

# Efectos del D-003 sobre patrones conductuales de roedores

**Lilia Fernández Dorta, Rosa Más Ferreiro, Julio C. Fernández Travieso, Sarahí Mendoza Castaño, Rafael Gámez Menéndez y Eldis Felipe León Alamo.**

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

Recibido: 5 de mayo de 2004. Aceptado: 20 de octubre de 2004.

Palabras clave: D-003, conducta, actividad exploratoria, plato caliente, varilla rotatoria, evitación pasiva.  
Key words: D-003, behaviour, exploratory behavior, hot plate, rotating rod, passive avoidance.

**RESUMEN.** El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos de muy alto peso molecular purificada de la cera de la caña de azúcar con efectos hipocolesterolemizante y antiagregante plaquetario demostrados experimentalmente y en estudios clínicos Fase I y II. Los estudios experimentales y clínicos culminados han mostrado que el D-003 es seguro y bien tolerado. Sin embargo, la farmacología de la seguridad de nuevos medicamentos investiga sus efectos sobre diversos sistemas que pudieran ser blancos potenciales de toxicidad. Teniendo en cuenta que los efectos adversos relacionados con el Sistema Nervioso (SN) están entre los más frecuentes para diversas áreas terapéuticas, estos estudios suelen investigar los efectos de las sustancias sobre la función y estructura del SN. La investigación de los efectos sobre patrones conductuales de roedores comúnmente representa la primera etapa de estos estudios. De acuerdo con ello, el presente estudio tuvo como objetivo investigar los efectos del tratamiento oral con D-003 (dosis únicas y repetidas) sobre la actividad exploratoria, la respuesta al plato caliente, la sujeción y ejecución en varilla rotatoria y la evitación pasiva de una sola prueba de aprendizaje en ratones. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales (10 animales/grupo): uno control que recibió el vehículo goma acacia-H<sub>2</sub>O y cuatro tratados con D-003 (5, 25, 100 y 400 mg/kg, respectivamente). El tratamiento oral con dosis únicas y repetidas de D-003 (400 mg/kg) aumentó de forma modesta, pero significativa, la actividad exploratoria con respecto al grupo control. Sin embargo, el D-003 no modificó la respuesta en el ensayo de plato caliente, la capacidad de sujeción y ejecución motora en varilla rotatoria ni la retención del aprendizaje en el ensayo de evitación pasiva. Se necesitan estudios ulteriores que diluciden las causas por las cuales el D-003 aumenta la actividad exploratoria en ratones y que investiguen otros posibles efectos del D-003 sobre el SN para determinar los riesgos o beneficios potenciales asociados.

**ABSTRACT.** D-003 is a mixture of very high molecular weight aliphatic acids purified from sugar cane wax with cholesterol lowering and antiplatelet effects demonstrated experimentally and in Phase I and Phase II clinical studies. Experimental and clinical studies concluded up to date have shown that D-003 is safe and well tolerated. Safety pharmacology of new drugs, however, research their effects on different body systems that could be potential toxicity targets. Taking into account that effects related to Nervous System (NS) are among the more frequent adverse effects of different therapeutic areas, these studies often research the effects of the substances on structures and functions of NS. The search of the effects of new substances on rodent behavioral patterns commonly represents the first step of such studies. Accordingly, the present study researched the effect of the oral treatment with D-003 (single and repeated doses) on exploratory activity, hot plate response, performance in rotating rod and single-trial passive avoidance task in mice. Animals were randomly distributed into five experimental groups (10 animals/group): a control group receiving the acacia gum-H<sub>2</sub>O vehicle and four treated with D-003 (5, 25, 100 and 400 mg/kg, respectively). Oral treatment with single and repeated doses of D-003 at 400 mg/kg, but not with lower doses, modestly, but significantly increased exploratory activity with regards to control group.

Nevertheless, D-003 did not modify the response to hot plate, the holding and performance ability on rotating rod and the retention on a single-trial passive avoidance test. Further studies are needed for elucidating the reasons whereby D-003 increased exploratory activity in mice and for researching other putative effects of D-003 on NS for determining the potential risk of benefits associated to them.

