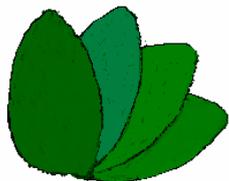


*REPÚBLICA DE CUBA*  
*MINISTERIO DE CIENCIAS TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE*  
*CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS*  
*CENTRO DE PRODUCTOS NATURALES*



*Mecanismos que sustentan la eficacia del D-004,  
extracto lipídico del fruto de la palma real, en modelos  
experimentales de hiperplasia prostática.*

*Tesis presentada en opción al Grado Científico  
De Doctor en Ciencias de la Salud*

*Autora: Lic. Yohani Pérez Guerra*

*Tutoras: Dra. Vivian Molina Cuevas  
Dra. Rosa Más Ferreiro*

*Ciudad de la Habana*

*2009*

**A mis Hijos**

## AGRADECIMIENTOS

Cuando se concluye un trabajo al que se han dedicado esfuerzo y meditación, y se vuelve la vista atrás, es imposible desconocer el apoyo recibido en cada uno de los pasos, que se expresa no sólo en el consejo o la crítica acertada, sino en el estímulo, la preocupación constante y la cooperación. Por eso deseo agradecer a mis tutoras, a la Dra. Vivian Molina Cuevas por todo el tiempo que me a dedicado, por su paciencia y porque sin ella no hubiera sido posible la realización de este trabajo. A la Dra. Rosa Más Ferreiro por su acertada y bien documentada asesoría lo que contribuyó al éxito del trabajo. Debo agradecer a mis compañeras de laboratorio Sonia, Ambar y Dayisell, que no dejaron de ayudarme nunca y que en los momentos más difíciles se portaron como familia. Así como a otros compañeros de trabajo como Tere, Sarí y Yazmín por su amistad y apoyo. También les agradezco a todos mis compañeros de CPN por su preocupación y aliento.

Creo que es de indiscutible valor la ayuda brindada por los oponentes de la pre-defensa Dra. Miriam Noa y Dr José Luis Colunga que con sus valiosos aportes en la revisión exhaustiva del documento hicieron posible la culminación exitosa del mismo.

Pienso que es indispensable el agradecimiento a mi mamá, esposo y al resto de la familia que incluye a mis vecinas Silvia y Marilú, que sin la ayudada de todos ellos no hubiera podido dedicar el tiempo necesario a la realización de este trabajo.

También agradezco al Centro Nacional de Investigaciones Científicas en especial al Centro de Productos Naturales donde he realizado mi formación profesional.

A todos los que de una forma u otra han cooperado ***Muchas Gracias.***

## ABREVIATURAS.

AA: Ácido araquidónico.  
ABTS+: Cation 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato].  
ADN: Ácido desoxirribonucleico.  
ADP: Difosfato de Adenosina.  
ADR- $\alpha$ 1: Receptores adrenérgicos.  
AGPI: Ácidos poliinsaturados.  
AL: Ácido láurico.  
AINE: anti-inflamatorios no esteroideos.  
AM: Ácido Mirístico.  
AMPc: Monofosfato de Adenosina cíclico.  
AO: Ácido Oleico.  
ATNBS: Ácido trinitrobencelsulfónico.  
AAU: Asociación Americana de Urología.  
BHT: Hidroxitolueno Butilado.  
BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio.  
C: Carbono.  
CAOP: Capacidad Antioxidante Total del plasma.  
CAT: Catalasa.  
CCl<sub>4</sub>: Tetracloruro de carbono.  
CCL<sub>3</sub>\*: Radical triclorometilo.  
CCL<sub>3</sub>OO\*: Radical triclorometilperoxílico.  
CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.  
CMC: Carboximetil celulosa.  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono.  
COX: Ciclooxygenasa.  
DE: Disfunción Eréctil.  
DHT: Dihidrotestosterona.  
DHP: Dihidropiridina.  
dmp: Depresiones por minutos.  
DNFH: Dinitrofenilhidracina.  
DO: Densidad Óptica.  
ERD: Exámen Rectal Digital.  
DS: Desviación estándar.  
EA: Experiencias Adversas.  
EDTA: Sal sódica del Ácido Etilendiamino Tetracético.  
E/Emax: Efecto sobre Efecto máximo.  
ELSP: Extracto lipídico del fruto del Saw Palmetto.  
EROs: Especies Reactivas del Oxígeno.

$\beta$ -FCF: Factores de Crecimiento Fibroblástico.  
FCE: Factores de Crecimiento Epidérmico.  
FR: Factor de Riesgo.  
FRs: Factores de Riesgo.  
FE: Fenilefrina.  
 $\text{FeCl}_2$ : Cloruro de Hierro II.  
 $\text{FeCl}_3$ : Cloruro de Hierro III.  
FSH: Hormona Folículo Estimulante.  
GMPc: Monofosfato de Guanosina cíclico.  
GSH: Glutation.  
GSH-Px: Glutation Peroxidasa.  
GSH-R: Glutation Reductasa.  
GST: Glutation S-transferasa.  
HMTC: 6-hidroxi-2-,5,7,8-tetrametilcromán-2- ácido carboxílico.  
HCl: Ácido Clorhídrico.  
HP: Hiperplasia Prostática.  
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna.  
 $\text{H}_2\text{O}$ : Agua.  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrógeno.  
HOCL: Ácido hipocloroso.  
I: Inhibición.  
 $\text{IC}_{50}$ : Concentración inhibitoria media.  
 $\text{IFN}\gamma$ : Interferón  $\gamma$ .  
IGFI: Factor de crecimiento tipo insulina.  
IGFBP3: Factor de crecimiento tipo insulina unido a proteína.  
IL: Interleucina.  
IMEFA: Industria Médico Farmacéutica.  
I.N.F.T: Cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium chloride.  
ITUP: Incisión transuretral de la próstata.  
 $K_a$ : Constantes de enlace aparente.  
KCl: Cloruro de Potasio.  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Hidrógeno Fosfato de Potasio.  
 $K_m$ : Constante de afinidad Sustrato/Receptor.  
KOH: Hidróxido de Potasio.  
LH: Lactato Hidrogenasa.  
LOX: Lipooxigenasa.  
LTB4: Leucotrienos B4.  
MDA: Malondialdehido.  
 $\text{MgCl}_2$ : Cloruro de Magnesio.

NaCl: Cloruro de Sodio.  
NADPH: Nicotinamina Adenina Difosfato.  
NE: Norepinefrina.  
NOAEL: Efectos adversos observables.  
OH\*: Radical Hidroxilo.  
O<sub>2</sub>: Oxígeno.  
O<sub>2</sub>\*<sup>-</sup>: Radical superóxido.  
1O<sub>2</sub>: Oxígeno singlete.  
ON\*<sup>-</sup>: Oxido nítrico.  
PBS: Buffer Fosfato Salina.  
PC: Peso Corporal.  
5-PDE: 5-fosfodiesterasa.  
PGE2: Prostaglandinas E2.  
Pgl<sub>2</sub>: Prostaciclina I<sub>2</sub>.  
Ph: Peso húmedo.  
PISP: Puntaje Internacional de los Síntomas de la Próstata.  
PL: Peroxidación Lipídica.  
PMNs: Neutrófilos Polimorfonucleares.  
PP: Peso de la Próstata.  
PP/PC: Relación Peso Próstata/Peso Corporal.  
Ps: Peso seco.  
PSA: Antígeno Específico de Próstata.  
Qmax: Flujo urinario máximo.  
Qprom: Flujo urinario promedio.  
REDOX: Reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno.  
RL: Radicales Libres.  
RT: Radioactividad Total.  
SARMs: Moduladores Selectivos de los Receptores Androgénicos.  
SHBG: Hormonas sexuales unidas a proteína.  
SOD: Superóxido Dismutasa.  
SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.  
STBU: Signos y síntomas del Tracto Bajo Urinario.  
T: Testosterona.  
TBA: Ácido Tiobarbitúrico.  
TCA: Ácido tricloroacético.  
Th: Células T helper.  
TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>  
Vmax: Velocidad Máxima.

## SINTESIS

La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), enfermedad común a partir de los 50 años, produce diversos síntomas del tracto bajo urinario (STBU) que afectan la calidad de vida. Su etiología multifactorial involucra fundamentalmente el incremento de la conversión de testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT) por acción de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática, desencadenando eventos que propician el agrandamiento de la próstata (componente estático de la HPB), y el aumento del tono del músculo liso de vejiga y próstata (componente dinámico) regulado por los adrenorreceptores (ADR)- $\alpha_1$ . El tratamiento farmacológico incluye los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa, antagonistas de ADR- $\alpha_1$ , su terapia combinada y la fitoterapia [fundamentalmente los extractos lipídicos de los frutos de la palma Saw palmetto (ELSP)].

La composición del extracto lipídico de los frutos de la palma real (D-004), presenta similitudes con la del ELSP. Este trabajo demuestra mecanismos que sustentan los efectos del D-004 en modelos de hiperplasia prostática (HP) y su eficacia potencial en el tratamiento de la entidad HPB/STBU.

El D-004 produjo una inhibición no competitiva y marcada de la 5 $\alpha$ - reductasa prostática, sin afectar el enlace de la <sup>3</sup>H-DHT a sus receptores prostáticos. Además, antagonizó no competitivamente la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (FE) en próstata de rata, mediada por los ADR- $\alpha_1$ . El D-004 y sus ácidos componentes oleico, láurico y mirístico, antagonizaron la respuesta contráctil inducida por FE en conducto deferente de rata, lo que indica que estos ácidos son responsables del efecto del D-004 en este modelo.

El D-004 inhibió la actividad de la 5-lipooxigenasa de modo incompetitivo y marcado, y redujo el peso del granuloma de algodón en rata (modelo de inflamación crónica), efecto potencialmente útil sobre la inflamación crónica vinculada a la HPB. El D-004 redujo la peroxidación lipídica y la oxidación proteica en diversos tejidos, mostrando capacidad secuestradora sobre los radicales OH\* y estimulación del sistema antioxidante endógeno. A nivel de próstata, sus efectos antioxidantes fueron más pronunciados en las próstatas de ratas con HP por T que en próstatas normales.

Por tanto, el D-004 debe beneficiar el componente estático y el dinámico de la entidad HPB/STBU, sustentando la expectativa de su eficacia potencial, y producir efectos pleiotrópicos (anti-inflamatorios, antioxidantes) que pueden constituir beneficios adicionales sobre el tejido prostático.

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1. Hiperplasia prostática benigna. Problema clínico y su contexto. ....	9
1.2. Epidemiología. ....	9
1.3. Factores de riesgo. ....	10
1.4. Etiología. ....	11
1.4.1. HPB y cambios hormonales del tejido prostático.....	11
1.4.2. HPB, STBU y aumento del tono $\alpha$ 1-adrenérgico.....	12
1.4.3. HPB e inflamación crónica.....	12
1.4.4. HPB y estrés oxidativo.....	13
1.4.5. Carácter multifactorial de la etiopatogenia de la HPB.....	14
1.5. Tratamientos. ....	14
1.5.1 Tratamientos quirúrgicos. ....	14
1.5.2. Tratamiento farmacológico. ....	15
1.5.2.1. Terapia con acción hormonal.....	15
1.5.2.2. Tratamiento con acción no hormonal.....	18
1.5.2.3 Terapias combinadas.....	20
1.5.2.4. Alternativas fitoterapéuticas. ....	21
1.5.2.5. D-004.....	24
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 Aspectos generales.....	26
2.1.1 Animales.....	26
2.1.2 Administración y dosis.....	26
2.1.3 Otras sustancias.....	26
2.1.4 Análisis Estadístico.....	27
2.2. Efectos del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática "in vitro". ....	27
2.3. Efectos del D-004 "in vitro" sobre receptores androgénicos en tejido prostático. ....	28
2.4. Efectos del D-004 "in vitro" sobre contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en próstata aislada de ratas. ....	29
2.5. Estudio comparativo de los efectos del D-004, ácido oleico, láurico y mirístico "in vitro" sobre las contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en conducto deferente aislado de ratas. ....	30
2.6. Estudio de los efectos anti-inflamatorios del D-004. ....	30

2.6.1. Evaluación de los efectos del D-004 en el modelo del granuloma por algodón. ....	31
2.6.2. Evaluación de los efectos del D-004 en el modelo de pleuresía por carragenina. ....	31
2.6.3. Determinación de la actividad “ <i>in vitro</i> ” de la 5-LOX en leucocitos Polimorfonucleares (PMNs). ....	32
<b>2.7. Efectos antioxidantes del D-004 sobre plasma y tejidos de rata.....</b>	<b>32</b>
2.7.1. Aspectos generales. ....	32
2.7.2. Efectos del D-004 “ <i>in vitro</i> ” sobre la PL en fracciones microsomales de hígado de ratas. ....	35
2.7.3. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la PL basal en plasma y en microsomas hepáticos. ....	36
2.7.4. Efectos del D-004 sobre la PL en próstata de ratas normales y de ratas con HP inducida con T. ....	36
2.7.5. Efectos del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con HP inducida por T. ....	37
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Efectos del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5<math>\alpha</math>-reductasa prostática “<i>in vitro</i>”. ....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Efectos del D-004 “<i>in vitro</i>” sobre receptores androgénicos de tejido prostático.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Efectos del D-004 “<i>in vitro</i>” sobre contracciones mediadas por los ADR-<math>\alpha</math>1 en próstata aislada de ratas. ....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. Efectos “<i>in vitro</i>” del D-004, de los ácidos oleico, láurico y mirístico y de la Adición conjunta de estos ácidos sobre las contracciones inducidas por FE en conducto deferente aislado de ratas.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5. Efectos anti-inflamatorios del D-004. ....</b>	<b>44</b>
3.5.1. Evaluación de efectos en los modelos de granuloma inducido por algodón y de pleuresía inducida por carragenina en ratas. ....	44
3.5.2. Evaluación de efectos sobre la actividad enzimática “ <i>in vitro</i> ” de 5-LOX.....	45
<b>6.6. Efectos antioxidantes del D-004 sobre plasma y tejidos de rata. ....</b>	<b>47</b>
6.6.1. Efectos del D-004 “ <i>in vitro</i> ” sobre la PL en fracciones microsomales de hígado de ratas. ....	47
6.6.2. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la PL basal en plasma y en microsomas hepáticos. ....	50
6.6.3. Efectos del D-004 sobre la PL en próstata de ratas normales y de ratas con HP inducida con T. ....	52

6.6.4. Efectos del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con HP inducida por T. ....	54
<b>CAPITULO 4. DISCUSION.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Consideraciones generales. ....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Evaluación del efecto antiandrogénico del D-004. ....</b>	<b>56</b>
<b>4.3. Efectos sobre las respuestas mediadas por los ADR-<math>\alpha</math>1. ....</b>	<b>60</b>
<b>4.4. Evaluación de los efectos anti-inflamatorios del D-004. ....</b>	<b>62</b>
<b>4.5. Evaluación de los efectos antioxidantes del D-004. ....</b>	<b>65</b>
<b>4.6. Consideraciones finales. ....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONES. ....</b>	<b>71</b>
<b>RECOMENDACIONES. ....</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....</b>	<b>73</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN.

La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) es una patología común en hombres mayores de 50 años que junto al cáncer de próstata y la prostatitis se encuentra entre los procesos patológicos más relevantes que afectan la próstata (Simpson, **2001**; Fernández y Pereira, **2008**; Alcaraz *et al.*, **2008**).

Ya que la próstata se localiza a la salida de la vejiga y rodea la primera parte de la uretra, cuando crece, tiende a causar obstrucción (De la Rosette *et al.*, **2002**; Emberton *et al.*, **2003**; Bhargava *et al.*, **2004**; Nix y Carson, **2007**; Roehrborn, **2008 a**). En consecuencia, la mayoría de los pacientes con HPB muestra signos y síntomas del tracto bajo urinario (STBU), como retención urinaria, disminución del volumen de orina y de la presión de la micción, latencia aumentada para orinar, nicturia, irritación o incontinencia vesical, que varían en intensidad y que en parte, aunque no exclusivamente, dependen del grado de obstrucción existente (Bhargava *et al.*, **2004**; Nix y Carson, **2007**; Roehrborn, **2008 a**; Zhu y McGinley, **2009**).

La etiología de la HPB, multifactorial y no del todo dilucidada, depende de cambios hormonales y no hormonales que ocurren durante el envejecimiento.

El cambio hormonal fundamental que propicia el desarrollo de la HPB, y en particular el aumento del tamaño de la próstata (componente mecánico de la enfermedad) es el aumento de la transformación de testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT), reacción mediada por la enzima 5  $\alpha$ -reductasa prostática, que ocurre durante el envejecimiento (Nix y Carson, **2007**; Roehrborn, **2008 a**; Zhu y McGinley, **2009**). Este aumento, unido a la reducción del catabolismo de la DHT que ocurre con la edad (Nix y Carson, **2007**; Zhu y McGinley, **2009**) conlleva al aumento de la concentración prostática de DHT, metabolito activo de la T. Entre los hechos que sustentan esta hipótesis patogénica se encuentra que la concentración de DHT es mayor en la próstata hipertrofiada que en el tejido prostático normal (Zhu y McGinley, **2009**) y que la enzima 5- $\alpha$  reductasa está más concentrada en la zona periuretral y en el estroma, dos áreas fundamentales en la génesis de la HPB (Paterson y Goldenberg, **2001**; Roehrborn, **2002**; Asociación Americana de Urología (AAU), **2003**; Zhu y McGinley, **2009**).

La DHT producida por la acción de la 5  $\alpha$ -reductasa se une a sus receptores androgénicos presentes en las membranas plasmáticas de las células prostáticas, entre otras, y este complejo receptor androgénico-DHT activa la secreción de factores de crecimiento que promueven la proliferación celular y por ende, el desarrollo de la hiperplasia y el crecimiento de la glándula prostática (Carson and Rittmaster, **2003**; Roehrborn, **2008 a**).

Otro cambio hormonal que ocurre durante el envejecimiento al cual se le atribuye un papel en la etiología de la HPB es el aumento de los niveles de estrógenos en el interior de la glándula, ya que por acción de la enzima aromatasa los andrógenos pueden metabolizarse de forma irreversible a estrógenos, aumentar la actividad de sustancias estimuladoras de la proliferación celular (Bonkhoff, **2003**; Benjamin *et al.*, **2004**; Chéchile, **2007**), (Bonkhoff, **2003**; Nelson *et al.*, **2003**, Benjamin *et al.*, **2004**; Chéchile, **2007**) y así contribuir al incremento del tamaño de la glándula prostática.

Por otra parte, el principal componente no hormonal de la entidad clínica HPB/STBU es el aumento del tono de la musculatura lisa de la vejiga y la próstata regulado por los adrenoreceptores (ADR)- $\alpha_1$  (Bartsch *et al.*, **2002**; Carson y Rittmaster, **2003**; Schwinn y Roehrborn, **2008**) que constituye el componente dinámico de

la HPB. Ha sido demostrado que en la próstata hipertrofiada existe un aumento de la población de ADR- $\alpha_1$  y del tono del músculo liso prostático (Yamada *et al.*, **1987**; Kawabe *et al.*, **1990**; Yamada *et al.*, **1987**; Jonlar *et al.*, **1994**; Carson y Rittmaster, **2003**; Roehrborn, **2008 a**; Schwinn y Roehrborn, **2008**).

Mientras el componente hormonal desempeña un papel crucial en el desarrollo de la hiperplasia y en el aumento del tamaño de la próstata, el aumento del tono de la musculatura lisa urogenital dependiente de los ADR- $\alpha_1$  es fundamental en el desarrollo de los STBU (Carson y Rittmaster, **2003**; Roehrborn, **2008 a**).

El tratamiento de la HPB incluye desde la vigilancia en espera (casos sin síntomas o con síntomas leves), hasta la cirugía, si bien el más utilizado es el farmacológico. Precisamente debido a la importancia de los principales factores hormonales y no hormonales en la etiología de la HPB y los STBU asociados, el tratamiento farmacológico se basa fundamentalmente en el empleo de los inhibidores de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa prostática (finasteride, dutasteride) (Edwards y Moore, **2002**; Sandhu y Te, **2004**; González y Vegas, **2007**), de los antagonistas de los ADR- $\alpha_1$  (alfuzosin doxazosin, prazosin, terazosin, tamsulosin) (Olke *et al.*, **2002**; Lepor, **2006**) y de la terapia combinada con ambos, recomendada en casos con HPB severa ó refractaria (Desgrandchamps, **2002**; Kirby y Andriole, **2003**; Doggrell, **2004**; Roehrborn *et al.*, **2008 b**; Schwinn y Roehrborn, **2008**).

El tratamiento con inhibidores de la 5  $\alpha$ -reductasa prostática a mediano plazo (6 – 12 meses) previene la progresión de la HPB, produciendo una reducción moderada del volumen prostático que no siempre se asocia a una mejoría de los síntomas. Entre las experiencias adversas (EA) asociadas a su uso se encuentran la disminución de la libido, impotencia y trastornos de la eyaculación (Edwards y Moore, **2002**; Sandhu y Te, **2004**; Lam *et al.*, **2003**; Bhargava *et al.*, **2004**; Roehrborn, **2008 a**; Roehrborn *et al.*, **2008 b**).

A diferencia de la relevancia clínica de los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática en el manejo de la HPB, otros agentes que afectan diferentes factores hormonales que coadyuvan al desarrollo de la enfermedad no han tenido gran repercusión clínica. Así, pese a que los antagonistas de los receptores androgénicos pueden reducir la proliferación celular asociada a la HPB (Abdel-Wahab, **2008**; Marks *et al.*, **2008**) estos agentes han tenido un uso limitado, ya que producen depleción de DHT en diferentes tejidos y no sólo en el tejido prostático (Narayan *et al.*, **1996**; Gao y James, **2007**). Por ello, se han desarrollado nuevos compuestos de este tipo que actúan selectivamente sobre el tejido prostático denominados moduladores selectivos de los receptores androgénicos (SARMs) que presentan promisorios efectos sobre la HPB, pero cuyo impacto clínico queda por demostrar (Gao y James, **2007**; J N. Miner *et al.*, **2007**; Khosla *et al.*, **2008**).

Por otra parte, pese a que la supresión de estrógenos por los inhibidores de la aromatasa pudiera ayudar al manejo de la HPB, el uso de estos agentes también se ha visto limitado por los diversos EA que producen, como pérdida del apetito, náuseas, vómitos, malestar general del cuerpo, hipersensibilidad en la piel, pérdida del pelo, entre otros (Bonkhoff, **2003**; Nelson *et al.*, **2003**; Benjamin *et al.*, **2004**; Dunkel, **2006**; Chéchile, **2007**; Gao y James, **2007**).

Por su parte, los antagonistas de los ADR- $\alpha_1$  suelen inducir rápido alivio de los síntomas, aunque su eficacia mantenida requiere del tratamiento a largo plazo. Entre los principales EA de esta clase terapéutica se encuentran la hipotensión ortostática, fatiga, mareos, disfunción eyaculatoria, alteraciones del músculo

iridiano, efectos que tratan de reducirse con el uso de antagonistas específicos de los ADR- $\alpha_{1A}$ , como el tamsulosin, si bien este medicamento tampoco está desprovisto de tales efectos (Olke *et al.*, **2002**; Llisterri *et al.*, **2005**; Lopor, **2006**; Van Dijk *et al.*, **2006**; Bar-Yosef *et al.*, **2008**; Prata *et al.*, **2009**).

Evidencias clínicas recientes han documentado el uso de los inhibidores de la 5-fosfodiesterasa (5-PDE) como el sildenafil y tadalafil para el alivio de los STBU asociados a la HPB. Este tipo de medicamentos constituye la primera línea en la terapia de la disfunción eréctil (DE), condición que suele coexistir con los STBU en hombres de avanzada edad, por lo cual su uso permite mejorar ambas condiciones (Wong *et al.*, **2009**). La 5-PDE presente en la próstata degrada al AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) y al GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), mensajeros intracelulares que desempeñan un importante papel en la regulación del tono muscular liso, manteniendo la adecuada relajación de la musculatura lisa del tejido prostático. Consecuentemente, los inhibidores de la 5-PDE evitan la degradación de estos nucleótidos cíclicos, lo que favorece la relajación del tejido prostático y por ende, la mejoría de los STBU (Andersson *et al.*, **2007**). Así, la administración aguda de sildenafil incrementa el flujo urinario máximo (Qmax) y promedio (Qprom) en pacientes en que coexisten la DE y la HPB (Güven *et al.*, **2009**).

Además de los factores hormonales y no hormonales mencionados, otros procesos, tales como la inflamación crónica y el aumento del estrés oxidativo han sido vinculados al desarrollo de la HPB. En tal sentido, evidencias crecientes demuestran la importancia de la inflamación crónica en la etiología y progresión de la HPB, por lo cual algunos autores consideran que la HPB es una enfermedad inflamatoria y que la reducción del grado de inflamación favorece el pronóstico clínico de la enfermedad (Wang *et al.*, **2008**).

Kramer y Marberger (**2007**) plantean que la presencia de las células de los infiltrados inflamatorios crónicos asociados a los nódulos hiperplásicos del tejido prostático, principalmente macrófagos y linfocitos T activados, son responsables de la producción de citocinas, como la interleucina-2 (IL-2), el factor IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) y otras que pueden sustentar el crecimiento fibromuscular que ocurre en la HPB (Kramer *et al.*, **2002**). Las citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, IL-8 y la IL-15 atraen las células T al área de lesión (Lee *et al.*, **2004**; Untergasser *et al.*, **2005**), con lesión concomitante y muerte de las células vecinas por mecanismos no dilucidados, lo que conlleva a lisis tisular formándose espacios que son reemplazados por nódulos fibromusculares (Díaz *et al.*, **2004**).

Aunque no existen razones convincentes que sustenten el aumento de la población de leucocitos en la HPB, diferentes hipótesis tratan de explicarlo. Estudios *in-situ* han demostrado una expresión elevada de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 e IL-17) en la HPB, lo que puede sostener la respuesta inmune e inducir el crecimiento fibromuscular bien por mecanismos autocrinos o paracrinos (Díaz *et al.*, **2004**; König *et al.*, **2004**) o bien induciendo la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2 (Wang *et al.*, **2004**). La reacción inmune puede ser activada y mediada por los macrófagos y células T (König *et al.*, **2004**).

Por el contrario, los tejidos de pacientes con HPB muestran una reducción de factores anti-inflamatorios como la citocina-1 inhibidora de los macrófagos (Díaz *et al.*, **2004**).

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune se debilita y la secreción hormonal se modifica durante el envejecimiento, resulta posible el deterioro de las células encargadas de suprimir el reconocimiento de los antígenos prostáticos, lo que lleva a la gradual infiltración de la próstata por los leucocitos y la subsecuente

cascada de eventos que conllevan a la HPB (Kramer *et al.*, 2007).

Por tanto, si la inflamación se asocia a la progresión de la HPB, es lógico pensar que los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) deben encontrarse entre los medicamentos utilizados para tratar la HPB, si bien hasta el presente su uso ha sido limitado. Estudios recientes, sin embargo, documentan que utilizar ibuprofeno junto al doxazosin (antagonista ADR- $\alpha$ 1) reduce los cambios histológicos que acompañan la progresión de la HPB (Minnery y Getzenberg, 2005), y que utilizar rofecoxib (inhibidor de la COX-2) junto al finasteride mejora los STBU más rápidamente que cuando se utiliza el finasteride solo (Di Silverio *et al.*, 2005).

Por otra parte, varias evidencias sugieren una relación causal entre el estrés oxidativo celular en el tejido prostático y el desarrollo de la HPB (Ekkehard *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Di Pasquale *et al.*, 2003; Merendino *et al.*, 2003; Aydin *et al.*, 2006; Aryal *et al.*, 2007), habiéndose demostrado que sustancias que reducen la hiperplasia prostática (HP) producen efectos antioxidantes que representan un beneficio adicional sobre la próstata hipertrofiada (Jonas *et al.*, 1998; Hass *et al.*, 1999; Siddiqui *et al.*, 2006; Almushata *et al.*, 2006; Calò *et al.*, 2006; Belostottskaia *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo, estado celular en que se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular por un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes (Humphries *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007), se debe a una excesiva producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y/o a una deficiencia en los mecanismos antioxidantes. Las EROs inducen daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y ADN (ácido desoxirribonucleico), y estimulan la producción de citocinas pro-inflamatorias. En contraste, la capacidad defensiva celular está determinada por la interacción dinámica entre las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) y moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (Toyokuni, 1999; Vaya y Aviram, 2001; Muller *et al.*, 2007).

Merendino y cols (2003) describieron la existencia de altos niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en pacientes con HPB y una correlación positiva entre este marcador de estrés oxidativo y las concentraciones plasmáticas del antígeno específico de próstata (PSA), indicador de hipertrofia y cáncer de próstata. Evidencias recientes apoyan la existencia de este vínculo entre HPB y estrés oxidativo, ya que en pacientes con HPB los niveles plasmáticos de MDA son mayores y los de moléculas antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico) menores que en voluntarios sanos, existiendo una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de MDA y de dichas moléculas antioxidantes (Aryal *et al.*, 2007).

Además, se ha demostrado que sustancias que previenen la HP y/o alivian los STBU presentan efectos antioxidantes (Jonas *et al.*, 1998; Hass *et al.*, 1999; Siddiqui *et al.*, 2005; Almushata *et al.*, 2006; Calò *et al.*, 2006; Calo *et al.*, 2007; Belostottskaia *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2008; Curtis *et al.*, 2008 a). Entre ellas merece destacarse el doxazosin, antagonista de los ADR- $\alpha$ 1 que también presenta efectos antioxidantes que favorecen una menor producción de las proteínas oxidadas que participan en la proliferación y en el remodelado celular característico de la HPB (Calo *et al.*, 2007).

La fitoterapia se enmarca dentro de los tratamientos farmacológicos de la entidad HPB/STBU, destacándose el uso de los extractos de los frutos de saw palmetto (*Serenoa repens*), de la resina del árbol *Pygeum africanum* y en menor grado, de las raíces de *Urtica dioica* (Wilt *et al.*, 2000; Koch, 2001; Curtis, 2008 b).

Dentro de ellas, el uso de los extractos lipídicos de los frutos de SP (ELSP) (*Serenoa repens* B) palma de la familia *Arecaceae* (Lowe, **2001**; Gordon y Shaughnessy, **2003**; Curtis, **2008** b) es la más utilizada.

El ELSP es una mezcla de ácidos grasos, principalmente láurico, mirístico y oleico, que contiene en menor proporción los ésteres de estos ácidos, esteroides y alcoholes alifáticos de alto peso molecular (Bombardelli *et al.*, **1997**; Rockville, **2005** a). El mecanismo que sustenta la acción farmacológica del ELSP es multifactorial e involucra como aspectos fundamentales la inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa prostática y el antagonismo de los ADR- $\alpha_1$ - (Gerber *et al.*, **2001**; Debruyne *et al.*, **2002**; Abe *et al.*, **2009** a). Además, presenta actividad anti-inflamatoria que involucra la inhibición de las enzimas COX y 5-lipooxigenasa (5-LOX), lo que contribuye a su eficacia (Mogul *et al.*, **2000**; Potenziani, **2003**; Raman *et al.*, **2007**; Curtis, **2008** b). El ELSP también posee efectos anti-proliferativos, ya que inhibe la producción de los factores de crecimiento fibroblástico ( $\beta$ -FCF) y epidérmico (FCE) que inducen la proliferación de las células prostáticas (Winslow y Kroll, **1998**; Curtis, **2008** b, Baron *et al.*, **2009**).

Varios estudios han mostrado que la adición del ELSP inhibe la actividad de la  $5\alpha$ -reductasa en cultivos de fibroblastos (Sultan *et al.*, **1984**), en enzimas semipurificadas de origen prostático (Rhodes *et al.*, **1993**) y en cultivos de células hiperplásicas de próstata (Bayne *et al.*, **1999**), evidencias que sustentan que su eficacia en el tratamiento de la HPB se relaciona con la inhibición de  $5\alpha$ -reductasa prostática. De modo consistente, otros estudios mostraron que tanto el ELSP como algunos de sus componentes (ácidos oleico, láurico, mirístico y linoleico) inhiben la actividad de la enzima (Raynaud *et al.*, **2000**; Abe *et al.*, **2009** b).

La eficacia del ELSP en el manejo de la HPB, sin embargo, también se ha vinculado al bloqueo “*in vitro*” e “*in vivo*” de respuestas mediadas por los ADR- $\alpha_1$  (Goepel *et al.*, **1999**; Goepel *et al.*, **2001**). Además, recientemente se demostró la capacidad del ELSP de unirse a los ADR- $\alpha_1$ , lo que confirma que sus efectos para relajar la musculatura lisa del tracto bajo urinario y aliviar los STBU incluyen un bloqueo a este nivel, si bien el hecho que también se enlace a los receptores muscarínicos y a los receptores 1,4 DHP (dihidropiridina) acoplados a canales de calcio indica un efecto no selectivo (Abe *et al.*, **2009** b).

Estudios recientes han referido que el ELSP produce efectos antioxidantes que podrían contribuir a su eficacia en el manejo de la HPB, consistente con resultados previos que habían demostrado que los ácidos grasos saturados e insaturados de cadena media (8 - 24 átomos de carbono) inhiben la peroxidación lipídica (PL) (Henry *et al.*, **2000**; Perona *et al.*, **2005**; Chapkin *et al.*, **2007**).

Estudios clínicos controlados con placebo y comparativos, han demostrado la eficacia del tratamiento con ELSP (320 mg/d) durante 1-6 meses en el tratamiento de la HPB (Descotes *et al.*, **1995**; Carraro *et al.*, **1996**; Braeckman *et al.*, **1997**; Bauer *et al.*, **1999**; Marks *et al.*, **2000**; Gerber *et al.*, **2001**; Debruyne *et al.*, **2002**; Curtis *et al.*, **2008** a). El ELSP ha demostrado reducir la frecuencia de micciones diurnas y nocturnas, aumentar el Qmax y mejorar el volumen residual post-micción y los STBU respecto al placebo (Descotes *et al.*, **1995**; Braeckman *et al.*, **1997**; Bauer *et al.*, **1999**; Marks *et al.*, **2000**; Gerber *et al.*, **2001**).

Sin embargo, algunos estudios mostraron que el ELSP no resultó efectivo con respecto al placebo, lo cual parece atribuirse, además de a posibles diferencias en los extractos usados, a la inclusión de casos con HPB más severa (Willettts *et al.*, **2003**; Bent *et al.*, **2006**).

Un estudio comparativo mostró que el ELSP (320 mg/d) y el finasteride (5 mg/d) administrados por 6 meses a pacientes con HPB mejoraron los STBU, el Qmax y redujeron el volumen prostático, y aunque los cambios fueron más favorables con finasteride, el porcentaje de casos con aumentos del flujo máximo >30% y la mejoría de síntomas fue similar en ambos grupos (Carraro *et al.*, 1996). Otros estudios han revelado que la eficacia del ELSP es comparable a la de los bloqueadores de los ADR  $\alpha_1$ . (Debruyne *et al.*, 2002; Debruyne *et al.*, 2004). Varios meta-análisis sobre la eficacia de ELSP en la HPB han sido positivos (Wilt *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2000; Wilt *et al.*, 2002 a; Boyle *et al.*, 2005), lo que concuerda con los resultados de un estudio europeo multinacional (Hutchison *et al.*, 2006), si bien una reciente revisión plantea que las evidencias de su eficacia son insuficientes (Tacklind *et al.*, 2009).

Los datos de la toxicología preclínica del ELSP son escasos, pero se acepta que es bien tolerado. Los estudios clínicos muestran una frecuencia de EA entre un 2 y un 4 %, y una frecuencia de impotencia, reducción de la libido, disuria y síntomas gastrointestinales menor, y una frecuencia de hipotensión postural, dolor de cabeza y dolor de espalda mayor que el finasteride (Rockville, 2005 a). El ELSP está aprobado para tratar la HPB en numerosos países y es uno de los productos naturales más vendidos en los últimos años.

Teniendo en cuenta que en Cuba existen numerosas palmas Arecacea, a la cual pertenece saw palmetto, en nuestro centro se realizó la purificación de los extractos lipídicos de los frutos de 3 de las palmas más abundantes en nuestro país y se evaluaron sus efectos farmacológicos en la HP inducida por T. De acuerdo a la abundancia de la fuente, la composición del extracto, el rendimiento del proceso y los datos de eficacia experimental, se decidió continuar el desarrollo del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*), estimándose que podría presentar efectos similares a los del ELSP.

El análisis químico del D-004 demostró que éste contenía, al igual que el ELSP, una mezcla reproducible de ácidos grasos, fundamentalmente oleico, láurico, mirístico, palmítico y linoleico, mientras los ácidos palmitoleico, caprílico, cáprico y esteárico se encuentran en menor proporción (Arruzazabala *et al.*, 2008 a).

Un estudio farmacocinético realizado con D-004 enriquecido con H<sup>3</sup>-oleico demostró que la radioactividad total (RT) se distribuye rápida y notablemente, pero de modo diferenciado, en diferentes tejidos y que la mayor retención de la RT ocurrió en el tejido prostático (Pérez *et al.*, 2006), lo que concuerda con lo reportado para el ELSP por Chevalier *et al.* (1997) y además resulta beneficioso, ya que la próstata es el órgano diana de los tratamientos destinados al manejo de la HPB.

Los estudios de farmacodinamia han demostrado la eficacia del D-004 en el tratamiento de la HP inducida en roedores por T (Arruzazabala *et al.*, 2008 a; Arruzazabala *et al.*, 2004; Carbajal *et al.*, 2004; Noa *et al.*, 2005), no así la inducida por DHT (Carbajal *et al.*, 2004), así como en la HP atípica inducida por fenilefrina (FE) en ratas (Arruzazabala *et al.*, 2006). Las experiencias que han comparado los efectos del tratamiento oral (400 mg/kg) con D-004 y con el ELSP administrados durante 14 días sobre la HP inducida por T ó por FE en ratas han mostrado que el D-004 es moderadamente más efectivo que el ELSP (Arruzazabala *et al.*, 2004; Arruzazabala *et al.*, 2006).

La terapia combinada con dosis efectivas mínimas de finasteride (0.5 mg/kg) y D-004 (200 mg/kg) ha mostrado beneficios aditivos en reducir el crecimiento de la próstata inducido por T con respecto a cada monoterapia (Molina *et al.*, 2007). Por otra parte, el D-004 y el tamsulosin previnieron la reducción del

volumen de micción en el modelo de HP atípica inducida por FE de modo dependiente de la dosis, si bien la terapia combinada con ambas sustancias mostró un efecto mayor que el de cada monoterapia, interacción que resultó aditiva, no sinérgica (Arruzazabala *et al.*, 2008 b).

Los estudios de toxicidad por dosis únicas han mostrado que el D-004 no es una sustancia tóxica, ya que la dosis de 2000 mg/kg no produjo muertes ni signos de toxicidad en roedores y conejos (Gámez *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007). El estudio de toxicidad por dosis orales repetidas de D-004 (500-2000 mg/kg) durante 90 días en ratas no mostró evidencias de toxicidad ni a la dosis superior, la cual no indujo efectos adversos observables (NOAEL) (Gámez *et al.*, 2005). Similares resultados se obtuvieron en ratones (Gutiérrez *et al.*, 2008) y en un estudio de toxicidad crónica (12 meses) en ratas (Gámez, datos no publicados).

La evaluación del potencial genotóxico mediante el ensayo de Ames y micronúcleos en médula ósea de ratón no mostraron evidencias de genotoxicidad asociada al D-004 (Gutiérrez *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005). Por otra parte, otros estudios de toxicología especial han demostrado que el D-004 no posee efectos estrogénicos o antiestrogénicos (Gutiérrez *et al.*, 2008), no modifica la actividad sexual en la rata macho (Fernández *et al.*, 2008), ni diversos patrones conductuales en roedores (Carbajal *et al.*, 2007).

Dos estudios clínicos en hombres sanos han demostrado que el tratamiento oral con dosis únicas o repetidas de D-004 (320 – 960 mg/d) ha resultado bien tolerado (López *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008).

## **2.1 Problema.**

La HPB, enfermedad común en hombres mayores de 50 años, conlleva a padecer STBU que afectan la calidad de vida de estos pacientes, muchos de ellos dentro de la edad laboral activa. El tratamiento de la entidad HPB/STBU abarca, en dependencia del grado de complicación del paciente, desde la vigilancia en espera hasta el tratamiento quirúrgico, si bien el tratamiento farmacológico es el más utilizado.

