

EFFECTO DEL D-004, SAW PALMETTO, Y TAMSULOSIN SOBRE LA APOPTOSIS EN LA HIPERPLASIA PROSTÁTICA INDUCIDA EN RATAS

DRA. MIRIAM NOA PUIG, DRA.C¹, LIC. SARAHÍ MENDOZA CASTAÑO, DRA.C², DR. MAIKEL VALLE CLARA, MSc³,
LIC. ROSA MAS FERREIRO DRA.C⁴

¹*Escuela Latinoamericana de Medicina*
^{2,3,4}*Centro de Productos Naturales (CNIC)*

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto del D-004, Saw Palmetto (SP) y Tamsulosin, sobre la apoptosis, en la hiperplasia de próstata inducida por testosterona y por fenilefrina en ratas.

Materiales y métodos: se estudiaron 2 series experimentales para inducir hiperplasia prostática (HP). En la serie 1 se indujo la HP con testosterona. Las ratas se distribuyeron en 6 grupos: control negativo y positivo, 3 grupos tratados con D004 a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg, y otro de SP (400 mg/kg). En la serie 2 se administró fenilefrina.

Se estudiaron 5 grupos: un control negativo, un control positivo, un grupo D-004 y SP (400mg/kg) y Tamsulosin (0.4mg/kg). Las muestras de próstata ventral se procesaron para el estudio inmunohistoquímico de apoptosis. El índice apoptótico (IA) se analizó como variable de eficacia primaria.

Resultados: en los controles positivos de las series 1 y 2 se observó disminución significativa del IA, vs los controles negativos. En la serie 1, las muestras de los animales tratados con D-004, así como con SP mostraron aumento significativo de los IA, vs control positivo, al igual que en la serie 2, los tratados con D-004 y SP mostraron aumento significativo de los IA vs control positivo, al igual que las de Tamsulosin. Conclusiones: El D-004 previno la disminución de la apoptosis inducida por T y FE en ratas, al igual que el SP, lo que permite relacionar por primera vez su efecto sobre la HP con su efecto inductor de la apoptosis. El Tamsulosin produjo menor efecto.

Palabras clave: hiperplasia prostática, D-004, Saw Palmetto, Tamsulosin, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Prostática (HP) es un proceso sumamente frecuente en los varones de más de 50 años. Se caracteriza por una hiperplasia del estroma y de las células epiteliales de la próstata, con formación de nódulos en la región periuretral de la próstata, que cuando son lo bastante grandes, comprimen y causan obstrucción de la uretra.

Es el tumor benigno más común en los varones, su incidencia está relacionada con la edad (20% en hombres entre 41 y 50 años, 50% en hombres de 51 a 60 años y más de 90% en hombres mayores de 80 años); la

anterior, es incidencia histológica. Clínicamente, también existe relación con la edad (a los 55 años el 25% de los varones experimentan síntomas, mientras que a los 75 años es el 50%), constituyendo un problema de salud importante. 1, 2 En EUA se realizan más de 400,000 resecciones transuretrales de la próstata cada año, siendo esta intervención, la segunda, en orden de frecuencia en los varones de más de 65 años, solo superada por la extracción de cataratas.3,4

Existen pocas dudas sobre la relación que tienen los andrógenos con esta forma de aumento de tamaño de la

próstata 5. La dihidrotestosterona (DHT), un metabolito de la testosterona (T) es finalmente la sustancia mediadora de la hipertrofia prostática. Se sintetiza en la propia próstata a partir de la T circulante, por acción de una enzima la 5 α reductasa de tipo 2. Esta enzima se encuentra principalmente en las células del estroma y es en ellas donde se sintetiza la DHT actuando de forma autocrina sobre las células del estroma, o de forma paracrina, tras difundirse en las células epiteliales próximas. En estos dos tipos de células, la DHT se une a los receptores nucleares de los andrógenos y actúa como señal para la transcripción de los factores de crecimiento que son mitógenos para las células del epitelio y el estroma. Aunque la T puede unirse también a los receptores de los andrógenos y estimular igualmente el crecimiento de la próstata, la DHT es 10 veces más potente porque se separa más lentamente de los receptores de los andrógenos

La importancia de la DHT como mediador de la HP se apoya en la observación clínica de que un inhibidor de la 5 α reductasa (finasteride) disminuye notablemente la cantidad de DHT que contiene la próstata y cierto porcentaje de los casos experimentan disminución de volumen de la próstata y de la obstrucción urinaria 6. Sin embargo, un por ciento de los pacientes tratados con finasteride reportan trastornos sexuales incluyendo impotencia.