## INTRODUCCION

El D003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios purificada de la cera de la caña de azúcar.<sup>1</sup> El componente fundamental del D-003 es el ácido octacosanoico, seguido de los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetracontanoico. En proporción minoritaria también aparecen los ácidos hexacosanoico, nonacosanoico, hentriacontanoico, tritriacontanoico, pentatriacontanoico, dotriacontanoico, hexacotriacontanoico y tetratriacontanoico.

Ha sido demostrado que el D-003 ejerce efectos reductores del colesterol en modelos experimentales<sup>2,3</sup> y en estudios clínicos.<sup>4,5</sup> Así, el D-003 (5 a 200 mg/(kg · d) reduce significativamente las concentraciones séricas de colesterol total (CT) y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), de modo dependiente de las dosis.<sup>2</sup> Además, incrementa significativamente el colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C).<sup>2</sup> La comparación de los efectos del policosanol y el D-003 administrado en dosis de 5 mg/(kg · d) ha revelado que los efectos de este

último sobre las LDL-C y HDL-C, se obtienen en un menor tiempo y son de mayor magnitud que los inducidos por el policosanol.<sup>3</sup>

La reducción del colesterol inducida por el D-003 se asocia a la inhibición de la síntesis de colesterol en pasos ulteriores al consumo de acetato y anteriores a la generación del mevalonato.<sup>6</sup> Experiencias en cultivos de fibroblastos han evidenciado que el D-003 inhibe la biosíntesis de colesterol de manera dosis-dependiente a través de una modulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa.<sup>6</sup>

Por otra parte, el D-003 ha mostrado acción antioxidante en modelos experimentales<sup>7</sup> y en voluntarios sanos,<sup>5</sup> ejercida fundamentalmente a través de la disminución de la susceptibilidad de las lipoproteínas plasmáticas a la peroxidación lipídica.

El D-003 ha revelado efectos antiagregantes plaquetarios en estudios experimentales<sup>8,9</sup> y clínicos.<sup>4,5,10</sup> Estudios experimentales han demostrado que el D-003 (5 a 200 mg/kg) inhibe la agregación plaquetaria de forma dosis-dependiente y previene la trombosis arterial (5 a 200 mg/kg) en roedores.<sup>8</sup> Los efectos del D-003 parecen ser mediados a través de una reducción significativa del TXA<sub>2</sub> y un incremento en las concentraciones de prostaciclina.<sup>9,11</sup>

La administración oral de dosis repetidas de D-003 (25 y 200 mg/kg) en un modelo de isquemia en médula espinal de conejo, mejora significativamente el estado neurológico y protege significativamente la mortalidad, así como la presencia de lesiones, lo que sugiere que el tratamiento previene el daño neuronal.<sup>12</sup>

Por otra parte, los resultados de los estudios sobre la toxicidad potencial del D-003 no han revelado toxicidad asociada al tratamiento, aún y cuando se han investigado dosis de hasta 5 000 mg/kg en estudios de dosis únicas y de > 1 000 mg/kg en estudios de dosis repetidas, los cuales han abarcado estudios de toxicidad subcrónica y crónica.<sup>13,14</sup> Los estudios del potencial mutagénico y embriotóxico del D-003 también han mostrado resultados negativos.<sup>15-17</sup>

La evaluación de los posibles efectos de cualquier nuevo medicamento en desarrollo sobre otros blancos de acción diferentes a los primarios o causalmente relacionados con la indicación para la cual se

propone, constituye un aspecto relevante. Estos estudios permiten demostrar nuevas acciones o indicaciones, que en ocasiones, han llegado a ser más importantes que los inicialmente propuestos, tributando así, a la Farmacología; o bien, dan información sobre posibles efectos adversos (EA) que se deriven de su acción sobre esos blancos, aspecto que define a la Farmacología de la Seguridad.

Teniendo en cuenta que entre los EA más frecuentemente causados por un gran número de medicamentos de disímiles áreas terapéuticas se encuentran los ejercidos sobre el sistema nervioso (SN), la evaluación de los efectos de los medicamentos sobre este sistema es una parte fundamental de esos estudios. En este caso, la necesidad de su realización se incrementa por el hecho de que el D-003 resultó efectivo en la prevención de isquemia cerebral en médula espinal<sup>12</sup> y porque los estudios de farmacocinética han demostrado que tras la administración oral del precursor marcado, parte de la radiactividad se encuentra en cerebro, lo que indica que puede atravesar la barrera hematoencefálica.

