

# Toxicidad aguda oral del D-003 en conejos F1

**Rafael Gámez, Rosa Más, Miriam Noa, Roberto Menéndez, Michel de Armas, Caridad Hernández y Haydée García.**

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: 30 de marzo de 2004. Aceptado: 17 de junio de 2004.

Palabras clave: toxicología aguda, D-003, hipolipemiente, antiagregante plaquetario.

Key words: acute toxicity, 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 efectos hipolipemiente y antiagregante plaquetario demostrados experimental y clínicamente. En los estudios toxicológicos del D-003 se ha evaluado su toxicidad por dosis orales únicas y repetidas en roedores y no roedores. De acuerdo con ello y teniendo en cuenta que el conejo es una especie comúnmente utilizada para evaluar sustancias hipolipemiantes, se seleccionó esta especie para investigar la toxicidad por dosis orales únicas del D-003. De modo consistente con los resultados de los estudios agudos en roedores que revelaron que el D-003 no era tóxico por vía oral, en el presente estudio se administraron dosis únicas de 800, 2 000 y 5 000 mg/kg. Los animales se observaron durante 14 d, se controló el consumo de alimentos, se registró el peso corporal y los signos clínicos. Adicionalmente y dada la sensibilidad del conejo a las drogas hipolipemiantes, en los animales supervivientes se determinaron indicadores hematológicos y de bioquímica sanguínea. Además, durante la autopsia se realizó el estudio macroscópico de los órganos, se determinó el peso relativo de los órganos respecto al peso corporal, y se llevó a cabo el estudio histopatológico. Los resultados confirman que el D-003 administrado por vía oral a dosis únicas muy elevadas no resulta tóxico, lo cual se sustenta no solo en datos de mortalidad y síntomas, sino también, en otros indicadores actualmente no exigidos en este tipo de estudio toxicológico.

**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 experimental and clinically demonstrated. Taking into account the pharmacological effects of D-003, experimental toxicological studies have included the assessment of oral single and repeated doses, in rodents and non rodents. Hence, and considering that the rabbit is a species commonly used for the experimental pharmacological study of the effects of lipid lowering drugs, such species was selected among non rodent species used for investigating the potential acute toxicity of D-003. The present study researched the effects of D-003 orally administered as single doses of 800, 2 000 y 5 000 mg/kg, including a group treated only with the vehicle, as control. Once concluded the dosing, animals were observed for 14 d for detecting any clinical symptom of toxicity, food consumption was evaluated and body-weight was controlled. In addition, and according to the rabbit sensitivity to drugs acting on lipid metabolism at the end of the study were determined hematological and blood biochemical markers. Also, macroscopic analysis of the organs was conducted during the autopsy, determining the organ to body-weight relative percent, whereas histopathological study was also performed. The results obtained in this species confirm that D-003 orally administered at high single oral doses is not toxic, which is supported not only by mortality and clinical symptoms data, but also by other markers not updated required for this type of toxicological study.

## INTRODUCCION

El D-003 es una mezcla de ácidos grasos de muy alto peso molecular purificada de la cera de caña azúcar (*Saccharum officinarum*, L.), cuyo principal componente es el ácido octacosanoico, seguido de los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico, mientras otros ácidos (hexacosanoico, nonacosanoico, hentriacontanoico, tritriacontanoico, pentatriacontanoico y hexatriacontanoico) son componentes minoritarios.<sup>1</sup>

El tratamiento oral de conejos F1 con D-003 (5 a 200 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) durante 30 d produjo una reducción significativa de las concentraciones séricas de colesterol total (CT) y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), efectos que resultaron reversibles y dependientes de las dosis utilizadas.<sup>2</sup> Además, el D-003 incrementó significativamente las concentraciones del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), de modo dosis-dependiente.<sup>2</sup>

