

## Carcinogenicidad del D-004 en ratas Sprague Dawley: informe parcial a los 18 meses

### Carcinogenicity of D-004 in Sprague Dawley rats: a partial report at 18 months

Dra. C. Ariadne Gutiérrez Martínez, Dr. C. Rafael Gámez Menéndez, Dra. C. Rosa Mas Ferreiro, Dra. C. Miriam Noa Puig, MSc. Maikel Valle Clara, Dr. Carlos Nodal Flores

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción.** el D-004, extracto lipídico del fruto de *Roystonea regia* (palma real), constituido por una mezcla reproducible de ácidos grasos -principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico- ha mostrado ser efectivo en modelos experimentales de hiperplasia prostática.

**Objetivo.** resumir los resultados parciales (18 meses) del estudio de carcinogenicidad por exposición repetida y prolongada del D-004 en ratas Sprague Dawley, el cual culminará al concluir el tiempo establecido (24 meses).

**Métodos.** ratas Sprague Dawley de uno y otro sexo fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos (50 ratas/sexo/grupo): uno control de vehículo y tres tratados con D-004 (500, 1000 y 1500 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos se administraron oralmente por intubación gástrica. Este reporte incluye los resultados de peso corporal, observaciones clínicas, mortalidad y frecuencia de aparición de tumores hasta ese momento (18 meses).

**Resultados.** la frecuencia de mortalidad es baja: en los grupos tratados fue de un 8,3 % por un 9 % en los controles. No se evidencia una disminución en el tiempo de supervivencia y las observaciones diarias no revelaron signos indicativos de toxicidad atribuibles al tratamiento. Además, el momento de aparición de tumores y la frecuencia de estos en los animales tratados y en los controles fueron estadísticamente similares en ambos sexos.

**Conclusiones.** en conclusión, la administración oral de D-004 (500-1500 mg/kg) a las ratas no mostró, durante los primeros 18 meses del estudio, evidencias de toxicidad o carcinogenicidad temprana relacionadas con el tratamiento.

**Palabras clave:** D-004, *Roystonea regia*, ácidos grasos libres, hiperplasia prostática, ratas, carcinogénesis.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** D-004, a lipid extract from royal palm (*Roystonea regia*) fruit constituted by a reproducible mixture of fatty acids, mainly oleic, palmitic, lauric and myristic, has shown to be effective in experimental models of prostate hyperplasia.

**Objective:** summarize the partial results (18 months) of the study on carcinogenicity by repeated and long-term exposure of Sprague Dawley rats to D-004, to be completed in the planned period of 24 months.

**Methods:** sprague Dawley rats of both sexes were randomly distributed into four groups (50 rats / sex / group): one group was the vehicle control and three were treated with D-004 (500, 1000 and 1500 mg/kg, respectively). Treatments were administered orally by gastric intubation. This report includes the results obtained so far (18 months) concerning body weight, clinical observations, mortality and frequency of appearance of tumors.

**Results:** mortality is low: 8.3% in treatment groups and 9% in controls. A reduction in survival time was not observed, and daily observations did not reveal any signs of toxicity attributable to the treatment. The time of appearance and the frequency of tumors in treated animals and controls were statistically similar in both sexes.

**Conclusions:** oral administration of D-004 (500–1500 mg/kg) to rats during the first 18 months of the study did not show any evidence of early carcinogenicity or toxicity associated with the treatment.

**Key words:** D-004, *Roystonea regia*, free fatty acids, prostatic hyperplasia, rats, carcinogenesis.

---

## INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una afección de alta prevalencia en los hombres mayores de 50 años. Causa eventos adversos considerables para la salud, y su frecuencia aumenta con la edad.<sup>1</sup> Consiste en un crecimiento incontrolado del tejido prostático que involucra los elementos estromales y epiteliales de la glándula, su origen es multifactorial. Una de las causas fundamentales del incremento del tamaño de la próstata con la edad es el aumento de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática, enzima que transforma la testosterona (T) en su metabolito más activo, la dihidrotestosterona (DHT). Esta última, al unirse a los receptores androgénicos, promueve la proliferación de factores de crecimiento celular.<sup>1</sup> Por otra parte, los síntomas de la enfermedad se encuentran influidos por el aumento del tono de la musculatura lisa de la vejiga y la próstata, regulado por los  $\alpha$ 1-adrenoreceptores ( $\alpha$ 1-ADR).<sup>2</sup>

El tratamiento de la enfermedad abarca, según la gravedad, desde la vigilancia atenta hasta la cirugía, pero la terapia farmacológica es la más utilizada. Esta terapia se basa fundamentalmente en el empleo de dos clases terapéuticas: los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa prostática (finasteride, dutasteride),<sup>3</sup> y los antagonistas de los ADR- $\alpha$ 1 (alfuzosin doxazosin, prazosin, terazosin, tamsulosin).<sup>2</sup>

