

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**  
**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**



**PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PERFIL DE SEGURIDAD DE UN  
EXTRACTO DE CO<sub>2</sub> FLUIDO SUPERCRÍTICO DE SAW PALMETTO  
(*Serenoa repens* W. Bartram)**

**Patrocinante:**

Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología.  
Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica.

**Director de memoria:**

Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología.  
Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica.

**Memoria de Título para optar al título de Química Farmacéutica**

**LILIANA ANDREA PEREDO SILVA**

SANTIAGO DE CHILE

2010

*Para triunfar en la vida, no es importante llegar primero.*

*Para triunfar simplemente hay que llegar,  
levantándose cada vez que se cae en el camino.*

*Dedicado a mi papá. QEPD*

## **AGRADECIMIENTOS**

Haber llegado hasta este momento y haber concluido estos seis años de estudio, no hubiera sido posible sin el incondicional apoyo de mi familia, sin sus palabras de aliento y sin su abrazo y comprensión eterna cada vez que debía faltar a un evento familiar por tener que estudiar. Gracias mamá por tu amor y dedicación, por ser un ejemplo de entrega y sacrificio. Gracias hermana por tus palabras de aliento y por tus consejos, por mostrarme que la vida es más que estudio y que hay tantas otras cosas por las que vale la pena luchar. Gracias papá por ser mi pilar y ejemplo de vida, por tu fuerza, amor y por haberme enseñado a que nada es imposible si se trabaja duro. Gracias papá por haber sido el gran hombre que fuiste, porque donde quiera que la vida me lleve, tu imagen, consejos y esencia de persona me guiarán por siempre.

Gracias a mi querido laboratorio y en especial, gracias profesora María Eugenia Letelier, por haberme enseñado más allá que sólo lo académico, por haberme ayudado cuando más lo necesite y por enseñarme cada día una lección de vida. Gracias también Paula, ya que tu apoyo y ánimo fueron fundamentales para este proceso.

Por último, gracias a ti Alfredo que llegaste a iluminar mi vida y llenarla de amor, gracias por nunca dejarme caer y ayudarme a levantar cuando sentía que ya no tenía fuerzas para seguir, sin ti haber llegado hasta aquí hubiera sido un camino cuesta arriba muy difícil de superar. Sinceramente, gracias a todos.

## **ABREVIATURAS**

VCM	: Volumen corpuscular medio
HCM	: Hemoglobina corpuscular media
CHCM	: Concentración de hemoglobina corpuscular media
FA	: Fosfatasa alcalina
LDH	: Lactato deshidrogenasa
GOT	: Transaminasa glutámico-oxalacética
HPB	: Hiperplasia prostática benigna
PBS	: Buffer fosfato salino pH 7,4



## ÍNDICE GENERAL

	<i><b>Página</b></i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Reactivos.....	7
Animales de experimentación.....	7
Tratamiento de animales de experimentación.....	8
Exámenes clínicos: hemograma y perfil bioquímico.....	9
Estudios histomorfológicos.....	10

Análisis estadístico.....	11
III.RESULTADOS.....	12
IV.DISCUSIÓN.....	27
V. REFERENCIAS.....	31
ANEXOS. Ampliaciones de microfotografías.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

### *Página*

Figura 1	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre el número de eritrocitos y hematocrito de ratas Sprague-Dawley	12
Figura 2	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre hemoglobina y parámetros relacionados (VCM, HCM, CHCM) de ratas Sprague-Dawley	13
Figura 3	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre leucocitos y linfocitos de ratas Sprague-Dawley	14
Figura 4	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre plaquetas de ratas Sprague-Dawley	15
Figura 5	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de calcio y fósforo de ratas Sprague-Dawley	17
Figura 6	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de albúmina y proteínas totales de ratas Sprague-Dawley	18

Figura 7	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de glucosa, colesterol, bilirrubina y nitrógeno ureico de ratas Sprague-Dawley	19
Figura 8	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de Fosfatasa alcalina, Transaminasa glutámico-oxalacético y Lactato deshidrogenasa de ratas Sprague-Dawley	20
Figura 9	Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre la morfología de biopsias de hígado, bazo, ganglio linfático y timo de ratas Sprague-Dawley	24

## ÍNDICE DE TABLAS

### *Página*

Tabla 1	Protocolo de sacrificio de ratas Sprague Dawley	8
---------	---	---

## RESUMEN

Los extractos herbales deben ser evaluados en cuanto a eficacia y seguridad. Estudios de toxicidad aguda *in vivo* deben considerar los diferentes mecanismos por los cuales los principios activos pueden producir toxicidad. Por consiguiente, se desarrolló una metodología para examinar parámetros generales relacionados con la respuesta de toxicidad aguda. Para ello se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos las cuales fueron tratadas con dos dosis de Saw Palmetto, *Serenoa repens* W. Bartram HiPower® (la dosis recomendada para humanos y una dosis 10 veces mayor) durante 10 días. Se evaluaron los parámetros generales homeostáticos (hemograma y perfil bioquímico), así como características morfológicas de tejidos involucrados en la respuesta a xenobióticos (hígado, timo, bazo y ganglios linfáticos). Todos los parámetros analizados no fueron significativamente diferentes en el grupo control como en los tratados con ambas dosis de Saw Palmetto, HiPower®, sugiriendo que este preparado comercial presenta un buen perfil de seguridad durante el periodo de tratamiento evaluado. La diferencia en las dosis utilizadas fue un orden de magnitud y a pesar de ello, no se observaron alteraciones en los parámetros medidos. El protocolo utilizado en este estudio podría ser utilizado para ensayar la toxicidad aguda *in vivo* de diferentes extractos herbales.

## SUMMARY

Herbal extracts must be evaluated for their efficacy and safety. *In vivo* acute toxicity studies must consider the different mechanisms by which active compounds may elicit toxicological outcomes. Thus, a methodology to test general parameters related to acute toxicity responses in a murine model was developed, using a Saw Palmetto, *Serenoa repens* W. Bartram extract (HiPower®): adult male Sprague-Dawley rats were treated orally with two doses of Saw Palmetto (the recommended dose for humans and a dose 10-fold higher) for 10 days, to examine general homeostatic parameters (hemogram and clinical chemistry) as well as morphological features of tissues involved in the response to xenobiotics (liver, timus, spleen, and lymphatic ganglia).

All the parameters assayed did not undergo significant changes during treatment, suggesting that the commercial extract of Saw Palmetto HiPower® displays a good safety profile for the period tested. The doses assayed spanned over one order of magnitude in the drug concentration and we did not observe differences in the parameters assayed. This method may be adopted for testing the *in vivo* acute toxicity of any herbal extracts.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La medicina nativa ha utilizado las plantas durante milenios para el tratamiento de diversas enfermedades; estos usos han establecido las bases para el aislamiento de aquellos compuestos para su uso terapéutico. Sin embargo, sólo recientemente los estudios científicos especializados en extractos herbales han comenzado a validar los usos terapéuticos y los perfiles de seguridad de ellos. La mayoría de estas investigaciones se enfocan sólo en la aplicación terapéutica de los extractos herbales. Por ejemplo, los extractos encontrados en las hojas de las plantas son ricos en compuestos antioxidantes como polifenoles, que pueden ser útiles para el tratamiento de patologías asociadas a estrés oxidativo (enfermedades neurodegenerativas, entre otros). No obstante, la evaluación de la seguridad de los preparados herbales es un gran desafío, debido a la naturaleza compleja de estos extractos. En contraste a los compuestos purificados, los extractos herbales exhiben un número elevado de moléculas diferentes, con potenciales blancos biológicos muy diferentes; las interacciones de los compuestos herbales con sus blancos pueden llevar a efectos benéficos y/o tóxicos. Es por esto, que se ha vuelto necesario desarrollar una metodología que evalúe el perfil de seguridad de extractos herbales que contengan más de un componente activo.

El presente trabajo, está orientado a establecer una metodología para evaluar la toxicidad aguda de un extracto herbal de Saw Palmetto (*Serenoa repens* W. Bartram).

Saw Palmetto pertenece a la familia de las *Arecaceae* (*Palmae* o *Palmaceae*); también es conocido como *Serenoa serrulatum* Schultes, *Serenoa serrulata* (Michaux) Nichols, o *Sabal serrulata* (Michaux) Nuttall ex Schultes [1]. Se sabe que el poder terapéutico de Saw Palmetto radica en sus frutos ricos en aceite. Actualmente, el extracto de Saw Palmetto es ampliamente utilizado para el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) [1-5]. El tipo y la abundancia relativa de los componentes activos (compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides, poliprenoides, azúcares, ácidos grasos, etc.) del extracto oleoso de Saw Palmetto, depende principalmente del método de extracción utilizado. Actualmente, los procedimientos más utilizados para la obtención de extractos de Saw Palmetto son: 1) extracciones con n-hexano (100%), que produce el extracto lipoesterólico (LESP) [6]; 2) extracciones con etanol (70-95% V/V) [7]; o 3) extracción con CO<sub>2</sub> fluido supercrítico [8]. Los componentes principales de los extractos de n-hexano son: fitoesteroles, compuestos fenólicos, ácidos grasos libres, ésteres etílicos de ácidos grasos y otros compuestos lipídicos. Los componentes principales de los extractos de etanol son: compuestos liposolubles del tipo poliprenoides, flavonoides, glicósidos fenólicos y alcoholes, y compuestos hidrosolubles como azúcares y polisacáridos acídicos de alto peso molecular. Los componentes principales de



los extractos de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico son: β-sitosteroles, alcoholes grasos y ácidos grasos saturados e insaturados. Cabe señalar que los principios activos responsables de la acción terapéutica de Saw Palmetto son los β-sitosteroles, los cuales inhibirían la actividad de 5-α-reductasa, enzima involucrada en el metabolismo de la testosterona; este mecanismo es el mismo propuesto para el tratamiento de HPB con finasteride, que es el fármaco alopático más utilizado en este tipo de patologías.

