

Toxicología aguda del D-004 en conejos

Ariadne Gutiérrez Martínez, Rafael Gámez Menéndez, Rosa Más Ferreiro, Miriam Noa Puig, Balía Pardo Acosta, Eddy Goicochea Carrero, Dayisell Curveco Sánchez y Haydée García Cambián.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científica, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba. Telef: 271 4225, Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 17 de julio de 2006. Aceptado: 15 de noviembre de 2006.

Palabras clave: D-004, *Roystonea regia*, ácidos grasos primarios, toxicidad aguda, método de las clases de toxicidad aguda.
Key words: D-004, *Roystonea regia*, primary fatty acids, acute toxicity, acute toxic class.

RESUMEN. El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real (*Roystonea regia*) (*Arecaceae*) que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes. El tratamiento oral con D-004 inhibe significativamente la hiperplasia prostática inducida por testosterona en roedores. La toxicología preclínica de un nuevo compuesto incluye la evaluación aguda en una especie no roedora. Con este objetivo se realizó el ensayo de toxicidad del D-004 a dosis única en conejos Nueva Zelandia, especie no roedora de elección. Teniendo en cuenta los resultados negativos obtenidos en el estudio agudo oral realizado previamente en roedores, se utilizó el método alternativo de las clases, administrando una dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal. Los animales fueron observados en diferentes intervalos durante las primeras 24 horas y diariamente durante los restantes días. El peso corporal se controló al inicio y al final de la experiencia. Las variables analizadas fueron: mortalidad, ganancia en peso corporal, peso de órganos y hallazgos histopatológicos. El análisis de las mismas no arrojó diferencias significativas entre los grupos tratados y el control en ninguno de los sexos. El D-004 presentó una toxicidad intrínseca baja, al mostrar una DL₅₀ superior a los 2 000 mg/kg de peso corporal, dosis con la que no se evidenciaron signos indicativos de toxicidad en ninguno de los sexos, por lo que su toxicidad se puede declarar como no clasificable según el método de las clases de toxicidad aguda.

ABSTRACT. D-004 is a lipid extract of the fruits of the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) (*Arecaceae*), which consists of a mixture of fatty acids, in which oleic, lauric and palmitic are the most abundant. Oral treatment with D-004 significantly prevents the prostate hyperplasia induced with testosterone in rodents. Preclinical evaluation of a new drug acute study in non-rodents species usually is included. That is why single toxicity study of D-004 in non-rodent species was done in the present work. A New Zealand rabbit was selected, usually employed in these evaluations. Taking into account previous negative results from other acute study in rodents, oral acute toxicity of D-004 (2 000 mg/kg) was investigated in rabbits according to the acute toxic class method. Animals after a single administration were observed daily during 14 days. Body weight data measured at the beginning and the end of the study were also recorded. Thus, data analysis of mortality, clinical observations, body weight gain, organ weight ratios and histopathological findings did not show significant differences between control and treated groups in any sex. The oral acute toxicity of D-004 was considered as unclassified, since a dose of 2000 mg/kg did not induce deaths or toxic symptoms.

INTRODUCCION

La hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste en un alargamiento de la fibra muscular y la estructura epitelial de la próstata que da lugar a la compresión de la uretra y la aparición de síntomas del tracto bajo urinario. La HPB es una

enfermedad frecuente en el hombre a partir de los 50 años, y su frecuencia aumenta con la edad.¹

La etiopatología de esta enfermedad no está del todo dilucidada, pero depende de factores hormonales y no hormonales. Así, se ha relacionado con un incremento en la transformación

de la testosterona (T) en su derivado más activo, la dihidrotestosterona (DHT) en las células prostáticas a través de la enzima 5 α -reductasa prostática. La DHT se combina con los receptores androgénicos y promueve el crecimiento celular.^{2,3}

El tratamiento de la HPB incluye diferentes opciones que se utilizan de acuerdo con la severidad de la enfermedad. El tratamiento más drástico y definitivo es la resección transuretral de la próstata, el cual se recomienda en los casos más complicados por el riesgo que implica,¹ mientras que el tratamiento más empleado es la terapia farmacológica,²⁻⁵ en la cual se destacan dos grandes grupos: los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa prostática, y los antagonistas α_1 -adrenérgicos.

