



Toxicología Subcrónica Oral del D-003 en Ratones NMRI

Rafael GÁMEZ *, Miriam NOA, Rosa MÁ S, María RODRÍGUEZ, Idania RODEIRO,
Roberto MENÉNDEZ, Caridad HERNÁNDEZ y Haydee GARCÍA

*Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.*

RESUMEN. El D-003 es una mezcla de ácidos alifáticos primarios de muy alto peso molecular purificada de la cera de caña, con efectos hipolipemiente y antiagregante plaquetario demostrados experimental y clínicamente. Los estudios toxicológicos han investigado la toxicidad del D-003, administrado como dosis orales únicas y repetidas en ratas y perros. Este estudio investigó la toxicidad oral del D-003 administrado como dosis repetidas a ratones NMRI. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos: 1 control y 3 tratados con D-003 (5, 50 y 500 mg/kg/d). Los tratamientos se administraron durante 90 días, a cuyo término los animales fueron sacrificados. El tratamiento subcrónico oral con D-003 no produjo evidencias de toxicidad asociada al tratamiento, según el análisis de su ganancia de peso, consumo de alimentos, observaciones clínicas, indicadores de bioquímica sanguínea, hematología, peso relativo de los órganos y análisis histopatológico, que no mostraron diferencias o tendencias entre tratados y controles. Los resultados en esta segunda especie roedora confirman que el D-003 administrado por vía oral a dosis repetidas no resulta tóxico aún a la máxima dosis investigada.

SUMMARY. "Oral Subchronic Toxicity of D-003 in NMRI Mice". D-003 is a mixture of very high molecular weight aliphatic acids purified from sugarcane wax with lipid-lowering and antiplatelet effects experimentally and clinically proven. Toxicological studies have assessed the oral toxicity of D-003, administered as single or repeated doses, in rats and dogs. This study investigated the oral toxicity of D-003 repeatedly administered to NMRI mice. Animals were randomly distributed into 4 groups: 1 control and 3 treated with D-003 (5, 50 and 500 mg/kg/d, respectively). Treatments were given for 90 days, and at treatment completion animals were sacrificed. Oral subchronic treatment with D-003 did not show evidences of drug-related toxicity, as per the analysis of body-weight gain, food consumption, clinical daily observations, blood biochemistry and haematological safety indicators, relative organ weight and histopathological study, which did not show any significant difference or trends between control and treated animals. The results of this study in a second rodent species confirm that D-003 administered orally at repeated doses was not toxic, even at the highest dose investigated.

INTRODUCCION

El D-003 es una mezcla de ácidos primarios alifáticos superiores purificada de la cera de caña (*Saccharum officinarum*, L.), cuyo componente principal es el ácido octacosanoico, seguido de los ácidos triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico, mientras que los ácidos tetracosanoico, pentacosanoico, hexacosanoico, heptacosanoico, nanocosanoico, hentriacontanoico, tritriacontanoico, pentatriacontanoico y

hexatriacontanoico están presentes en menores proporciones ¹.

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que el tratamiento oral con D-003 produce efectos hipocolesterolemizantes ²⁻⁶, asociados a la inhibición de la síntesis de colesterol antes de la formación de mevalonato, mediante la regulación de la actividad de la HMGCoA reductasa ⁷, enzima clave de la síntesis de colesterol, así como efectos antiagregantes plaquetarios

PALABRAS CLAVE: Ácidos primarios alifáticos superiores, Antiagregante plaquetario, D-003, Hipolipemiente, Toxicología subcrónica.

KEY WORDS: Antiplatelet drugs, Cholesterol-lowering drugs, D003, Higher aliphatic primary acids, Subchronic toxicity.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: rafael.gamez@cnic.edu.cu, cpn@cnic.edu.cu

⁸⁻¹⁰. Además, el D-003 inhibe la peroxidación lipídica ^{5,11}, lo cual, unido a sus efectos sobre la vía del mevalonato, pueden contribuir a sus efectos antiosteroporóticos en ratas ovariectomizadas y en ratas tratadas con prednisolona ¹²⁻¹⁴.