El tratamiento de la HPB también incluye la fitoterapia, y el agente más conocido y estudiado es el extracto lipídico de los frutos *Serenoa repens* (saw palmetto, ELSP).<sup>4</sup> El modo de acción del saw palmetto incluye diversos mecanismos, ya que inhibe la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa prostática, bloquea los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos<sup>5</sup> y además posee efectos antiinflamatorios y antiproliferativos.<sup>6,7</sup>

La *Roystonea regia* (palma real) es la palmácea más abundante en Cuba y presenta similitudes taxonómicas con el saw palmetto. El D-004 es un extracto lipídico del fruto de la palma real, constituido por una mezcla de ácidos grasos -principalmente oleico, palmítico, láurico y mirístico-<sup>8</sup> que ha mostrado prevenir la hiperplasia prostática (HP) inducida con T en los roedores y que, como el ELSP, actúa mediante un mecanismo multifactorial que implica la inhibición de 5 $\alpha$ -reductasa prostática,<sup>9-11</sup> el antagonismo de las respuestas mediadas por los  $\alpha$ 1-ADR,<sup>12,13</sup> y efectos antiinflamatorios y antioxidantes.<sup>4,15</sup> Tal similitud es consistente con la de las composiciones de los extractos lipídicos de los frutos de *Roystonea regia* y *Serenoa repens*. Tales antecedentes, unidos a los resultados obtenidos en los primeros estudios clínicos del D-004 que mostraron sus efectos antioxidantes en voluntarios sanos<sup>16</sup> sustentan la necesidad de desarrollar la evaluación toxicológica de esta sustancia.

El D-004, en dosis de hasta 2000 mg/kg no reveló toxicidad en los estudios de dosis únicas y repetidas a corto y largo plazo, administradas por vía oral.<sup>17-21</sup> Tampoco mostró potencial citotóxico o mutagénico en ninguno de los sistemas empleados, entre los cuales se incluye el ensayo de Ames, el ensayo cometa, el ensayo de micronúcleos en medula ósea de roedores, aberraciones cromosómicas *in vitro* e *in vivo* y el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide.<sup>22-27</sup> Por otra parte, otros estudios han demostrado que el D-004 no posee efectos estrogénicos o antiestrogénicos,<sup>9,29</sup> no modifica la actividad sexual en la rata macho,<sup>30</sup> ni diversos patrones conductuales en los roedores.<sup>31</sup> El tratamiento con D-004 no afectó la fertilidad y la reproducción en ratas,<sup>32</sup> ni produjo efectos embriotóxicos o teratogénicos en conejos, administrado en dosis de hasta 1000 mg/kg.<sup>33</sup>

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos luego de 18 meses de tratamiento en el estudio de carcinogenicidad inducida a largo plazo (24 meses) por la administración oral de D-004 a ratas Sprague Dawley (SD) son un aporte al conocimiento de la toxicidad por exposición repetida y prolongada a esta sustancia, presentamos un reporte parcial en ese intervalo de tiempo. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo es resumir los resultados parciales (18 meses) del estudio de carcinogenicidad por exposición repetida y prolongada del D-004 en ratas Sprague Dawley, el cual culminará al concluir el tiempo establecido (24 meses).

## MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas SD de uno y otro sexo (75 y 110 g), de 7 semanas de edad, provenientes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (La Habana, Cuba). Fueron colocadas en cajas para roedores (tres ratas por jaula) y mantenidas en cuarentena durante 7 días para su adaptación a las condiciones experimentales que se mantuvieron durante el estudio: temperatura 23  $\pm$  2 °C, humedad relativa del 60  $\pm$  10 % y 12 h de ciclos de luz y oscuridad. Los animales tuvieron acceso libre al agua. Como alimento se suministró pienso convencional para roedores, proveniente del CENPALAB, el cual se administró en función del peso corporal promedio (10 % del peso) durante las primeras 13 semanas. A partir de la semana 14 la cantidad administrada a los animales se restringió al hasta el final del estudio.

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de animales de laboratorio, recomendados internacionalmente y en la República de Cuba, y en correspondencia con las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Centro de Productos Naturales.

### Administración y dosificación

El D-004 utilizado en los estudios fue suministrado por el Departamento de Química Farmacéutica del Centro de Productos Naturales, y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. Su composición y pureza fueron determinadas mediante un método validado de cromatografía gaseosa.<sup>34</sup>

Para su administración en el D-004 se preparó diariamente como emulsión en un vehículo Tween 65/H<sub>2</sub>O al 2 %. Las emulsiones por emplear se prepararon 2 h antes de su utilización, tras corroborar su estabilidad y homogeneidad mediante cromatografía gaseosa.<sup>35</sup> Se realizaron los ajustes de la dosis según el peso corporal semanal.