Actualmente, los extractos de Saw Palmetto han sido aprobados como drogas de prescripción en Austria, Italia y Polonia [9]. En Suiza, Suecia y Dinamarca, Saw palmetto ha sido aprobada como una droga con *status* OTC para su uso en el tratamiento de problemas urinarios relacionados con HPB [10]. En España, los extractos provenientes de n-hexano estandarizados de Saw Palmetto han sido aprobados como drogas con *status* de prescripción, mientras que aquellos que carecen de estandarización han sido aprobados como suplemento dietario [10]. La aprobación de ellos como drogas se basó fundamentalmente en estudios clínicos desarrollados con este tipo de extractos. Cabe señalar que la FDA considera estos extractos de Saw Palmetto como un suplemento dietario [11]. En Francia durante 1998, más del 40% de los pacientes con HPB fueron tratados con fitoterapia, incluido Saw Palmetto [9]. En Alemania, la Comisión E (Comisión europea encargada de la seguridad de fitomedicamentos) ha evaluado la planta Saw Palmetto como segura y efectiva para el tratamiento de problemas urinarios relacionados con HPB (de leve a

moderado) [12]. En Canadá, Saw Palmetto ha sido autorizado para su venta, como una hierba de medicina tradicional para aumentar el flujo urinario [10].

Aunque existen muchos estudios respecto a las aplicaciones terapéuticas de los extractos de Saw Palmetto [1, 2, 6, 9, 10, 13], hay muy pocos estudios toxicológicos clásicos en animales. Sólo una pequeña cantidad de estudios han mostrado efectos tóxicos significativos de una preparación específica de Saw Palmetto (PC-SPES), el cual fue retirado del mercado en el año 2002 por el Departamento de Servicios de Salud de California [14-17]. Estudios clínicos más recientes con extractos de Saw Palmetto, no han reportado efectos tóxicos serios [4, 18-21]. Por otra parte, un estudio clínico realizado con un extracto de n-hexano de Saw Palmetto mostró efectos hepatotóxicos en sólo uno de los pacientes del estudio [22]. Es por ello que se llevó a cabo un estudio toxicológico en ratas con una ingesta de 2X y 5X la dosis máxima recomendada en humanos (450µL/día) para este tipo de preparación [23]. Estos autores observaron una disminución de las enzimas hepáticas y no detectaron aumento de la lipoperoxidación basal en microsomas hepáticos. Estudios toxicológicos que utilicen extractos de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto aún no han sido reportados.

Es por esto, que el presente trabajo es el primer estudio de toxicidad aguda en ratas de un extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto (nombre comercial, HiPower®). Para este propósito, ratas Sprague-Dawley fueron tratadas durante 10 días con la dosis recomendada para consumo en humanos

(1X) y una 10 veces mayor (10X) de HiPower® (las dosis fueron ajustadas considerando el metabolismo de las ratas como 4 veces superior al de humanos). Se analizaron los parámetros del hemograma y perfil bioquímico de muestras de sangre de las ratas, obtenidas a diferentes intervalos de tiempo. Paralelamente, se realizaron estudios histomorfológicos de biopsias de hígado dado que los principios activos del extracto de Saw Palmetto son xenobióticos lipofílicos que se metabolizan mayoritariamente por el sistema CYP 450 hepático; muchos de los sustratos de este sistema metabólico, al ser metabolizados, generan intermediarios electrofílicos y/o especies reactivas del oxígeno, todos ellos compuestos altamente reactivos y por lo tanto, tóxicos. También se utilizaron biopsias de bazo, timo y ganglios linfáticos para detectar posibles cambios morfológicos ya que estos órganos están especialmente involucrados en la respuesta inmune. Ninguno de los parámetros estudiados mostró diferencia significativa entre los animales controles y los tratados con HiPower®, lo cual muestra la seguridad de este extracto de Saw Palmetto a las dosis ensayadas, en el período de tratamiento elegido para este estudio.

El protocolo propuesto en este estudio, evalúa la homeostasis general y la función del hígado y riñón, órganos responsables de la biotransformación y excreción de xenobióticos, respectivamente.

## **HIPÓTESIS**

El extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto (*Serenoa repens* W. Bartram) no provoca toxicidad aguda en ratas a la dosis recomendada para su uso terapéutico y una 10 veces mayor.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Elaborar un protocolo y estudiar los efectos adversos y/o tóxicos de un extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar los efectos del extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto sobre los parámetros del hemograma de ratas: eritrocito, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), plaquetas, linfocitos y leucocitos.
2. Determinar los efectos del extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto sobre los parámetros del perfil bioquímico de ratas: calcio, fósforo,

glicemia, nitrógeno ureico, colesterol, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina (FA), lactato deshidrogenasa (LDH) y transaminasa glutámica oxalacética (GOT).

3. Determinar los posibles cambios morfológicos provocados por el extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto sobre biopsias de bazo, hígado, timo y ganglios linfáticos de ratas de la cepa Sprague-Dawley.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. MATERIALES**

#### **1. Reactivos**

Formalina tamponada: Formalina comercial al 37%: PBS (1:9) (buffer fosfato salino pH 7,4); Etanol de 100°; Xilol (técnico); Parafina sólida y Tinción Hematoxilina-Eosina, se obtuvieron de Prolab Ltda. La heparina se obtuvo en Corsos S.A. El extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto fue donado por la empresa Madreselva Desarrollo y Producciones Ltda.

#### **2. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (200-230g) los cuales fueron mantenidos con una dieta normal de pellet Kimber, acceso a agua *ad*

*libitum*, ciclos de luz y oscuridad (12:12), y a una temperatura ambiental de 21°C. Los animales fueron mantenidos en el vivero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité de Ética Institucional y según la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (NRC, USA).

## **B. MÉTODOS**

### **1. Tratamiento de animales experimentación**

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos experimentales (40 ratas cada uno): Grupo Control, Grupo 1: tratadas con la dosis recomendada y Grupo 2: tratadas con 10X la dosis recomendada del extracto de Saw Palmetto. A los Grupos 1 y 2 se les administró 28 y 280µL de extracto/Kg/día respectivamente, en dos dosis orales (*gavage*). Estas dosis fueron calculadas a partir de 1X la dosis recomendada para uso en humanos (480µL/día), y considerando 70Kg como peso promedio para humanos. Se consideró también la tasa metabólica de las ratas, la cual es 4 veces mayor que la de los humanos. Las dosis fueron diluidas en aceite de maravilla para su administración oral. El grupo Control recibió aceite vegetal solo en volúmenes equivalentes.

Luego de 2, 4, 6, 8 y 10 días de tratamiento diario, 8 ratas de cada grupo fueron anestesiadas con éter y sacrificadas a través de desangramiento por punción cardíaca. Las muestras de sangre obtenidas se utilizaron para realizar

hemograma y perfil bioquímico. Se recolectaron también biopsias de hígado, bazo, timo y ganglio linfático para los estudios morfológicos.

**Tabla 1. Protocolo de sacrificio de ratas Sprague-Dawley.**

GRUPOS DE RATAS SACRIFICADAS										
Fechas (día)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Grupo Control</b>		Sacrificar 8 controles		Sacrificar 8 controles		Sacrificar 8 controles		Sacrificar 8 controles		Sacrificar 8 controles
<b>Grupo Tratado Dosis 1</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo A</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo B</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo C</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo D</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo E</b>
<b>Grupo Tratado Dosis 2</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo F</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo G</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo H</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo I</b>		Sacrificar 8 ratas <b>Grupo J</b>

Grupo control: aceite vegetal como vehículo. Grupo tratado Dosis 1: tratamiento con Saw Palmetto 1X. Grupo tratado dosis 2: tratamiento con Saw Palmetto 10X.

## **2. Exámenes clínicos: hemograma y perfil bioquímico.**

Para realizar estos análisis, se extrajeron 4mL de sangre de cada animal en la fecha asignada por el protocolo de sacrificio de los animales. La muestra extraída se dividió y recibió en dos contenedores.

- a) Un tubo con anticoagulante EDTA para realizar el hemograma.
- b) Un tubo sin anticoagulante para realizar el perfil bioquímico.

Ambos análisis fueron realizados en el Laboratorio Central del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

- a) Hemograma:** Recuento de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, VCM (volumen corpuscular medio), HCM (Hemoglobina corpuscular media), CHCM (concentración de hemoglobina corpuscular media), N° de leucocitos, linfocitos, y N° de plaquetas.
- b) Perfil Bioquímico:** Calcio, fósforo, glicemia, nitrógeno ureico sanguíneo, colesterol, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina (FA), lactato deshidrogenasa (LDH), transaminasa glutámico-oxalacética (GOT).

### **3. Estudios histomorfológicos**

En las fechas establecidas en el protocolo de sacrificio de las ratas, además de las muestras de sangre, se extrajeron biopsias de bazo, hígado, timo y ganglios linfáticos. Los tejidos se recibieron en formalina tamponada pH 7,2 para su posterior inclusión en parafina y procesamiento, y posterior teñido con hematoxilina-eosina para realizar el estudio histomorfológico. En este estudio se utilizó un microscopio óptico Askamina, RM L5, Germany.230V~45 VA 50/60 Hz., con un lente Carl Zeiss-Jena 000490, de aumento 10X (10/0.25, 160 / - A pH). En cada porta-objeto se colocaron 2 cortes longitudinales y 2 cortes transversales, los cuales fueron evaluados en 2 y 4 campos respectivamente (Diámetro de campo: 4 mm). Las fotos fueron tomadas con una cámara digital



KODAK [5.0 Mega-Pixeles, modelo: EasyShare CX 7530; 34mm-102mm (Equiv) AF 3x Optical], adosada al ocular del microscopio.

