

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Estudio de la toxicidad crónica en conejas administrando la formulación Cytoreg[®]

De Jesús Rosa¹, Vicuña-Fernández Nelson², Romel Molina¹, Martucci David³, Pozo Lewis³, Jiménez Williams³.

1. Bioterio de la Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela.
2. Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela.
3. Empresa Cytorex de Venezuela filial de Cytorex internacional INC.

Correspondencia al autor Dra. Rosa De Jesús. Correo electrónico: rosadej@ula.ve,
telefax. (0274)2403128. y/o Lic. Jiménez Williams. Correo electrónico:
cytorexinc@yahoo.com

Resumen

La incorporación de un nuevo producto en el mercado para el uso humano lleva implícito un conjunto de investigaciones, incluidos los estudios toxicológicos que determinan la seguridad de su uso. El Cytoreg® es un agente en estudio como medicamento alternativo antineoplásico producido por Laboratorio Cytorex de Venezuela S.A. Se trata de una presentación líquida, con mezcla de ácidos fuertes y débiles; con una concentración de ácido fluorídico (HF) referida por el proveedor de 55 g/litro. Estudios previos conllevaron a determinar la dosis letal mínima en 0,49 mL/Kg de peso y, en este estudio se determinó la toxicidad crónica en el conejo New Zelanda. Se le suministró en el agua de bebida a las conejas, la formulación durante 8 meses a tres dosis diferentes. Se valoró la condición fisiológica midiendo el consumo de agua, el del alimento y la evolución del peso. Se usaron 4 animales por cada dosificación y se sacrificaron 4 animales a los tres, cuatro, seis y ocho meses, uno de cada dosis y un control. Se realizó necropsia, se tomó muestra de sangre para análisis hematológicos y bioquímicos y se tomaron órganos para estudio histopatológico. El estudio determinó que el agente terapéutico Cytoreg®, no produce alteraciones en el peso de los animales, en el consumo de agua, ni en el consumo de alimento. En relación a los parámetros sanguíneos hematológicos y bioquímicos, tampoco se observaron alteraciones, ni a nivel histológico de órganos tales como: cerebro, corazón, pulmones, bazo, hígado, estómago, intestinos delgado y grueso; determinándose que este agente terapéutico no produce toxicidad en conejas New Zelanda cuando es suministrado durante 8 meses.

Palabras clave: toxicidad crónica, ratas, dosificación, Cytoreg®.

Abstract

The incorporation of a new product on the market for the human use takes implicitly the accomplishment of a set of investigations, included the toxicological studies that determine the safety of using it. The Cytoreg® is an agent in study as alternative medicine antineoplásico produced by Laboratory Cytorex of Venezuela S.A. It is a product of liquid presentation, with mixture of strong and weak acids; with a concentration of acid fluorídico (HF) recounted by the supplier of 55 g/litro. Previous studies carried to determine the lethal minimal dose in 0.49 mL/Kg weight. Here was studied the chronic toxicity in New Zelanda rabbits. The formulation was supply in the water of rabbits, during 8 months in three different doses. The physiological condition was evaluated by the water and food consumption and the weight. Four animals were used by every doses and 4 animals sacrificed to the three, four, six and eight months. The necropsy was realized, sample of blood were took for hematologic and biochemical analyses and organs were took for study pathologic tissue. This study determined that the therapeutic agent Cytoreg®, not produced alterations neither in the weight of the animals, nor the water consumption, nor in the food consumption. In relation to the blood hematologic and biochemical parameters, alterations were not observed, not histological level of such organs either as: brain, heart, lungs, spleen, liver, stomach, intestines. With this study is possible consider to therapeutic agent not toxicity in rabbits during 8 months to administration.

Key words: chronic toxicity, rats, dosage, Cytoreg®.

Introducción

Las pruebas de toxicidad están incluidas en las evaluaciones toxicológicas que deben realizarse a todas las drogas de primera generación. La incorporación de un nuevo producto en el mercado lleva implícito la realización de un conjunto de investigaciones, incluidos los estudios toxicológicos que determinan la seguridad de su uso (1). Las pruebas preclínicas de toxicidad a dosis repetidas brindan una valiosa información sobre la seguridad del producto, al incluir estudios macroscópicos e histopatológicos de órganos importantes, así como evaluaciones de las vías de administración y esquemas de dosificación (2) y de la valoración de parámetros bioquímicos sanguíneos a distintos tiempos de la administración del producto; de forma que se pueda determinar los posibles efectos tóxicos del compuesto sobre los sistemas de órganos de los animales usados en el estudio. En relación a este último aspecto, la importancia de la valoración de los parámetros bioquímicos sanguíneos, radica en que la mayor parte de las sustancias químicas xenobióticas que entran en contacto con el organismo humano son metabolizadas por el sistema metabolizador de los medicamentos el cual, en línea de máxima, ejerce su actividad a nivel hepático. Mediante repetidas exposiciones, muchas sustancias xenobióticas pueden aumentar sensiblemente la actividad de este sistema enzimático y pueden influenciar no solamente su propio metabolismo, sino también el de otras sustancias xenobióticas a las cuales el hombre se encuentra expuesto (3).