El D-004 se administró por vía oral por ser esta es la ruta propuesta para su uso terapéutico, una vez al día (entre las 9:00 y 11:30 a.m.) (5 días/semana), frecuencia aceptada para estos estudios. Los resultados aquí reportados corresponden a los de la administración realizada durante 18 meses consecutivos.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (50 ratas/sexo/grupo): uno control de vehículo y tres tratados con D-004 (500, 1000 y 1500 mg/kg, respectivamente). Los tratamientos se administraron oralmente por intubación gástrica (2 mL/kg). La dosis mayor estudiada es 300 veces superior que la dosis propuesta para su uso en los seres humanos (320 mg/día, aprox. 4,6 mg/kg).

### Exámenes realizados

*Peso corporal.* El peso corporal se controló al inicio (día previo al comienzo del tratamiento), semanalmente hasta la semana 13, y mensualmente desde la semana 14 hasta los 18 meses.

*Consumo de alimentos.* El consumo de alimentos se controló dos veces a la semana durante las primeras 13 semanas y una vez al mes a partir de la semana 14.

*Observaciones diarias.* Los animales fueron observados diariamente en tres momentos: en la mañana (8:30 a 11:30 a.m.) se realizó una inspección minuciosa de cada animal; y entre las 2:00 y 3:00 p.m. y las 5:00 y 6:00 p.m. se registró cualquier cambio en la condición vital de cada animal. Estas observaciones perseguían detectar cualquier signo clínico de toxicidad, así como la posible aparición temprana de tumores palpables, animales moribundos o mortalidad.

### Eutanasia

La eutanasia se practicó a todos los animales que manifestaron deterioro notable de salud, incluida la pérdida de peso mayor de un 10 % durante el estudio. Fueron anestesiados en una atmósfera de éter, y posteriormente desangrados. Hasta el corte de 18 meses solo se había practicado la eutanasia de nueve animales (cuatro

controles y cinco tratados). Todos presentaban pérdida de peso y deterioro general, y seis de ellos mostraban tumores evidentes al tacto.

### **Análisis histopatológico**

Se realizó la necropsia a todos los animales muertos por eutanasia o espontáneamente, y se evaluó *in situ* la presencia de lesiones macroscópicas en órganos y cavidades. En este reporte se incluyen las observaciones microscópicas de los animales necropsiados y su diagnóstico. Se utilizó la denominación "tumores palpables" en los animales vivos con tal manifestación y la de "tumores" para los confirmados en la necropsia. El momento de detección de las masas o tumores palpables fue la primera fecha en que se registró su detección.

### **Evidencia temprana de carcinogenicidad asociada al D-004**

En este reporte se consideró como una evidencia temprana de carcinogenicidad relacionada con el tratamiento el aumento significativo de la frecuencia de mortalidad, la reducción del tiempo de supervivencia o el incremento de la frecuencia total de tumores (por sexo o en total) en los animales tratados con respecto a los controles hasta los 18 meses de tratamiento.

### **Análisis estadístico**

Según lo establecido, la esencia de este tipo de estudios es el análisis de supervivencia y de aparición de tumores. El análisis de supervivencia del estudio total se hará según el modelo de regresión de Cox.

El análisis de las lesiones incluyó la incidencia total de animales con tumores, la incidencia total de tumores y el período de latencia hasta la aparición de tumores. Las variables continuas (peso corporal y consumo de alimentos) se compararon por la prueba de Levene y las diferencias se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA). Si se encontraron efectos significativos, las diferencias se evaluaron por la prueba de Tukey. De no existir homogeneidad de varianza fueron analizadas por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Por su parte, las variables categóricas se analizaron mediante la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Las pruebas utilizadas fueron de doble cola. Un  $\alpha = 0,05$  se asumió *a priori* para la significación estadística. Los resultados se analizaron con el paquete de programas Estadística para Windows.

## **RESULTADOS**

### **Análisis de la mortalidad**

En los primeros 18 meses de estudio se produjeron 34 muertes (8,5 %), distribuidas como refleja la tabla 1. La eutanasia se practicó en nueve casos, los cuales presentaban signos tales como pérdida de peso, reducción del consumo de alimentos, deterioro general, poca respuesta a estímulos y disnea marcada. Tres de ellos tenían lesiones tumorales evidentes al tacto y sangramiento, por lo que presentaban mucosas pálidas y debilidad.

