

# Toxicología aguda del D-002 en dos especies no roedoras

Celia L. Alemán Santiago, Rosario Mesa Borges, Miriam Noa Puig, Idania Rodeiro Guerra, Roberto Menéndez Soto del Valle y Rafael Gámez Menéndez.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 10 de agosto de 1999. Aceptado: 12 de julio del 2000.

Palabras clave: toxicología aguda, droga antiulcerosa, D-002, conejos, perros.

Key words: acute toxicity, antiulcer drug, rabbits, dogs.

**RESUMEN.** El D-002 es una mezcla natural de alcoholes alifáticos primarios de elevado peso molecular aislada y purificada a partir de la cera de las abejas (*Apis mellifera*). La evaluación farmacológica realizada a este producto evidenció una moderada acción antiinflamatoria y una efectiva actividad antiulcerosa en diferentes modelos experimentales. Durante la evaluación toxicológica preclínica de todo nuevo producto propuesto como medicamento se incluyen evaluaciones de administraciones únicas tanto en especies roedoras como no roedoras. Con este propósito, se realizaron los ensayos de toxicidad del D-002 a dosis única en dos especies no roedoras por vía oral. Las especies seleccionadas fueron conejos Nueva Zelanda y perros Beagle, ambas de amplio empleo en estas evaluaciones. Partiendo de los resultados negativos obtenidos en los estudios agudos realizados previamente en especies roedoras, en los que se evidenció la baja toxicidad de este producto, se administraron dosis de 0, 2, 3 y 5 g/kg. Una vez realizada la administración, los animales fueron observados durante 14 d. El peso corporal fue controlado al inicio y al final del período. Concluido el tiempo establecido, se sacrificaron los animales. Se determinaron los indicadores de bioquímica sanguínea recomendados generalmente en estos estudios. En los conejos: glucosa, ambas transaminasas, acetilcolinesterasa, gamma glutamiltransferasa, hemoglobina y hematocrito. En los perros se evaluaron además, la creatinina, la fosfatasa alcalina y el conteo global y diferencial de leucocitos. Se realizó también, el estudio anatómo-patológico, tanto macro como microscópico en el que se calculó el valor porcentual respecto al peso corporal de los órganos siguientes: hígado, riñones, corazón, bazo, pulmones, timo testículos y en los perros se pesaron además, las glándulas suprarrenales. La toxicidad del D-002 resultó nula, ya que no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los indicadores antes mencionados al realizar las comparaciones entre los grupos tratados y los controles.

**ABSTRACT.** D-002 is a natural mixture of higher aliphatic primary alcohols isolated and purified from beeswax (*Apis mellifera*). Pharmacological evaluation of this product shows moderate antiinflammatory and effective antiulcer activity in different experimental models. During the preclinical evaluation of a new drug acute studies in rodents and non-rodents species usually are included. That is why single toxicity studies in two non-rodents species were done in the present work. New Zealand rabbits and Beagle dogs were selected, both of them usually employed in these evaluations. Taking into account previous negative results from other acute studies performed in rodent species doses of 0, 2, 3 and 5 g/kg were selected. After single oral administration of D-002 animals were observed for 14 d. Body weight was registered at the beginning and at the end of the assay. Animals were put to sleep at the end of the studies. Biochemical determinations were as follows: glucose, both transaminases, acetylcholinesterase, gammaglutaryltransferase hemoglobin and hematocrit were determined in rabbits. Furthermore, creatinine, alkaline phosphatase, and global and differential leukocytes count were also done in dog's study. A complete macro and microscopical anatomopathological study were performed and organ weight percent of the following organs were calculated: liver, kidneys, heart, spleen, lungs, thymus, testis, and suprarenals in dogs. D-002 toxicity was nil because any significant differences were found during the comparisons established between controls and treated groups regarding the above mentioned indicators.