El hecho de que todos los pacientes no mejoren con el tratamiento con inhibidores androgénicos indica que la etiología de la HPB puede ser multifactorial.

De esta forma, existen otros medicamentos que se utilizan con similar frecuencia entre los que se encuentran los bloqueadores α 1 adrenérgicos (doxazosin, prazosin, terazosin, tamsulosin). Estos medicamentos se utilizan para la HP porque ellos relajan los músculos del cuello de la vejiga, permitiendo así una mejoría de los síntomas obstructivos. El 74% de los pacientes reportan alivio sintomático. 7

En la búsqueda de otros medicamentos para esta importante patología, el empleo de la fitoterapia es muy común en Europa y los Estados Unidos. En los últimos años se vienen utilizando productos naturales tales como, el Saw Palmetto (*Sabal serrulata*, syn. *Serenoa repens*), el *Pygeum africanum*, los cuales muestran resultados clínicos similares a las otras drogas de la competencia en cuanto al alivio de los síntomas. El efecto farmacológico del extracto lipídico de Saw Palmetto (ELSP) se atribuye a un mecanismo multifactorial que fundamentalmente incluye la inhibición de la enzima 5 α - reductasa prostática y el antagonismo de los adrenoreceptores α 1, auxiliado por su efecto antiinflamatorio a consecuencia de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa. 8

El D-004, es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) (Arecaceae) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico, el linoleico, el mirístico y el palmítico son los más abundantes y de concentraciones

menores de palmitoleico, caprílico, cáprico y esteárico, que muestra similitud en su origen y composición con los descritos para el ELSP. 9

Los estudios de farmacodinamia han demostrado la eficacia del D-004 en el tratamiento de la HP inducida en roedores por T 10-14, no así la inducida por DHT 13, así como en la HP atípica inducida por fenilefrina (FE) en ratas 15,16. 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 o por FE, en ratas han mostrado que el D-004 es moderadamente más efectivo que el ELSP 17.

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 inducida por T con respecto a cada monoterapia 18. Además, 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. 16

Por otra parte, se realizó un estudio en ratas tratadas con D-004 y Saw Palmetto a las que se les había inducido HP mediante inyección con T y se procesaron las próstatas para su estudio histopatológico de acuerdo al sistema de puntaje de Scolnik y se observó que el D-004 a las dosis de 200 y 400 mg/kg previno el aumento de tamaño de las próstatas, así como disminuyó el puntaje histológico asignado. El Saw Palmetto mostró resultados similares. 14 De igual forma, el estudio histológico del efecto del D-004 y el tamsulosin, en el modelo de HP inducido por FE previno también el aumento de tamaño de las próstatas, así como el puntaje histológico, indicando menor daño en las ratas tratadas con ambos compuestos. 14,15

Aunque la HP se reconoce como un problema de salud importante, los procesos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo de esta enfermedad se conocen poco. Las evidencias experimentales confirman que la cinética del crecimiento celular, tanto benigno como maligno, se relaciona con 2 parámetros independientes, el promedio de proliferación y el de apoptosis. 2

La apoptosis, o muerte celular programada, es un componente normal del desarrollo y salud de organismos multicelulares. Las células mueren en respuesta a una variedad de estímulos y en la apoptosis lo hacen de una manera controlada, lo que la hace diferente a la necrosis, la cual lleva a la lisis celular, respuesta inflamatoria y serios problemas de salud. La apoptosis es un proceso en el cual la célula tiene un papel activo en su propia muerte (por lo que se le conoce a veces como suicidio celular). Se caracteriza por una serie de cambios en la arquitectura nuclear tales como condensación de la cromatina y fragmentación del ADN nuclear los cuales

han sido los marcadores más específicos de apoptosis 19. La detección de la fragmentación del ADN nuclear es un método ampliamente aceptado para detectar apoptosis, lo cual puede ser detectado in situ incorporando nucleótidos marcados en los extremos libres 3' OH de los fragmentos usando la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT) seguida de la detección de moléculas marcadas. Este tipo de ensayo, denominado TUNEL permite estudiar la apoptosis en tejidos.20, 21

Se reporta un aumento de la proliferación así como un decremento de la apoptosis en el tejido prostático en la HP. Sugiriéndose que el crecimiento de la próstata resulta del desbalance entre la proliferación celular y la apoptosis. 21