El Cytoreg® es un agente en estudio como medicamento alternativo antineoplásico producido por el Laboratorio Cytores de Venezuela S.A. Se trata de una presentación líquida, con mezcla de ácidos fuertes y débiles; con una concentración de ácido fluorídico (HF) referida por el proveedor de 55 g/litro. El ácido Fluorídico es el compuesto activo en la mezcla equilibrada de ácidos. Las concentraciones a referir en este trabajo estarán señaladas como ácido fluorídico – HF, compuesto activo del agente terapéutico Cytoreg®.

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar si existe toxicidad de la formulación Cytoreg®, al ser administrada durante 8 meses a conejas New Zelanda, las cuales fueron adquiridas del Instituto Nacional de Higiene del país.

La experiencia se realizó tomando en cuenta las normativas sobre la producción y uso ético de los animales de laboratorio de la AVECAL (4) y el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología (5), y con el Aval de la comisión de ética institucional, registrado con el N° CE BIOULA/013(02/11/2010).

Material y Métodos

Animales

Se usaron 16 conejas (6, 7), entre 3,71 a 3,89 Kg, los animales fueron agrupados en 4 grupos, cada uno contentivo de 4 conejas, se formó el grupo control y 3 grupos experimentales. Los grupos experimentales se nombraron de la siguiente manera: grupo D1, se les suministró dosis de 0,49 mL/Kg de peso/día; grupo D2, se les suministró dosis de 0,25 mL/Kg de peso/día y grupo D3, se les suministraron dosis de 0,13 mL/Kg. Las conejas se alojaron de forma individual. A las cuatro conejas del grupo control se les suministró agua sin el agente terapéutico y alimento a voluntad. El tratamiento fue administrado en 300 mL del agua de bebida, suministrada a voluntad, ajustando la dosis de acuerdo al peso semanal de los animales, al igual que el alimento. El agua suministrada era esterilizada a 120°C/10 min. El alimento suministrado era conejarina marca comercial. Los animales permanecieron en jaulas con piso de malla y bandeja, las medidas de la caja fueron de 30x50x25 cm³, la bandeja se lavaba diariamente. A una temperatura aproximadamente de 20±5°C, una humedad de 85%, con luz artificial (12horas luz: 12 horas oscuridad).

Los animales fueron pesados semanalmente. El alimento fue pesado, tres veces a la semana, con 1 día por medio. Se pesaron 500 g, iniciales y se completaba a los 500g, igualmente se registró el consumo de agua, la cual se suministraba diariamente la cantidad de 300 mL de agua, a la que se le colocaba la cantidad del agente terapéutico correspondiente de acuerdo al grupo y peso del animal, todos los datos fueron tabulados. Otros parámetros medidos fueron: claudicación, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación, incoordinación, y cualquier otro síntoma observado. Los datos fueron registrados diariamente.

La administración del agente terapéutico en prueba se realizó durante ocho meses. Las conejas se sacrificaron aleatoriamente, transcurridos 2 (60 días), 4 (120 días), 6 (180 días) y 8 (240 días) meses, en cada tiempo de sacrificio se sacrificó una coneja por dosis evaluada del agente terapéutico y una coneja del grupo control, con la finalidad de realizar exanguinación vía intracardiaca para valorar parámetros sanguíneos y tomar muestras de órganos para realizar histopatología. Inmediatamente después del sacrificio del animal, se tomó la muestra de sangre y de los órganos. El sacrificio se realizó colocándole una sobredosis del tranquilizante Xilacina (Sedazine®) vía Intramuscular, una sobredosis de relajante muscular Bromuro de Rocuronio (Gland Pharma LTD) y finalmente, una sobredosis del anestésico Ketamina (Ketamine ®).

