1,03	0,86 ± 0,40	0,06 ± 0,05
D-005	200	95,30 ± 1,09	4,70 ± 1,09	0,12 ± 0,07	3,47 ± 0,85	1,09 ± 0,75	0,01 ± 0,03
D-005	500	95,51 ± 1,28	4,49 ± 1,28	0,12 ± 0,12	3,19 ± 1,03	1,15 ± 0,32	0,02 ± 0,05
D-005	1 000	95,91 ± 1,06	4,09 ± 1,06	0,15 ± 0,13	3,16 ± 0,86	0,72 ± 0,36	0,05 ± 0,08

X media; DE desviación estándar, Determinaciones en 500 células/animal.

El esquema de tratamiento utilizado permitió estudiar las células que durante la diferenciación y el desarrollo estuvieron en contacto con la sustancia en estudio o sus metabolitos (Mitchell, A.D., 1999). Con los resultados negativos obtenidos en este ensayo se demuestra que a las dosis estudiadas (200, 500 y 1000 mg/kg) el D-005 no interfiere en ninguna de las etapas del proceso de diferenciación de las células germinales.

De acuerdo al esquema de tratamiento empleado, las ratas fueron tratadas por más de un ciclo espermático, por lo que además de los espermatozoides analizados que estuvieron bajo la acción de la sustancia de ensayo durante todo su ciclo celular, los órganos sexuales y el sistema endocrino en su totalidad también estuvieron expuestos a los efectos de altas dosis de D-005. Estos resultados reproducen lo observado en ratas tratadas con dosis de hasta 2000 mg/kg de D-004 (Arencibia et al., 2009), extracto lipídico de *Roystonea regia* (palma real), otra especie de la familia Arecaceae, ampliamente estudiada para usos medicinales como antioxidante (López et al., 2009; Rodríguez et al., 2010; Oyarzábal et al., 2011; González et al., 2015), antiinflamatorio (Menéndez et al., 2006; Ravelo et al., 2011, González et al., 2015) y en hiperplasia prostática benigna (Pérez et al., 2010; Oyarzábal, Pérez, Jiménez, Mas & Molina, 2013; Guzmán et al., 2013; Oyarzábal et al., 2015)

CONCLUSIONES

El tratamiento oral con D-005 (200, 500 y 1000 mg/kg) en ratas durante el período de espermatogénesis no redujo el número total de espermatozoides ni aumentó la frecuencia de formas anómalas, por lo cual dicha sustancia en estudio no presenta potencial citotóxico ni genotóxico sobre las células germinales masculinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akasaki, Y., Matsuda, S., Nakayama, K., Fukagawa, S., Miura, H., & Iwamoto, Y. (2009). Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*, 17 (2), 235-243.
- Arencibia, D. F., Gámez, R., Gutiérrez, A., Pardo, B., Curveco, D., García, H., y Goicochea, E. (2009). Evaluación genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, mediante el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Revista de Toxicología (España)*, 26, 127-130.
- Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N., Gallina, A., Salonia, A., Bianchi, M., Tutolo, M., et al. (2009). Benign prostatic hyperplasia and its aetiologies. *European Urology Supplements*, 8, 865-871.
- Chan, P., Juei-Tang, C., Chiang-Wen, T., Chiang-Shan, N., & Chiang-Ye, H. (1996). The in vitro antioxidant activity of triolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. *Life Sciences*, 59, 2067-2073.
- Galli, S. J., & Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. (2012). *Nature Medicine*, 18 (5), 693-704.
- González, V. L., Sierra, R., Mas, R., Pérez, Y., Oyarzábal, A., Rodríguez, E., Molina, V., et al. (2015). Ingrediente Activo para el tratamiento y la prevención de la inflamación y el estrés oxidativo, así como su procedimiento de obtención a partir de los frutos de *Acrocomia crispa* y/o *Acrocomia aculeata*. Certificado No. 24143. Resolución 2979/2015.
- Gutiérrez, A., Gámez, R., Meneau R. I., Nodal, C. R., Bucarano, I., y Goicochea, E. (2019). Evaluación genotóxica de sustancia lipídica del fruto de *Acrocomia crispa*, en el ensayo de micronúcleos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 50(3), 254-263.
- Gutiérrez, A., Nodal, C. R., Bucarano, I., y Goicochea, E. (2016). Toxicología aguda oral del extracto lipídico de *Acrocomia crispa* en ratones NMRI. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(1), 21-26.

