

Carcinogénesis del D-003 en ratas Sprague Dawley. Reporte de un año.

Rafael Gámez Menéndez, Rosa Más Ferreiro, Miriam Noa Puig, Eldis Felipe León, Haydée García Cambián, Eddy Goicochea, Ariel Gómez Pie, María D. Rodríguez y Jorge González.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de noviembre de 2004. Aceptado: 1ro de abril de 2005.

Palabras clave: carcinogénesis, D-003, hipolipemiente, antiagregante plaquetario.
Key words: carcinogenicity, D-003, cholesterol lowering drugs, antiplatelet effects.

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios de muy alto peso molecular purificada de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con efecto hipolipemiente y antiagregante plaquetario. Estudios previos de toxicología experimental han mostrado ausencia de toxicidad asociada al D-003 administrado como dosis únicas o repetidas durante corto o largo plazo, así como de efectos genotóxicos o de afectación sobre la fertilidad y la reproducción. Teniendo en cuenta sus indicaciones potenciales y que los lineamientos para la aprobación de nuevos medicamentos requieren la evaluación del potencial carcinogénico, los resultados que se discuten conforman un informe preliminar del estudio carcinogénico del D-003 en el cual se incluyen tres grupos tratados con D-003 (50, 500 y 1 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) y un control tratado solo con el vehículo empleado (goma acacia-agua). Se incluyen en él los resultados relativos a ganancia en peso, observaciones clínicas, mortalidad y la aparición de tumores detectada en dicho período. Los resultados muestran que el D-003 administrado por vía oral durante un año a ratas SD no resulta tóxico, ya que no afecta ninguno de los indicadores de seguridad evaluados, incluida la aparición de tumores, en el período considerado.

ABSTRACT. D-003 is a mixture of very high molecular weight aliphatic acids purified from sugar cane (*Saccharum officinarum*) with lipid-lowering and antiplatelet effects. Previous studies of experimental toxicology have shown no D-003-related toxicity when administered for short or long-term periods, as well as lack of genotoxicity or disturbances on fertility and reproduction. Potential long term carcinogenicity needs to be evaluated considering its putative indications and guidelines for new drug approval. Hence, the present partial report shows the results of the first year of an on-going study researching the long-term oral carcinogenicity of D-003 administered to SD rats for 24 months. Animals were randomly distributed into four groups: one control group treated only with acacia gum-water vehicle and other three treated with D-003 (50, 500 and 1 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹). This preliminary report shows the results specifically related to weight gain, clinical daily observations, mortality and frequency of tumours detected after one year of D-003 administration, which represent the first half of the whole treatment period. Taking into account half of the planned study concluded after one year under treatment, the present preliminary report shows the results of weight gain, clinical daily observations, mortality and the frequency of tumours detected in such period. The present results confirm that D-003 orally administered for one year to SD rats is not toxic, since it did not affect any safety indicator assessed, including the tumours occurrence up to such time.

INTRODUCCION

El D003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios de muy elevado peso molecular purificada de la cera de la caña de azúcar.¹ El componente fundamental del D-003 es el ácido octacosanoico, seguido de los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico. En dicha mezcla aparecen también los ácidos hexacosanoico, heptacosanoico, nonacosanoico, hentriacontanoico, tritriacontanoico, pentatriacontanoico, y hexacotriacontanoico, como componentes minoritarios.

Farmacología experimental

Los estudios de farmacología experimental han mostrado que el tratamiento oral de conejos F-1 con D-003 (5 a 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) durante 30 d redujo la concentración sérica de colesterol total (CT) y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), efectos que resultaron reversibles y dependientes de las dosis.² Además, el D-003 incrementó significativamente la concentración del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), efecto que también resultó dosis dependiente.² Un estudio ulterior que comparó los efectos del D-003 y el policosanol administrados a 5 mg/kg en este modelo demostró que los efectos del D-003 se obtuvieron en menor tiempo y fueronde mayor magnitud que los inducidos por el policosanol.³

La reducción del colesterol inducida por el D-003 se asocia a una inhibición de la síntesis de colesterol

producida como consecuencia de un efecto modulador sobre la actividad de la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A (HMG-CoA) reductasa.^{4,5} Experiencias realizadas en un modelo de hipercolesterolemia endógena mostraron que el D-003 previene el incremento de la concentración sérica de LDL-C inducido por la reducción de los receptores hepáticos a las LDL que esta dieta causa, demostrándose que el D-003 aumenta la velocidad catabólica de esta lipoproteína.⁶