Las alternativas fitoterapéuticas son muy utilizadas para tratar la HPB, destacándose el uso de los extractos lipídicos del fruto de *Saw palmetto* (*Serenoa repens*), palma enana de la familia *Arecaceae* y oriunda de regiones del sureste de Norteamérica.^{6,7} *Saw palmetto* actúa mediante la inhibición de la 5 α -reductasa prostática y el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos, si bien también presenta efecto antiinflamatorio e inhibe la proliferación de células prostáticas.^{6,8}

La palma real de Cuba (*Roystonea regia*), también perteneciente a la familia *Arecaceae*, presenta similitudes taxonómicas con *Serenoa repens*, por lo cual, era lógico que el extracto lipídico de sus frutos fuese efectivo en el manejo de la HPB, de modo análogo al *Saw palmetto*.

El D-004 es un extracto lipídico obtenido del fruto de la palma real, que consiste en una mezcla reproducible de ácidos grasos, en la cual el ácido oleico, el láurico y el palmítico son los más abundantes (Departamento de Química, Centro de Productos Naturales. Datos de Archivo). El D-004 administrado por vía oral inhibe significativamente la hiperplasia prostática (HP) inducida por T, no por DHT, en roedores, lo que ha hecho suponer que inhibe la 5 α -reductasa prostática.⁹ En modelos experimentales el D-004 presenta una eficacia similar, o ligeramente superior, a los extractos de *Saw palmetto*, lo que hace concebir su uso potencial para tratar la HPB.^{9,10}

Teniendo en cuenta los resultados promisorios revelados por los estudios farmacológicos del D-004, se hace necesario acometer su estudio toxicológico, y comenzar como se establece por la determinación de su toxicidad por dosis orales únicas.

Los estudios agudos son imprescindibles en la primera etapa de la investigación de un nuevo producto propuesto como medicamento. Tomando en consideración los resultados negativos obtenidos en la evaluación del D-004 por el método de las clases en ratas, y que el conejo es la especie no roedora de elección en las evaluaciones toxicológicas preclínicas, se hace necesario acometer la evaluación toxicológica aguda en esta especie.

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad aguda oral del producto en una de las especies no roedoras que habitualmente se emplean para estos fines, con el objetivo de: a) realizar la clasificación toxicológica aguda del D-004 utilizando el método alternativo de las clases, b) determinar si la administración de estas dosis únicas producen afectaciones no reversibles, de modo que se detecten en los sobrevivientes.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron Conejos Nueva Zelanda, adultos jóvenes (12 a 13 semanas) de ambos sexos, procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal osciló entre 2,2 y 2,7 kg.

Los animales se colocaron en jaulas individuales y se adaptaron durante 14 d a las condiciones experimentales. Se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura (17 a 23 °C), humedad (30 a 70 %) y

ciclos luz-oscuridad de 12 h. El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum*. Se utilizó como alimento pienso estándar producido en el CENPALAB.

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio, recomendados en los lineamientos internacionales y en la República de Cuba, plasmados en los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación

El D-004 se obtuvo en el departamento de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales, con su correspondiente información relativa a la pureza y a las condiciones de estabilidad. El D-004, un extracto hexánico del fruto de la palma real cubana (palmiche), fue preparado en forma de emulsión (aceite en agua) usando como agente tensoactivo Tween 65 (2 %). La preparación de las disoluciones se realizó 2 h antes de la administración en función del peso corporal.

Se empleó la vía intragástrica, la cual es la propuesta para los humanos y es además la que se empleará en el resto de las evaluaciones de toxicología preclínica. El producto se administró a volumen variable en función del peso corporal (10 mL/kg).

Grupos experimentales

Considerando las experiencias en los estudios de farmacología realizados con el D-004, en los cuales se han empleado hasta 400 mg/kg de peso corporal sin que se haya manifestado ningún cuadro clínico indicativo de daño inducido por la sustancia, así como los resultados de la evaluación aguda en roedores por este método experimental (con dosis máxima empleada de 2 000 mg/kg) y las características propias del mismo, se inició el estudio por la mayor dosis recomendada para este ensayo. Este método parte del concepto de un uso escalonado de dosis a partir de una dosis de partida, que en este caso fue de 2 g/kg.