Los principales medicamentos utilizados para tratar la HPB y los STBU son los inhibidores de la 5  $\alpha$ -reductasa, cuyo efecto fundamental se produce sobre la progresión del agrandamiento prostático, y los antagonistas de los ADR $\alpha$ -1, más efectivos en mejorar los STBU. Ambas clases terapéuticas por separado producen diversos EA. Aunque la cirugía es la solución más eficaz, no se encuentra exenta de riesgos, por lo que se recomienda el uso de la terapia combinada con inhibidores de la 5  $\alpha$ -reductasa y antagonistas de los ADR $\alpha$ -1 en los casos más complicados, si bien ello aumenta la frecuencia de EA. Más recientemente se ha incorporado el uso adicional de AINEs, los que presentan su propio patrón de EA, principalmente gastrointestinales (AINEs tradicionales) y cardiovasculares (inhibidores de la COX-2).

Nuestro país presenta ciertas restricciones para adquirir medicamentos para el manejo de la HPB en cantidades suficientes y no todos los casos deben ni pueden encontrar su solución en la cirugía. El hecho que a nivel internacional se utilice ampliamente la fitoterapia, en especial el ELSP, para el manejo de la HPB y los STBU sustenta que una estrategia similar pudiera utilizarse en nuestra población, máxime si se tiene en cuenta que el ELSP se obtiene de los frutos de una palma filogenéticamente cercana a nuestra palma real, muy abundante en nuestro medio.

Tales antecedentes justificaron el desarrollo de una sustancia que consiste en un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), con similitudes en su composición química con la del ELSP, que pueda ser utilizada en el manejo de la HPB.

Para ello, un aspecto importante consiste en demostrar las bases de su acción farmacodinámica previamente demostrada ya que el tratamiento oral con D-004 previno la HP inducida experimentalmente en roedores. El problema que se aborda en el presente trabajo, por tanto, consiste en investigar si el D-004 comparte el (los) mecanismo (s) que permiten esperar eficacia en el tratamiento de la HPB y los STBU asociados.

## **2.2 Hipótesis de trabajo.**

Teniendo en cuenta los mecanismos fundamentales de los medicamentos utilizados para tratar la HPB, la semejanza en el origen y la composición del D-004 y el ELSP, se supone que la eficacia experimental del D-004 responda a un mecanismo multifactorial que involucre efectos antiandrogénicos y el antagonismo de la respuesta contráctil mediada por los  $ADR\alpha-1$ , efectos de utilidad potencial sobre los componentes mecánico y dinámico de la enfermedad, respectivamente, así como efectos pleiotrópicos favorables (anti-inflamatorios, antioxidantes) que puedan contribuir a prevenir la progresión de la enfermedad.

## **2.3 Originalidad del Trabajo:**

La originalidad científica del tema se sustenta no sólo porque el D-004 es una nueva sustancia purificada del fruto de la palma real consistente en una mezcla de ácidos grasos, lo cual está avalado por el alto número de patentes concedidas, sino porque ésta tesis demuestra, por primera vez, los mecanismos que contribuyen a su eficacia potencial en el manejo de la HPB, tales como la inhibición de la actividad de la  $5\alpha$ -reductasa prostática y el antagonismo de respuestas mediadas por los  $ADR\alpha-1$ , incluyéndose el primer reporte del efecto antagonista de los ácidos láurico, oleico y mirístico sobre estas respuestas.

Además, se demuestra que el D-004 produce efectos antiinflamatorios y antioxidantes que pueden contribuir adicionalmente a su eficacia. La originalidad se refuerza por las publicaciones en revistas de impacto.

## **2.4 Objetivos**

### **Objetivos generales.**

Investigar los posibles mecanismos involucrados en los efectos del D-004 sobre la HP en modelos experimentales y que pudieran justificar su eficacia en el manejo de la entidad HPB/STBU.

### **Objetivos específicos.**

Evaluar el efecto del D-004 sobre:

- 1- La actividad enzimática de la  $5\alpha$ -reductasa prostática en ratas.
- 2- El enlace de la DHT a receptores androgénicos en tejido prostático de ratas.
- 3- Respuestas contráctiles mediadas por los  $ADR-\alpha 1$  en próstatas aisladas y en conducto deferente de rata. Demostrar el efecto del D-004 y los ácidos oleico, láurico y mirístico sobre estas últimas.
- 4- Modelos de inflamación (granuloma por algodón & pleuresía por carragenina en ratas) y sobre la actividad de la enzima 5-LOX.
- 5- Marcadores oxidativos en modelos experimentales.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Hiperplasia prostática benigna. Problema clínico y su contexto.

La HPB, el cáncer de próstata y la prostatitis son los principales procesos patológicos que afectan la próstata (Simpson, 2001; Fernández y Pereira, 2008; Alcaraz *et al.*, 2008).

La HPB se define histológicamente como el crecimiento no maligno e incontrolado del tejido prostático que involucra los elementos estromales y glandulares de la glándula y que afecta la zona de transición que rodea a la uretra. Por su localización anatómica, el crecimiento incontrolado de la próstata tiende a causar obstrucción urinaria (De la Rosette *et al.*, 2002; Emberton *et al.*, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a) y a producir STBU que varían en intensidad y que en parte, aunque no exclusivamente, dependen del grado de obstrucción que exista. Los STBU incluyen disminución del volumen y presión de la micción, aumento de su latencia, nicturia, irritación o incontinencia vesical, retención urinaria (Bhargava *et al.*, 2004; Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a, Zhu y McGinley, 2009) y la HPB puede producir complicaciones como infecciones urinarias debido al vaciamiento incompleto de la vejiga (Clinton, 1994; Oesterling, 1995; Bhargava *et al.*, 2004; Curtis *et al.*, 2008 a).

### 1.2. Epidemiología

La HPB es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en el hombre que envejece, junto a la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria, el cáncer de próstata, la osteoartritis y la depresión (Nikel, 2006; Uribe, 2006; Góngora *et al.*, 2006; World Health, 2007; Rouillon, 2008) y resulta frecuente su coexistencia con enfermedades cardiovasculares, metabólicas (obesidad, diabetes mellitus) y con la DE (Colon y Payne, 2008; Safarinejed, 2008; Guven *et al.*, 2009). De hecho, la HPB es un relevante problema de salud pública y la más frecuente de las patologías que afectan la próstata (Nandeesha, 2008).

La incidencia de la HPB aumenta con la edad y puede sobrepasar el 80% en hombres de avanzada edad (Simpson, 2001; Fernández y Pereira, 2008; Alcaraz *et al.*, 2008; Safarinejed, 2008). En realidad, la prevalencia de HPB histológicamente diagnosticada aparece cerca de un 8% en hombres entre los 31 y 40 años, entre un 40 y un 50% en hombres entre 51 y 60 años y en un 80% en hombres con más de 80 años (Berry *et al.*, 1984; Guess *et al.*, 1990; Rodríguez, 2002; Curtis *et al.*, 2008 a). Por otra parte, diversas evidencias sustentan la relación entre la HPB clínicamente diagnosticada y el aumento de la edad en diferentes grupos poblacionales (Kaplan *et al.*, 1998), de modo que la prevalencia de STBU moderados o severos en hombres en la quinta, sexta, séptima y octava década de vida es de un 26%, 33%, 41% y 46%, respectivamente (Chute *et al.*, 1993; Moncada, 2003). La correlación positiva entre la progresión de la HPB y la edad se sustenta por cambios en la expresión de los genes que codifican para la síntesis de proteínas o enzimas implicadas en la proliferación celular y en el estrés oxidativo que ocurren durante el envejecimiento, mecanismos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Bethel *et al.*, 2009).

Durante el envejecimiento la zona de transición del tejido prostático sufre un proceso de remodelado multifactorial, con hipertrofia de las células basales y secreción alterada de las células luminarias que favorece la calcificación e inflamación, infiltración de linfocitos y producción de citocinas proinflamatorias, aumento en la producción de EROs que dañan las células del epitelio y del estroma y aumento en la secreción de factores de crecimiento que propician la proliferación celular (Untergasser *et al.*, 2005).

Aunque la elevada frecuencia de la HPB es un hecho común a nivel internacional, existen diferencias en distintos países y poblaciones, hecho en el que influyen factores genéticos y de estilo de vida.

Estudios de la pasada década refirieron una incidencia de un 38% y un 56% en Estados Unidos y en Japón, respectivamente, lo que confirma la alta frecuencia de la enfermedad (Sagnier *et al.*, 1996).

Estudios realizados en afro-americanos, hispanos y caucásicos, habían mostrado un mayor volumen de la zona de transición con respecto al volumen total de la próstata en afro-americanos que en las otras dos etnias, lo que indicaba una tendencia mayor a presentar el componente mecánico de la HPB (Kaplan *et al.*, 1998). Estudios epidemiológicos recientes confirmaron una alta prevalencia de HPB en la población afro-americana y latina de los Estados Unidos (Colon y Payne, 2008; Hoke y McWilliams, 2008; Sarma *et al.*, 2008; Howard *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008) que se atribuye a una predisposición genética relacionada con una mayor expresión de los receptores androgénicos y a una mayor incidencia de patologías concomitantes, como hipertensión, DE, diabetes, resistencia a la insulina y enfermedades renales (Colon y Payne, 2008). A ello se suman factores socioeconómicos que afectan a estos grupos poblacionales y que limitan una atención médica adecuada, favorecen la progresión de la HPB (Martínez *et al.*, 2008) y contribuyen a que la solución quirúrgica en afro-americanos sea un 40% mayor que en hombres de raza blanca (Howard *et al.*, 2008).

En Europa existe una alta prevalencia de la enfermedad, que acorde a la manifestación de los STBU es de un 14%, 16.6%, 18% y 23.1% en Francia, España, Escocia y Croacia, respectivamente (Sagnier *et al.*, 1996; Galic y Simunovic, 2008; Fernández *et al.*, 2009), y que ha sido asociada al consumo de una dieta rica en grasa saturada (Serrano, 2004; Berges, 2008). Un estudio en hombres croatas con HPB mostró que presentaban muy bajos niveles de Vitamina D, inhibidora de la proliferación celular, lo que podría deberse a algún déficit dietético y/o a una baja exposición a los rayos solares (Galic y Simunovic, 2008).

### **1.3. Factores de riesgo.**

Pese a que la HPB es un relevante problema de salud pública que afecta la calidad de vida de los hombres que la padecen, se conoce relativamente poco acerca de sus factores de riesgo (FRs), entre los cuales el más importante es la edad avanzada que suele acompañarse de reducción en la funcionalidad testicular (Barry y Roehrborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a; Zhu y McGinley, 2009).

Los FRs de padecer la enfermedad pueden ser no modificables ó modificables en mayor o menor grado. La edad avanzada, la raza negra y la predisposición genética asociada a una historia familiar de la enfermedad son FR no modificables, mientras que FR como la diabetes mellitus, hiperinsulinemia, hipertensión, obesidad y dislipidemia pueden ser controlados en mayor o menor medida con tratamientos adecuados, y otros como un inadecuado estilo de vida, dieta pobre en vegetales y frutas, excesiva en grasas, sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo son modificables (Nandeesh, 2008; Jacobsen, 2007; Hoke y McWilliams, 2008).

Entre los FR genéticos se encuentran variaciones en los genes que codifican para la formación de la enzima glutatión S-transferasa (GST) (presente en las isoformas GSTM1, GSTM3 y GSTT1) que pueden alterar su eficiencia catalítica en la detoxificación de los compuestos tóxicos presentes en el humo del cigarro. La ausencia del genotipo GSTM1 en hombres con hábitos de tabaquismo y alcoholismo constituye un FR para la HPB (Mittal *et al.*, 2009).

Por otra parte, entre las alteraciones metabólicas identificadas como FRs independientes para la HPB se encuentran los altos niveles séricos de insulina y estradiol, confiriéndole un papel relevante a la hiperinsulinemia (Hammarsten *et al.*, 2009). Asimismo, se ha sugerido que la relación entre obesidad y HPB involucra una compleja interacción entre factores que afectan la captación de glucosa y la sensibilidad a la insulina (Schenk *et al.*, 2009). Además, mientras péptidos involucrados en la proliferación celular y en la apoptosis como el factor de crecimiento tipo insulina (IGFI) se correlacionan de modo inverso con la HPB, lo opuesto ocurre con el cociente IGFI/ factor de crecimiento tipo insulina unido a proteína (IGFBP3), por lo cual un alto cociente IGFI/IGBP3 constituye otro FR metabólico de HPB (Neuhouser *et al.*, 2008).

Por otra parte, la dieta es uno de los FR modificables más importantes, ya que mientras un alto consumo de calorías favorece la HPB (Meigs *et al.*, 2001), el consumo de una dieta sana rica en vegetales se relaciona inversamente con la incidencia de HPB (Galeone *et al.*, 2007).

Mientras que la actividad física se correlaciona inversamente con la HPB, el sedentarismo es un FR modificable de la enfermedad, recomendándose el aumento de la actividad física, que además reduce el riesgo de padecer otras enfermedades, entre las medidas preventivas de la HPB (Lagiou *et al.*, 2008).

#### **1.4. Etiología.**

La etiología de la HPB es multifactorial y no del todo dilucidada, pero se conoce que está asociada a cambios hormonales y no hormonales que ocurren durante el envejecimiento. Los cambios hormonales conducen al agrandamiento de la próstata (componente estático o mecánico de la enfermedad), y los cambios no hormonales (componente dinámico), relacionados con el tono del músculo liso presente en próstata y vejiga (Oesterling, 1995; Ramos *et al.*, 2001; González y Vegas, 2007; Aceo *et al.*, 2008), propician los STBU.

##### **1.4.1. HPB y cambios hormonales del tejido prostático.**

El cambio hormonal más importante que conduce al desarrollo de la HPB es el aumento de la conversión de la T en DHT por la acción de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática, la cual se encuentra más concentrada en la zona periuretral y en el estroma, dos áreas fundamentales en la génesis de la HPB (Paterson y Goldenberg, 2001; Roehrborn, 2002). La próstata contiene dos isoformas de la enzima: tipo 1 y tipo 2; pero la isoenzima 2 es la más potente en producir DHT y además la más abundante y (Bartsch *et al.*, 2000; Uribe, 2006; Rick, 2007), fundamentalmente en el estroma prostático donde actúa de forma autocrina, encontrándose en menor cantidad en el epitelio glandular, donde actúa de forma paracrina (Uribe, 2006).

Con el envejecimiento, a la par del aumento de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática, se reduce el catabolismo de la DHT, todo lo cual promueve el aumento de las concentraciones prostáticas de DHT (Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a; Zhu y McGinley, 2009). La DHT se une a los receptores androgénicos presentes en las membranas plasmáticas de células de diferentes tejidos, principalmente en la próstata donde se encuentra en mayores concentraciones, y el complejo receptor androgénico-DHT activa la síntesis proteica y la secreción de factores de crecimiento celular que promueven la proliferación celular y con ello el crecimiento excesivo de la glándula prostática, lo que conduce a la hiperplasia (Carson y Rittmaster, 2003; Roehrborn, 2008 a).

La transformación irreversible de andrógenos a estrógenos por acción de la aromatasa que ocurre en el interior de la glándula prostática durante el envejecimiento es otro cambio hormonal que contribuye a la patogenia de la HPB (Bonkhoff, 2003; Nelson *et al.*, 2003; Benjamin *et al.*, 2004; Chéchile, 2007).

Este cambio conduce al aumento de las concentraciones prostáticas de estrógenos, los que se unen a los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  estrogénicos presentes en el estroma y en las células luminarias del epitelio, respectivamente, y el complejo estrógeno-receptor activa la secreción de sustancias estimuladoras de la proliferación celular, propiciando la hiperplasia y el agrandamiento de la próstata (Bonkhoff, **2003**; Nelson *et al.*, **2003**).

El papel de los estrógenos en la etiología de la HPB es más evidente cuando el hombre presenta niveles altos de estrógenos y relativamente bajos de T libre, o cuando los tejidos prostáticos se vuelven más sensibles a los estrógenos y menos a la DHT (Barry *et al.*, **1992**; AAU, **2003**; Kaplan *et al.*, **2006 b**).

En conjunto, los cambios hormonales que ocurren en la próstata condicionan en primer lugar un aumento de las concentraciones de andrógenos y adicionalmente de estrógenos en el tejido prostático, lo que promueve el agrandamiento de la glándula prostática (Barry y Roehrborn, **2001**; Dull *et al.*, **2002**; Thorpe y Neal, **2003**; Carson y Rittmaster, **2003**; Bhargava *et al.*, **2004**; Nix y Carson, **2007**; Roehrborn, **2008 a**; Zhu y McGinley, **2009**).

#### **1.4.2. HPB, STBU y aumento del tono $\alpha 1$ -adrenergico.**

El aumento de la innervación simpática a través de los ADR- $\alpha 1$  de diferentes subtipos ( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$  y  $\alpha 1D$ ) presentes en próstata, vejiga y uretra (componente dinámico de la HPB) representa el principal cambio no hormonal en la etiología de la HPB y en particular, en la aparición de los STBU (Lepor *et al.*, **1993**; Zhao *et al.*, **1996**; Chen *et al.*, **2004**; Lepor, **2006**), ya que los ADR- $\alpha 1$  regulan el tono o grado de contracción de la musculatura lisa de la vejiga y de la próstata (Bartsch *et al.*, **2002**; Carson y Rittmaster, **2003**; Schwinn y Roehrborn, **2008**).

Evidencias experimentales que documentan el papel de los ADR- $\alpha 1$  en el desarrollo de la HPB muestran que la denervación experimental de la próstata induce atrofia de los acinis y una disminución significativa de la actividad secretora de la glándula (Martínez-Piñeiro *et al.*, **1993**; Uribe, **2006**). Así, la presencia de una población aumentada de ADR- $\alpha 1$  en la próstata hipertrofiada, uretra y vejiga, conduce a una mayor contracción de estos tejidos contribuyendo decisivamente al desarrollo de los STBU que acompañan a la HPB (Barry y Roehrborn, **2001**; Dull *et al.*, **2002**; Thorpe y Neal, **2003**; Carson y Rittmaster, **2003**; Bhargava *et al.*, **2004**; Schwinn y Roehrborn, **2008**).

#### **1.4.3. HPB e inflamación crónica.**

Además de los cambios hormonales y no hormonales que promueven el desarrollo de la HPB, existen otros procesos vinculados a su etiopatogenia como son la inflamación crónica y el estrés oxidativo.

Recientemente la HPB ha sido considerada una enfermedad inflamatoria (Wang *et al.*, **2008**), describiéndose la presencia de las células de los infiltrados inflamatorios crónicos en los nódulos hiperplásicos del tejido prostático, principalmente macrófagos y linfocitos T activados los cuales son responsables de la producción de citocinas, como la interleucina-2 (IL-2), el factor  $IFN\gamma$  y otras que pueden sustentar el crecimiento fibromuscular que ocurre en la HPB (Kramer *et al.*, **2002**).

Las citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8 y la IL-15 atraen el proceso de inmigración de las células T al área de lesión (Untergasser *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004), con ataque concomitante y muerte de las células vecinas por mecanismos no dilucidados, ocurriendo lisis tisular y creando espacios que son reemplazados por nódulos fibromusculares de acuerdo a un patrón de respuesta inmune específica tipo Th0/Th3 (Steiner *et al.*, 2003).

Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar el aumento de la población de leucocitos en la HPB. Una elevada expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 e IL-17) en la próstata hiperplásica contribuye a mantener la respuesta inmune e inducir el crecimiento fibromuscular por mecanismos autocrinos o paracrinos (Steiner *et al.*, 2003; König *et al.*, 2004) o bien por inducir la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2 (Wang *et al.*, 2004). La reacción inmune puede ser activada y mediada por los macrófagos y células T (König *et al.*, 2004). Además, los tejidos de pacientes con HPB muestran una reducción de factores anti-inflamatorios como la citocina-1 inhibidora de los macrófagos (Kahehi *et al.*, 2004).

La infiltración gradual de leucocitos en la próstata y la subsecuente cascada de eventos que conllevan a la HPB pudiera ser la consecuencia de un deterioro de las células encargadas de suprimir el reconocimiento de los antígenos prostáticos debido a al debilitamiento de la respuesta inmune y a los cambios hormonales que ocurren durante el envejecimiento (Kramer *et al.*, 2007).

#### **1.4.4. HPB y estrés oxidativo.**

Un aumento del estrés oxidativo ha sido relacionado con la patogénesis de diferentes enfermedades (Yoshikawa, 2002; Valenzuela *et al.*, 2003; Augusto *et al.*, 2007), en particular, en los últimos años se han reportado evidencias experimentales y clínicas de una relación causal entre la HPB y el estrés oxidativo (Ekkehard *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Di Pasquale *et al.*, 2003; Merendino *et al.*, 2003; Aydin *et al.*, 2006; Aryal *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el que se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular (Sahnoun *et al.*, 1997; Humphries *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007), debido a una excesiva producción de EROs y/o a una deficiencia en los mecanismos antioxidantes.

Los radicales libres se producen continuamente por medio de reacciones de oxidación-reducción que ocurren en el metabolismo celular normal, en reacciones inflamatorias controladas y/o como respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, entre otros (Céspedes y Sánchez, 2000; González-Urbaneja, 2006; Araujo *et al.*, 2007). Dentro de los agentes pro-oxidantes se encuentran los radicales libres de oxígeno, como el radical  $O_2^{*-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^*$ ,  $1O_2$ ,  $ON^*$ , HOCL, entre otras (Céspedes y Sánchez, 2000; González-Urbaneja, 2006; Muller *et al.*, 2007), que causan daño sobre los lípidos, proteínas y ADN, y propician una cadena de eventos que originan la lesión celular. Estos procesos se aceleran por metales de transición como el Fe y el Cu y enzimas específicas, como monoxigenasas y ciertas oxidasas (Céspedes y Sánchez, 2000; González-Urbaneja, 2006; Muller *et al.*, 2007).

Estas reacciones son contrarrestadas por sistemas antioxidantes endógenos como las enzimas SOD, CAT, GSH-Px y GSH-R, la transferrina, GSH y la ceruloplasmina, y por sistemas exógenos como las vitaminas A, E y C, y los metales cobre y selenio (Toyokuni, 1999; Annuk *et al.*, 2001; Vaya y Aviram, 2001; Muller *et*

*al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2007), pero tal protección no es total (Sahnoun *et al.*, 1997; Céspedes y Sánchez, 2000; González-Urbaneja, 2006; Araujo *et al.*, 2007).

Además, pese a que los sistemas antioxidantes endógenos contrarrestan la acción y formación de los radicales libres y EROs, con el envejecimiento su producción aumenta por encima de la capacidad antioxidante del sistema reproductivo del hombre (Fujii *et al.*, 2003).

La asociación entre HPB y estrés oxidativo involucra el hecho de que los procesos inflamatorios involucrados en la HPB generan EROs, ya que el ácido araquidónico (AA) liberado por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> está involucrado en la liberación de radicales peróxilos e hidroxilos, y de mono y dihidroperóxidos, subproductos metabólicos de las reacciones enzimáticas catalizadas por la COX y la LOX (Céspedes y Sánchez, 2000; González-Urbaneja, 2006; Araujo *et al.*, 2007).

Los pacientes con HPB presentan altas concentraciones plasmáticas de MDA (Merendino *et al.*, 2003; Aryal *et al.*, 2007) que se correlacionan positivamente con los niveles plasmáticos del PSA, indicador de hipertrofia y cáncer de próstata (Merendino *et al.*, 2003), así como valores plasmáticos de moléculas antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico) menores que los hombres sanos (Aryal *et al.*, 2007).

#### **1.4.5. Carácter multifactorial de la etiopatogenia de la HPB.**

Hasta aquí, los argumentos esbozados sustentan que la concepción actual de la etiología de la entidad clínica HPB/STBU involucra la combinación de cambios hormonales y no hormonales donde el primero propicia la hiperplasia y en consecuencia el agrandamiento de la próstata, y el segundo induce el aumento del tono de la musculatura lisa urogenital y por ende de los STBU (Carson y Rittmaster, 2003; Roehrborn, 2008 a). A ello se suma, con evidencias crecientes, el papel de la inflamación crónica y el aumento del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones (Aryal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

#### **1.5. Tratamientos.**

El objetivo del tratamiento de la HPB es aliviar los STBU y evitar la progresión del agrandamiento de la próstata para prevenir las complicaciones con el mínimo posible de EA. El manejo actual de la entidad HPB/STBU abarca, de acuerdo a su severidad, desde la vigilancia en espera hasta la cirugía.

##### **1.5.1 Tratamientos quirúrgicos.**

La cirugía es la opción considerada como el *estándar de oro* para aquellos pacientes que no responden a la terapia farmacológica, y para los que presenten retención urinaria refractaria o infecciones recurrentes, o incluso puede ser la opción inicial en casos con severa HPB y bajo riesgo de complicaciones quirúrgicas.

Los tratamientos quirúrgicos más empleados son la resección transuretral de la próstata, la prostatectomía abierta, la incisión transuretral de la próstata, la termoterapia transuretral por microondas y la terapia transuretral con láser (Bhargava *et al.*, 2004; Dull *et al.*, 2002).

Las complicaciones más frecuentes que se pueden presentar en el período post-quirúrgico más inmediato son el vaciado incompleto de la vejiga, la retención de coágulos e infecciones secundarias, y con mucha menor frecuencia (1%), el sangrado post-operatorio. Otras complicaciones que pueden ocurrir en un plazo más mediano son la eyaculación retrógrada (70%), impotencia (14 %) e incontinencia parcial (6%) y total (1%). Alrededor del 10% de los casos requiere volver a tratarse tras un período de cinco años (Sall y Brukewitz, 1996; Oesterling, 1995).

## **1.5.2. Tratamiento farmacológico**

Ya que el desarrollo de la HPB involucra un componente estático asociado al aumento de la masa de tejido prostático y uno dinámico asociado al aumento del tono del músculo liso prostático (Engl *et al.*, 2004; Sampson *et al.*, 2008), el tratamiento farmacológico de la HPB utiliza terapias hormonales y no hormonales que actúan sobre estos componentes, dentro de los cuales los medicamentos fundamentales son los inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa y los antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1.

Los inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa representan la principal terapia hormonal de la HPB, ya que otras terapias hormonales como los inhibidores de la aromatasa, los antagonistas de los receptores androgénicos y los SARMs presentan un uso clínico más limitado (Clifford y Farmer, 2000; Thorpe y Neal, 2003; Rick, 2007; Chéchile, 2007; Ohbuchi *et al.*, 2009, Khosla *et al.*, 2008). Por su parte, los antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 son la terapia no hormonal de primera línea para el manejo de los STBU (Simpson, 2001). Recientemente se sustenta el uso de la terapia combinada con inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa y antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 se utiliza especialmente en casos refractarios o complicados que no resulten buenos candidatos para la cirugía (Roehborn *et al.*, 2008 a, Tanguay *et al.*, 2009).

Otros tratamientos recientemente considerados dentro de la terapia combinada para tratar la entidad HPB/STBU son los inhibidores de la 5-PDE (Simpson, 2001; Barry y Roehborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009) y el uso de algunos AINEs (Doggrell, 2004; Minnery y Getzenberg, 2005; Di Silverio *et al.*, 2005, Tarter y Vaughan, 2006).

Finalmente, la HPB frecuentemente se trata con alternativas fitoterapéuticas, dentro de ellas las más documentadas son los ELSP, los extractos de *Pygeum africanum*, y en menor grado, de *Urtica dioica* (Lowe *et al.*, 2000; Ulbricht *et al.*, 2006; Dedhia y McVary, 2008; Curtis, 2008 b; EBSCO, 2009).

### **1.5.2.1. Terapia con acción hormonal.**

#### **1.5.2.1.1. Inhibidores de la enzima 5 $\alpha$ - reductasa.**

Ya que el aumento de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa y la reducción del metabolismo de la DHT condicionan la acumulación de DHT en el tejido prostático y los eventos subsecuentes que conllevan al desarrollo de la hiperplasia, es lógico que los inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa sean una de las alternativas fundamentales para tratar la HPB (Engl *et al.*, 2004; Nix y Carson, 2007; Zhu y McGinley, 2009).

Los inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa son efectivos en reducir el tamaño de la próstata y sus complicaciones, si bien su impacto sobre los síntomas es modesto y relativamente lento (Clifford y Farmer, 2000; Bartsch *et al.*, 2002; Bhargava *et al.*, 2004; Aceo *et al.*, 2008).

El principal agente de esta clase terapéutica es el finasteride, potente inhibidor competitivo y reversible de la isoforma tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa, causa atrofia de las células epiteliales de la glándula prostática y ha mostrado su eficacia en estudios experimentales y clínicos (Edwards y Moore, 2002; Lam *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2006 b; Marberger, 2006; Rick, 2007; González y Vegas, 2007; Martin- Morales *et al.*, 2008; Aceo *et al.*, 2008). El finasteride reduce la concentración de DHT (60-70%), el volumen prostático (20 - 30%) y los síntomas obstructivos (25%), mientras aumenta el Qmax (25%) (Clifford *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2001; Rick, 2007; Aceo *et al.*, 2008) en pacientes con HPB.

No obstante, se plantea que el finasteride reduce el volumen prostático sólo en hombres con peso prostático mayor de 40g (Boyle y Napalkov, **1996**; Llisterri *et al.*, **2005**; Castro, **2007**; Aceo *et al.*, **2008**).

Un ensayo clínico aleatorizado en 3040 hombres con HPB y STBU demostró que el tratamiento con finasteride 5 mg/día durante 4 años redujo significativamente los STBU con respecto al placebo (Mc Connell *et al.*, **1998**), mientras que un meta-análisis reportó que el finasteride redujo el riesgo de retención urinaria aguda (6.6% vs 2.8%), las prostatectomías (8.3% vs 4.2%) y la incidencia de los EA (13.2% vs 6.6%) más que el placebo, siendo el efecto mayor en los hombres con mayores valores séricos de PSA (3.3-12.0 ng/ml) (Castro, **2007**). Sin embargo, la interrupción del tratamiento conlleva a la reaparición de los STBU (Oesterling, **1995**; Marberger, **2006**). El tratamiento con finasteride ha demostrado reducir la necesidad de someter a los pacientes a la cirugía prostática, ya que reduce la incidencia de retención aguda de orina y sangrado durante el desarrollo natural de la enfermedad. (Potenziani, **2003**)

Sin embargo, ya que el finasteride disminuye los niveles de PSA de un 40 a un 50% (Mc Connell *et al.*, **1998**; Roehrborn *et al.*, **1999 a**; Edwards y Moore, **2002**; Lam *et al.*, **2003**; Kaplan *et al.*, **2006 b**; Castro, **2007**; Martin- Morales *et al.*, **2008**) se ha suscitado la preocupación de que su uso enmascare la detección temprana del cáncer de próstata, si bien algunos estudios demuestran que no afecta la sensibilidad y/o especificidad de las pruebas de diagnóstico de cáncer de la próstata. (Lam *et al.*, **2003**)

Por otra parte, la terapia con finasteride se acompaña de un conjunto de EA, fundamentalmente relacionados con la función sexual masculina que incluyen reducción de la libido, desórdenes en la eyaculación e impotencia (Clifford y Farmer, **2000**; Bartsch *et al.*, **2002**; Edwards y Moore, **2002**; Lam *et al.*, **2003**; Kaplan *et al.*, **2006 b**; Marberger, **2006**; Martin- Morales *et al.*, **2008**) que resultan reversibles al interrumpir el tratamiento. Recientemente se ha documentado también que el finasteride induce depresión (Babak *et al.*, **2006**; Rahimi *et al.*, **2006**) hecho preocupante ya que junto a la HPB, la depresión es una de las enfermedades más frecuentes en hombres mayores de 50 años.

El epristeride es otro inhibidor de la  $5\alpha$  reductasa tipo 2, al igual que el finasteride, que reduce el tamaño de la próstata y mejora los STBU (Ju *et al.*, **2002**; Wu *et al.*, **2006**). Sin embargo, a diferencia del finasteride, el epristeride es un inhibidor incompetitivo de la enzima, lo que podría explicar el aumento de los niveles de T en suero de pacientes tratados con finasteride, pero no en los tratados con epristeride (Zu- Yue *et al.*, **1999**). El tratamiento con epristeride 5mg dos veces al día por 4 meses redujo los STBU, el volumen residual de orina y el volumen de la próstata en 100 pacientes con HPB, entre los cuales la incidencia de EA asociadas al tratamiento fue baja (1 caso con náuseas y vómitos, 1 caso con insomnio, 3 casos con DE) (Ju *et al.*, **2002**).

El dutasteride inhibe ambas isoformas (tipo 1 y tipo 2) de la  $5\alpha$ - reductasa; lo que conlleva a una reducción muy marcada (>90%) de la DHT sérica (Kirby y Andriole, **2003**). Estudios aleatorizados han demostrado la eficacia del dutasteride en aliviar los STBU, aumentar el Qmax, reducir el riesgo de retención urinaria aguda y la necesidad de intervención quirúrgica (Brown y Nuttall, **2003**; Djavan *et al.*, **2005**; Dolder, **2006**). Los EA más comunes descritos sobre el dutasteride incluyen dolor de cabeza, vértigo, dolor muscular, DE, disfunción eyaculatoria, disminución de la libido y ginecomastia (Dolder, **2006**; Marberger, **2006**; Martin- Morales *et al.*, **2008**), pero su uso por largo plazo (más de 4 años) no produce nuevos EA asociados a la función sexual (Djavan *et al.*, **2005**).

El uso del episteride y del dutasteride, empero, se encuentra mucho menos documentado que el uso del finasteride.

#### **1.5.2.1.2. Inhibidores de la enzima aromatasas.**

La unión de los andrógenos y estrógenos a sus respectivos receptores próstáticos induce la proliferación celular y por ende el agrandamiento de la glándula prostática. Durante el envejecimiento se aumenta el paso de T a estradiol por acción de la aromatasas, por lo cual los inhibidores de la aromatasas producen una supresión de estrógenos que ha mostrado cierta utilidad en el tratamiento de la HPB (Bonkhoff, **2003**; Nelson *et al.*, **2003**, Benjamin *et al.*, **2004**; Chéchile, **2007**; Gao y James, **2007**). Entre estos agentes se encuentran la testolactona y el atamestane.

La testolactona inhibe de modo no competitivo la actividad de la aromatasas *in vivo*, bloqueando la conversión periférica de T a estrógenos, por lo que no afecta sus concentraciones en sangre (Chen *et al.*, **2002**). Los EA más comunes asociados a su uso son la anorexia, náuseas, vómitos, malestar general del cuerpo, hipersensibilidad en la piel y pérdida del pelo, entre otras (Dunkel, **2006**; Chéchile, **2007**).

El atamestane también inhibe "*in vivo*" la actividad de la aromatasas, pero de modo irreversible y competitivo (Benjamin *et al.*, **2003**, **2004**). El tratamiento con atamestane (400 mg/d) durante 48 semanas redujo los niveles séricos de estradiol (aproximadamente en un 40%) en pacientes con HPB, sin que se reportaran EA asociados al tratamiento (Dunkel, **2006**; Chéchile, **2007**).

#### **5.2.1.3. Antagonistas a receptores androgénicos.**

En la próstata, específicamente en el estroma, la proliferación celular se inicia cuando el complejo receptor androgénico-DHT activa la secreción de los factores de crecimiento. Los antagonistas a los receptores androgénicos evitan la unión de la DHT al receptor y por tanto evitan o disminuyen la proliferación celular, uno de los principales eventos en la patogénesis de la HPB (Abdel-Wahab, **2008**; Marks *et al.*, **2008**). Dentro de esta clase se encuentran los medicamentos anti-androgénicos como la flutamida y la nilutamida, los que producen numerosos EA debido a que depletan la DHT en diferentes tejidos, no solo en el prostático.

La flutamida, antagonista androgénico no esteroide desprovisto de acción endocrina, compete por el receptor androgénico "*in vitro*" e "*in vivo*." La 2-hidroxi-flutamida, su metabolito activo, es más potente y presenta un tiempo de vida media más largo. La flutamida carece de efecto agonista sobre el receptor androgénico, no tiene actividad estrogénica, progestativa ni glucocorticoidea. Entre sus EA se encuentra la hepatotoxicidad, lo que hace necesario que se realicen estudios de función hepática previos a la terapia y durante su administración (Kang *et al.*, **2007**, **2008**; Ohbuchi *et al.*, **2009**).

La nilutamida, antagonista no esteroide del receptor androgénico, "*in vitro*" muestra baja afinidad por su receptor, pero "*in vivo*" produce un bloqueo sostenido. Tras su administración oral se absorbe completamente y permanece en plasma 56 horas, lo que garantiza la toma de una dosis diaria (Chéchile, **2007**). Su EA más común es la fotofobia mantenida tras exposición a luz intensa que se revierte disminuyendo la dosis o suspendiendo el tratamiento. Durante las primeras semanas de tratamiento también produce sensación de sofoco, aumento de transaminasas, náuseas, vómitos y ginecomastia (Chéchile, **2007**).

### 1.5.2.1.3. SARMs

Los SARMs actúan selectivamente sobre los receptores androgénicos presentes en la próstata, evitando que la DHT se una a estos receptores y desencadene la proliferación celular (Gao y James, 2007). Estudios experimentales han mostrado que los SARMs reducen selectivamente el peso de la próstata en ratas con HP con una eficacia similar al finasteride, resultados que sugirieron su posible utilidad clínica para el tratamiento de la HPB (Gao *et al.*, 2004).

El desarrollo de estas moléculas se encamina a evitar los efectos secundarios indeseables que producen los antagonistas androgénicos, pero muchos de estos compuestos están aun bajo investigación preclínica, algunos pocos en estudios clínicos fase I o II, y su uso aun no ha sido aprobado. (Gao y James, 2007)

### 1.5.2.2. Tratamiento con acción no hormonal.

#### 1.5.2.2.1. Bloqueadores de los ADR- $\alpha$ 1

Los bloqueadores de los ADR- $\alpha$ 1 (prazosin, doxazosin, terazosin, tamsulosin) antagonizan los ADR- $\alpha$ 1 presentes en el músculo liso del cuello de la vejiga y de la próstata, por lo que reducen el tono del músculo liso y mejoran la hipertonia u obstrucción dinámica de la glándula prostática causante de los STBU (Engl *et al.*, 2004).

Existen tres subtipos de ADR- $\alpha$ 1 ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ ) y precisamente los medicamentos de esta clase terapéutica se clasifican en no-selectivos y selectivos en dependencia de que antagonicen todos los ADR- $\alpha$ 1 (no selectivos) o un único subtipo (selectivos) (Clifford y Farmer, 2000; Simpson, 2001; Barry y Roehrborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Rick, 2007; Roehrborn *et al.*, 2008 b; Schwinn y Roehrborn, 2008).

El prazosin, terazosin y el doxazosin son antagonistas no selectivos de los ADR- $\alpha$ 1 que presentan igual afinidad por los tres subtipos, mientras el tamsulosin es selectivo para los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  (Schwinn y Michelotti, 2000; Uribe, 2006; Schwinn y Roehrborn, 2008).

El prazosin fue el primer antagonista de los ADR- $\alpha$ 1 con potencial terapéutico para la HPB (Martorana *et al.*, 1984; Kirby, *et al.*, 1987). Varios ensayos clínicos aleatorizados y controlados contra placebo demostraron su eficacia a corto plazo para reducir los STBU y aumentar el Qmax y Qprom. Sin embargo, induce una hipotensión notable que ha limitado su uso clínico (Tsujii, 2000; Lepor, 2006).

El terazosin es un antagonista no-selectivo de los ADR- $\alpha$ 1 de acción prolongada (Clifford y Farmer, 2000; Simpson, 2001; Barry y Roehrborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2006 b) que además de utilizarse en el tratamiento de la HPB, se utiliza de modo limitado como tratamiento concomitante de la hipertensión arterial (Hofner *et al.*, 1999; Krames, 2009). Diferentes estudios clínicos han demostrado que el terazosin reduce los STBU (38%) y aumenta el Qmax (22%) respecto al placebo en pacientes con HPB/STBU, y que su eficacia sobre estos indicadores es superior a la del finasteride y similar a la de otros antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 (Wilt, 2002 b; Rick, 2007; Krames, 2009).

Por lo general, el terazosin produce más EA que otros antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1, tales como fatiga, vértigo, cefaleas, hipotensión (postural y no postural), episodios de DE, disminución de la libido, astenia y cuadro clínico tipo influenza (Wilt, 2002 b; Rick, 2007; Roehrborn *et al.*, 2008 b; Krames, 2009). Un estudio

que comparó los efectos del terazosin y el finasteride reportó que el primero produjo mareos, debilidad generalizada, rinitis e hipotensión ortostática, mientras que la DE fue el EA mas común asociado al segundo (Lam *et al.*, 2003).