Para el procesamiento de las muestras de sangre, se tomaron aproximadamente 2,5 mL de sangre en tubos con EDTA para realizar hematología completa: Hb, Ht, cuenta de glóbulos blancos, plaquetas y cuenta diferencia. En tubos sin heparina se colectaron, 3 mL de sangre, para el resto de las pruebas bioquímicas sanguíneas: SGOT (transaminasa glutámica), SGPT (transaminasa pirúvica), LDH (Lactato deshidrogenasa), ácido úrico, creatinina y CK-NAC ACTIVIDA (NAD⁺). Los análisis se realizaron en un analizador semi-automático Marca Mindray, Modelo BA-88A, las medidas se realizaron por duplicado, y se promediaron para obtener los resultados. Para obtener los valores de CK (se restaron los valores de la primera medida de los de la segunda medida y se multiplicaron por el factor 1768. Para obtener los valores de la LDH, se multiplicó por 6592 siendo este el factor de conversión de Ij/mL a U/L, la diferencia de absorbancia.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa *Statistix* versión 7, usando el análisis de One-Way ANOVA.

Luego de la toma de muestra sanguínea se realizó la necropsia con la finalidad de observar la condición de los órganos macroscópicamente "in situ". Posteriormente se extrajeron los siguientes órganos: riñón derecho, encéfalo, estómago, intestino delgado, corazón, pulmones e hígado. Los órganos antes señalados se colocaron en un envase con suficiente solución fijadora (10 volúmenes de fijador por volumen de tejido) y se utilizó formol neutro al 40%. Para la preparación de éste se utilizó: formaldehído comercial, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico y anhídrido de sodio.

Para colocar los órganos en el envase contentivo con el formaldehído se procedió de la siguiente manera: **Riñón derecho**: se dividió en dos mitades haciendo un corte longitudinal (del polo anterior al posterior) sobre su eje mayor y se incluyeron ambas mitades. **Encéfalo** (cerebro y cerebelo): se fijó completo. **Estómago**: se abrió a lo largo de la gran curvatura interna, se lavó suavemente su contenido y se fijó un segmento sobre una lámina de cartón, con la mucosa (parte interna) hacia el exterior. **Intestino delgado**: se abrió a lo largo, se lavó suavemente y se eliminó su contenido, se tomaron los tres segmentos (duodeno, yeyuno, íleon). Se colocaron los segmentos sobre un cartón con la mucosa (parte interna) hacia arriba. **Corazón**: se abrió las cavidades auriculares y ventriculares, se eliminaron los coágulos sanguíneos mediante lavado con agua del grifo y se fijó completo. **Pulmones**: se tomó un segmento de 0,5 cm de grosor y de caras paralelas. Siempre se tomó el lóbulo izquierdo. En el envase con el formaldehído se cubrió con algodón o papel toallin, para mantener su superficie húmeda, ya que el fragmento flotaba. **Hígado**: se tomó un segmento de 0,5 cm de grosor y de caras paralelas.

Los órganos se manipularon con delicadeza, sin ejercer presión o tracción sobre ellos. Se utilizaron envases de boca ancha con tapas de cierre hermético. Se identificaron adecuadamente los frascos y se prepararon en parafina para la histología, para lo cual se siguió el procedimiento tradicional de deshidratación, aclaramiento, infiltración e inclusión en la parafina, posteriormente se realizaron los cortes en microtomo Marca Numak, Modelo MRF-4, y se colorearon las láminas con Hematoxilina - Eosina.

Resultados

I. Parámetros fisiológicos: consumo de agua, alimento y evolución del peso.

El consumo de agua se comenzó a medir desde el momento en que se inició el suministro del agente terapéutico. Los promedios del consumo de agua se presentan a los 60, 120, 180 y 240 días, los cuales están relacionados con el tiempo de sacrificio. Estos promedios son presentados en la Tabla 1.

En ésta se puede observar que el consumo de agua fue menor en los animales a los cuales se les suministró la mayor concentración del agente terapéutico, ésta tendencia se mantuvo hasta aproximadamente los 180 días, luego se normalizó el consumo de agua diario de todos los conejos en 300 mL/día, tanto en los controles como en las distintas concentraciones del agente terapéutico. El análisis estadístico no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$; DS = ± 5.658).

Con respecto a la evolución de peso de las conejas, se presentan en la Tabla 2, los promedios de la evolución de los pesos de las conejas durante el tiempo del estudio (240 días). El análisis estadístico no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$; DS = ± 0.4934).

En esta se observa que la adquisición de peso de las conejas fue progresivo de forma general, presentándose el menor crecimiento en el grupo del tratamiento nombrado como D1 (0,49 mL/peso), sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores encontrados.