Se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales/sexo de tres animales cada uno. Los tratados con D-004 recibieron la emulsión del producto en estudio y el control, volúmenes equivalentes del vehículo con el fin de evaluar los efectos de manipulación y del propio vehículo (Tween 65/H₂O) sobre todos los indicadores a analizar.

Los animales se administraron tras un 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, lo cual satisface los requisitos de la mayoría de los estudios de toxicidad aguda.¹¹⁻¹³ Los signos clínicos chequeados incluyeron aquellos que se definieron para este método como índices de toxicidad severa tales como: convulsiones, postración, temblores, dificultades respiratorias y vocalización. Al final, los animales fueron sacrificados.

En este estudio se reportó la mortalidad y el estado clínico general del animal. El peso corporal se controló al inicio y al final de la experiencia. El consumo de alimentos fue calculado diariamente por diferencia de pesada entre alimento suministrado y alimento remanente.

Necropsia y examen histopatológico

Para la autopsia, a los animales se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico y luego de perder los reflejos, fueron sacrificados, dejándose desangrar por la vena cava abdominal. Posteriormente, se les practicó la necropsia completa y se examinó el contenido de las cavidades abdominal, torácica y craneana, pesando los órganos y tomando muestras según el protocolo de trabajo.

Con posterioridad, se calculó la relación:

$$\frac{PO}{PC} \cdot 100$$

para su procesamiento estadístico. El peso corporal referido es el que presentaron el día de su sacrificio.

Para el estudio histopatológico, las muestras obtenidas se fijaron en formaldehído al 10 % estabilizado y los cortes se colorearon con hematoxilina y eosina. Se sometieron a este estudio todos los animales. Todas las lesiones observadas fueron diagnosticadas por la Unidad de Histopatología.

Variables analizadas

Se analizó para cada grupo y sexo, la mortalidad, el peso corporal, el consumo de alimentos, el peso de los órganos y los hallazgos de la autopsia y del análisis histopatológico.

Análisis estadístico

El análisis de las variables continuas, tales como peso corporal, consumo de alimentos y peso de los órganos se realizó de manera independiente para cada sexo mediante análisis de varianza, mientras que la frecuencia de aparición de las lesiones histológicas (variables categóricas) fueron analizadas mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher, manteniendo la independencia de los sexos.¹⁴

RESULTADOS Y DISCUSION

Mortalidad y signos clínicos

Ninguno de los animales tratados con D-004 a la dosis de 2 000 mg/kg murió en el transcurso de la experiencia ni manifestó signos indicativos de toxicidad, de modo que constituyeran criterios para definir este nivel de dosis como tóxico para alguno de los sexos. Los signos clínicos que fueron chequeados durante el estudio, recogidos en las planillas de observaciones individuales, incluyen aquellos que se definieron para este método como indicativos de toxicidad severa durante el proceso de validación, como son: convulsiones, postración, temblores, dificultades respiratorias y vocalización.

Peso corporal

El tratamiento con D-004 no indujo modificaciones en la ganancia en peso corporal entre animales tratados y controles en ninguno de los sexos (Tabla 1), lo cual resulta consistente con el porcentaje de alimento consumido durante el estudio (Figuras 1 y 2).

Estos resultados ya de por sí permiten definir que el D-004 debe tener una toxicidad aguda superior a los 2 g/kg en conejos y que por tanto, según la metodología empleada, su toxicidad es no clasificable.¹² No obstante, para contar con más información sobre el efecto de la administración aguda

Tabla 1. Efecto de dosis única de D-004 sobre el peso corporal en conejos.