El doxazosin es otro antagonista no-selectivo de los ADR- $\alpha_1$  prescrito también como antihipertensivo y cuyo mecanismo de acción se basa en el antagonismo de los ADR  $\alpha_1$  (Clifford y Farmer, 2000; Simpson, 2001; Barry y Roehrborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Lepor, 2006; Roehrborn, 2008 a; Schwinn y Roehrborn, 2008; Byrd, 2009). El tratamiento a corto y largo plazo (1 a 4 años) con doxazosin ha demostrado reducir los STBU, aumentar el Qmax y reducir el volumen residual de orina al compararse con el placebo, lo que mejora la calidad de vida del paciente (Chung y Hong, 2006).

Los EA más comunes asociados al doxazosin son vértigo, máreos, dispepsia, astenia, somnolencia y sequedad de la boca (Chung *et al.*, 2005; Van Dijk *et al.*, 2006; Bar-Yosef *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2009). Su administración a largo plazo aumenta el riesgo de EA, especialmente de hipotensión ortostática (Roehrborn y Schwinn, 2004; Lepor, 2006; Schwinn y Roehrborn, 2008; Byrd, 2009).

Además de bloquear los ADR- $\alpha_1$ , el terazosin y el doxazosin inducen apoptosis (muerte celular programada) tanto en las células epiteliales prostáticas como en las células estromales del músculo liso prostático, con lo cual inhiben el crecimiento prostático (Chon *et al.*, 1999; Kyprianou *et al.*, 2000; Kyprianou, 2006; Schwinn y Roehrborn, 2008; Potenziani, 2003). Estos efectos están asociados a una reducción en la expresión de muchas proteínas codificadoras del ARN mensajero involucradas no sólo en la regulación del ciclo celular, sino en la ultraestructura nuclear de las células y en el metabolismo celular, lo cual afecta la progresión de la línea celular tanto maligna como benigna (Walden *et al.*, 2002).

El tamsulosin es un antagonista selectivo de los ADR- $\alpha_1$  con acción uroselectiva, ya que bloquea solamente los receptores  $\alpha_{1A}$ , que son los que median la función contráctil del músculo liso prostático (estroma) y del cuello de la vejiga, y a diferencia del resto de los antagonistas ADR- $\alpha_1$ , no afecta el sistema cardiovascular (Clifford y Farmer, 2000; Simpson, 2001; Barry y Roehrborn, 2001; Dull *et al.*, 2002; Olke *et al.*, 2002; Thorpe y Neal, 2003; Bhargava *et al.*, 2004; Lepor, 2006; Kaplan *et al.*, 2006 b; Roehrborn *et al.*, 2008 b; Bar-Yosef *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2009). El tamsulosin relaja el músculo liso de la próstata y la vejiga, facilita el vaciado vesical, mejora los STBU en no menos de un 25%, aumenta el Qmax y reduce el volumen residual de orina, efectos que son dependientes de la dosis (Okada *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2007 b; Roehrborn, 2008 a). Una dosis tan baja como 0.4 mg/kg se comporta como la dosis máxima efectiva (Lee, 2000; Lepor, 2006; Bar-Yosef *et al.*, 2008).

Los EA más comunes asociados al tratamiento con tamsulosin son dolor de cabeza, astenia, vértigo y síndrome tipo influenza. La eyaculación retrógrada ocurre entre un 4.5 a 14% de los pacientes, en los cuales se requiere discontinuar el tratamiento. Debido a su uroselectividad, el tamsulosin no disminuye la presión sanguínea ni aumenta el ritmo cardíaco a la dosis comúnmente utilizada (0.4mg/kg) (Lee, 2000; Olke *et al.*, 2002; Wilt, 2002 b; Lepor, 2006; Van Dijk *et al.*, 2006; Bar-Yosef *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2009), lo cual favorece el hecho de que sea mejor tolerado que el doxazosin y el terazosin (Djavan *et al.*, 2005).

#### **1.5.2.2.2. Inhibidores de la 5-Fosfodiesterasa (PDE)**

En los últimos años se han comenzado a utilizar los inhibidores de la 5-PDE, medicamentos como el

sildenafil y el tadalafil, utilizados para tratar la DE, en el tratamiento de la HPB, obteniéndose una mejoría de los STBU y de la propia DE, entidades que suelen coexistir en hombres de avanzada edad (Andersson *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009).

La PDE degrada a los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc que actúan como segundos mensajeros para regular el tono de la musculatura lisa y garantizar su adecuada relajación. Esta enzima presenta varias isoformas, entre las cuales la 5-PDE está presente en la próstata y en la uretra. Por tanto, los inhibidores de la 5-PDE previenen el catabolismo de estos substratos y aumentan sus concentraciones intracelulares, lo que favorece la relajación del musculo liso y el alivio de los STBU (Andersson *et al.*, 2007).

El sildenafil, inhibidor de la 5-PDE comúnmente utilizado en el manejo de la DE, ha demostrado mejorar los STBU asociados a la HPB (Wong *et al.*, 2009). Recientemente ha sido reportado que una dosis única de sildenafil aumenta el Qmax en pacientes que presentan conjuntamente DE y STBU (Güven *et al.*, 2009).

Sin embargo, su uso simultáneo con nitratos orgánicos (donantes de NO) constituye una contraindicación, ya que ambos medicamentos facilitan la misma vía metabólica a distinto nivel, por lo que sus efectos se potencian y pueden conducir a una hipotensión grave (Mas y Gutiérrez, 2007). Los EA más frecuentes asociados con el sildenafil son sofocos, cefalea, dispepsia y alteraciones visuales (Cochrane, 2002 b).

El desarrollo de nuevos agentes de esta clase terapéutica conllevó al desarrollo del tadalafil, cuya acción sobre la 5-PDE es 10.000 veces más potente que sobre otras PDE, produce una mejoría considerable de los STBU y mejora la DE en pacientes que presentan ambas patologías o mantiene una adecuada función eréctil en los que ésta no ha sido afectada, sin producir EA importantes (Wong *et al.*, 2009; Noviasky *et al.*, 2004). Su eficacia clínica fue demostrada en un estudio aleatorizado a doble ciego realizado en diez países que incluyó a más de 1000 hombres, el cual mostró que diferentes dosis de tadalafil (2.5, 5, 10 y 20 mg/día) resultaron efectivas para mejorar los STBU (Roehrborn, 2008 c). Similarmente al sildenafil, su uso conjunto con nitratos orgánicos provoca hipotensión grave (Mas y Gutiérrez, 2007). Los EA producidos por el tadalafil son generalmente leves o moderados, y entre los más frecuentes se encuentran dolor de cabeza, mareo, dispepsia, sofocos e hipotensión (Noviasky *et al.*, 2004).

### **1.5.2.3 Terapias combinadas.**

#### **1.5.2.3.1 Terapia combinada entre inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa y antagonistas $\alpha_1$ - adrenérgicos.**

Los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa reducen el tamaño de la próstata, mejoran modestamente los STBU, aumentan el Qmax, reducen el riesgo de retención urinaria y la necesidad de requerir intervención quirúrgica, especialmente en hombres con próstata grande, pero no mejoran sustancialmente los STBU. Los antagonistas de los ADR- $\alpha_1$  relajan el músculo liso del cuello de la vejiga y de la próstata, de modo que disminuyen la resistencia al flujo urinario, aumentan el Qmax, mejoran efectivamente los STBU y reducen la progresión clínica de la enfermedad, pero no disminuyen el riesgo de retención urinaria y la necesidad de intervención quirúrgica a largo plazo. Por ello, la combinación de ambos grupos farmacológicos se emplea como otra opción en el tratamiento de la HPB (Tarter y Vaughan, 2006).

Recientes estudios han demostrado los beneficios de la combinación de antagonistas de ADR- $\alpha_1$  e inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa sobre variables clínicas relacionadas con la progresión de la HPB/STBU, particularmente en pacientes con síntomas severos (puntaje internacional de prostata  $\geq 17$ ), grandes

volúmenes prostáticos ( $\geq 32$ g), y altos niveles plasmáticos de PSA ( $> 1.5$  ng/ml) (Kevin y Mc Vary, 2007). Evidencias clínicas sustentan el uso combinado del finasteride con doxazosín, y del dutasteride con tamsulosín (Doggrell, 2004; Siami *et al.*, 2007). Un estudio a doble ciegas y controlado con placebo realizado durante 4.5 años en 3047 pacientes con HPB demostró que la administración de finasteride (34%) y doxazosín (39%) redujo el riesgo de progresión clínica de la enfermedad en comparación con placebo, pero la reducción lograda con la terapia combinada (67%) fue mayor que la obtenida con cada monoterapia. Todos los tratamientos mejoraron el puntaje de los síntomas, pero la terapia combinada resultó más efectiva que las monoterapias. El finasteride y la terapia combinada, pero no la monoterapia con doxazosin, redujeron el riesgo de retención urinaria aguda y la necesidad de intervención quirúrgica. El perfil de EA de la terapia combinada fue similar al de cada monoterapia (Doggrell, 2004).

La evaluación de la terapia combinada con dutasteride y tamsulosin en pacientes con HPB y síntomas obstructivos de moderados a graves ha mostrado la eficacia de dicha combinación sobre los síntomas y sobre el tamaño de la próstata (Siami *et al.*, 2007; Roehrborn *et al.*, 2008 b), y resulta bien tolerada (Djavan *et al.*, 2005), con menos abandonos por EA que las monoterapias (Schulman, 2003).

#### **1.5.2.3.2 Uso combinado de los AINEs e inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa ó antagonistas de los ADR- $\alpha_1$ .**

Como la inflamación se asocia a la progresión de la HPB, los AINE podría utilizarse para tratar la enfermedad, pero hasta el presente su uso clínico en este sentido ha sido limitado.

Estudios recientes, sin embargo, documentan la utilidad del uso del ibuprofeno junto al doxazosin en los cambios histológicos que acompañan a la progresión de la HPB, provocando una disminución de la viabilidad celular en líneas de cultivo y de la expresión de la JM-27, proteína que se expresa particularmente en la próstata y que está altamente sobre-regulada en la HPB (Minnery y Getzenberg, 2005). Asimismo, la terapia combinada con rofecoxib (inhibidor de la COX-2) y finasteride mejora los STBU más rápidamente que el finasteride, observándose mejoría a las 4 semanas de tratamiento (Di Silverio *et al.*, 2005).

#### **1.5.2.3.3. Terapia combinada con inhibidores de 5-PDE y antagonistas ADR- $\alpha_1$ .**

La combinación de inhibidores de 5-PDE y antagonistas de los ADR- $\alpha_1$  ha mostrado utilidad en pacientes en que coexisten los STBU y la DE (Taylor *et al.*, 2008). La terapia con alfuzosin (10 mg/d), sildenafil (25 mg/d) y con ambos durante 12 semanas produjo mejoría de ambas condiciones, pero el efecto de la terapia combinada fue superior (Kaplan *et al.*, 2006 a).

Aunque este tipo de terapia combinada es promisorio en el tratamiento de los STBU asociados a la HPB, la interacción hemodinámica entre ambas clases puede producir hipotensión postural y en algunos casos hipotensión arterial sistémica, siendo la combinación entre el tadalafil y bajas dosis de tamsulosin la mejor tolerada. (Vela *et al.*, 2005).

#### **1.5.2.4. Alternativas fitoterapéuticas.**

Las alternativas fitoterapéuticas, ampliamente utilizadas en el tratamiento de la HPB y los STBU, incluyen fundamentalmente el ELSP, palma de la familia *Arecaceae*, (Lowe, 2001; Gordon y Shaughnessy, 2003; Curtis, 2008 b), los extractos de *Pygeum africanum*, árbol africano de la familia *Rosaceae* (WHO, 2007), y en menor grado, los de *Urtica dioica* (familia *Urticaceae*) (WHO, 2007).

Los extractos de la resina de *Pygeum africanum*, utilizados por décadas para tratar la HPB (Ishani *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2000; Koch, 2001; Curtis, 2008 b; EBSCO, 2009), entre sus componentes activos presentan fitosteroles, especialmente beta-sitosteroles, triterpenoides pentacíclicos y ésteres de alcoholes grasos de cadena larga (Cochrane, 2002 a, Potenziani, 2003).

La eficacia del extracto de *Pygeum africanum* para reducir los STBU ha sido atribuida a la reducción de la hiperreactividad de la vejiga y a que protege el crecimiento prostático (Barlet *et al.*, 2007; Curtis, 2008 b; Dedhia y McVary, 2008; Wilt *et al.*, 2008; EBSCO, 2009). Entre los mecanismos que sustentan sus efectos se incluyen la inhibición de factores de crecimiento celular, y sus efectos antiinflamatorios y antiestrogénicos (Barlet *et al.*, 2007; Curtis, 2008 b; Dedhia y McVary, 2008). Su actividad anti-inflamatoria, relacionada con la inhibición de las enzimas COX y 5-LOX (Sidoti *et al.*, 1993; Paubert-Braquet *et al.*, 1994), y su acción antiproliferativa podrían contribuir a su eficacia en la HPB (Anonymous, 1993).

Los efectos de los extractos de *P. africanum* (100 y 200 mg/d) en pacientes con HPB han sido investigados en estudios abiertos y a doble ciegas, controlados con placebo. En la mayoría de los estudios abiertos, la variable primaria de eficacia fue la frecuencia diurna y nocturna de micciones, y sólo algunos estudios evaluaron los efectos sobre el Qmax. En su mayoría, los estudios revelaron que el tratamiento mejoraba la frecuencia de micciones diurnas y nocturnas, y el Qmax (Ishani *et al.*, 2000; Wilt *et al.*, 2002 a). Estudios a doble ciegas y controlados con placebo demostraron ventajas del tratamiento sobre los STBU, el Qmax y volumen residual, si bien el único estudio que investigó los efectos sobre frecuencia de micciones no detectó ventajas respecto al placebo. El tratamiento es bien tolerado y las EA más reportadas ( $\geq 2\%$ ) son gastrointestinales (diarrea, constipación, dolor epigástrico, náuseas) (Izan *et al.*, 2000; Wilt *et al.*, 2002 a; Lowe, 2002; Schleich *et al.*, 2006).

El extracto de las raíces de *Urtica dioica*, utilizado en varios países de Europa para tratar la HPB y los STBU (Koch, 2001; Curtis, 2008 b) contiene una mezcla de lignanos, fenoles, esteroides y lectinas. Su eficacia se basa en mecanismos multifactoriales que incluyen efectos anti-inflamatorios, modulación de hormonas sexuales unidas a proteína (SHBG) e inhibición de la secreción de factores de crecimiento (Koch, 2001; Potenziani, 2003; EBSCO, 2009).

El tratamiento con *Urtica dioica* ha mostrado aliviar los STBU, aumentar la Qmax, disminuir el volumen de orina residual, la nicturia y el volumen global de la glándula prostática en pacientes con HPB sintomática (Yarnell, 2003; EBSCO, 2009). El tratamiento es bien tolerado, con escasos EA, fundamentalmente molestias gastrointestinales, alergias y discreta hipertensión arterial (Yarnell, 2003).

La administración conjunta de *Urtica dioica* y *Pygeum africanum* durante 8 semanas mejora notablemente el flujo urinario, el volumen de orina residual y los episodios de nicturia (Potenziani, 2003). Esta combinación es capaz de inhibir la  $5\alpha$  reductasa, así como las aromatasas que convierten la T y la androstenediona a estradiol y estrona. Con el aumento sérico de los estrógenos, la proporción de globulina unida a hormonas sexuales aumenta, y esto provoca una disminución de los niveles de T libre impidiendo el desarrollo de la HPB (Gao y James, 2007).

Por su parte, el ELSP contiene fundamentalmente ácidos grasos libres y esterificados, como el oleico, láurico, mirístico, palmítico, linoleico, cáprico, caprílico, linolénico y ácido esteárico; así como flavonoides y fitosteroles como beta-sitosteroles, campesterol y etimasterol y alcoholes de alto peso molecular (Bombardelli *et al.*, 1997; Marks *et al.*, 2000; Pharmacopeial Convention, 2005).

El mecanismo que sustenta su acción farmacológica es multifactorial, e involucra como aspectos fundamentales la inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática y el antagonismo de los ADR- $\alpha_1$ - (Gerber *et al.*, 2001; Debruyne *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2009 a). Además, presenta como efectos pleiotrópicos acciones anti-inflamatoria y antioxidante, lo cual contribuye a sus efectos beneficiosos sobre la próstata.

La adición del ELSP ha mostrado inhibir la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa en cultivos de fibroblastos (Sultan *et al.*, 1984), en preparaciones de enzimas semipurificadas de origen prostático (Rhodes *et al.*, 1993) y en cultivos de células hiperplásicas de próstata (Bayne *et al.*, 1999), lo que sustenta que su eficacia en el tratamiento de la HPB se relacionara, al menos parcialmente, con la inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática. De modo consistente, otros estudios demostraron que tanto algunos de sus componentes (ácidos oleico, láurico, mirístico y linoleico) como el ELSP inhibieron la actividad de dicha enzima (Raynaud *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2009 b). La inhibición de la actividad de la 5 $\alpha$ - reductasa causada por el ELSP es específica de próstata, ya que inhibe “*in vitro*” las dos isoformas de la enzima (tipo 1 y tipo 2) en la próstata, pero no en otros tejidos (epidídimo, testículos, riñón, piel y mama) (Chevalier *et al.*, 1997; Riehemann *et al.*, 2000; Curtis, 2008 b), lo que concuerda con los resultados de estudios clínicos que indican que el ELSP reduce preferentemente la concentración de DHT prostática sin alterar las concentraciones de DHT plasmáticas o los niveles de hormonas sexuales (Boyle *et al.*, 2004).

La eficacia del ELSP en el manejo de la HPB, sin embargo, también se ha vinculado al bloqueo de respuestas mediadas por los ADR- $\alpha_1$  “*in vitro*” (Goepel *et al.*, 1999) e “*in vivo*” (Goepel *et al.*, 2001). Recientemente se demostró la capacidad del ELSP y sus ácidos individuales de unirse a los ADR- $\alpha_1$ , lo que confirma que sus efectos beneficiosos sobre los STBU incluyen un bloqueo a este nivel, si bien el hecho que también se enlace a los receptores muscarínicos y a los receptores 1,4 DHP acoplados a canales de calcio indica que el efecto no es selectivo (Abe *et al.*, 2009 b).

Por otra parte, el ELSP presenta efectos anti-inflamatorios y antiproliferativos que pueden contribuir a su eficacia en el manejo de la HPB. Los efectos anti-inflamatorios se asocian a la inhibición de las enzimas COX y 5-LOX (Mogul *et al.*, 2000; Potenziani, 2003; Raman *et al.*, 2007; Curtis, 2008 b) y los antiproliferativos a la inhibición de la secreción de los  $\beta$ -FCF y FCE que contribuyen a reducir la proliferación de las células prostáticas (Winslow y Kroll, 1998; Curtis, 2008 b, Baron *et al.*, 2009).

Estudios recientes han referido que el ELSP produce efectos antioxidantes que podrían contribuir a su eficacia en el manejo de la HPB, los que han sido atribuidos, al menos en parte, a la capacidad de los ácidos palmítico y linoleico, componentes del ELSP, para secuestrar “*in vitro*” radicales libres (Chan *et al.*, 1996), si bien otros ácidos grasos, saturados e insaturados de cadena mediana entre 8 y 24 átomos de carbono, inhiben la PL, efecto observado paralelamente a la inhibición de la COX (Henry *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Perona *et al.*, 2005; Chapkin *et al.*, 2007).

La eficacia clínica del ELSP para inhibir la progresión de la HPB/STBU ha sido demostrada en diferentes estudios (Curtis, 2008 b, Carraro *et al.*, 1996; Debruyne *et al.*, 2002; Djavan *et al.*, 2005), como en un estudio aleatorizado y controlado con placebo realizado en 225 pacientes con HPB, en que la administración de ELSP (320mg/d) durante 1 año mejoró los STBU y redujo el tamaño de la próstata, proporcionando una mejor calidad de vida (Curtis, 2008 b). Sin embargo, algunos estudios controlados con placebo no encontraron diferencias del ELSP versus placebo, lo cual parece atribuirse, además de a posibles diferencias en los extractos usados, a la inclusión de casos con HPB más severa (Willets *et al.*, 2003; Bent *et al.*, 2006). La eficacia clínica del ELSP también ha sido comparada con la de otros medicamentos usados en el tratamiento de la HPB. Un estudio aleatorizado, a doble ciego, de 26 semanas de duración, realizado en 1098 pacientes con HPB demostró que tanto el ELSP como el finasteride mejoraron los síntomas urinarios, la retención urinaria y el volumen de la próstata, resultando igualmente eficaces en reducir la severidad de los STBU e incrementar el Qmax, si bien el finasteride resultó mas efectivo en reducir el volumen de la próstata (Carraro *et al.*, 1996). Otro estudio aleatorizado y a doble ciegas realizado en 704 hombres con HPB mostró que tanto el ELSP (320mg/día) como el tamsulosín (0.4mg/día) administrados durante 12 meses redujeron la severidad de los STBU y aumentaron el Qmax con similar eficacia, y resultaron bien tolerados (Debruyne *et al.*, 2002), mientras otro estudio indica una eficacia ligeramente superior del ELSP respecto al tamsulosin (Debruyne *et al.*, 2004). Sin embargo, otros estudio comparativo demostró que el ELSP fue menos efectivo que el alfusosin, otro antagonista de los ADR- $\alpha_1$  (Djavan *et al.*, 2005).

Los resultados de la mayoría de los meta-análisis de la eficacia de ELSP en la HPB (Wilt *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2000; Wilt *et al.*, 2002 a; Boyle *et al.*, 2005) y los de un estudio multinacional europeo (Hutchison *et al.*, 2006) son positivos, pero una revisión reciente considera las evidencias insuficientes (Cochrane, 2009).

Los datos de la toxicología preclínica del ELSP son escasos. Sin embargo, el ELSP es bien tolerado, ya que aunque produce trastornos gástricos, estos pueden evitarse si se consume conjuntamente con alimentos (Gordon y Shaughnessy, 2003; Yarnell, 2003; Rowland y Tai, 2003; Kennedy, 2007). A diferencia del finasteride, el ELSP no afecta la función sexual (Willets *et al.*, 2003). La frecuencia de EA con el ELSP oscila entre un 2 y un 4%, dentro de los que sobresalen los síntomas gastrointestinales (náuseas y dolor abdominal), y menos frecuentemente impotencia, reducción de la libido, disuria, hipotensión postural, dolor de cabeza y dolor de espalda (Bombardelli *et al.*, 1997; Pharmacopeial Convention, 2005). El ELSP no presenta interacción documentada con otras drogas (Gordon y Shaughnessy, 2003; Kennedy, 2007).

El ELSP, aprobado para tratar la HBP en países de Europa, es uno de los productos naturales más vendidos en los últimos años (Hung *et al.*, 2008, Tilburt *et al.*, 2008).

#### **1.5.2.5. D-004.**

Teniendo en cuenta que en Cuba existen numerosas palmas de la familia a la que pertenece el ELSP, en nuestro Centro se desarrolló el aislamiento y purificación de los extractos lipídicos de los frutos de 3 de las palmas más abundantes en nuestro país. Tras evaluar sus efectos farmacológicos en la HP por T en ratas y de acuerdo a sus efectos en este modelo, la abundancia de la fuente, composición del extracto y rendimiento del proceso se decidió continuar el desarrollo del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*), planteándose como hipótesis que podría presentar efectos similares a los del ELSP.

El D-004 contiene, al igual que el ELSP, una mezcla reproducible de ácidos grasos, fundamentalmente oleico, laúrico, mirístico, palmítico y linoleico como componentes mayoritarios; así como ácido palmitoleico, caprílico, cáprico y esteárico, aunque en menor proporción (Arruzazabala *et al.*, **2008 b**).

El estudio farmacocinético mostró que tras la administración oral de dosis únicas de D-004 enriquecido con H3-oleico la radioactividad total (RT) se distribuyó rápida y ampliamente hacia todos los tejidos, pero la mayor acumulación de RT se localizó en el tejido prostático (Pérez *et al.*, **2006**), hecho relevante ya que la próstata constituye el órgano diana de la HPB. Estos resultados concuerdan con los reportados para el ELSP por Chevalier *et al.* (**1997**).

Los estudios de farmacodinamia han demostrado la eficacia del D-004 en el tratamiento de la HP inducida en roedores por T (Arruzazabala *et al.*, **2008 a**; Arruzazabala *et al.*, **2004**; Carbajal *et al.*, **2004**; Noa *et al.*, **2005**), no así la inducida por DHT (Carbajal *et al.*, **2004**), así como en la HP atípica inducida por FE en ratas (Arruzazabala *et al.*, **2006**). Las experiencias que han comparado los efectos del tratamiento oral (400 mg/kg) con D-004 y con ELSP durante 14 días sobre la HP inducida por T ó por FE en ratas han mostrado que el D-004 es moderadamente más efectivo que el ELSP (Arruzazabala *et al.*, **2004**; Arruzazabala *et al.*, **2006**).

La terapia combinada con dosis efectivas mínimas de finasteride (0.5 mg/kg) y D-004 (200 mg/kg) han mostrado beneficios aditivos en reducir el crecimiento de la próstata inducido por T con respecto a cada monoterapia (Molina *et al.*, **2007**). Por otra parte, la evaluación del D-004, tamsulosin y la combinación de ambos en el modelo de HP atípica inducida por FE mostró que todos los tratamientos previnieron la reducción del volumen de micción, si bien con la terapia combinada se alcanzaron mayores efectos que con cada monoterapia, observándose una interacción de tipo aditiva (Arruzazabala *et al.*, **2008 b**).

Los estudios de toxicidad oral aguda del D-004 muestran que dosis de 2000 mg/kg no produjeron muertes ni signos de toxicidad en roedores y conejos, lo que indica que no es una sustancia tóxica (Gámez *et al.*, **2005**; Gutiérrez *et al.*, **2007**). El estudio de toxicidad por dosis orales repetidas de D-004 (500-2000 mg/kg) administradas a ratas durante 90 días no mostró evidencias de toxicidad ni a la dosis superior (Gámez *et al.*, **2005**) y similares resultados se obtuvieron en ratones (Gutiérrez *et al.*, **2008**) y en el estudio de toxicidad crónica (12 meses) en ratas (datos no publicados).

La evaluación del potencial genotóxico mediante el ensayo de Ames y micronúcleos en médula ósea de ratón no mostró evidencias de genotoxicidad asociada al D-004 (Gámez *et al.*, **2005**; Fernández *et al.*, **2005**). Además, estudios de toxicología especial han demostrado que el D-004 no posee efectos estrogénicos o antiestrogénicos (Gutiérrez *et al.*, **2008**), no modifica la actividad sexual en la rata macho (Fernández *et al.*, **2008**), ni diversos patrones conductuales en roedores (Carbajal *et al.*, **2007**).

Un estudio clínico demostró que el tratamiento oral con dosis únicas y repetidas de D-004 (320 – 960 mg/d) resultaron bien toleradas, sin afectar los indicadores de seguridad (López *et al.*, **2007**). Un segundo estudio mostró que el tratamiento con D-004 durante 6 semanas redujo significativamente los niveles plasmáticos de MDA (26.7%), hidroperóxidos totales (18.8%) y grupos sulfidrilos (31.6%), y aumentó la CAOP (35.3%) en hombres sanos. El D-004 fue seguro y bien tolerado (López *et al.*, **2008**).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 Aspectos generales.

#### 2.1.1 Animales.

Con excepción de los experimentos encaminados a evaluar los efectos antioxidantes, en los cuales se utilizaron ratas Wistar, en el resto se emplearon ratas Sprague Dawley del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana).

Las ratas, cuyos pesos oscilaban entre 150 y 200 g, se mantuvieron en cuarentena durante 7 días y se adaptaron a las condiciones de laboratorio (temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa  $60 \pm 10\%$ , ciclos de luz/oscuridad de 12 h), con libre acceso al agua y la comida (pienso estándar para roedores procedente del CENPALAB). Las experiencias se realizaron de acuerdo a los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) vigentes en la República de Cuba.

#### 2.1.2 Administración y dosis.

Los lotes de D-004, suministrados por el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales, se utilizaron tras corroborar sus especificaciones de calidad. El ELSP utilizado en estudios comparativos provino de Blackmores (Balgowlah, Sydney, Australia).

Ambas sustancias se emulsionaron en el vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O (2%) para los estudios "*in vivo*" y para los experimentos "*in vitro*" en preparaciones de órgano aislado, y en el vehículo carboximetil celulosa (CMC)/H<sub>2</sub>O (2%) en los estudios "*in vitro*" que investigaron efectos sobre la actividad de las enzimas 5 $\alpha$ -reductasa prostática y 5-LOX, sobre los receptores a la DHT y sobre las variables de oxidación.

En los estudios "*in vivo*" el D-004 y el ELSP se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (5 ml/kg). Los grupos controles recibieron volúmenes equivalentes del vehículo Tween-65 /H<sub>2</sub>O.

En las experiencias en que se determinaron las concentraciones de proteínas para ello se utilizó una modificación del método de Lowry (Marxwell *et al.*, 1987).

#### 2.1.3 Otras sustancias

El propionato de T, utilizado para inducir la HP por T, fue suministrado por la Industria Médico Farmacéutica (IMEFA, Ciudad Habana, Cuba), se disolvió en aceite de soya y se administró por vía subcutánea (sc) (3 mg/kg).

Para medir la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ - reductasa se utilizó T marcada (<sup>3</sup>H-testosterona, 95 Ci/ mmol) y para determinar la capacidad de unión del D-004 a los receptores androgénicos en tejido prostático se empleó <sup>3</sup>H-DHT, 50 Ci/mmol y DHT no marcada. Todos estos sustratos fueron suministrados por Amersham Biosciences (Piscataway, New Jersey). Las experiencias con sustancias radioactivas se realizaron de acuerdo a las Normas Básicas de Seguridad Radiológica vigentes en la República de Cuba.

La FE y el KCl utilizados para inducir respuestas contráctiles en órganos aislados (próstata y conducto deferente) de rata provenían de la IMEFA (Ciudad Habana, Cuba) y de la Merck (Darmstadt, Alemania), respectivamente.

Los ácidos oleico, láurico y mirístico (Sigma Chemical CO (St Louis, USA), utilizados en los experimentos de respuesta contráctil en conducto deferente de rata, se prepararon en forma de emulsión en Tween 65/agua (2%), así como que el tamsulosin (Yamanouchi Pharma, Milan, Italia) utilizado como sustancia de

referencia en estos experimentos se preparó en forma de emulsión en Tween 65/agua (2%).

La indometacina (Sigma Chemical CO (St Louis, USA), utilizada como sustancia de referencia en estudios de efecto anti-inflamatorio, se disolvió en bicarbonato al 5%.

#### **2.1.4 Análisis Estadístico.**

Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney). Las pruebas utilizadas fueron de dos colas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete comercial Statistic para Windows (Release 4.2, Stat Soft, Inc USA). A priori se fijó un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

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).

#### **2.2. Efectos del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática "in vitro".**

Teniendo en cuenta que el D-004 había demostrado inhibir la HP inducida por T, pero no por DHT (Carbajal *et al.*, 2004), el papel protagónico de los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática en el manejo de la HPB (Carson y Rittmaster, 2003) y que este efecto había sido referido para el ELSP y algunos de sus ácidos constituyentes (Habib *et al.*, 2005), se investigaron los efectos del D-004 sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática como parte de los posibles mecanismos implicados en su eficacia.

##### **2.2.1 Medición de la actividad enzimática.**

La actividad de la enzima se determinó a partir de la conversión de  $^3\text{H-T}$  en  $^3\text{H-DHT}$  en fracciones citosólicas provenientes de tejido prostático. El método de obtención de la fracción soluble y de la medición de la actividad enzimática es análogo al descrito por Frederick *et al.*, 1991.

##### **2.2.2 Obtención de la fracción citosólica del tejido prostático.**

Para la obtención de las preparaciones citosólicas se utilizó el tejido prostático de 20 ratas Sprague Dawley. Luego de disecar las próstatas, las muestras se homogenizaron, utilizando un potter, en solución reguladora que contenía sacarosa 0.25 mol/l, Tris HCl 50 mmol/l, MgCl 50mmol/l (relación 1:9, v/v). El homogenato se centrifugó a 800 x g durante 20 min (4°C) y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

##### **2.2.3. Determinación de la actividad de la enzima 5- $\alpha$ reductasa.**

Para la evaluación de los efectos del D-004 sobre la actividad de la enzima se emplearon dosis comprendidas entre 0.24-125  $\mu\text{g/ml}$  teniendo en cuenta que estudios "in vitro" con el ELSP habían mostrado que los valores de  $\text{IC}_{50}$  para inhibir la actividad enzimática eran cercanos a 10  $\mu\text{g/ml}$  (Rhodes *et al.*, 1993).

La determinación de la actividad enzimática se realizó según Kitahara *et al.*, 1989, con pequeñas modificaciones. Para ello, se tomaron alícuotas de fracción citosólica de concentración proteica conocida (100  $\mu\text{g/ml}$ ) que contenían el vehículo (CMC 2%) (tubos controles) ó diferentes concentraciones de D-004 (0.24-125  $\mu\text{g/ml}$ ) suspendido en CMC 2% (tubos tratados) y se preincubaron con la solución reguladora de incubación (0.25 mol/l de sacarosa, 50 mmol/l Tris HCl, NADPH 0.3 mmol/l, Mg Cl<sub>2</sub> 50 mmol/l, pH 7.4).

Transcurridos 10 minutos, se añadió el sustrato marcado, preparado a partir del "stock" ( $^3\text{H-T}$ , 95Ci/mmol, Amersham), añadiendo T fría hasta obtener una concentración final de ensayo de 2  $\mu\text{mol/l}$  y una concentración radiactiva de 200 000 dpm/ml (volumen final =1 ml).

La mezcla de reacción se incubó, agitando manualmente, durante 1 hora a 37°C y la reacción se detuvo con cloroformo frío (3 ml). La incubación se realizó por triplicado. A cada tubo se le añadió DHT fría (no radiactiva) (50 µg) como marcador. Los esteroides se extrajeron sucesivamente (3 veces) con cloroformo, para lo cual la mezcla se agitó con un vortex, se centrifugó y se extrajo la fase orgánica. Los extractos lipídicos finales de cada extracción sucesiva se secaron en atmósfera de nitrógeno a 40°C y se disolvieron en 1 ml de cloroformo. Alícuotas (200 µl) de esta solución clorofórmica se aplicaron a placas de gel de sílice.

Para la cromatografía, se utilizó una mezcla de benceno-acetona (4:1, v/v) como fase móvil. Al terminar la corrida, las manchas de DHT se revelaron con solución de ácido sulfúrico al 50%, las placas se calentaron y las manchas de DHT se rasparon cuidadosamente y se transfirieron a viales de centelleo para cuantificar la radiactividad, la cual se cuantificó en un contador de centelleo RAKBETA 1219 (LKB Wallac).

Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron gráficamente de la curva del porcentaje (%) de inhibición de la actividad enzimática *versus* concentraciones de D-004. Los estudios cinéticos se realizaron en similares condiciones pero determinando la actividad enzimática frente a varias concentraciones de T marcada (0.5 a 25 µmol/l).

Los gráficos de Lineweaver-Burke se generaron de los valores de la constante aparente de Michaelis-Menten (Km), calculándose la velocidad máxima (Vmax). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **2.3. Efectos del D-004 “*in vitro*” sobre receptores androgénicos en tejido prostático.**

Teniendo en cuenta que la unión a los receptores androgénicos en tejido prostático puede estar implicada en el efecto antiandrógeno de diversas sustancias y que algunos estudios han señalado que el ELSP presenta este efecto (Marks y Tyler, 1999), aunque controvertido por otros (Willets *et al.*, 2003), se estudiaron los efectos del D-004 sobre la unión del D-004 a los receptores androgénicos en tejido prostático.

#### **2.3.1. Obtención de la fracción citosólica.**

Las próstatas se disecaron, se pesaron, se cortaron con bisturí y se homogeneizaron en solución reguladora Tris HCl 10 mmol/l, pH 7.5, EDTA 1mmol/l 1:10 (p/v) con un homogeneizador Potter. Para evitar la proteólisis del receptor, se añadió el *cocktail* inhibidor de proteasas a la solución reguladora (1 tableta de *cocktail* COMPLETE EDTA -Roche diagnostics, Bélgica- por cada 50 volúmenes de solución reguladora), proceso que se realizó en baño de hielo para garantizar una temperatura entre 0 y 4°C. Posteriormente, el homogenizado se transfirió a tubos de centrifugación y se centrifugó a 20 000 x g durante 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman modelo L-7, obteniendo así la fracción citosólica.

#### **2.3.2. Ensayo para la determinación de enlaces de la DHT a los receptores androgénicos.**

Los efectos del D-004 sobre los receptores a la DHT se evaluaron en la fracción citosólica de tejido prostático de ratas, y tanto la obtención de la fracción de membranas como la determinación de los enlaces a los receptores se realizó según el método descrito por Carrilla *et al.*, 1984.

Para medir los enlaces totales de la DHT a los receptores se procedió como sigue: a un volumen final de 500 µl, se añadió, en el orden siguiente, 220 µl de solución reguladora de ensayo, 20 µl de CMC al 2% (vehículo), 50 µl de DHT marcada (Amershan, 50 Ci/mmol) a una concentración final de 10 nmol/l (equivalentes a 250 nCi) y 200 µl de fracción citosólica. En paralelo, y para medir los enlaces no específicos, se incubaron tubos a los cuales se añadió 100 µl DHT no marcada disuelta en 120 µl de la solución reguladora de ensayo (concentración 0.1 mmol/l), manteniendo fijo el volumen final de incubación.

Para la construcción de la curva de saturación de los enlaces específicos se emplearon iguales condiciones de ensayo, pero agregando al volumen establecido de ligando marcado (50  $\mu$ l) disoluciones de DHT marcada preparadas de modo que se alcanzaran concentraciones de DHT en el medio equivalentes a 100; 50; 10; 5; 1; 0,5 nmol/l. La concentración máxima de desplazante empleado en este ensayo se ajustó a una concentración equivalente a 100 veces la concentración máxima de ligando marcado utilizada.

A partir del momento en que se añadió la fracción citosólica, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C y al final de este período, a cada muestra se añadió 0.5 ml de carbón revestido en dextrana al 0.2 % en solución reguladora bien fría. Tras agitar con vortex durante 10 seg, las muestras se centrifugaron a 1500 x g a 4°C. Al finalizar se tomaron 100 $\mu$ L de cada tubo y se transfirieron a viales de centelleo líquido a los que se añadió el líquido de centelleo, dejándose en reposo, en la oscuridad, durante 12 h como mínimo.

Se compararon los efectos del D-004 y del ELSP sobre los enlaces totales. En estos casos, los 20  $\mu$ L de vehículo se sustituyeron por alícuotas de las suspensiones de D-004 y ELSP, respectivamente, que garantizaran concentraciones de ambos extractos entre 500 y 0.9  $\mu$ g/ml en el medio de incubación, con el objetivo de obtener sus constantes de enlace aparente ( $K_a$ ). En este estudio se utilizó una concentración de DHT de 10 nmol/l que, según los experimentos iniciales, estaba por debajo de la concentración inicial de saturación, por lo cual aún existía dependencia de la concentración del ligando añadido.

Teniendo en cuenta la naturaleza lipídica de ambos extractos y que el propio proceso de incubación a 4°C pudiese inhibir la interacción de estos componentes con los receptores de membrana, se realizaron experimentos en los cuales las muestras se pre-incubaron con los respectivos extractos a 37°C durante 10 min, y posteriormente se añadió el ligando marcado antes de comenzar la incubación a 4°C durante 12 h. Posteriormente se midió la radiactividad en un contador de centelleo Rackbeta Modelo 1219 (LKB). Las experiencias se realizaron en muestras por triplicado. Los enlaces específicos se determinaron sustrayendo los enlaces no específicos de los totales.

#### **2.4. Efectos del D-004 "in vitro" sobre contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en próstata aislada de ratas.**

Teniendo en cuenta la importancia del antagonismo de las contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 prostáticos en el manejo de los STBU y que el D-004 reduce la HP inducida por FE (Arruzazabala *et al.*, 2006) y las contracciones inducidas por norepinefrina (NE) en conducto deferente de rata (Arruzazabala *et al.*, 2005) se investigaron sus efectos sobre la respuesta contráctil inducida por FE en tejido prostático de rata. En este caso se utilizó como sustancia de referencia el tamsulosin (no el ELSP) por ser un antagonista específico de los ADR  $\alpha$ 1<sub>A</sub> presentes en la próstata.

