

Carcinogenesis del D-003 en ratones OF1. Reporte de nueve meses.

Rafael Gámez Menéndez,* Rosa Más Ferreiro, Ariadne Gutiérrez Martínez, Gisela Marrero Cofiño, Miriam Noa Puig, Balia Pardo Acosta, Yanier Rodríguez Lías, Yunier Rodríguez Alfonso, Jorge Guerra Sardiña, Haydée García Cambián, Dayisel Curveco Sánchez y Eddy Goicochea Carrero.

Dpto. 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: 30 de noviembre de 2004.

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 elevado 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 a 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 en una segunda especie roedora, se realizó el estudio carcinogénico del D-003 en ratones. El presente trabajo es un reporte preliminar, una vez que el estudio alcanzó el 50 % (9 meses) del tiempo previsto en el protocolo (18 meses), en el cual los animales fueron aleatorizados en cuatro grupos experimentales: uno control tratado solamente con el vehículo empleado en suspender al D-003 (goma acacia-agua) y otros tres tratados con D-003 (50, 500 y 1 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹). Este reporte incluye los resultados de la ganancia en peso corporal, observaciones clínicas diarias, mortalidad y frecuencia de tumores. La mortalidad observada en este análisis fue muy baja (1,25 %). Los resultados muestran ausencia de signos de toxicidad relacionados con el tratamiento, ni incremento de la frecuencia de tumores en los animales tratados con relación a los controles. Se concluye que tras 9 meses de tratamiento, no hay evidencias de toxicidad o carcinogenicidad relacionada con la administración del D-003 a ratones.

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 have shown no drug-related toxicity when D-003 has been administered for short or long-term periods, lack of mutagenic potential or disturbances on fertility and reproduction. Considering the putative indications of D-003, its potential risk of long-term carcinogenicity needs to be evaluated in a second rodent species. Hence, the present work is the interim report of the study of the long-term oral carcinogenicity of D-003 in mice, performed when the study reached the 50 % (9 months) of the intended time (18 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 includes the results of weight gain, clinical daily observations, mortality and frequency of tumours. Mortality rate (1.25 %) has been very low up to this interim check-up. Results show no drug-related toxicity and no differences on tumours rate and onset between treated and control animals. It is concluded that after nine months on treatment, no evidences of D-003 related toxicity or carcinogenicity in OF1 mice have been found.

INTRODUCCION

El D003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificada de la cera de caña (*Sacharum officinarum*), cuyo componente fundamental es el ácido octacosanoico, seguido de los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico, mientras otros ácidos de larga cadena se encuentran en menores proporciones.¹

El D-003 administrado por vía oral a conejos (5 a 200 mg/kg) durante 30 d redujo significativa y reversiblemente las concentraciones séricas de colesterol total (CT) y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) de modo dosis-dependiente,² e incrementó significativamente las concentraciones del colesterol transportado por las lipoproteínas de elevada densidad (HDL-C).² En este modelo animal, mostró una acción hipolipemiente más efectiva que el policosanol a iguales dosis.³

La reducción del colesterol inducida por el D-003 se asocia a la inhibición de la síntesis de colesterol a través de una modulación de la actividad de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa.^{4,5} Experiencias realizadas en un modelo de hipercolesterolemia (HC) endógena inducida en conejos por una dieta rica libre de grasa, pero rica en carbohidratos y caseína mostraron que el D-003 previno el aumento de las LDL-C inducido por la reducción de los receptores hepáti-

cos a las LDL que esta dieta provoca, ratificándose que inhibe la síntesis de colesterol y mostrándose que aumenta la velocidad catabólica de esta lipoproteína.⁶

Además, se ha demostrado que el D003 (0,5; 5; 50 y 100 mg/kg) administrado por vía oral inhibió la susceptibilidad de las lipoproteínas plasmáticas de ratas (LDL + VLDL) a la peroxidación lipídica (PL) inducida por Cu²⁺ y A 2'2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), protegiendo la porción lipídica de las lipoproteínas y la generación de grupos carbonilos inducidos por la PL causada por Cu²⁺ y AAPH, respectivamente.⁷

El D-003 también ha mostrado efectos antiagregantes plaquetarios en estudios experimentales⁸⁻¹¹ y clínicos.^{12,13} El D-003 (25 y 200 mg/kg) administrado como dosis repetidas durante 10 d redujo significativamente las concentraciones de TxB₂ y malonildialdehído (MDA) causados por la adición de colágeno a la sangre y aumentó las concentración plasmática de 6-cetoPgf1a.^{9,10} Resultados similares a los obtenidos en un estudio realizado en voluntarios sanos tratados durante 14 d con D-003 (20 mg/d).^{12,13}