En la última década se han realizado estudios para evaluar el efecto de diferentes sustancias que actúan sobre la HP y la apoptosis. Así, se ha reportado que el finasteride actúa aumentando la apoptosis en la HP 22. De igual forma se ha demostrado la habilidad del doxazosin y el terazosin, pero no el tamsulosin, para inhibir el crecimiento prostático induciendo apoptosis de las células epiteliales en la HP. Así, las evidencias indican que además de causar relajación de las células musculares lisas, ciertos bloqueadores de adrenoreceptores $\alpha 1$ pueden afectar la dinámica del crecimiento de la próstata cambiando el balance entre proliferación celular y apoptosis. 23 Por otra parte, aunque en la literatura científica se plantea que el Saw Palmetto induce marcado incremento de apoptosis, 24,25 existen algunos resultados contradictorios en cuanto a este efecto, ya que ha sido reportado por algunos autores que no induce la apoptosis.26

Teniendo en cuenta que:

- En la HP ocurre disminución de la apoptosis
- Los medicamentos de primera línea en el tratamiento de la HP, en su mayoría, actúan sobre la apoptosis en la glándula prostática.
- El D-004 muestra similitudes en su origen y composición con el Saw Palmetto, producto natural que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la HP y que algunos autores refieren aumenta la apoptosis de células prostáticas.
- El D-004 ha demostrado eficacia en el tratamiento de la HP en ratas en diferentes modelos experimentales (inducido por T y por FE) al presentar efectos reductores del tamaño de la próstata en estos modelos, así como también de la disminución de daño tisular (puntaje histológico).

Resultaba lógico suponer que el D-004 pudiera tener efectos beneficiosos en modelos de HP mediante aumento de la inducción de la apoptosis.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del D-004, saw palmetto y tamsulosin, sobre la apoptosis, en la HP inducida por T y por FE en ratas Sprague Dawley.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron láminas histológicas con muestras de próstata, cedidas gentilmente por el departamento de Farmacología del Centro de Productos Naturales (CPN), provenientes de dos estudios farmacológicos.

El D-004 para los estudios fue obtenido en el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales (CPN), y utilizado tras haber corroborado sus especificaciones de calidad. Como sustancias de comparación se utilizaron Saw Palmetto (Blackmores, Australia) y tamsulosin (Omnice, Yamanouchi Pharma SpA, Italia).

Tanto el D-004 como el SP y el tamsulosin se prepararon en un vehículo Tween 65/H₂O (2%) y se administraron por vía oral a las ratas mediante entubación gástrica (5 mL/kg).

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de 3 meses de edad y peso de 200 a 220 g. Las ratas fueron colocadas en jaulas individuales en un local con condiciones ambientales controladas (20-25°C, 60 ± 10% humedad y ciclos de 12/12h Luz/Oscuridad), en el cual permanecieron durante todo el experimento. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento estándar para ratas suministrado por el CENPALAB.

Descripción de las series experimentales de las cuales se obtuvieron las muestras

Serie Experimental 1. Modelo de inducción de HP por testosterona

La HP fue inducida por la administración sc de propionato de T (Quimefa, Cuba), disuelto en aceite vegetal a la dosis de 4 mg/kg durante 14 días. Las ratas se distribuyeron en 6 grupos: un grupo control negativo que recibió inyecciones sc de aceite de soya y se trataron con vehículo, y 5 grupos inyectados sc con T y tratados con vehículo (control positivo), D-004 (200, 400 y 800 mg/kg) o Saw Palmetto (400 mg/kg). Los tratamientos se administraron oralmente durante 14 días.

Serie experimental 2. Modelo de inducción de HP por fenilefrina.

La HP fue inducida por la administración sc de FE (Quimefa, Cuba), a la dosis de 2 mg/kg durante 30 días. Las ratas tratadas fueron distribuidas en 5 grupos experimentales: un control negativo y 4 grupos tratados con FE y administrados con vehículo (control positivo), D-004 (400 mg/kg), Tamsulosin (0.4 mg/kg) o Saw Palmetto (400 mg/kg).

Obtención de las muestras

En ambas series experimentales, al sacrificio, se extrajeron las próstatas y se tomaron muestras de próstata ventral fijándose en formaldehído tamponado. Posteriormente se procesaron y se incluyeron en parafina para su estudio por microscopía óptica.