Machos	Dosis	Peso corporal (kg) ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	
		Inicio	Final
Hembras	Control	2,29 \pm 0,08	2,63 \pm 0,12
	2 000	2,29 \pm 0,10	2,66 \pm 0,24
	Control	2,40 \pm 0,18	2,68 \pm 0,28
	2 000	2,40 \pm 0,26	2,66 \pm 0,39

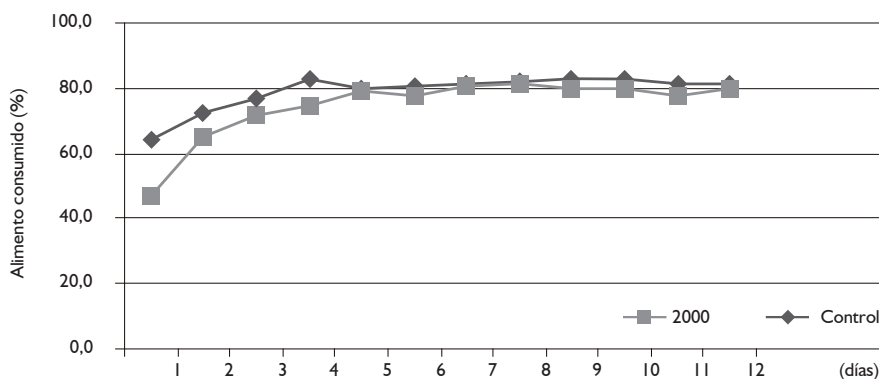


Fig. 1. Efecto del D-004 sobre el porcentaje de alimento consumido. Machos.

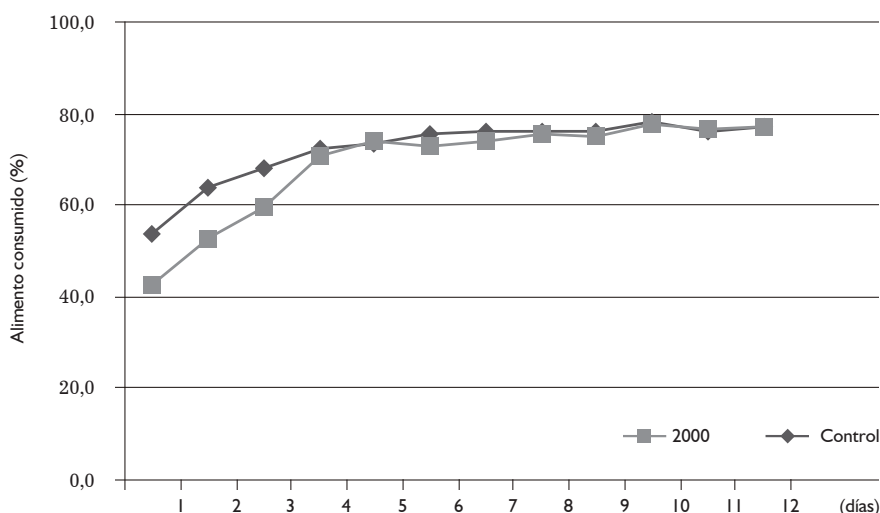


Fig. 2. Efecto del D-004 sobre el porcentaje de alimento consumido. Hembras.

oral del D-004 en conejos de ambos sexos, se analizó además la información que brinda el peso de los órganos y las observaciones macro y microscópicas de órganos y tejidos.

Peso de los órganos

El tratamiento por vía oral con D-004 no indujo alteraciones del peso relativo de los órganos estudiados con relación al peso corporal (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Efecto de dosis única de D-004 sobre el peso de los órganos en conejos machos (%).

Dosis	Peso de órganos (%) ($\bar{X} \pm \text{DE}$)				
	Hígado	Riñón derecho	Riñón izquierdo	Corazón	Pulmones
Control	2,65 \pm 0,24	0,22 \pm 0,07	0,22 \pm 0,05	0,24 \pm 0,03	0,47 \pm 0,12
2 000	2,62 \pm 0,04	0,23 \pm 0,06	0,22 \pm 0,05	0,24 \pm 0,03	0,47 \pm 0,15
Dosis	Bazo	Timo	Testículo derecho	Testículo izquierdo	Cerebro
Control	0,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02
2 000	0,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02

Tabla 3. Efecto de dosis única de D-004 sobre el peso de los órganos en conejos hembras (%).