## INTRODUCCION

El D-002 es una mezcla natural de alcoholes alifáticos primarios superiores obtenida de la cera de las abejas (*Apis mellifera*), la cual contiene 1-triacontanol, 1-octacosanol, 1-dotriacontanol, 1-hexacosanol, 1-tetracosanol y 1-tetratriacontanol como componente minoritario. Este producto ha mostrado su acción antiulcerosa en diferentes modelos experimentales y también una cierta actividad antiinflamatoria.<sup>1-3</sup>

Estudios realizados para evaluar la toxicidad aguda oral del D-002 en especies roedoras (ratas y ratones) han demostrado que la toxicidad de este producto por esta vía de administración es prácticamente nula. Así, su DL<sub>50</sub> resultó superior a 5 g/kg. Además, no se encontraron diferencias en las observaciones clínicas, ni tampoco en las determinaciones bioquímicas y hematológicas. No se apreciaron cambios en el peso corporal ni en el porcentaje del peso de los órganos, así como tampoco se encontraron lesiones histopatológicas atribuibles al tratamiento.<sup>4,5</sup>

Sin embargo, durante la evaluación preclínica de un nuevo producto propuesto como medicamento, también se incluyen evaluaciones en especies no roedoras. En este sentido, los conejos y los perros son las especies de laboratorio de empleo más común.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la toxicidad oral del D-002 en conejos Nueva Zelanda y en perros Beagle machos.

**MATERIALES Y METODOS**

**Animales**

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda de ambos sexos y perros Beagle machos que al inicio del estudio pesaban entre 2 y 2,5 kg y de 9 a 14 kg respectivamente. Estos pesos se correspondieron con el estado de adulto joven, es decir, los conejos tenían de 12 a 13 semanas y los perros de 9 a 12 meses. Todos los animales provenían del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba).

Los animales se colocaron en jaulas individuales y se adaptaron durante 15 d a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en (25 ± 2) °C, la humedad entre 55 y 60 % y se aplicaron ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar de acuerdo con la especie preparado en el CENPALAB.

**Administración y dosificación**

El D-002 fue suministrado por Laboratorios Dalmer, La Habana, Cuba. El lote empleado (No. 021093) cumplía los criterios de calidad, lo cual fue verificado mediante cromatografía gaseosa.

En este ensayo se administró el D-002 mediante sonda gástrica a razón de 10 mL/kg.<sup>6</sup> El vehículo empleado en la suspensión fue la goma acacia (10 mg de goma acacia/mL H<sub>2</sub>O) de amplio empleo en casos de productos insolubles en agua.<sup>7</sup>

**Grupos experimentales**

Partiendo de los resultados obtenidos previamente en los estudios agudos realizados en otras especies (los cuales demostraron la baja toxicidad del producto), se eligieron las dosis siguientes: 2, 3 y 5 g/kg.<sup>4,5</sup>

Los animales se distribuyeron de modo aleatorio en grupos formados por cinco animales/sexo en el caso de los conejos. Y en el caso de los perros tres animales/grupo en los tratados y dos animales en el grupo control. Los grupos controles sólo recibieron el vehículo empleado en las suspensiones.

Los productos fueron administrados a los animales previo ayuno de 12 h.

**Exámenes realizados**

Los animales fueron observados cada 30 min a partir de la administración de cada producto, cada 4 h durante las primeras 24 h y luego diariamente durante los 14 d que duró el ensayo. Las observaciones se realizaron en el horario comprendi-

do entre las 8:30 y las 10:30 a.m., lo cual satisface los requisitos de la mayoría de los estudios de toxicidad aguda.<sup>8</sup> Al final, los animales fueron sacrificados.

En este estudio se reportaron: la mortalidad y el estado clínico general del animal, lo cual incluía la detección de posibles afectaciones respiratorias, motoras, cardiovasculares y gastrointestinales, así como otras en el pelo, las mucosas y los ojos y además, el estado de la piel. El peso de los animales se determinó al principio y al final del ensayo.

En el estudio efectuado en conejos se realizaron mediciones de los indicadores de bioquímica sanguínea siguientes: glucosa, creatinina, las transaminasas aspártica y pirúvica (ASAT y ALAT), gamma glutamiltransferasa (GGT), fosfatasas alcalina y ácida. También, fueron determinados la hemoglobina (Hb) y el hematocrito (Hto).