**Tabla 1.** Mortalidad (%) y tiempo de supervivencia [X ± DE] en ratas SD a los 18 meses de tratamiento

Grupos	Dosis (mg/kg)	Hembras	Machos	Total
Control	0	6/50 (12 %) [543,92 ± 38,36]	3/50 (6 %) [546,76 ± 34,69]	9/100 (9 %) [545,34 ± 36,41]
D-004	500	7/50 (14 %) [539,20 ± 41,10]	2/50 (4 %) [551,44 ± 8,62]	9/100 (9 %) [545,32 ± 30,18]
	1000	3/50 (6 %) [548,64 ± 21,25]	1/50 (2 %) [552,36 ± 4,53]	4/100 (4 %) [550,50 ± 15,40]
	1500	7/50 (14 %) [546,06 ± 20,26]	5/50 (10 %) [544,18 ± 36,19]	12/100 (12 %) [545,12 ± 29,19]

La mortalidad se comportó de modo similar en los grupos tratados y controles en ambos sexos: nueve muertes (9,0 %) ocurrieron en las ratas controles (seis hembras, tres machos), nueve (8,3 %) en las ratas tratadas; con 500 mg/kg (siete hembras, dos machos), cuatro en las tratadas con 1000 mg/kg (tres hembras, un macho) y 12 en las tratadas con 1500 mg/kg (siete hembras, cinco machos). La primera muerte ocurrió en un macho control pasados los 10 meses de tratamiento.

La comparación entre grupos de las frecuencias de mortalidad hasta los 18 meses de tratamiento por sexo y total no reveló diferencias significativas entre los grupos tratados y el control. Un análisis de supervivencia revela que la mortalidad y el tiempo de supervivencia en los animales tratados y los controles tuvieron un comportamiento similar. Un análisis por sexo reveló un comportamiento similar, sin diferencias entre animales tratados y controles (v. tabla 1).

#### Signos de toxicidad

Las observaciones diarias no revelaron signos de toxicidad, aparecieron en animales de uno y otro sexo y de todos los grupos, y se relacionaron con eventos aislados de lesiones por mordeduras, cambios en las deposiciones, lesiones en las extremidades inferiores, alopecia y tumores evidentes al tacto en los animales que murieron o fueron sacrificados antes de los 18 meses, así como en algunos que aún permanecen en estudio. La tabla 2 resume las lesiones evidentes al tacto en los animales que aún continúan en el estudio, presentes al culminar los 18 meses de tratamiento.

**Tabla 2.** Total de animales vivos con lesiones (%) y tiempo de aparición [X ± DE] de posibles tumores al término de 18 meses de tratamiento

Grupos	Dosis (mg/kg)	Hembras	Machos	Total
Control	0	15/44 (34,1 %) [506,98 ± 80,43]	4/47 (8,5 %) [536,82 ± 53,82]	18/91 (19,8 %) [521,90 ± 69,72]
D-004	500	7/43 (16,3 %) [518,74 ± 86,23]	2/48 (4,2 %) [549,78 ± 18,30]	9/91 (9,9 %) [534,26 ± 63,95]
	1000	10/47 (21,3 %) [515,92 ± 79,29]	2/49 (4,1 %) [549,74 ± 16,33]	12/96 (12,5 %) [532,83 ± 59,43]
	1500	8/43 (18,6 %) [532,98 ± 46,01]	2/45 (4,4 %) [532,16 ± 60,51]	10/88 (11,4 %) [532,57 ± 53,48]

Se detectaron lesiones nodulares palpables, presumiblemente de tipo tumoral, en 63 animales que continúan en estudio: 51 hembras y 12 machos. En las hembras se observan lesiones nodulares, fundamentalmente en las mamas, en animales de todos los grupos (20 controles, nueve de 500 mg/kg, 11 de 1000 mg/kg y 11 de 1500 mg/kg). En cambio, las lesiones nodulares se detectaron en los machos fundamentalmente asociadas al tejido celular subcutáneo, y también se localizaron en animales de todos los grupos (seis controles, dos de 500 mg/kg, dos de 1000 mg/kg y tres de 1500 mg/kg). El tiempo de aparición de estas lesiones nodulares fue similar entre animales tratados y controles (v. tabla 2).

### Peso corporal y consumo de alimento

La tabla 3 muestra los datos de peso corporal, evidenciándose que no hubo diferencias significativas entre tratados y controles, ni tendencias con las dosis en ninguno de los sexos y un mayor aumento de estas variables en los machos que en las hembras.