Con respecto al consumo de alimento, la Tabla 3, presenta los promedios obtenidos durante el período del estudio.

En relación al consumo del alimento por parte de las conejas en estudio se observó que el promedio fue mayor en las conejas que estaban tomando el agente terapéutico en las concentraciones D2 (0,25 mL/Kg) y D3 (0,13 mL/Kg), que las conejas del grupo control y las del grupo de tratamiento D1(0,49 mL/Kg), estadísticamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$; DS = ± 17.937), entre grupos. Sin embargo, dentro de los grupos no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$; DS = ± 22.892). Las diferencias observadas no son motivadas aparentemente

por la administración del agente terapéutico ya que el control (sin tratamiento) presentó un promedio menor que dos de los grupos con tratamiento.

II. Parámetros sanguíneos: hematológicos y bioquímicos

En relación a los valores de las pruebas de bioquímica sanguínea realizadas se presentan tabulados, en la Tabla 4.

Con respecto a los valores hematológicos: la hemoglobina, la cuenta leucocitaria y la cuenta diferencia en relación esta última a: neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos que se les suministró el agente terapéutico en prueba y el grupo control. Sin embargo, los valores obtenidos en el hematocrito, plaquetas y para los monocitos (cuenta diferencial), se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los valores obtenidos para el porcentaje de monocitos, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$; $DS = \pm 3,0585$), entre grupos; la diferencias encontradas, sin embargo, no pudiesen relacionarse al tratamiento en prueba ya que de acuerdo a la prueba de Duncan, el grupo que se desvía de la media poblacional fue el medido en el último sacrificio, y dentro del grupo no hubo diferencias estadísticamente significativas. Los valores encontrados, en los parámetros hematológicos, se encontraron dentro del rango considerado como valores normales para conejos, de acuerdo a la bibliografía (8, 9, 10, 11) consultada.

En relación a los valores de las pruebas de bioquímica sanguínea realizadas, estos se presentan en la Tabla 5.

Los parámetros bioquímicos sanguíneos encontrados en los conejos tanto tratados con el agente terapéutico como los controles, con distintos tiempos de tratamiento, presentaron en forma general que: SGOT ($p < 0,05$; $DS = 20.418$), SGPT ($p < 0,05$; $DS = 34.852$), LDH ($p < 0,05$; $DS = 33.165$), Creatinina ($p < 0,05$; $DS = 0.4876$) y CK NAC ACTIVADA (NAD^+) ($p < 0,05$; $DS = 834.44$), no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tanto para el control como tratados, y los valores en general se encontraron dentro del rango establecido por la bibliografía como normales, a excepción de los valores encontrados para la CK NAC ACTIVADA (NAD^+), los cuales se encontraron más bajos que los reportados en la bibliografía.

III. Análisis anatomopatológico.

Macroscópicamente no se observaron patologías en los órganos, de los animales sacrificados a los distintos tiempos. En el análisis histológico en forma general se observaron los hallazgos resumidos en la Tabla 6, nótese que los hallazgos fueron comunes a todos los grupos, tanto control, como a los que se les suministró el agente

terapéutico, indicando por tanto que la patología observada no estuvo relacionada con el consumo del agente en estudio.

a. Hígado: hepatocitos hinchados, citoplasma con vacuolas. Diagnóstico patológico: hepatopatía tóxica aguda, difusa y leve: tipo tóxico. **b.** Riñón: escasos túbulos proximales con necrosis segmentaria del epitelio y depósito de sales minerales (calcificación) en pared y lumen, linfáticos levemente dilatados, leve edema perivascular. Diagnóstico patológico: b.1. nefrocalcinosis multifocal leve. b.2. Nefrosis focal, muy leve. **c.** Pulmón: focos de infiltración por linfocitos con formación de agregados de folículos linfoides en paredes alveolares, vasculares y bronquiolares. Diagnóstico patológico: bronquiolitis linfocítica aguda, multifocal, leve (compatible con infección por bacterias *Pasteurella*, *Bordetella*, *Mycoplasma*, *Clamidia*. **d.** En los fragmentos examinados no se observaron alteraciones degenerativas, inflamatorias ni necróticas.