Estudio inmunohistoquímico de apoptosis (TUNEL)

A partir de los bloques de parafina de estas muestras se prepararon las láminas para la realización de la técnica inmunohistoquímica para la detección in situ de apoptosis en las células prostáticas. Se utilizó el juego de reactivos TACS.XL de R&D Systems y se siguió el protocolo adjunto.

En breve: las secciones de tejidos una vez desparafinadas, se incubaron en proteinasa, enzima utilizada para permeabilizar los tejidos. La fragmentación del DNA se detectó mediante la incorporación de nucleótidos marcados a las terminaciones libres de 3' OH de los fragmentos de DNA por la acción de la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT), en un medio de incubación en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C. Después de repetidos lavados en buffer, las secciones se incubaron con el sistema de detección estreptavidina peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y subsiguientemente con diaminobenzidina (DAB). Para el contraste se utilizó la coloración de verde metilo.

Se realizaron los controles siguientes: a) TACS Control tratado con nucleasa. Tras la incubación en solución de proteinasa K, se trató una muestra con TACS nucleasa, para generar fragmentos de DNA en cada célula y confirmar si la permeabilización de la membrana y la reacción de marcaje ocurren adecuadamente, b) Muestra control experimental no marcada. Se tomó una muestra en la cual se omitió la adición de la enzima TdT como control del fondo asociado al marcaje no específico de la estreptavidina/HRP.

Variables analizadas

El índice apoptótico (IA) se analizó como la variable de eficacia primaria. Para esto se realizó el conteo de las células TUNEL+ al marcaje para apoptosis (células que presentaban la coloración nuclear carmelitosa oscura o fragmentos nucleares con un halo en el citoplasma), utilizando un objetivo de 40 X. El índice apoptótico fue evaluado contando el número de células TUNEL + y el número total de células en el epitelio prostático (300 a 500). El IA fue expresado basado en ese porcentaje. $IA (\%) = A \times 100 / (A+C)$, donde A indica células en apoptosis y C indica células contrastadas, no TUNEL +. Para el procedimiento inmunohistoquímico, las células TUNEL + fueron evaluadas en 8 campos aleatorios por cada lámina, y se determinaron los valores promedios.14

Análisis Estadístico

Se analizó el comportamiento de la apoptosis en cada uno de los grupos mediante el empleo de estadígrafos. Las comparaciones de las variables continuas entre los grupos se realizaron utilizando el test no paramétrico de la U de Mann Whitney y el de Chi cuadrado para proporciones. Un $\alpha = 0,05$ fue a priori asumido para la significación estadística en todos los casos. Los datos se procesaron de acuerdo al software Statistica para Windows.

Control de Calidad

En trabajos previos, toda la manipulación de los animales empleados en la obtención de las muestras se realizó de acuerdo a los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio recomendados en los Lineamientos Internacionales y en los Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental (Regulación No.39/04, CECMED, Cuba).

El estudio fue realizado de acuerdo al protocolo revisado y aprobado por el Comité de Etica y los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) establecidos en el CPN.

RESULTADOS

Los controles negativos realizados cuando se omitió la enzima transferasa no mostraron coloración carmelita. El control de la técnica tratado con TAC-nucleasa mostró la mayoría de las células exhibiendo la coloración nuclear carmelita.

Se observó apoptosis en células de las glándulas prostáticas de los controles negativos de ambas series experimentales. La mayoría de los cuerpos apoptóticos se observaron cercanos a la luz de las glándulas prostáticas mayores, mientras que estaban ausentes en el epitelio de glándulas dilatadas (atróficas). En los controles positivos de la serie experimental 1 (animales tratados con T) se observó disminución significativa ($p < 0.001$) de células apoptóticas y del índice apoptótico, al compararlos con los controles negativos. En el grupo control positivo de la serie experimental 2 (inducción de HP por FE), las células apoptóticas se encontraban disminuidas, pero sin significación estadística, aunque el índice apoptótico sí mostró significación estadística ($p < 0.001$).

En la serie experimental 1, las muestras de los animales tratados con D-004 a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg, así como con Saw Palmetto a la dosis de 400 mg/kg mostraron aumento significativo de las células apoptóticas y de los índices de apoptosis, ($p < 0.001$) cuando se compararon con las del grupo control positivo.