**Tabla 3.** Efectos del tratamiento crónico (18 meses) con D-004 sobre el peso corporal de ratas SD

Grupos	Dosis (mg/kg)	Inicial	Final
<b>Hembras</b>			
<b>Control</b>	<b>0</b>	89,18 ± 7,58	349,67 ± 50,08
<b>D-004</b>	<b>500</b>	89,18 ± 10,30	341,28 ± 45,88
	<b>1 000</b>	89,18 ± 9,85	351,11 ± 40,08
	<b>1 500</b>	89,18 ± 9,94	349,88 ± 48,36
<b>Machos</b>			
<b>Control</b>	<b>0</b>	92,20 ± 11,96	551,72 ± 62,82
<b>D-004</b>	<b>500</b>	92,20 ± 10,02	540,67 ± 61,43
	<b>1 000</b>	92,20 ± 10,96	541,14 ± 58,04
	<b>1 500</b>	92,20 ± 9,13	548,87 ± 78,89

Consistente con lo referido sobre la ganancia en peso, el consumo de alimentos fue similar en ambos sexos, tanto en los animales tratados como en los controles, si bien el consumo en los machos fue mayor que en las hembras (datos no mostrados).

### Análisis anatomopatológico

Las tablas 4 y 5 resumen los resultados del análisis microscópico de los animales que murieron antes de los 18 meses de tratamiento, bien espontáneamente o por eutanasia. Las lesiones histopatológicas observadas fueron muy escasas y en ninguna de las comparaciones realizadas se encontraron diferencias significativas entre tratados y controles.

**Tabla 4.** Lesiones histopatológicas no neoplásicas más observadas a los 18 meses de estudio

	Hembras				Machos			
	Contr	500	1	1 500	Contr	500	1	1
	n=5	n=5	n=5	n=50	n=5	n=50	n=5	n=5
<b>Sistema urinario</b>								
<b>Riñones. Glomerulonefrosis</b>	1	0	1	0	1	0	0	1
<b>Sistema endocrino</b>								
<b>Adrenales. Peliosis</b>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Hiperplasia cortical</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Quiste</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
<b>Tiroides. Hiperplasia células</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Sistema Reproductor</b>								
<b>Útero. Endometritis</b>	1	0	0	0	-	-	-	-
<b>Ovarios. Quiste</b>	1	0	0	0	-	-	-	-
<b>Próstata. Prostatitis</b>	-	-	-	-	0	1	1	0
<b>Vesículas seminales.</b>	-	-	-	-	1	0	0	0
<b>Sistema Respiratorio</b>								
<b>Pulmones. Inflamación</b>	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>Edema</i>	0	2	0	1	0	0	0	1
<i>Congestión</i>	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>Hemorragia</i>	1	3	1	1	0	0	0	0
<b>Sistema Digestivo</b>								
<b>Estómago. Úlceras</b>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Hiperplasia región no</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Hígado. Metamorfosis grasa</b>	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>Sistema</b>								
<b>Hueso. Osteítis fibrosa</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total de animales con</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Entre las lesiones no neoplásicas más frecuentemente observadas durante los 18 meses de tratamiento se encuentran la glomerulonefrosis y la hemorragia pulmonar. La glomerulonefrosis fue diagnosticada en cuatro animales, dos controles (un macho y una hembra) y dos tratados (una hembra de la dosis de 1000 mg/kg, y un macho de la dosis máxima). La hemorragia pulmonar solo ocurrió en las hembras y, en su mayoría en animales que amanecieron muertos, donde puede aparecer esta lesión debido a autólisis (v. tabla 4).

El número de animales con lesiones tumorales que fueron determinantes para la vida de los animales a los 18 meses de tratamiento se puede clasificar como bajo (28/400, 7,0 %); de estos ocho (8,0 %) muertes fueron en animales controles. El tumor de mayor prevalencia diagnosticado en los animales que murieron en 18 meses de tratamiento fue el adenoma de hipófisis (lesión benigna), documentado en 12 hembras (tres controles y nueve tratados con D-004: cinco [500 mg/kg], uno [1000 mg/kg] y tres [1500 mg/kg] y dos machos [control y 1000 mg/kg]). Ocurrieron en muy baja frecuencia otras lesiones neoplásicas benignas tales como fibroma de tejido celular subcutáneo, fibroadenoma de glándulas mamarias, pólipo endometrial y angioma hepático (v. tabla 5).

**Tabla 5.** Lesiones histopatológicas neoplásicas observadas a los 18 meses de estudio

	Hembras				Machos			
	Contr	500	1	1	Contr	500	1	1
	n=5							
<b>Benignas</b>								
<b>Tejido Celular Subcutáneo</b>								
<i>Histiocitoma fibroso</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Fibroma</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Sistema Endocrino</b>								
<i>Glándula Pituitaria. Adenoma</i>	3	5	1	3	1	0	1	0
<i>Glándulas Mamarias.</i>	0	0	2	1	0	0	0	0
<b>Sistema Reproductor</b>								
<i>Útero. Pólipo Endometrial</i>	0	0	0	1	-	-	-	-
<b>Sistema Digestivo</b>								
<i>Hígado. Anqíoma</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total de animales con</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Malignas</b>								
<b>Tejido Celular Subcutáneo</b>								
<i>Sarcoma quístico</i>	0	0	0	0	0	0	0	3
<b>Sistema Endocrino</b>								
<i>Glándulas Mamarias.</i>	1	5	0	2	0	0	0	0
<b>Múltiples órganos</b>								
<i>Histiocitoma maligno</i>	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Linfosarcoma</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total de animales con</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