Dosis	Peso de órganos (%)				
	(X ± DE)				
	Hígado	Riñón derecho	Riñón izquierdo	Corazón	Pulmones
Control	3,14 ± 0,33	0,24 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,42 ± 0,03
2 000	3,10 ± 0,35	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,44 ± 0,08
	Bazo	Timo	Útero + ovarios	Cerebro	
Control	0,033 ± 0,001	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,03	
2 000	0,035 ± 0,002	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,05	

Hallazgos macro y microscópicos

No se apreció daño en órganos, tejidos y cavidades de ninguno de los animales tratados con D-004.

CONCLUSIONES

El D-004 presenta una toxicidad intrínseca baja, al mostrar una DL50 superior a los 2 000 mg/kg de peso corporal. Con esta dosis no se evidencian signos indicativos de toxicidad en ninguno de los sexos, por lo que su toxicidad se puede declarar como no clasificable según el método de las clases de toxicidad aguda.

BIBLIOGRAFIA

- Bruskewitz M. Benign prostatic hyperplasia pathophysiology and pharmacological treatment. **Curr. Opin. Nephrol. Hypert.**, **5**, 455, 1995.
- Oesterling J.E. Benign Hyperplasia: Medical and minimally invasive treatment options. **New Engl. J. Med.**, **332**, 99, 1995.
- Geller J., Kirschenbaum A., Lepor H. and Levine A.C. Therapeutic contro-
- versies: clinical treatment of benign prostatic hyperplasia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**, 745, 1995.
- Boyle P., Gould A.L. and Roehrborn C.G. Prostate volume predicts outcome of treatment of benign prostatic hyperplasia with finasteride: meta analysis of randomized clinical trials. **Urology**, **48**, 398, 1996.
- Chapple C.R. Selective α -adrenergic antagonists in benign prostatic hyperplasia: rationale and clinical experience. **Eur. Urol.**, **29**, 129, 1996.
- Carraro J.C., Raynaud J.P., Koch G., Chisholm G.D., Di Silverio F. *et al.* Comparisons of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a randomized international study of 1098 patients. **Prostate**, **29**, 231, 1996.
- Small J.K., Bombardelli E., Morazzoni P. *Serenoa repens* (Bartram). **Fitoterapia**, **68**, 99, 1997.
- Marks L.S., Partin A.W., Epstein J.I., *et al.* Effects of *saw palmetto* herbal blend in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. **J. Urology**, **163**, 1451, 2000.
- Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Molina V., Rodríguez E., González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. **Drugs Exptl. Clin. Res.**, **30**, 227, 2004.
- Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., Molina V., Rodríguez E., González V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostate hyperplasia induced with testosterone and dihydrotestosterone in rats. **Curr. Ther. Res.**, **65**, 505, 2004.
- Auletta C.S., Gad S.C., Product Safety: Evaluation Handbook, Chapter III. 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. U.S., 43-86, 1999.
- OECD, Guidelines for testing of chemicals, No. 420: Acute oral toxicity class method, Paris, 2002.
- EPA Public Access Gopher (gopher.epa.gov) under the heading "Environmental Test Methods and Guidelines", 2001.
- Gad S.C. and Carrol S.W., Principles and Methods of Toxicology, Chapter XV, 2nd Ed., Raven Press, New York: 15, 435-483, 1989.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

SISTEMA DE PROGRAMAS INFORMÁTICOS PARA LA ENSEÑANZA UNIVERSITARIA DE LA QUÍMICA EXPERIMENTAL

Colectivo de la Universidad de la Habana, Instituto Superior Politécnico "José A. Echevarría", Universidad Agraria de La Habana, Universidad Central de Las Villas "Marta Abreu", Universidad de Oriente y Centro Universitario de las Tunas.

Se elaboró un sistema de programas para la formación química experimental de profesionales químicos y no químicos, el cual comprende las asignaturas de Química General, Química Inorgánica, Química Orgánica, Química Física, Química Analítica, Bioquímica Básica y Química Ambiental. El sistema posibilita la realización virtual de numerosas prácticas de laboratorio y aporta otros muchos materiales didácticos. Su contenido es utilizado en todo el país para la enseñanza de la Química en los Centros de la Educación Superior del Ministerio de la Educación Superior.