En la serie experimental 2, las muestras de los animales tratados con D-004 y Saw Palmetto (400 mg/kg ambas) mostraron también aumento significativo de las células apoptóticas y de los índices de apoptosis ($p < 0.0001$), cuando se compararon con las del grupo control positivo. Sin embargo, las del grupo de Tamsulosín no mostraron este aumento.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que la administración de D-004 induce un aumento de la apoptosis de células prostáticas (número de células en apoptosis e índice apoptótico) en ratas con hiperplasia inducida por T (200, 400 y 800 mg/kg) y FE (400 mg/kg). En estos modelos, la administración de T o FE induce un aumento significativo del tamaño de la próstata y un aumento del puntaje histológico, simulando la HP en humanos, por lo que son ampliamente utilizados para evaluar la utilidad potencial de nuevas sustancias en el manejo de la HP.

Como era de esperar, el control negativo de la técnica inmunohistoquímica (sin la enzima transferasa) no mostró reacción TUNEL +, este control es indicativo del nivel de marcaje de fondo (DAB) asociado con uniones no específicas a la estreptavidina HRP. De igual forma, se observó mucha reacción al tratar una de las láminas con TAC-nucleasa después de la permeabilización con proteinasa para generar ruptura de DNA en las células prostáticas, lo cual permitió confirmar que la permeabilización y la reacción enzimática habían surtido efecto. La mayoría de las células mostró reacción positiva al colorearse con DAB. Estos controles realizados demostraron la validez de la técnica.

En la serie experimental 1 se observó una disminución significativa de la apoptosis en los animales del grupo control positivo en relación con el control negativo, lo que corrobora que en la HP inducida por T ocurre una disminución de la apoptosis. Algunos autores plantean que el crecimiento de la próstata en este modelo resulta del desbalance entre la proliferación celular y la apoptosis.²¹

Sin embargo, en la serie experimental 2, en el que la HP se indujo por FE, no se observó diferencia en el número de células en apoptosis y células normales entre los controles negativo y positivo, aunque si se encontró disminución significativa del índice apoptótico en los animales del control positivo. Estos resultados concuerdan con otros autores que plantean que en la HP inducida por FE no existe diferencia significativa en el número de células apoptóticas de animales controles negativos y positivos.²⁸

El D-004 incrementa la apoptosis de células prostáticas y el índice apoptótico en la HP inducida por T y por FE, a las mismas dosis que previene el aumento de tamaño de la próstata y los cambios histológicos.^{14, 15}

De igual manera, el Saw Palmetto (400 mg/kg) aumentó significativamente la apoptosis (número de células en apoptosis e índice apoptótico), en las muestras de próstata estudiadas en ambas series experimentales, de manera consistente con sus efectos en la prevención del aumento de tamaño de la próstata y los cambios histológicos inducidos por T y FE, ^{14,15} lo que concuerda con lo reportado por otros autores.²⁷

Los resultados de la serie experimental 2, del grupo tratado con Tamsulosin, muestran que el número de células en apoptosis no difiere de los grupos controles, teniendo valores muy similares al grupo control negativo. Sin embargo, el índice apoptótico, aunque presenta valores muy inferiores al D-004 y el Saw Palmetto, mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) al compararlo con el grupo control positivo. Diferentes autores han reportado que los bloqueadores $\alpha 1$ adrenérgicos (doxazosin, prazosin, terazosin), que como es conocido actúan sobre la HP, mejorando los síntomas obstructivos, tienen acción sobre la apoptosis de células prostáticas y ocurre independientemente de su unión

a los $\alpha 1$ -adrenoreceptores.^{28, 29} Así, se ha demostrado la habilidad del doxazosin y el terazosin, pero no el tamsulosin para inhibir el crecimiento prostático induciendo apoptosis de las células epiteliales en la HP. Las evidencias indican que más que causar relajación de las células musculares lisas, ciertos bloqueadores $\alpha 1$ adrenérgicos pueden afectar la dinámica del crecimiento de la próstata cambiando el balance entre proliferación celular y apoptosis.¹⁹ Estos efectos parecen estar mediados por el núcleo de la quinazolina que poseen la doxazosina y la terazosina, no así el tamsulosin, el cual es un derivado de la metoxisulfonamida, que no posee núcleo quinazolina. Evidencias recientes apuntan a una desregulación de señales de transducción que involucran al factor transformante de crecimiento β y disrupción de la unión celular a la matriz extracelular. La correlación de la apoptosis, con la mejoría de los síntomas, en pacientes con HP, permite plantear que el efecto de las quinazolininas sobre la apoptosis constituye un mecanismo molecular para la terapia de la HP a largo término.³⁰

Otros fitoquímicos han mostrado también efectos sobre la apoptosis en tejido prostático, así, Elberry y cols, (2011) ³¹ investigando el polen de la palma datilera (Date Palm Pollen) (DPP) (Phoenix dactylifera) para la infertilidad masculina, (Arabia), observaron aumento de la apoptosis en tejido prostático con el tratamiento de de DPP en suspensión y extracto.