##### **2.4.1. Procedimiento experimental.**

Las próstatas se disecaron para liberar el tejido exterior y se suspendieron en un baño de órganos con solución Krebs burbujeada con una mezcla de gases (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. Se registraron las contracciones de tejido a través de un transductor fuerza-desplazamiento (modelo: TB-612T) conectado a un polígrafo Nihon-Kohden (Japón). Después de un período de incubación de 60 min y tensión de 1 g, se indujeron las contracciones mediante la adición acumulativa de varias concentraciones de FE (10<sup>-6</sup> - 10<sup>-4</sup> mol/l) (Cao *et al.*, 2005).

Después de obtener respuestas reproducibles al baño de órganos se añadió el D-004 (125, 250 y 500 µg/ml), tamsulosin (0.001 y 0.01µg/ml) ó volúmenes equivalentes del vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O al 2% durante 20 min y se repitió la curva dosis-respuesta a la FE. No se evaluaron concentraciones mayores de 500 µg/ml.

Para estudiar si esta acción era o no específica para la FE se registraron también las contracciones inducidas por KCl (50 mmol/l) realizando el experimento de igual forma que como se describe para la FE.

### **2.5. Estudio comparativo de los efectos del D-004, ácido oleico, láurico y mirístico “*in vitro*” sobre las contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en conducto deferente aislado de ratas.**

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar si los ácidos más abundantes en el D-004 (láurico, oleico y mirístico) eran capaces de antagonizar la respuesta contráctil inducida por FE. La composición del lote utilizado, determinada por cromatografía gaseosa y de gran importancia por la naturaleza de este experimento en que se compara el efecto del D-004 y de los ácidos individuales, se resume a continuación: caprílico 0.2%, cáprico 0.6%, láurico 23.9%, mirístico 10.9%, palmítico 12.1%, palmitoleico 0.3%, esteárico 2.6% y oleico 41.1%). Tanto el lote de D-004 como los ácidos oleico, láurico y mirístico se prepararon en forma de emulsión en Tween 65/agua (2%).

Los conductos deferentes se disecaron para liberar todo el tejido exterior y se suspendieron en un baño de órganos conteniendo solución Tyrode burbujeada con una mezcla de gases (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) a 37 °C. Se registraron las contracciones del tejido utilizando un transductor fuerza-desplazamiento (modelo: TB-612T) conectado a un Polígrafo Nihon-Kohden (Japón).

Se realizaron 2 experimentos, los que se describen a continuación.

**Experimento 1:** Después de un período de estabilización de 30 min a los baños de órganos se añadieron volúmenes equivalentes de vehículo Tween 65/agua (controles), D-004 (250 µg/ml), ácido oleico (100 µg/ml), ácido láurico (50 µg/ml) ó ácido mirístico (25 µg/ml) durante 20 min. Las concentraciones de cada ácido seleccionadas son similares a las presentes en el lote de D-004 utilizado. Seguidamente se indujeron las contracciones mediante la adición acumulativa de concentraciones sucesivas de FE ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  mol/l).

**Experimento 2:** Después de un período de estabilización de 30 min, se añadieron volúmenes equivalentes de vehículo Tween 65/agua (controles), D-004 (250 µg/ml) ó de ácido oleico (100 µg/ml) + ácido láurico (50 µg/ml) + ácido mirístico (25 µg/ml) durante 20 min y seguidamente las contracciones se indujeron del modo referido en el párrafo precedente.

Todas las respuestas de las preparaciones controles, tratadas con D-004 y los diferentes ácidos se refirieron a las inducidas por el efecto máximo del grupo control (E/Emax).

### **2.6. Estudio de los efectos anti-inflamatorios del D-004.**

Ha sido referido que algunos fitofarmacos empleados en el manejo de la HPB como el extracto de *Pygeum africanum* (Lowe y Tyler, 1999) y el ELSP (Mogul *et al.*, 2000) presentan efectos anti-inflamatorios que pueden contribuir de modo complementario a su eficacia en el manejo de la HPB. Por ello, se investigaron los posibles efectos anti-inflamatorios del D-004.

### 2.6.1. Evaluación de los efectos del D-004 en el modelo del granuloma por algodón.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos: un grupo control que solo recibió el vehículo; dos tratados con D-004 (200 y 400 mg/kg, respectivamente) y un grupo de referencia tratado con indometacina (3 mg/kg). Las dosis de D-004 se seleccionaron tomando en cuenta las dosis efectivas para prevenir la HP inducida por T en ratas (Arruzazabala *et al.*, 2004, Carbajal *et al.*, 2004).

El D-004 y el vehículo se administraron por vía oral durante los 10 días previos y durante los 6 días posteriores a la implantación de la mota de algodón, mientras que la indometacina se administró también por vía oral, pero sólo durante los 6 días posteriores a la implantación de la mota de algodón.

Para la inducción del granuloma por algodón las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter y se les realizó una incisión en su mitad del dorso lateral. La mota de algodón estéril de 50 mg de peso se colocó subcutáneamente, posteriormente se suturó la herida y se aplicó un antiséptico local.

Al día siguiente de la última administración, las ratas se sacrificaron en atmósfera de éter y los granulomas se disecaron cuidadosamente, se pesaron en balanza rápida Sartorius para determinar los pesos húmedos y se colocaron en estufa a 60°C durante 48 horas. Una vez secos, se pesaron nuevamente. Para calcular el peso seco de los granulomas, el peso de la mota de algodón (50 mg) se sustrajo de este valor. El porcentaje de inhibición se expresó tomando como referencia el peso del granuloma formado en el grupo control.

### 2.6.2. Evaluación de los efectos del D-004 en el modelo de pleuresía por carragenina.

Las ratas se distribuyeron en 4 grupos, todos inyectados con carragenina: un grupo control que recibió por vía oral el vehículo, dos tratados con D-004 (200 y 400 mg/kg) y uno tratado con indometacina (10 mg/kg).

El D-004 y el vehículo se administraron por vía oral durante los 10 días previos a la inyección de carragenina, mientras que la indometacina se administró como dosis oral única 30 min antes del ensayo.

Para la inducción del edema pleural las ratas se anestesiaron con éter y en la cavidad pleural (entre la tercera y la cuarta costilla) se les inyectaron 0.3 ml de carragenina al 1% disuelta en solución salina. Cinco horas después se sacrificaron en atmósfera de éter y el exudado se colectó y se midió su volumen. Los exudados contaminados con sangre se desecharon. El porcentaje de inhibición del edema se calculó según:

$$\text{Inhibición} = 1 - \frac{(\text{VT})}{(\text{VC})} \times 100 (\%)$$

Donde:

VT volumen del edema en los animales tratados, VC volumen del edema en los animales controles

### 2.6.3. Determinación de la actividad de la 5-LOX en leucocitos Polimorfonucleares (PMNs).

#### 2.6.3.1. Obtención de la muestra de PMN.

Para obtener los leucocitos PMNs se utilizó la metodología de Boyum, 1983, para lo cual las muestras de sangre se colocaron en tubos que contenían anticoagulante (EDTA 100 µl/1 ml) y se diluyeron con un volumen similar de solución salina fisiológica (volumen final: 10 ml). En un tubo de centrifuga se colocó un volumen equivalente a 3 ml ó múltiplo de una solución de Nycondenz (d= 1.077 g/ml), preparada en solución reguladora Tris HCl 5mmol/l, pH 7.2 y NaCl 0.44% (p/v), y encima se colocaron cuidadosamente 6 ml de sangre diluida (o múltiplo similar).

Posteriormente, este gradiente se centrifugó a 800 x g durante 30 min a 20°C en un rotor de ángulo libre. Las células mononucleadas, que aparecen como una banda en la interfase Nycondenz-plasma, se colectaron con una pipeta y se transfirieron a un tubo de centrifuga más pequeño al cual se añadió un volumen similar de solución reguladora Buffer fosfato salina (PBS) 50 mmol/l/EDTA 1 mmol/l, pH 7.4. Esta mezcla se centrifugó nuevamente a 400 x g durante 10 min, el precipitado se lavó con un volumen similar de la solución reguladora y se resuspendió, utilizándose en la preparación cruda de la enzima.

La fracción citosólica se obtuvo de acuerdo a la metodología de Tateson *et al.*, 1988, para lo cual los PMNs se sonicaron durante tres ciclos de 30 seg, cada uno a la potencia submáxima y el homogenizado se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 100000 x g durante 1 h y la fracción citosólica se almaceno a -20°C hasta su utilización. Todas las operaciones se realizaron a una temperatura de 4°C.

#### **2.6.3.2. Ensayo de la actividad de la 5-LOX.**

La actividad de la 5-LOX se determinó según una modificación de la metodología de Abad *et al.*, 1994, midiendo la actividad de la enzima a través de la formación de los dienos conjugados mediante la lectura en espectrofotómetro (UV/Visible Ultrospec 2000) a 234 nm.

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: fracción citosólica (20-50 µg de proteína) disuelta en solución reguladora borato 0.2 mol/l, pH 9, sustrato (ácido linoleico) a concentraciones entre 125 y 3 mmol/l, D-004 preparado en CMC 2% (0.9-1000 µg/ml). La mezcla se preincubó durante 5 min, se añadió el sustrato y a intervalos de 1 min durante 10 min se cuantificó la DO a 234 nm. La actividad de la enzima se expresó en µmol dienos conjugados/min/mg proteína. El grado de inhibición se determinó frente a muestras incubadas en presencia de vehículo solamente.

### **2.7. Efectos antioxidantes del D-004 sobre plasma y tejidos de rata.**

#### **2.7.1. Aspectos generales.**

##### **2.7.1.1. Obtención de las muestras de plasma.**

Al concluir los tratamientos, las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter y se desangraron por la aorta abdominal. Las muestras de sangre se colectaron, en dependencia de las variables medidas en el estudio, en tubos a los cuales se añadió previamente un volumen de solución de EDTA al 10% (concentración final: 1 mg/ml de sangre) o 1 ml de sangre en tubos eppendorf heparinizados (5µl, heparina sódica 5000 UI/ml). El plasma se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Se utilizaron alícuotas de estas muestras para determinar las concentraciones de MDA, grupos carbonilos, reactividad frente al ácido trinitrobenzilsulfónico (ATNBS) (plasma con EDTA) y de la Capacidad Antioxidante Total del plasma (CAOP) (plasma heparinizado).

##### **2.7.1.2. Obtención de las preparaciones de membrana.**

Las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter y se desangraron a través de la vena cava. Posteriormente, se disecaron los hígados, se lavaron en solución salina fisiológica bien fría (0-4°C) y se tomaron alícuotas que se homogenizaron en potter en solución de sacarosa 0.32 mol/l (1:9, p/v). El homogenizado se centrifugó a 800 x g durante 10 min con el objetivo de eliminar el “debris” celular. El sobrenadante se centrifugó a 13000 x g durante 20 min y el nuevo sobrenadante se centrifugó a 28 000 x g durante 1 h.

Todas las operaciones se realizaron a temperatura entre 0 y 4°C. El precipitado se almacenó a -70°C hasta su utilización, momento en el cual se re-homogenizó en PBS.

### **2.7.1.3 Obtención del homogenato.**

Las próstatas se disecaron y almacenaron a -20°C hasta su utilización. Posteriormente se tomaron alícuotas que se homogenizaron en un homogenizador de cuchilla (Ultra-Turrax T25, Staufen, Germany) en baño de hielo en solución de PBS pH 7.4 (1:9, p/v). Al culminar este proceso las muestras se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso, volviéndose a homogenizar en un volumen similar de PBS.

### **2.7.1.4 Variables oxidativas.**

Se utilizaron diferentes sistemas de oxidación para inducir la formación de las sustancias reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico (SRATB).

#### **A. Sistemas de oxidación.**

En todos los sistemas empleados el volumen final de la mezcla de incubación fue 1ml y se añadió una concentración de proteína microsomal equivalente a 500 µg. El sistema enzimático (200 µM NADPH /200 µM ADP /2 µM FeCl<sub>3</sub>) y el sistema no enzimático (25 µM FeCl<sub>2</sub>/100 µM ascorbato /100 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en el cual los microsomas se inactivaron previamente con calor (60°C, 1 h). Además, se investigaron los efectos sobre la oxidación por adición de CCl<sub>4</sub> (2 µl/ml) en microsomas activos (Recknagel y Glende., 1973). En todos los casos las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos, como mínimo. El grado de PL se determinó de acuerdo a la formación de las SRATB.

Para determinar los efectos del D-004 sobre la PL microsomal inducida por los diferentes sistemas oxidantes, se incubaron muestras a las cuales se añadió el D-004 y en paralelo muestras a las cuales se añadieron volúmenes similares del vehículo (controles).

#### **B. Determinación de SRATB.**

La determinación de las SRATB se realizó según la técnica de Ohkawa *et al.*, 1979. Para ello, tras la incubación se añadió a la mezcla de reacción 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 se calentó 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 agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Se extrajo la capa orgánica y se leyó a 534 nm en un espectrofotómetro.

Los niveles de SRATB se calcularon según las concentraciones de MDA, para lo que se construyó una curva patrón con malondialdehído bis (dimetil acetal). Los valores de MDA se reportaron como nmol de MDA/mg de proteína.

#### **C. Determinación de la capacidad secuestradora del radical OH\*.**

Para esta determinación se utilizó la inhibición del daño a la desoxirribosa medido como la formación de SRATB (Burdon y Knippenberg, 1991). La mezcla de reacción (1.2 ml volumen final) contenía 2.8 mmol/l de desoxirribosa (BDH, Inglaterra), solución reguladora KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH (pH 7.4 ,15 mmol/l), FeCl<sub>3</sub> 20 µmol/l, EDTA 100 µmol/l, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.8 mmol/l, ácido ascórbico 100 µmol/l y el vehículo o D-004 a las concentraciones utilizadas.

Las soluciones de ascorbato y cloruro de hierro III ( $\text{FeCl}_3$ ) se prepararon frescas en agua bidestilada. El EDTA y el  $\text{FeCl}_3$  se mezclaron antes de ser añadidos al medio de incubación. Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , considerando al inicio de la reacción en el momento en que se adicionó el ascorbato. Posteriormente, se determinó la concentración de SRATB de acuerdo a la metodología descrita. Con el fin de investigar si el D-004 poseía un efecto quelante sobre el  $\text{Fe}^{2+}$ , se realizó en paralelo la misma determinación sin añadir EDTA, comparándose ambos efectos. Para el cálculo se confeccionaron las curvas de concentración de MDA vs la concentración de D-004 añadida.

#### **D. Determinación de la capacidad secuestradora de los radicales superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).**

Para esta determinación se utilizó una adaptación del juego de reactivos de la firma Randox (SD 125), empleada para medir la actividad de la enzima SOD. De este modo, se investigó la capacidad de captación de este radical a través de la inhibición del color generado por la reacción entre los radicales superóxido y el cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.F.T). Los radicales superóxido se generaron en el medio de incubación por el sistema Xantina/Xantina oxidasa. La intensidad del color se midió por espectrofotometría visible 505 nm. Teniendo en cuenta la influencia de posibles interferencias por la turbidez de las suspensiones de D-004, para cada determinación se utilizó como referencia una muestra a la cual sólo se añadió D-004. Para el cálculo se confeccionaron las curvas de concentración de Xantina oxidasa.

#### **E. Determinación de la capacidad secuestradora del 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato (ABTS+).**

Para esta determinación se utilizó el juego de reactivos de la firma Randox (NX2332). Se midió la captación de los radicales a través de la disminución del color que se produce por la reacción de la peroxidasa (metamioglobina) y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generada del catión  $\text{ABTS}^+$  en el medio de reacción.

La intensidad de color generado se midió a través de espectrofotometría visible a 600nm. Se utilizó HMTC (6-hidroxi-2.5.7.8-tetrametilcromán-2- ácido carboxílico) como patrón de referencia a una concentración de 1.65 mmol/l. La inhibición del color se expresó en % relativo a la lectura (en densidad óptica) que alcanza la muestra control a la cual se añadieron volúmenes similares del vehículo.

#### **F. Reactividad frente al ATNBS.**

La reactividad frente al ATNBS en muestras de plasma se determinó con una modificación del método de Steinbrecher *et al.*, (1987). Para ello, se añadieron 1ml de bicarbonato de sodio al 4% (pH 8.4) y 50  $\mu\text{l}$  de ATNBS al 1% a una alícuota de plasma equivalente a 60  $\mu\text{g}$  de proteína. Las muestras se incubaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente se añadió 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 100  $\mu\text{L}$  de HCl 1mol/l. Las muestras se leyeron a 340nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones de grupos aminos se determinaron comparando con los valores de DO obtenidos con un estándar de albúmina de concentración conocida y se expresaron en  $\mu\text{moles/mg}$  de proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **G. Determinación de los grupos carbonilos.**

Los grupos carbonilos se determinaron según Reznick *et al.*, 1994. El homogenato se preparó con solución reguladora fosfato 50 mmol/l, (pH, 7.4) (0.1% de digitonina, 40  $\mu\text{g/ml}$  de una mezcla de inhibidores de proteasa y 1 mmol/l de EDTA) y se centrifugó a 6000 x g durante 15 min, utilizándose el sobrenadante en la determinación.

Con el objetivo de descartar la presencia de ácidos nucleicos, antes del ensayo se realizó una lectura a 280/260 nm. Siempre que la razón fue mayor que 1 se realizó un paso intermedio de precipitación con sulfato de estreptomycin al 1% con el objetivo de eliminar los ácidos nucleicos. Posteriormente, a 1ml de sobrenadante se añadió 4ml de solución de dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mmol/l disuelta en HCl 2.5 mol/l. Tras agitación vigorosa, los tubos se guardaron en la oscuridad durante 1 h, al término de las cuales se añadieron 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) (concentración final del 10%), se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, y para eliminar los restos de DNFH el precipitado de proteínas se lavó 3 veces como mínimo con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1, v/v). Finalmente, el pellet de proteína se disolvió en 2 ml de guanidina 6 mol/l y en un espectrofotómetro se realizó la lectura contra blanco a 450 nm. Para el cálculo de los grupos carbonilos se utilizó el coeficiente de extinción molar de 22000 M<sup>-1</sup>. Los datos se reportaron en nmol/mg de proteína.

#### **H. Determinación de la CAOP.**

La CAOP se determinó utilizando el juego de reactivos de la firma Randox (NX2332). La captación de los radicales se midió a través de la disminución del color que se produce al generarse el catión ABTS<sup>+</sup> en el medio de reacción, producto de la reacción de la peroxidasa (metamioglobina) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La intensidad de color generado se midió a través de espectrofotometría visible a 600 nm. Los valores de CAOP se reportaron en μmol/l. La CAOP se determinó por duplicado para cada muestra de plasma.

#### **I. Determinación de la actividad enzimática de la SOD.**

La actividad de la SOD se determinó con el juego de reactivo Randox SD125 que se basa en la reacción de xantina/xantina oxidasa con formación de color. Para ello se tomaron 0.5 ml de sangre total con anticoagulante (EDTA) y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. El plasma se decantó, y los eritrocitos se lavaron cuatro veces con 3 ml de solución de NaCl (0.9 %) y se centrifugaron tras cada lavado. La lisis de los eritrocitos se produjo mediante la adición de 2 ml de agua destilada fría y colocándose durante 15 min a 4 °C. Seguidamente, esta preparación de eritrocitos lisados se diluyó 50 veces con 0.01 mol/l de buffer fosfato (pH=7) para alcanzar porcentajes de inhibición entre 30 y 60 %. El factor de dilución final fue de 200.

#### **J. Determinación de la actividad enzimática de la CAT.**

La actividad de la CAT se determinó por el método modificado de Aebis, 1974, en el que se monitorea la desaparición del peróxido de hidrógeno a 240 nm durante 5 min en espectrofotómetro. A 10 μl de muestra se añaden 2.89 ml de 50 mmol/l de buffer fosfato de potasio (pH =7.4). La reacción comienza al adicionar 0.1 ml de peróxido de hidrógeno, para un volumen final de 3 ml a 25 °C. La actividad se calcula por el coeficiente de extinción molar (43.6 x 10<sup>-3</sup>).

### **2.7.2. Efectos del D-004 “*in vitro*” sobre la PL en fracciones microsomales de hígado de ratas.**

#### **2.7.2.1 Tratamiento.**

Teniendo en cuenta que los efectos antioxidantes “*in vitro*” de los ácidos grasos de cadena mediana similares a los que componen el D-004 se observan tras su adición a la mezcla de ensayo a concentraciones entre 2 y 500 μg/ml (Coffey y Walsh, 1990; Austin y Ricer, 1996; Carson y Rittmaster, 2003), el D-004 se añadió a concentraciones entre 0.9 y 1000 μg/ml (0.9, 3.9, 15, 67, 100, 250 y 1000 μg/ml) con el objetivo de utilizar una gama más amplia de dosis.

### **2.7.2.2. Variables oxidativas medidas.**

En microsomas de hígado se determinaron los valores de SRATB inducidas por los sistemas oxidativos enzimático, no enzimático y por adición de CCl<sub>4</sub>. Además, se determinó la capacidad secuestradora de los radicales OH<sup>\*</sup>, O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> y del catión ABTS<sup>+</sup>.

### **2.7.3. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la PL basal en plasma y en microsomas hepáticos.**

#### **2.7.3.1 Tratamiento.**

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos (10 animales/grupo): un grupo control tratado con el vehículo y 5 tratados con D-004 (50, 100, 200, 400 y 800 mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía intragástrica (5 ml/kg) diariamente durante 14 días.

#### **2.7.3.2 Variables oxidativas medidas.**

Las variables oxidativas medidas en plasma fueron los niveles de MDA, la CAOP y la reactividad frente ATNBS, mientras que en fracción microsomal de hígado se midieron las SRATB inducidas por el sistema oxidativo enzimático.

### **2.7.4 Efectos del D-004 sobre la PL en próstata de ratas normales y de ratas con HP inducida con T.**

#### **2.7.4.1 Tratamiento.**

Se realizaron dos experimentos: el primero en ratas normales y el segundo en ratas con HP por T. El D-004 se administró por vía oral durante 14 días en ambos estudios.

En el primer experimento las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos (10 animales/grupo): uno control que solo recibió el vehículo y 5 tratados con D-004 (50, 100, 200, 400 y 800 mg/kg, respectivamente).

En el segundo experimento las ratas se distribuyeron en 5 grupos (10 ratas/grupo): un control negativo, inyectado por vía s.c con aceite de soya y tratado oralmente con el vehículo Tween 65/agua (2 %) y 4 grupos inyectados con T (3 mg/kg, s.c) diariamente durante 14 días (Carbajal *et al.*, 2004): un control positivo tratado por vía oral con el vehículo y 3 con D-004 (200, 400 y 800 mg/kg, respectivamente).

#### **2.7.4.2 Determinación del peso corporal y del peso de la próstata.**

El peso corporal (PC) se determinó en balanza rápida Mettler el día antes de iniciar el tratamiento (basal) y semanalmente. Al término del estudio y 24 horas tras la última administración las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter y se sacrificaron. Se les abrió el abdomen mediante una incisión en la línea media ventral, se separó su próstata de la vejiga y se pesó en balanza analítica Mettler Toledo, determinándose el peso de la próstata (PP).

#### **2.7.4.3 Determinación de variables oxidativas.**

Se determinaron los niveles de las SRATB generados por oxidación enzimática en homogenatos de próstatas de ratas normales. Además, se cuantificaron las concentraciones basales de SRATB y de grupos carbonilos en los homogenatos de próstatas obtenidas tanto de ratas normales como de ratas con HP inducida con T.

## **2.7.5. Efectos del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con HP inducida por T.**

### **2.7.5.1 Tratamiento.**

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente (10 ratas/grupo) en 4 grupos: un control negativo, inyectado por vía s.c. con aceite de soya y tratado oralmente con el vehículo Tween 65 (2 %) y 3 grupos inyectados con T: un control positivo tratado con el vehículo y dos con D-004 (400 y 800 mg/kg/día, respectivamente) el tratamiento se realizó durante 14 días.

La inducción de la HP en ratas se realizó mediante la inyección s.c diaria de propionato de T (3 mg/kg) durante 14 días. (Carbajal *et al.*, 2004)

La determinación del PC, PP y la relación PP/PC se realizó como fue descrito anteriormente.

### **2.7.5.2. Variables oxidativas.**

En plasma se determinaron la CAOP y la actividad enzimática de la CAT, mientras se cuantificó la actividad de la SOD en eritrocitos lisados.

# **RESULTADOS**

### CAPITULO 3. RESULTADOS.

#### 3.1. Efectos del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática "in vitro".

La adición de D-004 (0.24 – 125  $\mu\text{g/ml}$ ) a los homogenatos de fracciones citosólicas de tejido prostático produjo una inhibición significativa de la actividad de la enzima 5  $\alpha$ -reductasa (expresada mediante la generación de DHT) con respecto al control a partir de la concentración de 1.95  $\mu\text{g/ml}$ , la cual resultó dependiente de las dosis ( $r = 0.925$ ,  $p < 0.001$ ) (Tabla 1). La inhibición máxima fue marcada (cerca de 95%) y se logró con 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , ya que la adición de 125  $\mu\text{g/ml}$  produjo un efecto similar.

La adición del ELSP (0.24 – 125  $\mu\text{g/ml}$ ), utilizado como tratamiento de referencia, también produjo una inhibición significativa y dependiente de las dosis ( $r = 0.937$ ,  $p < 0.001$ ) de la actividad de la 5  $\alpha$ -reductasa prostática, si bien en este caso la inhibición resultó a partir de 3.9  $\mu\text{g/ml}$ , ya que los efectos de 1.95  $\mu\text{g/ml}$  no fueron significativos ( $p = 0.06$ ). También en este caso la inhibición máxima, lograda con 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , fue marcada (alrededor de un 93%).

**Tabla 1. Efectos de la adición de D-004 y ELSP sobre la actividad enzimática de la 5  $\alpha$ -reductasa del tejido prostático.**

Concentraciones $\mu\text{g/ml}$	Actividad Enzimática (nmoles DHT/min/mg proteína)	Inhibición (%)
Control	4.15 $\pm$ 0.352	-
<b>D-004</b>		
0.24	4.12 $\pm$ 0.213	0.7
0.48	4.08 $\pm$ 0.162	1.7
0.97	3.90 $\pm$ 0.095	6.0
1.95	2.99 $\pm$ 0.195 *	27.9
3.90	1.09 $\pm$ 0.051 *	73.8
15.62	0.56 $\pm$ 0.030 *	86.5
62.5	0.18 $\pm$ 0.011 *	95.7
125.0	0.19 $\pm$ 0.003 *	95.4
<b>ELSP</b>		
0.24	4.11 $\pm$ 0.305	0.8
0.48	4.09 $\pm$ 0.258	1.5
0.97	3.92 $\pm$ 0.058	5.4
1.95	3.58 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>	13.7
3.90	2.23 $\pm$ 0.197 *	46.1
15.62	0.95 $\pm$ 0.051 *	77.2
62.5	0.31 $\pm$ 0.014 *	92.6
125.0	0.26 $\pm$ 0.011 *	93.8

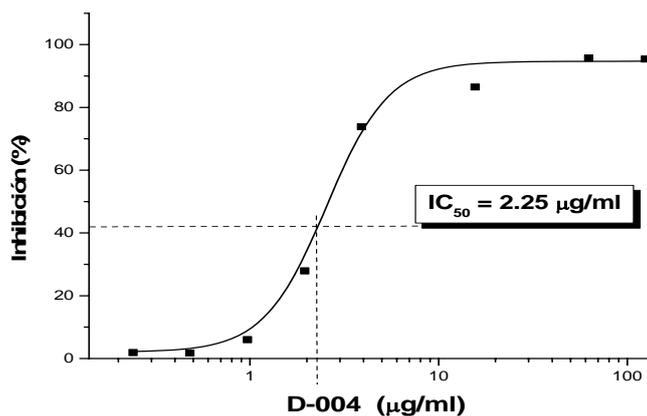
ELSP extracto lipídico de saw palmetto, Datos expresados como media  $\pm$  DS

\* $p < 0.05$ , <sup>a</sup> $p = 0.06$ , Comparación con el control (Test de la U de Mann Whitney).

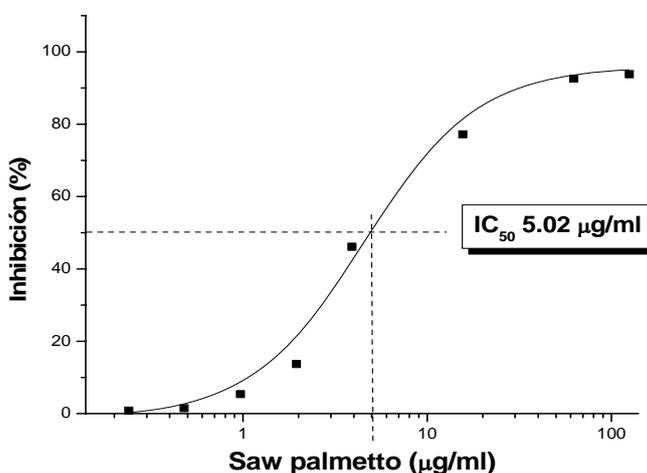
Las figuras 1 y 2 ilustran los efectos dosis-dependientes mencionados, ya que a medida que se incrementa la concentración de D-004 ó ELSP añadida al medio aumenta la inhibición de la actividad enzimática, hasta lograr en ambos casos un efecto máximo con la dosis de 62.5µg/ml.

En nuestras condiciones experimentales, las concentraciones inhibitorias medias (IC<sub>50</sub>) del D-004 y del ELSP fueron 2.25 µg/ml y 5.02 µg/ml, respectivamente.

**Figura 1. Curva dosis-respuesta del efecto inhibitorio “in vitro” del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5 α-reductasa total en fracciones citosólicas de tejido prostático.**

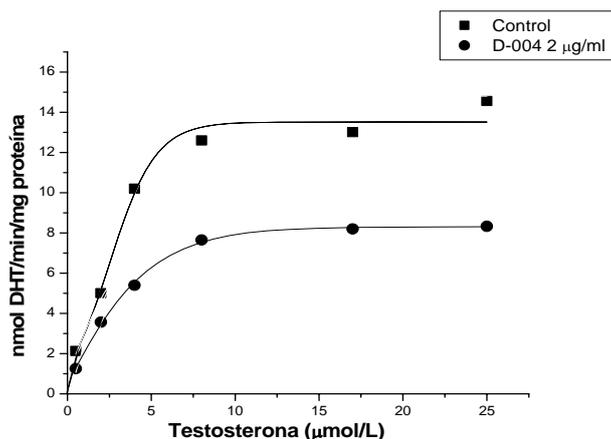


**Figura 2. Curva dosis-respuesta del efecto inhibitorio “in vitro” del ELSP sobre la actividad enzimática de la 5 α-reductasa total en fracciones citosólicas de tejido prostático.**



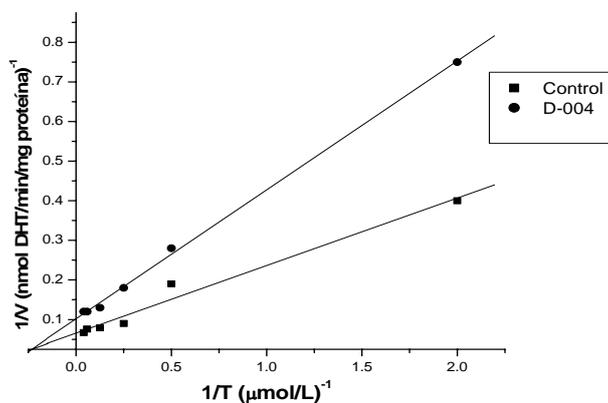
Profundizando en las características del efecto del D-004 sobre la cinética de la actividad de la 5 α reductasa prostática total, se muestran las curvas de saturación (figura 3) y la doble-recíproca (figura 4). En condiciones controles la enzima muestra saturación a concentraciones de sustrato mayores que 8 µmol/l. La Km aparente y la Vmax fueron 4.54 µmol/l y 15.3 nmol DHT/min/mg de proteína, respectivamente, mientras que la pre-incubación con D-004 redujo la Vmax de 15.3 a 10.0 nmol DHT/min/mg de proteína sin modificar la Km, indicando que la inhibición es de tipo no-competitiva.

**Figura 3. Curva de saturación de la inhibición del D-004 sobre la actividad de la 5  $\alpha$ - reductasa prostática.**



La curva se construyó con los valores medios de un estudio realizado en muestras triplicadas, con varias concentraciones de T en ausencia (control) y en presencia del D-004 añadido en concentración inhibitoria.

**Figura 4. Gráfico de Lineweaver- Burke (doble-recíproca) de la inhibición del D-004 sobre la actividad de la 5  $\alpha$ - reductasa prostática.**



El gráfico se construyó con los valores medios de un estudio realizado en muestras triplicadas, con varias concentraciones de T en ausencia (control) y en presencia del D-004 añadido en concentración inhibitoria.

### 3.2. Efectos del D-004 "in vitro" sobre receptores androgénicos de tejido prostático.

Antes de investigar los efectos del D-004 sobre los receptores a la DHT de tejido prostático se caracterizaron los parámetros del enlace de la DHT marcada a los receptores de la fracción citosólica de tejido prostático. La Tabla 2 muestra los valores de enlaces (totales, no específicos y específicos) de la DHT marcada con estos receptores, mientras la figura 5 ilustra la curva de saturación de los enlaces específicos. El número de uniones de la DHT a sus receptores muestra una típica dependencia de la concentración de ligando marcado, produciéndose la saturación a partir de los 50 mmol/l de ligando añadido (figura 5).

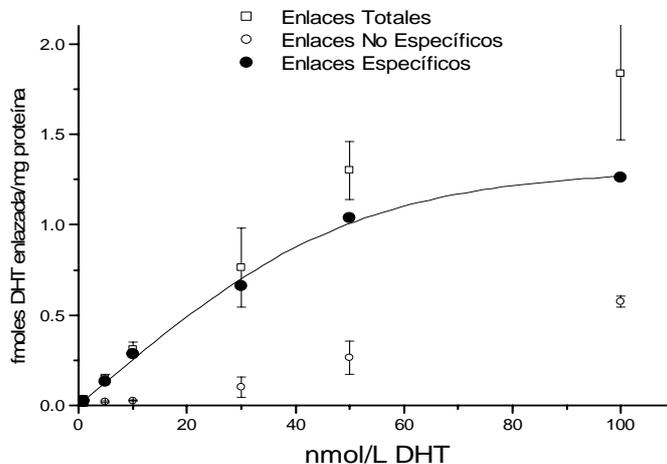
Ello confirma, dado que la conducta de saturación es uno de los marcadores de la presencia de estructuras receptoras, que estamos en presencia de uniones específicas de DHT a sus receptores de la membrana.

**Tabla 2. Enlaces de la <sup>3</sup>H-DHT a la fracción citosólica de tejido prostático de ratas.**

Concentración de DHT (nmol/l)	Enlaces totales/proteína (nmol/mg)	Enlaces no específicos/proteína (nmol/mg)	Enlaces específicos/proteína (fmol/mg )
0.50	0.006 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.0015
1	0.034 ± 0.008	0.009 ± 0.002	0.0240
5	0.15 ± 0.026	0.020 ± 0.004	0.1340
10	0.31 ± 0.043	0.024 ± 0.003	0.2840
30	0.76 ± 0.022	0.102 ± 0.054	0.6580
50	1.36 ± 0.16	0.264 ± 0.009	1.0360
100	1.83 ± 0.37	0.575 ± 0.053	1.2610

(Media ± DS). Para el cálculo de los enlaces específicos se utilizaron los valores promedios de los enlaces totales y no específicos.

**Fig. 5. Gráfico de saturación para los enlaces específicos de la DHT marcada a sus receptores de fracciones citosólicas de tejido prostático de ratas.**



La tabla 3 muestra los efectos del D-004 y el ELSP (sustancia de referencia) (ambos a concentraciones entre 0.9 y 500 µg/ml) sobre los enlaces de DHT, apreciándose que ninguna de las concentraciones ensayadas, (con o sin pre-incubación de las muestras) produjo el desplazamiento de las uniones totales, ya que no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control.

**Tabla 3. Efectos "in vitro" del D-004 y el ELSP sobre los enlaces de la DHT en tejido prostático.**

Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	Enlaces/ proteína (fmol/mg)	
	A	B
Control	0.051	0.063
<b>D004</b>		
0.9	0.045	0.059
7.8	0.050	0.059
31.2	0.022	0.066
125	0.024	0.041
500	0.053	0.081
<b>ELSP</b>		
0.9	0.071	0.078
7.8	0.013	0.059
31.2	0.019	0.069
500	0.031	0.064

ELSP: extracto lipídico de saw palmetto. Los resultados se corresponden con los experimentos donde:

A. Se incubaron los extractos a  $4^{\circ}\text{C}$ , junto al ligando marcado y la suspensión de membrana.

B. Se preincubaron los extractos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min con la preparación de membrana, con antelación a la adición de ligando marcado.

### **3.3. Efectos "in vitro" del D-004 sobre contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en próstata aislada de ratas.**

La adición de vehículo (control), D-004 o tamsulosin no cambió el tono basal de las preparaciones de próstatas aisladas de ratas. La tabla 4 muestra los efectos "in vitro" del D-004 y el tamsulosin sobre las contracciones inducidas por FE y KCl en preparaciones aisladas de próstatas de ratas. La incubación de la preparación con D-004 (250 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 20 min, no de 125  $\mu\text{g/ml}$ , disminuyó, de modo significativo y dependiente de la dosis, las contracciones inducidas por la FE.

El tipo de inhibición provocada (que aplana la curva dosis-respuesta incluyendo la respuesta máxima de la FE) sugiere la existencia de un antagonismo no competitivo.

El antagonismo de la respuesta por el D-004 fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que el logrado por el tamsulosin, el cual a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/ml}$  eliminó completamente (100% de inhibición) las contracciones inducidas por FE en las preparaciones de próstatas, mientras que la inhibición mayor lograda por el D-004 fue de un 79 % .

Los efectos del D-004 sobre las contracciones de próstata no fueron específicos, ya que a la concentración más alta evaluada de 500  $\mu\text{g/ml}$  inhibió las contracciones inducidas por KCl, en la misma extensión con que redujo las inducidas por FE. El tamsulosin no modificó las contracciones inducidas por KCl. (Tabla 4)

**Tabla 4. Efecto del D-004 "in vitro" sobre las contracciones inducidas por FE y KCl en próstata aislada de ratas.**

Magnitud de las contracciones (E/Emax) (%)					
Tratamiento	FE (1 x 10 <sup>-6</sup> mol/l)	FE (1 x 10 <sup>-5</sup> mol/l)	FE (3 x 10 <sup>-5</sup> mol/l)	FE (1 x 10 <sup>-4</sup> mol/l)	KCl (50 m mol/l)
Control	56.0 ± 4.66	86.1 ± 4.03	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0 ± 0.0
D-004 125µg/ml	46.8 ± 8.3	80.8 ± 9.9	88.2 ± 7.3	88.2 ± 7.3	--
D-004 250µg/ml	28.1 ± 6.2 **	52.4 ± 12.1**	54.1 ± 11.0***	60.0 ± 11.0***	108.0 ± 15.9
D-004 500µg/ml	11.6 ± 1.7***	25.4 ± 2.6***	40.5 ± 8.2***	46.0 ± 10.9***	43.3 ± 4.09 *
Tam 0.001µg/ml	9.30 ± 6.0***	35.6 ± 6.2 ***	72.9 ± 9.9	100	--
Tam 0.01µg/ml	0	0	0	0	102.3 ± 3.1

FE fenilefrina, Tam Tamsulosin, (Media ± DS),

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 Comparación con el grupo control (Test de la U de Mann Whitney)

### 3.4. Efectos "in vitro" del D-004, de los ácidos oleico, láurico y mirístico y de la adición conjunta de estos ácidos sobre las contracciones inducidas por FE en conducto deferente aislado de ratas.

De modo consistente con los resultados mostrados, la incubación de las preparaciones aisladas con D-004 (250 µg/ml) inhibió significativamente la respuesta contráctil inducida por cada concentración añadida de FE (Tabla 5). La adición de los ácidos láurico (50 µg/ml), oleico (100 µg/ml) ó mirístico (25 µg/ml) produjo inhibiciones significativas de las respuestas contráctiles producidas por FE. El ácido láurico, al igual que el D-004, inhibió la respuesta en todos los puntos de la curva-concentración respuesta a la FE, si bien el ácido mirístico sólo inhibió las respuestas inducidas por algunas concentraciones de FE (1 x 10<sup>-6</sup> y 3 x 10<sup>-6</sup> mol/l) y el oleico solo inhibió la respuesta inducida por FE a la concentración de 3 x 10<sup>-6</sup> mol/l.