Estudios ulteriores han comparado los efectos del D-003 sobre el perfil lipídico con los inducidos por otras drogas hipolipemiantes, tales como los inhibidores de la hidroximetilglutarilcoenzima A (HMGCoA) reductasa lovastatina<sup>3</sup> y fluvastatina,<sup>4</sup> mostrando el D-003 similar eficacia respecto a la reducción de las concentraciones de LDL-C y CT, pero ventajas respecto al aumento de los valores de HDL-C, así como un perfil de seguridad superior.<sup>3,4</sup> Un estudio comparativo con policosanol, una droga hipolipemiente consistente en una mezcla de alco-

holes alifáticos primarios superiores obtenida de la misma fuente,<sup>5</sup> la cera de la caña, reveló que el D-003 muestra superioridad respecto al policosanol en lo relativo a los cambios en las concentraciones séricas de HDL-C y LDL-C en conejos normocolesterolémicos.<sup>6</sup>

El efecto reductor del colesterol del D-003 se induce mediante la inhibición de la síntesis de colesterol producida por una modulación de la actividad de la enzima HMGCoA reductasa. Estos efectos han sido demostrados en estudios realizados en cultivos de fibroblastos<sup>7</sup> y en el modelo de la hipercolesterolemia endógena inducida en conejos por una dieta rica en caseína y libre de grasas en el cual, se puso de manifiesto que el D-003 aumenta la velocidad catabólica de las LDL.<sup>8</sup>

Por otra parte, la administración oral de estatinas a conejos induce un esquema típico de toxicidad, relacionado con la inhibición de la síntesis de mevalonato que inducen por su acción sobre la HMGCoA reductasa que se caracteriza por una disminución del peso corporal y necrosis hepatocelular acompañada de elevación de las transaminasas, reducción en el consumo de alimentos y necrosis de los túbulos renales y la mucosa de la vesícula.<sup>9-11</sup>

De acuerdo con estos antecedentes, el conejo resulta una especie relevante para el estudio de la toxicidad potencial inducida por el tratamiento oral con D-003, lo que justifica su inclusión en los estudios toxicológicos en no roedores.

Por otra parte, el D-003 administrado por vía oral inhibe la agregación plaquetaria y la trombosis experimental en roedores<sup>12-15</sup> y en voluntarios sanos,<sup>16,17</sup> efecto que se relaciona con la reducción de las concentraciones de tromboxano A<sub>2</sub> (poderoso agente vasoconstrictor y proagregante liberado por el endotelio vascular y las plaquetas) y el incremento de la concentración de prostaciclina, agente antiagregante y vasodilatador liberado por el endotelio vascular.<sup>12-17</sup>

Los estudios de la toxicidad por dosis únicas orales realizados en roedores demostraron que el D-003 no resulta tóxico, ya que dosis de hasta 2 g/kg según el Método de la Clase de Toxicidad Aguda (Acute Toxicity Class, ATC) en ratas y de hasta 5 g/kg de acuerdo con el Método Convencional de la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) no revelaron toxicidad relacionada con el D-003.<sup>18</sup> En dichos estudios no ocurrieron

muertes ni se detectaron efectos tóxicos durante los 14 d que siguieron a la administración oral de dosis únicas de D-003.

De igual modo, el estudio de dosis orales repetidas de D-003 (50, 500 y 1 250 mg/kg) administradas durante 90 d a ratas Sprague Dawley no reveló evidencias de toxicidad asociada al tratamiento.<sup>18</sup> Similares resultados se obtuvieron en un estudio de toxicidad crónica en ratas tratadas por vía oral con D-003 (250, 500 y 1 000 mg/kg) durante 6 meses.<sup>19</sup>

Otros estudios de toxicología experimental han mostrado ausencia de toxicidad asociada al tratamiento con D-003.<sup>20-23</sup> Así, la evaluación citotóxica y mutagénica del D-003 en modelos *in vivo* e *in vitro*, así como los estudios de toxicología de la reproducción no han encontrado evidencias de potencial citotóxico, mutagénico o teratogénico relacionado con el D-003.<sup>19-23</sup>

De acuerdo con estos antecedentes, y con el objetivo de investigar la toxicidad potencial del D-003 en una especie más sensible que los roedores, se desarrolló el presente estudio, el cual por ende incluye la búsqueda de efectos sobre marcadores diana que, aunque no son actualmente exigidos por muchas autoridades reguladoras de medicamentos, sí pueden brindar información adicional sobre la toxicidad intrínseca de la sustancia en especies no roedoras.