Por otra parte, se han evidenciado relevantes efectos extravasculares del D-003 en modelos animales, observándose que previene la pérdida ósea trabecular e inhibe la resorción producida por la ovariectomía.¹⁴

Estudios toxicológicos previos no han mostrado toxicidad asociada a la administración de dosis únicas y repetidas de D-003.¹⁵⁻²³ Así, los estudios de la toxicidad oral por dosis únicas de D-003 en roedores y no roedores y de toxicidad por dosis repetidas en roedores,^{15,16} no han mostrado evidencias de toxicidad, aún a dosis de 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 *Beagle*, que incluyó dosis de 200 y 400 mg/kg administradas durante 9 meses.¹⁸ En alguno de estos estudios se evaluaron efectos farmacológicos del D-003 sobre la agregación plaquetaria (AP) en ratas y perros^{16,17} y el perfil lipídico (perros),¹⁷ los cuales descartaron toxicidad atribuible a la exacerbación de los efectos farmacológicos del D-003.¹⁵⁻¹⁷

El D-003 no mostró potencial mutagénico en los ensayos de Ames, micronúcleos y morfología del espermatozoide, así como en

estudios complementarios como el ensayo cometa.¹⁸⁻²⁰ Los estudios de la toxicología de la reproducción y la fertilidad desarrollados en ratas y conejos con dosis de hasta 1 000 mg/kg, dosis máxima para estos estudios, también han mostrado resultados negativos.^{21,22}

Un reporte previo a este estudio mostró que el D-003 administrado durante un año en ratas a dosis de 50, 500 y 1 500 mg/kg, no incrementó ni aceleró la aparición de lesiones tumorales tempranas, ni indujo la mortalidad en ningún sexo a ninguna dosis.²³

Los resultados experimentales y de los ensayos clínicos Fase I y II realizados hasta el presente, sugieren el uso potencial del D-003 en el manejo de enfermedades ateroscleróticas, las cuales por su naturaleza requieren tratamientos a largo plazo.

Por ello, se hace imprescindible evaluar su potencial carcinogénico a largo plazo, para lo cual, se diseñaron dos estudios en roedores. De ellos, ha sido reportado un informe del primer año del tratamiento en ratas, no observándose toxicidad o evidencias de carcinogenicidad asociadas al D-003.²³ Teniendo en cuenta que el ratón es la segunda especie roedora más empleada en este tipo de estudios y de la que se poseen datos históricos, el otro se realiza en esta especie.^{24,25}

Este trabajo resume los datos obtenidos al culminar los primeros 9 meses de tratamiento, del estudio en ratones y constituye el primer reporte toxicológico de la administración crónica del D-003 en esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se emplearon ratones OF1 de ambos sexos, de 4 a 7 semanas, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Ciudad de La Habana) entre 18 y 22 g de peso al inicio del experimento, los cuales se colocaron en cajas de Poliplast para roedores con tapas de acero inoxidable, a razón de tres ratones por jaula en el caso de las hembras, mientras que los machos se mantuvieron en jaulas individuales.

El período de cuarentena fue de 7 d, para su adaptación a las condiciones experimentales controladas: (25 ± 2) °C y (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 (50 animales por grupo y sexo).

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 se controló en esa etapa 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.²⁶⁻²⁹ Durante esa etapa, el consumo de alimentos se controló mensualmente hasta el final del estudio. Los animales tuvieron acceso libre al agua durante toda la experiencia.

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 Productos Naturales (Agrupación No. 3), Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Ciudad de La Habana) y sus especificaciones de calidad fueron corroboradas por el Departamento de Química del CPN.

El D-003 se administró en forma de suspensión empleando como vehículo goma acacia-agua (10 mg/mL). La cantidad de sustancia 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 del estudio de estabilidad y se les comprobaron una vez al mes sus concentraciones mediante análisis cromatográfico 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. Los tratamientos se aplicaron mediante entubación gástrica (hasta 10 mL/kg), una vez al día (5 d/semana).