Estudios de toxicidad aguda en ratas Wistar y en ratones NMRI demostraron que la administración de dosis únicas orales de D-003 hasta 2 y 5 g/kg, respectivamente; no resultaron tóxicas, ya que no ocurrieron muertes ni se detectaron efectos tóxicos durante los 14 días que siguieron a la administración de la dosis ¹⁵.

Estudios de la toxicidad oral crónica del D-003 en ratas y perros, en los que se pusieron de manifiesto sus efectos antiagregante plaquetario e hipolipemiente, respectivamente, no mostraron toxicidad atribuible al tratamiento con D-003 ^{16,17}. Además, el D-003 no ha mostrado potencial citotóxico o mutagénico en ensayos *in vitro* e *in vivo* ¹⁸⁻²⁰ ni evidencias de toxicidad fetal o reproductiva en ratas y conejos ²¹⁻²³.

Como parte de los estudios toxicológicos requeridos para evaluar la toxicidad potencial de una nueva sustancia, los estudios de dosis repetidas deben realizarse en dos especies roedoras ²⁴. Por tanto, el objetivo del presente trabajo consistió en investigar la toxicidad oral de dosis repetidas de D-003 administradas durante 90 días a ratones, la segunda especie roedora más utilizada con estos objetivos.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones NMRI adultos jóvenes de ambos sexos procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 18-25 g. Los animales fueron adaptados durante 7 días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en 21 ± 2 °C, la humedad entre el 55-60% y la iluminación en ciclos de 12 h. El alimento que se les suministró fue pienso estándar para roedores preparado en el CENPALAB. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo a los principios éticos para el uso de animales de laboratorio y a los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales.

Administración y dosificación

El D-003 fue suministrado por el Departamento de Química del Centro de Productos Naturales, y se utilizó tras corroborar sus especificaciones de calidad. El D-003 se administró suspendido en un vehículo goma acacia/H₂O (10 mg/mL), una vez confirmada la homogeneidad

y estabilidad de estas suspensiones. Las suspensiones se prepararon semanalmente, de acuerdo al aumento de peso de los animales. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos (30 animales/sexo/grupo), 1 grupo control tratado con volúmenes equivalentes del vehículo y 3 tratados con D-003 (5, 50 y 500 mg/kg). La dosis mayor investigada fue 500 mg/kg, 100 veces mayor que la dosis efectiva mínima en roedores y 4 veces inferior que la máxima dosis recomendada para evaluar toxicidad oral aguda (2000 mg/kg) según el método de las clases ²⁴. Las otras dosis (5 y 50 mg/kg) fueron submúltiplos (0.01 y 0.1) de la mayor dosis investigada.

Observaciones diarias

Las observaciones se realizaron entre 8:30 y 10:30 horas, e incluyeron los aspectos siguientes: respiración; apariencia de la piel; consistencia de las heces; lacrimación; actividad locomotora; reflejos de enderezamiento y agarre, así como presencia de salivación; piloerección; convulsiones; catalepsia; temblores y/o de conductas estereotipadas. También se observó si aparecían o no masas o abscesos evidentes al tacto. En la tarde, entre las 16:00 y 17:00 horas, se realizó una segunda observación para detectar animales moribundos.

Evaluaciones Terminales

Concluido el período de tratamiento, los animales fueron sacrificados en atmósfera de éter y posteriormente desangrados por la aorta abdominal. Se colectaron muestras de sangre para el estudio de indicadores sanguíneos.

Hematología y bioquímica sanguínea

Los indicadores bioquímicos determinados fueron los siguientes: glucosa, urea, alanito amino transferasa (ALAT), aspartato amino transferasa (ASAT), fosfatasa alcalina y creatinina. Las determinaciones se realizaron por métodos enzimáticos convencionales, con juegos de reactivos (Boehringer Mannheim). Los indicadores hematológicos determinados fueron la hemoglobina, el hematocrito y el conteo global y diferencial de leucocitos, realizados por métodos de rutina de laboratorio clínico.