En el estudio de los perros se determinaron además, la alfa amilasa pancreática y el conteo global y diferencial de leucocitos. En este estudio no se determinó la fosfatasa ácida.

Los indicadores hematológicos y bioquímicos utilizados se seleccionaron considerando que permiten obtener información relativa a posibles alteraciones de los principales órganos o sistema diana y son los que habitualmente se emplean con estos propósitos. Por otra parte, la evaluación de las concentraciones de alfa amilasa pancreática permitiría definir toxicidad pancreática e insuficiencia renal (elevadas concentraciones) y toxicidad hepatobiliar (bajas concentraciones).

**Estudio anátomo-patológico**

Al término del período de observación (14 d), se realizó la autopsia de los animales sobrevivientes.

Los órganos fueron pesados en una balanza Sartorius y con posterioridad, se calculó la relación: peso del órgano/peso corporal · 100 para su procesamiento estadístico. El peso corporal referido es el que presentaban el día de su sacrificio.

Se tomaron muestras de todos los órganos y tejidos y se fijaron en formaldehído al 10 % estabilizado.<sup>8</sup> Las secciones de parafina, coloreadas con hematoxilina y eosina fueron examinadas en un microscopio Olympus BH-2.

**Análisis estadístico**

El análisis estadístico de las variables continuas, tales como peso corporal, peso de los órganos y de los

resultados correspondientes a las pruebas bioquímicas y hematológicas se realizaron mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis. La mortalidad y la frecuencia de aparición de las lesiones histológicas (variables categóricas) fueron analizadas mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher.<sup>9</sup>

**RESULTADOS Y DISCUSION**

**Mortalidad y signos tóxicos**

En el estudio realizado en conejos ocurrieron dos muertes: un macho del grupo tratado con 2 g/kg y otro del tratado con 3 g/kg de D-002. Estas muertes ocurrieron inmediatamente después de la entubación y al realizarse la autopsia se pudo apreciar la presencia de suspensión en los pulmones. En el resto de los animales no se apreciaron síntomas tóxicos durante el período de estudio.

En el estudio realizado en perros no ocurrió ninguna muerte.

**Modificaciones del peso corporal**

Las tablas 1 y 2 muestran los pesos registrados de los animales al inicio y al final de cada estudio. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 1.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre el incremento de peso corporal en conejos.

| Dosis (mg/kg)  | Peso corporal (kg) |             |
|----------------|--------------------|-------------|
|                | Inicio             | Final       |
| <b>MACHOS</b>  |                    |             |
| Control        | 2,33 ± 0,16        | 2,57 ± 0,05 |
| 2 000          | 2,38 ± 0,23        | 2,71 ± 0,18 |
| 3 000          | 2,47 ± 0,11        | 2,55 ± 0,17 |
| 5 000          | 2,31 ± 0,16        | 2,56 ± 0,21 |
| <b>HEMBRAS</b> |                    |             |
| Control        | 2,23 ± 0,08        | 2,44 ± 0,07 |
| 2 000          | 2,23 ± 0,10        | 2,39 ± 0,16 |
| 3 000          | 2,22 ± 0,09        | 2,32 ± 0,14 |
| 5 000          | 2,26 ± 0,16        | 2,39 ± 0,18 |

**Modificaciones de indicadores hematológicos y bioquímicos**

No se apreciaron diferencias significativas entre los grupos (Tablas 3-5), lo que indicó que la administración de dosis únicas de D-002 hasta 5 g/kg no produce cambios irreversibles de los indicadores analizados en estas especies. Por otra parte, los valores obtenidos se encuentran

**Tabla 2.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre el incremento de peso corporal en perros.

| Dosis (mg/kg) | Peso corporal (kg) |              |
|---------------|--------------------|--------------|
|               | Inicio             | Final        |
| Control       | 10,89 ± 3,24       | 9,85 ± 1,63  |
| 2 000         | 11,33 ± 2,13       | 11,00 ± 1,80 |
| 3 000         | 11,64 ± 1,40       | 11,60 ± 1,35 |
| 5 000         | 11,33 ± 0,45       | 12,10 ± 1,29 |

dentro de los límites normales para cada una de las especies estudiadas.<sup>10</sup>

**Anatomía patológica**

**Peso de los órganos**

La administración de dosis únicas de D-002 tampoco ocasionó cambios significativos en el peso de los órganos (Tabla 6-7).