Se crearon aleatoriamente cuatro grupos experimentales (50 animales/sexo por grupo): tres tratados con D-003 (50, 500 y 1 500 mg/kg por

día) y uno control tratado solo con el vehículo goma acacia-agua. La dosis máxima se seleccionó teniendo en cuenta la máxima recomendada para estos estudios cuando no hay evidencias previas de toxicidad y mutagenicidad de la sustancia en ensayo.^{26,27}

La dosis máxima empleada fue 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).

Exámenes realizados

Peso corporal. Se determinó el peso corporal al inicio (antes de comenzar el tratamiento activo), semanalmente durante las primeras 13 semanas y mensualmente después, hasta el final del estudio.

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

Observaciones diarias. Los animales se observaron diariamente en tres momentos: en el horario de la mañana (8:30 a 11:00 a.m.), momento en que se realizó una inspección minuciosa de cada animal; entre las 2:00 y 3:00 p.m. y entre 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, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos, así como la aparición temprana de tumores palpables, animales moribundos o mortalidad.

Análisis histopatológico

Se realizó la necropsia a todos los animales que murieron o se sacrificaron a través del estudio, evaluando *in situ* la presencia de lesiones macroscópicas en órganos y cavidades. Se tomaron muestras de los órganos y de las lesiones ob-

servadas, las cuales fueron además, medidas y descritas.

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

Este reporte incluye las observaciones macroscópicas de los animales a lo que se realizó la necropsia en los primeros 9 meses de tratamiento y los resultados de las pruebas practicadas a los tumores detectados por palpación en las observaciones diarias. Por ello, se observará la denominación de tumor para los hallazgos microscópicos, mientras que las lesiones detectadas mediante palpación durante el chequeo clínico diario, pero sin confirmación histopatológica se identificaron como "tumores palpables". Las fechas de aparición de los tumores fueron definidas como el momento de detección de los "tumores palpables" o de detección en autopsia, de no haberse detectado previamente. En todos los casos, el resultado histopatológico es el que brindó el criterio definitivo de clasificación.

Evidencia temprana de carcinogenicidad asociada al D-003

Se definió como evidencia temprana de carcinogenicidad relacionada con el tratamiento el incremento significativo de la frecuencia de tumores totales confirmados histopatológicamente, o de los tumores palpables de tratados contra controles, de acuerdo con los lineamientos para este tipo de estudio.²⁸

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 neoplá-

sicas mediante el mismo estadígrafo. De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el presente, no resulta posible aplicar este análisis en el presente informe.

Las variables continuas se analizarán mediante un análisis de varianza (ANOVA), mientras que las categóricas (frecuencia de muerte, aparición de signos y lesiones) mediante la dócima de la Probabilidad Exacta de Fisher. Las pruebas utilizadas serán de doble cola.

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

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de la mortalidad

Durante los 9 meses del estudio ocurrieron cinco muertes: cuatro hembras, un macho. La eutanasia solo se practicó en dos de estos casos en que los animales tenían tumores evidentes al tacto y signos visibles (pérdida de peso, reducción del consumo de alimentos y deterioro general). De los cinco animales muertos en el estudio, tres eran controles; de las cuatro hembras muertas, dos eran controles y dos tratadas (una con 50 mg/kg y la otra con 1 500 mg/kg), mientras que el único macho muerto fue un control (Tabla 1).

El hecho de que la frecuencia de mortalidad total sea muy baja (< 2 %) para un estudio crónico en ratones en el noveno mes de la experiencia, 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 tratamiento a largo plazo, no se producen muertes atribuibles a él. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios toxicológicos previos en roedores y no roedores.^{15-17,23}

Tabla 1. Mortalidad ocurrida durante los 9 meses de estudio.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
Control	0	1/50 (2,0 %)	2/50 (4,0 %)	3/100 (3,0 %)
	50	0/50 (0,0 %)	1/50 (2,0 %)	1/100 (1,0 %)
D-003	500	0/50 (0,0 %)	0/50 (0,0 %)	0/100 (0,0 %)
	1 500	0/50 (0,0 %)	1/50 (2,0 %)	1/100 (1,0 %)

Todas las comparaciones fueron no significativas. Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher.

De los animales que murieron, solo dos controles presentaban tumores, un macho con linfoma linfocítico y una hembra con histiocitoma fibroso, lo que muestra una baja frecuencia de muertes asociadas a tumores. Las lesiones tumorales encontradas se presentan espontáneamente en animales de esta edad, especie y línea, y su baja frecuencia se corresponde con lo referido en otros reportes.²⁹⁻³¹ El hecho que estas lesiones estén descritas como de aparición espontánea para esta especie y que solo se hayan presentado en animales controles, descarta su relación con el tratamiento.