#### **4. Análisis estadístico**

Los valores de hemograma y perfil bioquímico se muestran como la media  $\pm$  el intervalo de confianza del 95% (95% IC); las significancias estadísticas fueron obtenidas a través de ANOVA, utilizando el programa computacional GraphPad Prism 5.0. Las diferencias estadísticas entre las medias y los valores de referencia fueron obtenidos a través del test de Wilcoxon. Los valores de referencia para el hemograma y perfil bioquímico de ratas adultas Sprague-Dawley fueron obtenidas de la Revista Médica Chilena [24] y de aquellos descritos en Lillie y cols., 1996 [25].

El estudio morfológico representa la observación de al menos 10 placas teñidas con hematoxilina-eosina. Las alteraciones observadas fueron número de mitosis y presencia de cuerpos apoptóticos, parámetros que fueron evaluados de acuerdo al siguiente puntaje asignado:

0 = ausencia

1 = discreta cantidad (1 a 2)

2 = moderada cantidad (3 a 5)

3 = abundante cantidad (mayor de 5)

Los valores obtenidos de las distintas muestras (controles y tratadas) fueron relacionados entre sí de acuerdo a los valores controles para establecer

alteraciones morfológicas. La significancia de las diferencias se analizaron mediante el test t-student con un intervalo de confianza del 95% (95% IC).

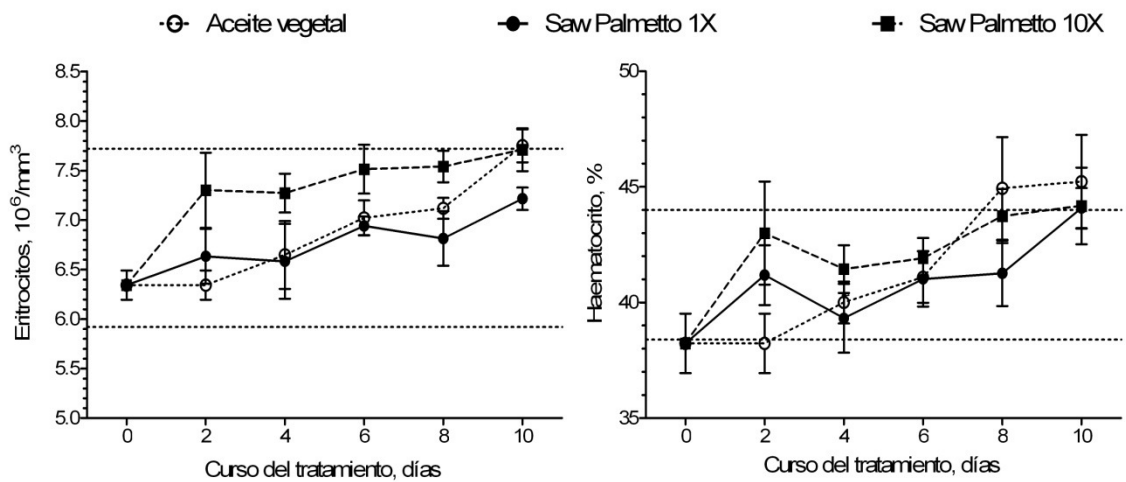
### **III. RESULTADOS**

#### **1. Efecto del extracto de Saw Palmetto sobre los parámetros del hemograma de ratas Sprague-Dawley.**

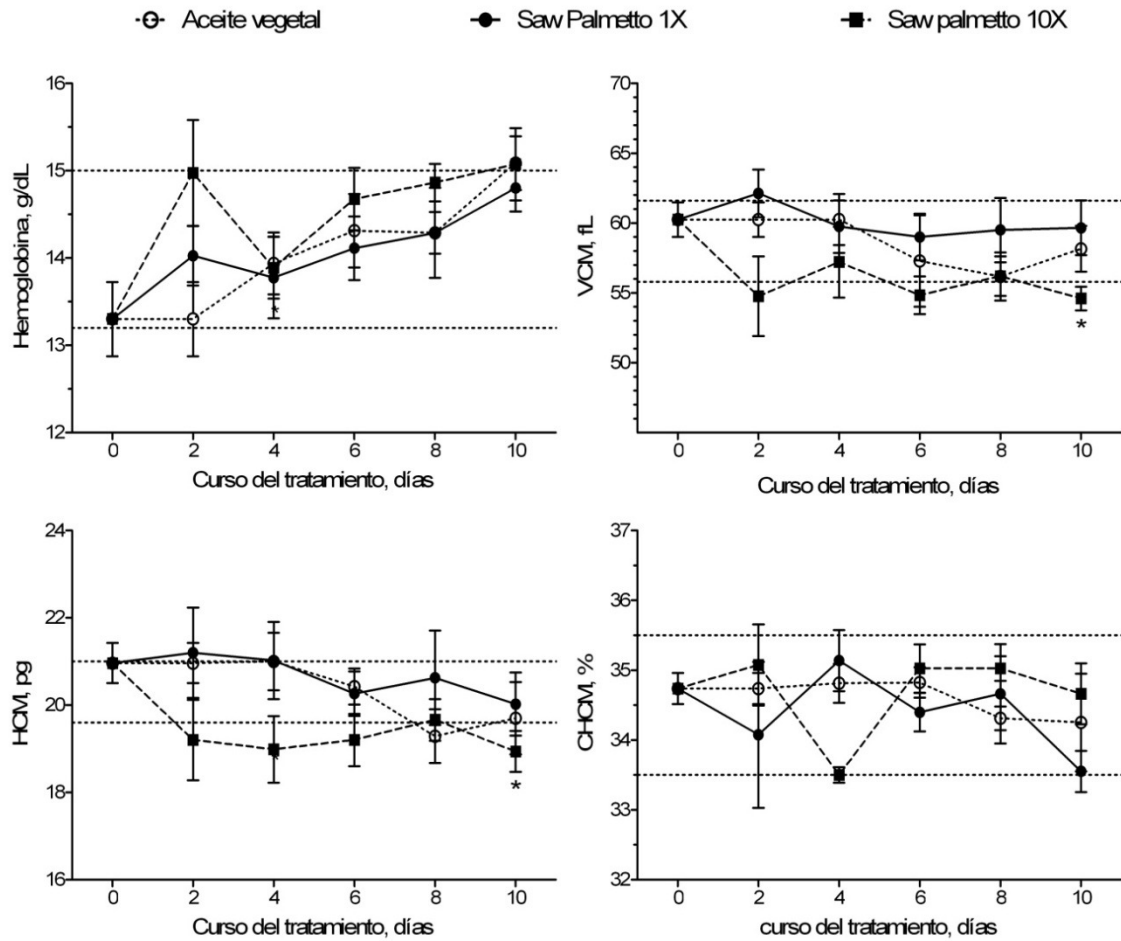
Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento de los animales con Saw Palmetto, mostró una tendencia al aumento en el recuento de eritrocitos y hematocrito; sin embargo esta tendencia no fue significativamente diferente al rango normal de estos parámetros ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, las concentraciones de hemoglobina y hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Figura 2), leucocitos (Figura 3) y número de plaquetas (Figura 4) no mostraron diferencias significativas respecto de los rangos normales ( $p > 0,05$ ). Además, no se observaron células baciliformes, basófilos, eosinófilos, metamielocitos o mielocitos (datos no mostrados).

El test de Wilcoxon mostró que algunos parámetros en particular presentaron medianas significativamente diferentes respecto a los rangos de referencia, tanto en el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), y linfocitos (Figuras 2 y 3 respectivamente). Sin embargo, el análisis de

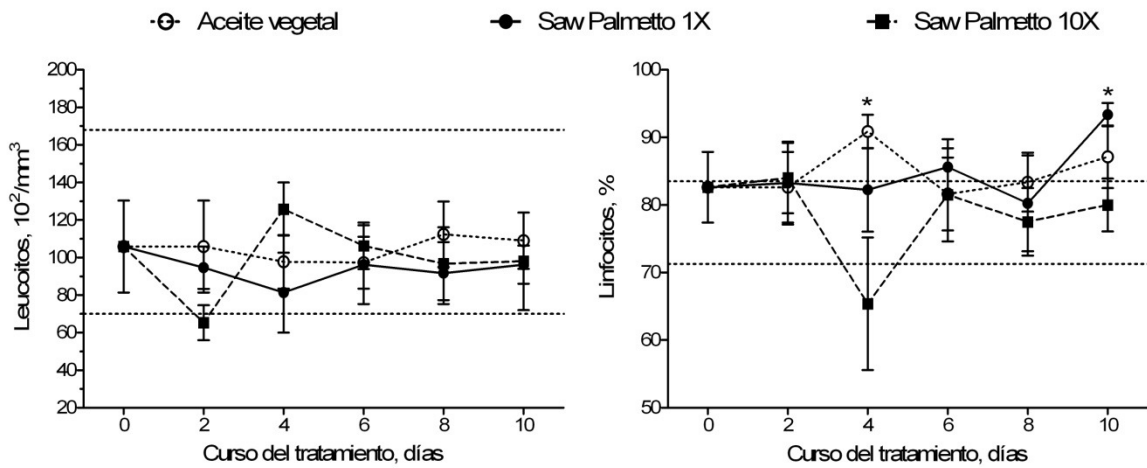
ANOVA de dos vías mostró que estas diferencias no reflejaban una desviación significativa comparada con los valores del grupo control ( $p>0,05$ ).