El objetivo del presente estudio fue, por tanto, investigar la toxicidad oral por dosis únicas del D-003 en el conejo, una especie sensible a sus efectos hipolipemiantes.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Se utilizaron conejos F1 de ambos sexos provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba, entre 1,9 y 2,2 kg de peso corporal al inicio del experimento, los cuales se colocaron en cuarentena para su adaptación a las condiciones experimentales durante 15 d. La temperatura y la humedad relativa fueron las ambientales y los ciclos de luz y oscuridad los naturales. Posteriormente, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales por sexo.

Los animales tuvieron acceso libre al agua y a la comida, la cual, consistió en pienso adecuado para la especie proveniente del CENPALAB (180 g/d) compuesto por: fibra cruda (14,5 %), proteína cruda (16,8 %), carbohidratos (60,2 %), fósforo (0,5 %),

humedad (12,5 %) y con un pH de 5,3.

Toda la manipulación realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio y los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales (CPN).

### Administración y dosificación

El D-003 utilizado en la experiencia fue suministrado por el Departamento de Química del CPN, una vez corroborada sus especificaciones de calidad.

El D-003 se suspendió en un vehículo goma acacia-agua 10 mg/mL y se administró por entubación intragástrica, dos dosificaciones a volumen constante (10 mL/kg), espaciadas 30 min entre sí fueron necesarias, lo que se encuentra dentro de las recomendaciones para la administración de dosis elevadas en estudios de toxicidad aguda oral.<sup>24,25</sup>

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (cinco animales por sexo por grupo), un grupo control que solo recibió volúmenes equivalentes del vehículo goma acacia-agua y tres grupos tratados con D-003 (800, 2 000 y 5 000 mg/kg).

Las dosis de D-003 utilizadas se seleccionaron teniendo en cuenta que los estudios previos de toxicidad oral aguda en roedores mostraron que el D-003 no era tóxico por esta vía y que la evaluación subcrónica (90 d) realizada en ratas tratadas con dosis de hasta 1 250 mg/kg, no mostró evidencias de toxicidad asociada al D-003. Además, en el estudio que evaluó los efectos del D-003 sobre el perfil lipídico en conejos se administraron dosis de hasta 200 mg/kg durante 30 d sin que se produjeran muertes ni se observaran afectaciones de los indicadores de seguridad controlados.<sup>2</sup> Tales antecedentes sustentan que la máxima dosis a investigar en el presente estudio fuese la máxima empleada en estudios agudos orales: 5 000 mg/kg; mientras que el resto de las dosis (800 y 2 000 mg/kg) se estimó como submúltiplos (0,16 y 0,4, respectivamente) de aquella. A su vez, las dosis utilizadas fueron 4; 10 y 25 veces mayores que la máxima dosis efectiva documentada en esta especie (200 mg/kg).

### Exámenes realizados

Se realizaron observaciones individuales cada 4 h durante las primeras 12 h y después diariamente

durante los 14 d siguientes a la administración. El horario de observaciones estuvo comprendido entre las 8:30 y las 10:30 h.

Se observaron diariamente los aspectos siguientes: respiración; apariencia de la piel, consistencia de las heces; apariencia de la pupila, actividad motora; presencia de lacrimación; salivación; convulsiones; piloerección; conductas estereotipadas, catalepsia; temblores y reflejos.

El peso de los animales se determinó y registró al principio y al final del ensayo, mientras que el control del consumo de alimentos se realizó diariamente.<sup>24,25</sup>

### Determinaciones finales

Al concluir los 14 d de observaciones, se tomaron muestras de sangre extraídas de la vena marginal de la oreja para las determinaciones bioquímicas y hematológicas. Una vez obtenidas, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg). Al observarse la pérdida de los reflejos, los animales fueron desangrados por sección de la aorta abdominal y se les realizó la autopsia. Con estos propósitos fueron previamente sometidos a un ayuno de 12 h.