**Análisis histopatológico**

En el estudio histopatológico realizado en conejos de ambos sexos (Tabla 8), tan sólo dos animales machos del grupo tratado con 3 g/kg presentaron lesiones histopatológicas. Sin embargo, teniendo en cuenta que estas patologías son comunes en esta línea de animales y que no se obtuvieron diferencias entre grupos ni tendencia con la dosis, se concluye que este hallazgo no representa un efecto tóxico atribuible al tratamiento.<sup>11</sup>

Por otra parte, en los hallazgos histopatológicos encontrados en el estudio realizado en perros (Tabla 9), no se apreciaron diferencias significativas entre grupos y las lesiones encontradas suelen aparecer esporádicamente en estos animales.<sup>12</sup>

**CONCLUSIONES**

Los resultados provenientes de los estudios de dosis únicas orales de D-002 en dos especies no roedoras permiten afirmar que la dosis máxima empleada (5 g/kg) no puede ser considerada como la DL<sub>50</sub> en ninguno de los estudios realizados al no alcanzarse el 50% de mortalidad en ningún caso.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R. y Magraner J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from bees wax. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids*, 59, 235, 1998.
2. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R. Effect of D-002: an active product isolated from beeswax on experimental induced ul-

**Tabla 3.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre los indicadores sanguíneos en conejos Nueva Zelanda.

| MACHOS                 |                  |                        |                 |             |
|------------------------|------------------|------------------------|-----------------|-------------|
| Dosis (mg/kg)          | Glucosa (mmol/L) | ALAT                   | ASAT (UI)       | GGT         |
| Control                | 10,42 ± 1,98     | 35,4 ± 15,3            | 12,5 ± 8,1      | 8,44 ± 2,40 |
| 2 000                  | 7,80 ± 1,70      | 38,8 ± 13,6            | 27,7 ± 7,7      | 7,42 ± 2,13 |
| 3 000                  | 9,17 ± 1,90      | 35,8 ± 16,3            | 12,6 ± 4,1      | 9,39 ± 1,75 |
| 5 000                  | 11,02 ± 4,37     | 37,0 ± 11,5            | 23,3 ± 12,8     | 6,86 ± 1,81 |
| HEMBRAS                |                  |                        |                 |             |
| Dosis (mg/kg)          | Glucosa (mmol/L) | ALAT                   | ASAT (UI)       | GGT         |
| Control                | 8,48 ± 1,17      | 53,2 ± 2,6             | 29,9 ± 4,8      | 6,96 ± 1,96 |
| 2 000                  | 7,70 ± 1,94      | 45,0 ± 24,9            | 27,0 ± 5,9      | 9,45 ± 1,06 |
| 3 000                  | 7,84 ± 1,68      | 55,2 ± 19,6            | 28,3 ± 4,4      | 8,21 ± 1,59 |
| 5 000                  | 8,50 ± 3,67      | 40,6 ± 7,9             | 27,1 ± 6,1      | 8,62 ± 2,73 |
| MACHOS (continuación)  |                  |                        |                 |             |
| Dosis (mg/kg)          | AchE (U)         | Hemoglobina (g/100 mL) | Hematocrito (%) |             |
| Control                | 0,15 ± 0,03      | 13,6 ± 1,73            | 44,2 ± 2,59     |             |
| 2 000                  | 0,17 ± 0,01      | 14,6 ± 1,41            | 46,5 ± 4,20     |             |
| 3 000                  | 0,17 ± 0,05      | 16,0 ± 1,88            | 48,5 ± 3,42     |             |
| 5 000                  | 0,20 ± 0,03      | 15,3 ± 2,21            | 46,4 ± 4,56     |             |
| HEMBRAS (continuación) |                  |                        |                 |             |
| Dosis (mg/kg)          | AchE (U)         | Hemoglobina (g/100 mL) | Hematocrito (%) |             |
| Control                | 0,27 ± 0,03      | 13,8 ± 0,53            | 42,4 ± 2,07     |             |
| 2 000                  | 0,28 ± 0,03      | 14,1 ± 1,65            | 44,4 ± 3,58     |             |
| 3 000                  | 0,32 ± 0,04      | 13,6 ± 2,59            | 43,8 ± 4,02     |             |
| 5 000                  | 0,27 ± 0,04      | 13,7 ± 1,64            | 44,8 ± 2,49     |             |