Exámenes anátomo-patológicos

A todos los animales se les realizó la necropsia, examinándose el contenido de sus cavidades abdominal, torácica y craneana. Los órganos se pesaron en una balanza Sartorius y con posterioridad se calculó la relación: (peso del órgano/peso corporal) x 100. El peso corporal referi-

do es el que presentaban el día de su sacrificio. Se tomaron muestras de todos los órganos y tejidos de cada animal y se fijaron en formaldehído al 10% tamponado, y se procesaron las de todos los controles y los tratados con la dosis mayor, las cuales se colorearon con hematoxilina y eosina. Se empleó un microscopio Olympus BH-2 en la observación de las láminas.

Análisis estadístico

Las variables continuas se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y las categóricas con el test de la Probabilidad Exacta de Fisher, ambos de dos colas, de modo independiente para cada sexo²⁶. Se empleó el paquete estadístico "Statistics for Windows" (Release 4.2; StatSoft, Inc, Tulsa OK, USA). La significación estadística se estableció para un valor $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad y observaciones clínicas

Durante el estudio, un macho tratado con la dosis intermedia (50 mg/kg) de D-003 amaneció muerto sin signos tóxicos previos, no pudiéndose tomar muestras de tejidos debido a su estado de lisis, sin otras muertes durante el estudio. Debido a la pérdida de peso y a su aspecto general, se practicó la eutanasia a 1 hembra control y a 2 machos del grupo de 50 mg/kg, cuyas autopsias mostraron que tenían lastimaduras en el tracto digestivo superior relacionadas con la manipulación de la entubación, no atribuibles a los tratamientos (vehículo o D-003). No se observaron signos de toxicidad, salvo discretas lesiones de la piel detectadas esporádicamente en todos los grupos. Estos resultados son consistentes con los de estudios previos de la toxicidad oral subcrónica (90 días)¹⁵ y crónica (6 meses) del D-003 en ratas¹⁶.

Efectos sobre peso corporal y consumo de alimentos.

La Tabla 1 muestra los valores de peso corporal al inicio y al final del estudio, cuyas com-

paraciones no mostraron diferencias significativas entre los grupos. De modo consistente, el consumo de alimentos tampoco fue afectado por el tratamiento (datos no mostrados). En tal sentido, tanto el aumento del peso corporal como el consumo de alimentos son indicadores del estado general de salud de los animales que suelen modificarse por la acción tóxica de diferentes agentes, razón por la cual no resultar alterados por la administración de una sustancia dada representa un criterio de su buena tolerabilidad^{24,25}.

Efectos sobre indicadores bioquímicos

Las Tablas 2 y 3 muestran los valores de los indicadores de hematología y bioquímica sanguínea, respectivamente. En ninguna comparación se encontraron diferencias significativas respecto a los controles, lo que indica que el tratamiento no afectó los indicadores estudiados, resultados que son coherentes con los de estudios precedentes en que el D-003 se ha administrado durante 90 días y 6 meses a ratas^{15,16} y durante 9 meses a perros beagle¹⁷.

Efectos sobre peso de los órganos y estudio anatomo-patológico

El tratamiento tampoco modificó el peso relativo de los órganos respecto al corporal, al compararse los datos con los del grupo control (Tabla 4), lo que sugiere que no produjo alteraciones relevantes, incluidas reacciones inflamatorias, de los órganos investigados, aspecto que se confirma en los resultados del estudio anatomo-patológico.

La Tabla 5 muestra los resultados del estudio anátomo-patológico practicado a los animales tratados con la mayor dosis (500 mg/kg) y los controles, no encontrándose diferencias entre ambos.