En tal sentido, la evaluación de los efectos sobre diferentes patrones conductuales de roedores es la alternativa más común para el inicio de estos estudios.<sup>18,19</sup> El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el posible efecto de la administración oral del D-003 sobre el SN de roedores a través de su acción sobre cuatro patrones conductuales: la actividad exploratoria en campo abierto, la respuesta a estímulos dolorosos inducidos en plato caliente, la capacidad de sujeción y ejecución en una varilla rotatoria y su efecto sobre la retención del aprendizaje en un modelo de evitación pasiva de una sola prueba.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para su uso en el 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.

Se utilizaron ratones OF-1 machos adultos jóvenes procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (La Habana, Cuba), cuyo peso corporal

osciló entre 20 y 25 g. Los ratones se alojaron en cajas plásticas para ratones (cinco/jaula). Se les suministró pienso para roedores y agua *ad libitum*.

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura (25 ± 4) °C, humedad (60 ± 8) °C y ciclos de luz-oscuridad de 12 h y una vez concluida la experiencia, se sacrificaron mediante dislocación cervical, tras la pérdida de reflejos en atmósfera de éter.

### Administración y dosificación

El D-003 se administró en forma de suspensión en un vehículo goma acacia-agua (10 mg/mL) preparado 2 h antes de su utilización en el estudio experimental de dosis únicas. Para la serie de dosis repetidas, se prepararon semanalmente, lo cual, se encuentra avalado por los datos de estabilidad del D-003 en suspensión.

La administración se realizó utilizando una sonda intragástrica y una relación volumen/peso corporal de 5 mL/kg, lo que se encuentra dentro de los límites recomendados para la especie (10 mL/kg).

Para el estudio de dosis únicas, se realizó una sola administración oral mediante entubación gástrica entre las 8:00 y 10:30 a.m. y con 90 min de antelación a la realización de las pruebas, mientras que para la de dosis repetidas, se realizó una administración oral diaria mediante entubación gástrica en el horario comprendido de 8:00 a 10:30 a.m. El tratamiento se llevó a cabo durante 30 d, a razón de 6 d por semana y la última administración se realizó entre las 16 y las 24 h previas a la prueba conductual.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales (10 animales/grupo): Cuatro tratados con D-003 (5, 25, 100 y 400 mg/kg) y uno control que solo recibió volúmenes equivalentes del vehículo goma acacia-agua.

### Ensayos y mediciones realizadas

Las pruebas conductuales se realizaron en el horario comprendido entre las 8:30 y las 12:00 a.m. Para las diferentes conductas a evaluar se utilizaron los métodos siguientes:

#### Actividad exploratoria en campo abierto

La conducta se evaluó según una modificación del método de campo abierto de Fernández y col.<sup>20</sup> en el cual, se cuantificó el número de paradas (P) y de cruces (C) a través de

un círculo central que el animal realiza dentro del dispositivo experimental en un tiempo fijo (6 min). La actividad exploratoria total se consideró la suma de P + C.

**Ensayo de plato caliente**

El posible efecto sobre la respuesta a estímulos nociceptivos se desarrolló mediante una modificación del método de Holzer y col.<sup>21</sup> Para ello, se cuantificó la latencia de las respuestas al dolor [lamido de las patas y(o) salto] inducido por el estímulo doloroso causado por el calor (57 ± 2) °C. El ensayo se daba por terminado cuando el animal no respondía a ninguna de las formas señaladas en un tiempo de 60 s. En este estudio, se analizaron los resultados de la latencia de las respuestas en el plato caliente.

**Sujeción y ejecución motora en varilla rotatoria**

El ensayo se realizó mediante una modificación del método descrito por Cougenhour y col.<sup>22</sup> Su esencia consiste en colocar al ratón en el extremo de una rejilla (13 X 13) cm que se coloca fija mediante un brazo perpendicular (9 X 1,5) cm a una varilla rotatoria central (130 X 1,5) cm, de modo que en cada una se encuentran dispuestas seis rejillas que permiten ensayar seis animales al mismo tiempo. Se realiza un giro de 180° a 15 r/min y se cuantifica la cantidad de animales que se caen y la que no alcanzan el lado opuesto de la rejilla. Antes de realizar la experiencia, todos los animales se evalúan en esta prueba para descartar los que presenten posible afectaciones que le impidan ejecutar esta maniobra. En esta prueba se compara el porcentaje de animales tratados que caen y los que no pasan al otro lado de la malla con respecto a los del grupo control.