Entre las lesiones neoplásicas malignas observadas, la de mayor frecuencia fue el adenocarcinoma de glándulas mamarias, que fue diagnosticado en seis hembras: un control y cinco tratados (tres hembras de la dosis de 500 mg/kg, y dos de la dosis máxima). También se observó en menor frecuencia el histiocitoma maligno, el sarcoma quístico y el linfosarcoma (v. tabla 5).

## DISCUSIÓN

Este constituye el primer reporte de la administración de D-004 a ratas por un período superior a los 12 meses. Durante 18 meses de tratamiento no existen evidencias de carcinogenicidad o toxicidad asociada al D-004 en ratas SD. Teniendo en cuenta que la dosis más alta evaluada (1500 mg/kg) es la dosis límite propuesta para estos estudios<sup>36</sup> y que esta dosis es mucho mayor que la mínima a la cual se observan efectos farmacológicos, debe descartarse la inadecuada selección de las dosis de D-004 empleadas como la causa de la falta de toxicidad/carcinogenicidad aquí reportada.

Los resultados muestran que la frecuencia de mortalidad ha sido baja (8,5 %), lo que es una evidencia indirecta de que las condiciones de desarrollo del estudio han sido las adecuadas. Además corroboran la toxicidad de dosis orales repetidas por largo plazo (18 meses) del D-004, ya que no se produjeron muertes atribuibles al tratamiento, resultados que son consistentes con los obtenidos en el estudio crónico de 1 año en ratas tratadas con dosis de hasta 2000 mg/kg, y con otros estudios toxicológicos previos realizados en roedores y no roedores.<sup>18-21</sup>

Las primeras muertes ocurrieron en animales con presencia de lesiones tumorales, en una etapa muy próxima al año de iniciado el estudio, cuando es normal que aumente la mortalidad y también comiencen a manifestarse espontáneamente lesiones neoplásicas (benignas y malignas) en esta especie y línea.<sup>37,38</sup>

El análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas entre los grupos, lo cual demostró que el tratamiento con D-004 no induce mortalidad temprana con respecto al grupo control. La frecuencia de lesiones tumorales resultó baja y consistente con esta especie y línea, de acuerdo con los resultados de estudios toxicológicos previos de otros autores y de los propios reportes históricos.<sup>39-42</sup>

Así, luego de 18 meses de estudio, no se han observado signos de toxicidad atribuibles al tratamiento, incluyendo la ganancia de peso corporal y el consumo de alimentos en ambos sexos, y ningún grupo ha mostrado reducciones del peso corporal mayores o iguales al 10 % al compararlo con el grupo control, lo cual permite descartar que el D-004 afecte el peso corporal. El hecho de que el incremento en el peso corporal fuera mayor en los machos que en las hembras es consistente con resultados previos de nuestro grupo en esta especie,<sup>40-42</sup> y evidencia también que las condiciones del estudio han sido adecuadas.

Este estudio demuestra que el D-004 no aumenta la frecuencia o acelera la ocurrencia de tumores benignos o malignos, y se comportó de manera muy similar la frecuencia de tumores entre los grupos tratados y control. El adenoma de hipófisis fue el tumor más diagnosticado, el cual es una lesión benigna muy común en las ratas de esta especie y edad, y fue más frecuente en las hembras que en los machos.<sup>37,38,43</sup>

Otras lesiones neoplásicas benignas tales como el fibroma de tejido celular subcutáneo, el fibroadenoma de glándulas mamarias, el pólipo endometrial y el angioma hepático que han sido descritas como espontáneas<sup>37,38</sup> ocurrieron en muy baja frecuencia. La lesión neoplásica maligna de mayor frecuencia fue el adenocarcinoma de glándulas mamarias, consistente con otros reportes.<sup>37,38,44,45</sup> También se observó en menor frecuencia el histiocitoma maligno, el sarcoma quístico y el linfosarcoma.