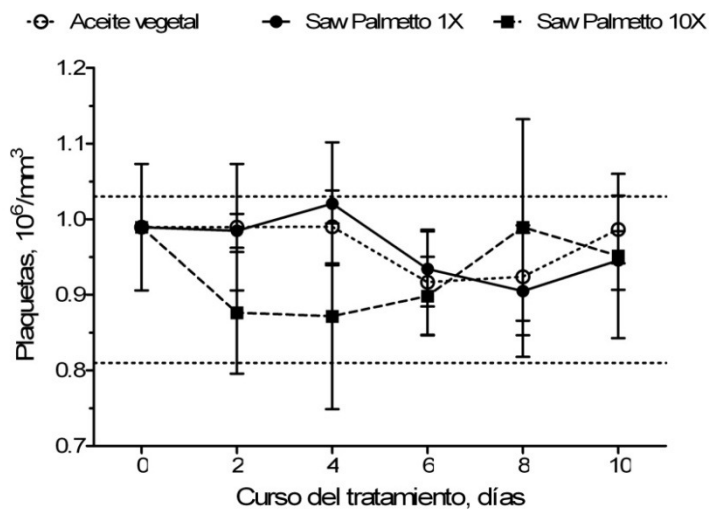
**Figura 1. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre el número de eritrocitos y hematocrito de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales.



**Figura 2. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre homoglobina y parámetros relacionados (VCM, HCM, CHCM) de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales. Los asteriscos indican parámetros con medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) respecto al correspondiente rango de referencia, según indica el test de Wilcoxon.



**Figura 3. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre leucocitos y linfocitos de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales. Los asteriscos indican parámetros con medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) respecto al correspondiente rango de referencia, según indica el test de Wilcoxon.

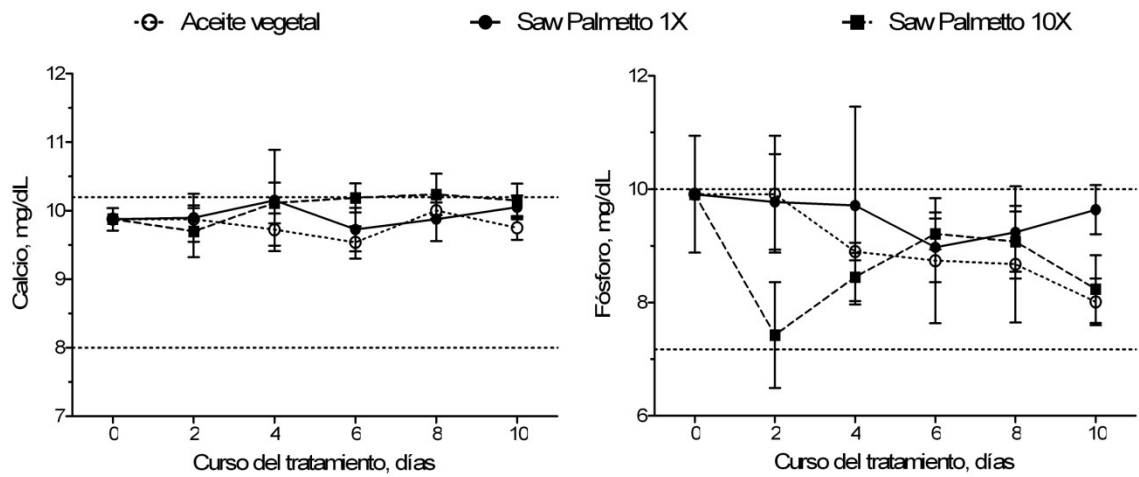


**Figura 4. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre plaquetas de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales.

## **2. Efecto del extracto de Saw Palmetto sobre los parámetros del perfil bioquímico de ratas Sprague-Dawley.**

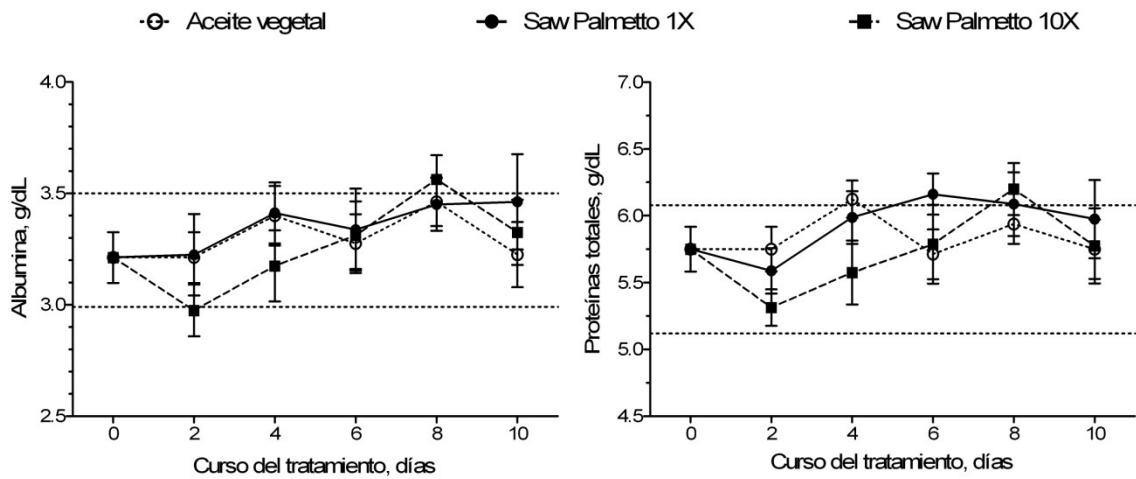
Como se muestra en las Figuras 5-8, el tratamiento de los animales con Saw Palmetto, no alteró significativamente los parámetros siguientes: calcio y fósforo (Figura 5); niveles sanguíneos de albúmina y proteínas totales (Figura 6); glucosa sanguínea, colesterol, bilirrubina y nitrógeno ureico sanguíneo (Figura 7); y la actividad de fosfatasa alcalina (FA) (Figura 8).

El test de Wilcoxon mostró que la actividad de la transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) presentaba medianas significativamente altas respecto al límite superior del rango normal para este parámetro (Figura 8). Sin embargo, el test de ANOVA de dos vías mostró que estas diferencias no reflejaban una desviación significativa comparada con los valores del grupo control ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, la actividad de lactato deshidrogenasa mostró medianas significativamente menores respecto al límite inferior del rango normal para este parámetro (Figura 8). Sin embargo, el test de ANOVA de dos vías mostró que la mayoría de estas desviaciones no fueron significativamente diferentes respecto al grupo control, excepto para los grupos tratados con Saw Palmetto 1X (días 8 y 10 de tratamiento,  $p < 0,001$ ) y Saw Palmetto 10X (días 6 y 8 de tratamiento,  $p < 0,001$ ).

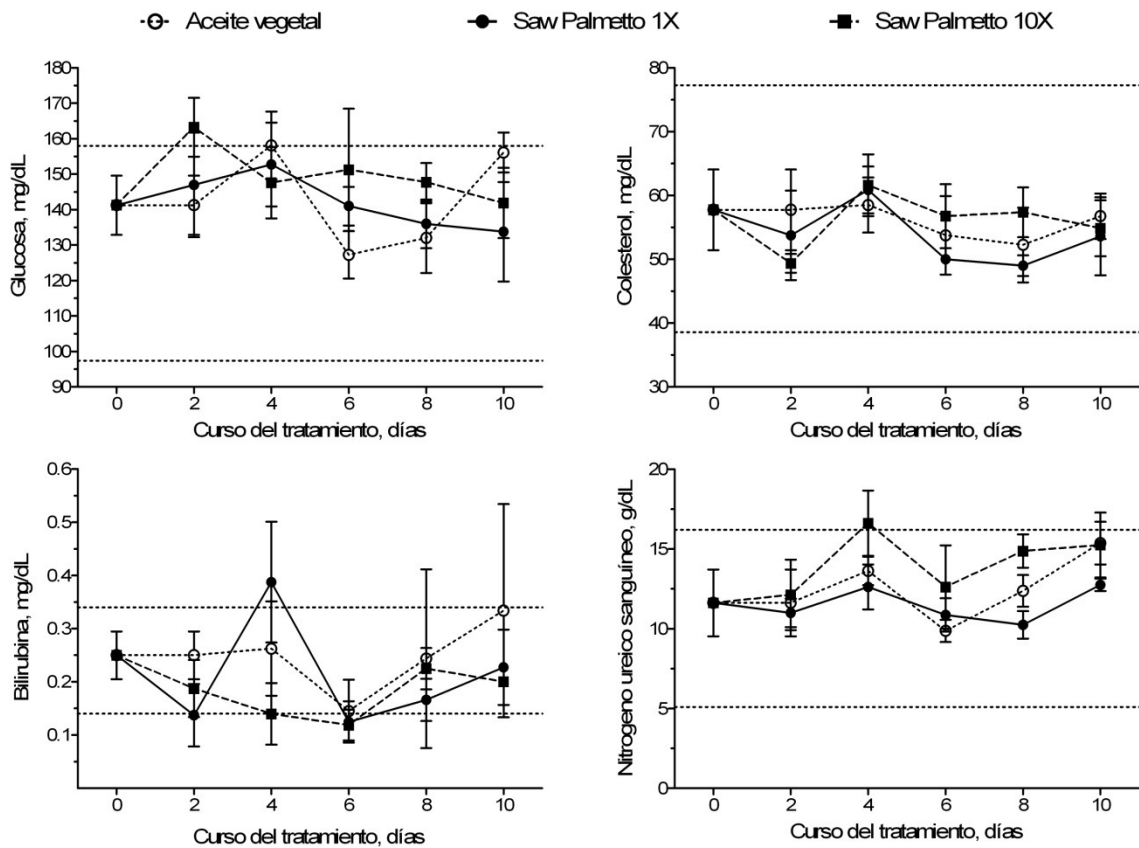


**Figura 5. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de calcio y fósforo de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales.