- Gutiérrez, A., Nodal, C. R., Bucarano, I., Placeres, R., Tolón, Z., y Goicochea, E. (2016). Toxicología aguda en conejos del D-005, extracto lipídico del fruto de la palma corajo (*Acrocomia crispa*) *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(1), 51-57.
- Guzmán, R., Illnait, J., Mas, R., Pérez, Y., Fernández, L., Mendoza, S., & Oyarzábal, A. (2013). Comparative effects of *Roystonea regia* (D004) and Saw palmetto lipid extracts on blood oxidative variables in men with benign prostate hyperplasia (BPH). *IOSR Journal of Pharmacy*, 3, 1-8.
- Henry, G., Momin, R. A., Nair, M. G., & Dewitt, D. L. (2002). Antioxidant and cyclooxygenase activity of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2231-2234.
- Johnson, J. (1998). Administration backs chemical testing, genetic toxicology in germinal cells. *Chemical & Engineering News*, 76, 7-8.
- Kempinas, W. G., & Lamano-Carvalho, T. L. (1988) A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Laboratory Animals*, 22, 154-6.
- Liu, F., Li, X. L., Lin, T., He, D. W., Wei, G. H., Liu, J. H., & Li, L. S. (2012). The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeletal changes and oxidative stress in Sertoli cells. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 493–500.
- López, E., Molina, V., Illnait, J., Oyarzábal, A., Fernández, L., Mas, R., & Gámez, R. (2009). Antioxidant effects of D004, a lipid extract from the *Roystonea regia* fruits, on the plasma of healthy men. *Asian Journal of Andrology*, 11, 385-392.
- Mc Neill, E., Channon, K. M. & Greaves, D.R. (2010). Inflammatory cell recruitment in cardiovascular diseases: murine models and potential clinical applications. *Clinical Science*, 118(11), 641-655.
- Mena, L., Sierra, R., Valle, M., Molina, V., Rodríguez, S., Merino, N., & Zamora, Z., et al. (2019). *Acrocomia crispa* fruits lipid extract prevents LPS-induced acute lung injury in mice. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(1), 16-26.
- Menéndez, R., Carbajal, D., Mas, R., Pérez, Y., Molina, V., Arruzazabala, M. L., & González, R. (2006). Efectos del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*) sobre el granuloma inducido por algodón en ratas y sobre la lipooxigenasa presente en leucocitos polimorfonucleares (PMNs). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25, 213-218.
- 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, 89-95.
- Mitchell, A. D. Genetic Toxicology Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook. Ed. Gad S.C.; Marcel Dekker, Inc. U.S. (1999): p. 167-200.
- Monsees, T. K., Franz, M., Gebhardt, S., Winterstein, U., Schill, W. B., & Hayatpour, J. (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*, 32, 239-246.
- Niknami, M., Vignarajan, S., Yau, M., Hua, S., Witting, P. K., Kita, Y., Shimizu, T., et al. (2010). Decrease in expression of activity of cytosolic phospholipase A2alpha increases cyclooxygenase-1 action: A cross-talk between key enzymes in arachidonic acid pathway in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(7), 731-737.
- Oyarzábal, A., Jiménez, S., Curveco, D., Pérez, Y., Molina, V., & Mas, R. (2011). Effects of oral treatment (60 days) with D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on rat prostate hyperplasia and oxidative markers. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30, 368-372.

- Oyarábal, A., Pérez, Y., Jiménez, S., Mas, R., & Molina, V. (2013). Effects of D-004, antioxidant and anti-inflammatory substances on testosterone-induced prostate hyperplasia in rats. *Oxidant and Antioxidant in Medical Science*, 2, 181-186.
- Oyarábal, A., Pérez, Y., Molina, V., Mas, R., Ravelo, Y., & Jiménez, S. (2015). Effects of D-004, vitamin E and grape seed extract on phenylephrine induced urodynamic impairment in rats. *Translational Andrology and Urology*, 4, 391-397.
- Oyarábal, A., Rodríguez, S., Merino N., Ocaña L., González L., Mena L., & Zamora, Z., et al. (2019). Protective effects of D-005, a lipid extract from *Acrocomia crispera* fruits, against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Kidney Research and Clinical Practice*, 38(4), 462-471.
- Pérez, Y., Oyarábal, A., Molina, V., Jiménez, S., Curveco, D., & Mas, R. (2010). Estudio del D004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con hiperplasia prostática inducida por inyección de testosterona. *Revista Cubana de Farmacia*, 44, 221-230.
- Pérez, Y., Oyarábal, A., Sierra, R., Mas, R., Molina, V., Jiménez, S., & González, V. (2017). Inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by a lipid extract of *Acrocomia crispera* fruits. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(3), 319-328.
- Pérez, Y., Oyarábal, A., Sierra, R., Mas, R., Molina, V., Jiménez, S., & González, V. (2016). Oral administration of D-005, a lipid extract from Corojo palm (*Acrocomia crispera*) fruits, attenuates testosterone induced prostate enlargement and increased oxidative stress in rats. *Academia Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(1), 10-15.
- Ravelo, Y., Molina, V., Jiménez S., Oyarábal, A., Pérez, Y., & Mas, R. (2011). Effect of oral administration of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on xylene-induced ear oedema in mice. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30 (9), 1744-1748.
- Rodríguez, I., Molina, V., Mas, R., Illnait, J., Oyarábal, A., Mendoza, S., Fernández, L. (2010). Comparison of the antioxidant effects of lipid extracts of *Roystonea regia* (D-004) and saw palmetto on blood oxidative variables of healthy men. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 1185-1192.
- Rodríguez, S., Ocaña, L., Oyarábal, A., González, L., Medina, J. A., & Molina, V. (2020). Effects of *Acrocomia crispera* fruits lipid extract (D-005) over Kanamycin induced tubular damage. *Microscopy and Microanalysis Research*, 26 (Suppl 1), 61-62.
- Sierra, R. C., González, V. L., Rodríguez, E. A., Marrero, D., Vicente, R., & Morales, C. L. (2014). Estudio fitoquímico de los frutos de *Acrocomia crispera*, palma endémica cubana. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, 41-47.
- Strober, W., Fuss, I., & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. (2007). *Journal of Clinical Investigation*, 117, 514-21.
- The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. (2000). Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 342, 1301-1308.
- Wyrobek, A. J. & Bruce, W. R. (1978). The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans. In Hollander, A. and de Serre, F.J. (eds). *Chemical Mutagens: principles and methods for their detection*. Vol. 5, pp. 257-285 (New York and London: Plenum Press).
- Wyrobek, A. J. (1983). An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mutation Research*, 115, 73-148.

- Zhang, Y., Mills, G. L., & Fair, M. G. (2002). Cyclooxygenase inhibitory activity and antioxidant compounds from the mucelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7581-7585.
- Zuk, A., & Bonventre, J. V. (2016). Acute kidney injury. *Annual review of medicine*, 67, 293-307.