La administración oral de D003 (0.5, 5, 50 y 100 mg/kg) inhibió la susceptibilidad de las lipoproteínas plasmáticas de ratas a la peroxidación lipídica (PL) inducida por la oxidación con Cu²⁺.⁷ Similares resultados se obtuvieron sobre la generación de sustancias reaccionantes al ácido tiobarbitúrico (SRATB) en homogenados de hígado activos de ratas en las que se ha inducido peroxidación lipídica por CCl₄. El efecto inhibitorio máximo fue mayor que un 80 % y se alcanzó con 100 mg/kg.^{7,8}

Por otra parte, el D-003 ha mostrado efectos antiagregantes plaquetarios en estudios experimentales⁹⁻¹³ y clínicos.^{14,15} Así, la administración oral de dosis únicas de D-003 (25, 50 y 200 mg/kg) a ratas inhibió la agregación plaquetaria (AP) por colágeno de modo significativo y dependiente de las dosis, mientras que solo dosis $\geq 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ inhibieron significativamente la AP inducida por ADP, apreciándose en este caso, solo una modesta dependencia de la dosis.^{10,11} La administración oral de dosis repetidas durante 3 d mostró resultados consistentes con los obtenidos con dosis únicas.^{9,10}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se compararon los efectos del D-003 y del policosanol sobre la AP y la PL inducida por esta en cobayos.¹⁰ El policosanol y el D-003 (25 mg/kg) administrados por vía oral durante 10 d inhibieron significativamente la AP inducida *ex vivo* por colágeno en PRP de cobayos. Aunque el nivel de significación y la inhibición logrados con D-003 fueron mayores que con el policosanol, la ausencia de diferencias significativas entre grupos limita la relevancia de esta apreciación y conmina a realizar nuevos estudios comparativos. La PL inducida por la AP resultó inhibida de modo similar por ambas drogas.⁹

Dosis orales únicas y repetidas de D-003 (25 y 200 mg/kg) redujeron significativamente las concentraciones de tromboxano B₂ (TxB₂) y malondialdehído (MDA) causados

por la adición de colágeno a la sangre, mientras que sólo en el esquema de dosis orales repetidas (25 y 200 mg/kg) administradas durante 10 d incrementaron la concentración plasmática de 6-cetoPgf1a generados por la adición de colágeno. En consecuencia, dosis orales únicas y repetidas redujeron significativamente la relación TxB₂/6-cetoPgf1a en el plasma de los animales tratados respecto a la de los controles.^{11,12} Similares resultados fueron obtenidos en un estudio realizado en voluntarios sanos tratados durante 14 d con D-003 (20 mg/d).^{14,15}

La administración oral de dosis únicas y repetidas de D-003 (50 a 200 mg/kg) aumentó el tiempo de sangrado (TS),⁹⁻¹² mientras que dosis desde 25 mg/kg inhibieron la trombosis venosa inducida en ratas.¹⁰

Por otra parte, dosis orales repetidas de D-003 (50 y 200 mg/kg) administradas durante 90 d a ratas SD ovariectomizadas (ovx) previnieron la pérdida ósea trabecular producida por la ovariectomía e inhibieron la resorción ósea sin modificar la ganancia en peso.¹⁶

Estudios de toxicología experimental

Los estudios de la toxicidad oral por dosis únicas y repetidas del D-003 en roedores, incluyendo los estudios de toxicología subcrónica (90 d) y crónica (6 meses) en ratas,^{17,18} no han mostrado evidencias de toxicidad pese a haberse evaluado dosis de hasta 2 000 y 5 000 mg/kg (estudios agudos) y de 1 250 mg/kg (dosis repetidas). Similares resultados fueron obtenidos en un estudio de toxicidad crónica en perros,¹⁹ el cual reveló que dosis de 200 y 400 mg/kg administradas durante 9 meses a perros Beagle no inducen toxicidad atribuible al tratamiento. En los estudios crónicos se pusieron de manifiesto, sin embargo, los efectos farmacológicos del D-003 sobre la AP (ratas y perros) y el perfil lipídico (perros).^{18,19}

Por otra parte, los estudios de genotoxicidad indican que el D-003 no muestra potencial mutagénico en los ensayos de Ames, micronúcleos, morfología del espermatozoide, así como en estudios complementarios como el ensayo cometa.²⁰⁻²² Los estudios de la toxicología de la reproducción y la fertilidad desarrollados con dosis de hasta 1 000 mg/kg, dosis máxima para estos estudios, también han mostrado resultados negativos.²³

Teniendo en cuenta que los hallazgos de farmacología experimental y de estudios clínicos Fase I y II muestran un potencial uso del D-003 en el manejo de enfermedades aterotrombóticas, lo que implicaría su posible empleo en tratamientos a largo plazo, y que los lineamientos para el registro de nuevos medicamentos conminan a realizar estudios de su potencial carcinogénico a largo término, se decidió realizar el estudio carcinogénico de este producto en ratas Sprague Dawley (SD), una de las especies utilizadas en este tipo de estudios,²⁴ y de la cual, se poseen datos históricos de comportamiento.²⁵⁻²⁸

Teniendo en cuenta que la mitad del estudio de carcinogenicidad inducida a largo plazo (24 meses) por la administración oral prolongada de D-003 a ratas SD concluye al año de administración, el presente informe parcial muestra los resultados a ese intervalo de tiempo, como un nuevo aporte al conocimiento de la toxicidad por exposición repetida y prolongada a esta sustancia, constituyendo el primer reporte toxicológico de los efectos de la administración crónica oral de D-003 durante un año en cualquier especie.