Estos hallazgos no son sorprendentes ya que el histiocitoma maligno es un tumor del tejido celular subcutáneo que aparece espontáneamente en las ratas Sprague Dawley de esta edad y ha sido reportado con una frecuencia similar a la obtenida en este estudio, entre un 0,9-5 % en machos y entre un 1,4-2 % en hembras. Igual se ha dicho para el linfosarcoma y el sarcoma indiferenciado (quístico) en las ratas SD de esta edad, los cuales han sido reportados con una frecuencia baja.<sup>38,46</sup>

Llama la atención que no hubo tumores malignos en el grupo tratado con la dosis de 1000 mg/kg y en los machos tratados con 500 mg/kg no se observó ninguna lesión neoplásica, lo que no resultó significativo debido a la baja frecuencia ocurrida en el grupo control. En los animales tratados tampoco se observaron lesiones poco comunes en esta especie y línea. Todas las neoplasias encontradas en los animales tratados han sido descritas en esta especie y línea,<sup>38,46</sup> y en ningún caso su aparición ha sido asociada con la acción agentes inductores específicos.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la administración oral de D-004 (500-1500 mg/kg) a ratas SD durante 18 meses no mostró evidencias de toxicidad o carcinogenicidad temprana relacionadas con el tratamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la relevante participación de los técnicos Isury Bucarano, Eddy Goicochea, Nilda Mendoza y Regla Placeres, durante el trabajo experimental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdollah F, Briganti A, Suardi N, Castiglione F, Gallina A, Capitanio U, et al. Metabolic syndrome and Benign Prostatic Hyperplasia: Evidence of a potential relationship, hypothesized etiology, and prevention. *Korean J Urol*. 2011;52:507-16.
2. Schwinn DA, Roehrborn CG. Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol*. 2008;15:193-9.
3. Schmidt LJ, Tindall DJ. Steroid 5 $\alpha$ -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;125:32-8.
4. Azimi H, Khakshur AA, Aghdasi I, Fallah-Tafti M, Abdollahi M. A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products; perspective of new pharmacological agents. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 2012;11:207-21.
5. Abe M, Ito Y, Oyunzul L, Oki- Fujino T, Yamada S. Pharmacologically Relevant receptor Binding Characteristics and 5 $\alpha$ - reductase inhibitory activity of free fatty acids contained in Saw Palmetto Extract. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(4):646-50.
6. Raman P, David L, DeWitt G, Muraleedharan G. Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytotherapy Res*. 2007;22(2):204-12.
7. Baron A, Mancini M, Caldwell E, Cabrelle A, Bernardi P, Pagano F. *Serenoa repens* extract targets mitochondria and activates the intrinsic apoptotic pathway in human prostate cancer cells. *BJU Int*. 2009;103(9):1275-83.
8. Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D. Composition changes of lipid extract of *Roystonea regia* fruits of different ripening stages influence their effects on testosterone-induced prostate enlargement in rats. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(1): 41-5.
9. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exptl Clin Res*. 2004;30:227-34.
10. Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R. 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 Clin & Exptl*. 2004;65: 505-14.
11. Noa M, Arruzazabala ML, Carbajal D. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in rats. *Int J Tiss React*. 2005;27:203-12.

12. Arruzazabala ML, Mas R, Carbajal D, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on in vitro and in vivo effects mediated by  $\alpha$  adrenoceptors in rat. *Drugs R & D*. 2005;6:281-289.
13. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Noa M, Carbajal D, Mendoza N. Effects of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R & D*. 2006;7:233-241.
14. Ravelo Y, Molina V, Jiménez S, Oyarzábal A, Pérez Y, Mas R. Effect of oral administration of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on xylene-induced ear oedema in mice. *Lat Am J Pharm*. 2011;30(9):1744-8.
15. Pérez Y, Molina V, Mas R, Menéndez R, González RM, Oyarzábal A, y colaboradores. *Ex vivo* antioxidant effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on rat prostate tissue. *Asian J Androl*. 2008;10:659-66.
16. Lopez E, Molina V, Illnait J, Oyarzábal A, Fernández L, Mas R, y colaboradores. Antioxidant effects of D-004, a lipid extract from the *Roystonea regia* fruits, on the plasma of healthy men. *Asian J Androl*. 2007;11:385-92.
17. Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, et al. Toxicología aguda del D-004 en conejos. *Rev. CENIC Cien. Biol*. 2007;38 (2): 99-102.
18. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, et al. Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Exp Clin Res*. 2005;31(3):101-8.
19. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Marrero G, et al. Oral subchronic toxicity of a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in mice. *Drug Chem Toxicol*. 2008; 31: 217-228.
20. Pardo B, Gutiérrez A, Gámez R, Noa M, Marrero G. Six-Month oral Toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in Sprague Dawley rats: a preliminary study. *Rev CNIC Cien. Biol*. 2009;40(3): 161-165.
21. Gutiérrez A, Gámez R, Noa M, Mas R, Arencibia D, Pardo B, et al. One year oral Toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in Sprague Dawley rats. *Food Chem Tox*. 2011;49: 2855-2861.
22. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2005; 36 (Especial):15-21.
23. Marrero G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Curveco D. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa). *Rev. CNIC Cien. Biol*. 2007;38 (3):200-3.
24. Fernández I, Gámez R, Gutiérrez A, García H. Evaluación Genotóxica in vivo del D-004 en el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea en Ratones. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2005;36 (Especial): 11-14.
25. Gutiérrez A, Gámez R, Arencibia D, Pardo B, García H. Evaluación del potencial genotóxico del D-004, para inducir aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2010;41(Especial): 30-34.

26. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H y Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Rev. Toxicol.* 2009;26:127-130.
27. Arencibia D, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, et al. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en Ratones OF-1. *Rev. CNIC Cien. Biol.* 2009;40 (1): 29-32.
28. Pardo B, Gutiérrez A, Gámez R, Mendoza S, Noa M, Mas R, et al. Estudio de los posibles efectos estrogénicos del D-004. *Rev. CENIC Cien. Biol.* 2007;38 (2) 103-106.
29. Gutiérrez A, Gámez R, Noa M, Mas R, Pardo B, Valle M, et al. Evaluation of D-004 in Mature Ovariectomized Rat Uterotrophic Assays. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008;27(5):710-5.
30. Fernández L, Mas R, Fernández JC, Mendoza S, Gámez R, Pardo B. Effects of D-004, a Lipid Extract of the Fruit of the Cuban Royal Palm (*Roystonea regia*) or the Lipidosterolic Extract of Saw Palmetto (*Serenoa repens*) on the Sexual Activity in Male Rats: A controlled, experimental study. *Curr Ther.* 2009; 69: 65-74.
31. Carbajal D, Molina V, Mas R, Arruzazabala ML. Efecto del D-004 sobre patrones conductuales en roedores. *Rev CNIC.* 2007; 38: 12-17.
32. Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Mas R, Noa M, Marrero G, et al. Effects of in utero exposure to D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in the male rat. Comparison with Finasteride. *J Med Food.* 2011;14 (12): 1663-69.
33. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, García H, Bucarano I, Goicochea E. Estudio teratogénico del D-004 en conejos. *Rev Cubana Toxicol.* 2012;1(2): 58-62.
34. Sierra R, Rodríguez E, González V, Marrero D, Vicente R. Estudios preliminares de estabilidad de un extracto lipídico de frutos de *Roystonea regia* (D-004) en frascos de vidrio ámbar. *Rev Cubana Farm.* 2010;44(3):360-6.
35. Sierra R, Rodríguez EA, Vicente R, Marrero D, González VL, Morales CL. Metodología analítica y estudio de estabilidad de las emulsiones empleadas en los estudios de toxicología preclínica del D004, sustancia de naturaleza oleosa. *Rev Cubana Toxicol.* 2012;1(2). (en prensa)
36. US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guideline for Industry: S1C(R) Addendum to Dose Selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. Addition of a limit dose and related notes. ICH 1997,S1A.
37. Nakazawa M, Tawaratani T, Uchimoto H. Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Exp Anim.* 2001;50:99-103.
38. Giknis MLA, Clifford Ch B. Compilation of spontaneous neoplastic lesions in survival. In *Crl: CD (SD) rats from control groups*. Charles River Laboratories, 2004.
39. Keenan KP, Smith PF, Hertzog P. The effects of overfeeding and dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival and early pathology biomarkers of aging. *Toxicol. Pathol.*, 1994;22: 300-15.

40. Alemán CL, Mas RM, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, et al. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Anim.* 1998;32:457-66.
41. Alemán CL, Mas R, Noa M, Rodeiro I, Hernández C, Capote A. Carcinogenicity of policosanol in Sprague Dawley rats: A 24 months study. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* 1994;14:239-49.
42. Gámez R, Noa M, Mas R, Mendoza N, Pardo B, Menéndez R, et al. Long-term carcinogenicity of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, in Sprague Dawley rats: a 24 months study. *Food Chem Tox.* 2007;45:2352-8.
43. Johnson MD, Gad SC. The rat. In: Gad SC, ed. *Animal models in toxicology.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2007;147-275.
44. Durbin PW, Williams MH, Jeung N, Arnold JS. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: the influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res.* 1966;26(3):400-11.
45. Chandra M, Frith CF. Spontaneous neoplasms in aged control Fischer 344 rats. *Cancer Lett.* 1992;62(1):49-56.
46. Peckham JC. *Animal Histopathology.* In: Derelanko MJ, Hollinger MA, eds. *Handbook of Toxicology.* Boca Raton, Florida: CRC Press, 2002;640-732.

Recibido: 24 de marzo de 2014.

Aprobado: 20 de abril de 2014

*Dra. C. Ariadne Gutiérrez Martínez.* Departamento de Toxicología. Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Apartado Postal 6990, Ave 198 entre 19 y 21. Cubanacán, Playa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: [ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu](mailto:ariadne.gutierrez@cnic.edu.cu)