La prueba de evitación pasiva de una sola prueba, se realizó según el método de Bartus.<sup>23</sup> El experimento se realizó en una caja plástica iluminada de (20 X 20 X 20) cm conectada a una caja oscura (10 X 10 X 10) cm por una puerta de guillotina. El compartimiento oscuro tiene una rejilla electrificada en el piso. La corriente se suministró por una fuente de corriente constante. Los ratones fueron entrenados mediante una sola prueba de aprendizaje. La entrada al compartimiento oscuro usualmente ocurre dentro del minuto e inmediatamente, se baja la puerta de guillotina y los ratones reciben un shock eléctrico (0,5 mA durante 3 s). A las 24 h (sesión de prueba), el mismo ratón se coloca en la caja iluminada. Los animales que permanecen por más de 60 s en el compartimiento claro se consideran como que recuerdan la tarea. La retención se cuantificó por la cantidad de animales que evitaron el compartimiento oscuro (porcentaje de evitación). Por otra parte, se midió la latencia de entrada al compartimiento oscuro el día del entrenamiento.

**Análisis estadístico**

**Actividad exploratoria y respuesta en plato caliente.** Las comparaciones de las variables P, C y P + C, así como del t de latencia en el plato caliente de los grupos tratados con los controles, se realizaron según la prueba de la U de Mann Whitney. Además, para ver variaciones en el tiempo dentro de cada grupo los resultados se analizaron con la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

**Sujeción-ejecución en varilla.**

Las comparaciones entre grupos de la frecuencia (%) de animales que se

caen de la varilla y los que no pasan al otro lado, se realizaron mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher.

**Evitación pasiva de una sola prueba.** Las comparaciones entre grupos de la latencia de entrada al compartimiento oscuro el día del entrenamiento se realizaron mediante la prueba de la U de Mann Whitney de doble cola. Las comparaciones entre grupos de la frecuencia de animales que evitaron el compartimiento oscuro el día de la prueba, se realizaron mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher de doble cola.

Todos las pruebas utilizadas fueron de doble cola. Un  $\alpha = 0,05$  se asumió *a priori* para la significación estadística y los datos se procesaron por el paquete de programas estadístico Statistics para Windows.

**RESULTADOS**

**Efectos sobre la actividad exploratoria**

La administración de D-003 (5 a 100 mg/kg) no produjo modificación de la actividad exploratoria, mientras que la dosis de D-003 (400 mg/kg) incrementó significativamente las paradas y la actividad exploratoria total de los ratones respecto a los valores basales, así como con respecto al grupo control. El número de cruces a través del círculo central no se modificó en ninguno de los grupos. El incremento de la actividad exploratoria total (P + C) a la mayor dosis ensayada se produjo como consecuencia de un aumento en el número de paradas (Tabla 1).

**Efectos sobre la respuesta al plato caliente**

La administración de dosis orales únicas y repetidas de D-003 (5 a

**Tabla 1.** Efectos de dosis orales únicas y repetidas del D-003 sobre la actividad exploratoria en ratones OF-1.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	P		C		P + C	
		(X ± DE)					
		Basal Dosis únicas	30 d Dosis repetidas	Basal Dosis únicas	30 d Dosis repetidas	Basal Dosis únicas	30 d Dosis repetidas
Control	0	48,4 ± 14,2	58,3 ± 18,1	7,1 ± 6,3	9,7 ± 5,2	55,5 ± 19,6	68,0 ± 21,9
D-003	5	55,6 ± 21,4	57,0 ± 20,6	9,5 ± 4,5	8,5 ± 3,7	65,1 ± 24,3	65,5 ± 22,5
D-003	25	57,2 ± 12,8	64,1 ± 11,7	9,2 ± 2,9	10,2 ± 4,4	66,4 ± 14,6	74,3 ± 13,7
D-003	100	55,2 ± 10,8	64,2 ± 15,2	8,7 ± 4,0	9,6 ± 5,0	64,0 ± 11,2	73,9 ± 18,2
D-003	400	59,6 ± 10,2 <sup>+</sup>	77,1 ± 11,8 <sup>***</sup>	8,5 ± 3,8	12,1 ± 4,8	68,1 ± 13,3 <sup>+</sup>	89,2 ± 14,0 <sup>***</sup>

X Media. DE Desviación estándar. P Paradas. C Cruces a través del círculo central. P + C Actividad exploratoria total.