MATERIALES Y METODOS Animales

Se utilizaron ratas SD de ambos sexos, de 7 semanas, provenientes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Ciudad de La Habana) entre 130 y 170 g de peso al inicio del experimento, las cuales, se colocaron en cajas de poliplast para roedores con tapas de acero inoxidable (tres ratas/jaula). Los animales se mantuvieron en cuarentena durante 7 d, para su adaptación a las condiciones experimentales controladas [temperatura (25 ± 2) °C, (60 ± 10) % de humedad relativa y ciclos de luz y oscuridad de 12 h], las que se mantuvieron durante el estudio. Posteriormente, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (60 animales/grupo por sexo).

Los animales tuvieron acceso libre al agua. Como alimento se suministró pienso convencional para roedores proveniente del CENPALAB, el cual fue administrado en función del peso corporal promedio (10 % del peso) durante las primeras 13 semanas. el consumo de alimentos en esa etapa se controló dos veces por semana. A partir de la semana 14,

estas cantidades fueron restringidas y se suministró a los animales el 80 % de la cantidad que se le debía asignar de acuerdo con el peso y lo recomendado para estos estudios.^{27,28} Durante esta etapa el consumo de alimentos se controló mensualmente hasta el final del estudio.

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Centro de Productos Naturales (CPN).

Administración y dosificación

El D-003 utilizado en la experiencia fue obtenido en las Plantas de Producción de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas y corroborada sus especificaciones de calidad por el Departamento de Química del CPN.

Para su administración, el D-003 se suspendió en un vehículo goma acacia-agua (10 mg/mL). La cantidad de producto a emplear para la preparación de las suspensiones fue calculada considerando el valor medio del peso corporal de cada grupo y sexo, semanalmente durante las primeras 13 semanas y mensualmente el resto del período experimental. Las suspensiones se prepararon semanalmente, tomando en consideración los resultados de un estudio de su estabilidad y les fueron comprobadas sus concentraciones mediante análisis cromatográfico una vez al mes por el departamento de Química Analítica del CPN. El D-003 se administró por vía oral, ya que esta es la ruta propuesta para su uso terapéutico. Las suspensiones se administraron mediante entubación gástrica (hasta 10 mL/kg), una vez al día (entre 8:30 y 10:30 a.m.) (5 d/semana).

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (60 animales/sexo por grupo): uno control tratado solo con el vehículo goma acacia-agua y tres con D-003 (50, 500 y 1 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹). La dosis máxima se seleccionó teniendo en cuenta la máxima recomendada para estos estudios cuando no hay evidencias previas de toxicidad de la sustancia bajo ensayo.²⁹⁻³⁰ Además, esta dosis es 300 veces superior que la efectiva mínima en roedores y lagomorfos (5 mg/kg) y aproximadamente, 5 100 veces superior a la dosis máxima propuesta hasta hoy para su uso en humanos (20 mg/d; 0,29 mg/kg). Los resulta-

dos reportados en este informe corresponden a los obtenidos tras la administración del tratamiento durante los doce primeros meses.

Exámenes realizados

Se realizó la necropsia a todos los animales que murieron o se sacrificaron a través del estudio y se evaluó *in situ* la presencia de lesiones macroscópicas en órganos y cavidades. Se tomaron muestras de los primeros y de las lesiones observadas, las cuales fueron además, medidas y descritas.

Medición de indicadores físicos

Peso corporal. Se realizó el control del peso corporal al inicio (peso del animal el día previo al comienzo del tratamiento activo), semanalmente durante las primeras 13 semanas y mensualmente a partir de la semana 14 hasta el final de la experiencia.

Consumo de alimentos. Se controló el consumo de alimentos dos veces a la semana durante las primeras 13 semanas y una vez al mes a partir de la 14.

Observaciones diarias. Los animales se observaron diariamente en tres momentos: en el horario de la mañana (8:30 a 11:00 a.m.), período en que se realizó una inspección minuciosa de cada animal; entre las 2:00 y 3:00 p.m. y las 5:00 y 6:00 p.m. en que se enfatizó en el seguimiento de la condición vital de cada animal. Estas observaciones perseguían detectar cualquier signo clínico de toxicidad, así como la posible aparición temprana de tumores palpables, animales moribundos y(o) mortalidad.