GGT Ganma glutariltransferasa. ALAT Alaninoaminotransferasa. ASAT Aspartatoaminotransferasa. AchE Acetilcolinesterasa.

**Tabla 4.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre los indicadores sanguíneos en perros Beagle.

| Dosis (mg/kg) | Glucosa (mmol/L)    | ASAT (U/I)    | ALAT (U/I) | Fosfatasa   |
|---------------|---------------------|---------------|------------|-------------|
| Control       | 4,63 ± 0,10         | 24,5 ± 2,1    | 18,6 ± 2,9 | 29,8 ± 12,1 |
| 2 000         | 4,55 ± 0,54         | 25,7 ± 6,1    | 22,4 ± 3,9 | 36,2 ± 2,7  |
| 3 000         | 4,52 ± 0,02         | 19,3 ± 3,5    | 17,0 ± 0,9 | 33,5 ± 2,5  |
| 5 000         | 4,58 ± 0,10         | 19,7 ± 6,4    | 18,6 ± 3,5 | 30,6 ± 6,1  |
| HEMBRAS       |                     |               |            |             |
| Dosis (mg/kg) | Creatinina (µmol/L) | Amilasa (U/L) |            |             |
| Control       | 72,6 ± 17,2         | 358 ± 180     |            |             |
| 2 000         | 69,2 ± 12,7         | 360 ± 43      |            |             |
| 3 000         | 66,2 ± 1,8          | 345 ± 20      |            |             |
| 5 000         | 64,7 ± 4,2          | 436 ± 81      |            |             |

GGT Ganma glutariltransferasa. ALAT Alaninoaminotransferasa. ASAT. Aspartatoaminotransferasa. AchE Acetilcolinesterasa.

3. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Rodeiro I., Más R y Magraner J. Possible mechanism cytoprotective of D-002. An antiulcerogenic product isolated from beeswax. *J. of Pharmacy and Pharmacology*, 47, 731, 1995.
3. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Rodeiro I., Más R y Magraner J. Possible mechanism cytoprotective of D-002. An antiulcerogenic product isolated from beeswax. *J. of Pharmacy and Pharmacol.*, 48, 858, 1996.

**Tabla 5.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre los indicadores hematológicos en perros Beagle.

| Dosis<br>(mg/kg) | Hb<br>(g/mL) | Hto      | P       | L       | M         | E         | Global        |
|------------------|--------------|----------|---------|---------|-----------|-----------|---------------|
|                  |              |          |         |         |           |           | (%)           |
|                  | 16 ± 0,2     | 52 ± 0,0 | 62 ± 18 | 34 ± 15 | 3,0 ± 2,0 | 0,5 ± 0,5 | 7 700 ± 141   |
| 2 000            | 16 ± 0,6     | 48 ± 1,5 | 46 ± 3  | 44 ± 7  | 2,3 ± 1,5 | 0,7 ± 0,6 | 7 133 ± 1 106 |
| 3 000            | 15 ± 1,2     | 50 ± 5,1 | 36 ± 10 | 59 ± 11 | 3,3 ± 0,6 | 1,7 ± 1,2 | 7 266 ± 404   |
| 5 000            | 15 ± 2,7     | 44 ± 5,1 | 44 ± 6  | 53 ± 8  | 2,0 ± 2,0 | 0,9 ± 0,9 | 6 633 ± 2 042 |

Hb Hemoglobina. Hto Hematocrito. P Polimorfonucleares. L Linfocitos.  
M Monocitos. E Eosinófilos. Global Cuento global de leucocitos.