<sup>\*\*\*</sup>p = 0,01 Comparación con los valores basales (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

<sup>+</sup>p < 0,05 Comparación con el control (prueba de la U de Mann Whitney).

400 mg/kg) no modificó el tiempo de latencia de la respuesta al estímulo nociceptivo ensayado, lo que implica que el tratamiento no afecta la respuesta al plato caliente (Tabla 2).

Sin embargo, en todos los grupos experimentales, excepto en el tratado con la dosis inferior de D-003, se observó una disminución significativa del tiempo de latencia de la respuesta al estímulo doloroso cuando se compararon los valores obtenidos a los 30 d con los iniciales.

Además, se produjo una conversión en la naturaleza de la respuesta, ya que mientras en el primer día la primera respuesta siempre consistió en el lamido de las patas, en la sesión realizada a los 30 d de tratamiento esta consistió en el salto. Estos cambios indican, al menos parcialmente, el resultado del aprendizaje de la respuesta de evitación a un estímulo doloroso, así como la ejecución de una respuesta más compleja ante el estímulo motivada por el mayor tiempo y madurez de los animales.

### Efectos sobre la sujeción y ejecución motora de ratones en varilla rotatoria

La administración oral de D-003 (5 a 400 mg/kg) como dosis únicas o repetidas no afectó significativamente el porcentaje de ratones que se sujetan de la rejilla y(o) pasan al otro lado, lo que implica que no afectó su capacidad de sujeción y ejecución en estas condiciones (Tabla 3).

### Efectos sobre evitación pasiva de una sola prueba

Los animales tratados con D-003 (5 a 400 mg/kg) mostraron una latencia de entrada al compartimiento oscuro similar al grupo control, el día del entrenamiento (Tabla 4) y por otra parte, el porcentaje de animales que evitó el compartimiento oscuro el día de la prueba (porcen-

**Tabla 2.** Efectos de dosis orales únicas y repetidas del D-003 sobre la latencia (s) de la respuesta en plato caliente en ratones OF-1.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Basal (Dosis únicas)	30 d (Dosis repetidas)
Control	0	11,60 ± 3,75	5,00 ± 2,74*
D-003	5	11,60 ± 4,17	7,90 ± 4,86
D-003	25	9,60 ± 2,84	4,90 ± 3,03*
D-003	100	10,50 ± 3,34	4,75 ± 1,98*
D-003	400	11,80 ± 3,99	6,44 ± 3,21**

X Media. DE Desviación estándar. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 Comparación con los valores basales (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas).

taje de retención del aprendizaje), también resultó similar al del grupo control (Tabla 4).

### DISCUSION

El objetivo fundamental de un estudio neurofarmacológico consiste en determinar la acción farmacológica y el modo de acción de una sustancia cuya actividad fundamental se ejerza sobre el SN cuando se administra en dosis dentro del intervalo dosis-respuesta de su acción farmacodinámica. Por sus características, la mayoría de los estudios neurofarmacológicos se orientan hacia el estudio de variables funcionales agudas que suelen ser reversibles.<sup>24</sup>

En cambio, los estudios neurotoxicológicos enfatizan más en las alteraciones de las funciones y estructuras del SN producidas por cualquier sustancia de estudio, particularmente, administradas hasta dosis lo suficientemente elevadas que permitan descartar cualquier efecto deletéreo, independientemente del órgano, proceso o sistema que constituya su blanco primario de acción. Así, en los estudios neurotoxicológicos se insiste en la búsqueda de alteraciones funcionales del tejido nervioso que, por su intensidad y(o) carácter irreversible, sean indicativas de toxicidad

asociada a la sustancia en cuestión y consideradas como un efecto no deseado.<sup>24, 25</sup>