Durante la necropsia se examinó el contenido de las cavidades abdominal, torácica y craneana, así como el aspecto macroscópico *in situ* y se procedió al pesaje de órganos (hígado, riñones, corazón, pulmones, bazo, timo y testículos) para el cálculo posterior de la relación (peso del órgano/peso corporal) · 100.

En esa ocasión, también fueron tomadas muestras de estos y del resto de los órganos y tejidos para su posterior estudio microscópico, las cuales se colocaron en formaldehído al 10 % estabilizado, y posteriormente, fueron incluidas en parafina y coloreadas con hematoxilina y eosina. Se estudiaron microscópicamente las muestras provenientes de los animales correspondientes a los grupos controles y a la dosis más elevada.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico del peso corporal y del peso relativo (%) de los órganos, así como de los indicadores hematológicos y bioquímicos se realizó de manera independiente para cada sexo mediante la prueba de Kruskal Wallis (ANOVA no paramétrico). La frecuencia de aparición de las lesiones histológicas (datos categóricos) se analizó me-

dante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher, manteniendo la independencia entre los sexos.<sup>26</sup> Todas las pruebas empleadas fueron de dos colas. Un nivel de  $\alpha = 0,05$  fue prefijado para la significación estadística. Los datos se procesaron con el paquete de programas StatSoft, Inc. (1998), STATISTICA for Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Mortalidad

Durante el estudio no ocurrieron muertes, ni durante las primeras 24 h de la administración del producto, ni en los 14 d de observación posteriores a ella, por lo que no fue alcanzada la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) oral en conejos ni aún con la dosis de 5 000 mg/kg, lo que corrobora que el D-003 resulta una sustancia no tóxica, en consistencia con los resultados obtenidos en roedores.

### Signos tóxicos

No se detectaron signos indicativos de toxicidad atribuibles al tratamiento durante el período de observación (14 d), salvo algunos animales de todos los grupos que en ocasiones mostraron disnea inmediatamente después de la entubación, recuperándose posteriormente.

### Modificaciones del peso corporal y del consumo de alimentos

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas del peso corporal entre los grupos controles y los tratados en ninguno de los sexos (Tabla 1), lo cual indica que la administración de dosis únicas de D-003 de hasta 5 000 mg/kg no afectó este indicador.

Teniendo en cuenta que el incremento del peso corporal es una de las respuestas que mejor revela el estado de salud general del animal, este resultado corrobora que el tratamiento oral con D-003 no resulta tóxico.

Se apreció que el tratamiento con D-003 no afectó el consumo de alimento, lo cual resulta consistente con los resultados de ganancia en peso (Figuras 1 y 2).

### Análisis de los indicadores hematológicos y bioquímicos

Los lineamientos actuales establecidos en los estudios de toxicidad para dosis únicas no incluyen la determinación de variables sanguíneas en los animales supervivientes.<sup>24,25</sup> No obstante, teniendo en cuenta la sensibilidad del conejo a

los efectos de las drogas hipolipemiantes, en especial, a las que inhiben la síntesis de colesterol,<sup>9-11</sup> como ocurre con el D-003,<sup>2-4,6</sup> así como todos los resultados previos que muestran que dosis de D-003 de tan sólo 5 mg/kg resultan efectivas en esta especie,<sup>2-4,6,8</sup> el protocolo de estudio incluyó algunos determinaciones hematológicas y bioquímicas como indicadores secundarios de toxicidad.

Se comprobó que dosis orales únicas de D-003 de hasta 5 000 mg/kg no modifican ninguno de los indicadores sanguíneos analizados respecto al grupo control (Tabla 2).

### Análisis del peso de los órganos

No se observaron diferencias significativas entre los grupos respecto al porcentaje del peso de los órganos de los animales (Tabla 3).