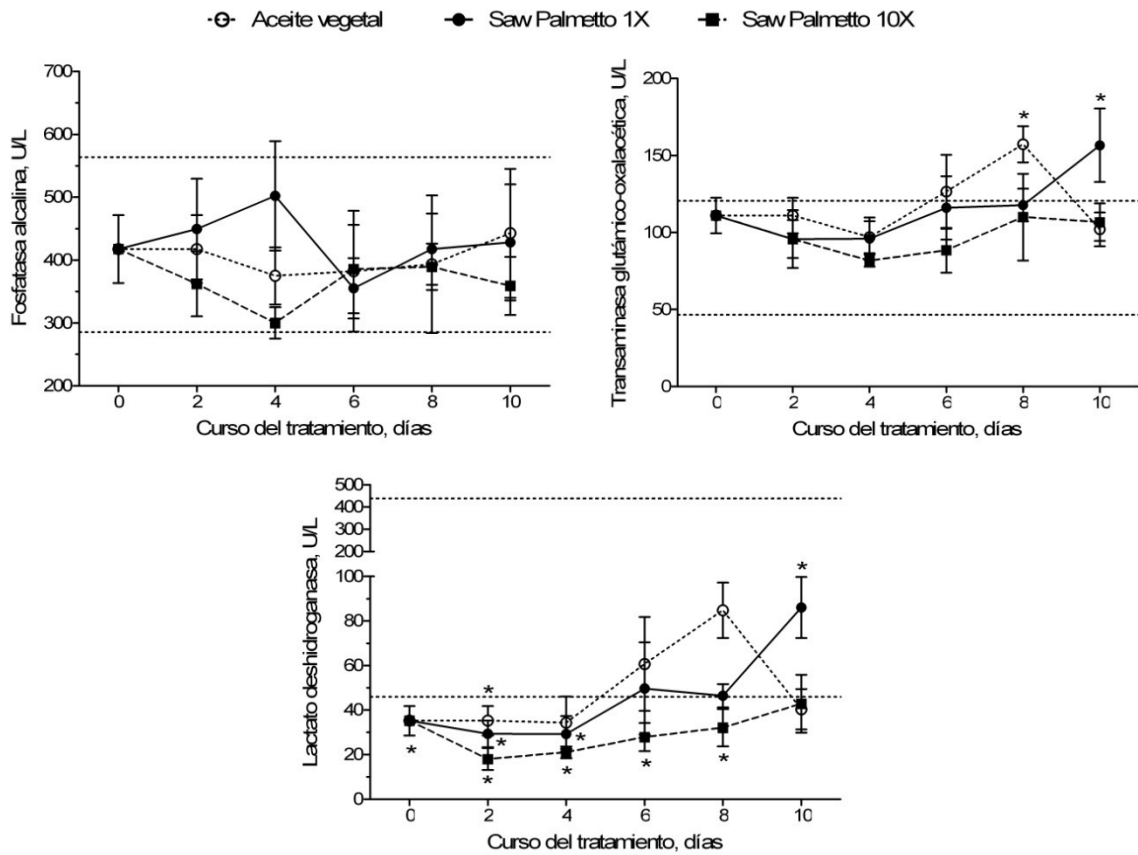




**Figura 6. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de albúmina y proteínas totales de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales.



**Figura 7. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de glucosa, colesterol, bilirrubina y nitrógeno ureico de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales.



**Figura 8. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre los niveles sanguíneos de Fosfatasa alcalina, Transaminasa glutámico-oxalacético y Lactato deshidrogenasa de ratas Sprague-Dawley.** Los animales fueron tratados con vehículo (aceite vegetal) o con dos dosis diferentes de Saw Palmetto (grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X), de acuerdo a lo descrito en métodos. Los valores representan el promedio de cada determinación y las barras de error, el 95% de IC. Las líneas punteadas horizontales representan los límites superior e inferior del rango de referencia para estos parámetros en estos animales. Los asteriscos indican parámetros con medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) respecto al correspondiente rango de referencia, según indica el test de Wilcoxon.

## **I. Efecto del extracto de Saw Palmetto sobre la morfología de diferentes tejidos de ratas.**

Todas las biopsias de hígado, independiente del grupo o tiempo de recolección de las muestras, mostraron una arquitectura histológica conservada (Figura 9A-C). Se observaron las estructuras clásicas del hígado tales como lóbulos hepáticos con una vena central (Figuras 9A y 9B), y una triada portal constituida por un vaso sanguíneo, un ducto biliar y una arteriola hepática (Figura 9C). Los hepatocitos mostraron una estructura conservada, sin mostrar signos de necrosis o degeneración. La mayoría de las biopsias de los hígados mostraron pequeños focos hematopoyéticos, tanto en el grupo Control como tratados e independiente del tiempo de recolección de las muestras. En la mayoría de las muestras, el recuento de mitosis en el parénquima hepático fue de 0 mitosis por  $\text{mm}^2$ , y sólo en pocas biopsias se encontró un recuento de 1-4 mitosis por  $\text{mm}^2$ , independiente del grupo o el tiempo de recolección de las muestras.

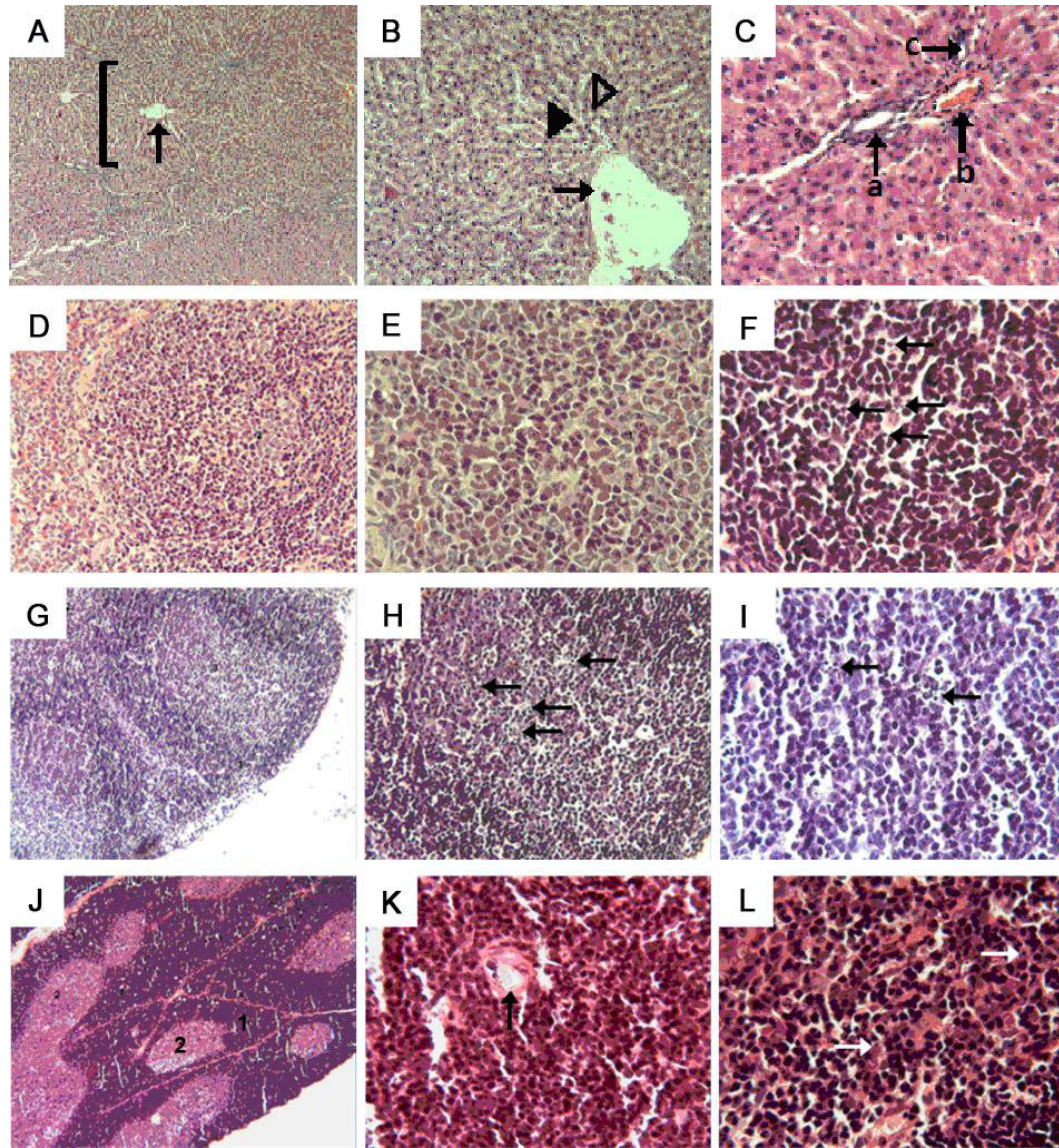
Las biopsias obtenidas del bazo, también mostraron una arquitectura conservada en todos los grupos de tratamiento, tanto a nivel de la pulpa roja como blanca (Figura 9D-F). Todas las muestras mostraron actividad hematopoyética, y el recuento de mitosis a nivel de los centros germinativos varió de 0-4 mitosis por  $\text{mm}^2$ , independiente de los grupos de tratamiento y el tiempo de recolección de las muestras (Figuras 9D y 9E). El grupo control no mostró cuerpos apoptóticos, mientras que los grupos Saw Palmetto 1X y Saw

Palmetto 10X en ciertos casos mostraron algunos cuerpos apoptóticos (Figura 9F).