La presencia de focos de células grandes cargadas de pigmento ceroides en glándulas adrenales (ubicadas cerca de la unión córtico-medular), tanto en animales controles como experi-

Dosis (mg/kg)	Peso corporal (g) (x ± DS)			
	Machos		Hembras	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Control	33,9 ± 3,1	41,9 ± 4,8	26,7 ± 3,1	31,5 ± 4,6
5	35,4 ± 3,6	40,9 ± 5,1	26,9 ± 2,9	31,3 ± 4,2
50	34,6 ± 3,2	41,4 ± 6,0	27,2 ± 2,6	31,0 ± 4,0
500	35,2 ± 2,6	41,1 ± 3,7	26,2 ± 2,2	31,0 ± 3,4

Tabla 1. Efecto del tratamiento oral con D-003 por 90 días sobre el peso corporal.

Dosis (mg/kg)	Hb (mg/100 ml)	Hto	L	N (%)	M	E	Conteo global Células/mm ³
Machos							
Control	13,3 ± 1,8	42,0 ± 5,9	82,6 ± 2,6	17,4 ± 2,6	0	0	5714 ± 996
5	13,8 ± 1,3	43,5 ± 4,2	79,4 ± 3,0	20,3 ± 3,4	0,4 ± 0,74	0	6188 ± 1032
50	14,5 ± 0,4	46,3 ± 2,8	67,7 ± 9,0	31,7 ± 8,9	0,7 ± 1,03	0	5700 ± 957
500	15,2 ± 0,5	50,5 ± 1,4	79,8 ± 5,2	20,2 ± 5,2	0	0	5920 ± 755
Hembras							
Control	14,4 ± 0,8	45,7 ± 4,1	79,8 ± 3,2	20,2 ± 3,2	0	0	6050 ± 554
5	15,9 ± 1,0	50,4 ± 3,7	79,4 ± 4,9	20,6 ± 4,9	0	0	6200 ± 924
50	15,9 ± 0,7	51,2 ± 1,5	83,3 ± 1,9	16,7 ± 1,9	0	0	7200 ± 654
500	15,5 ± 0,8	50,7 ± 1,5	81,8 ± 4,4	18,2 ± 4,4	0	0	5944 ± 1141

Tabla 2. Efecto del tratamiento oral con D-003 por 90 días sobre los parámetros hematológicos. (X ± D.E.). **Hb** hemoglobina, **Hto** hematocrito, **L** linfocitos, **N** neutrófilos, **M** monocitos, **E** eosinófilos.

Grupos (mg/kg)	Glucosa (mmol/L)	Creatinina (mmol/L)	ALAT (UI)	ASAT (UI)	Fosfatasa Alcalina (UI)	Urea (UI)
Machos						
Control	8,5 ± 2,6	50,9 ± 11,7	47,0 ± 15,7	88,3 ± 23,4	53,5 ± 13,7	8,55 ± 1,48
5	7,4 ± 2,6	49,6 ± 7,3	46,8 ± 8,7	78,8 ± 15,1	52,5 ± 16,4	8,29 ± 1,56
50	7,6 ± 2,8	52,3 ± 5,4	59,2 ± 35,8	87,4 ± 27,4	52,8 ± 6,1	8,51 ± 1,44
500	7,0 ± 1,8	52,2 ± 9,1	44,2 ± 20,4	76,5 ± 18,2	49,3 ± 7,4	8,93 ± 1,66
Hembras						
Control	6,9 ± 2,9	52,9 ± 6,5	49,0 ± 18,0	92,3 ± 35,9	73,4 ± 15,3	7,30 ± 0,97
5	5,9 ± 1,4	53,0 ± 16,1	57,1 ± 27,1	120,7 ± 40,7	67,3 ± 14,0	7,70 ± 1,14
50	6,7 ± 1,2	56,5 ± 13,9	48,1 ± 19,9	116,2 ± 34,4	80,1 ± 28,3	6,65 ± 0,61
500	7,8 ± 1,4	52,6 ± 9,3	51,8 ± 23,0	98,4 ± 24,4	88,3 ± 16,3	7,27 ± 1,61

Tabla 3. Efecto del tratamiento oral con D-003 por 90 días sobre los parámetros bioquímicos (X ± D.E.)

mentales, indican que dichas observaciones no están asociadas al tratamiento realizado sino más bien a una lesión espontánea de la línea 27,28.