Discusión

Siendo el Cytoreg®, una nueva formulación con probables propiedades antineoplásicas, es de interés realizar las distintas pruebas pre – clínicas que conlleven a certificar de que tal formulación no causa efectos dañinos, sobre distintas especies animales (12). En el estudio realizado, la especie utilizada fue el conejo New Zelanda y el tiempo de administración de la formulación fue de 8 meses, por lo que el estudio permitió plantear el análisis de una toxicidad crónica de acuerdo al tiempo de estudio y de acuerdo a las pruebas realizadas (13).

Uno de los parámetros fisiológicos que primeramente se ven afectados por el suministro de sustancias ajenas al alimento y agua rutinaria en los animales es el peso del animal (14). El comportamiento del peso de las conejas referido por la bibliografía (15), es el de un crecimiento continuo hasta alcanzar una estabilización del mismo. El suministro de la formulación se inició cuando las conejas pesaban en promedio 3.79 Kg., y luego de los 8 meses de tratamiento llegaron a pesar en promedio 4.44 Kg, Indicando que hubo un crecimiento continuo en éstas; además el análisis estadístico no presentó diferencias significativas, lo que indica que la formulación suministrada durante 8 meses no afectó el crecimiento de los animales. Este resultado observado está relacionado al consumo necesario y a la cantidad requerida del alimento y del agua, para lograr el crecimiento adecuado.

Con respecto al consumo del agua este debe ser de 6mL/kg/día (16), revisando los promedios encontrados durante el tiempo de estudio en éste se encontró una diferencia de 50mL, entre el control y los animales con tratamiento, el análisis estadístico no presentó diferencias significativas. La diferencia de consumo de agua, aunque poca,

entre el control y los animales sometidos al consumo del agente terapéutico, se debió probablemente al bajo pH de la formulación, la cual se mezcló con el agua.

En relación al consumo del alimento, la bibliografía (17), reporta que el consumo de los conejos es de 40 - 60 gr/Kg/día, tomando en cuenta lo reportado, de acuerdo al promedio de peso que adquirieron los animales durante el estudio, el consumo debió ser: control = 232,02; D1 = 231,9; D2 = 251,82 y D3 = 244,2; sin embargo el consumo de los animales en estudio fue 34,18 g., mayor que el reportado, esta diferencia puede estar relacionada a parámetros ambientales, y no relacionados con el agente en prueba.

Se ha reportado que las alteraciones en los valores de los parámetros sanguíneos tanto a nivel hematológico como a nivel bioquímico, son indicativos de daños. A nivel hematológico son indicadores de posibles patologías a nivel de la médula ósea en la cual se generan las distintas células sanguíneas, a partir de la célula denominada proeritoblasto en el caso de los eritrocitos, y mieloblasto a nivel de los leucocitos (18), además que, alteraciones en las medidas involucradas con los parámetros sanguíneos tal como la hemoglobina, puede ser indicativo de alteraciones a nivel de la bioquímica de las mismas, por lo antes expuesto los análisis referidos a los parámetros sanguíneos deben encontrarse en las evaluaciones de posibles daños de cualquier medicamento de primera generación. Los parámetros hematológicos medidos fueron: hemoglobina, hematocrito, cuenta leucocitaria, plaquetas y cuenta diferencial, de éstos el parámetro hematocrito, plaquetas y los monocitos, presentaron diferencias estadísticamente significativas, el resto de los parámetros no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En relación a la diferencia estadísticamente significativa encontrada en los parámetros hematológicos mencionados, todos los animales aún el control estuvieron involucrados en este resultado, lo que puede conllevar a pensar en algún problema ajeno al tratamiento que no se observó en los grupos anteriores.

Los otros parámetros sanguíneos medidos fueron algunos bioquímicos, entre estos: las transaminasas, creatinina, ácido úrico, Lactato deshidrogenasa (LDH) y la CK NAC ACTIVADA (NAD⁺). La enzima transaminasa glutámico oxalacética del suero (STGO) llamada Aspartato Aminotransferasa (AST), es una de las muchas enzimas titulares que catalizan la transferencia de los grupos amino y oxo entre los alfa-aminoácidos y los alfa-oxo ácidos. Los niveles elevados son observados en enfermedades del hígado. Los niveles disminuidos se encuentran en las deficiencias de Vitamina B6. Cantidades menores de AST se encuentran en el músculo, riñón, páncreas, pulmón y cerebro. Los daños a estos tejidos nos dan un ligero aumento de los niveles de AST en el suero (19). Los niveles elevados de creatinina están asociados con lesiones del esqueleto, corazón y cerebro y se usa generalmente como indicador de infracción al miocardio (20). Los niveles elevados de Lactato Deshidrogenasa están asociados primeramente con infartos al miocardio (21). El grado de incremento es utilizado para