Como se desprende de la observación de los resultados, las diferencias de las frecuencias de mortalidad en tratados y controles no fueron significativas empleando la prueba de las Probabilidades Exactas de Fisher. Debido a la baja frecuencia de muertes y tumores los resultados no pudieron procesarse con el Modelo de Regresión de Cox.

Peso corporal y consumo de alimento

Se evidenció un mayor incremento de peso en los machos que en las hembras, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores³³ y por nuestro grupo en experimentos previos (Tabla 2).^{25,26} Entre los diferentes grupos de tratamiento, el comportamiento de este importante indicador, que aporta información sobre el estado general del animal, fue semejante ya que no se manifestaron diferencias significativas al comparar tratados contra controles.

Consistente con lo referido sobre la ganancia en peso corporal, el consumo de alimentos en ambos sexos, fue similar en los animales tratados y en los controles.

Signos clínicos de toxicidad

Las observaciones diarias no revelaron signos de toxicidad atribuible al tratamiento, ya que los hallazgos clínicos aparecieron en animales de todos los grupos y consistieron fundamentalmente en lesiones por mordeduras.

Sólo en dos animales se observaron "tumores palpables", localizados en ambos casos en el tejido subcutáneo. Uno de ellos, se detectó en una hembra control, a la cual, se le practicó la eutanasia y el estudio ulterior confirmó la presencia de un histiocitoma fibroso maligno del tejido celular subcutáneo, con me-

tástasis pulmonar. El otro tumor se presentó en una hembra tratada con la dosis de 500 mg/kg, fue detectado tras 8 meses de tratamiento y correspondió a un tumor en la región torácica. El animal continúa en estudio, con buen estado clínico general (Tabla 3).

El otro animal con signos clínicos relevantes fue un macho control que en el quinto mes de estudio comenzó a presentar una inflamación abdominal progresiva, a lo cual, se adicionaron finalmente manifestaciones de disnea, cuadro clínico este que motivó se le practicara la eutanasia. La necropsia del animal evidenció la presencia de un tumor abdominal de consistencia friable, no detectado previamente por palpación.

Análisis anatómo-patológico

Se realizaron análisis macro y microscópico a los animales que no llegaron al noveno mes de estudio, ya sea por muertes espontáneas o a los que les fue practicada la eutanasia (Tabla 4).

Los principales hallazgos macroscópicos y microscópicos se encontraron en animales controles (un macho y una hembra), cuya muerte se relacionó con la presencia de tumores que provocaron un cuadro clínico que justificó la realización de la eutanasia.

El ratón macho del grupo control presentó un linfoma linfocítico, el cual consistió en una gran proliferación tumoral de linfocitos pequeños y medianos, con un núcleo oval a redondeado y discreto citoplasma, con moderada infiltración en hígado,

riñón y pulmón. En tal sentido, un análisis realizado con los resultados de 20 estudios de carcinogénesis en ratones realizados entre 1990 y 2002 demostró que los linfomas constituyeron el tipo de tumor más común en esta especie, seguido del adenoma alveolar.³¹

Los linfomas constituyen una importante causa de muerte en ratones, con una incidencia de aparición espontánea que puede resultar elevada.³⁰ Por otra parte, en ratones suizos machos y hembras ha sido reportada una frecuencia de linfomas de un 4 y un 16 %, respectivamente.^{30,33} Además, en la carcinogénesis del policosanol en ratones realizado por el propio grupo de autores, al término del estudio (18 meses) se observó un 25 % de linfomas en ratones machos suizos controles.²⁵

Como ha sido referido, el otro animal con tumor diagnosticado fue una hembra del grupo control que presentó histiocitoma fibroso maligno del tejido celular subcutáneo, con metástasis pulmonar. El tumor presentó numerosas células histiocitarias y fibroblastos con abundantes fibras colágenas. Este tipo de tumor es el que se desarrolla con mayor frecuencia en el tejido celular subcutáneo de algunas líneas de ratones, habiéndose descrito una frecuencia de 0,45 (4/890) en hembras controles de la línea CD-1 por Maita *et al.*,³³ inferior a la observada por Faccini *et al.* en esta línea.³⁴

En los otros tres animales (una hembra control, una tratada con D-003 50 mg/kg y otra con 1 500 mg/kg) las muertes ocurrieron después