Por otra parte, se observaron adenomas de células B en las glándulas adrenales de 1 hembra control y en 1 tratada con 500 mg/kg. Ha sido referido que los tumores de la corteza adrenal pueden aparecer espontáneamente en ratones, con una incidencia total de aproximadamente un 1% en ratones CD-1, siendo los adenomas más comunes que los carcinomas; y datos similares se han referido para otras líneas de ratones 28,29. En nuestro estudio, la frecuencia global (2/120, 1,6%) concuerda con estos datos, lo que unido a que la frecuencia en animales controles y tratados fue similar, descarta que sean atribuibles al tratamiento.

Entre las lesiones del sistema reproductivo se detectó periarteritis en el testículo de un macho control, y quistes de ovario, hallazgo común en esta especie 28, en 3 hembras controles y 1 tratada con la mayor dosis.

La ausencia de toxicidad oral subcrónica del D-003 demostrada en el presente estudio concuerda, como hemos referido, con los resultados de estudios precedentes en roedores y no roedores 15-17, y los valores de los diferentes indicadores estudiados son compatibles con datos históricos de nuestro laboratorio 27, lo que confiere validez adicional a los presentes resultados.

Es importante destacar que la ausencia de toxicidad detectada no debe interpretarse como resultado de una baja exposición al D-003, ya que dosis orales de 5 y 25 mg/kg administradas repetidamente han producido efectos antitrombóticos y antioxidantes en roedores, respectivamente 8,11, e incluso dosis únicas de 25 mg/kg han producido efectos antiagregantes en ratas y cobayos 8. En efecto, el D-003 administrado por vía oral en dosis únicas, entre 25 y 200 mg/kg, redujo modo significativo y dosis-dependiente la agregación plaquetaria en ratas 8,9, mientras que una dosis única de sólo 5 mg/kg resultó efectiva en el modelo de trombosis venosa en esta

Dosis (mg/kg)	Machos			
	Hígado	Riñón		Corazón
		Derecho	Izquierdo	
Control	4,62 ± 0,42	0,77 ± 0,09	0,74 ± 0,09	0,47 ± 0,05
5	4,54 ± 0,42	0,77 ± 0,08	0,74 ± 0,09	0,48 ± 0,05
50	4,66 ± 0,52	0,77 ± 0,09	0,75 ± 0,09	0,48 ± 0,06
500	4,48 ± 0,63	0,77 ± 0,09	0,73 ± 0,08	0,49 ± 0,05
Pulmones		Bazo		Timo
Control	0,61 ± 0,07	0,41 ± 0,19		0,12 ± 0,04
5	0,61 ± 0,06	0,41 ± 0,11		0,12 ± 0,03
500	0,63 ± 0,06	0,41 ± 0,20		0,14 ± 0,05
500	0,62 ± 0,06	0,39 ± 0,11		0,11 ± 0,02
Hembras				
	Hígado	Riñón		Corazón
		Derecho	Izquierdo	
	Control	4,43 ± 0,40	0,62 ± 0,08	0,60 ± 0,05
5	4,54 ± 0,66	0,60 ± 0,10	0,58 ± 0,09	0,45 ± 0,05
50	4,46 ± 0,74	0,62 ± 0,07	0,60 ± 0,07	0,47 ± 0,07
500	4,59 ± 0,41	0,63 ± 0,06	0,60 ± 0,08	0,47 ± 0,04
Pulmones		Bazo		Timo
Control	0,71 ± 0,08	0,44 ± 0,06		0,19 ± 0,07
5	0,72 ± 0,10	0,49 ± 0,12		0,17 ± 0,04
50	0,74 ± 0,12	0,47 ± 0,08		0,17 ± 0,03
500	0,75 ± 0,08	0,45 ± 0,05		0,17 ± 0,04

Tabla 4. Efecto del tratamiento oral con D-003 por 90 días sobre el peso relativo de los órganos (X ± DE).