Análisis histopatológico

El protocolo de estudio estableció que la eutanasia se practicara a todos los animales que manifestaran deterioro de salud notable. Para su sacrificio, fueron anestesiados en atmósfera de éter y posteriormente, desangrados.

En este reporte, se incluyen las observaciones macroscópicas de los animales autopsiados durante el primer año de tratamiento y el diagnóstico presuntivo por su palpación durante las observaciones diarias. Por tal razón, de modo preliminar se utilizó la denominación de tumor para los hallazgos macroscópicos y la de tumor palpable para los animales vivos con estas manifestaciones. El momento de detección de masas o tumores evidentes al tacto fue la fecha consignada para la apa-

rición del tumor. En todos los casos, el resultado histopatológico es el que brindó el criterio definitivo de clasificación.

Evidencia temprana de carcinogenicidad asociada al D-003

En este reporte, se considera como evidencia temprana de carcinogenicidad relacionada con el tratamiento el incremento significativo de la frecuencia de mortalidad de tratados frente a controles, y(o) el incremento significativo de la frecuencia de tumores totales (por sexo o en total) de tratados frente a controles, tal como establecen los lineamientos para este tipo de estudio.²⁴

Análisis estadístico

De acuerdo con lo establecido, la esencia de este tipo de estudios es el análisis de supervivencia y de aparición de tumores. El análisis de supervivencia del estudio total se hará según el modelo de regresión de Cox y, de resultar positivo, se analizará si el tratamiento influye sobre la frecuencia de lesiones neoplásicas mediante el mismo estadígrafo. De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el presente, no resulta posible aplicar este análisis en el presente informe.

El análisis de las lesiones tomará en cuenta la incidencia total de animales con tumores, la incidencia total de tumores y el período de latencia hasta la aparición de tumores (evaluado por el análisis de supervivencia).

Las variables categóricas (frecuencia de muerte, aparición de signos y lesiones) se analizarán mediante al prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Las pruebas utilizadas serán de doble cola.

Un $\alpha = 0,05$ será asumido *a priori* para la significación estadística en todos los casos. Los resultados se procesarán de acuerdo con los paquetes de programas Statistica para Windows y SAS (para el análisis de supervivencia).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de la mortalidad

Durante el primer año del estudio ocurrieron cinco muertes: cuatro animales macho y una hembra. La eutanasia solo se practicó en dos casos en que los animales tenían lesiones tumorales evidentes al tacto y signos tales como pérdida de peso, reducción del consumo de alimentos y deterioro general (Tabla 1).

Tabla 1. Mortalidad ocurrida durante el primer año de estudio.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
Control	0	3/60 (5,0 %)	0/60 (0,0 %)	3/120 (2,5 %)
	50	0/60 (0,0 %)	0/60 (0,0 %)	0/120 (0,0 %)
D-003	500	1/60 (3,3 %)	0/60 (0,0 %)	1/120 (0,8 %)
	1 500	0/60 (0,0 %)	1/60 (1,7 %)	1/120 (0,8 %)

De las cuatro muertes ocurridas en los machos, tres ocurrieron en animales controles y la otra en un animal tratado con 500 mg/kg, mientras que la única muerte ocurrida en las hembras correspondió a una hembra tratada con la mayor dosis (1500 mg/kg).

Las muertes ocurrieron en animales que presentaban tumores en una etapa muy próxima al año de haberse iniciado el estudio, tiempo en el cual comienzan a manifestarse espontáneamente la aparición de tumores benignos y malignos en esta especie y línea.^{25-27,31}

El análisis estadístico de mortalidad fue no significativo de acuerdo con la prueba de las Proporciones Exactas de Fisher. Debido a la baja frecuencia de muertes y tumores no pudo aplicarse el Modelo de Regresión de Cox. Los resultados muestran una frecuencia de mortalidad muy baja (< 3 %) para un estudio crónico, lo que es una evidencia indirecta de que las condiciones de desarrollo del estudio han sido adecuadas. Además, corroboran la baja toxicidad del D-003 y muestran, que aún después de un largo plazo de tratamiento, no se producen muertes que sean atribuibles al tratamiento. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios toxi-

cológicos previos en roedores y no roedores.¹⁷⁻¹⁹

Signos de toxicidad

Las observaciones diarias no revelaron signos de toxicidad, ya que los hallazgos clínicos registrados durante el estudio aparecieron en algunos animales de ambos sexos y de todos los grupos experimentales, y se relacionaron con eventos aislados de lesiones por mordeduras y con los tumores detectados en los animales que murieron o se sacrificaron antes del año, así como en algunos animales que aún permanecen en estudio.