Sin embargo, aún es insuficiente la comprensión de los mecanismos y relaciones estructura-actividad involucradas en la neurotoxicidad, por lo cual, no existe una única clasificación de los agentes neurotóxicos en función del daño que inducen, ya que en su mayoría, las acciones de las sustancias neurotóxicas implican daño o disfunción de diferentes partes del SN y no de un blanco de acción aislado.<sup>25</sup> Los agentes neurotóxicos pueden tener sitios de acción primario o secundario y clasificarse de acuerdo con las afectaciones que inducen en sensoriales, motoras, periféricas (sensoriales y motoras) y centrales (integrativas o conductuales).<sup>26</sup>

El método generalmente más útil para detectar una posible acción neurotóxica de una sustancia consiste en la observación cuidadosa, sistemática y planificada de los animales durante los estudios de toxicidad a dosis únicas y repetidas. Así, el uso de diferentes métodos de evaluación ha sido utilizado en las observaciones realizadas en los estudios de toxicidad, como etapa inicial de evaluación de la neurotoxicidad potencial de una sustancia.<sup>27-29</sup> La periodicidad de esta evaluación va-

**Tabla 3.** Efectos de dosis orales únicas del D-003 sobre la sujeción y ejecución motora de ratones OF-1 en varilla rotatoria.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Animales que se caen (n)		Animales que no pasan (n)	
		Basal (Dosis únicas)	30 d (Dosis repetidas)	Basal (Dosis únicas)	30 d (Dosis repetidas)
Control	0	0	0	0	0
D-003	5	0	0	0	0
D-003	25	0	1	0	2
D-003	100	0	0	0	0
D-003	400	0	0	0	0

Todas las comparaciones resultaron no significativas (prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

**Tabla 4.** Efecto de dosis orales únicas y repetidas sobre una tarea de evitación pasiva de una sola prueba.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Animales/grupo	Latencia de entrada (X ± DE) Dosis únicas	Porcentaje de evitación
Control	0	10	24,9 ± 23,0	90
D-003	5	10	22,6 ± 22,4	100
D-003	25	10	22,8 ± 19,9	100
D-003	100	10	22,2 ± 22,2	90
D-003	400	10	20,0 ± 21,3	100
Dosis repetidas				
Control	0	10	23,1 ± 21,2	90
D-003	5	10	23,2 ± 20,9	100
D-003	25	10	21,6 ± 25,1	100
D-003	100	10	23,8 ± 22,5	90
D-003	400	10	26,2 ± 22,8	100

Ninguna de las comparaciones con el grupo control fue significativa. (pruebas de la U de Mann Whitney y de la Probabilidad Exacta de Fisher).

ría en los diferentes ensayos de toxicidad a dosis únicas y repetidas.

Dentro de estos aspectos, se encuentra la evaluación de la actividad locomotora del animal que incluye desde la observación de su intensidad hasta la detección de afectaciones en la marcha. Además, se evalúan reflejos tales como el de enderezamiento, agarre, alerta o escape, respuesta al dolor, sujeción en varilla, respuesta de la pupila y la presencia de signos como la salivación, lacrimo, convulsiones, temblores, piloerección, estereotipias, inactividad general, catalepsia, diarreas, entre otros.

Sin embargo, esto se enriquece con la realización de estudios específicos de conductas espontáneas o provocadas que permiten cuantificar las conductas observadas como eventos acumulados o como porcentaje de animales que realizan una conducta en un tiempo dado. Estos estudios no sólo son de gran utilidad, sino que constituyen los métodos de evaluación de primera opción, ya que la conducta es la respuesta integral del organismo ante los diferentes estímulos que sobre él actúan.

El presente estudio constituye el primer reporte de que el D-003 administrado en dosis orales únicas o repetidas (400 mg/kg) incrementa significativamente las paradas y la actividad exploratoria total respecto a los valores basales y al grupo control, ya que dosis inferiores (5 a 100 mg/kg) no modifican estos indicadores. El incremento en el número de paradas a la mayor dosis ensayada pudiera deberse a un au-

mento del estado de alerta de los animales.

La actividad exploratoria es la conducta espontánea del animal ante un medio que le resulta novedoso y es una de las más utilizadas en la evaluación de efectos sobre el SN Central.<sup>30</sup> Esta conducta incluye dos componentes: las paradas del animal, que se vinculan más específicamente a la conducta exploratoria o inquisitiva frente a un nuevo escenario que revela la respuesta coordinada central frente a dicho estímulo y que involucra parte del estado de alerta del animal ante lo desconocido. Por otra parte, las cruces a través del círculo central, si bien también se relacionan con los desplazamientos necesarios para abarcar el universo de exploración del animal, son una expresión más directa de la actividad locomotora del animal.