estimar la extensión del daño al músculo cardíaco. Los niveles altos de LDH también se han observado en enfermedades del hígado, anemia perniciosa, enfermedad renal y en algunos casos de trauma músculo esquelético. La Creatina Kinasa (CK) se encuentra principalmente en el cerebro y los tejidos musculares (22). El análisis de la actividad de la CK en plasma o suero, provee un marcador sensible para la detección de enfermedades del tejido muscular esquelético. Por ejemplo: en la distrofi muscular del tipo Duchenne se pueden encontrar niveles de CK hasta 50 veces superior al límite de normalidad establecido, al igual que en el caso de la distrofia muscular progresiva, siendo máxima la actividad de ésta enzima. La CK es también útil en el diagnóstico del infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. La valoración de los parámetros bioquímicos sanguíneos de los animales en estudio se encontró dentro de los rangos establecidos, para cada uno de ellos.

En relación a los resultados del análisis histológico, los hallazgos encontrados a nivel de los riñones tales como: depósitos de sales de calcio (nefrocalcinosis) puede ser causado por dietas altas en proteína, calcio, oxalatos, restricción o privación de agua, cambios en el pH de la orina. A nivel de los pulmones, la neumonía observada era de tipo infeccioso la cual puede ser causado por: posibles bacterias (*Pasteurella sp.* y *Bordetella sp.*, principalmente), *Mycoplasma* o *Clamydias*. A nivel del hígado. La observación de los hepatocitos hinchados, el citoplasma con vacuolas lípidicas e hídricas, y los núcleos conservados puede ser causada por: micotoxinas, medicamentos, sustancias tóxicas, otras hepatotoxinas. De forma general se puede decir que las lesiones observadas no se encuentran asociadas al tratamiento experimental, por cuanto se observan también en los animales controles.

Conclusión

El estudio de toxicidad crónica en conejas determinó que el agente terapéutico Cytoreg®, no produjo alteraciones en el peso de los animales, en el consumo de agua, en el consumo de alimento, en los parámetros sanguíneos hematológicos y bioquímicos, ni a nivel histológicos de órganos tales como: cerebro, corazón, pulmones, bazo, hígado, estómago, intestinos delgado y grueso; durante 8 meses de administración del mismo.

Tabla 1. Promedio de consumo de agua durante el tiempo de suministro del tratamiento.

	control	Tratamiento D1 (0,49 mL/Kg de peso)	Tratamiento D2 (0,25 mL/Kg de peso)	Tratamiento D3 (0,13 mL/Kg de peso)
60 días	292,694	281,377	286,105	291,521
120 días	293,915	290,052	289,365	294,232
180 días	294,852	291,911	289,558	292,647
240 días	300,00	300,00	300,00	300,00
promedio	295,365	290,835	291,257	294,6

Tabla 2. Peso en Kg, de las conejas durante el período de ensayo (control y tratamientos)

	Control	Tratamiento D1 (0,49 mL/Kg de peso)	Tratamiento D2 (0,25 mL/Kg de peso)	Tratamiento D3 (0,13 mL/Kg de peso)
60 días	3.78	3.71	3.81	3.89
120 días	3.51	3.37	3.63	3.61
180 días	4.0	4.11	4.66	4.70
240 días	4.31	4.28	4.69	4.89
promedio	3.81	3.87	4.20	4.07

Tabla 3. Promedios del consumo de alimento en gramos, de las conejas durante el período de estudio.

	control	Tratamiento D1 (0,49 mL/Kg de peso)	Tratamiento D2 (0,25 mL/Kg de peso)	Tratamiento D3 (0,13 mL/Kg de peso)
60 días	317.0	335.9	370.9	358.3
120 días	326.8	319.1	346.3	351.5
180 días	346.8	353.7	374.6	388.5
24 días	346.0	343.0	400,0	388.0
promedio	334,2	337,9	372,9	371,5

Tabla 4. Valores obtenidos en las pruebas hematológicas de las conejas en estudio