Peso corporal y consumo de alimento

Se evidenció un mayor incremento en los pesos corporales (ganancia en peso) en los machos que en las hembras (Tabla 2 y figuras 1 y 2), lo cual concuerda con lo reportado por otros autores y en estudios previos del propio grupo de trabajo de los autores.²⁵⁻²⁷ La comparación estadística de los pesos corporales no mostró diferencias significativas entre animales tratados y controles en ninguno de los sexos.

Consistente con lo anteriormente referido sobre la ganancia en peso, el consumo de alimentos en

ambos sexos, fue similar en los animales tratados y en los controles, si bien el consumo en machos fue mayor que en las hembras.

Análisis anatómo-patológico

El número de animales con lesiones tumorales que fueron determinantes para su vida al año de tratamiento se puede clasificar como bajo (5/480; 1,04 %), tres de los cuales fueron controles, frecuencia menor que la observada en estudios precedentes, realizados también con ratas SD del mismo suministrador (CENPALAB) (Tabla 3).^{25,27}

Los principales hallazgos macroscópicos se encontraron en animales machos controles (3). Se detectaron varias lesiones de importancia histopatológica en un mismo animal. Así, en dos de ellos, se observó esplenomegalia. Uno de estos controles presentó también un tumor en la región lateral de la cara y el otro, dos tumores de piel y un gran absceso adherido a un riñón. En el tercer animal control, se observaron tres tumoraciones en los ganglios linfáticos y un tumor en tejido subcutáneo.

Los tumores detectados en los animales tratados fueron uno en la mandíbula de un macho (500 mg/kg) y un adenoma de hipófisis en una hembra (1 500 mg/kg).

Los resultados histopatológicos permitieron determinar la presencia de lesiones tumorales malignas en tres animales, mientras que dos de ellos presentaron lesiones neoplásicas benignas (Tabla 3). Los tumores malignos se presentaron en tres machos: dos controles y uno tratado con 500 mg/kg.

En dos de los animales con tumores malignos, estos se localizaron en la región lateral de la cara, lo que provocó afectaciones en el consumo de alimentos de ambos. La rata control con un tumor de tal localización presentaba un heman-giosarcoma, tumoración en la región lateral izquierda de la cara y que al estudio microscópico se observó como una tumoración del tejido celular subcutáneo, de origen vascular, constituida por una masa sólida con un patrón vascular con células endoteliales pleomórficas, formando canales que contenían sangre. Este tipo de tumor maligno puede ocurrir en vísceras y tejido celular subcutáneo de ratas.³²

Por su parte, el tumor maligno encontrado en el macho tratado con 500 mg/kg que a la observación macroscópica presentaba una

Tabla 2. Efectos del tratamiento crónico (1 año) con D-003 sobre el peso corporal de ratas SD.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	
		Inicial	Final
Control	0	151,8 ± 11,5	534,9 ± 49,1
	50	151,9 ± 11,6	516,3 ± 51,2
D-003	500	151,9 ± 11,4	537,9 ± 46,3
	1 500	151,8 ± 11,2	529,6 ± 43,7
Hembras			
Control	0	138,8 ± 8,9	330,7 ± 30,3
	50	138,8 ± 8,8	326,6 ± 35,9
D-003	500	138,8 ± 8,7	327,1 ± 30,5
	1 500	138,9 ± 8,8	326,8 ± 31,8

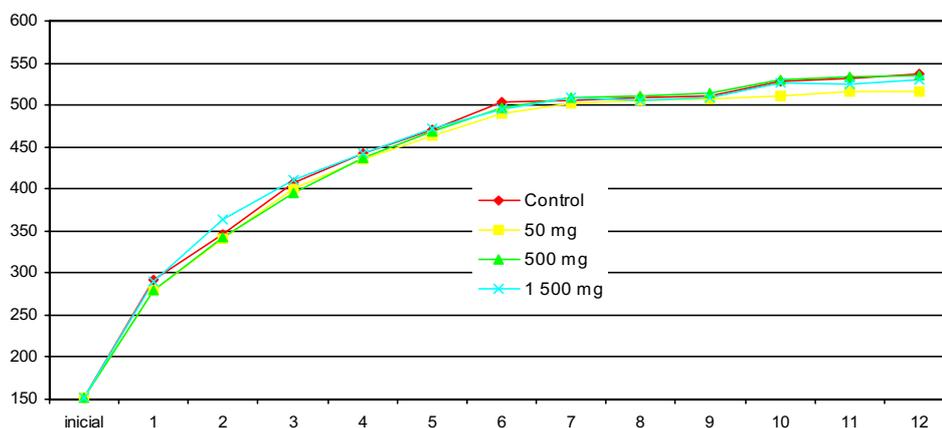


Fig. 1. Evolución del peso corporal durante el primer año de estudio. Ratas machos.