Este estudio demuestra los efectos del D-004 (200, 400 y 800 mg/kg), así como del Saw Palmetto (400 mg/kg), sobre la apoptosis en ratas con HP inducida por T y también en el modelo inducido por FE. El D-004 y el Saw Palmetto, a estas dosis previnieron en ambos modelos el aumento de tamaño de la próstata, así como los cambios histológicos inducidos en ambos modelos en trabajos previos ^{14,15}. Esta reducción de la HP, observada en ratas inducida con T y FE, pudiera ser explicada por el aumento de la apoptosis.

La inducción de apoptosis en células prostáticas pudiera ser uno de los mecanismos involucrados en los efectos terapéuticos de estas sustancias, por lo que estos hallazgos posibilitan el desarrollo de nuevas investigaciones encaminadas al mecanismo de acción de estas sustancias y su relación con el crecimiento del tejido prostático. Se deben realizar estudios de proliferación celular en estos modelos, con el objetivo de estudiar la cinética de la proliferación celular y la apoptosis.

CONCLUSIONES

El D-004 (200, 400 y 800 mg/kg/día) previno la disminución de la apoptosis inducida por T y FE en ratas, al igual que el Saw Palmetto, lo que permite relacionar por primera vez su efecto sobre la HP con su efecto inductor de la apoptosis. El Tamsulosin no produjo este efecto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos reconocer la asistencia técnica de la técnica Nilda Mendoza Hernández en la preparación de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barboza Hernández M. Hiperplasia prostática benigna. *Revista médica Sinergia*. 2017; 2 (8) : 11-16
2. Lim K B. Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol*. 2017; 4(3): 148–151.
3. Foo K T. Pathophysiology of Clinical Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *Asian J Urol*. 2017; 4(3): 152–157.
4. Braeckman J, and Denis L. Management of BPH then 2000 and now 2016-From BPH to BPO. *Asian J Urol*. 2017; 4(3): 138–147.
5. Martínez LE, González A, Olzábal JP, Pardo HD. Diagnóstico y tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. *Rev Progaleño* 2018; 1 (2):133-147. Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urol*. 2003; 61 (Suppl 1): 2-7
6. Kim E, Brokman J, Andriole G. The use of 5 alpha reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol* 2018; 5(1):28-32 Sandhu JS, Te AE. The role of 5 alpha-reductase inhibition as monotherapy in view of the MTOPS data. *Curr. Urol. Rep*. 2004; 5: 274-279
7. Domínguez-Domínguez C, Calderón-Ospina C. Postural hypotension associated with inappropriate choice of drug treatment of benign prostatic hyperplasia. *Rev Colombi cienc quim farm*. 2015; 44 (3): Roehrborn CG, Schwinn DA. Alpha-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *J. Urol*. 2004; 171:1029-1035.
8. Kwon Y. Use of Saw Palmetto (*Serenoa repens*) extract for benign prostatic hyperplasia. *Food Sci Biotecnol*. 2019; 28 (6):1599-1606. Gerber GS. Saw palmetto for the treatment of men with lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2000; 163:1408-1414.
9. Laguna A, Rodríguez E, González V, et al, inventors, Laboratorios Dalmer SA, assignee. Pharmaceutical composition and procedure for the prevention and treatment of prostate hyperplasia and prostatitis obtained from the fruit of *Roystonea regia* (Cuban royal palm) Cuba patent PCT/CU/2004/00004
10. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on testosterone-induced prostate hyperplasia in intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res*. 2004; 30 (5-6): 227-33.
11. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Mas R, González V, Rodríguez E and Marrero D. 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*. 2008; 27: 41-45
12. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V and González V, Rodríguez E. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exptl Clin Res*. 2004; XXX: 227- 234.
13. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban Royal Palm fruit, on inhibiting prostatic hypertrophy induced with testosterone or dihydrotestosterone in a rat model: A randomized controlled study. *Curr Ther. Res*. 2004; 65: 505 – 514.
14. Noa, M, Arruzazabala, ML, Carbajal, D, Mas R and Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Int J Tiss React*. 2005; 27: 193-198.
15. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Noa M and Carbajal D. 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*. 2006; 7: 233- 224.
16. Arruzazabala ML, Molina V, Mas R and Carbajal D. Effects of D-004, tamsulosin and the combined therapy D004 plus tamsulosin on urodynamic changes induced with phenylephrine in rats. *Arzneimittel-Forschung Drug Res*.2008; 58: 81-85.
17. Carbajal D, Molina V, Mas R and Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004 a lipid extract from *Roystonea regia* fruits on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res*. 2005; 31:193-197.
18. Molina V, Arruzazabala ML, Carbajal D and Mas R. Effects of D-004 plus finasteride on prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Latin Am J of Pharm*. 2007; 26: 536-540.
19. Minutoli R, Rinaldi M, Marini H, Irrera N, Crea G, Lorenzini C. Apoptotic pathways linked to endocrine system as potential therapeutic targets for benign prostatic hyperplasia. *Int J Molec Sci*. 2016; 17 (8):1311-1317. Tahmatzopoulos A, Kyprianou N. Apoptotic impact of alpha1-blockers on prostate cancer growth: a myth or an inviting reality? *Prostate*. 2004; 1: 91-100.
20. M Demir, Akin Y, Gulut M, Buyukfirat E, Cifteci H, Yeni E. Evaluation of apoptosis indexes in currently used oral alpha blockers in prostate: a pilot study. *Int Braz J Urol*. 2018; 44 (3) <http://doi.org/10.1590/s1677-5538 ibju.2017.0668> Duman I, Arisan S, Büyüktunçer D, Çafkurlu T, Sönmez C, Palavan Ünsal N Apoptosis detection by TUNEL assay in BPH patients *J of Cell and Molec Biol*. 2004; 3: 103-107.
21. Yuan Y, Yang J, Zhu W, Liu T, He J, Zhou Q, et al. Qianlongtong Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Hyperplastic