### Estudio de anatomía patológica

El estudio macroscópico realizado durante las autopsias reveló que en tres animales se observaron lesiones y cambios de coloración en los pulmones. Se presentaron algunas lesiones esporádicas en animales de ambos sexos. Dos animales macho exhibieron lesiones: un nódulo en el lóbulo inferior del pulmón derecho en un animal control y una retracción del lóbulo superior del pulmón derecho en otro tratado con la dosis mayor. Por otra parte, una hembra tratada con 2 000 mg/kg presentó pulmones con adherencias y el lóbulo superior derecho con nódulos blanquecinos.

Estos hallazgos se relacionan con algunos errores puntuales de manipulación durante la entubación, ya que estos animales presentaron disnea en las observaciones clínicas realizadas inmediatamente después de la administración.

Las lesiones pulmonares encontradas en el análisis microscópico se correspondieron con las broncoaspiraciones señaladas en la manipulación de los animales, ya que se observó la presencia de macrófagos espumosos en los alvéolos pulmonares (Tabla 4).

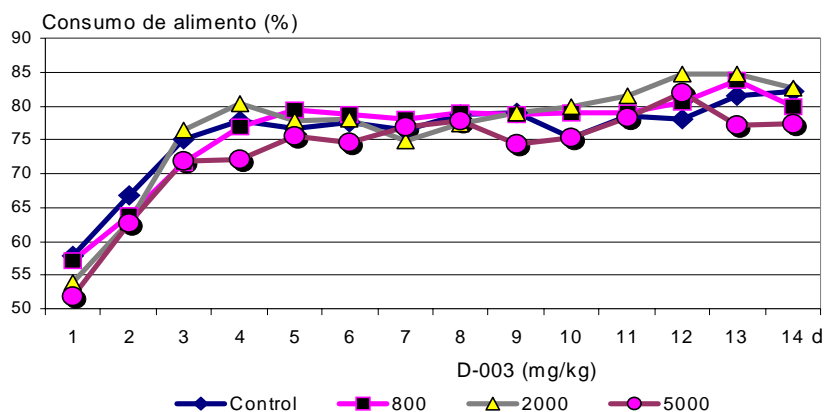
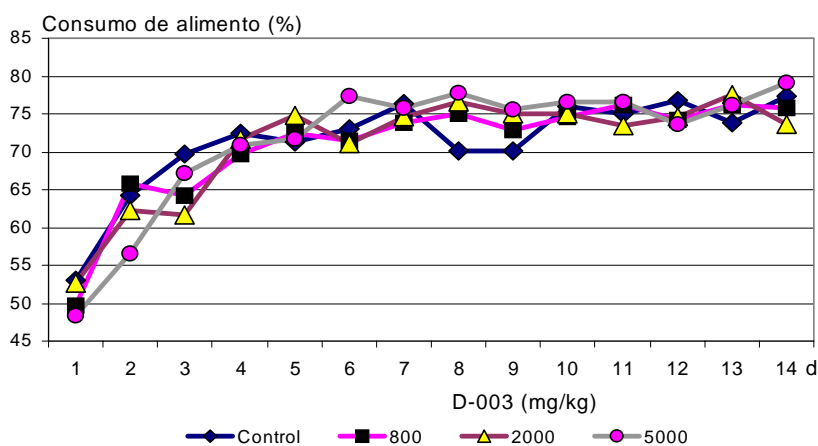
Un macho tratado con la dosis superior de D-003 mostró atrofia testicular, lesión que se reporta como espontánea para esta especie,<sup>27,28</sup> lo cual coincide también con datos previos del grupo de trabajo de los autores encontrados en conejos controles de otras series experimentales.