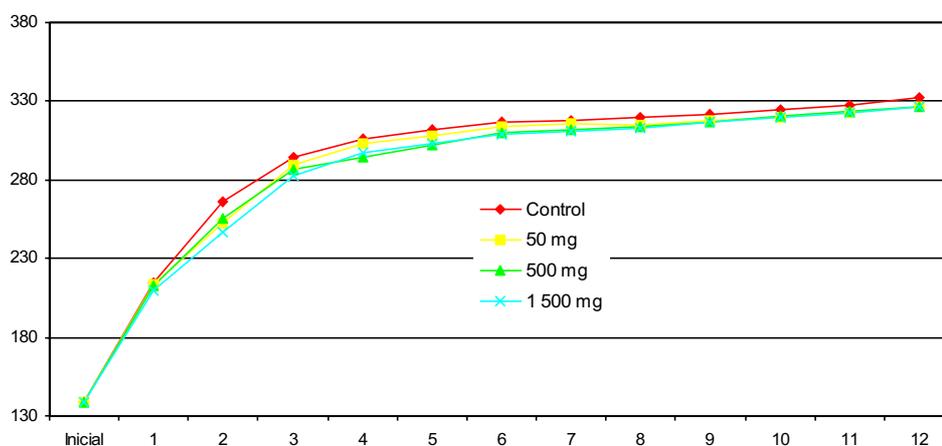


Fig. 2. Evolución del peso corporal durante el primer año de estudio. Ratas hembras.

Tabla 3. Hallazgos macroscópicos y microscópicos en los animales muertos en el primer año de estudio.

Grupo	Sexo	Tipo de muerte	Hallazgos	
			Macroscópicos	Microscópicos
Control	M	Espontánea	Tumor en tejido subcutáneo. Infiltrado tumoral hemorrágico en intestino y tumores (3) en ganglios linfáticos en la región del cuello.	Linfoma linfocítico con infiltración renal, hígado, páncreas, pulmones, músculo y bazo.
Control	M	Espontánea	Tumor en la región lateral de la cara, al corte se observa una masa carnosa blanquecina con áreas rojizas, dura al tacto. Esplenomegalia.	Hemangiosarcoma (TCS).
Control	M	Eutanasia	Tumores (2) en la piel: al corte ambos presentaban forma de lobulillos de color gris y consistencia dura. Gran absceso esférico en cavidad abdominal, adherido al riñón, de bordes carnosos e internamente irregulares con contenido seropurulento. Esplenomegalia.	Tumor benigno de folículos pilosos (tipo tricofoliculoma). Absceso en cavidad abdominal.
500	M	Eutanasia	Formación pétreo en lado derecho de la mandíbula, que afectaba las encías.	Osteosarcoma de maxilar.
1500	H	Espontánea	Secreciones nasales y bucales sanguinolentas, pulmones hemorrágicos. Tumor grande en la hipófisis.	Adenoma hemorrágico de hipófisis.

tumoración en el maxilar inferior, el estudio microscópico reveló que se trataba de un osteosarcoma en el maxilar, con marcada formación de hueso y matriz osteoide. El estroma pleomórfico mostró osteoblastos y células fusiformes como se describe en este tipo de tumor. Litinov y Soloviev,³³ plantearon que el osteosarcoma es un

tumor que raramente aparece de manera espontánea en ratas, aunque Greaves y Faccini reportan que lo han observado ocasionalmente.³⁴ En los resultados históricos del grupo de trabajo de los autores se ha observado también de manera ocasional.^{25,26}

El otro animal que presentó tumores malignos, murió con el abdomen

aumentado de tamaño. Al hacer la necropsia, se observó que presentaba varias tumoraciones abdominales, además de las que presentaba en cuello con una evolución de unos 20 d desde su detección hasta el momento de la muerte. En el estudio microscópico se diagnosticó un linfoma linfocítico. Este tipo de tumor se puede observar de manera

Tabla 4. Total de animales vivos con lesiones tumorales al término del primer año de estudio.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
Control	0	1/60 (1,7 %)	1/60 (1,7 %)	2/120 (1,7 %)
	50	1/60 (1,7 %)	1/60 (1,7 %)	2/120 (1,7 %)
D-003	500	0/60 (0,0 %)	1/60 (1,7 %)	1/120 (0,8 %)
	1 500	0/60 (0,0 %)	1/60 (1,7 %)	1/120 (0,8 %)

espontánea en ratas. Las tumoraciones observadas estaban constituidas por linfocitos pequeños, redondos, bien diferenciados y también, se observó infiltración linfoide en diversos órganos.

Las dos restantes lesiones tumorales detectadas en el estudio hasta el presente han sido benignas. Así, en la rata hembra tratada con la dosis máxima, se observó una tumoración hemorrágica de la hipófisis (adenoma). Este tipo de tumor es común en ratas, aparece de forma espontánea. Consiste fundamentalmente en proliferación celular de las células de la adenohipófisis y muestra compresión y desplazamiento del tejido normal que lo circunda. Este adenoma era muy vascular y contenía muchos espacios llenos de sangre, de ahí, su clasificación como adenoma hemorrágico de hipófisis.