**Tabla 6.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre el peso de los órganos de conejos Nueva Zelanda expresado en valor porcentual\*.

| MACHOS           |             |             |             |             |             |  |           |           |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|-----------|-----------|
| Dosis<br>(mg/kg) | Hígado      | Riñón       |             | Corazón     |             |  |           |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Derecho   | Izquierdo |
| Control          | 3,24 ± 0,74 | 0,32 ± 0,02 | 0,32 ± 0,03 | 0,27 ± 0,02 |             |  |           |           |
| 2 000            | 2,92 ± 0,24 | 0,31 ± 0,04 | 0,31 ± 0,04 | 0,26 ± 0,02 |             |  |           |           |
| 3 000            | 3,11 ± 0,34 | 0,32 ± 0,10 | 0,32 ± 0,01 | 0,26 ± 0,04 |             |  |           |           |
| 5 000            | 3,06 ± 0,36 | 0,32 ± 0,03 | 0,31 ± 0,04 | 0,25 ± 0,02 |             |  |           |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Testículo |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Derecho   | Izquierdo |
| Control          | 0,44 ± 0,09 | 0,05 ± 0,01 | 0,17 ± 0,03 | 0,08 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 |  |           |           |
| 2 000            | 0,45 ± 0,10 | 0,04 ± 0,02 | 0,14 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 | 0,07 ± 0,02 |  |           |           |
| 3 000            | 0,58 ± 0,26 | 0,05 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 0,08 ± 0,02 |  |           |           |
| 5 000            | 0,38 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | 0,14 ± 0,03 | 0,09 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 |  |           |           |
| HEMBRAS          |             |             |             |             |             |  |           |           |
| Dosis<br>(mg/kg) | Hígado      | Riñón       |             | Corazón     |             |  |           |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Derecho   | Izquierdo |
| Control          | 3,23 ± 0,44 | 0,31 ± 0,03 | 0,31 ± 0,03 | 0,25 ± 0,03 |             |  |           |           |
| 2 000            | 2,82 ± 0,37 | 0,27 ± 0,02 | 0,28 ± 0,02 | 0,25 ± 0,02 |             |  |           |           |
| 3 000            | 2,71 ± 0,23 | 0,29 ± 0,04 | 0,30 ± 0,03 | 0,25 ± 0,02 |             |  |           |           |
| 5 000            | 3,15 ± 0,41 | 0,29 ± 0,05 | 0,29 ± 0,04 | 0,25 ± 0,01 |             |  |           |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Timo      |           |
|                  |             |             |             |             |             |  | Derecho   | Izquierdo |
| Control          | 0,40 ± 0,05 | 0,03 ± 0,01 | 0,18 ± 0,04 |             |             |  |           |           |
| 2 000            | 0,49 ± 0,07 | 0,04 ± 0,01 | 0,16 ± 0,04 |             |             |  |           |           |
| 3 000            | 0,48 ± 0,13 | 0,04 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 |             |             |  |           |           |
| 5 000            | 0,38 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 |             |             |  |           |           |

$$* \text{Peso corporal} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del cuerpo}} \cdot 100 \quad (\%)$$

- Rodeiro I., Alemán C., Más R., Noa M., Briñis F y Hernández C. Toxicología aguda del D-002 en ratas Sprague Dawley. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 26, 34, 1995
- Rodeiro I., Alemán C., Noa M., Rendón A., Más R., Fernández I., Acosta P, Briñis F y Hernández C. Oral Toxicological studies of D-002 in mice. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 30, 1, 1999.
- Chan PK., O'Hara G.P., Hayes A.W., Principles and Methods of Toxicology. Chapt. 6: Principles and Methods for Acute toxicity and eye irritancy, second edition, Raven in press, New York, 1989.
- Stevens K and Gallo M. Principles and Methods of Toxicology, Chapter 8, 2nd Ed., 237, Raven Press., Ltd., New York, 1989.
- Chhabra R.S., Huff J.E., Schwetz B.S., Selkirk J. An overview of prechronic and chronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environmental Health Perspectives*, 86, 313, 1990.
- Gad S. and Carrol S., Principles and Methods and Eye Irritancy, Chapt. 15: Statistics for Toxicologist, second edition, Raven Press, New York, 1989.
- Alemán C.L., Noa M., Más R., Rodeiro I., R.Mesa, Menéndez R., Gámez R. and Hernández C. Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Laboratory Animals*, 2000 (en prensa)
- Canadian Council on Animal Care, Guide to the Care and Use of Experimental Animals, I -II, 1994.
- Mesa R., Más R., Noa M., Hernández C., Rodeiro I, Gámez R., García M., Capote A., Alemán S. Toxicity of policosanol in beagle dogs: one-year study. *Toxicology Letters*, 73, 81, 1994.