Posteriormente se compararon los efectos de la adición "in vitro" del D-004 (250 µg/ml) con los de la mezcla de los ácidos (oleico 100 µg/ml, láurico 50 µg/ml y mirístico 25 µg/ml) sobre las contracciones inducidas por FE en conducto deferente de ratas (Tabla 6). Tanto el D-004 como la adición conjunta de los tres ácidos produjeron inhibiciones significativas de las contracciones inducidas por las diferentes concentraciones de FE. Los efectos inhibitorios del D-004 fueron estadísticamente similares a los obtenidos con la combinación de los tres ácidos.

En ambos experimentos la adición del D-004 (250 µg/ml) o de los diferentes ácidos a las concentraciones estudiadas no produjo cambios en el tono basal de la preparación.

**Tabla 5. Efecto del D-004 y los ácidos oleico, láurico y mirístico "in vitro" sobre las contracciones inducidas por FE en conducto deferente de ratas.**

Magnitud de las contracciones por FE (E/Emax) (%)					
Grupos	1x10 <sup>-6</sup> mol/l	3x 10 <sup>-6</sup> mol/l	1x 10 <sup>-5</sup> mol/l	3 x 10 <sup>-5</sup> mol/l	1x 10 <sup>-4</sup> mol/l
Control	17.0 ± 3.66	43 ± 5.18	68 ± 5.35	95 ± 2.19	100 ± 0.00
D004 250 µg/ml	3.0 ± 0.81***	17 ± 3.43***	30 ± 6.02***	41± 7.51****	42 ± 7.26 ****
AO 100 µg/ml	12.0 ± 6.22	30 ± 13.22*	51± 17.30	65 ±19.92	65 ± 19.92
AL 50 µg/ml	7.6 ± 2.00*	20 ± 5.80**	40 ± 11.48**	52 ± 12.55 **	54 ±12.03**
AM 25 µg/ml	8.0 ± 3.05*	28 ± 9.36*	57 ± 18.87	70 ± 21.89	72 ± 22.57

FE fenilefrina, (Media ± DS) AO: Acido Oleico, AL: Acido láurico, AM: Acido Mirístico.

\* p< 0.05, \*\*p< 0.01, \*\*\* p< 0.001, \*\*\*\* p< 0.0001. Comparación con el grupo control (Test de la U de Mann Whitney)

**Tabla 6. Efecto del D-004 y la combinación de los ácidos oleico, láurico y mirístico "in vitro" sobre las contracciones por FE en conducto deferente de ratas.**

Magnitud de las contracciones por FE (E/Emax) (%)					
Grupos	Concentraciones añadidas de FE				
	1x10 <sup>-6</sup> mol/l	3x 10 <sup>-6</sup> mol/l	1x 10 <sup>-5</sup> mol/l	3 x 10 <sup>-5</sup> mol/l	1x 10 <sup>-4</sup> mol/l
Control	13.0 ± 3.04	58.0 ± 5.04	87.0 ± 6.61	100 ± 0.00	100 ± 0.00
D004 250 µg/ml	2.8 ± 3.8**	22.0 ± 7.2**	47.0 ± 12.9 **	51.0± 9.9 **	51.0± 9.9 **
AO+AL+AM	5.0 ± 4.3 **	29 ± 171.4 **	55.0 ± 13.8**	62.0 ± 13.2**	62.0 ± 3.2**

AO: Ácido Oleico (100 µg/ml), AL: Ácido láurico (50 µg/ml), AM: Ácido Mirístico (25 µg/ml), (Media ± DS)

\*\*p< 0.01. Comparación con el grupo control. Las comparaciones entre ambos grupos tratados resultaron no significativas. (Test de la U de Mann Whitney)

### 3.5. Efectos anti-inflamatorios del D-004.

#### 3.5.1 Evaluación de efectos en los modelos de granuloma inducido por algodón y de pleuresía inducida por carragenina en ratas.

La administración oral de dosis repetidas de D-004 (400mg/kg) durante los 10 días previos y los 6 días posteriores a la implantación de la mota de algodón, disminuyó significativamente el peso húmedo, el peso seco y el edema del granuloma en un 32 y un 23% respectivamente (Tabla 7), mientras la dosis de 200mg/kg no produjo efectos significativos sobre estas variables. El efecto del D-004 sobre el granuloma fue inferior (p<0.01) al de la indometacina (sustancia de referencia), la cual a dosis bajas (3 mg/kg) inhibió la inflamación en un 50% (Tabla 7).

**Tabla 7. Efecto de la administración de D-004 sobre el modelo de granuloma por algodón.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Peso húmedo(Ph) (mg)	Peso seco (Ps) (mg)	Inhibición (%)	Edema $\Delta(\text{Ph-Ps})$	Inhibición (%)
Control		1189 ± 0.06	192 ± 0.016	-	996 ± 0.05	-
D-004	200	1026 ± 0.07 <sup>t+</sup>	153 ± 0.008 <sup>t+</sup>	20	872 ± 0.07 <sup>+</sup>	12
D-004	400	898 ± 0.01 <sup>***+</sup>	131 ± 0.005 <sup>*+</sup>	32	766 ± 0.01 <sup>***+</sup>	23
Indometacina	3	672 ± 0.03 <sup>***</sup>	95 ± 0.008 <sup>***</sup>	50	577 ± 0.029 <sup>***</sup>	42

(Media ± DS) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, t p=0.07 comparación con el grupo control, + p<0.01 comparación con indometacina (Test de la U de Mann Whitney)

Sin embargo, el tratamiento oral con D-004 a similares dosis (200 y 400 mg/kg) no modificó el volumen del exudado pleural inducido por carragenina (Tabla 8).

**Tabla 8. Efecto del D-004 sobre el edema pleural inducido por carragenina en ratas.**

Grupos	Dosis (mg/kg)	Volumen de exudado (ml)	Inhibición (%)
Control		1.12 ± 0.055	-
D-004	200	1.03 ± 0.09 <sup>+</sup>	8
D-004	400	1.02 ± 0.7 <sup>+</sup>	9
Indometacina	10	0.73 ± 0.06 <sup>***</sup>	35

\*\*\* p<0.001 Comparación vs control, + p<0.01 comparación con indometacina (Test de la U de Mann Whitney)

### 5.5.2. Evaluación de efectos sobre la actividad enzimática de 5-LOX.

La adición “*in vitro*” de D-004 (0.9 – 1000 µg/ml) a las fracciones citosólicas de PMN humanos produjo una inhibición dependiente de las dosis ( $r = 0.900$ ,  $p < 0.01$ ) de la actividad de la enzima 5-LOX (expresada mediante la generación de dienos conjugados) que resultó significativa a partir de la concentración de 15 µg/ml (Tabla 9, Fig. 6).

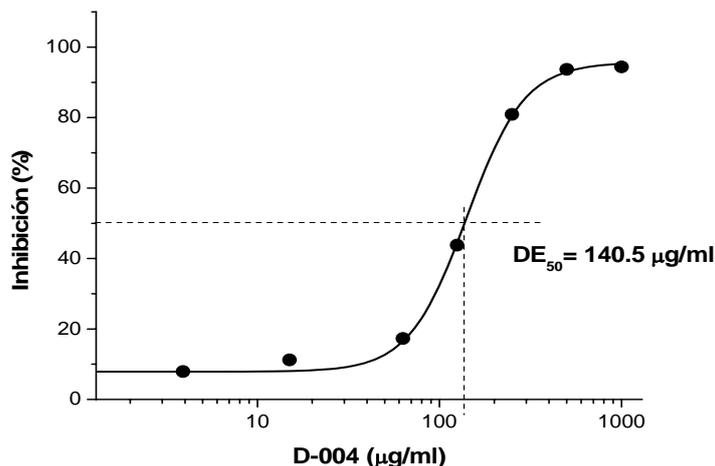
El efecto máximo se alcanzó con 500 µg/ml, ya que con la dosis mayor ensayada (1000 µg/ml) se obtuvo una inhibición similar. La máxima inhibición alcanzada fue marcada (alrededor de un 94%). La IC<sub>50</sub> para el D-004 fue 140.5 µg/ml.

**Tabla 9. Efectos de la adición del D-004 sobre la actividad enzimática de la 5-LOX en leucocitos PMN.**

Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad Enzimática ( $\mu\text{mol dienos conjugados /min/mg proteína}$ )	Inhibición (%)
Control	$6.66 \pm 0.4$	-
<b>D-004</b>		
0.9	$6.36 \pm 0.7$	4.2
3.9	$6.14 \pm 0.3$	7.9
15	$5.92 \pm 0.2^*$	11.2
63	$5.51 \pm 0.3^*$	17.3
125	$3.73 \pm 0.4^*$	43.8
250	$1.25 \pm 0.9^*$	80.9
500	$0.40 \pm 0.03^*$	93.7
1000	$0.37 \pm 0.3^*$	94.4

(Media  $\pm$  DS) \* $p < 0.05$ , Comparación con el control (Test de la U de Mann Whitney).

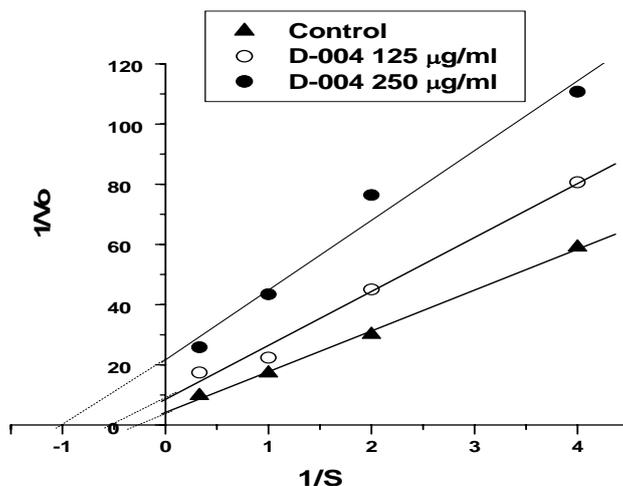
**Figura 6. Efecto de la adición “*in vitro*” de D-004 sobre la actividad de la enzima 5-LOX en fracciones citosólicas obtenidas de leucocitos PMN humanos.**



La actividad de 5-LOX se determinó a través de la generación de dienos conjugados. La gráfica fue construida con los valores promedios de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Por otro lado, la figura 7 muestra el gráfico de Lineweaver-Burk donde se representan los efectos de dos concentraciones de D-004 (125 y 250  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la velocidad inicial de la reacción enzimática medida en presencia de concentraciones crecientes de sustrato (0.125, 0.25, 1 y 3  $\text{mmol/l}$ ), apreciándose que el D-004 modifica los valores de  $K_m$  (intercepto con el eje de las abscisas) y los de  $V_{\text{máx}}$  (intercepto con el eje de las ordenadas), lo que indica que el D-004 ejerce una inhibición de tipo incompetitiva sobre la enzima.

Figura 7. Representación doble recíproca ( $1/v_0$  frente a  $1/[S]_0$ ), de los efectos del D-004 sobre la velocidad inicial de reacción de la 5-LOX en PMN.



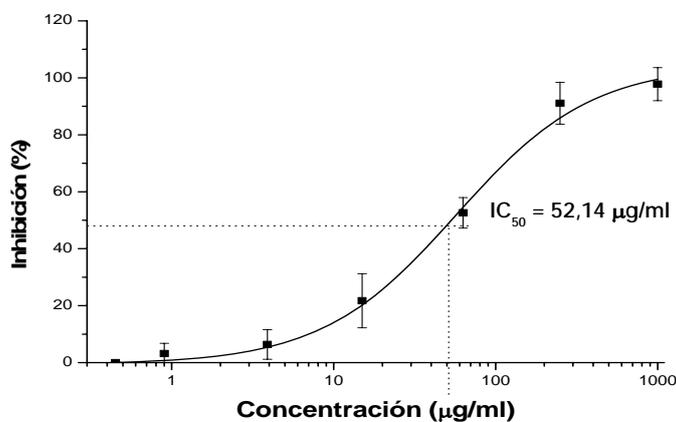
La velocidad inicial de reacción fue medida en presencia de 0.125, 0.25 y 3mmol/l de ácido linoleico.

### 3.6 Efectos antioxidantes del D-004 sobre plasma y tejidos de rata.

#### 3.6.1 Efectos del D-004 “*in vitro*” sobre la PL en fracciones microsomales de hígado de ratas.

La Figura 8 muestra los efectos de la adición del D-004 sobre la PL inducida por el sistema enzimático (NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub>) en preparaciones microsomales de hígado de ratas. Los efectos inhibitorios del D-004 fueron marcados y dependientes de las dosis ( $r = 0.909$ ,  $p < 0.01$ ), de tal forma que la inhibición se incrementó de acuerdo a las dosis añadidas al medio hasta lograr un efecto máximo prácticamente de un 100%. La IC<sub>50</sub> resultó igual a 52.14 µg/ml.

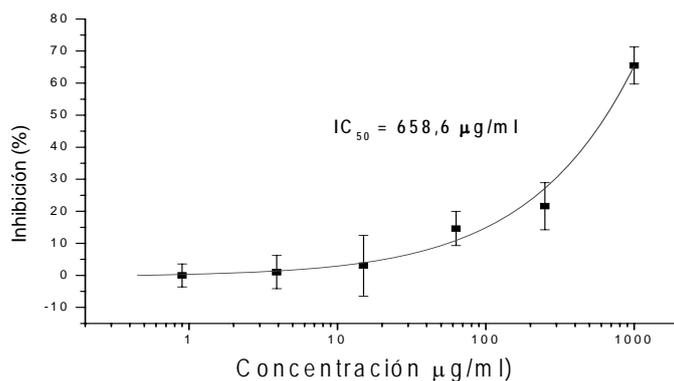
Figura 8. Efectos del D-004 sobre la generación de SRTBA inducida por NADPH/Fe<sup>3+</sup>/ADP (sistema enzimático) en microsomas hepáticos activos.



Los resultados presentados en la figura son la media  $\pm$  DS de tres experiencias independientes realizadas por triplicado.

La Figura 9 muestra los resultados de la evaluación de los efectos del D-004 sobre la PL inducida por el sistema  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato en los microsomas inactivados, para lo cual utilizamos un rango de dosis similar al del experimento anterior. Como se aprecia, también en este sistema el D-004 muestra efectos antioxidantes dependientes de la dosis ( $r= 0.860$ ,  $p<0.05$ ), si bien el grado de inhibición alcanzado fue de sólo un 65% a la mayor dosis ensayada (1000  $\mu\text{g/ml}$ ). La  $\text{IC}_{50}$  fue 658.6  $\mu\text{g/ml}$ .

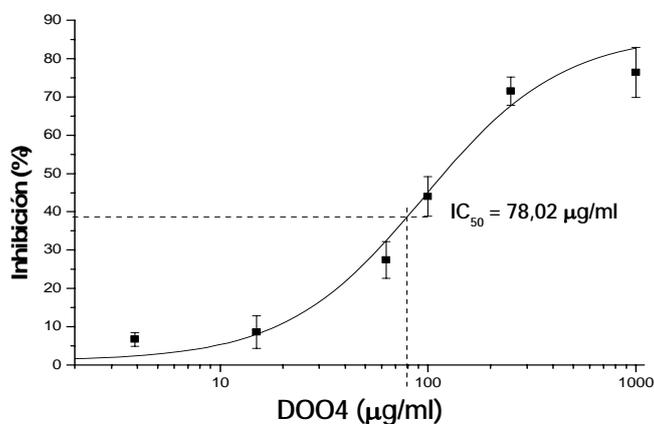
**Figura 9. Efectos del D-004 sobre la generación de SRTBA en microsomas inactivos inducida por la adición del sistema  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbato (sistema no enzimático).**



Los resultados presentados en la figura son la media  $\pm$  DS de tres experiencias independientes realizadas por triplicado.

La Figura 10 muestra los efectos del D-004 sobre la PL inducida por  $\text{CCl}_4$ . En este sistema el D-004 también resultó efectivo, ya que inhibió la generación de SRTBA inducida por la adición de  $\text{CCl}_4$  en el medio de incubación, efecto que resultó dependiente de las dosis. En este caso la inhibición máxima fue menor que en el sistema del  $\text{FeCl}_3$ , (70% aproximadamente) y la  $\text{IC}_{50}$  equivalente a 78.02 $\mu\text{g/ml}$ .

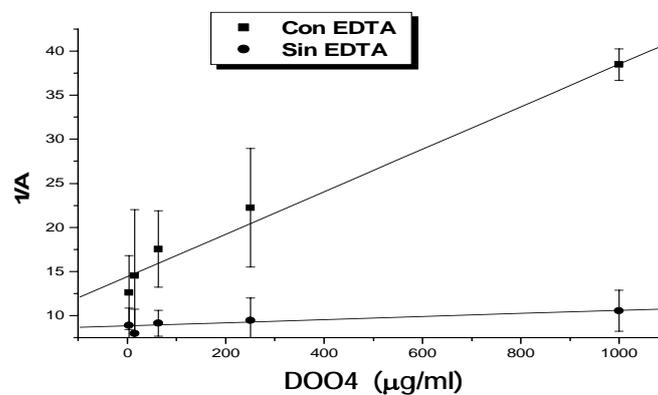
**Figura 10. Efectos del D-004 sobre la PL inducida por la adición de  $\text{NADPH}/\text{CCl}_4$  a los microsomas de hígado activos.**



Los resultados presentados en la figura son la media  $\pm$  DS de tres experiencias independientes realizadas por triplicado.

Posteriormente se investigaron los efectos del D-004 sobre el daño a la desoxirribosa a través de la formación de las SRTBA, para lo cual se adicionó  $\text{Fe}^{3+}$  previamente quelado con EDTA y el  $\text{Fe}^{3+}$  en ausencia de EDTA (Figura 11). En las experiencias en las que se adicionó el  $\text{Fe}^{3+}$  y el EDTA, el D-004 inhibió la generación de SRTBA, lo que sugiere que el D-004 protege a la molécula de desoxirribosa del daño que infringen los radicales libres  $\text{OH}^*$  generados en el medio por la presencia de los iones férricos y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, el D-004 no fue efectivo cuando el  $\text{Fe}^{3+}$  se añadió en ausencia de agente quelante en el medio, lo que se constata en el gráfico  $1/A$  352nm vs concentración que muestra una recta prácticamente paralela al eje de las ordenadas, lo que sugiere que la inhibición del daño a la desoxirribosa está mediada fundamentalmente por la capacidad secuestradora del D-004 sobre este radical y no por una acción quelante sobre el  $\text{Fe}^{3+}$ .

**Figura 11. Efectos del D-004 sobre la oxidación de la 2-desoxirribosa en presencia y en ausencia de EDTA.**



Los valores de cada punto (Media  $\pm$  DS) son las medidas de tres experimentos realizados por duplicado.

A partir de los resultados anteriores investigamos la capacidad secuestradora del D-004 frente a otras especies reactivas. La tabla 10 muestra que el D-004 no modifica la actividad de la SOD medida a través de los cambios de color producidos por la unión del anión superóxido (generado por la presencia del sistema Xantina/xantina oxidasa) con el cromógeno I.N.F.T.

**Tabla 10. Efectos del D-004 sobre la generación del anión superóxido.**

Tratamiento	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\Delta\text{DO}$
Control	-	$0.129 \pm 0.03$
D-004	0.9	$0.129 \pm 0.04$
D-004	3.9	$0.127 \pm 0.03$
D-004	15	$0.120 \pm 0.03$
D-004	63	$0.120 \pm 0.06$
D-004	100	$0.127 \pm 0.04$
D-004	250	$0.130 \pm 0.02$
D-004	1000	$0.132 \pm 0.01$

Media  $\pm$  DS. DO densidad óptica. Las diferencias fueron no significativas (Test de la U de Mann Whitney)

Posteriormente investigamos el efecto del D-004 frente al catión ATBS<sup>+</sup>, para lo cual añadimos al medio de incubación concentraciones similares a las empleadas en los experimentos con fracciones de membrana y utilizamos como control una muestra a la cual adicionamos un volumen similar del vehículo. El D-004 no modificó la disminución de la coloración provocada por la generación del ATBS<sup>+</sup> en el medio oxidante (Tabla 11). Estos resultados contrastan con la inhibición del color producida por la adición de un capturador de este catión, el ácido dicarboxílico HMTC. De este modo, estas experiencias sugieren que el D-004 no posee capacidad secuestradora para el ABTS<sup>+</sup> en el rango de dosis ensayada.

**Tabla 11. Efectos del D-004 sobre la generación del catión ABTS<sup>+</sup>.**

Tratamiento	Concentración	ΔDO
Control	-	0.225 ± 0.01
D-004	0.9 µg/ml	0.229 ± 0.09
D-004	3.9 µg/ml	0.222 ± 0.05
D-004	15 µg/ml	0.225 ± 0.03
D-004	63 µg/ml	0.222 ± 0.01
D-004	100 µg/ml	0.222 ± 0.05
D-004	250 µg/ml	0.225 ± 0.03
D-004	1000 µg/ml	0.210 ± 0.06
HMTC	1.65 mmol/l	0.122 ± 0.03 *

(Media ± DS), \* p < 0.05 comparación con el grupo control (Test de la U de Mann Whitney)

### 3.6.2 Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la PL basal en plasma y en microsomas hepáticos

El tratamiento oral durante 14 días con D-004 produjo una inhibición moderada (50%), significativa y dependiente de la dosis (r = 0.961, p < 0.01) de la PL inducida mediante el sistema enzimático en microsomas de hígado. La dosis efectiva mínima fue 200 mg/kg y el efecto máximo se alcanzó con 400 mg/kg, ya que con la dosis superior ensayada (800 mg/kg) no se obtuvo efecto adicional (Tabla 12)

**Tabla 12. Efecto del tratamiento oral con D-004 sobre la generación de MDA inducida por el sistema enzimático en microsomas de hígado de rata.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (nmol/mg prot)	Inhibición (%)
Control	0	34.89 ± 6.52	-
D-004	50	33.83 ± 8.85	3.0
D-004	100	31.67 ± 9.14	9.2
D-004	200	23.21 ± 10.11 *	33.5
D-004	400	17.28 ± 3.17 **	50.6
D-004	800	17.28 ± 3.22 **	50.8

Media ± DS, \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, comparación con el grupo control

(Test de la U de Mann Whitney)

El tratamiento oral con D-004 durante dos semanas redujo de modo significativo y dependiente de la dosis los niveles plasmáticos de MDA ( $r = 0.900$ ,  $p < 0.05$ ) y aumentó los de la CAOP ( $r = 0.930$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 13). En ambos casos 200 mg/kg fue la dosis mínima efectiva y 400 mg/kg la dosis que produjo el efecto máximo.

**Tabla 13. Efecto del D-004 sobre los niveles basales de MDA y CAOP en plasma de rata.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (nmol/mg pt)	Inhibición (%)	CAOP (mmol/l)	Incremento (%)
Control		13.94 ± 2.48	-	0.93 ± 0.13	-
D-004	50	13.12 ± 1.31	5.8	0.95 ± 0.18	2.1
D-004	100	13.04 ± 1.18	6.4	1.02 ± 0.10	9.6
D-004	200	11.48 ± 1.61 *	17.6	1.12 ± 0.15*	20.4
D-004	400	9.49 ± 2.01 **	31.9	1.56 ± 0.17*	67.7
D-004	800	10.18 ± 3.20 **	26.9	1.52 ± 0.21**	63.4

Media ± DS \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , comparación con el grupo control,  
(Test de la U de Mann Whitney)

El tratamiento oral con D-004 también protegió del daño oxidativo sobre proteínas plasmáticas medido como la reactividad frente al ATNBS, ya que a partir de 200 mg/kg produjo un incremento significativo y dependiente de la dosis, aunque modesto, de la reactividad al ATNBS. No se observó el efecto máximo, ya que la dosis superior ensayada de 800 mg/kg produjo un efecto mayor al de la dosis de 400 mg/kg (Tabla 14)

**Tabla 14. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la reactividad frente al ATNBS.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Reactividad al ATNBS (DO/mg prot)	Incremento (%)
Control		10.83 ± 0.24	-
D-004	50	10.90 ± 0.24	0.6
D-004	100	11.00 ± 0.34	1.5
D-004	200	11.29 ± 0.56 *	4.2
D-004	400	11.75 ± 0.13 **	8.5
D-004	800	11.98 ± 0.88 **	10.6

Media ± DS, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , comparación con el grupo control  
(Test de la U de Mann Whitney)

### 3.6.3 Efectos del D-004 sobre la PL en próstata de ratas normales y de ratas con HP inducida con T.

La Tabla 15 muestra que el tratamiento oral con D-004 (100 – 800 mg/kg) inhibió de modo marcado, significativo y dependiente de la dosis la generación de MDA inducida por el sistema enzimático en homogenato de próstatas normales de ratas a partir de la dosis de 100 mg/kg, mientras la menor dosis (50 mg/kg) produjo una ligera disminución que no alcanzó niveles de significación. El efecto inhibitorio máximo (aproximadamente 80%) se obtuvo con 400 mg/kg, puesto que la dosis de 800mg/kg, produjo efectos muy similares.

**Tabla 15. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la generación de MDA inducida por el sistema enzimático en homogenato de próstata de ratas normales.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (nmol/mg pt)	Inhibición (%)
Control	0	25.78 ± 8.62	
D-004	50	23.31 ± 3.85	9.6
D-004	100	16.56 ± 9.96*	35.7
D-004	200	10.60 ± 3.31*	58.8
D-004	400	5.01 ± 1.28**	80.5
D-004	800	5.04 ± 4.66**	80.4

Media ± DS, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, comparado con el grupo control,

(Test de la U de Mann Whitney)

La Tabla 16 muestra los efectos del D-004 sobre la HP inducida con T. La administración oral con D-004 a las dosis de 400 y 800 mg/kg previno el aumento del PP y de la relación PP/PC sin afectar el PC en las ratas con HP inducida con T. Estos efectos aumentaron marcadamente con la dosis, ya que la dosis más baja ensayada (200 mg/kg) solo produjo un 8.1% de inhibición que no alcanzó significación estadística, mientras que las dosis de 400 y 800 mg/kg produjeron una inhibición completa (≈ 100%).

**Tabla 16. Efectos de la administración oral del D-004 sobre la hiperplasia prostática (HP) inducida con testosterona en ratas.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	PC (g)	PP (mg)	Inhibición (%)	PP/PC
Control Negativo	0	306.0 ± 3.48	356.1 ± 15.8 **	-	1.15 ± 0.04**
Control Positivo	0	305.4 ± 6.47	463.0 ± 20.9 +	-	1.50 ± 0.06 +
D004	200	304.8 ± 5.61	454.3 ± 27.7 +	8.1	1.49 ± 0.10 +
D004	400	296.7 ± 2.75	355.9 ± 23.2 **	100	1.20 ± 0.08**
D004	800	317.0 ± 2.39	356.6 ± 19.4 **	99.5	1.13 ± 0.06**

PC peso corporal, PP peso próstata, Media ± DS. \*\*p < 0.01 comparado con el grupo control positivo, +p < 0.5

comparado con el grupo control negativo (Test de la U de Mann Whitney)

La tabla 17 muestra los valores de MDA y de grupos carbonilos en homogenatos de próstatas de ratas normales y de ratas con HP inducida con T. En ratas normales, el tratamiento con D-004 redujo de modo marcado, significativo y dependiente de la dosis los niveles de MDA en tejido prostático a partir de la dosis de 200 mg/kg, mientras la dosis de 100 mg/kg resultó inefectiva. El efecto máximo se alcanzó con 400 mg/kg (84% de inhibición) ya que la mayor dosis ensayada (800 mg/kg) no produjo efectos adicionales.

El tratamiento oral con D-004 redujo de forma moderada, significativa y dependiente de la dosis las concentraciones de los grupos carbonilos asociados a proteínas en homogenato de próstatas normales. La dosis efectiva mínima fue 200 mg/kg, ya que la dosis de 100 mg/kg produjo una reducción de un 26.6% que no alcanzó significación estadística. La dosis de 400 mg/kg produjo el efecto máximo (51% de inhibición) ya que la dosis de 800 mg/kg produjo un efecto muy similar.

En las ratas con HP inducida con T se observó un aumento significativo en los valores de MDA y de los grupos carbonilos en el tejido prostático del grupo control positivo respecto a los del control negativo, lo que fue prevenido modo marcado y significativo por el tratamiento con D-004 (200 – 800 mg/kg), alcanzando una inhibición completa (100 %) de ambos indicadores oxidativos con las dosis de 400 mg/kg.

**Tabla 17. Efectos del tratamiento oral con D-004 sobre los niveles de MDA y de grupos carbonilos en homogenatos de próstatas de ratas normales y con HP inducida con T.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (nmol/mg Pt)	Inhibición (%)	Grupos carbonilo (nmol/mg Pt)	Inhibición (%)
<b>Ratas normales</b>					
<b>Control</b>	0	24.17 ± 5.40	-	11.63 ± 1.85	-
<b>D-004</b>	100	18.51 ± 3.43	<b>23.4</b>	8.53 ± 1.52	<b>26.6</b>
<b>D-004</b>	200	10.60 ± 2.44*	<b>56.1</b>	7.26 ± 2.56 *	<b>37.5</b>
<b>D-004</b>	400	4.02 ± 1.45**	<b>83.6</b>	5.63 ± 1.60**	<b>51.6</b>
<b>D-004</b>	800	3.66 ± 1.62**	<b>84.8</b>	5.25 ± 1.49**	<b>54.8</b>
<b>Ratas con HP inducida con T</b>					
<b>Control negativo</b>	0	74.6 ± 6.05 ***	-	9.94 ± 1.20 ***	
<b>Control positivo</b>	0	125.7 ± 10.3 +	-	24.73 ± 1.39 +	
<b>D-004</b>	200	87.0 ± 11.3*	<b>75.7</b>	21.05 ± 1.07 *	<b>24.8</b>
<b>D-004</b>	400	53.5 ± 8.4 ***	<b>100</b>	7.39 ± 0.83****	<b>100</b>
<b>D-004</b>	800	65.7 ± 8.4 ***	<b>100</b>	8.80 ± 0.71 ****	<b>100</b>

Media ± DS, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 comparación con el control (ratas normales) o con el control positivo (ratas con HP por T) +p < 0.5 comparado con el grupo control negativo (Test de la U de Mann Whitney)

### 3.6.4. Efectos del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con HP inducida por T.

Como era esperado, en este experimento la inyección de T también aumentó significativamente el PP y la relación PP/PC con respecto al grupo control negativo, efectos que fueron significativamente reducidos por el tratamiento con D-004 (400 y 800 mg/kg) (Tabla 18). La dosis de 400 mg/kg se comportó como la dosis máxima efectiva puesto que 800 mg/kg/día no produjo un efecto adicional. Ningún tratamiento afectó el PC.

**Tabla 18. Efecto del D-004 sobre el aumento del tamaño prostático en ratas con HP**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	PC (g)	PP (mg)	I (%)	PP/PC ( $\times 10^{-3}$ )	I (%)
Control negativo		335.5 $\pm$ 12.83	377.6 $\pm$ 24.53	-	1.14 $\pm$ 0.10	-
Control positivo		307.5 $\pm$ 13.41	643.9 $\pm$ 47.41***	-	2.11 $\pm$ 0.15***	-
D-004	400	309.2 $\pm$ 6.86	461.1 $\pm$ 21.5++	69.8	1.47 $\pm$ 0.08 ++	65.9
D-004	800	315.8 $\pm$ 7.70	469.0 $\pm$ 15.4 ++	67	1.48 $\pm$ 0.03 ++	64.9

(Media  $\pm$  DS), \*\*\*p<0.001 Comparación con el grupo control negativo,

++ p<0.01 Comparación con el grupo control positivo (Test de la U de Mann Whitney)

La Tabla 19 resume los efectos del D-004 sobre la CAOP y sobre las actividades de la SOD y la CAT, variables que disminuyeron significativamente en el grupo control positivo con relación al control negativo. El tratamiento oral con D-004 (400 y 800 mg/kg) previno la disminución de la CAOP y de la actividad de la CAT, pero no de la SOD, ya que aumentó de modo marcado y significativo la CAOP (81.8 y 77.2%, respectivamente) y la actividad de la CAT (100 y 92.3% respectivamente) con relación al control positivo.

**Tabla 19. Efecto del tratamiento oral con D-004 sobre la CAOP y sobre las actividades enzimáticas de la SOD y CAT medidas en eritrocitos y plasma, respectivamente, de ratas con HP.**

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	CAOP (mmol/l)	I (%)	SOD (U/g de Hb)	I (%)	CAT (UI/min mgp) $\times 10^{-1}$	I (%)
Control negativo	-	0.58 $\pm$ 0.06	-	71.54 $\pm$ 3.50	-	1.21 $\pm$ 0.09	-
Control positivo	-	0.36 $\pm$ 0.05*	-	60.76 $\pm$ 2.29 *	-	0.82 $\pm$ 0.07 *	-
D-004	400	0.54 $\pm$ 0.02 +	81.8	60.47 $\pm$ 1.35	0	1.23 $\pm$ 0.14 +	100
D-004	800	0.53 $\pm$ 0.03 +	77.2	61.17 $\pm$ 0.87	3.8	1.18 $\pm$ 0.96 +	92.3

Media  $\pm$  DS, I (Inhibición), \*p<0.05. Comparación con el grupo control negativo, +p<0.05. Comparación con el grupo control positivo, (Test de la U de Mann Whitney)

# **DISCUSIÓN**

## CAPITULO 4. DISCUSIÓN.

### 4.1 Consideraciones generales.

El D-004 es un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*) cuya administración oral ha mostrado ser efectiva en los modelos de HP inducida por T (Arruzazabala *et al.*, 2004) y en la HP atípica inducida por FE en roedores (Arruzazabala *et al.*, 2006).

El presente trabajo incluye los estudios experimentales realizados para determinar los probables mecanismos por los cuales el D-004 podría resultar beneficioso en el tratamiento de la HPB con el fin de demostrar si produce los mecanismos que permiten predecir la eficacia de una sustancia en el manejo de la HPB y los STBU asociados, abordando en primer lugar los más relevantes, como la inhibición de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa prostática y el antagonismo de las respuestas mediadas por los ADR- $\alpha$ 1, acciones que sustentan los efectos de los principales medicamentos utilizados para el manejo de la HPB: los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática y los antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 (Paterson y Goldenberg, 2001; Oelkel *et al.*, 2002; Lepor, 2006).

Además, considerando la similitud en la composición del D-004 y la del ELSP, alternativa fitoterapéutica muy utilizada para tratar la HPB (Wilt *et al.*, 2000; Lowe, 2001; Aliev *et al.*, 2002; Hutchison *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2008 a) se investigó si el D-004 también podía producir efectos antiinflamatorios y antioxidantes complementarios, de modo coherente con las tendencias del estado del arte actual en esta temática (Kramer *et al.*, 2007; De la Taille *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2007; Curtis, 2008 b; Wang *et al.*, 2008 ; Begley *et al.*, 2008; Lucia y Lambert , 2008; Sciarra *et al.*, 2008; Sampson *et al.*, 2008; Alcaraz *et al.*, 2008).

Aunque ha sido referido que en la HPB también se produce un aumento de los estrógenos prostáticos (Chéchile, 2007; Gao y James, 2007) este estudio no investigó este aspecto, ya que trabajos previos habían descartado que el D-004 produjese efecto estrogénico o anti-estrogénico (Gutierrez *et al.*, 2008).

La etiología de la HPB, enfermedad común en hombres mayores de 50 años, es multifactorial y se relaciona con cambios hormonales y no hormonales que ocurren durante el envejecimiento (Katz, 2002; Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a; Schwinn y Roehrborn, 2008). La definición de esta patología, esencialmente histológica, refleja un proceso hiperplásico que conlleva al crecimiento incontrolado del tejido prostático glandular-epitelial y estromal/muscular que produce un aumento del tamaño de la próstata. Sin embargo, son los STBU aparejados a esta condición los que sustentan el malestar y la afectación de la calidad de vida de los pacientes (Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008 a), por lo cual su mejoría constituye un blanco primordial del tratamiento de la enfermedad.

Dada su localización a la salida de la vejiga y rodeando la uretra, la próstata hipertrofiada puede afectar la micción por compresión uretral (componente mecánico de la entidad HPB/LUTS). Sin embargo, los STBU no se producen exclusivamente a expensas del agrandamiento de la próstata, sino que dependen de componentes dinámicos relacionados con el tono del músculo liso uretral y prostático, considerados los más relevantes en la aparición de los STBU (Yamada *et al.*, 1987; Chapple *et al.*, 1989; Roehrborn, 2008 a).

La demostración de la capacidad del D-004 para actuar sobre estos componentes, por tanto, representa una pieza clave en las evidencias experimentales que sustentan su eficacia potencial en el manejo de la HPB, mientras que la demostración de sus efectos anti-inflamatorios y antioxidantes muestra la potencialidad de efectos pleiotrópicos beneficiosos sobre el tejido prostático.

## **4.2. Evaluación del efecto antiandrogénico del D-004.**

### **4.2.1 Efecto “*in vitro*” sobre la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ reductasa prostática.**

El factor hormonal más relevante en la patogénesis de la HPB es la sobreproducción de la concentración prostática de DHT por aumento de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa, enzima que cataliza la conversión de la T a DHT (Bartsch *et al.*, 2002; Bhargava *et al.*, 2004; Zhu y McGinley, 2009) con la consiguiente acumulación de DHT en el tejido y la producción de factores de crecimiento originada por su unión con los receptores androgénicos (Carson y Rittmaster, 2003), por lo cual los inhibidores de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa constituyen medicamentos de primera línea en el tratamiento farmacológico de la HPB (Lam *et al.*, 2003; Sandhu y Te, 2004; Zhu y McGinley, 2009). Teniendo en cuenta este antecedente y que el tratamiento oral con D-004 previene la HP inducida por T, pero no por DHT en ratas (Carbajal *et al.*, 2004) resultaba evidente que la inhibición de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática formaba parte del mecanismo antiandrógeno del D-004.

En nuestro estudio, la adición “*in vitro*” del D-004 a fracciones citosólicas de tejido prostático inhibió la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática de modo significativo, marcado y dependiente de la dosis, lo que explica, al menos en parte, el efecto antiandrogénico que sustenta que el D-004 resulte efectivo en prevenir la HP inducida por T, y no en la HP inducida por DHT (Carbajal *et al.*, 2004) y podría justificar su eficacia potencial en el manejo de la HPB.

Además, este hallazgo es consistente con uno de los mecanismos que sustentan los efectos del ELSP (Ihelé *et al.*, 1995; Weisser *et al.*, 1996), sustancia con la cual el D-004 guarda similitud en su origen, composición y efectos, y con los efectos descritos para los ácidos grasos componentes del D-004 como los ácidos láurico, oleico, mirístico, palmítico y linoleico (Weisser *et al.*, 1996; Raynaud *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2009 b).

Para reafirmar la validez de los resultados, evaluamos los efectos del ELSP sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática en nuestras condiciones experimentales, confirmándose que dicho extracto inhibe la actividad enzimática y que el valor de IC<sub>50</sub> encontrado (5.02  $\mu$ g/ml) es similar a los reportados por Rhodes y cols (1993) y por Iehlé y cols (1995), (5.6  $\mu$ g/ml y 4.9  $\mu$ g/ml, respectivamente), y lo mismo ocurre con el valor de inhibición máxima (95%) cercano al descrito por Weisser y cols 1996, (90%), lo que confirma la validez de nuestras condiciones y de los resultados observados con el D-004.

En nuestro estudio no utilizamos finasteride como sustancia de referencia de la inhibición de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa, pese a ser el más clásico de los inhibidores (Lam *et al.*, 2003; Sandhu y Te, 2004), lo que puede representar una limitación aparente del presente trabajo.

Sin embargo, dada la similitud en la composición del D-004 y el ELSP, consideramos que comprobar que los efectos descritos para el ELSP se reproducían en nuestras condiciones experimentales, no sólo era un argumento suficiente para corroborar la validez de los resultados, sino un aspecto importante para comparar la eficacia relativa de ambos extractos al inhibir la actividad enzimática.

La inhibición máxima de la actividad enzimática lograda “*in vitro*” fue similar para ambas sustancias, lo que indica que el efecto máximo deducible de este efecto debe ser similar, por lo que basado en este resultado el tratamiento con dosis orales máximas de ambos extractos debía producir similares efectos en el modelo de HP inducida por T.

Aunque la comparación del efecto de dosis orales máximas de ambas sustancias en el modelo de HP inducida por T no ha sido realizada hasta el presente, se encontró que al administrar dosis orales similares (400 mg/kg) de ambas sustancias, el D-004 resultó ligeramente más efectivo que el ELSP en prevenir la HP inducida por T (Arruzazabala *et al.*, 2004). El hecho que la IC<sub>50</sub> del D-004 (2.25 µg/ml) sea inferior a la del ELSP (5.02 µg/ml) sugiere que el D-004 presenta mayor potencia farmacológica “*in vitro*”, lo que pudiera explicar, al menos en parte, dicho resultado. Sin embargo, debe subrayarse que nuestro estudio muestra la inhibición “*in vitro*” de la actividad enzimática por ambas sustancias, mientras que la eficacia en prevenir la HP “*in vivo*” implica también la influencia de la biodisponibilidad relativa de ambos extractos sobre el tejido diana que podría influir en la diferencia de efectos observados a una misma dosis. Como no se ha comparado la biodisponibilidad de ambos extractos sobre el tejido prostático en similares condiciones experimentales, tal consideración es sólo especulativa.