Asimismo, las biopsias del ganglio linfático de los tres grupos, mostraron una arquitectura histológica conservada (Figura 9G-I). En el tejido linfoide se encontraron elementos linfocíticos y células retículo-histiocíticas. La mayoría de las biopsias presentaron folículos secundarios con centros germinativos, en forma independiente del grupo o del tiempo de recolección de las muestras. (Figura 9G). En los grupos tratados como en el grupo Control se observó además, un discreto edema sinusal. A nivel de los folículos linfoides, se observó actividad apoptótica evidenciada por la presencia de cuerpos apoptóticos en el citoplasma de las células retículo-histiocíticas (Figuras 9H y 9I). Sin embargo, la abundancia de cuerpos apoptóticos, no fue asociada ni a un grupo en particular, ni al tiempo de recolección de las muestras. Por otra parte, a nivel de los centros germinativos, se observó actividad mitótica con variaciones de 2-25 mitosis por  $\text{mm}^2$ ; estas variaciones no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos ensayados.

Por otra parte, la arquitectura histológica del timo se observó conservada en todas las biopsias estudiadas (Figura 9J-L), independiente del grupo de tratamiento o el tiempo de recolección de las muestras, mostrando una estructura normal tanto de la corteza como de la médula (Figura 9J). Tampoco se observaron diferencias morfológicas significativas a nivel linfoide como del componente epitelial (cuerpos de Hassall, Figura 9K). Independiente del tiempo

de recolección de las muestras, la cantidad de cuerpos apoptóticos tampoco reveló diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento (Figura 9L). Asimismo, el recuento de mitosis a nivel de los centros germinativos varió de 1-2 mitosis por  $\text{mm}^2$ , sin mostrar diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo Control.



**Figura 9. Efecto del tratamiento con Saw Palmetto sobre la morfología de biopsias de hígado, bazo, ganglio linfático y timo de ratas Sprague-Dawley.** Las imágenes incluyen muestras de animales controles y tratados durante los 10 días de tratamiento, obtenidas a través de la técnica de tinción hematoxilina-eosina, de acuerdo a lo descrito en métodos. **A.** Aumento 4X de una biopsia hepática, muestra un lóbulo hepático típico (paréntesis cuadrado) con una vena central (flecha). **B.** Aumento 10X de una biopsia hepática, muestra una mejor vista de la vena central

(flecha); trabéculas hepáticas (flecha sólida) y sinusoides (punta de flecha abierta). **C.** Aumento 20X muestra una triada portal, con su vena portal (a), el conducto biliar rodeado por epitelio cuboide (b), y la arteriola hepática (c). **D.** Aumento 20X de una biopsia de bazo, muestra las pulpas rojas y blancas, con un centro germinativo en este último. **E.** Aumento 40X muestra el centro germinativo de una pulpa roja esplénica. **F.** Centro germinativo de una pulpa roja esplénica, donde se muestran cuerpos apoptóticos (flechas). Todas las estructuras señaladas son representativas de todos los grupos e intervalos de tratamiento. **G.** Aumento 10X de la biopsia de un ganglio linfático, en donde se distinguen la corteza y parte de la médula. Se pueden apreciar dos folículos linfoides, con sus centros germinativos respectivos. **H.** Aumento 20X de un centro germinativo de un folículo de ganglio linfoide, donde se aprecian numerosos cuerpos apoptóticos (flechas). **I.** Aumento 40X de un centro germinativo de un folículo de ganglio linfoide, con una mejor vista de los cuerpos apoptóticos (flechas). **J.** Aumento 4X de la estructura de un lóbulo tímico, donde se aprecia claramente la corteza (1), y la médula (2). **K.** Aumento 40X de un cuerpo de Hassall (flecha negra), con una arquitectura normal. **L.** Aumento 40X de la zona medular de un lóbulo tímico, donde se muestran escasos cuerpos apoptóticos (flechas blancas).



#### **IV. DISCUSIÓN**

Nuestro estudio tuvo como propósito desarrollar una metodología que permita evaluar el perfil de seguridad de distintos extractos herbales, y en forma especial, de un extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto. Para ello, se evaluaron los parámetros incluidos en el hemograma y perfil bioquímico de ratas Sprague-Dawley, a las cuales se les administró por gavaje durante 10 días dos dosis diferentes de Saw Palmetto. Las ratas control recibieron sólo el vehículo (aceite vegetal). Además, se evaluaron las potenciales alteraciones morfológicas del hígado, un órgano clave involucrado en el metabolismo de xenobióticos (para identificar una posible toxicidad asociada con la biotransformación de xenobióticos), y el sistema inmune (para identificar una potencial respuesta inmunológica tóxica). Con esta finalidad, se recolectaron muestras de sangre y biopsias de tejidos a diferentes intervalos de tiempo durante 10 días de tratamiento.

Los parámetros incluidos en el hemograma y el perfil bioquímicos no revelaron cambios estadísticamente significativos luego de estos tratamientos, según lo evaluado por el test de Wilcoxon. Aunque estos análisis mostraron algunas desviaciones respecto a los rangos normales (Figuras 3 y 8), la mayoría de estas desviaciones no fueron significativamente diferentes en relación al grupo control, y pueden ser un reflejo de la gran variabilidad inter-individual de los animales de cada grupo para estos parámetros. Sin embargo, hay que hacer

notar que los valores de lactato deshidrogenasa (Figura 8) fueron menores que el límite inferior del rango normal para este parámetro en todos los grupos, especialmente al comienzo del tratamiento. Aunque este parámetro alcanzó el nivel normal en el grupo control, se mantuvo por debajo del límite inferior en los grupos Saw Palmetto 1X y Saw Palmetto 10X. Puesto que la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es un marcador clásico de daño a membrana celular, estos datos sugieren que Saw Palmetto podría generar actividad hepatoprotectora. Sin embargo, no podemos descartar que la disminución de esta enzima pueda deberse a una represión de su síntesis o a una inactivación directa de ella; se requieren experimentos adicionales para probar este postulado, ya que podrían indicar de manera contraria un evento tóxico. En resumen, los datos hematológicos y de perfil bioquímico muestran que el tratamiento de ratas Sprague-Dawley con un extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto, conduce a alteraciones indetectables en la integridad de eritrocitos, procesos hematopoyéticos, respuesta inmune o inflamatoria, metabolismo de glucosa, proteínas, ácidos grasos o esteroides, así como también no muestra alteración en la función del hígado, bazo, riñón, o glándulas paratiroides.

Los resultados de los parámetros de los hemogramas y perfiles bioquímicos fueron corroborados por la ausencia de cambios morfológicos en el hígado, bazo, timo y ganglios linfáticos (Figura 9). Por lo tanto, concluimos que el tratamiento agudo con extracto de CO<sub>2</sub> fluido supercrítico de Saw Palmetto, no

conduce a eventos toxicológicos bioquímicos y morfológicos en ratas, incluso a dosis que difieren en un orden de magnitud de la dosis recomendada.

Existen antecedentes de estudios de toxicidad aguda, que demuestran efectos tóxicos de algunos extractos de Saw Palmetto [22, 23]. Por otra parte, existen muchos antecedentes donde se ha probado la seguridad de estos extractos [4, 18-21]. Sin embargo, es muy difícil abordar el tema de la seguridad de los extractos de Saw Palmetto debido a la diversidad de métodos de extracción utilizados [26]. Los métodos de extracción que utilizan solventes orgánicos como el n-hexano, podrían ser más tóxicos que la extracción con CO<sub>2</sub> fluido supercrítico, postulado que debería ser estudiado comparativamente. El n-hexano es un hidrocarburo que se metaboliza a través del sistema oxidativo CYP 450; diversos estudios han mostrado que la toxicidad de este tipo de solventes se debe precisamente a la generación de intermediarios tóxicos a través de su metabolización [27]. Además, los extractos con n-hexano podrían contener no sólo β-sitosteroles sino además, otros compuestos lipofílicos que podrían contribuir a la toxicidad de este tipo de extractos. Estos antecedentes justifican el control a través de técnicas de gas-masa para identificar posibles contaminaciones con solventes orgánicos de estos preparados herbales.

Es necesario hacer notar, que debido a la naturaleza oleosa del extracto de Saw Palmetto, es posible que contenga lipoperoxidos, sustancias electrofílicas que pueden promover lipoperoxidación en tejidos biológicos. Sin embargo, el extracto de Saw Palmetto utilizado en este estudio no produjo un aumento en la

lipoperoxidación basal en microsomas hepáticos de rata (datos no mostrados), un sistema ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para determinar daño oxidativo [28]. La ausencia de esta actividad pro-oxidante, corrobora el buen perfil de seguridad del extracto de Saw Palmetto utilizado en este estudio, y por lo tanto, se puede concluir que el extracto ensayado muestra un perfil de seguridad de al menos un orden de magnitud.

Cabe señalar que durante el desarrollo de los experimentos *in vivo* se controló además, el peso diario de los animales y su comportamiento. Todos los animales, controles y tratados, aumentaron durante el período en estudio aproximadamente un 10% su peso, no encontrándose diferencias significativas en este parámetro,  $p > 0,05$  (datos no mostrados). Asimismo, los animales controles y tratados no mostraron cambios en su comportamiento.

La estrategia general que se utilizó en el presente estudio, permitió la evaluación de posibles alteraciones en la homeostasis general y las características morfológicas del hígado (entre otros órganos) de los animales, órgano clave en la biotransformación de xenobióticos. Por lo tanto, este protocolo de estudio podría ser adoptado para futuras evaluaciones de perfiles de seguridad de los extractos herbales.