Observaciones	Hembras		Machos	
	Control	500 mg/kg	Control	500 mg/kg
Sistema endocrino: Glándulas adrenales				
Adenoma en células B	1/30	1/30	0/30	0/30
Pigmento cerioide	1/30	0/30	3/30	2/30
Sistema digestivo: Hígado				
Necrosis focal con infiltrado inflamatorio	0/30	1/30	0/30	0/30
Sistema reproductor				
Testículos: Periarteritis	-	-	1/30	0/30
Ovario: Quiste	3/30	1/30	-	-

Tabla 5. Lesiones histopatológicas observadas en el estudio de toxicidad oral subcrónica del D-003 en ratones NMRI.

especie ⁸. Además, dosis de 0,5, 5, 50 y 100 mg/kg inhibieron la peroxidación lipídica inducida por diferentes agentes en ratas con respecto al grupo control ¹¹.

Por otra parte, la administración de dosis únicas de D-003 mezclado con ³H-octacosanoico a ratas por vía oral (40 mg/kg) y endovenosa

(4 mg/kg), reveló una absorción oral rápida del radioactivo, con niveles plasmáticos apreciables a los 15 min y con un tmax de 30 min, la cual a las 2 h de la administración se había distribuido en casi todos los tejidos estudiados, fundamentalmente en el hígado, seguido por estómago, intestino delgado y plasma. La cantidad absorbi-