En tal sentido, aunque los estudios farmacocinéticos de ambas sustancias (ELSP y D-004) son limitados, estudios independientes han mostrado que tras el tratamiento oral con ELSP ó D-004 enriquecidos con ácido oleico-H<sup>3</sup> marcado se observa radiactividad en el plasma y en el tejido prostático (Chevalier *et al.*, 1997, Pérez *et al.*, 2006), órgano diana del efecto implicado en el modelo de HP inducida por T, ya que el ácido oleico es uno de los principales componentes de ambos extractos (Arruzazabala *et al.*, 2008 a; Abe *et al.*, 2009 b) capaz de inhibir la actividad enzimática de la 5 α reductasa prostática (Abe *et al.*, 2009 b). Aunque ambos estudios farmacocinéticos se realizaron en condiciones fisiopatológicas diferentes, ya que el estudio del ELSP se condujo en ratas con HP (Chevalier *et al.*, 1997) y el del D-004 en ratas normales (Pérez *et al.*, 2006), en ambos casos la mayor acumulación de radiactividad tuvo lugar en la próstata con relación al plasma y otros tejidos, mostrando la distribución preferencial de ambas sustancias por el tejido prostático.

La inhibición de la actividad enzimática de la 5α- reductasa producida por el D-004 es de naturaleza no-competitiva, ya que redujo la Vmax de la reacción enzimática sin cambiar la Km aparente, mecanismo similar referido al ELSP (Sultan *et al.*, 1984), lo que indica que no debe ocurrir el enlace del componente (s) activo (s) del extracto al sitio enzimático.

El desarrollo de sustancias inhibidoras de la 5 α-reductasa prostática de potencial interés terapéutico requiere conocer si en realidad dichas sustancias son capaces de inhibir la actividad enzimática “*in vivo*”. Nuestro estudio demuestra que el D-004 inhibe la actividad de la 5α- reductasa prostática “*in vitro*”, no “*in vivo*”.

Sin embargo, nuestros resultados son suficientes para demostrar que este es uno de los mecanismos subyacentes en los efectos del D-004, ya que la eficacia en prevenir la HP inducida por T y no por DHT (Carbajal *et al.*, 2004) es un reflejo indirecto de la capacidad del D-004 de inhibir la actividad de la 5  $\alpha$  reductasa prostática “*in vivo*” y de lograr un efecto farmacológico relevante que implica que la absorción y biodisponibilidad de la sustancia permite lograr el efecto esperado en el tejido prostático.

El uso exclusivo de bioensayos que demuestran la capacidad de reducir el aumento del tamaño de la próstata inducido por T (Giudici *et al.*, 1996; Nnane *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2005), sin embargo, no resulta una demostración convincente del mecanismo implicado, ya que diversos mecanismos como el antagonismo de los receptores androgénicos, la inhibición central de la producción testicular de andrógenos, la inhibición del consumo de T por el tejido prostático y/o la inhibición de la síntesis de T pueden justificar este efecto.

En realidad, la evaluación del efecto potencial de una sustancia sobre la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -reductasa se basa en comparar la caracterización cinética de la enzima tras la incubación “*in vitro*” en presencia y ausencia de la sustancia a evaluar (Giudici *et al.*, 1996; Weisser y Krieg, 1998; Sun *et al.*, 1999; Salem *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2005), tal y como se realizó en el presente trabajo. Con este objetivo básicamente se emplean dos métodos: el colorimétrico (Sun y Tu, 1998) y el isotópico (Rhodes *et al.*, 1993) empleado en el presente estudio y muy utilizado para confirmar los efectos de diversas sustancias.

Con el empleo de esta metodología ha sido demostrado el efecto del finasteride (inhibidor competitivo de la enzima) (Rhodes *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1999; Weisser y Krieg, 1998), el epristeride (inhibidor incompetitivo) (Sun *et al.*, 1999) y el FCE 28260 (Giudici *et al.*, 1996) sobre la actividad de la 5  $\alpha$ -reductasa prostática. El finasteride inhibe la actividad de la enzima “*in vitro*” en el estroma y epitelio de la glándula prostática, con mayor efecto sobre la preparación epitelial (Weisser y Krieg, 1998). Asimismo, estudios “*in vitro*” han demostrado la capacidad del ELSP y de sus componentes individuales (los ácidos oleico, laurico, mirístico y linoleico) en inhibir la 5 $\alpha$ -reductasa prostática en microsomas hepáticos de ratas (Abe *et al.*, 2009 b)

Aunque existe un método que permite investigar los efectos “*in vivo*” de una sustancia sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática (Toomey *et al.*, 1991), éste ha sido poco utilizado. Por otra parte, aunque la determinación de los niveles de DHT en suero y tejido prostático es un reflejo de la inhibición enzimática “*in vivo*” (Giudici *et al.*, 1996; Nnane *et al.*, 1998), tales valores se reducen con todos los inhibidores de la síntesis de andrógenos, no solo con los inhibidores de la 5 $\alpha$ - reductasa (Nnane *et al.*, 1998). Por ello, con más frecuencia se combina la demostración del efecto “*in vitro*” sobre la actividad enzimática y el empleo de bioensayos que demuestren la capacidad del tratamiento oral para reducir el aumento de la próstata inducido por T (Giudici *et al.*, 1996; Nnane *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2005), lo que documenta de modo indirecto su efecto *in vivo* a este nivel, complementándose con estudios de la biodisponibilidad sistémica de la sustancia (Salem *et al.*, 2006).

En nuestro caso, demostramos que el D-004 inhibe la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa “*in vitro*”, y pudimos confirmar que el D-004 redujo el tamaño de la glándula prostática, en consonancia con estudios previos (Arruzazabala *et al.*, 2004; Carbajal *et al.*, 2005).

Tales evidencias, unido al hecho que el tratamiento oral con D-004 inhibe la HP inducida por T, no por DHT (Carbajal *et al.*, 2004) y que tras su administración oral se absorbe rápidamente y se distribuye en plasma y otros tejidos, fundamentalmente el prostático (Pérez *et al.*, 2006), órgano diana del efecto farmacológico, sustentan que este efecto del D-004 representa una parte importante del mecanismo de acción por el cual pudiera ser beneficioso en el manejo de la HPB.

#### **4.2.2. Efectos “*in vitro*” sobre la unión de la DHT a sus receptores androgénicos prostáticos.**

Otro factor involucrado en la etiología de la HPB es la unión de la DHT a sus receptores androgénicos prostáticos lo que estimula la proliferación celular y el crecimiento del tejido (Carson y Rittmaster, 2003), resultando lógico investigar los efectos a este nivel de cualquier sustancia con efecto antiandrogénico potencial.

No obstante, a diferencia de la inhibición de la 5  $\alpha$  reductasa prostática, que permite incluso la clasificación de una sustancia en una clase terapéutica, no existen medicamentos para tratar la HPB cuyo efecto sólo se base en el bloqueo del receptor al DHT, ya que estos compuestos impiden la captación de la DHT por todos los tejidos, no sólo por el prostático, lo que conlleva a la depleción de andrógenos en diversos tejidos y a la aparición de numerosos eventos adversos (Narayan *et al.*, 1996; Gao y James, 2007).

Los estudios que han evaluado los efectos del ELSP sobre la unión de la DHT a sus receptores han mostrado resultados dispares (Carrilla *et al.*, 1984; Sultan *et al.*, 1984; El Sheik *et al.*, 1988; Rhodes *et al.*, 1993), ya que algunos demostraron que el ELSP inhibe “*in vitro*” moderadamente (hasta un 50%) la unión de la DHT a la fracción citosólica de tejido prostático de ratas (Carrilla *et al.*, 1984), su unión a los receptores en cultivo de fibroblastos (Sultan *et al.*, 1984), y su consumo por diferentes tejidos (El Sheikh *et al.*, 1988), sugiriendo un efecto sobre los receptores a la DHT. Sin embargo, otro estudio mostró que el ELSP (hasta 100  $\mu\text{g/ml}$ ) no inhibió la unión a los receptores prostáticos de DHT (Rhodes *et al.*, 1993).

En nuestro estudio, la adición “*in vitro*” del ELSP a la fracción citosólica de tejido prostático no desplazó la unión de DHT a la membrana, lo que discrepa de los resultados de algunos autores (Carrilla *et al.*, 1984), pero concuerda con los de Rhodes *et al.*, 1993; por lo cual pueden considerarse como válidos. Aunque otros autores (Sultan *et al.*, 1984; El Sheik *et al.*, 1988) encontraron resultados positivos del ELSP a este nivel, los modelos utilizados son diferentes al empleado en el presente estudio, más similar al utilizado por Carrilla (1984) y por Rhodes y cols (1993). Aunque la variabilidad en la composición del ELSP pudiera explicar las diferencias encontradas en los distintos estudios, dado que los artículos publicados no muestran la composición exacta de los extractos utilizados (Sultan *et al.*, 1984; El Sheikh *et al.*, 1988; Rhodes *et al.*, 1993) no podemos emitir opinión conclusiva al respecto.

En nuestro caso, sin embargo, el hecho de que la adición del lote de ELSP en el mismo rango de dosis haya inhibido la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática y no haya afectado la unión de la DHT a sus receptores sugiere que la ausencia de efecto no se debe a un problema de la calidad del extracto empleado.

La adición de D-004 tampoco modificó la unión de DHT a la membrana, pese a emplearse concentraciones que fueron efectivas en inhibir la actividad 5 $\alpha$ - reductasa en preparaciones de próstata.

Por tanto, en nuestras condiciones experimentales se descarta que la unión a los receptores de DHT sea un componente relevante de la acción antiandrogénica del D-004, lo que concuerda con el hecho de que el D-004 haya sido efectivo en inhibir la HP inducida por T, pero no por DHT (Carbajal *et al.*, 2004), ya que para que una sustancia (s) sea eficaz en este último modelo se requiere que desplace la unión de DHT a los receptores prostáticos.

Finalmente, no investigamos si el D-004 presenta un posible efecto modulador de los receptores androgénicos, ya que aunque recientemente se han desarrollado compuestos de este tipo que actúan con especificidad sobre la próstata y que presentan interés potencial en el tratamiento de la HPB, su impacto clínico queda aun por demostrarse (Gao *et al.*, 2004).

#### **4.3. Efectos sobre las respuestas mediadas por los ADR- $\alpha$ 1.**

El componente dinámico o no hormonal que contribuye de forma esencial al desarrollo de los STBU que acompañan a la HPB está relacionado con el tono de la musculatura lisa uretral y prostática. La estimulación de los ADR- $\alpha$ 1<sub>A</sub> del músculo liso uretral y prostático causa obstrucción del flujo urinario en los pacientes con HPB (Chapple *et al.*, 1989) y que en la próstata hipertrofiada de estos pacientes existe un aumento del número de estos receptores (Yamada *et al.*, 1987). Consecuentemente, los antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 representan una terapia de primera línea en el tratamiento de los STBU en pacientes con HPB. (Lepor, 2006). Estudios previos habían demostrado que el D004 antagoniza las contracciones inducidas por NA en vaso deferente de rata (Arruzazabala *et al.*, 2005) y el aumento de presión arterial inducido por NA en ratas (Arruzazabala *et al.*, 2005), lo cual sugería el antagonismo de respuestas mediadas “*in vitro*” e “*in vivo*” por ADR- $\alpha$ 1, si bien no existían evidencias de un efecto similar sobre la respuesta contráctil en la próstata, órgano diana de la HPB. Por tales motivos investigamos los posibles efectos del D-004 sobre las contracciones mediadas por los ADR- $\alpha$ 1 en próstatas aisladas de ratas. Nuestros resultados demuestran que el D-004 (250-500  $\mu$ g/ml) produce una disminución de las contracciones inducidas por FE en próstata aislada de ratas que resultó significativa, dependiente de las concentraciones y que responde a un antagonismo de tipo no competitivo. Estos resultados concuerdan con datos previos obtenidos en conducto deferente de ratas (Arruzazabala *et al.*, 2005) y demuestran que tal efecto también se manifiesta sobre el órgano blanco de la acción del D-004: la próstata, y son consistentes con la inhibición “*in vivo*” de los cambios urodinámicos inducidos por la FE en ratas (Arruzazabala *et al.*, 2006). El D-004, sin embargo, resultó menos efectivo que el tamsulosin en inhibir la respuesta contráctil inducida por FE, ya que la inhibición máxima con D-004 fue de un 60% aproximadamente y de un 100% con tamsulosin.

Sin embargo, es de señalar que la mayor concentración de D-004 (500  $\mu$ g/ml), no la de 250  $\mu$ g/ml, también inhibió las contracciones inducidas por el KCl, agente despolarizante de membrana que causa una contracción del músculo liso no mediada por los ADR- $\alpha$ 1. Estos resultados indican que aunque el antagonismo de la contracción por FE producida por el D-004 involucra un efecto sobre los ADR- $\alpha$ 1<sub>A</sub>, el efecto de la dosis mayor no resulta específico pues también implica un efecto antiespasmódico, similar al descrito para el ELSP (Gutierrez *et al.*, 1996; Odenthal y Rauwald, 1996).

En contraste y como era esperado, el efecto antagónico del tamsulosin (antagonista específico de los ADR- $\alpha_1$ ) fue específico, ya que inhibió por completo (100%) las contracciones por FE sin modificar las inducidas por KCl.

La ausencia de especificidad del efecto “*in vitro*” de la mayor concentración de D-004 ensayada, sin embargo, no limita la relevancia potencial del efecto del D-004 sobre las respuestas “*in vivo*” mediadas por los ADR- $\alpha_1$ , ya que el tratamiento oral con D-004 previene la HP atípica y los cambios urodinámicos inducidos por la FE en ratas (Arruzazabala *et al.*, 2006), hecho que evidencia la presencia “*in vivo*” de un antagonismo (específico o no) frente a este agonista.

Puede resultar llamativo que, a diferencia del enfoque utilizado en el estudio de los efectos sobre la actividad de la 5  $\alpha$ -reductasa, en estos experimentos no hayamos investigado los efectos del ELSP, lo cual pudiera concebirse como una limitación del presente estudio.

Sin embargo, dada la similitud de los efectos del D-004 y del ELSP sobre las contracciones inducidas por NE en conducto deferente de rata (Arruzazabala *et al.*, 2005), preferimos comparar los efectos del D-004 con los del tamsulosin por tratarse de un antagonista selectivo de los ADR- $\alpha_1$  presentes en próstata.

Aunque otros autores habían demostrado que los ácidos láurico, oleico y mirístico son capaces de inhibir la actividad enzimática de la 5  $\alpha$ -reductasa prostática (Raynaud *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2009 b), su capacidad de antagonizar las respuestas mediadas por los ADR- $\alpha_1$  no había sido demostrada con anterioridad. Por tal razón, investigamos los efectos de estos ácidos, componentes fundamentales del D-004, sobre las contracciones inducidas por FE en el conducto deferente aislado de rata.

En tal sentido, seleccionamos la preparación de conducto deferente aislado y no la de próstata aislada de rata, pese a ser esta el órgano diana de la entidad STBU/HPB, porque las contracciones inducidas por los agonistas adrenérgicos en conducto deferente son mucho mayores y mejor cuantificables que en la próstata aislada, lo que facilita la ejecución de experimentos en que se comparan los efectos de varias sustancias, como era nuestro caso.

Nuestros resultados demostraron, por primera vez, que el ácido oleico, el láurico y el mirístico inhiben las contracciones inducidas “*in vitro*” por agonistas  $\alpha$  adrenérgicos como la FE en conducto deferente aislado de rata. Dentro de ellos, el ácido láurico fue el que logró inhibir la respuesta contráctil producida por todas las concentraciones de FE. Estos resultados indican que estos ácidos son responsables del efecto del D-004 en este modelo, y el hecho de que la adición conjunta de los tres ácidos a las concentraciones en que se encuentran en el D-004 reproduzcan los efectos inhibitorios de este último confirma esta hipótesis y prácticamente descarta que otro componente del D-004 contribuya a este efecto de modo importante.

Estudios recientes publicados con posterioridad a la realización de nuestros experimentos, demostraron que estos ácidos tienen la capacidad de unirse no-competitivamente a tres tipos de estructuras receptoras presentes en la musculatura lisa del tracto bajo urinario: los ADR- $\alpha_1$ , los receptores muscarínicos y los receptores 1,4 Dihidropiridina acoplados a canales de calcio (Abe *et al.*, 2009 b). Estos resultados son consistentes con los nuestros que mostraron el antagonismo no-competitivo e inespecífico sobre la respuesta contráctil inducida por FE en preparaciones de próstata aislada de ratas.

En nuestros experimentos el D-004 y los ácidos individuales no afectaron el tono basal de las preparaciones de próstata y conducto deferente aisladas de rata, no reproduciendo la acción simpaticomimética descrita para el ELSP (Cao *et al.*, 2005).

Aunque no podemos concluir las razones que sustentan la diferencia entre nuestros resultados y los descritos en este sentido para el ELSP, el hecho que la adición de los ácidos no haya provocado tal efecto sugiere que otros compuestos presentes en el lote de ELSP ensayado por dichos autores podría ser el responsable de tal acción simpaticomimética.

#### **4.4. Evaluación de los efectos anti-inflamatorios del D-004.**

Existen evidencias crecientes que sustentan la contribución de la inflamación al crecimiento incontrolado del tejido prostático tanto en la HPB como en el cáncer de próstata (Sciarra *et al.*, 2008), por lo cual los procesos inflamatorios se encuentran entre los factores etiológicos que puede contribuir al desarrollo de la HPB.

La inflamación que acompaña comúnmente a la HPB puede contribuir al daño tisular y las citoquinas producidas por las células inflamatorias pueden constituir factores locales que desencadenen la producción de factores de crecimiento y la angiogénesis tisular como respuesta de cicatrización (Lucia y Lambert, 2008). Ha sido sugerido que las células T activadas y los macrófagos juegan un rol importante en la patogénesis de la HPB, así como las citoquinas producidas por las células inflamatorias que estimulan la producción de factores de crecimiento local en la próstata sustentando la hipótesis de que una reducción de la inflamación podría ser de gran utilidad en el tratamiento de la HPB (Wang *et al.*, 2008, Lucia y Lambert, 2008).

Tales antecedentes justificaban la evaluación de los posibles efectos anti-inflamatorios del tratamiento oral con dosis repetidas de D-004. En tal sentido, nuestros resultados demuestran que la administración oral de D-004 a una dosis efectiva (400 mg/kg) en prevenir tanto la HP inducida por T (Arruzazabala *et al.*, 2004; Carbajal *et al.*, 2004; Noa *et al.*, 2005) como por FE (Arruzazabala *et al.*, 2006; Arruzazabala *et al.*, 2008 a) en ratas inhibió de modo significativo la formación del granuloma en el modelo de inflamación inducida por la mota de algodón, pero resultó inefectivo en el modelo de pleuresía por carragenina. A diferencia de su eficacia en reducir la inflamación crónica inducida por la mota de algodón, el D-004 (400 mg/kg) no modificó la inflamación aguda pleural inducida por carragenina.

Estos resultados parecen encontrar explicación en los diferentes eventos del proceso inflamatorio involucrados en estos modelos. Como es conocido, el proceso inflamatorio involucra diversos eventos como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular con formación de exudado inflamatorio y edema local, migración de leucocitos, y liberación de mediadores (histamina, serotonina, tromboxano, prostaglandinas, leucotrienos -LT-, entre otros) (Mitchell y Cotran, 2000; Kim *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2009).

La magnitud del efecto del D-004 en el modelo del granuloma por algodón, sin embargo, es modesta para una sustancia cuyo objetivo fundamental sea producir un efecto anti-inflamatorio, como indica el porcentaje de reducción logrado en comparación con el efecto de la indometacina. Sin embargo, la presencia de tal efecto podría, junto a los otros efectos ya demostrados, contribuir a reducir la inflamación prostática, por lo cual puede considerarse como un efecto pleiotrópico potencialmente beneficioso en el manejo de la HPB.

El evento inflamatorio más relevante en el modelo de granuloma por algodón es la migración celular de leucocitos neutrófilos que lleva a su agregación, degranulación y liberación de sus enzimas microsomaes y que es propiciada por mediadores quimiotácticos, fundamentalmente leucotrienos (LT) como el LTB<sub>4</sub> (Kramer *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2008 a; Sampson *et al.*, 2008; Begley *et al.*, 2008).

La inyección de carragenina en la cavidad pleural de ratas induce una respuesta inflamatoria aguda que se caracteriza por una rápida acumulación de fluido, proteínas plasmáticas y entrada de leucocitos en la cavidad, liberándose mediadores como la histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas en el fluido pleural. Además hay un aumento de las prostaglandinas E y F (PgE y F) que desempeñan un papel fundamental durante las primeras horas del proceso inflamatorio, mientras que la concentración de prostaciclina (Pgi<sub>2</sub>) y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) aumenta después de 3 horas. El LTB<sub>4</sub> también se encuentra presente en el exudado pleural, ya que los neutrófilos sintetizan este metabolito (Alves *et al.*, 2004).

El hecho de que el efecto anti-inflamatorio del D-004 sólo se manifieste en el modelo de inflamación crónica (granuloma por algodón) y no en el de pleuresía inducida por carragenina, modelo de inflamación agudo, sugiere una posible acción del D-004 sobre la migración y/o infiltración de células inflamatorias, característica del tipo crónico de inflamación (Nandal *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta la falta de eficacia del D-004 sobre el edema de tipo vasogénico inducido en la cavidad pleural de ratas por la inyección de carragenina, modelo en el cual la COX desempeña un papel crucial, consideramos que no era probable que el D-004 inhibiera esta enzima, razón por la cual no se investigaron los efectos del D-004 sobre la actividad de la COX.

Teniendo en cuenta el efecto anti-inflamatorio del D-004 observado en el modelo de granuloma por algodón, y la implicación de los LT, fundamentalmente, el LTB<sub>4</sub>, mediadores quimiotácticos de la migración celular de leucocitos neutrófilos, se investigaron los efectos del D-004 sobre la 5-LOX.

Los LT son importantes mediadores de la inflamación que pueden generarse en los leucocitos PMN: los neutrófilos y eosinófilos producen los LTB<sub>4</sub> y los basófilos y mastocitos producen los LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Es conocido que la 5-LOX cataliza la formación del epóxido insaturado LTA<sub>4</sub> a partir del ácido eicosatetraenoico (5-HPETE), y que posteriormente por la acción de otras enzimas, se forman otros LT, como el LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y el LTE<sub>4</sub> (Salmon *et al.*, 1987; Samuelsson *et al.*, 1987). Además, los estudios estructurales sobre la LOX muestran la presencia de diversas isoformas de esta enzima en humanos; la 5S-LOX, presente en los leucocitos PMN, la 12S-LOX que se expresa fundamentalmente en plaquetas y células endoteliales, la 15S-LOX presente en reticulocitos, eosinófilos, macrófagos y piel (Funk, 2002) y la 15S-LOX2 que se expresa fundamentalmente en tejido prostático, pulmones y córnea (Brash *et al.*, 1997; Boeglin *et al.*, 2001; Andrew *et al.*, 1998). Ha sido descrito que la expresión molecular de la 15S-LOX2 se encuentra aumentada en pacientes con HPB y que algunos metabolitos del AA pudieran estar implicados en el crecimiento del tejido prostático (Shappell *et al.*, 1999).

El D-004 inhibió “*in vitro*” (0.9 -1000 µg/ml) la actividad de la 5-LOX presente en leucocitos PMNs (IC<sub>50</sub>=140.5 µg/ml) de modo dependiente de las dosis, hasta alcanzar una inhibición cercana al 100% con la dosis máxima ensayada que fue de tipo incompetitiva al modificar tanto los valores de Km como de Vmax.

La inhibición ejercida por el D-004 sobre la actividad de la 5-LOX podría explicar, al menos parcialmente, los efectos anti-inflamatorios observados, ya que esta enzima presente en los neutrófilos y los eosinófilos, es la responsable del paso inicial en la ruta de síntesis de LTB<sub>4</sub> (Díaz, **2001**; González *et al.*, **2003**; Begley *et al.*, **2008**) en estas células. Además, la 5-LOX se encuentra localizada prácticamente en todas las células que participan en el proceso inflamatorio, por lo tanto, su inhibición podría también disminuir la formación de los LT C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, los cuales actúan también como mediadores de la inflamación (Sala *et al.*, **1998**; Díaz, **2001**; González *et al.*, **2003**; Begley *et al.*, **2008**).

El efecto inhibitorio del D-004 sobre la 5-LOX no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que tanto el ELSP (Paubert-Braquet *et al.*, **1997**; Comhaire y Mahmoud, **2004**; Curtis, **2008** b) como el ácido oleico (Mogul *et al.*, **2000**), uno de los constituyentes principales del D-004, inhiben la actividad de esta enzima.

Sin embargo, mientras el ELSP produce una inhibición no competitiva (Paubert-Braquet *et al.*, **1997**; García y Morales, **2006**) y el ácido oleico inhibe la LOX a través de su unión a un sitio alostérico que induce un aumento notable de su Km para el AA, nuestros resultados demuestran que el D-004 produce una inhibición incompetitiva, lo cual resulta aparentemente contradictorio. No obstante, la contradicción con el efecto del oleico es sólo relativa, ya que tanto el D-004 como el ELSP son mezclas constituidas por varios ácidos grasos de diferente largo de cadena y grado de insaturación, cuya interacción puede resultar en una inhibición de naturaleza diferente a la producida por el ácido oleico.

En cambio, resulta más llamativo que el tipo de inhibición que el D-004 produce sobre la 5-LOX sea diferente a la ejercida por el ELSP, ya que la similitud en las composiciones de ambas sustancias presupone que ejercieran un tipo similar de inhibición sobre la LOX. Una explicación posible de esta discrepancia podría relacionarse con las diferencias en la composición relativa de sus ácidos y de otros componentes de ambas sustancias, lo que resulta especulativo, ya que no realizamos experimentos que evaluaran el efecto del ELSP sobre la 5-LOX, lo que supone una limitación para poder confirmar si en nuestras condiciones experimentales la inhibición producida por el ELSP era de tipo no competitivo.

Por otra parte, merece la pena recordar las características de ambos tipos de inhibición. En la inhibición incompetitiva, como ocurre con el D-004, el inhibidor se fija al complejo Enzima-Sustrato (ES) (no a la enzima libre) por un sitio alostérico y no por el centro activo, reduciendo los valores de Km y Vmax. En la inhibición no competitiva, descrita para el ELSP (Paubert-Braquet *et al.*, **1997**; García y Morales, **2006**), el inhibidor se fija tanto al complejo ES como a la enzima libre, pero se une a esta última por un centro diferente del centro activo, deformando la enzima de modo tal que el complejo ES no puede formarse a su velocidad normal y una vez formado no se descompone a la velocidad habitual. En este tipo de inhibición se reduce la Vmax sin modificar la Km. (Flores 1998). Por tanto, las inhibiciones de tipo incompetitiva y no competitiva tienen rasgos en común, ya que en ambas el inhibidor puede unirse al complejo ES a través de un sitio diferente al centro activo, lo que indica que el compuesto(s) inhibidor(es) de la 5-LOX presente(s) en la composición química del D-004 y el ELSP no es análogo al sustrato del enzima.

Los efectos inhibitorios del D-004 sobre 5-LOX son compatibles con su eficacia en el granuloma por algodón, modelo de inflamación crónica en que la 5-LOX desempeña un papel protagónico (Begley *et al.*, **2008**).

Ya que en la HPB se produce una inflamación crónica de la próstata (Curtis *et al.*, 2008 a; Lucia y Lambert, 2008), los resultados comentados indican que el efecto anti-inflamatorio del D-004, asociado al menos parcialmente a su capacidad de inhibir la 5-LOX pudiera reducir la migración y/o infiltración de las células inflamatorias que tiene lugar durante el desarrollo de la HPB y por ende, contribuir a reducir el aumento del tamaño prostático. Estos resultados son consistentes con que el tratamiento oral con D-004 reduzca significativamente los hallazgos histológicos que caracterizan la HP inducida por T (Noa *et al.*, 2005) o por FE (Arruzabala *et al.*, 2006 b), dentro de los cuales se incluyen componentes inflamatorios/infiltrativos, y con que la mayoría de las terapias complementarias utilizadas en el manejo de la HPB presentan propiedades anti-inflamatorias (Comhaire y Mahmoud, 2004; Curtis, 2008 b).

#### **4.5 Evaluación de los efectos antioxidantes del D-004.**

El estrés oxidativo se asocia a diversas enfermedades, dentro de las cuales recientemente se ha vinculado a la HPB e incluso al cáncer de próstata (Aydin *et al.*, 2006; Aryal *et al.*, 2007) Por tal razón, se investigó si el D-004 producía efectos antioxidantes que pudieran contribuir a sus beneficios en pacientes con HPB. Para ello, comenzamos por demostrar estos efectos en diferentes tejidos y condiciones, investigando posteriormente sus efectos antioxidantes sobre el tejido prostático de ratas normales y de ratas con HP inducida por T.

Teniendo en cuenta que la demostración de los efectos antioxidantes de una sustancia sobre el tejido hepático representa un modo común de abordar este problema dada la contribución del hígado al metabolismo oxidativo (Carrasco *et al.*, 2003; Rajasekaran *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006) estos estudios comenzaron por investigar los efectos de la adición del D-004 (0.9 - 1000 µg/ml) en preparaciones microsomales de hígado.

El D-004 inhibió “*in vitro*” la PL inducida por el sistema enzimático (NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub>) y por la adición de CCl<sub>4</sub>/NADPH en microsomas activos, y la generación de las SRTBA inducida por el sistema no enzimático (FeCl<sub>2</sub>/Ascorbato) en microsomas inactivados, efectos que resultaron dependientes de la dosis. Sin embargo, el efecto sobre la PL enzimática (microsomas activos) fue mucho mayor que sobre la no enzimática (microsomas desnaturalizados), ya que mientras en la primera se alcanzó prácticamente un 100% de inhibición y la IC<sub>50</sub> fue de 52.14 µg/ml, en la segunda se obtuvo un 65% de inhibición y la IC<sub>50</sub> fue notablemente mayor (658.6 µg/ml). Por lo tanto, el D-004 resultó más potente y eficaz en inhibir la PL generada por el sistema enzimático en microsomas nativos, donde los mecanismos generadores y/o activadores endógenos de la PL se encuentran activos.

En la PL inducida por el sistema NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub> el sistema de microsomas hepáticos se encarga de regenerar el Fe<sup>2+</sup> que a su vez induce la generación de radicales OH\* mediante la reacción de Fenton (Castillo *et al.*, 2003), mientras que en el sistema no enzimático los microsomas son sólo blancos de acción de los radicales OH\* y la activación de la PL ocurre por la presencia del ascorbato, que es el encargado de regenerar el Fe<sup>2+</sup> (Halliwell *et al.*, 2007). Por tanto, la interacción del D-004 con el sistema microsomal hepático activo pudiera implicar la inhibición de la regeneración del hierro.

No obstante, el hecho de que el D-004 inhiba también la PL inducida en los microsomas inactivos, sugiere al menos tres posibilidades: que actúe como secuestrador de RL (específicamente de radicales OH\*); como agente quelante que limite el acceso del ión Fe<sup>2+</sup> y por ende, su función activadora y generadora de grupos hidroxilos; o que actúe por ambos efectos.

Por otra parte, el D-004 inhibió también la PL inducida por el CCl<sub>4</sub> de modo dependiente de la dosis. El efecto máximo (75 % de inhibición) fue inferior al encontrado sobre la PL inducida por Fe<sup>+2</sup>. En este sistema la PL se induce por la generación de EROs (como los radicales CCL<sub>3</sub>\* y CCL<sub>3</sub>OO\*) a través del sistema microsomal P450 (Candelario *et al.*, **2001**; Natarajan *et al.*, **2006**). Así, la inhibición de la PL inducida por CCl<sub>4</sub> en microsomas hepáticos pudiera estar dada por una disminución en la producción de los RL y/o por otros mecanismos antioxidantes.

Con el objetivo de dilucidar si los efectos inhibitorios del D-004 sobre la PL involucraban o no una acción secuestradora de RL, se realizaron tres ensayos para determinar sus posibles efectos sobre los radicales OH\*, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el catión ABTS<sup>+</sup>.

Para estudiar la potencial capacidad secuestradora del D-004 sobre el radical OH\* se investigó si protegía el daño a la 2-desoxirribosa. En este modelo, cuando el Fe<sup>3+</sup> se añade acompañado con el EDTA, este permanece en solución y al adicionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se generan los radicales OH\* que pueden reaccionar con la desoxirribosa (Gutteridge y Halliwell, **1988**). Por tanto, si la sustancia a evaluar provoca una inhibición dependiente de la dosis en presencia de EDTA, se puede inferir que se debe al secuestro de estos radicales.

Por el contrario, cuando el Fe<sup>3+</sup> se añade en ausencia de EDTA, éste se une inespecíficamente a la desoxirribosa y los radicales OH\* formados al adicionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la dañan tan rápidamente que imposibilitan la interacción de la sustancia con los radicales. Una inhibición en estas condiciones sugiere que la sustancia evaluada es capaz de quelar el Fe<sup>3+</sup> y evitar que se produzca el daño sitio-específico sobre la 2-desoxirribosa. El D-004 sólo inhibió el daño a la molécula de 2-desoxirribosa cuando se añadió el Fe<sup>3+</sup> previamente acompañado con el EDTA, lo que indica que presenta un efecto secuestrador del radical OH\*. Este resultado concuerda con estudios previos que demostraron similares efectos con algunos de los ácidos individuales componentes del D-004 (Chan *et al.*, **1996**; Zhang *et al.*, **2002**; Nepote *et al.*, **2007**).

Así, el efecto secuestrador del D-004 sobre el OH\* puede explicar sus efectos inhibitorios sobre la peroxidación de los microsomas no activos. Sin embargo, el hecho de que esta inhibición no sea completa, al menos en el rango de dosis ensayado, revela que la magnitud del efecto no fue suficiente para eliminar completamente la acción deletérea del radical OH\* que se genera en este sistema. Por otro lado, estos efectos secuestradores también pueden ponerse de manifiesto en la acción inhibitoria del D-004 sobre el sistema enzimático, pero en este caso la inhibición es prácticamente completa, lo que podría implicar no sólo su efecto secuestrador sobre el OH\*, sino también la inhibición de otros mecanismos generadores o activadores de la producción de RL a través de la interacción del D-004 con la membrana microsomal activa.

No obstante, la capacidad secuestradora del D-004 es limitada ya que parece circunscribirse al radical OH\*, pues no se encontró acción atrapadora sobre el anión superóxido ni el catión ABTS<sup>+</sup>. Así, la inhibición producida por el D-004 sobre la PL inducida por CCl<sub>4</sub> en microsomas hepáticos parece estar más relacionada con una reducción de la generación de EROs que con su acción secuestradora de radicales.

El alcance limitado del D-004 para secuestrar otros tipos de radicales resulta lógico y congruente con su composición. Hasta el presente, la mayoría de los compuestos con amplia capacidad secuestradora de especies reactivas “*in vitro*” poseen en su estructura anillos fenólicos que le confieren esta característica (González *et al.*, 2006; Fernández-Pachón *et al.*, 2006). El D-004 presenta ácidos grasos saturados, como el palmítico (16:0) y el esteárico (18:0), o insaturados, como el oleico (18:1) y el linolénico (18:2) (Zhang *et al.*, 2002; Nepote *et al.*, 2007), a los que se les ha descrito efectos antioxidantes relacionados con su capacidad secuestradora de radicales peroxílicos e hidroxilo, pero no de otras especies reactivas (Perona *et al.*, 2005), más pronunciada en los insaturados, ya que la presencia de dobles enlaces en su estructura es determinante en esta característica (Perona *et al.*, 2005).

No obstante, teniendo en cuenta que era importante determinar si el efecto antioxidante del D-004 sobre la PL también se produce “*in vivo*”, se investigó si el tratamiento oral con D-004 inhibía la PL en tejido hepático y en plasma de ratas. El D-004 (50-800mg/kg) administrado durante 14 días redujo de modo significativo y dependiente de la dosis la PL generada por el sistema enzimático en microsomas activos de hígado y los niveles plasmáticos de MDA y aumentó la CAOP, lo que demuestra que el D-004 no solo inhibe la PL “*in vitro*” sino también en “*in vivo*”.

El tratamiento oral con D-004 también protegió del daño oxidativo sobre proteínas plasmáticas medido como la reactividad frente al ATNBS, si bien una limitación de nuestro estudio radica en no haber determinado el efecto máximo, ya que la mayor dosis ensayada (800 mg/kg) produjo un efecto mayor que 400 mg/kg, pero no se investigaron dosis superiores.

El hecho de que el D-004 aumente la reactividad total del plasma frente a este marcador de grupos aminos libres en el mismo rango de dosis en que aumenta la CAOP y disminuye las concentraciones de MDA resulta lógico, ya que aldehídos tóxicos como el MDA y el 4-hidroxinonenal, productos finales de la PL, son los que modifican los grupos aminos libres de las proteínas haciéndolos menos accesibles a la unión con el ATNBS (Hoff y O’Neil, 1993; Schaur, 2003).

Teniendo en cuenta que la próstata es el órgano diana para el manejo de la HPB era necesario determinar, sin embargo, si los efectos antioxidantes del D-004 también se manifestaban en el tejido prostático, máxime considerando las evidencias recientes del vínculo existente entre el estrés oxidativo y la HPB (Almushata *et al.*, 2006; Merendino *et al.*, 2003; Aryal *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2007). A ello se suma como elemento de interés que el rango de dosis en que el tratamiento oral con D-004 previene la HP inducida por T en ratas también produce efectos antioxidantes. Por tanto, investigamos los efectos antioxidantes del D-004 sobre el tejido prostático de ratas normales y de ratas con HP inducida con T.

El tratamiento oral con D-004 (100 - 800mg/kg) durante dos semanas produjo un efecto antioxidante marcado, significativo y dependiente de la dosis en el tejido prostático de ratas normales y de ratas con HP inducida con T. Aunque los efectos preventivos del D-004 sobre la HP inducida con T habían sido reportados previamente (Carbajal *et al.*, 2005), este efecto fue re-ensayado en este estudio para corroborar que los efectos del D-004 sobre los marcadores de estrés oxidativo en ratas tratadas con T fuesen producidos con las mismas dosis de D-004 y en el mismo grupo de ratas que manifestaron aumento del tamaño de la próstata.

Nuestros resultados confirmaron datos previos (Arruzazabala *et al.*, 2004; Carbajal *et al.*, 2005; Noa *et al.*, 2005), ya que el D-004 (400 y 800 mg/kg) previno significativamente el aumento del PP y de la relación PP/PC sin afectar el PC en ratas con HP inducida por T.

La administración oral con D-004 a ratas previno de modo significativo y dependiente de la dosis la PL y la oxidación de proteínas en homogenatos de próstatas de ratas normales y de ratas tratadas con T. Los efectos antioxidantes del D-004 sobre las próstatas hipertrofiadas fueron mayores, ya que la reducción de los niveles de MDA en las próstatas de ratas con HP por T y de ratas normales fue de un 100% y de un 80%, respectivamente, diferencia más notable en la reducción de los grupos carbonilos, que fue de un 100% en las próstatas de las ratas con HP por T, pero de sólo un 50% en las próstatas de las ratas normales.

Nuestros resultados sugieren que en condiciones en que el estrés oxidativo del tejido prostático se encuentra aumentado, como ocurre en la HP inducida por T, los efectos antioxidantes del D-004 son mayores.

En tal sentido, se ha demostrado que las especies radicalarias, entre ellas el radical OH\*, atacan a algunos aminoácidos convirtiéndolos en radicales carbonilos y conllevando a cambios estructurales y funcionales en las proteínas oxidadas (Davies *et al.*, 1999; Stadman y Levine, 2000). Por otra parte, se ha sugerido que las proteínas dañadas por el estrés oxidativo están involucradas en la proliferación celular de la próstata y en el remodelado presente en la HPB (Calò *et al.*, 2006). Así, el efecto protector del D-004 sobre grupos carbonilos pudiera estar relacionado con su capacidad secuestradora de radicales OH\* demostrada en los estudios “*in vitro*”.