**Tabla 7.** Efecto de dosis únicas de D-002 sobre el peso de los órganos de perros Beagle expresado en valor porcentual\*.

| Dosis<br>(mg/kg) | Hígado      | Riñón         |               | Corazón     | Pulmones    | Bazo        |
|------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
|                  |             | Derecho       | Izquierdo     |             |             |             |
| Control          | 4,70 ± 1,6  | 0,34 ± 0,06   | 0,36 ± 0,07   | 0,86 ± 0,09 | 0,94 ± 0,23 | 0,30 ± 0,04 |
| 2 000            | 4,13 ± 0,2  | 0,30 ± 0,06   | 0,30 ± 0,05   | 0,86 ± 0,09 | 0,93 ± 0,32 | 0,33 ± 0,08 |
| 3 000            | 3,60 ± 0,7  | 0,29 ± 0,02   | 0,31 ± 0,02   | 0,81 ± 0,04 | 0,93 ± 0,13 | 0,32 ± 0,07 |
| 5 000            | 3,47 ± 0,5  | 0,25 ± 0,03   | 0,26 ± 0,03   | 0,75 ± 0,06 | 0,84 ± 0,08 | 0,24 ± 0,04 |
|                  | Timo        | Suprarrenal   |               | Testículo   |             |             |
|                  |             | Derecha       | Izquierda     | Derecho     | Izquierdo   |             |
| Control          | 0,14 ± 0,06 | 0,008 ± 0,001 | 0,006 ± 0,001 | 0,12 ± 0,04 | 0,12 ± 0,01 |             |
| 2 000            | 0,10 ± 0,04 | 0,006 ± 0,002 | 0,006 ± 0,001 | 0,09 ± 0,01 | 0,08 ± 0,04 |             |
| 3 000            | 0,13 ± 0,04 | 0,007 ± 0,002 | 0,007 ± 0,002 | 0,11 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 |             |
| 5 000            | 0,13 ± 0,05 | 0,005 ± 0,001 | 0,005 ± 0,001 | 0,10 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 |             |

$$* \text{Peso corporal} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del cuerpo}} \cdot 100 \quad (\%)$$

**Tabla 8.** Hallazgos histopatológicos encontrados después de la administración de dosis únicas de D-002 a conejos.

| Observación                                      | MACHOS  |       |             |     |
|--------------------------------------------------|---------|-------|-------------|-----|
|                                                  | Control | Grupo |             |     |
|                                                  |         | 2     | 3<br>(g/kg) | 5   |
| Hígado: infiltrado inflamatorio<br>Crónico focal | 0/5     | 0/5   | 1/5         | 0/5 |
| Riñones: nefritis intersticial                   | 0/5     | 0/5   | 1/5         | 0/5 |

**Tabla 9.** Hallazgos histopatológicos encontrados después de la administración de dosis únicas de D-002 a perros Beagle.

| Observación                                             | Grupo   |     |             |     |
|---------------------------------------------------------|---------|-----|-------------|-----|
|                                                         | Control | 2   | 3<br>(g/kg) | 5   |
| <b>Próstata:</b><br>Inflamación crónica                 | 0/2     | 1/3 | 0/3         | 0/3 |
| <b>Testículos:</b><br>Atrofia severa                    | 1/2     | 0/3 | 0/3         | 0/3 |
| <b>Hígado:</b><br>Metamorfosis grasa moderada<br>difusa | 0/2     | 0/3 | 1/3         | 0/3 |