prostate cells. *Am J Men's Health* 2018; 12(5): 1548-1553

22. Opoku-Acheampong A, Henningson JN, Lindshield B. The impact of finasteride and dutasteride treatments on proliferation, apoptosis, 5 alpha reductase 1 and 5 alpha reductase 2 in TRAMP mouse prostate. *Heliyon* 2017; 3 (7): e 00360 doi:10.1016/j.heliyon.2017.e 00360 Sutton, M T, Yingling, M, Vyas A, Atiemo H, Borkowski A, Jacobs, S C. Finasteride targets prostate vascularity by inducing apoptosis and inhibiting cell adhesion of benign and malignant prostate cells. *The Prostate*. 2006; 66: 1194-1202.

23. López-Ramos H, Moreno M, Patiño G, Rasch-Isla A, Dallos A, Fernández N. Guía de manejo de la hiperplasia prostática benigna. *Sociedad colombiana de urología. Guía de práctica clínica* 2015; 24 (3): 187.e1-187.e32 doi:10.1016/j.uroco.2015.04.005 Kyprianou N, Jacobs SC. Induction of apoptosis in the prostate by alpha1-adrenoceptor antagonists: a novel effect of "old" drugs. *Curr Urol Rep*. 2000; 1(2):89-96.

24. Bayne CW, Ross M, Donnelly F, Habib FK. The selectivity and specificity of the actions of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the prostate. *J Urol* 2000; 164: 876-81.

25. Vacherot F, Azzouz M, Gil-Diez-De-Medina S, Colombel M, De La Taille A, Lefrere Belda MA, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (LS ESr, Permixon®) in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2000; 45: 259-66.

26. Hill B, Kyprianou N. Effect of permixon on human prostate cell growth: lack of apoptotic action. *Prostate*. 2004; 61(1):73-80.

27. Minutoli L, Altavilla D, Marini H, Rinaldi M, Irrera N, Pizzino G et al. Inhibitors of apoptosis proteins in experimental benign prostatic hyperplasia: effects of *Serenoa repens*, selenium and lycopene. *J Biomed Science*. 2014; 21: 19-26.

28. Benning C, Kyprianou N. Quinazoline-derived 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via an 1-adrenoceptor-independent action. *Cancer Res* 2002 Jan 15; 62(2): 597-602.

29. Anglin IE, Glassman DT, Kyprianou N. Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. *Prostate Cancer and Prostatic Dis*. 2002; 5: 88-95

30. Batty M, Pugh R, Rathinam I, Simmonds J, Walker E, Forbes A. The role of alfa 1 adrenoceptor antagonists in the treatment of prostate and others cancers. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (8): 1339-1364. Kyprianou N. Doxazosin and Terazosin Suppress Prostate Growth by Inducing Apoptosis: Clinical Significance. *The J Urol* 2003; 169(4): 1520-1525.