Por otra parte, se evaluaron los posibles efectos del tratamiento oral con D-004 sobre la CAOP y sobre las actividades enzimáticas de la SOD y CAT medidas en eritrocitos y plasma, respectivamente, de ratas con HP inducida por T. La CAOP y las actividades de la SOD y la CAT disminuyeron significativamente en las ratas con HP inducida por T con relación a las ratas normales, de modo que este modelo experimental reprodujo el comportamiento de estos indicadores descrito en pacientes con HPB, en los cuales aumenta la PL asociada a una reducción de la actividad enzimática de algunas enzimas pertenecientes al sistema de defensa antioxidante endógeno (Aydin *et al.*, 2006). El tratamiento oral con D-004 durante dos semanas a ratas previno los decrementos en la CAOP y en la actividad de la CAT, pero no de la SOD.

La HPB involucra procesos inflamatorios en los cuales el reclutamiento de los leucocitos PMN y/o la formación de LT y prostaglandinas propician la formación de EROs como O<sub>2</sub>\*-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH\* (Zhang *et al.*, 2002; Sampson *et al.*, 2008), especies metabolizadas por acción de la SOD y la CAT (Zhang *et al.*, 2002). Esta última enzima es capaz de convertir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, y los peróxidos e hidroperóxidos tóxicos en sus correspondientes alcoholes menos tóxicos y en H<sub>2</sub>O.

El radical OH\* es una de las especies que al dañar las membranas celulares produce peróxidos e hidroperóxidos tóxicos, substratos de la CAT cuya sobreproducción puede saturar la enzima (Gutteridge, 1995). En principio, la capacidad secuestradora del D-004 sobre el OH\* contribuiría a que se generen menores cantidades de estos productos tóxicos y que la enzima se mantenga activa, lo que supone una acción indirecta sobre la CAT.

El hecho de que la actividad de la SOD no fuera modificada por el D-004 concuerda con los resultados correspondientes a la adición “*in vitro*” de D-004 a microsomas de ratas en que no fue capaz de secuestrar el anión superóxido, lo cual sugirió una posible saturación de la enzima. No obstante, teniendo en cuenta que la actividad de la SOD eritrocitaria refleja la de la SOD citoplasmática tisular y no la SOD mitocondrial, no podemos descartar que el tratamiento oral con D-004 modifique esta última.

#### **4.6. Consideraciones finales.**

Los resultados del presente trabajo indican que el D-004, nueva sustancia obtenida del fruto de la palma real cubana, ejerce efectos beneficiosos sobre los principales factores etiológicos que contribuyen al desarrollo de la entidad HPB/STBU, lo que evidencia un mecanismo multifactorial.

El modo de acción del D-004 implica un efecto sobre el principal factor hormonal (componente estático) que propicia el desarrollo de la HPB, ya que muestra un efecto antiandrogénico que se debe a la inhibición no competitiva de la enzima 5 $\alpha$  reductasa prostática, pero no al antagonismo de los receptores a la DHT, ya que no afecta el enlace ligando-receptor a este nivel.

Ya que otros autores han demostrado que el D-004 no posee acciones estrogénicas o antiestrogénicas (Gutierrez *et al.*, 2008), los efectos del D-004 sobre los factores hormonales implicados en el desarrollo la HPB se asemejan a los de los inhibidores de la 5 $\alpha$  reductasa prostática.

Estos resultados sustentan la eficacia del D-004 en prevenir el agrandamiento de la próstata en roedores tratados con T (Arruzabala *et al.*, 2004; Carbajal *et al.*, 2005), así como los cambios histológicos asociados indicativos de la HP (Noa *et al.*, 2005).

Los mecanismos por los cuales el D-004 podría resultar eficaz en el manejo de los STBU que se asocian a la HPB se relacionan con su capacidad de antagonizar la respuesta contráctil mediada por los ADR- $\alpha$ 1 en preparaciones de próstata mediante un antagonismo de tipo no competitivo. Estos resultados sustentan la eficacia del D-004 en prevenir los cambios urodinámicos (disminución del volumen de micción) e histológicos que demuestran la presencia de la HP atípica inducida por FE en roedores (Arruzabala *et al.*, 2006; Arruzabala *et al.*, 2008 b)

Podría cuestionarse por qué no investigamos si el D-004 inhibe la 5-PDE y así podría coadyuvar al manejo de los STBU y de la DE que suele acompañar a la HPB, pero considerando que el tratamiento oral con dosis de D-004 similares o mayores a aquellas efectivas en reducir la HP inducida por T (Arruzabala *et al.*, 2004, Carbajal *et al.*, 2004; Noa *et al.*, 2005) ó por FE (Arruzabala *et al.*, 2006) no modificó la actividad sexual de las ratas machos frente a hembras estrogenizadas (Fernández *et al.*, 2006), resulta improbable que sea un inhibidor de la 5-PDE.

El hecho que el D-004 haya resultado efectivo en el granuloma por algodón y que inhiba la actividad de la 5-LOX indica que produce efectos anti-inflamatorios potencialmente beneficiosos en reducir los procesos de inflamación crónica, que son precisamente los vinculados al desarrollo y progresión de la HPB (Curtis *et al.*, 2008 a; Lucia y Lambert, 2008). Estos resultados sustentan la eficacia del D-004 en reducir los componentes inflamatorios de los hallazgos histológicos en los modelos de HP inducida por T (Noa *et al.*, 2005) o por FE (Arruzabala *et al.*, 2006) en ratas.

Finalmente, el tratamiento oral con D-004 en el mismo rango de dosis en que reduce la HP inducida por T, produjo efectos antioxidantes en el tejido prostático de ratas, ya que redujo la magnitud de la PL (MDA) y de la oxidación de proteínas (grupos carbonilos) en homogenatos de próstatas de ratas normales y de ratas tratadas con T, si bien los efectos antioxidantes del D-004 fueron mayores sobre las próstatas hipertrofiadas, las que mostraron un aumento del estrés oxidativo. El aumento de radicales carbonilos ha sido relacionado con el ataque del radical OH\* sobre algunos aminoácidos que conlleva a formar proteínas oxidadas (Davies 1999, Stadman 2000) que propician la proliferación celular y el remodelado de la próstata en la HPB (Calo *et al.*, 2006), efecto que pudiera ser atenuado por el efecto del D-004 al reducir los grupos carbonilos, posiblemente como consecuencia de su capacidad secuestradora de radicales OH\* demostrada “*in vitro*”.

Además, el tratamiento con D-004 parece estimular la respuesta antioxidante endógena, ya que previno las reducciones de la CAOP y de la actividad de la CAT plasmática inducidas con T en ratas. Mientras el efecto sobre la CAOP refleja un aumento de la respuesta antioxidante global del plasma, el efecto sobre la CAT implica un aumento de la destoxificación de las especies O<sub>2</sub>\*-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH\*, cuyo contenido aumenta durante los procesos inflamatorios que ocurren en la HPB, como el reclutamiento de los leucocitos PMN y/o la formación de LT y prostaglandinas (Zhang *et al.*, 2002; Sampson *et al.*, 2008). La acción del D-004 sobre la CAT es consecuente con su capacidad secuestradora sobre el OH\* que contribuye a reducir la generación de productos tóxicos (peróxidos e hidroperóxidos) sustratos de la CAT que se generan por el daño que el radical OH\* produce sobre la membrana celular y cuya sobreproducción satura la enzima (Gutteridge, 1995).

Ya que los pacientes con HPB presentan un aumento de indicadores relacionados con el estrés oxidativo como el MDA (Merendino *et al.*, 2003) y una relación inversa entre sus niveles plasmáticos de MDA y de vitaminas antioxidantes (Aryal *et al.*, 2007) nuestros resultados refuerzan la idea que los efectos antioxidantes del D-004 podrían contribuir a sus efectos protectores sobre el tejido de la próstata hipertrofiada.

**CONCLUSIONES**  
**Y**  
**RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES.

1. La adición de D-004 (0.24 – 125µg/ml) inhibió “*in vitro*” (IC50 = 2.25 µg/ml) la actividad de la 5 α reductasa en homogenatos de tejido prostático de rata de modo marcado (inhibición máxima >90%) y dosis-dependiente, mediante un mecanismo no competitivo.
2. La adición del D-004 (0.9 – 500 µg/mL) no desplazó “*in vitro*” el enlace de la 3H-DHT a sus receptores en próstata de rata, sugiriendo que su efecto antiandrogénico no involucra el bloqueo de estos receptores.
3. El D-004 (250-500 µg/mL) produjo un antagonismo no competitivo de las contracciones por FE en próstata aislada de rata, lo que indica un bloqueo de los ADR-α1 involucrados en esta respuesta. La comparación de los efectos del D-004 y el tamsulosin en este modelo demostró que el D-004 fue menos efectivo que el tamsulosin, y menos específico, ya que la concentración mayor también inhibió la respuesta contráctil por KCl.
4. La adición de los ácidos oleico, láurico y mirístico (componentes del D-004) inhibió las contracciones por FE en conducto deferente aislado de rata, lo que demuestra que antagonizan esta respuesta mediada por ADR-α1, si bien el efecto del D-004 fue mayor. Los efectos del D-004 y de la adición conjunta de los 3 ácidos (a las concentraciones en que aparecen en el D-004) fueron similares, lo que prácticamente descarta que otro componente del D-004 contribuya a este efecto.
5. La administración oral del D-004 a ratas (400mg/kg) redujo moderadamente el granuloma por algodón, sin modificar el edema por carragenina, lo que indica una acción anti-inflamatoria moderada del D-004.
6. Consistente con sus efectos anti-inflamatorios, la adición “*in vitro*” de D-004 (0.9 – 1000 µg/ml) inhibió (IC50 140.5µg/ml) la actividad de la 5-LOX en PMN humanos de modo marcado (inhibición máxima >90%), dosis-dependiente y mediante un mecanismo incompetitivo.
7. La adición “*in vitro*” de D-004 (0.9–1000 µg/ml) inhibió la oxidación inducida por diferentes agentes y mostró efecto secuestrador sobre radicales OH\*, no sobre el radical superóxido y el catión ATBS+. El tratamiento oral con D-004 (200–800 mg/kg) redujo la PL inducida por el sistema enzimático en microsomas hepáticos, las cifras plasmáticas de MDA, aumentó la CAOP y protegió las proteínas plasmáticas del daño oxidativo por ATNBS, efectos que resultaron dosis-dependientes.
8. El tratamiento oral con D-004 (200 – 800 mg/kg) redujo de modo marcado y dosis-dependiente la generación de MDA por el sistema enzimático, los niveles de MDA y de grupos carbonilos en homogenatos de próstatas de ratas normales. El tratamiento oral con D-004 (400 y 800 mg/kg) previno el agrandamiento prostático y redujo el aumento de los indicadores de la PL (MDA) y de la oxidación proteica (grupos carbonilos) en próstatas de ratas con HP por T. Los efectos antioxidantes sobre el tejido prostático hipertrofiado fueron mayores (inhibición 100%) que sobre el tejido prostático normal.
9. El efecto antioxidante del D-004 en el tejido prostático de ratas con HP también se asocia al aumento de la actividad de la CAT y de la CAOP.

## **RECOMENDACIONES.**

1. Estos resultados demuestran que la utilidad potencial del D-004 en el manejo de la entidad HPB/STBU se basa en mecanismos multifactoriales. No obstante, todas las evidencias son experimentales y la eficacia clínica del D-004 en la HPB no ha sido demostrada. Aunque estudios recientes han demostrado sus efectos antioxidantes en hombres sanos, deben culminarse los estudios clínicos de Fase II y III que aporten datos de eficacia y seguridad que confirmen la relevancia clínica de su uso.
2. Profundizar en los efectos anti-inflamatorios del D-004, incluyendo su evaluación en otros modelos, sobre otros indicadores del proceso inflamatorio y que incluyan diferentes dosis/tiempo de tratamiento.
3. Realizar estudios que investiguen la correlación entre los efectos antioxidantes del tratamiento oral con D-004 y la progresión de los hallazgos histológicos indicativos de la HP inducida por T o por FE.

# **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AAU (Asociación Americana de Urología). Practice Guidelines Committee (2003). AUA guideline on management of benign prostatic hyperplasia. Chapter 1: Diagnosis and treatment recommendations. *J Urol* 170: 530-547.
2. Abad M.J, Bermejo P, Vaverde S and Villar A (1994). Anti-inflammatory activity of hydroxyachilin a sesquiterpene lactone from *tanacetum microphyllum*. *Plant Med* 60: 228-231.
3. Abdel-Wahab M (2008). *Prostata Cancer. A practical Guide*. 2008 Saunders. Iversen P, Roder MA. The Early Prostate Cancer program: bicalutamide in nonmetastatic prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:361-369.
4. Abe M, Ito Y, Oyunzul L, Oki- Fujino T and Yamada S (2009). Pharmacological Relevant receptor Binding Characteristics and 5 $\alpha$ - reductasa inhibitory activity of free fatty acids contained in Saw Palmetto Extract. *Biol Pharm Bull* 32: 646-650 (a).
5. Abe M, Ito Y, Suzuki A, Onoue S, Noguchi H and Yamada S (2009). Isolation and Pharmacological Characterization of Fatty Acids from Saw Palmetto Extract. *Analytical Sciences* 25: 553-557 (b)
6. Abrahams P (1998). *Gran atlas de Anatomía Humana*. Océano Grupo Editorial España, SA. Capítulo 5. Abdomen y pelvis. Pelvis masculina. 187-237.
7. Aceo E, Tovar A and Pardo L (2008). Hiperplasia Prostatica Benigna. *Rev Mex Urol* 6: 203- 205.
8. Aebis H (1974). Catalase in method of enzymatic análisis. *New York Academic Press* 2: 673-684.
9. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder F.H and Castro R (2008). Is There Evidence of a Relationship between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? Findings of a Literature Review. *Eur Urol* 55: 4-5.
10. Aliev IuG, Vinarov A, Lokshin KL Spivak LG (2002). Five-years experience in treating with prostatic hyperplasia patients with permixon (*Serenoa repens* Pierre Fabre Medicament). *Urol* 1: 23-25.
11. Almushata A.S, Talwar D and Mc Ardle P.A (2006). Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 118: 1051-1053.
12. Alves J.C, Santos R.C, Castaman T.A and De Oliveira J.R (2004). Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res* 49:245-248.
13. Andersson K.E, Uckert S, Stief C and Hedlund P (2007). Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. *Neurourol Urodyn* 26: 28-33.
14. Andrew D.P, Chang M.S, McNinch J, Wathen S.T, Rihaneck M and Tseng J (1998). STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161:5027- 5038.
15. Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T and Zilmer M (2001). Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 56: 308-314.
16. Anonymous A (1993). Tadenan inhibited of proliferation in fibroblasts. *JAMA (French Ed) Special issue* 11-12.
17. Araujo C.R, Posleman S.M and Rodríguez L.C (2007). Cambios en el sistema de defensa

antioxidante inducido por Ciclosporina A Acta Bioquím Clin Latinoam 41:1-8.

18. Arruzazabala M.L, Mas R, Molina V, Noa M and Carbajal D (2006). Effect of D-004, a lipid extract from the fruits of Cuban royal palm, on the atypical prostate hyperplasia induced with phenylephrine in rats. Drug R&D 7: 233- 224.
19. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V and González V (2004). Rodríguez E. 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 XXX: 227- 234.
20. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Más R, González V, Rodríguez E and Marrero D (2008). Composition changes of lipid extracts of *Roystonea regia* fruits of different ripening stages influence their effects on testosterone-induced prostate enlargement in rats. Latin Am J Pharm 27: 41-45 (a)
21. Arruzazabala ML, Molina V, Más R and Carbajal D (2008). Effects of D-004, tamsulosin and the combined therapy D004 plus tamsulosin on urodynamic changes induced with phenylephrine in rats. Arzneimittel-Forschung Drug Research 58: 81-85 (b).
22. Aryal M, Pandeya A, Gautam N, Baral N, Lamsal M and Majhi S (2007). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. Nepal Med Coll J 9: 222-224.
23. Augusto A.C, Miguel F, Mendonca S, Pedrazzoli J and Gurgueira S.A (2007). Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. Clin Biochem 40: 615-622.
24. Austin O and Ricer R.E (1996). Prostate cancer screening. An appraisal of the PSA test. Farm Pract Recert 18: 81-91.
25. Aydin A, Arsova-Sarařinowska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O and Erten K (2006). Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Clinical Biochem 39:176-179.
26. Babak R, Pourandarjani R, Habibollahi P and Mualeki A (2006). Finasteride induced depression: a prospective study. BMC Clinical Pharmacology 6:7-9.
27. Barkin J, Guimares M and Jacobi G (2003). Alpha-blocker therapy can be withdrawn in the majority of men following initial combination therapy with the dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor dutasteride. Eur Urol 44: 461- 466.
28. Barlet A, Albrecht J and Aubert A (2007). Efficacy of *Pygeum africanum* extract in the treatment of micturational disorders due to benign prostatic hyperplasia. Evaluation of objective and subjective parameters. A multicenter, randomized, double-blind trial. Wein Klin Wochenschr 102:667- 673.
29. Baron A, Mancini M, Caldwell E , Cabrelle A, Bernardi P and Pagano F (2009). *Serenoa repens* extract targets mitochondria and activates the intrinsic apoptotic pathway in human prostate cancer cells. BJU International 103:1275– 1283.
30. Barry M.J and McNaughton-Collins M (2007). Benign Prostate Disease and Prostatitis. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier 7: 130-134.
31. Barry M.J and Rochrborn C.G (2001). Benign prostatic hyperplasia. BMJ 323: 1042 – 1046.

32. Barry M.J, Fowler F.J and O'Leary M.P (1992). The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. The Measurement Committee of the American Urological Association. J Urol 148: 1549-57. PMID 1279218.
33. Bartsch G, Rittmaster R.S and Klocker H (2002). Dihydrotestosterone and the role 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. Urol A 41: 412-424.
34. Bar-Yosef Y, Mabjeesh N.J, Laufer M, Neulander E.Z, Kaver I and Matzkin H (2008). Alpha blockers in use for symptomatic benign prostatic hyperplasia-are all drugs born equal? Harefuah 147: 514- 574.
35. Bauer H.W, Casarosa C and Cosci M (1999). Saw palmetto fruit extract for treatment of benign prostatic hyperplasia: results of a placebo-controlled double-blind study. MMW Fortschr Med 141:62-67.
36. Bayne C.W, Donnelly F, Ross M and Habib F.K (1999). Serenoa repens (Permixon) a alpha-reductase types I and II inhibitor-new evidence in a coculture model of BPH. Prost 40: 232-241.
37. Begley L.A, Kasina S, MacDonald J and Macoska J.A (2008). The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. Cytok 43:194-199.
38. Belostotskaia L.I, Nikitchenko I.V, Gomon O.N, Chaika L.A, Bondar V.V and Dziuba V.N (2006). Effect of biologically active substances of animal and plant origin on prooxidant-antioxidant balance in rats with experimental prostatic hyperplasia. Eksp Klin Farmakol 69:66-68.
39. Benjamin Z L, LeBlanc K.M, Schoenfeld D.A, Eastell R and Finkelstein J.S (2003). Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. J of Clin Endocrinol & Metabol 80:1002-1007.
40. Benjamin Z, Rohrer L, Stephen D, Gallo J and Longcope Ch (2004). Effects of Aromatase Inhibition in Elderly Men with Low or Borderline-Low Serum Testosterone Levels. J of Clin Endocrinol & Metabol 89:1174-1180.
41. Bent S, Kane C and Shinohara K (2006). Saw Palmetto for Benign Prostatic Hyperplasia. NEJM 354:557-566.
42. Berges R (2008). Epidemiology of benign prostatic syndrome: Associated risks and management data in German men over age 50. Urol A 47:141-148.
43. Berry S.J, Coffey D.S and Walsh P.C (1984). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. J Urol 132: 474-477.
44. Bethel C.R, Chaudhary J, Anway M.D and Brown Y.R (2009). Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. Prostate 69:838-850.
45. Bhargava S, Canda A.E and Chapple C.R (2004). A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation. Recent advances Curr Opin Urol 14:1-6.
46. Boeglin W.E, Schneider C and Brash A.R (2001). A 15-lipoxygenase in the rat, homolog of human 15-lipoxygenase-2 and mouse 8 lipoxygenase. Gen Bank 35:4-8.
47. Bombardelli E, Morazzoni P and Small J.K (1997). Serenoa repens (Bartram). Fitotherapy 68:99-

48. Bonkhoff H (2003). Morphogenesis of prostate cancer. *Stem Cells Handbook*. Hum 201:23-28.
49. Boyle P and Napalkov P (1996). Epidemiology of benign prostatic hyperplasia: Current perspectives. *Eur Urol* 29: 7-9.
50. Boyle P, Robertson C, Lowe F and Roehrborn C (2000). Meta-analysis of clinical trials of Permixon in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol* 55: 533-539.
51. Boyle P, Robertson C, Lowe F and Roehrborn C (2004). Updated meta-analysis of clinical trials of Serenoa repens extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 93: 751-756.
52. Boyle P, Robertson C, Lowe F and Roehrborn C (2005). Updated meta-analysis of clinical trials of Serenoa repens extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 173:516 - 520.
53. Boyum A (1983). In iodinated density gradient media. A practical approach. (ed. D. Rickwood), IRL Press 147-171.
54. Braeckman J, Denis L and De Leval J (1997). A double-blind placebo-controlled study of the plant extract Serenoa repens in the treatment of benign hyperplasia of the prostate. *Eur J Clin Res* 9:247-259.
55. Brash A.R, Chang M.S and Boeglin W.E (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6148-6152.
56. Brown C.T and Nuttall M.C (2003). Dutasteride: a new 5-alpha reductase inhibitor for men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *Int J Clin Pract* 57: 705-709.
57. Burdon R.H and Knippenberg P.H (1991). Eds. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 22. *Techniques in Free Radical Research*. Amsterdam, Elsevier 3: 50-55.
58. Byrd Sylvia. Krames (2009) Online. <http://wishard.kramesonline.com> (consultado 22 de Julio del 2009)
59. Caine M, Pfan A and Perlberg S (1976). The use of  $\alpha$ -adrenergic blockers in benign prostatic obstruction. *Br J Urol* 48: 255-263.
60. Calo L.A, Pagnin E, Davis P.A, Lodde M, Mian C, Semplicini A, Pycha A (2007). Effect of Doxazosin on oxidative stress related proteins in benign prostatic hyperplasia. *Urol* 76: 36-41.
61. Candelario J.E, Mohammed A.D, Fernandez O.S, Menendez S, Pérez- Davison G, Merino N, Sam S and Ajamieh H.H (2001). Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. *J Appl Toxicol* 21:297-301.
62. Cao N, Haynes J.M and Ventura s (2005). Saw palmetto is an indirectly acting sympathomimetic in the rat-isolated prostate gland. *Prost* 66: 115- 123.
63. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Rodriguez E and Gonzalez V (2004). 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* 65: 505- 514.

64. Carbajal D, Molina V, Mas R and Arruzazabala M.L (2005). Therapeutic effect of D-004 a lipid extract from *Roystonea regia* fruits on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res* 31:193-197.
65. Carbajal D, Molina V, Mas R and Arruzazabala M.L (2007). Efecto del D-004 sobre patrones conductuales en roedores. *Rev CNIC* 38: 12-17.
66. Carilla E, Briley M and Fauran F (1984). Binding of Permixon (R), a new treatment for prostatic benign hyperplasia, to the cytosolic androgen receptor in rat prostate. *J Steroid Biochem* 20: 521-523.
67. Carraro J.C., Raynaud J.P and Koch G (1996). Comparison of phytotherapy (permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: A randomized international study of 1,098 patients. *Prost* 29: 231-240.
68. Carrasco A, Castillo L, Huerta P.A and Thieleman L (2003). La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *Med UNAB* 6: 15-20.
69. Carson C and Rittmaster R (2003). The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urol* 61: 2-7.
70. Cartagena J, García F, Guzmán M, Quintero M and Guzmán J.V (2008). Criterios en el diagnóstico de hiperplasia prostática benigna en pacientes que acudieron al Hospital Univalle. *Rev Inv e Info Salud* 3: 29-33
71. Castillo R, Huerta P and Rodrigo R (2003). Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL* 8: 43-52.
72. Castro D (2007). Tratamiento de la hiperplasia prostática benigna basado en la evidencia. *Urol* 2: 35-37.
73. Céspedes T and Sánchez D (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación *Rev Cubana Cardiol* 14:55-60.
74. Clifford G.M and Farmer R.D (2000). Medical therapy for benign prostatic hyperplasia: a review of the literature. *Eur Urol* 38: 2-19.
75. Clinton J.J (1994). Benign prostatic hyperplasia (BPH) - diagnosis and treatment. *JAMA* 271: 1151.
76. Cochrane Database Syst Rev (2002). Review *Pygeum africanum* for benign prostatic hyperplasia. (1):CD001044.(a)
77. Cochrane Library (2002). Sildenafil y disfunción eréctil. Una revisión sistemática y meta-análisis *Arch Intern Med* 162:1349-1360.(b)
78. Coffey D.S, and Walsh P.C (1990). Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 17: 461-475.
79. Colon I and Payne R.E (2008). Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms in African Americans and Latinos: treatment in the context of common comorbidities. *Am J Med* 121: S18-26.
80. Comhaire F and Mahmoud A (2004). Preventing diseases of the prostate in the elderly using hormones and nutraceuticals. *Aging Male* 7: 155-169.
81. Curtis N (2008). Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am* 35: 109-115

(a)

82. Curtis N, Shoskes D and Moyad M (2008). Nutraceutical in Prostate Disease: The Urologist's role. *Rev Urol* 10: 192-206. (b)
83. Chan P, Juei-Tang Ch, Chiung-Wen T, Chiang-Shan N and Chuang-Ye H (1996). The "in vitro" antioxidant activity of trilinolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. *J Biol Chem* 59: 2067-2073.
84. Chapkin R.S, Davidson L.A, Weeks B.R, Lupton J.R and McMurray D.N (2007). Immunomodulatory Effects of (n-3) Fatty Acids: Putative Link to Inflammation and Colon Cancer. *J Nutr* 137: 200S - 204S.
85. Chapple C.R, Aubry M.L, James S, Greengrass P.M, Burnstock G, Turner-Warwick R.T, Milroy E.J and Davey M.J (1989). Characterization of human prostatic adrenoceptors using pharmacology receptor binding and localization. *Br J Urol* 63: 487- 496.
86. Chéchile G.E (2007). Tratamiento con medicamentos - Farmacología del cancer prostático. Antiandrógenos y analogos de lh-rh. *Prost* 4: 125-130.
87. Chen X, Ji Z.L and Chen Y.Z (2002). Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res* 30:412-415.
88. Chen Z, Rogge G, Hague C, Alewood D, Colless B, Lewis R.J and Minneman K.P (2004). Subtype-selective Noncompetitive or Competitive Inhibition of Human  $\{\alpha\}$ 1-Adrenergic Receptors by  $\{\rho\}$ -TIA. *J Biol Chem* 279: 35326- 35333.
89. Chevalier G, Benard P, Cousse H and Bengone T (1997). Distribution study of radioactivity in rats after oral administration of the lipido/sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) supplemented with (1-14C)-lauric acid, (1-14C)-oleic acid or (1-14C)-beta-sitosterol. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 22: 73- 83.
90. Chon J.K, Borkowski A, Partin A.W, Isaacs J.T, Jacobs S.C and Kyprianou N (1999). Alpha 1-adrenoceptor antagonist terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 161: 2002-2008.
91. Chung B.H and Hong S.J (2006). Long-term follow-up study to evaluate the efficacy and safety of the doxazosin gastrointestinal therapeutic system in patients with benign prostatic hyperplasia with or without concomitant hypertension. *BJU Int* 97: 90-95.
92. Chung B.H, Hong S.J and Lee M.S (2005). Doxazosin for benign prostatic hyperplasia: an open-label, baseline-controlled study in Korean general practices. *Int J Urol* 12: 59-65.
93. Chute C.G, Panser L.A and Girman C.J (1993). The prevalence of prostatism: a population based survey of urinary symptoms. *J Urol* 150: 85-89.
94. Davies M.J, Fu S, Wang H and Dean R.T (1999). Stable markers of oxidant damage to protein and their application to the study to human disease. *Free Rad Bol Med* 27: 1151-1163.
95. De la Rosette J, Alivizatos G and Madersbacher S (2002). Guidelines on Benign Prostatic Hyperplasia. European Association of urology. update.
96. De la Taille A, Fourmarier M, Desgrandchamps F, Ballereau C, Saussine C, Haillet O, Azzouzi A.R, Lukacs B and Devonec M (2007). Comité des Troubles Mictionnels de l'Homme (CTMH-AFU).

Value of antidiuretic, anticholinergic, and anti-inflammatory drugs and botulinum toxin for the treatment of voiding disorders related to BPH. *CTMH-AFU Prog Urol* 7:778-782.

97. Debruyne F, Boyle P, Calais Da Silva F, Gillenwater J.G, Hamdy F.C, Perrin P, Teillac P, Vela-Navarrete R, Raynaud J.P, Schulman C.C (2004). Evaluation of the clinical benefit of permixon and tamsulosin in severe BPH patients-PERMAL study subset analysis. *Eur Urol* 45: 773-779.
98. Debruyne F, Koch G and Boyle P (2002). Comparison of a phytotherapeutic agent (Permixon) with an alpha-blocker (Tamsulosin) in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a 1-year randomized international study. *Eur Urol* 4:497-506.
99. Dedhia R.C and McVary K.T (2008). Phytotherapy for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 179:2119-2125.
100. Descotes J.L, Rambeaud J.J, Deschaseaux P, Faure G (1995). Placebo-controlled evaluation of the efficacy and tolerability of Permixon in benign prostatic hyperplasia after the exclusion of placebo responders. *Clin Drug Invest* 9:291-297.
101. Desgrandchamps F (2002). Combination therapy in benign prostatic hyperplasia (BPH). *Annales d' Urol* 30: S24-28.
102. Di Pasquale G, Tomaino A, Minciullo P.L, Fraccica G, Gangemi S, Merendino R.A, Salvo F and Saija A (2003). Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a usefull marker?. *Mediat Inflamm* 12: 127-128.
103. Di Silverio F, Bosman C, Salvatori M, Albanesi L, Proietti L, Ciccariello M, Cardi A, Salvatori G and Sciarra A (2003). Combination Therapy with Rofecoxib and Finasteride in the Treatment of Men with Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *Eur Urol* 47: 72-79.
104. Díaz F, Fair O, Ruiz O and Valle R (2004). Inhibidores del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y el riesgo de infección por tuberculosis. *Rev Colom de Reumat* 11: 306-316.
105. Díaz V (2001). Suplementación enteral de los ácidos grasos esenciales en RN pretérmino. *Rev Cub Pediatr* 73: 34-42.
106. Djavan B and Marberger M (1999). A meta-analysis on the efficacy and tolerability of  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction. *Eur Urol* 36: 1-13.
107. Djavan B, Milani S and Fong Y.K (2005). Dutasteride novel dual inhibitor of 5alpha-reductase for benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Pharmacother* 6: 311-317.
108. Doggrell S.A (2004). Combination of finasteride and doxazosin for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Pharmacother* 5: 1209-1211.
109. Dolder C.R (2006). Dutasteride: a dual 5-alpha reductase inhibitor for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Ann Pharmacother* 40: 658-65.
110. Dull P, Reagan R and Bahsson R.R (2002). Managing benign prostatic hyperplasia. *Am Fam Physician* 66:77-84.
111. Dunkel L (2006). Use of aromatase inhibitors to increase final height. *Mol Cel. Endocrinol.* 254-

255: 207- 216.

112. EBSCO CAM (2009). Medical Review Board: Fitoterapia en Hiperplasia Prostatica. [healthlibrarysupport@ebSCOhost.com](mailto:healthlibrarysupport@ebSCOhost.com) (consultado el 29 de mayo del 2009)
113. Edwards J.E and Moore R.A (2002). Finasteride in the treatment of clinical benign prostatic hyperplasia: A systematic review of randomised trials. BMC Urol 2: 1471-1490.
114. Ekkehard J, Senge T, Allhoff E.P and Konig W (2000). Analysis of the inflammatory network in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Prost 58: 121-129.
115. El-Sheikh M.M, Dakkak M.R and Saddique A (1988). The effect of Permixon on androgen receptors. Acta Obstet Gynecol Scand 6: 397-399.
116. Emberton M, Andriole G.L, De la Rosette J, Djavan B, Hoefner K, Vela R, Nordling J, Roehrborn C, Schulman C, Teillac P, Tubaro A and Nickel J.C (2003). Benign prostatic hyperplasia: a progressive disease of aging men. Urol 61: 267- 273.
117. Engl W.T, Beecken D, Wolfram M, Jonas D and Blaheta R (2004). Uro pharmacology. International J of Clinl Pharmacol and Terap 42: 527-533.
118. Farreras V P and Rozman C (2000). Capítulo 129: Enfermedades de las vías urinarias: Medicina interna. España, Madrid Ediciones Harcourt, SA. 1136-1139.
119. Fernández A and Pereira S (2008). Hiperplasia benigna de prostata: una afección de elevada prevalencia en el paciente de edad avanzada. Rev Esp Geriatr Gerontol 43:44-51.
120. Fernández C, Moreno J, Cano S, Fuentes M.E, Bocardo G and Silmi A (2009). Prevalence of lower urinary tract symptoms related with benign prostatic hyperplasia. Study of 1804 men aged 40 or older in Madrid. Acta Urol Esp 33: 43-51.
121. Fernández I, Gámez R, Gutierrez A and Garcia H (2005). Evaluación Genotóxica “*in vivo*” del D-004 en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea en Ratones. Rev CNIC Cien Biol (suplemento especial)
122. Fernández L, Mas R, Fernández J.C, Mendoza S, Gámez R and Pardo B (2008). Effects of D-004, a Lipid Extract of the Fruit of the Cuban Royal Palm (*Roystonea regia*) or the Lipidosterolic Extract of Saw Palmetto (*Serenoa repens*) on the Sexual Activity in Male Rats: A controlled, experimental study. Curr Ther 69: 65-74.
123. Fernández-Pachón M.S, Villano D, Troncoso A.M y García M.C (2006). Revisión de los métodos de la actividad antioxidante “*in vitro*” del vino y valoración de sus efectos “*in vivo*”. Arch LatinAm Nutr 56: 1-14.
124. Flórez J (1998). Farmacología Humana. Editora MASSON S.A 3ra Edición.
125. Frederick W.G, Rusell D.W and Wilson S.D (1991). Feed- forward control of prostate growth: Dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 alpha reductase. Proc Natl Acad Sci 88: 8044-8047.
126. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S and Ishii T (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian J Androl 5: 231 - 242.
127. Funk C.D (2002). Cysteinyl leukotriene receptors. Biochem Pharmacol 64:1549-1557.

128. Galeone C, Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Dal Maso L, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S and La Vecchia C (2007). Onion and garlic intake and the odds of benign prostatic hyperplasia. *Urol* 70: 672-676.
129. Galic J and Simunovic D (2008). Prostate disease prevalence with epidemiological and hormonal analysis in randomly selected male population in Croatia. *Coll Antropol* 32: 1195-1202.
130. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, Rodríguez Y, Felipe E and Goicochea E (2005). Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 31: 101-108.
131. Gámez R, Noa M, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, Marrero G, Pérez Y, González R, Curveco D and García H (2007). Toxicología crónica oral del D004 en ratas. (Datos de archivo)
132. Gao W and James T (2007). Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs) *Endocr* 12: 241- 248.
133. Gao W, Kearbey J.D, Nair V.A, Chung K, Parlow A.F, Miller D.D and Dalton J.T (2004). Comparison of the Pharmacological Effects of a Novel Selective Androgen Receptor Modulator, the 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor Finasteride, and the Antiandrogen Hydroxyflutamide in Intact Rats: New Approach for Benign Prostate Hyperplasia. *Endocr* 145: 5420-5428.
134. Gao W, Kearbey J.D, Nair V.A, Chung K, Parlow A.F, Miller D.D and Dalton J.T (2005). Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *J Urol* 173:1279-1283.
135. García R.C and Morales M.A. (2006). Pythomed Chile [www.phytomedchile.cl](http://www.phytomedchile.cl). (consultado el 29 de mayo del 2009)
136. Gerber G.S, Kuznetsov D, Johnson B.C and Burstein J.D (2001). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of saw palmetto in men with lower urinary tract symptoms. *Urology* 58: 960-964.
137. Giudici D, Briatico G, Cominato C, Zaccheo T, Iehlé C, Nesi M, Panzeri A and Di Salle E (1996). FCE 28260, a new 5 alpha reductase inhibitor: in vitro and in vivo effects. *J Steroid Biochem mol Biol* 58: 299-305.
138. Goepel M, Dihn L, Michel M (2001). Do Saw palmetto extracts block human alfa 1 adrenoceptors subtypes *in vivo*? *Prost* 46: 226-232.
139. Goepel M, Hecker U, Krege S, Rubben H, Michel M (1999). Saw palmetto extracts potently and non- competitively inhibit human alfa 1 adrenoceptors “*in vitro*”. *Prost* 38: 208-215.
140. Gómez-Garrido M, Martinez G, Botella R and Gomez-Garrido J (2009). Nutricion enteral en el paciente critico. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 56: 31- 42.
141. Góngora Y.L, Friol J.E, Rodríguez E.M, Gonzalez J.C, Castellanos M, Alvarez R (2006). Calidad de vida en pacientes con osteoarthritis de cadera y rodilla. *Rev Cub de Reumat* 8:9-10.
142. González J.A, Aragonés R, Arrebola M<sup>a</sup>M, Guerrero A, Muñoz J, Ruiz D, Seller D.G y De la Cruz J.P (2006). Estado oxidativo periférico en pacientes trasplantadosde hígado. *Quím Clín* 25: 381-

385.

143. González J.M, and Vegas L (2007). Terapia medica de la Hiperplasia prostática benigna. *Rev Mex Urol* 67: 148-151.
144. Gonzalez S.B, Houghton P.J and Hoult J.R (2003). The activity against Leukocyte Eicosanoid Generation of Essential Oil and Polar Fractions of *Adesmia boronioides* Hook.f. *Phytother Res* 17:290-293.
145. González-Urbaneja I (2006). Radicales libres\* Algunas consideraciones clínicas *Gac Méd Caracas* 114 (2). <http://www.anm.org.ve>. (Consultado el 22 de junio del 2009)
146. Gordon A.E and Shaughnessy A.F (2003). Saw palmetto for prostate disorders. *Am Fam Physician* 67: 1281-1283.
147. Guess H.A, Arrighi H.M and Metter E.J (1990). Cumulative prevalence of prostatism matches the autopsy prevalence of benign prostatic hyperplasia. *Prost* 17:241-247.
148. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Marrero G, Pérez Y, González R, Curveco D and García H (2007). Oral subchronic toxicity of *Roystonea regia* fruits in mice. *Drugs Exptl Chem Toxicol* 23:68-71.
149. Gutierrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco C and Garcia H (2005). Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Rev CNIC Cien Biol Ed especial (CD)*.
150. Gutiérrez A., Gámez R., Noa M, Mas R., Pardo B, Valle M, Goicochea E, Curveco D, Mendoza N and García H (2008). Evaluation of D-004 effects in the uterotrophic assay in mature ovariectomized rats. *Lat Am J Pharm* 27: 710- 715.
151. Gutierrez M, Garcia de Boto M.J, Cantabrana B and Hidalgo A (1996). Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from *Sabal serrulata* fruit on smooth muscle. *Gen Pharmacol* 27: 171-176.
152. Gutteridge J.M (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.
153. Gutteridge J.M and Halliwell B (1988). The deoxyribose assay: and both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *Biochem J* 253: 932-933.
154. Guven E.O, Balbay M.D, Mete K and Serefoglu E.C (2009). Uroflowmetric assessment of acute effects of sildenafil on the voiding of men with erectile dysfunction and symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Int Urol Nephrol* 41:287-292.
155. Guyton A.C and Hall J.E (2001). Capítulo 80: Funciones reproductoras y hormonales del varón (y función de la glándula pineal). *Tratado de Fisiología médica*. México, Mc Gram-Hill InterAm 4:1104-1114.
156. Habib F.K, Ross M and Ho C.K (2005). *Serenoa repens* (Permixon) inhibits the 5 alpha-reductase activity of human prostate cancer cell lines without interfering with PSA expression. *Int J Cancer* 20: 190-194.
157. Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35: 1147-1150.
158. Hammarsten J, Damber J.E, Karlsson M, Knutson T, Ljunggren O, Ohlsson C, Pecker R, Smith U

- and Mellstrom D (2009). Insulin and free oestradiol are independent risk factors for benign prostatic hyperplasia. *Prost* 12:160-165.
159. Hass M.A, Nowak D.M, Leonova, E Levin R.M and Longhurst P.A (1999). Identification of components of *Prunus Africana* extract that inhibit lipid peroxidation. *Phytomedicine* 6:379-388.
  160. Henry G.E, Momin R.A, Nair M.G, Dewitt D. (2000). Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *J Agric Food Chem* 50:2231-2234.
  161. Hoff H.F and O'Neil J (1993). Structural and functional changes in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *J Lipid Res* 34: 1209-1217.
  162. Hofner K, Claes H and De Reijke T.M (1999). Tamsulosin 0.4 mg once daily: effect on sexual function in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction. *Eur Urol* 36: 335-341.
  163. Hoke G.P and McWilliams G.W (2008). Epidemiology of benign prostatic hyperplasia and comorbidities in racial and ethnic minority populations. *Am J Med* 8:S3-10.
  164. Howard D.L, Taylor Y.J, and Ross L.E (2008). Differences in lower urinary tract symptoms, treatment and mortality among African-American and white elderly men. *J Natl Med Assoc* 100:1146-1152.
  165. Humphries K.M, Szweda P.A and Szweda LI (2006). Aging: A shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic Res* 40: 1239-1243.
  166. Hung B.R, Falero A, Pérez C, Tirado S, Balcinde Y y Pineda M (2008). Fitoesteroles. Parte II: Fuente de obtención, formas de uso y posición actual en el Mercado. *Rev CNIC Ciencias Biológicas* 39:97-104.
  167. Hutchison A, Farmer R and Verhamme K (2006). The Efficacy of Drugs for the Treatment of LUTS/BPH, A Study in 6 European Countries. *Eur Urol* [Epub ahead of print]
  168. Iehlé C.V, Délos S and Guirou O (1995). Human prostatic steroid 5 $\alpha$ - reductasa isoforms a comparative study of selective inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54: 273-279.
  169. Ishani A, MacDonald R and Nelson D (2000). *Pygeum africanum* for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a systematic review and quantitative meta-analysis. *Am J Med* 109: 654-664.
  170. Jacobsen S.J (2007). Risk factors for benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep* 8: 281-288.
  171. Jonas A, Rosenblat G, Krapf D, Bitterman W and Neeman I (1998). Cactus flower extracts may prove beneficial in benign prostatic hyperplasia due to inhibition of 5 alpha reductase activity aromatase activity and lipid peroxidation. *Urol Res* 26: 265-270.
  172. Jonlar M, Riehmman M and Bruskewitz R.C (1994). Benign prostatic hyperplasia: Current pharmacological treatment. *Drugs* 47: 66-71.
  173. Ju X.B, Wu H.F, Hua L.X, Zhang W and Li J (2002). The clinical efficacy of epristeride in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Zhonghua Nan Ke Xue* 8:42-44.
  174. Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S and Deese A (2007). Identification of a Novel Glutathione Conjugate of Flutamide in Incubations with Human Liver Microsomes *Drug Metab. Dispos* 35:

1081 -1088.

175. Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, Deese A and Nieman J.A (2008). Bioactivation of Flutamide Metabolites by Human Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos* 36: 1425 - 1437.
176. Kaplan S.A, González R.R, Ogiste J and Te A.E (2006). Combination o adrenergic alfa blocker, alfuzosin and 5-PDE inhibitor, sildenafil citrate is superior to monotherapy in treating lower urinary tract symptoms (LUTS) and sexual dysfunction. *Urol* 175:528. (a)
177. Kaplan S.A, Mc Connell J.D and Roehrborn C.G (2006). Combination therapy with doxazosin and finasteride for benign prostatic hyperplasia in patients with lower urinary tract symptoms and a baseline total prostate volume of 25 ml or greater. *J Urol* 175: 217-220. (b)
178. Kaplan S.A, Reis R.B, Staimen V.B and Te A.E (1998). Is the ratio of transition zone to total prostate volume higher in African-american men than in their Caucasian or hispanic counterparts? *Br J Urol* 82: 804-807.
179. Katz A.E (2002). Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *J Altern Complement Med* 8: 813-821.
180. Kawabe K, Ueno A and Takimoto Y (1990). Use of an  $\alpha$ -blocker YM-12617, in the treatment of benign prostatic hypertrophy. YM617 clinical study group. *J. Urol* 144: 908 –915.
181. Kennedy D (2007). Pharmacology of Saw Palmetto. *J Urol* 139:1118-1124.
182. Kevin T and Mc Vary (2007). Review of combination therapy in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin therapeutics* 29: 387-398.
183. Khosla S, Amin S and Orwoll E (2008).Osteoporosis in Men. *Endocr Rev* 29: 441 - 464.
184. Kim H.D, Cho H.R, Moon S.B, Shin H.D, Yang K.J and Park B.R (2007). Effects of beta glucan from *Aureobasidium pullulans* on Acute Inflammation in Mice. *Arch Pharm Res* 30: 323-328.
185. Kirby R and Andriole G.L (2003). Safety and tolerability of the dual 5 $\alpha$ - reductase inhibitor dutasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia. *Eur Urol* 44: 82-88.
186. Kirby R.S, Coppinger S.W.C and Corcoran M.O (1987). Prazosin in the treatment of prostatic obstruction: a placebo-controlled study. *Br J Urol* 60:136-142.
187. Kitahara S, Higashi Y, Takeuchi S and Oshima H (1989). Relationship of changing  $\Delta^4$ -Steroid 5 $\alpha$ -Reductase Activity to [<sup>125</sup>I] Iododeoxyuridine Uptake during Regeneration of involuted Rat Prostates. *Biol of Reprod* 40: 793-799.
188. Koch E (2001). Extracts from fruits of Saw palmetto (*Sabal serrulata*) and roots of stinging nettle (*Urtica dioica*): viable alternatives in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia and associated lower urinary tracts symptoms. *Plant Med* 67: 489-500.
189. Konig J.E, Senge T, Allhoff E.P and Konig W (2004). Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prost* 58: 121-129.
190. Kramer G, Mitteregger D and Marberger M (2007). Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol* 51:1202-1216.
191. Kramer G, Theyer G and Assmann I (2002). Phenotypic Characterization of Infiltrating Leukocytes

- in Benign Prostatic Hyperplasia. *Lab Invest* 66: 96-107.
192. Krames (2009) Online. <http://wishard.kramesonline.com> (consultado 17 de Julio 2009)
  193. Kyprianou N (2006). Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance. *J Urol* 169: 1520-1525.
  194. Kyprianou N, Chon J and Benning C.M (2000). Effects of alpha (1)-adrenoceptor (alpha (1)-AR) antagonists on cell proliferation and apoptosis in the prostate: therapeutic implications in prostatic disease. *Prost* 9: 42-46.
  195. Lagiou A, Samoli E, Georgila E, Minaki P, Barbouni A, Tzonou A, Trchopoulos D and Lagiou P (2008). Occupational physical activity in relation with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Eur J Cancer Prev* 17: 336-339.
  196. Lam J.S, Romas N.A and Lowe F.C (2003). Long term treatment with finasteride in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. 10 year follow up. *Urol* 61: 354-357.
  197. Lee M (2000). Tamsulosin for the treatment of benign prostatic hypertrophy. *Ann Pharmacother* 34: 188-199.
  198. Lepor H (2006). The Evolution of alpha blockers for the treatment of Benign prostatic Hyperplasia. *Rev Urol* 8: S3-S9.
  199. Lepor H, Tang R, Meretyk S and Shapiro E (1993). Alpha1 adrenoceptor subtypes in the human prostate. *J Urol* 149: 640-642.
  200. Levin R.M, Riffaud J.P, Bellamy F, Rohrmann D, Krasnopolsky L and Haugaard N (1996). Effects of Tadenan pretreatment on bladder physiology and biochemistry following partial outlet obstruction. *J Urol* 156: 2084-2088.
  201. López E, Illnait J, Ramírez Y, Fernández L, Más R, Gámez R. Fernández J.C and Mendoza S (2008). Estudio Fase I de la tolerabilidad del D-004, un extracto lipídico del fruto de la palma real (320-960 mg/d) en voluntarios sanos. *Rev CNIC Cien Biol* 7: 33- 43.
  202. Lopez E, Molina V, Illnait J, Oyarzábal A, Fernández L, Más R, Gámez R. Fernández J.C, Jiménez S, Mesa M, Hollands I and Mendoza S (2007). Antioxidant effects of D-004, a lipid extract from the *Roystonea regia* fruits, on the plasma of healthy men. *Asian J Androl* 11: 385-392.
  203. Lowe F.C (2001). Phytotherapy in the management of benign prostatic hyperplasia. *Urol* 58:71-76.
  204. Lowe F.C (2002). *Altern Med: Anonimous. Pygeum affricanum (Prunus Africana) African plum tree: Monograph. Altern Med Rev* 7: 71-74.
  205. Lowe F.C and Ku J.C (1996). Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. *Urol* 48: 12-20.
  206. Lowe F.C, Fagelman E and Gregory T (2000). Using complementary medications to treat BPH. *Patients Care Urol* 34: 191-203.
  207. Lucia M.S and Lambert J.R (2008). Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications. *Curr Urol Rep* 9:272-278.
  208. Llisterri J.L, Sánchez F and Brotons F (2005). Sexual dysfunction and hipertensión Hipertensión. *Urol* 22:59-72.

209. Marberger M (2006). Drug insight: 5-alpha-reductase inhibitors for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Nat Clin Pract Urol* 3:495-503.
210. Marks L.S and Tyler V.E (1999). Saw palmetto extract: Newest (an oldest) treatment alternative for men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Urol* 53: 457- 461.
211. Marks L.S, Mostaghel E.A and Nelson P.S (2008). Prostate tissue androgens: history and current clinical relevance. *Urol.* 72:247-254.
212. Marks L.S, Partin A.W, Epstein J.I and Tyler V.E (2000). Effects of a saw palmetto herbal blend in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 163:1451-1456.
213. Martín- Morales A, Meyer G and Ramirez E (2008). Prevalencia de disfuncion eyaculatoria secundaria al tratamiento con alfa-bloqueantes en pacientes con hiperplasia benigna de prostata. *Actas Urol Esp* 32:705-712.
214. Martínez M, Maislos S and Rayford W (2008).How to engage the Latino or African American patient with benign prostatic hyperplasia: crossing socioeconomic and cultural barriers. *Am J Med* 8 :S11-7.
215. Martínez-Piñeiro L, Dahiya R, Nuñez L.L, Tanagho E.A and Schmidt R.A (1993). Pelvic plexus denervation in rats causes morphologic and functional changes of the prostate. *J Urol* 150: 215-218.
216. Martorana G, Giberti C and Damonte P (1984). The effect of prazosin in benign prostatic hypertrophy, a placebo controlled double-blind study. *IRCS Med Sci*12:11–12.
217. Maxwell M.A, Haas S.M, Beiber L.L and Tolbert N.E (1987). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-209.
218. Mas M and Gutiérrez P.M (2007). Inhibidores de la fosfodiesterasa 5 y tracto urogenital. *Rev Int Androl* 1: 73-81.
219. Matsuda H, Yamazi M, Naruto S, Yusuke N, Asanuma Y and Kubo M (2002). Anti-androgenic and hair growth promoting activities of lygodii spora (Spore of *Lygodium japonicum*) I. Active constituents inhibiting testosterone 5 alpha-reductase. *Prostate* 25: 622-626.
220. Mc Connell J, Bruskevitz R and Walsh P (1998). The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 338: 557-563.
221. Meigs J.B, Mohr B, Barry M.J, Collins M.M and McKinlay J.B (2001). Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community based population of healthy aging men. *J Clin Epidemiology* 54: 935-944.
222. Merendino R.A, Salvo F, Saija A, Di Pasquale G, Tomaino A and Minciullo P.L (2003). Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? *Mediators Inflamm* 12: 127-128.
223. Miner J.N, Chang W, Chapman M.S, Finn P.D, Hong M.H, Lopez F.J, Marschke K.B, Rosen J, Schrader W and Turner R (2007). An Orally Selective Androgen Receptor Modulator Is Efficacious on Bone, Muscle, and Sex Function Active with Reduced Impact on Prostate. *Endocr* 148:363-373.
224. Minnery C.H and Getzenberg R.H (2005). Benign prostatic hyperplasia cell line viability and

- modulation of JM-27 by doxazosin and ibuprofen. *J of Urol* 174: 375-379.
225. Mitchell R.N and Cotran R.S (2000). In, *Robinsons Basic Pathology*, 7<sup>th</sup> Edn, Harcourt (India) Pvt Ltd 33.
  226. Mittal R.D, Kesarwani P, Singh R, Ahirwar D and Mandhani A (2009). GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene variants and risk of benign prostate hyperplasia in North India. *Dis Markers* 26: 85-91.
  227. Mogul R, Johasen E and Holman T.R (2000). Oleic sulphate reveals allosteric inhibition of soybean lipoxygenase and human 15-lipoxygenase. *Biochem* 39: 4801-4807.
  228. Molina V, Arruzazabala M.L, Carbajal D and Mas R (2007). Effects of D-004 plus finasteride on prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Latin American J of Pharmacy* 26: 536-540.
  229. Moncada I (2003). LUTS: A Risk Factor for Sexual Dysfunction BPH Patient. *Eur Urol* 2:3-8.
  230. Muller, F.L, Lustgarten M.S and Jang Y (2007). Richardson A and Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 477 – 503.
  231. Nandal S, Dhir A, Kuhad A, Sharma S and Chopra K (2009). Curcumin potentiates the anti-inflammatory activity of cyclooxygenase inhibitors in the cotton pellet granuloma pouch model. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31:89-93.
  232. Nandeesha H (2008). Benign prostatic hyperplasia: dietary and metabolic risk factors. *Int Urol Nephrol* 40: 649-656.
  233. Narayan P, Trachtenberg J, Lepor H, Debruyne F.M, Tewari A, Stone N, Das S, Jimenez-Cruz J.F, Shearer R, Klimberg I, Schellhammer P.F and Costello A.J (1996). A dose-response study of the effect of flutamide on benign prostatic hyperplasia: results of a multicenter study. *Urol* 47:497–504.
  234. Natarajan S.K, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood A.B, Ramachandran A and Balasubramanian K.A (2006). Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 947-957.
  235. Nelson W, De Marzo A and Isaacs W (2003). Prostate Cancer. *M Engl J Med* 349: 366-381.
  236. Nepote V, Grosso N.R and Guzman C.A (2007). Radical scavenging activity of extract of argentine peanut skins (*Arachis Hypogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. <http://www.scielo.or.ar/scielo>. (consultado 25 de junio 2009)
  237. Neuhaus M.L, Schenk J, Song Y.J, Tangen C.M, Goodman P.J, Pollak M, Penson D.F, Thompson I.M and Kristal A.R (2008). Insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding protein-3 and risk of benign prostate hyperplasia in the prostate cancer prevention trial. *Prost* 68: 1477-1486.
  238. Nickel JC (2006). The overlapping lower urinary tract symptoms of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *Curr Opin Urol* 16:5-10.
  239. Nix J. W and Carson C. C (2007). Medical management of benign prostatic hypertrophy. *Can J Urol* 14:53-57.
  240. Nnane I.P, Kato K, Liu Y, Lu Q, Wang X, Ling Y.Z and Brodie A (1998). Effects of some novel inhibitors of C17, 20 lyase and 5alpha-reductase in vitro and in vivo and their potential role in the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 58: 3826-3832.
  241. Noa, M, Arruzazabala, M.L, Carbajal, D, Más R and Molina V (2005). 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* 27: 193-198.
242. Noviasky J.A, Masood A and Lo V (2004). Tadalafil (Cialis) for Erectile Dysfunction. *American Family Physician* 70: 359-360.
  243. Odenthal K.P and Rauwald H.W (1996). Lipophilic extract from *Sabal serrulata* inhibits contractions in smooth muscle tissue. *Aktuelle Urol* 27: 152-157.
  244. Oelke M, Hofner K, Berges R.R and Jonas U (2002). Drug therapy of benign prostatic hyperplasia syndrome with alpha 1-receptors blockers. Basic principles and clinical results. *Urol A* 41: 425-441.
  245. Oesterling J.E (1995). Benign prostatic hyperplasia: Medical and minimal invasive treatment options. *N Eng J Med* 332: 99-109.
  246. Ohbuchi M, Miyata M, Nagai D, Shimada M, Yoshinari K and Yamazoe Y (2009). Role of Enzymatic N-Hydroxylation and Reduction in Flutamide Metabolite-Induced Liver Toxicity. *Drug Metab. Dispos* 37: 97 - 105.
  247. Ohkawa Y, Ohishi J and Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
  248. Oka M, Tachibana M, Noda K, Inoue N, Tanaka M and Kuwabara K (2007). Relevance of anti-reactive oxygen species activity to anti-inflammatory activity of components of eviprost, a phytotherapeutic agent for benign prostatic hyperplasia. *Phytomed* 14:465-472.
  249. Okada H, Kamidono S and Yoshioka T (2000). A comparative study of terazosin and tamsulosin for symptomatic benign hyperplasia in Japanese patients. *BJU Int* 85: 676-681.
  250. Olke M, Hofner K, Berges R.R and Jonas U (2002). Drug therapy of benign prostatic hyperplasia syndrome with alpha 1- receptors blockers. Basic principles and clinical results. *Urol A* 41: 425-441.
  251. Paterson R and Goldenberg L (2001). Benign prostatic hyperplasia. In J Teichman, ed., *20 Common Problems in Urology*, part 2, chap. 13: 189-198.
  252. Paubert-Braquet M, Cave A and Hocquemiller R (1994): Effect of *Pygeum africanum* extract on A23187-stimulated production of lipoxigenases metabolites from human polymorphonuclear cells *J Lipid Mediat* 9: 285-290.
  253. Paubert-Braquet M, Mencia J.M, Cousse H and Braquet P (1997). Effect of the lipidic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the ionophore A23187- stimulated production of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) from human polymorphonuclear neutrophils. *Prostaglan Leukotr and Essen Fatty Acids* 57: 299-304. (d)
  254. Pérez Ornelas V, Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Sanchez M, Ramirez E and Naranjo E (2005). New 5 $\alpha$ - reductase inhibitors: “*in vitro*” and “*in vivo*” effects. *Steroids* 70: 217-224.
  255. Pérez V, Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Sánchez M, Ramírez E and Naranjo-Rodríguez E (2005). New 5 alpha reductase inhibitors: “*in vitro*” and “*in vivo*” effects. *Steroids* 70: 217-224.
  256. Pérez Y, Menéndez R, Más R and Gonzáles RM (2006). Plasma levels, tissue distribution, and excretion of radioactivity after single dose administration of (<sup>3</sup>H)-oleic acid added to D-004, a lipid

- extract of the fruit of *Roystonea regia*, in rats. *Current Ther Res* 67: 406-419.
257. Perona J.S, Arcemis C, Ruiz-Gutierrez V and Catala A (2005). Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *J Agric Food Chem* 53:730-735.
  258. Pharmacopeial Convention (2005): Saw palmetto extract. In: Expert Committee. United States pharmacopeial forum: (DSB) dietary supplement: botanicals. Rockville, Md.: Pharmacopeial Convention 28: 425-426.
  259. Potenziani J.C (2003). Terapia nutricional en cancer de próstata. Vol 2#1. Sitio WEB [urologiaaldia.com](http://urologiaaldia.com). (consultado 27 de junio 2009)
  260. Prasad S, Kalra N and Shujila Y (2006). Molulatory effects of diallyl sulfide against testosterone-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian J Androl* 8:719-723.
  261. Prasad S, Kalra N, Singh M and Shukla Y (2008). Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian J Androl* 10:313-318.
  262. Prata T.S, Palmiero P.M, Angelillo A, Sbeity Z, De Moraes C.G, Liebmann J.M and Ritch R (2009). Iris morphologic changes related to  $\alpha(1)$ - adrenergic receptor antagonists implications for intraoperative floppy iris syndrome. *Ophthalm* 166: 877-881.
  263. Rahimi-Ardabili B, Pourandarjani R, Habibollahi P and Mualeki A (2006). Finasteride induced depression: a prospective study. *BMC Clin Pharmacol* 7:6-7.
  264. Rajasekaran N.S, Devaraj N.S and Devaraj H (2004). Vitamin E prevents buthionine sulfoximine-induced biochemical disorders in the rat. *J Pharm. Pharmacol* 56: 91- 99.
  265. Raman P, David L. DeWitt G and Muraleedharan G (2007). Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytotherp Res* 22: 204- 212.
  266. Ramos E.E, Soto J.A, Castillo J and Aragon A.R (2001). Experiencia en el manejo de finasterida en pacientes con hiperplasia prostática. *Rev Mex Urol* 61:243-246.
  267. Raynaud J.P, Cousse H and Martin PM (2000). Inhibition of type 1 and 2 5 alpha reductase activity by free fatty acids, active ingredients of Permixon. *J Steroid Biochem* 82: 233-239.
  268. Recknagel R.O and Glende E.A (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 2:263- 297.
  269. Reznick A.Z and Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. In *Methods in Enzym Academic Press* 25:357-359.
  270. Rhodes C.W, Priomka R.L, Berman C, Vergult G, Gabriel M, Pierre- Malice M, Gibelin B (1993). Comparison of finasteride (Proscar), a 5 alpha reductase inhibitor, and various commercial plant extracts in vitro and in vivo 5 alpha reductase inhibition. *Prost* 20: 43-51.
  271. Rick A (2007). Hipertrofia prostatica Benigna American Urological Association. Disponible en: <http://www.auanet.org>.
  272. Riehemann K, Bayne C.W, Ross M, Donnelly F and Habib F.K (2000). The selectivity and specificity of the actions of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the prostate.

- J Urol 164: 876-881.
273. Rockville M (2005): Saw palmetto extract. In: United States pharmacopeial forum: (DSB) dietary supplement: botanicals. Pharmacopeial Convention 28:425- 430.
  274. Rodríguez V (2002). H.B.P. Tratamiento medicamentoso/quirúrgico. Alternativas. Perspectivas terapéuticas futuras. Actas Urol Esp. 26: 481- 490.
  275. Roehrborn C, Siami P and Barkin J (2008). The Effects of Dutasteride, Tamsulosin and Combination Therapy on Lower Urinary Tract Symptoms in Men with Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Enlargement: 2-Year Results from the CombAT Study. J Urol 179: 616- 621.(b)
  276. Roehrborn C. G (2008). BPH progression: concept and key learning from MTOPS, COMBAT, and ALF-ONE. BJU 101: 17-21. (a)
  277. Roehrborn C.G (2008). Tadalafil administrado una vez al día para síntomas del tracto urinario inferior secundario a Hiperplasia Benigna de Próstata: Un estudio de determinación de dosis. J Urol 180: 12-15. (c)
  278. Roehrborn C.G and McConnell J.D (2002). Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. In PC Walsh et al., eds., Campbell's Urology, 8<sup>th</sup> ed., vol. 2: 1297-1336.
  279. Roehrborn C.G and Schwinn D.A (2004). Alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia.J Urol 171:1029-1035.
  280. Roehrborn C.G, Boyle P and Bergner D (1999). Serum prostate specific antigen and prostate volume predict long-term changes in symptoms and flow rate: results of a four-year, randomised trial comparing finasteride and placebo. Urol 54: 663-669. (a)
  281. Roehrborn C.G, Mc Connell J.D and, Lieber M (1999). Serum prostate-specific antigen concentration is a powerful predictor of acute urinary retention and the need for surgery in men with clinical benign prostatic hyperplasia. Urol 53: 473-480. (b)
  282. Rouillon F (2008). Epidemiology of mood disorders. Rev Prat 58: 361-365.
  283. Rowland D.L and Tai W (2003). A review of plant-derived and herbal approaches to the treatment of sexual dysfunctions. J Sex Marital Ther 29: 185-205.
  284. Safarinejad M.R (2008). Prevalence of benign prostatic hyperplasia in a population-based study in Iranian men 40 years old or older. Int Urol Nephrol 40:921-931.
  285. Sagnier P.P, Girman C.J, Garraway M, Kumamoto Y, Lieber M.M, Richard F, MacFarlane G, Guess H.A, Jacobsen S.J, Tsukamoto T and Boyle P (1996). International comparison of the community prevalence of symptoms of prostatism in four countries. Eur Urol 29:15-20.
  286. Sahnoun Z, Jamoussi K and Zeghal K.M (1997). Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. Therapie 52: 251- 270.
  287. Sala A, Zarini S and Bolla M (1998). Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions. Biochemistry 63: 84-92.
  288. Salem O.I, Frotscher M, Scherer C, Neugebauer A, Biemel K, Streiber M, Maas R and Hartmann R.W (2006). Novel 5 $\alpha$ - reductase inhibitors: synthesis, structure-activity studies, and

- pharmacokinetic profile of phenoxybenzoylphenyl acetic acids. *J Med Chem* 49: 748-59.
289. Salmon J.A and Higgs G.A (1987). Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br Med Bull* 43: 285-296.
  290. Sall M and Bruskewitz R.C (1996). Treatment of benign prostatic hyperplasia: surgery, medical therapy, or watchful waiting. *Compr ther* 22:554-556.
  291. Sampson N, Madersbacher S and Berger P (2008). Pathophysiology and therapy of benign prostatic hyperplasia. *Wien Klin Wochenschr* 120:390-401.
  292. Samuelsson B, Dahlén S, Lindgren J.A, Rouzer C.A and Serhan C.N (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 237: 1171-1176.
  293. Sandhu J.S and Te A.E (2004). The role of 5 alpha-reductase inhibition as monotherapy in view of the MTOPS data. *Curr Urol Rep* 5: 274- 279.
  294. Sarma A.V, Burke J.P, Jacobson D.J, McGree M.E, St Sauver J, Girman CJ, Lieber M.M, Herman W, Macoska J, Montie J.E and Jacobsen S.J (2008). Associations between diabetes and clinical markers of benign prostatic hyperplasia among community-dwelling Black and White men. *Diabetes Care* 31:476- 482.
  295. Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Gomez A.A, Monti S, Toscano V and Di Silverio F (2008). Prostate growth and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:254-260.
  296. Schaur R.J (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol. Aspects Med* 24: 1499-1509.
  297. Schenk J.M, Kristal A.R, Neuhaus M.L, Tangen C.M, White E, Lin D.W and Thompson I.M (2009). Serum adiponectin, C-peptide and leptin and risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: Results from the prostate cancer prevention trial. *Prost (en prensa)*.
  298. Schleich S, Papaioannou M, Baniahmad A and Matusch R (2006). Extracts from *Pygeum africanum* and Other Ethnobotanical Species with Antiandrogenic Activity. *Plant Med* 72:807-813.
  299. Schulman CC (2003). Lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia: minimizing morbidity caused by treatment. *Urol* 62: 24-33.
  300. Schwinn D.A and Michelotti G.A (2000). Alpha 1-adrenergic receptors in the lower urinary tract and vascular bed: potential role for the  $\alpha 1d$ -subtype in filling symptoms and effects of ageing on vascular expression. *BJU Int* 85: 6-11.
  301. Schwinn D.A and Roehrborn C.G (2008).  $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol* 15:193-199.
  302. Seifter Julian and Brenner Barry (1990). Capítulo 281: Obstrucción de las vías urinarias: 1900. t. r. Harrison y colaboradores. *Principios de Medicina Interna*. Editorial Mexicana Reg. No. 736
  303. Serrano R (2004). Dieta mediterránea: aliada de la próstata. <http://www.dmedicina.com>. (consultado 30 de junio 2009)
  304. Shappell S.B, Boeglin W.E, Olson S.J, Kasper S, Brash A. (1999). R 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma. *Amer J Pathol* 155:235- 245.

305. Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Shoyama Y, Sato H, Ueno T (2000). Steroid 5 alpha-reductase inhibitory activity and hair regrowth effects of an extract of *Boehmeria nipo-nivea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 875-877.
306. Siami P, Roehrborn CG, Barkin J, Damiao R, Wyczolkowski M, Duggan A, Major-Walker K, and Morrill B.B (2007). Combination Therapy with dutasteride and tamsulosin in men with moderate to severe benign prostatic hyperplasia and prostate enlargement: the combAT (Combination of Avodart and Tamsulosin) trial rationale and study design. *Contem Clin Trial* 28: 770-779.
307. Siddiqui I.A, Adhami V.M, Saleem M and Mukhtar H (2006). Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Mol Nutr Food Res* 50:130-143.
308. Sidoti C, Hedef N and Delacroix D (1993). Inhibitory effect of *Pygeum africanum* extract (Tadenan) on A23187-stimulated lipoxygenase metabolite production from human polymorphonuclear cells. *Pharmacology* 12: 271-286.
309. Simpson R.J (2001). Benign prostatic hyperplasia. An overview of epidemiology and treatment. *Primary Care in the New NHS* 25:184-186.
310. Stadman E.R and Levine R.L (2000). Protein oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899: 191-208.
311. Stanley R (1985). Capítulo 26: Aparato genital masculino: Patología estructural y funcional (segunda parte). Edición revolucionaria La Habana 1147-1155.
312. Stanley R (1995). Patología estructural y funcional Tomo II 5<sup>a</sup> Edición Mc Gran-Hill. Interamericana. Healthcare group Nueva York, Londres, Milan, Tokyo.
313. Steinbrecher U.P, Witzum J, Parthasarathy S and Steinberg D (1987). Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. *Arteriosc* 135:143.
314. Sultan C, Terraza A, Deviller C, Carilla E, Briley M, Loire C and Descomps B (1984). Inhibition of androgen metabolism and binding by a liposterolic extract of "*Serenoa repens* B" in human foreskin fibroblast. *J. Steroid Biochem* 20: 515-519.
315. Sun Z.Y and Tu Z.H (1998). A novel "*in vitro*" model to screen steroid 5 alpha reductase inhibitors against benign prostatic hyperplasia. *Methods Find Exp clin Pharmacol* 20: 283-7.
316. Sun Z.Y, Xie H and Tu Z.H (1999). Effects of finasteride and epristeride on steroid 5  $\alpha$ - reductase kinetics A comparative "*in vitro*" study. *Indian J Pharmacol* 31: 120-123.
317. Suzuki S, Platz E.A, Kawachi I, Willet W.C and Giovannuci E (2002). Intakes of energy and macronutrients and the risk of benign prostatic hyperplasia. *Amm J Clin Nutr* 75: 689-97.
318. Tacklind J, MacDonald R, Rutks I and Wilt T.J (2009). *Serenoa repens* for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD 001423.
319. Tanguay S, Awde M, Brock G, Casey R, Kozak J, Lee J, Nickel C and Saad F (2009). Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia in primary care. *Can Urol Assoc J* 3: S92-S100.
320. Tarter T.H and Vaughan E.D (2006). Inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr Pharm Des* 12: 775-783.
321. Tatárinov V.G (1980). Anatomía y fisiología humanas. Editorial Mir Capítulo VII. Sistema

- urogenital. Órganos genitales masculinos internos.183-194.
322. Tateson J.E, Randall R.W, Reynolds C.H, Jackson W.P, Bhattacharjee P, Salmon J.A and Garland L.G (1988). Selective inhibition arachidonate 5- lipoxygenase by novel aceto-hydroxamic acids: biochemical assessment “*in vitro*” and “*ex vivo*”. Br J Pharmacol 94: 528-539.
  323. Taylor J.M, DeSouza R and Wang R (2008). Common approach to managing lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction. Asian J of Androl 10: 45–53.
  324. Thorpe A and Neal D (2003). Benign prostatic hyperplasia. Lancet 19: 1359 – 1367.
  325. Tilburt J.C, Emanuel E.J and Miller F.G (2008). Does the evidence make a difference in consumer behavior? Sales of supplements before and after publication of negative research results. J Gen Intern Med 23:1495-8.
  326. Toomey R.E, Goode R.L, Petrow V and Neubauer B (1991). “*In vivo*” assay for conversion of testosterone to dihydrotestosterone by rat prostatic steroid 5 $\alpha$ - Reductase and comparison of two inhibitors. Prost 19:63-72.
  327. Toyokuni S (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int 49: 91-102.
  328. Tsujii T (2000). Comparison of prazosin, terazosin and tamsulosin in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia: a short-term open, randomized multicenter study. BPH Medical Therapy Study Group. Benign prostatic hyperplasia. Int J Urol 7:199-205.
  329. Ulbricht C, Basch E, Bent S, Boon H, Corrado M and Foppa I (2006). Evidence-based systematic review of saw palmetto by the Natural Standard Research Collaboration. J Soc Integr Oncol 4:170-186.
  330. Untergasser G, Madersbacher S and Berger P (2005). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. Exp Gerontol 40: 121-128.
  331. Uribe F (2006). Cancer de próstata ¿Por que se produce el cancer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular. Urol Colom .Parte I: 19-32.
  332. Valenzuela A, Sanhueza J and Nieto S (2003). Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. Biol Res 36: 291-302.
  333. Van Dijk M.M, De la Rossette J.J and Michel M.C (2006). Effects of  $\alpha$ (1)- adrenoceptor antagonists on male sexual function. Drugs 66: 287-301.
  334. Vaya J and Aviram M (2001). Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. Current Med Chem 1: 99-117.
  335. Vela R, García J.V, Cabrera J, González C, Casado S and J (2005). Farre Impotencia y enfermedad cardiovascular: una nueva perspectiva en el compromiso asistencial del urologo. Arch Esp Urol 58: 46-48.
  336. Walden P, Neider A and Globina Y (2002). Investigation of the non-adrenergic, apoptotic mechanism of action of doxazosin in the prostate. J Urol 167: 215.
  337. Wang L, Yang J.R, Yang L.Y and Liu Z.T (2008). Chronic inflammation in benign prostatic

- hyperplasia: implications for therapy. *Med Hypoth* 70:1021-1023.
338. Wang W, Bergh A and Damber J.E (2004). Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase -2, Bcl-2, and cell proliferation in glandular epithelium. *Prost* 61: 60-72.
  339. Weisser H and Krieg M (1998). "In vitro" of androstenedione 5 alpha reduction by finasteride in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *J steroid Biochem Mol Biol* 67: 49-55.
  340. Weisser H, Tunn S, Behnke B, Krieg M (1996). Effects of the sable serrulata extract IDS 89 and its subfractions on 5-alpha reductase activity in human prostatic hyperplasia. *Prostate* 28: 300-306.
  341. WHO (2007). Monographs on Selected MedPlants. Vol 3, Cap11.
  342. Wikipedia, la enciclopedia libre (2008). MedlinePlus hierbas y suplementos: Ciruelo africano (*Prunus africanum*, *Pygeum africanum*) [http://es.wikipedia.org/wiki/Pygeum\\_africanum](http://es.wikipedia.org/wiki/Pygeum_africanum). (consultado 14 junio 2009)
  343. Wilt T, Ishani A and Mac Donald R (2002). *Serenoa repens* for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD001523-CD001423 (a)
  344. Wilt T, Ishani A, Mac Donald R, Rutks I and Stark G (2008). *Pygeum africanum* para la hiperplasia benigna de la próstata (Revisión Cochrane traducida) (1):CD001044.
  345. Wilt T.J, Ishani A and Stark G (1998). Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: Asystematic review. *JAMA*. 280: 294.
  346. Wilt T.J, Ishani A, Rutks I and MacDonald R (2000). Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutr* 3: 459-72.
  347. Wilt TJ (2002). Terazosin for treating symptomatic benign prostatic obstruction: a systematic review of efficacy and adverse effects. *BJU Internacional* 89: 214-225. (b)
  348. Willetts K.E, Clements M.S and Champion S (2003). *Serenoa repens* extract for benign prostate hyperplasia: a randomized controlled trial. *BJU Int* 92: 267- 270.
  349. Winslow L.C and Kroll D.J (1998). Herbs as medicines. *Arch Intern Med* 158: 2192-2199.
  350. Wong P, Lawrentschuk N and Bolton D.M (2009). Phosphodiesterase 5-inhibitors in the management of benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction: the best of both worlds. *Curr Opin Urol* 19:7-12.
  351. World Health Organization (2007). Fact sheet No. 317. Cardiovascular diseases. <http://www.who.int/mediacentre.html>. (consultado 23 julio 2009)
  352. Wu J. H, Sun Z Y and Cao L (2006). "In vitro" effects of epristeride on sperm in rats, dogs and man. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 52:191-195.
  353. Yamada S, Ashizawa N and Ushijima H (1987). Alpha-1 adrenoceptors in human prostate: characterization and alteration in benign prostatic hypertrophy. *J Pharmacol Exp* 242: 326-32.
  354. Yarnell E (2003). Botanical medicines for the urinary tract. *World J Urol* 20: 285-93.
  355. Yoshikawa T (2002). Vascular dysfunction and free radicals. *Free Radic Biol Med* 33: 425- 426.
  356. Zhang Y, Mills G.L and Nair M.G (2002). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J Agric Food Chem* 50:7581- 7585.

357. Zhao M.M, Hwa J and Perez D.M (1996). Identification of critical extracellular loop residues involved in alpha 1-adrenergic receptor subtype-selective antagonist binding American Society for Pharmacol and Experim Therapeutics 50: 1118-1126.
358. Zhu Y.S and McGinley J.L (2009). 5 $\alpha$ -reductase isozymes and androgen actions in the prostate. Ann N Y Acad Sci 1155:43-56.
359. Zu-Yue Sun, Hong Xie and Zeng-Hong (1999). Tu Effects of finasteride and epristeride on steroid 5 $\alpha$ -reductase kinetics-A comparative “*in vitro*” study. Indian J of Pharmacol 31: 102- 123.

# **ANEXO**

## ANEXO. 1

### Publicaciones y eventos relacionados con el tema de tesis.

#### Publicaciones Internacionales de Impacto:

1. **Pérez Y**, Menéndez R, Mas R and González R (2006). “*In vitro*” effect of D-004, a lipid extract from the Cuban Royal palm (*Roystonea regia*), on of prostate steroid 5- $\alpha$  reductase activity .**Curr Ther Res Clin &Exptl** 67 (6): 396-405.
2. Menéndez R, Carbajal D, Mas R, **Pérez Y**, Molina V, Arruzazabala ML and González R (2006). Efecto 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. **Lat J Pharm** 25 (2):213-218.
3. Menéndez R, Más R, **Pérez Y** and González RM (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 Res** 21(1):89-95.
4. **Pérez Y**, Molina V, Mas R, Menéndez R, González R. M, Oyarzábal A, and Jiménez S (2008). Ex vivo antioxidant effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on rat prostate tissue. **Asian J Androl** 10(4): 659-666.

#### Publicaciones Nacionales:

1. Menéndez R, Mas R, **Pérez Y**, Gamez R, González RM and Jiménez S (2005). Estudio de los efectos de la administracion oral de D-004, (50-800 mg/kg de peso) sobre la peroxidacion lipídica en ratas. **Rev CENIC Cien Biol** 36 No. Especial. (CD)
2. **Pérez Y**, Menéndez R, Mas R and González RM (2007). Efecto “*in Vitro*” del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real, sobre receptores androgénicos de tejido prostático. **Rev CENIC Cien Biol** 38 (3):177-199.
3. Arruzazabala ML, **Pérez Y**, Molina V, Carbajal D, Ravelo and Mas R (2008). Effect of D-004, a lipid extract from royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on phenylephrine-induced contractions of isolated rat prostate. **Rev Cubana Farm** (en prensa).
4. **Pérez Y**, Oyarzábal A, Molina V, Jiménez S, Cuverco D y Mas R (2009). Estudio del D-004 sobre la defensa antioxidante endógena en ratas con hiperplasia inducida por inyección de testosterona. **Rev Cubana Farm** (en prensa).

**Eventos científicos internacionales:**

**14 Congreso Científico Internacional CNIC 2005.** *Oral administration of D-004 (50-800 mg/kg) inhibited lipid peroxidation in rats.* **Pérez Y,** Menéndez R, Mas R, González RM, Jiménez S.

**14 Congreso Científico Internacional CNIC 2005.** *Effects of D-004 “in vitro” on liver and brain microsomal lipid peroxidation.* Menéndez R, **Pérez Y,** Mas R, González RM, Jiménez S.

**Otras publicaciones y eventos de la autora vinculados con el tema de tesis.**

1. **Pérez Y,** Menéndez R, Gámez R, González R, Mas R, Pardo B, Mendoza S (2005). Efectos de la administración oral de D-004 (400 mg/kg) sobre la peroxidación lipídica en ratas ovariectomizadas. **Rev CNIC Ciencias Biológicas;** Edición especial (CD).

***14 Congreso Científico Internacional CNIC 2005.***

2. **Pérez Y,** Menéndez R, Mas R, and González RM (2006). Study of plasma levels, tissue distribution and excretion of radioactivity after single oral dosing of rats with 3H-oleic acid added to D-004, a lipid extract of *Roystonea regia* fruits. **Curret Therapeutic Research.** 67:(6) 406-419.

***Concurso Científico Juvenil BTJ/CNIC 2007. Mención.***