La ausencia de afectación de la respuesta de plato caliente por el tratamiento con D-003 indica que este no produce afectación de los eventos sensitivos y motores implicados en esta respuesta. De igual modo, el tratamiento con dosis únicas y repetidas de D-003 tampoco afectó los eventos involucrados en la coordinación y ejecución motora requeridos en el ensayo de la varilla rotatoria ni en los aspectos relacionados con la retención del aprendizaje en el ensayo de evitación pasiva.

En su conjunto, estos resultados indican que el D-003 no induce efectos neurotóxicos, ya que el único efecto observado en los ensayos realizados fue un incremento signifi-

cativo, pero modesto y sólo manifestado a la dosis mayor administrada. Esta apreciación es compatible con los resultados de los diversos estudios toxicológicos del D-003 realizados en roedores, incluso los de largo plazo, en los que no se evidenciaron alteraciones en las conductas espontáneas de los animales ni aparición de conductas bizarras ni afectaciones histológicas en las estructuras del SN.

No obstante, el efecto observado resulta de interés y sugiere profundizar en los posibles efectos farmacológicos del D-003 sobre el SN, incluyendo la evaluación de conductas inducidas por agentes que induzcan patrones típicos, en las que se evalúe la posible presencia de fenómenos de antagonismo, adición y(o) potenciación de efectos.

## CONCLUSIONES

El D-003 administrado por vía oral a dosis únicas y repetidas (400 mg/kg) a ratones OF-1 incrementa significativamente y modestamente la actividad exploratoria. El D-003 (5 a 400 mg/kg) no modifica la respuesta a estímulos nociceptivos en el ensayo de plato caliente, la sujeción y ejecución motora en una varilla rotatoria ni la retención del aprendizaje en un ensayo de evitación pasiva de una sola prueba. Teniendo en cuenta el nivel de integración que requiere esta conducta animal, estudios ulteriores deberán profundizar en este efecto, el cual pudiera representar la base de potenciales efectos secundarios, beneficiosos o adversos para su uso en humanos.

## BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A. and col. Inventors, Laboratorios DALMER S.A, assignee. Mixture of primary fatty acids of high molecular weight obtained from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. Republic of South Africa patent 98:2744, Dec. 30, 1998.
- Gámez R., Mendoza S., Más R., Mesa R., Castaño G., Rodríguez B., Marrero D. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. **Current Therapeutic Research**, **61**, 460-468, 2000.
- Mendoza S., Gámez R., Noa M., Más R., Castaño G., Mesa R., Mesa M., de Armas M. Comparison of the effects of D-003 and policosanol on the lipid profile and endothelium cells in normocholesterolemic rabbits. **Current Therapeutic Research**, **62**, 209-220, 2001.
- Castaño G., Más R., Fernández L., Illnait J., Gámez R., López E., Gutiérrez J.A., Fernández J.C., Alvarez E. Assessment of the effects of D-003, a new antiplatelet and lipid-lowering