PRUEBAS HEMATOLÓGICAS									
TIEMPO DE SACRIFICIO	Valores de pruebas de laboratorio conejas	Hb gr/dL	Ht %	Glóbulos blancos x mm ³	Plaq x mm ³	Cuenta Diferencial			
						Neu %	Eos %	Ln %	Mon %
60 días	control	13.3	41,2	4.900	145.598	39	05	45	03
	D1	13	44,0	5.000	165.000	31	03	63	03
	D2	13.2	40,9	4.900	145.000	27	05	60	01
	D3	13.3	42,0	4.800	167.398	25	05	63	03
120 días	Control	13,9	41,8	4.600	113.000	39	06	52	03
	D1	14,3	44,6	6,100	150.000	31	03	64	02
	D2	13,2	39,4	4.500	190.000	26	03	68	03
	D3	13.3	40,3	4.600	178.899	25	05	64	02
180 días	Control	12.9	41,0	4.600	198.888	42	06	42	03
	D1	13.1	43,4	5.200	222.000	33	04	62	05
	D2	12.7	42,1	4.800	213.034	27	07	58	05
	D3	12.8	42,7	4.800	246.999	23	07	63	02
240 días	Control	12	33,1	5.400	136.000	45	07	40	8
	D1	12	31,9	4.000	215.000	23	05	65	7
	D2	12,5	38,6	5.700	253.000	24	08	58	10
	D3	12,3	37,9	5.900	285.000	21	07	63	9

Valores de Referencias para conejos: Hb: 8-17 (13,5), Blancos: 3,0 - 12,5 (8,6), Neu: 30 - 65 (45), Linf: 28 - 85 (40,1)%. PQ: 456.964 PQ/mm³; PQ: 338.000, PQ/ mm³ Mon: 0,00 - 1,8 (0,79) % (11), Eos: 0,5 - 2,2 (1,12)% (9, 10, 11).

Tabla 5. Valores bioquímicos sanguíneos encontrados en los conejos en estudio.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS							
TIEMPO DE SACRIFICIO	Valores de pruebas de laboratorio conejas	SGOT IU/ml	SGPT IU/ml	LDH U/L	Ácido Úrico mg/dl	Creatinina mg/dl	CK-NAC ACTIVAD (NAD) U/L
	60 días	control	35	74,1	204,6	0,7	1,1
D1		61,7	84,8	229,6	0,2	1,1	1762
D2		44,5	106,5	247,9	0,6	1,5	1111,8
D3		61,1	88,7	262,3	0,7	1,6	2353
120 días	Control	35,3	78,9	251,2	0,3	1,4	731,7
	D1	36,2	60,6	215,3	0,4	1.1	492,8
	D2	98,7	186,8	240,7	0,4	1,8	841,4
	D3	33,5	46,6	217,3	0,5	1,1	951,5
180 días	Control	35	74,5	207,1	06	1.1	776,8
	D1	61	84	223	02	1.1	1256
	D2	54	97,2	243	08	1.0	1251,2
	D3	31,4	46,9	256	07	1.7	2135,7
240 días	Control	35,0	74,1	204,6	0,7	1,1	786,4
	D1	61,7	84,8	229,6	0,2	1,1	1762,9
	D2	30,2	78,3	195,9	1,9	1,0	1202
	D3	22,5	60,8	315,5	1,2	2,7	3918

Valores de referencia para conejos (12): SGOT: 42 - 98 (71), SGPT: 79 - 849 (65). LDH: 397 - 848 (613) U/L. Ácido úrico: 0,10 - 0,3 (0,18) mg/100 mL creatinina: 0,50 - 1,0 (0,75) mg/100mL. CK NAC ACTIVADO: 2000 - 2100 U/L

Tabla 6. Diagnóstico histopatológico de conejas (control y tratamiento)

Tiempo de tratamiento	Coneja	Estómago	Intestino delgado duodeno	Hígado/bazo	Pulmón	Riñón dcho.	Intestino grueso	corazón	cerebro
60 días	Control	d	d	d	d	b	d	d	d
	D1	d	d	d	d	b	d	d	d
	D2	d	d	a	d	b	d	d	d
	D3	d	d	d	d	b	d	d	d
120 días	Control	d	d	a	d	d	d	d	d
	D1	d	d	a	c	b	d	d	d
	D2	d	d	a	d	d	d	d	d
	D3	d	d	a	d	d	d	d	d
180 días	Control	d	d	d	d	d	d	d	d
	D1	d	d	d	d	d	d	d	d
	D2	d	d	d	d	d	d	d	d
	D3	d	d	d	d	d	d	d	d
240 días	Control	d	d	d	d	d	d	d	d
	D1	d	d	d	d	d	d	d	d
	D2	d	d	d	c	b	d	d	d
	D3	d	d	d	c	b	d	d	d