Los resultados del presente estudio son consistentes con los en-

**Tabla 1.** Efecto del tratamiento agudo oral en conejos F1.

Dosis (mg/kg)	Peso corporal (X ± DE)			
	Machos		Hembras	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Control	2,19 ± 0,19	2,42 ± 0,18	2,19 ± 0,15	2,36 ± 0,13
800	2,19 ± 0,16	2,45 ± 0,19	2,19 ± 0,11	2,37 ± 0,07
2 000	2,21 ± 0,19	2,45 ± 0,23	2,20 ± 0,13	2,37 ± 0,09
5 000	2,19 ± 0,12	2,38 ± 0,14	2,19 ± 0,16	2,39 ± 0,11

X Media. DE Desviación estándar.


**Fig. 1.** Consumo de alimento durante el estudio. Machos.

**Fig. 2.** Consumo de alimento durante el estudio. Hembras.

## BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A., Más R., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Cora M y Menéndez R. (Laboratorios DALMER S.A.), A mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, 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.
- Gámez R., Mendoza S., Más R., Noa M., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Castaño G., Goicochea E., Mesa M., Mendoza N. Comparison of the cholesterol-lowering effects and toxicity of D-003 and lovastatin on rabbits. **Drug R&D**, **4**, 219-229, 2003.
- Mendoza S., Gámez R., Mas R., Goicochea E. Effects of D-003, a mixture of long-chain aliphatic primary acids, fluvastatin and the combined therapy D-003 plus fluvastatin on the lipid profile of normocholesterolemic rabbits. **Int. J. Tissue Reaction**, **25**, 81-9, 2003.
- Laguna A., Magraner J., Ramos R., et al. Pharmaceutical formulations containing a mixture of higher primary aliphatic alcohols in the treatment of hypercholesterolemia and hyperlipoproteinaemia type II and stimulation of sexual behavior in animals and humans. 91500137.4 (EPO Patent), 1997.
- 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 AM., Ro-deiro I., Gonzalez R.M., Alfonso J.L.. 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., Más R., Pérez J., González R.M. and Jimenez 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).

contrados en roedores, y confirman que el D-003 administrado en dosis orales únicas no resulta tóxico. Ello no sólo se sustenta porque la  $DL_{50}$  es superior a 5 g/kg, sino por la ausencia de signos indicativos de toxicidad asociada al tratamiento, así como por los datos de consumo de alimentos y la ganancia en peso corporal, indicadores sanguíneos, peso relativo de los órganos y resultados del estudio de anatomía patológica. Si se tiene en cuenta que la dosis mínima efectiva del D-003 en conejos es 5 mg/kg se refuerza el alcan-

ce de esta apreciación, ya que en el presente estudio se investigaron los efectos de dosis 400 y 1 000 veces superiores a esta.

## CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que el D-003 administrado en dosis orales únicas a conejos F-1 no es tóxico, ya que la  $DL_{50}$  es superior a 5 g/kg, ni se detectaron signos clínicos, ni modificaciones en los indicadores investigados que resultaran atribuibles a posible toxicidad del D-003.