Tabla 2. Efectos del tratamiento crónico (9 meses) con D-003 sobre el peso corporal de ratones OF1.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	
		Peso corporal (g)	
		Inicial	Final
Control	0	26,9 ± 3,1	34,8 ± 2,5
	50	27,0 ± 3,1	34,8 ± 2,7
	500	26,9 ± 3,1	35,5 ± 3,1
D-003	1 500	27,0 ± 3,0	34,4 ± 2,9
Hembras			
Control	0	22,9 ± 2,1	30,3 ± 1,9
	50	23,0 ± 2,1	29,7 ± 2,2
	500	23,4 ± 2,1	31,4 ± 1,7
D-003	1 500	23,2 ± 2,2	30,6 ± 2,5

Todas las comparaciones fueron no significativas según ANOVA.

Tabla 3. Total de animales vivos con "tumores palpables" al término de los primeros 9 meses de estudio.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Machos	Hembras	Total
Control	0	0/50 (0,0 %)	0/50 (0,0 %)	0/100 (0,0 %)
D-003	50	0/50 (0,0 %)	0/50 (0,0 %)	0/100 (0,0 %)
	500	0/50 (0,0 %)	1/50 (2,0 %)	1/100 (1,0 %)
	1 500	0/50 (0,0 %)	0/50 (0,0 %)	0/100 (0,0 %)

Tabla 4. Hallazgos macroscópicos en los animales muertos en los primeros nueve meses de estudio.

Grupo	Sexo	Tipo de muerte	Hallazgos		Tiempo ^a (d)
			Macroscópicos	Microscópicos	
Control	M	Eutanasia	Abdomen muy inflamado y severa disnea, lo que motivó la eutanasia. Tumor abdominal de consistencia friable y color blanquecino.	Linfoma linfocítico con infiltración discreta en hígado, riñones y pulmones.	161
Control	H	Espontánea	Congestión en lóbulos hepáticos y en diferentes zonas del intestino, riñones y pulmones.	Hígado, riñones y pulmones con congestión <i>post mortem</i> . Útero con infiltrado inflamatorio.	171
50	H	Espontánea	Útero y pulmones congestivos.	Hígado, riñones, pulmones con congestión <i>post mortem</i> . Útero con infiltrado inflamatorio.	197
1 500	H	Espontánea	Útero ligeramente edematoso y congestivo.	Riñones, pulmones, hígado y ganglio con congestión <i>post mortem</i> . Útero con infiltrado inflamatorio en endometrio y miometrio, así como algunas glándulas quísticas.	205
Control	H	Eutanasia	Animal con mucosas pálidas, pérdida de peso y disminución del consumo de alimentos, lo que motivó la eutanasia. Tumoración en tejido subcutáneo e hígado pálido.	Histiocitoma fibroso maligno de TCS. Metástasis pulmonar. Dilatación de los sinusoides hepáticos. Dilatación de túbulos renales y aplanamiento epitelial.	269

^a Tiempo de vida.

de las 6 pm, momento en el cual, se realiza la última observación diaria de los animales, sin que fueran precedidas de sintomatología clínica que pudiera prever su posible muerte. El análisis macroscópico de estos casos evidenció congestión *post mortem*, no pudiéndose determinar con exactitud la causa de la muerte por estar autolíticos, pero en ningún caso se observó la presencia de lesiones tumorales en órganos o cavidades.

A menudo es difícil determinar la causa de muerte pre-término en estudios de toxicidad crónica, por lo cual, el análisis de los factores que contribuyeron a la muerte, es decir toda la información sobre la sintomatología clínica que presentó el animal valorada en el contexto de los hallazgos histopatológicos desempeñan un papel relevante. No obstante, en ratones existe un conjunto de patologías no tumorales de rápida evolución y difícil diagnóstico como las enfermedades renales (nefropatía y glomerulonefritis),