## V. REFERENCIAS

1. Wilt T, Ishani A, Stark G, MacDonald R, Mulrow C, Lau J. 2000. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* CD001423.
2. Bent S, Kane C, Shinohara K, Neuhaus J, Hudes ES, Goldberg H, Avins AL. 2006. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. *New Eng J Med* 354: 557-566.
3. Gerber GS, Fitzpatrick JM. 2004. The role of a lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* in the management of lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 94: 338-344.
4. Hizli F, Uygur MC. 2007. A prospective study of the efficacy of *Serenoa repens*, tamsulosin, and *Serenoa repens* plus tamsulosin treatment for patients with benign prostate hyperplasia. *Int Urol Nephrol* 39: 879-886.
5. Wilt TJ, Ishani A, Stark G, MacDonald R, Lau J, Mulrow C. 1998. Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *JAMA* 280: 1604-1609.
6. Carraro JC, Raynaud JP, Koch G, Chisholm GD, Di Silverio F, Teillac P, Da Silva FC, Cauquil J, Chopin DK, Hamdy FC, Hanus M, Hauri D, Kalinteris A, Marenca J, Perier A, Perrin P. 1996. Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1,098 patients. *Prostate* 29: 231-240.

7. Derakhshani P, Geerke H, Böhnert KJ, Engelmann U. 1997. Beeinflussung des Internationalen Prostata-Symptomen-Score unter der Therapie mit Sägepalmenfrüchteextrakt bei täglicher Einmalgabe. *Der Urologe B* 37: 384-391.
8. Cristoni A, Morazzoni P, Bombardelli E. 1997. Chemical and pharmacological study on hypercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Serenoa repens* fruits. *Fitoterapia* 68: 355-358.
9. Vallancien G, Pariente P. 2001. Treatment of lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction in real life practice in France. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 4: 124-131
10. Lowe FC, Fagelman E. 2004. Permixon: A review. *Curr Prostate Rep* 2: 133-136
11. Tyler VE, ed. *The Honest Herbal*, Binghamton: Pharmaceutical Products Press. 3<sup>rd</sup> edition. 1993.
12. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg AD, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, Klein S, Rister RS. 1998. *The complete German Commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Austin, Texas, pp.74, 201, 432
13. Ulbricht C, Basch E, Bent S, Boon H, Corrado M, Foppa I, Hashmi S, Hammerness P, Kingsbury E, Smith M, Szapary P, Vora M, Weissner W. 2006. Evidence-based systematic review of saw palmetto by the Natural Standard Research Collaboration. *J Soc Integr Oncol* 4: 170-186

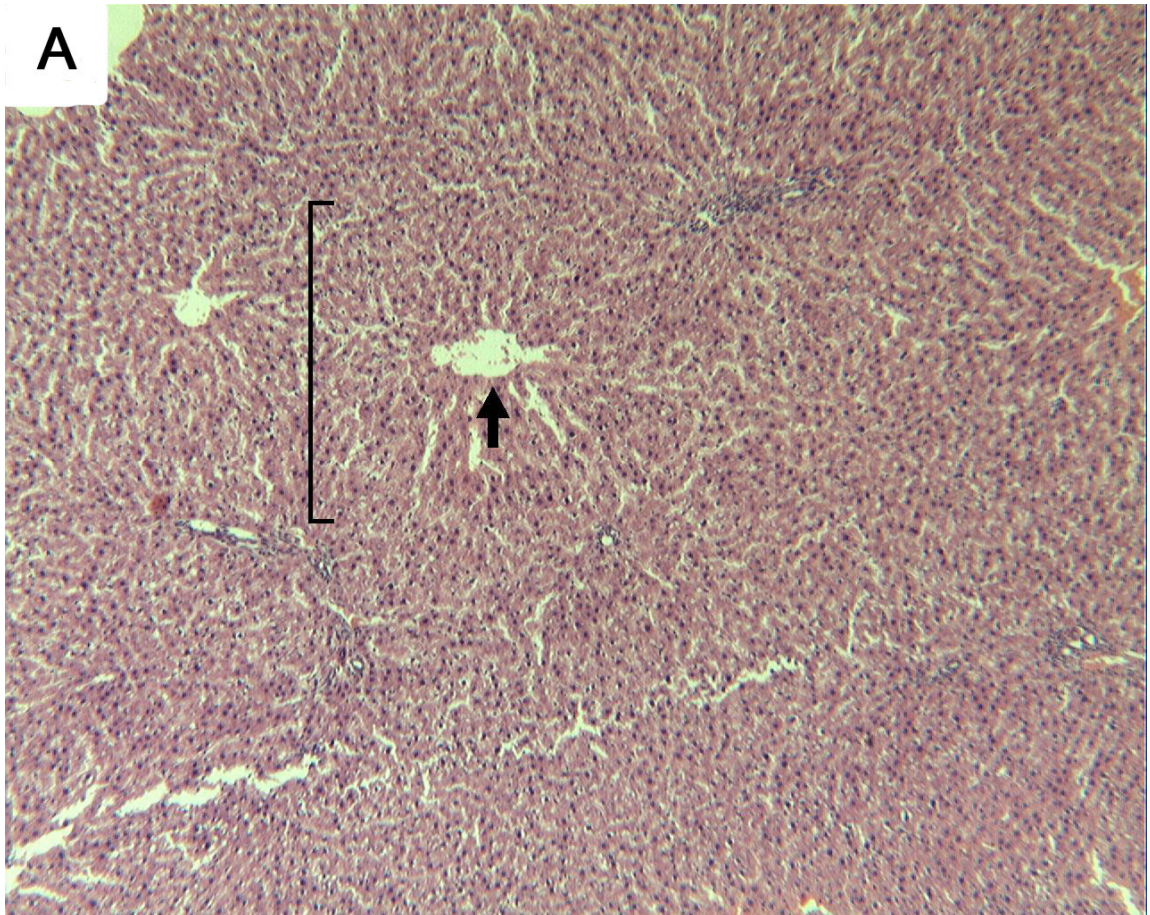
14. de la Taille A, Buttyan R, Hayek O, Bagiella E, Shabsigh A, Burchardt M, Burchardt T, Chopin DK, Katz AE. 2000. Herbal therapy PC-SPES: in vitro effects and evaluation of its efficacy in 69 patients with prostate cancer. *J Urol* 164: 1229-1234
15. de la Taille A, Hayek OR, Buttyan R, Bagiella E, Burchardt M, Katz AE. 1999. Effects of a phytotherapeutic agent, PC-SPES, on prostate cancer: a preliminary investigation on human cell lines and patients. *BJU Int* 84: 845-850
16. Small EJ, Frohlich MW, Bok R, Shinohara K, Grossfeld G, Rozenblat Z, Kelly WK, Corry M, Reese DM. 2000. Prospective trial of the herbal supplement PC-SPES in patients with progressive prostate cancer. *J Clin Oncol* 18: 3595-3603
17. Sovak M, Seligson AL, Konas M, Hajduch M, Dolezal M, Machala M, Nagourney R. 2002. Herbal composition PC-SPES for management of prostate cancer: identification of active principles. *J Natl Cancer Inst* 94: 1275-1281
18. Avins AL, Bent S, Staccone S, Badua E, Padula A, Goldberg H, Neuhaus J, Hudes E, Shinohara K, Kane C. 2008. A detailed safety assessment of a saw palmetto extract. *Complement Ther Med* 16: 147-154
19. Boyle P, Robertson C, Lowe F, Roehrborn C. 2004. Updated meta-analysis of clinical trials of *Serenoa repens* extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 93: 751-756

20. Ernst E. 2002. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Ann Intern Med* 136: 42-53
21. Willetts KE, Clements MS, Champion S, Ehsman S, Eden JA. 2003. *Serenoa repens* extract for benign prostate hyperplasia: a randomized controlled trial. *BJU Int* 92: 267-270
22. Hamid S, Rojter S, Vierling J. 1997. Protracted cholestatic hepatitis after the use of prostata. *Ann Intern Med* 127: 169-170
23. Singh YN, Devkota AK, Sneed DC, Singh KK, Halaweish F. 2007. Hepatotoxicity potential of saw palmetto (*Serenoa repens*) in rats. *Phytomedicine* 14: 204-208
24. Uribe M, Mariné L, Catán F, Capetillo M, Cavallieri S, Bianchi V, Pizarro F, Romero S, Carvajal C, Contreras R, Valdés P. 1995. Valores hematológicos, serológicos y peso de órganos en la rata Sprague-Dawley adulta [Hematological, serological values, and organs weight in adult Sprague-Dawley rats]. *Rev Med Chil* 123: 1235-1242.
25. Lillie LE, Temple NJ, Florence LZ. 1996. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum Exp Toxicol* 15: 612-616.
26. Habib FK, Wyllie MG. 2004. Not all brands are created equal: a comparison of selected components of different brands of *Serenoa repens* extract. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7: 195-200.