**Tabla 2.** Efecto del tratamiento agudo oral con D-003 sobre indicadores hematológicos y bioquímicos en conejos.

Dosis (mg/kg)	Machos			
	Hemoglobina	Hematocrito	Neutrófilos	Linfocitos
	(g/100 mL)		(%)	
0	13,5 ± 1,5	40,4 ± 2,2	30,0 ± 9,2	68,8 ± 10,1
800	13,1 ± 1,0	39,6 ± 2,3	32,4 ± 5,9	66,0 ± 5,3
2 000	13,1 ± 1,2	41,6 ± 3,0	40,2 ± 9,1	58,4 ± 10,2
5 000	13,6 ± 2,1	39,4 ± 2,8	42,4 ± 5,3	55,8 ± 5,1
	Monocitos	Eosinófilos	Conteo global	
	(%)		(células/mm <sup>3</sup> )	
0	0,8 ± 0,8	0,4 ± 0,5	5 640 ± 1 322	
800	1,4 ± 1,1	0,2 ± 0,4	6 040 ± 770	
2 000	0,8 ± 0,8	0,6 ± 0,9	6 880 ± 1 145	
5 000	1,4 ± 1,5	0,4 ± 0,5	6 660 ± 658	
	Glucosa	AST	ALT	
	(mmol/L)	(UI)		
0	5,12 ± 0,95	19,25 ± 7,00	35,70 ± 12,78	
800	4,34 ± 1,03	25,20 ± 10,97	49,35 ± 19,89	
2 000	4,34 ± 0,41	15,05 ± 4,73	46,55 ± 39,55	
5 000	5,66 ± 2,33	19,25 ± 5,53	37,10 ± 8,70	
	Hembras			
	Hemoglobina	Hematocrito	Neutrófilos	Linfocitos
	(g/100 mL)		(%)	
0	13,6 ± 0,9	40,6 ± 3,4	40,2 ± 12,0	56,8 ± 10,5
800	14,0 ± 1,0	40,8 ± 3,0	39,4 ± 9,7	57,2 ± 10,3
2 000	13,2 ± 1,0	38,2 ± 1,5	39,0 ± 11,7	59,8 ± 12,3
5 000	14,2 ± 0,7	39,8 ± 3,8	37,0 ± 9,8	61,6 ± 8,4
	Monocitos	Eosinófilos	Conteo global	
	(%)		(células/mm <sup>3</sup> )	
0	1,4 ± 1,7	1,6 ± 0,9	6 740 ± 1 184	
800	1,8 ± 0,8	1,6 ± 0,9	6 520 ± 798	
2 000	0,8 ± 1,1	0,4 ± 0,5	6 100 ± 1 247	
5 000	0,8 ± 1,1	0,6 ± 0,9	6 560 ± 838	
	Glucosa	AST	ALT	
	(mmol/L)	(UI)		
0	4,75 ± 0,33	18,55 ± 9,71	38,50 ± 10,72	
800	4,98 ± 0,96	19,60 ± 4,86	42,70 ± 11,78	
2 000	4,30 ± 0,52	14,70 ± 3,63	42,50 ± 15,56	
5 000	4,24 ± 0,56	21,05 ± 11,23	38,50 ± 12,86	

Los resultados se expresan como (X ± DE). X Media. DE Desviación estándar.

9. Kornbrust D.J., MacDonald J.S., Chennekatu P.P., et al: Toxicity of the HMG Coenzyme A reductase inhibitor, lovastatin, to rabbits. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **248**, 498-505, 1989.
10. Mac Donald J.S., Gerson R.J., Kornbrust J., et al: Preclinical evaluation of lovastatin. **Am. J. Cardiol.**, **62**, 16J-27J, 1998.
11. Gerson R.J., Mac Donald J.S., Alberts A., et al. Animal Safety and toxicology of simvastatin and related hydroxy-methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitors. **Am. J. Med.**, **87** (Suppl. 4 A) 28S-38S, 1987.
12. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Valdés S., Antiplatelet and antithrombotic effect of D-003, **Pharmacol. Res.**, **42**, 137-143, 2000.
13. Molina V., Arruzazabala 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.
14. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models. **Prostag. Leuk. Ess. Fatty Acids**, **68**, 305-10, 2003.
15. Arruzazabala M.L., Molina V., Carbajal D., Mas R. D-003 and warfarin interaction on the bleeding time and

**Tabla 3.** Efectos del tratamiento oral agudo con D-003 sobre el peso de los órganos en conejos.

Dosis (mg/kg)	Machos				
	Hígado	Riñón		Testículo	
		Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
	(%)				
0	3,12 ± 0,40	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,08 ± 0,018	0,08 ± 0,027
800	3,05 ± 0,57	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,09 ± 0,003	0,08 ± 0,003
2 000	3,16 ± 0,36	0,30 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,08 ± 0,018	0,08 ± 0,020
5 000	3,09 ± 0,15	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,06	0,08 ± 0,014	0,09 ± 0,018
Hembras					
	Hígado	Riñón		Corazón	
		Derecho	Izquierdo		
(%)					
0	0,26 ± 0,02	0,46 ± 0,06	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,05	
800	0,26 ± 0,02	0,47 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,18 ± 0,01	
2 000	0,27 ± 0,04	0,42 ± 0,09	0,05 ± 0,02	0,18 ± 0,04	
5 000	0,25 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,02	
Hembras					
	Hígado	Riñón		Corazón	
		Derecho	Izquierdo		
(%)					
0	3,03 ± 0,38	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,03	
800	2,99 ± 0,52	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,03	
2 000	3,18 ± 0,28	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,27 ± 0,03	
5 000	3,04 ± 0,43	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,26 ± 0,04	
Hembras					
	Pulmones	Bazo		Timo	
(%)					
0	0,41 ± 0,10	0,04 ± 0,02	0,16 ± 0,02		
800	0,40 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,15 ± 0,02		
2 000	0,45 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,04		
5 000	0,43 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,04		