31. Elberry A, Mufti Sh, Al-Maghrabi J, Abdel-Sattar E, Ashour O, Ghareib S, Mosli H. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*) on experimentally-induced atypical prostatic hyperplasia in rats. *J Inflamm* 2011; 8: 40-45

Tabla1. Efectos del D-004 y Saw Palmetto sobre el número de células en apoptosis en el modelo de HP inducida por testosterona en ratas

Tratamientos	Células en apoptosis (n)	Células no marcadas
Control negativo	37	7068+
Control positivo	23	7460
D-004 (200 mg/kg)	77	7719++
D-004 (400 mg/kg)	101	7461++
D-004 (800 mg/kg)	127	7568++
Saw Palmetto (400 mg/kg)	94	7220++

p<0.05, ++p<0.0001. Comparaciones vs control positivo. Test de Chi cuadrado.

Tabla2. Efectos del D-004 y Saw Palmetto sobre el índice apoptótico en el modelo de HP inducida por testosterona en ratas

Tratamientos	IA % (X ± DE)
Control negativo	0.53 ± 0.17+
Control positivo	0.31 ± 0.11
D-004 (200 mg/kg)	0.99 ± 0.14++
D-004 (400 mg/kg)	1.34 ± 0.29++
D-004 (800 mg/kg)	1.65 ± 0.12++
Saw Palmetto (400 mg/kg)	1.30 ± 0.22++

X: media, DE: Desviación estándar, IA: Índice apoptótico, p< 0.001, ++ p< 0.0001 (Test de U Mann Whitney) Comparación vs control positivo

Tabla3. Efectos del D-004, Saw Palmetto y Tamsulosin sobre el número de células en apoptosis en el modelo de HP inducida por fenilefrina en ratas

Tratamientos	Células en apoptosis (n)	Células no marcadas
Control negativo	37	7068
Control positivo	24	7312
D-004 (400 mg/kg)	107	7378+
Saw Palmetto (400 mg/kg)	83	7465+
Tamsulosin (0.4 mg/kg)	39	7257

p<0.0001. Comparaciones vs control positivo. Test de Chi cuadrado.

Tabla 4. Efectos del D-004, Saw Palmetto y Tamsulosin sobre el índice apoptótico en el modelo de HP inducida por fenilefrina en ratas

Tratamientos	IA % (X ± DE)
Control negativo	0.53 ± 0.17++
Control positivo	0.33 ± 0.11
D-004 (400 mg/kg)	1.45 ± 0.21+++
Saw Palmetto (400 mg/kg)	1.11 ± 0.16+++
Tamsulosin (0.4 mg/kg)	0.55 ± 0.25+

**p< 0.01, ++p< 0.001, +++ p< 0.0001 (Test de U Mann Whitney)
Comparación vs control positive**

SUMMARY

Objective: To evaluate the effect of D-004, Saw Palmetto (SP) and Tamsulosin, on apoptosis, in prostatic hyperplasia induced by testosterone and phenylephrine in rats.

Material and methods: Two experimental series were studied for induction of prostatic hyperplasia (PH). In serie1 PH was induced by testosterone. Rats were distributed in 6 groups: negative and positive controls, 3 groups treated with D004 at doses of 200, 400 and 800 mg/kg, and other of SP (400 mg/kg). In serie 2 phenylephrine was administered.

Five groups were studied: negative and positive control, D-004 and SP (400mg/kg) and Tamsulosin (0.4mg/kg). Samples of ventral prostate were processed for immunohistochemical study of apoptosis. The apoptotic index (AI) was analyzed as the primary efficacy variable.

Results: In positive controls of series 1 and 2, a significant reduction of AI was observed vs negative controls. In serie1, samples of treated animals with D-004, and SP showed significant elevation of AI, vs positive control, as in serie 2, D-004 and SP treated groups showed significant elevation of AI vs positive control, as in Tamsulosin group.

Conclusions: D-004 prevented the reduction of induced apoptosis by T and FE in rats, as same of SP, and may possible to relate at first, its effect on HP with apoptosis induction effect. Tamsulosin showed a lesser effect.

Keywords: prostatic hyperplasia, D-004, Saw Palmetto, Tamsulosin, apoptosis.

Dirección para la correspondencia: Miriam Noa Puig

Correo electrónico: mnpuig@infomed.sld.cu