Referencias

1. Zbinden G. Predictive value of animal studies in toxicology: Regulatory Toxicol Pharmacol. (1991);14:167-77.
2. Arencibia D.F, Rosario L.A, López Y, Fariñas M, Infante J.F, Díaz D, Prieto J.L. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel (revista de toxicología en línea) (2009); 22(1):1-15.
3. Vettorazzi G Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. 1989.
4. Asociación Venezolana para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (AVECAL). Manual para la producción y uso ético de los animales de Laboratorio. (2008). Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología. Caracas-Venezuela.
5. MPPCyT (MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA E INDUSTRIAS INTERMEDIAS). Normas para la utilización de animales en investigación: en experimentación en el laboratorio, obtenidos en sus hábitats, estudios de sus patologías y de su comportamiento natural- Manual Bioética y Bioseguridad. 2008. Cap. 3. Pp: 33-35. Caracas – Venezuela.
6. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline no. 425: Acute Oral Toxicity– Up-and-Down Method. Approved: June 1998. (Definitions for reference dose and threshold). 1998.
7. Alemán C, Mesa R, Noa M, Rodeiro I, Menéndez R, Gamez R. Toxicología aguda del D-002 en dos especies no roedoras. Rev. CENIC Cien. Biol (2001); 32(1):51-55.
8. Auletta C. Acute Systemic Toxicity Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook. Editorial Marcel Dekker. Inc. U.S.A. (1999); 43-86.
9. Gámez R, Más R, Noa M, Menendez R. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. Toxicol Letters (2000); 118:31-41.
10. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa, Ontario. National Library of Canada, 1986.
11. Faria O, Mendible V, Virgilio J. Valores hematológicos en conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) y niveles de progesterona en conejos estantes. (2009); 3:219-272.
12. Verde M, Gómez J. Parámetros sanguíneos de interés clínico en conejos normales. Informe técnico. Boletín de cunicultura. Boletín de Cunicultura, ISSN 0210-1998, Nº 38. (1987); p. 40-47
13. Gutiérrez P. Modulación por las distintas fuentes de grasa de la dieta (aceites de oliva, girasol y pescado) de la apoptosis inducida por la adriamicina: papel de la mitocondria. TESIS DOCTORAL. Dpto. de fisiología. Instituto de nutrición y tecnología

- de los alimentos "José Mataix Verdú" Universidad de Granada (España). (2000); p 253.
14. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic S4 Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent) toxicity testing. (2006). Fuente: <http://www.emea.eu.int>. acceso 27 Mayo 2013.
 15. Gutiérrez A, Gámez R, Más R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, Curveco D, García H. Toxicología aguda del D-004 en conejos. Revista CENIC Ciencias Biológicas (2007); 38: 99 – 102.
 16. Adams C. The laboratory rabbit. En: The Ufaw Handbook on The Care and Management of Laboratory. Editorial Wiley – Blackwell. Cap. 26. p. 415 – 435.
 17. Van Zutphen L, Baumans V, Beynen A. Principles of Laboratory Animal Science. Editorial Elsevier Science Publishers. Amsterdam (The Netherlands). (1993). p. 363
 18. De Jesús R. Introducción a la ciencia de los Animales de Laboratorio. Editorial Consejo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes. Mérida (Venezuela) Universidad de Los Andes.(1998); p. 97
 19. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología. 10ma. Ed. Cap. VII. Células sanguíneas, inmunidad y coagulación de la sangre. Editorial. McGraw-Hill Interamericana Distrito Federal (México). (2001); p. 465.
 20. Giannini E, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. CMAJ. (2005);172:367-79.
 21. Macin S, Perna E, Badaracco J, Agüero F, Coronel M, Medina F. *et al*. Importancia del daño miocárdico y la función renal em pacientes com infoarto agudo de miocardio y pronóstico a largo plazo. Rev Fed Arg Cardi, (2012); 241 (5):188-195.
 22. Dowshen S. Análisis de sangre: Lactato Deshidrogenasa (LDH). 2009: Fuente: http://kidshealth.org/parent/en_espanol/medicos/test_ldh_esp.html. acceso: 27 Noviembre 2013.
 23. López-Silva A, Sahagún-Flores J, León-Jiménez C, González-García C, Hernández-Flores G, Bravo-Cuéllar A. La Creatinfosfokinasa tiene utilidad en la Evaluación Pronóstica Temprana de Discapacidad en el Infarto Cerebral. Revista Ecuatoriana de Neurología. (2007). Fuente: http://medicosecuador.com/revecuatneurol/vol16_n2_2007/index.html. acceso: 27 Noviembre 2013.

Recibido: 01/12/13

Aceptado: 15/01/13