miocardiopatía, arteritis, entre otras, las cuales inciden en la aparición de animales muertos sin ningún hallazgo clínico precedente, ni manifestaciones histológicas importantes, causa final de muertes sin un diagnóstico conclusivo.³⁵ El número de animales con lesiones tumorales que fueron determinantes para la vida de los animales a los 9 meses de tratamiento, se puede clasificar como bajo (2/400; 0,5 %). En todos los casos, se trató de animales controles, lo que evidencia su manifestación espontánea.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante los primeros 9 meses de tratamiento oral con D-003 (50 a 1 500 mg/kg diariamente) a ratones OF1 confirman que este producto no es tóxico ni muestran evidencias de carcinogenicidad temprana asociada al tratamiento, resultado consistente con el obtenido en el corte parcial realizado en el estudio de carcinogénesis 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 rabbit., **Curr. Ther. Res.**, **61**, 8, 2000.
- Mendoza S., Gámez R., Noa M. *et al.* 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, 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, 2001.
- Menéndez R., Fernández I., del Río A. *et al.* Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances LDL processing in cultured human fibroblasts. **Biol. Res.**, **27**, 199, 1994.
- Menéndez R., Más R., Pérez J. *et al.* Oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids, prevents casein-induced endogenous

- hypercholesterolemia in rabbits. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **80**, 13, 2004.
7. Menéndez R., Más R., Perez 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, 2002.
 8. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D. *et al.* Antiplatelet and antithrombotic effect of D-003. **Pharmacol. Res.**, **42**, 137, 2000.
 9. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. D-003 a potential antithrombotic compound isolated from sugar cane wax with effects on arachidonic acid metabolites. **Prostag. Leuk. Ess. Fatty Acids**, **67**, 19, 2002.
 10. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models. **Pros. Leuk. Ess. Fatty Acids**, **68**, 305, 2003.
 11. 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**, **7**, 260, 2004.
 12. Castaño G., Menéndez R., Más R *et al.* Effects of D-003: A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 193, 2003.
 13. Arruzazabala M. L., Carbajal D., Más R. *et al.* Effects of D-003, a new compound purified from sugar cane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers: A randomized, double-blind clinical study. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 107, 2002.
 14. Noa M., Más R., Mendoza S. *et al.* Effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones of ovariectomized rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **30**, 35, 2004.
 15. Gámez R., Más R., Noa M. *et al.* Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. **Toxicol. Lett.**, **118**, 31, 2000.
 16. 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, 2002.
 17. Gámez R., Más R., Noa M. *et al.* Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular weight acids, in beagle dogs. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **30**, 75, 2004.
 18. 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, 2001.
 19. 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, 2002.
 20. Gonzalez J. E., 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, 2004.
 21. Rodríguez M.D., Gámez R., González 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, 2003.
 22. Rodríguez M.D., González J., Alemán C., Rodeiro I., Arango E., *et al.* Evaluation of the Reproductive and Developmental Toxicity of the D-003, a Mixture of Long-chain Fatty Acids, in Rats and Rabbits. **Food Chem. Toxicol.**, **42**, 1977, 2004.
 23. Gámez R., Más R., Noa M., Felipe E., García H. *et al.* Estudio de la carcinogénesis del D-003 en ratas Sprague Dawley: Informe Parcial a un año de Estudio. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **36**, 205, 2005.
 24. Alemán C., Noa M., Más R., *et al.* Reference database of the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. **Lab. Animals**, **34**, 376, 2000.
 25. Alemán C., Noa M., Cerejido E. *et al.* Carcinogenicity of policosanol in mice: A 18 months study. **Fd. Chem. Toxicol.**, **33**, 573, 1995.
 26. 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.
 27. Carcinogenic Potential. Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended. Date of first adoption October 1983. Date of entry into force, May 1984.
 28. 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.
 29. Tamano S., Hagiwara A., Shibata M. *et al.* Spontaneous tumours in aging (C57BL6N x C3H-HeN) F(B6C3F1) mice. **Toxicol. Pathol.**, **16**, 321, 1988.
 30. Toht B., Della Porta, Shubik P. The occurrence of malignant lymphomas in urethan-treated Swiss mice. **British J. Cancer**, **15**, 322, 1961.
 31. Son W.C. and Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats, **Toxicol. Pathol.**, **32**, 371, 2004.
 32. Andres J.M. Animal Models in Toxicology, The Mouse, Marcel Dekker, Inc., New York, 165-170, 1999.
 33. Maita K., Hirano M., Harada T. *et al.* Mortality. Major cause of moribundity and spontaneous tumors in CD-1 mice. **Toxicol. Pathol.**, **16**, 340, 1988.
 34. Faccini J.M., Abbott D.P., Paulus G.J. J. Mouse Histopathology. A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies, Chapter I. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 1-17, 1990.
 35. Son W.C. Factors contributory to early death of young CD-1 mice in carcinogenicity studies. **Toxicol. Lett.**, **145**, 88, 2003.