- compound in healthy volunteers: a phase I clinical study. **Drugs R&D**, **3**, 337-348, 2002.
5. 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. **Clinical Drug Investigation**, **23**, 193-203, 2003.
  6. Menéndez R., Más R., Amor A., Rodeiros I., González R.M., Alfonso J.L. Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Pharmacological Research**, **44**, 299-304, 2001.
  7. Menéndez R., Más R., Amor A.M., Ledón N., Pérez J., González R.M., Rodeiro I., Zayas M., Jiménez S. Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, **80**, 13-21, 2002
  8. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. **Pharmacological Research**, **42**, 137-143, 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. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **67**, 19-24, 2002.
  10. Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Molina V., Castaño G. Effects of D-003, a new compound purified from sugarcane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers. A randomized double-blind clinical study. **Clinical Drug Investigation**, **23**, 107-118, 2003.
  11. Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis models. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **68**, 305-310, 2003.
  12. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Noa M., Molina V., Más R., Arango E., Valdés S., González J. Protective effect of D-003 on experimental spinal cord ischemia in rabbits. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **70**, 1-6, 2004.
  13. Gámez R., Más R., Noa M., Menéndez R., Alemán C., Acosta P., García H., Hernández C., Amor A., Pérez J., Goicochea E. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. **Toxicology Letters**, **118**, 31-41, 2000.
  14. Gámez R., Más R., Noa M., Menéndez R., García H., González J., Pérez Y., Goicochea E. Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. **Drug R&D**, **3**, 375-386, 2002.
  15. Gámez R., Rodeiro I., Fernández I., Acosta P.C. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: mixture of very long chain fatty acids. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, **22**, 175-181, 2002.
  16. Gámez R., González J.E., Rodeiro I., Fernández I., Alemán C., Rodríguez M.D., Acosta P.C., García H. *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long chain aliphatic acids. **Journal of Medicinal Food**, **4**, 85-92, 2001.
  17. 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 and Chemical Toxicology**, **41**, 89-93, 2003.
  18. Alder S., Candrian R., Elsner J. Neurobehavioral screening in rats: A validation study. **Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.**, **8**, 279-289, 1986.
  19. Tilson H. Behavioral indices of neurotoxicity. what can be measured? **Neurotoxicol. Teratol.**, **1**, 427-443, 1987.
  20. Fernández L., Pérez H., Más R. Efectos de *Justicia pectoralis* sobre la conducta exploratoria en ratones. En *Estudios Avanzados en Neurociencias*. Ed. CENIC, Ciudad de La Habana, 257-264, 1987.
  21. Holzer P., Jurna I., Gambe R. Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment. **European Journal of Pharmacology**, **58**, 511-514, 1979.
  22. Coughenour L., Mac Lean J., Parker R. A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice. **Pharmacology and Biochemical Behavior**, **6**, 351-353, 1977.
  23. Bartus R.T. The one trial single passive avoidance procedure as a possible marker of aging Chapter 10. En *Biological Markers of Aging*. Reff M.E. and Schneider E.L. Ed. NIH publication 82, 221-230, 1982.
  24. Chang L.W., Slikker W. *Neurotoxicology: Approaches and Methods*. Academic Press, San Diego, 1995.
  25. Domer F.R. *Animal Experiments in Pharmacological Analysis*. Ed. Springfield I.L., Tomas C.C., 98-220, 1971.
  26. Gad S.C. *Neuro and Behavioral Toxicology Testing*. En *Product Safety Evaluation Handbook*. Ed. Gad S.C. Marcel Dekker Inc. New York-Base, 223-242, 1999.
  27. Irwin S. *Drug screening and evaluation of new compounds in animals. Animal and clinical pharmacologic techniques*. En *Drug Evaluation* Ed. Nodine J. and Siegler P. Year Book Medical Publishers, Chicago, 36-54, 1964.
  28. Gad S.C. A sensory/neuro screen for use in industrial toxicology. **Toxicologist**, **1**, 150-153, 1981.
  29. Mitchel C.L., Tilson H.A. Behavioral toxicology in risk assessment: Problems and research needs. **Critical Rev. Toxicol.**, **10**, 265-274, 1982.
  30. Shillito E.E. A method for investigating the effect of drugs on the exploratory behavior of mice. **British Journal of Pharmacology**, **40**, 113-116, 1970.



## 6. CUBAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS

### 1. CUBAN CONGRESS OF CLINICAL TRIALS 3. WORKSHOP ON PHARMACOEPIDEMOLOGY

## CUBAN SOCIETY OF PHARMACOLOGY

Medical University of Santiago de Cuba, November 21st - 25th, 2005.

**Abstracts should be sent before June 30th, 2005 to:** [farmacologia2005@sierra.scu.sld.cu](mailto:farmacologia2005@sierra.scu.sld.cu)

**For further information:** <http://www.scf.sld.cu/html/congreso/espanol/congreso2005.htm>

**Correspondence:**

**Dra. Doris Perdomo Leyva**

**Dr. Leonardo Ramos Hernández**

**Telephone: 53-22-653 011 ext. 256; Fax: 53-22-686 200**

**E-mails: [doris@sierra.scu.sld.cu](mailto:doris@sierra.scu.sld.cu) and [leonardo@sierra.scu.sld.cu](mailto:leonardo@sierra.scu.sld.cu)**