El otro caso, correspondió a un macho control, al que se le practicó eutanasia y que presentaba dos tumoraciones de piel en la región dorsal izquierda, las cuales se caracterizaron por una gran formación de folículos pilosos de manera distorsionada, con masas focales de células y en algunas zonas con acúmulos de queratina, así como presencia de múltiples quistes con material de folículos pilosos en su interior siendo diagnosticados como tumor benigno de folículos pilosos (tipo tricofolículo). A su vez, esta rata mostró un gran absceso en la cavidad abdominal. El peritoneo responde al daño de manera similar al mesotelio del pericardio y pleural.³² Una lesión mecánica del tracto gastrointestinal o la inflamación de algún órgano abdominal puede dar lugar a una inflamación en la cavidad abdominal que pudiera llegar a dar origen a un absceso. No obstante, no se pudo detectar el punto de partida que originó la formación de dicho absceso.

Al culminar el año de tratamiento, la frecuencia de lesiones tumorales presentes en animales que aún

continuaban en el estudio resultó baja y consistente con esta especie y línea, de acuerdo con los resultados de otros autores y de los propios reportes históricos (Tabla 4).^{25-27,31} Se detectaron lesiones de tipo tumoral en otros seis animales: cuatro hembras y dos machos que continuaban en la experiencia. En tres de las hembras se observaron lesiones tumorales en mama, las que correspondieron a controles y tratados con 500 y 1 500 mg/kg, respectivamente. Además, en la tratada con 1 500 mg/kg y en otra tratada con 50 mg/kg, se observaron lesiones tumorales en el cuello. Por su parte, los dos machos con tumores fueron un control que presentó un tumor de mama y un tratado con 50 mg/kg que presentó una lesión tumoral en cuello.

CONCLUSIONES

Los resultados correspondientes al primer año de tratamiento oral con D-003 (50 a 1 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) a ratas SD confirman que este producto no resulta tóxico y muestran que hasta ese momento no disminuye el tiempo de aparición de tumores ni aumenta su frecuencia de aparición en ratas SD.

BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A. *et al.* (Laboratorios DALMER S.A), 1997. A mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, PAT CU 35/97.
- Gámez R., Mendoza S., Más R., Mesa R., Castaño G., Marrero D., Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. **Curr. Ther. Res.**, **61**, 8-16, 2000.
- Mendoza S., Gámez R., Noa M., Más R., Castaño G., Mesa R., Mesa M., De Armas M. The effects of D-003 and policosanol on the lipid profile and endothelium cells in normocholesterolemic rabbits: a head to head comparison. **Curr. Ther. Res.**, **62**, 209-220, 2001.
- Menéndez R., Más R., Amor A.M. *et al.* Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Pharmacol. Res.**, **44**, 299-304, 2001.
- Menéndez R., Fernández I., Del Río A., González R.M. *et al.* Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances

LDL processing in cultured human fibroblasts. **Biol. Res.**, **27**, 199-203, 1994.

- Menéndez R., Más R., Pérez J., González R.M. and Jiménez S. Oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids, prevents casein-induced endogenous hypercholesterolemia in rabbits. **Canadian J. of Physiology and Pharmacology**, 2004. (en prensa).
- Menéndez R., Más R., Pérez Y. *et al.* Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, **80**, 13-21, 2002.
- Datos de Archivo. Laboratorio de Bioquímica, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D. *et al.* Antiplatelet and antithrombotic effect of D-003. **Pharmacol. Res.**, **42**, 137-143, 2000.
- Datos de Archivo. Laboratorio de Farmacología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. D-003 a potential anti-thrombotic compound isolated from sugar cane wax with effects on arachidonic acid metabolites. **Prostag. Leuk. Ess. Fatty Acids**, **67**, 19-24, 2002.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models. **Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids**, **68**, 305-10, 2003.
- Arruzazabala M.L., Molina V., Carbajal D., Más R. D-003 and warfarin interaction on the bleeding time and venous thrombosis experimentally induced in rats. *J. Med. Food*, 2003. (In press)
- Castaño G., Menéndez R., Más R., Ledón N., Fernández J.C., Pérez J.L., González R.M., Lescay M. Effects of D-003: A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 193-203, 2003.
- Arruzazabala M., Carbajal D., Más R., Molina V., Castaño G., Gámez R. Effects of D-003, a new compound purified from sugar cane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers: A randomized, double-blind clinical study. **Clinical Drug Invest.**, **23**, 107-118, 2002.
- Noa M., Más R., Mendoza S., Gámez R., Mendoza N. Effects of D-003, a

- mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones of ovariectomized rats. *Drugs Exp. Res.*, 2003. (en prensa)
17. Gámez R., Más R., Noa M. *et al.*, Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. *Toxicol. Lett.*, **118**, 31-41, 2000.
 18. Gámez R., Más R., Noa M. *et al.* Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. *Drug R&D*, **3**, 375-386, 2002.
 19. Gámez R., Más R., Noa M., Menéndez R. *et al.* Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagle dogs. *Drugs under Exp. and Clin. Res.*, 2003. (In press)
 20. Gámez R., González J.E., Rodeiro I. *et al.* *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long chain aliphatic alcohols. *J. Med. Food*, **4**, 85-92, 2001.
 21. Gámez R., Rodeiro I., Fernández I., Acosta P. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: mixture of very long chain aliphatic acids. *Teratog., Carcinog., Mutag.*, **22**, 175-181, 2002.
 22. Gonzalez J., Gámez R., Idania R., García H. Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas SD empleando la electroforesis de células individuales en gel de agarosa (ensayo cometa). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **35**, 125-127, 2004.
 23. Rodríguez M.D., Gámez R., Gonzalez J.E. *et al.* Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, **41**, 89-93, 2003.
 24. IARC Report 1. Basis requirements for long-term assays for carcinogenicity. In IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Suppl. 2, 1980.
 25. Alemán C.L., Más R., Noa M., Rodeiro I., Hernández C., and Capote A. Carcinogenicity of policosanol in Sprague Dawley rats: A 24 months study. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, **14**, 239-249, 1994.
 26. Alemán C.L., Más R., Hernández C., Rodeiro I., Cerejido E., Noa M., Menéndez R., Amor A., Sotolongo V., Fraga V., Capote A. and Jimenez S. A 12 month study of policosanol oral toxicity in Sprague Dawley rats. *Toxicology Letters*, **70**, 77-87, 1994.
 27. Alemán C., Más R., Rodeiro I., Noa M., Hernández C., Menéndez R. and Gámez R. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab. Animals*, **32**, 457-466, 1997.
 28. ICH committee. Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. ICH harmonised tripartite guideline. having reached step 4 of the ICH process at the ICH steering committee meeting on 27 october 1994.
 29. EEC. The Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended. Date of first adoption December 1995. Date of entry into force July 1996.
 30. EEC. Carcinogenic Potential. Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended. Date of first adoption October 1983. Date of entry into force May 1984.
 31. Keenan K.P., Smith P.F., Hertzog P, *et al.* The effects of overfeeding and dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival and early pathology biomarkers of aging. *Toxicol. Pathol.*, **22**, 300-15, 1994.
 32. Altman N.H., Goodman D.G. Neoplastic diseases Cap 13. In: The Laboratory Rat. Vol. 1. Biology and Diseases. Baker H., Lindsey J.R., ed. American College of Laboratory Academic Press, 1979.
 33. Litinov N.N. and Soloviev J.N. Tumours of the bone. In: V.S. Turusov (Ed.) Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Springer-Verlag, New York, Vol. 1, Chap. 10, 821-887, 1973.
 34. Greaves P and Faccini J.M. Rat Histopathology. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1984.

ozoney®

NUEVO OZONIZADOR DOMÉSTICO

OZONEY® está diseñado para para desinfectar pequeños volúmenes de agua para beber, lavar los alimentos que se ingieren crudos, enjuagar la vajilla y los utensilios de cocina, así como para la higiene bucal y otros usos.

OZONEY® puede convertirse en un gran aliado para la salud, ya que permite obtener agua de elevada calidad sin tener que hervir el agua o adquirir agua embotellada, porque al emplearlo se dispone de todas las ventajas que proporciona el ozono, entre las que se encuentra su elevado poder germicida. Su poder desinfectante es mayor que el de todos los agentes de este tipo que se emplean hasta el momento.

OZONEY® es ideal para oficinas, el hogar u otros lugares donde se requieran pequeños volúmenes de agua para consumo humano con elevada calidad.

Las concentraciones de ozono disuelto que se alcanzan con él, aseguran una desinfección total del agua tratada.



Características técnicas
 Alimentación: 110 V-CA +/- 10 %
 Frecuencia: 50 Hz .
 Concentración de ozono en el agua: 0,4 ppm (mínimo).
 Caudal de agua recomendado: 1,5 a 2 L/min .
 Potencia: 10 VA (máximo).
 Dimensiones: (195X285X185) mm .
 Peso: 1,8 kg .



Centro de Investigaciones del Ozono

Calle 230 y 15, No. 1313, Siboney, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfonos: (53-7) 271-9264; 271-2089. Fax: (53-7) 271-0233. E-mail: ozono@infomed.sld.cu <http://www.ozono.cubaweb.cu>