da, de acuerdo al cociente de excreción renal tras la administración oral y endovenosa del compuesto marcado fue de 58,6% y su biodisponibilidad sistémica de un 16,1%³⁰.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el esquema de administración empleado en este estudio, en el cual una dosis de hasta 500 mg/kg se administró durante 90 días, supone una exposición muy superior a la utilizada en los modelos que demostraron los efectos farmacológicos del D-003 en roedores y en el estudio farmacocinético, en el cual una dosis oral única de sólo 40 mg/kg mostró una rápida y considerable absorción ($\geq 50\%$) en esta misma especie³⁰. Por lo tanto, al no detectarse toxicidad en ningún grupo, nuestro estudio indica que la mayor dosis (500mg/kg) administrada por vía oral de modo subcrónico no produjo efectos tóxicos observables (NOEL) en ratones.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio no mostraron evidencias de toxicidad relacionada con el D-003 (5-500mg/kg) administrado por vía oral durante 90 días a ratones NMRI, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados y los controles con relación a todos los indicadores estudiados. Por tanto, la mayor dosis de D-003 administrada (500 mg/kg) se comportó como un nivel de dosis que no produce efectos tóxicos observables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Más, R. (2004) *Drugs Future* **29**: 773-86.
- Gámez, R., S. Mendoza, R. Más, R. Mesa, G. Castaño, B. Rodríguez. & D. Marrero (2000) *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **61**: 460-8.
- Mendoza, S., R. Gámez, M. Noa, R. Más, G. Castaño, R. Mesa, M. Mesa & M de Armas. (2001) *Curr. Ther. Res.* **62**: 209-20.
- Castaño, G., R. Más, L. Fernández, J. Illnait, R. Gámez, E. López, J.A. Gutiérrez, J.C. Fernández & E. Alvarez. (2002) *Drugs R&D* **3**: 337-48.
- Castaño, G., R. Menéndez, R. Mas, N. Ledón, J.C. Fernández, J.L. Pérez, R.M. González & M. Lescay (2003) *Clin. Drug Invest.* **23**: 193-203.
- Castaño, G., R. Mas, L. Fernández, J. Illnait, J.C. Fernández, S. Mendoza, R. Gámez; M. Mesa, E. López & E. Alvarez (2003) *Clin Drug Invest.* **23**: 789-802.
- Menéndez, R., R. Más, A.M. Amor, I. Rodeiro, R.M. González & J.L. Alfonso (2001) *Pharmacol. Res.* **44**: 299-304.
- Molina, V., M.L. Arruzazabala, D. Carbajal & R. Mas (2000) *Pharmacol. Res.* **42**: 137-43.
- Molina, V., M. L. Arruzazabala, D. Carbajal & R. Mas (2002) *Prostagl. Leuktr. Ess. Fatty Acids.* **67**: 19-24.
- Arruzazabala, M. L., V. Molina, D. Carbajal, L. Fernandez, R. Mas, J. Illnait, G. Castaño, J. Fernández & S. Mendoza (2004) *Int. J. Pharmacol. Clin. Res.* **24**: 56-64
- Menéndez, R., R. Mas & Y. Pérez (2002) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**: 13-7.
- Noa, M., R. Más & S. Mendoza.(2004) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **30**: 35-41.
- Noa, M., S. Mendoza, R. Más, N. Mendoza & F. León (2004) *Drugs in R&D* **5**: 281-90.
- Mendoza, S., M. Noa, R. Más & N. Mendoza (2005) *Int. J. Tiss. React.* **27**: 213-22.
- Gámez, R., R. Más, M. Noa, R. Menéndez, C. Alemán, P.C. Acosta, H. García, A.M. Amor, Y. Pérez & E. Goicochea (2000) *Toxicol. Letters* **118**: 31-41.
- Gámez, R., R. Mas, M. Noa, R. Menéndez, H. García, J. González, Y. Pérez & E. Goicochea (2002) *Drugs in R&D* **3**: 375-86.
- Gámez, R., R. Más, M. Noa, R. Menéndez, H. García, J. González, Y. Pérez & E. Goicochea (2004) *Drugs Exp. & Clin. Res.* **30**: 75-88.
- Gámez, R., I. Rodeiro, I. Fernández & C.P. Acosta (2002) *Teratog. Carcinog. Mutagenesis* **22**: 175-81.
- Gámez, R., J.E. González, I. Rodeiro, I. Fernández, C. Alemán, M.D. Rodríguez, P.C. Acosta & H. García (2001) *J. Med. Food* **4**: 85-92.
- González, J., R. Gámez, I. Rodeiro & H. García (2004) *Rev. CNIC. Cien. Biol.* **35**: 125-7.
- Rodríguez, M. D., R. Gámez, J. E. González, H. García, P.C. Acosta & E. Goicochea (2003) *Food. Chem. Toxicol.* **41**: 89-93.
- Rodríguez, M. D., J. E. González., C. Aleman, I. Rodeiro, E. Arango, R. Gámez, S. Valdes, H. García, E. Goicochea & C.P. Acosta (2004) *Food Chem. Toxicol.* **42**: 1977-85.
- Rodríguez, M. D., A. Gutiérrez, G. Marrero, H. García & R. Gámez (2006) *J. Med. Food.* **9**: 223-20.
- Piccirillo, VJ. (1999) Repeated-Dose Toxicity Studies. In: Product Safety evaluation Handbook. (S.C. Gad., ed) Ed Marcel Dekker, Inc. U.S., pp. 201-22.
- Auletta, C. (1999) Acute Systemic Toxicity. In: Product Safety evaluation Handbook: (S.C. Gad., ed), Ed Marcel Dekker, Inc. U.S., pp. 43-86.
- Gad, S.C. (1999) Practical Statistical Analysis.. In: Product Safety evaluation Handbook: (S.C. Gad., ed), Ed Marcel Dekker, Inc. U.S., pp. 463-538.
- Alemán, C.L., M. Noa, R. Más, I. Rodeiro, R. Mesa, R. Menéndez, R. Gámez & C. Hernández (2000) *Lab. Animals* **34**: 379-385.
- Faccini, J.M., D. P. Abbot & G.J. Paulus (1990) Mouse histopathology, Elsevier, Amsterdam New York- Oxford
- Maita, K., M. Hirano, T. Harada, K. Mitsumori & A. Joshiba. (1988) *Toxicol. Pathol.* **16**: 340-9.
- Menéndez, R., R. Mas, Y. Pérez, R.M. González & S. Jiménez (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 48-60.