- venous thrombosis experimentally induced in rats. **J. Med. Food**, **7**, 260-3, 2004.
16. 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.
17. Arruzabala 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. **Clin. Drug. Invest.**, **23**, 107-118, 2002.
18. Gámez R., Más R., Noa M. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. **Toxicol. Lett.**, **118**, 31-41, 2000.
19. Gámez R., Más R., Noa M., Menéndez R., García H., González J.E., Pérez Y., Goicochea E. Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. **Drug R&D**, **3**, 375-86, 2002.
20. 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 under Exp. Clin. Res.**, **30**, 75-88, 2004.
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. Gámez R., González J.E., Rodeiro I., Fernández I., Alemán C., Rodríguez M., Acosta P., García H. *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long chain aliphatic acids. **J. Med. Food**, **4**, 85-91, 2001.
23. Rodríguez M.D., Gámez R., González J.E., García H., Acosta C.P. Goicochea E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats. **Food. Chem. Toxicol.**, **41**, 89-93, 2003.
24. Chan P.K., O'Hara G.P. and Hayes A.W. Principles and methods for Acute and Subchronic Toxicity, Principles and Methods of Toxicol., 1-51, 1982.
25. Acute Oral Toxicity Testing Guidelines into Practice. Workshop organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), in partnership with the U.S. Environmental Protection Agency and the ILSI Risk Science Institute. February 19-21, Bethesda, Maryland, 2002.
26. Gad S.C. and Weil, C.S. Statistics for Toxicologist. **J. of the Amer. Coll. of Toxicol.**, **7**, 273, 1988.
27. Pakes S. and Gerrity L. Protozoal Diseases In: The Biology of the Laboratory rabbit. 2nd edition. Academic Press, Second Edition, 205-229, Chapter 10, 1994.
28. Gómez Barry H. Tratado de Anatomía Patológica, Edición Revolucionaria, Tomo 1, Ciudad de La Habana, 1964.

**Tabla 4.** Resumen de la incidencia de las lesiones histopatológicas observadas.

Observaciones	Control	Dosis D-003 (mg/kg)		
	0	800	2 000	5 000
Machos				
Corazón				
Miocardio, infiltrado inflamatorio crónico focal.	1/5	0/5	0/5	0/5
Hígado				
Infiltrado inflamatorio crónico focal.	0/5	0/5	0/5	1/5
Pulmones				
Presencia de células espumosas en luces alveolares.	1/5	0/5	0/5	1/5
Riñones				
Pielonefritis.	0/5	0/5	0/5	1/5
Testículos				
Atrofia de túbulos seminíferos.	0/5	0/5	0/5	1/5
Total de lesiones.	2/5	0/5	0/5	4/5
Total de animales con lesiones.	2/5	0/5	0/5	3/5
Hembras				
Adrenales				
Foco cortical basófilo.	0/5	0/5	0/5	1/5
Hígado				
Discreto infiltrado inflamatorio crónico focal.	0/5	0/5	0/5	1/5
Pulmones				
Inflamación crónica pulmonar.	0/5	0/5	1/5	0/5
Total de lesiones.	0/5	0/5	1/5	2/5
Total de animales con lesiones.	0/5	0/5	1/5	1/5

Comparaciones no significativas. Prueba de las Probabilidades Exacta de Fisher.