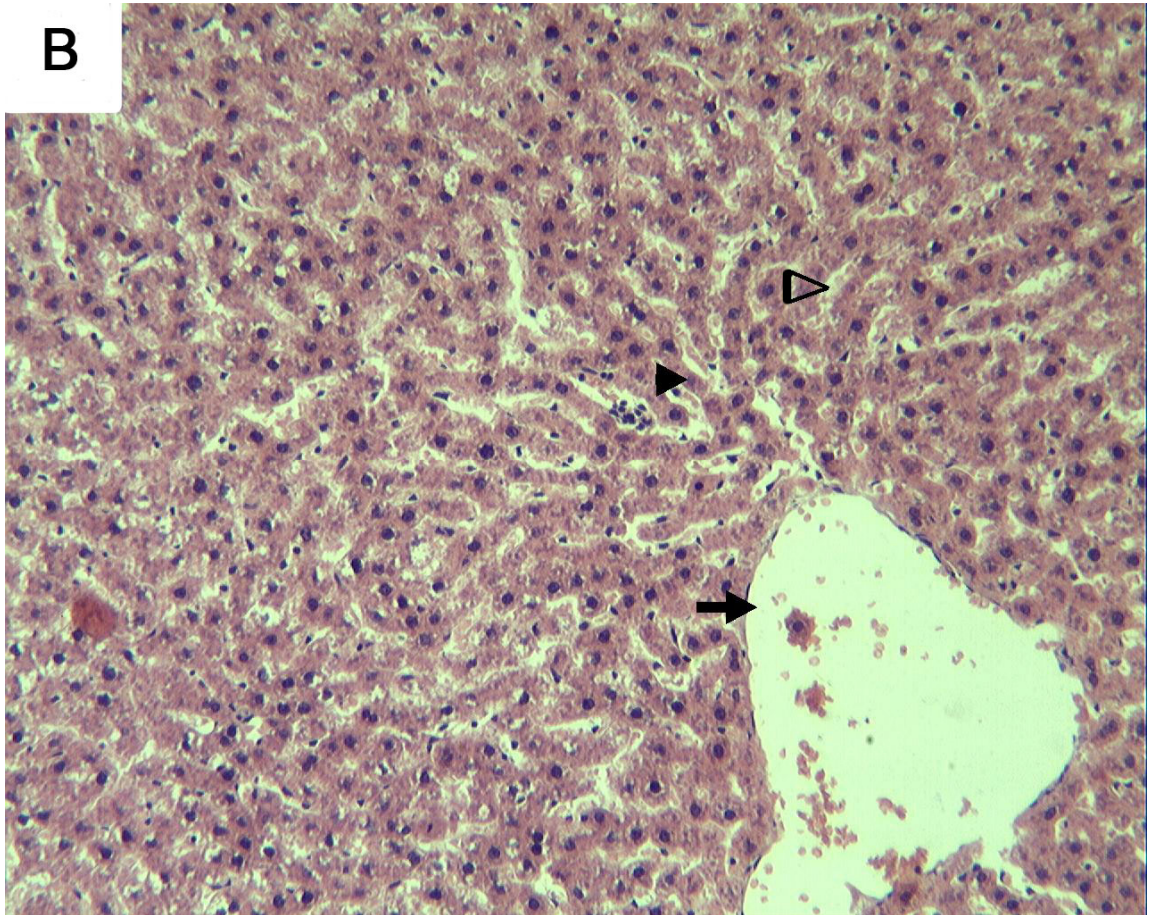


27. Klaassen CD. Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 7<sup>th</sup> edition. 2008. 640-642.
28. Letelier ME, Entrala P, López-Alarcón C, González-Lira V, Molina-Berríos A, Cortés-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Santander P, Núñez-Vergara L. 2007. Nitroaryl-1,4-dihydropyridines as antioxidants against rat liver microsomes oxidation induced by iron/ascorbate, nitrofurantoin and naphthalene. *Toxicol in Vitro* 21: 1610-1618.

## ANEXOS

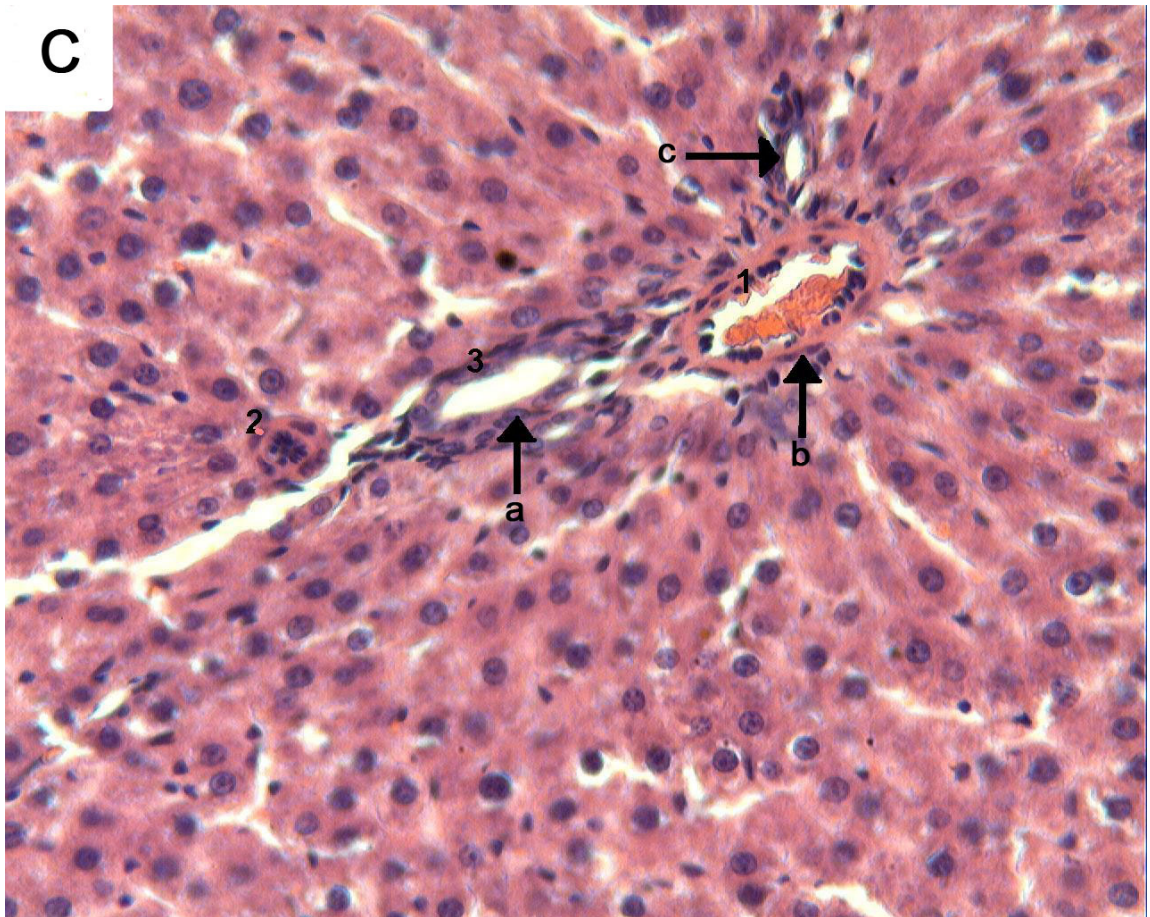


**Figura 9. A.** Aumento 4X de una biopsia hepatica, muestra un lóbulo hepático típico (paréntesis cuadrado) con una vena central (flecha).

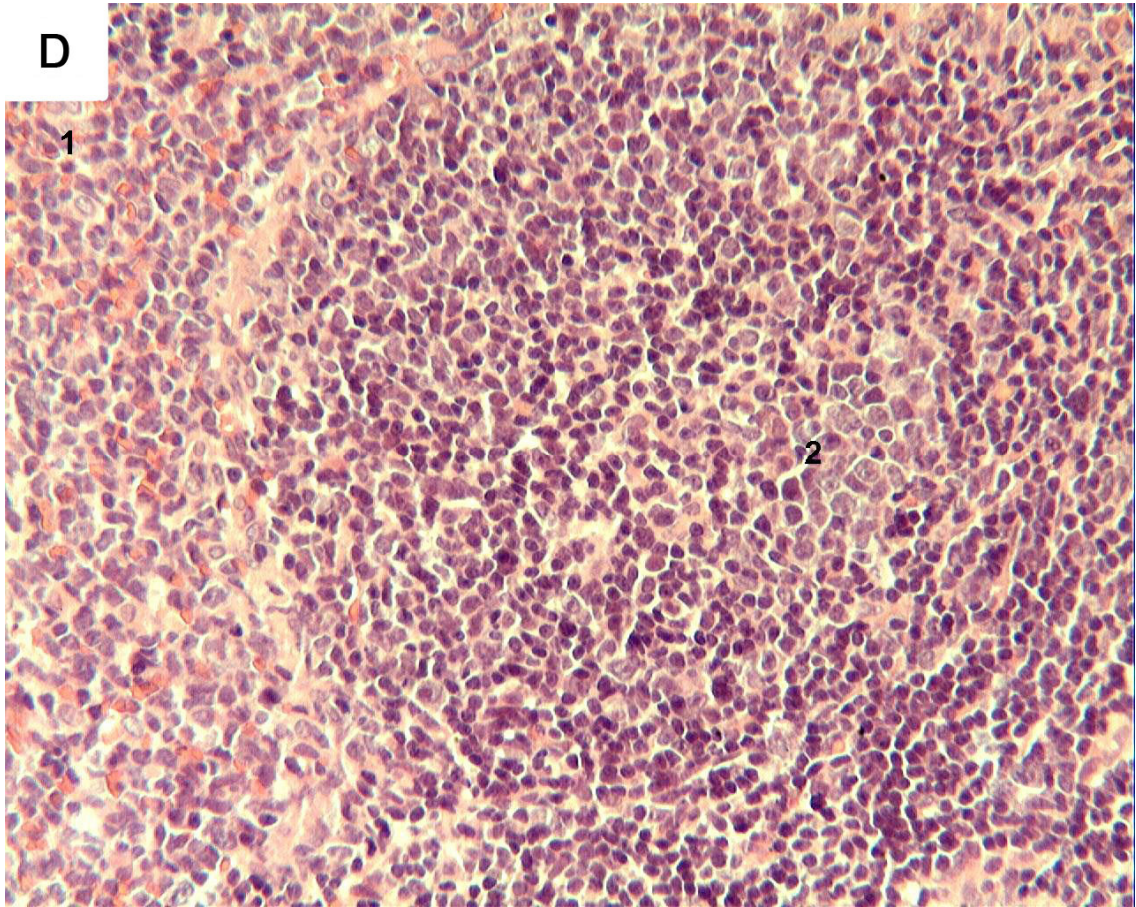


**Figura 9. B.** Aumento 10X de una biopsia hepática, muestra una mejor vista de la vena central (flecha); trabéculas hepáticas (flecha sólida) y sinusoids (punta de flecha abierta).



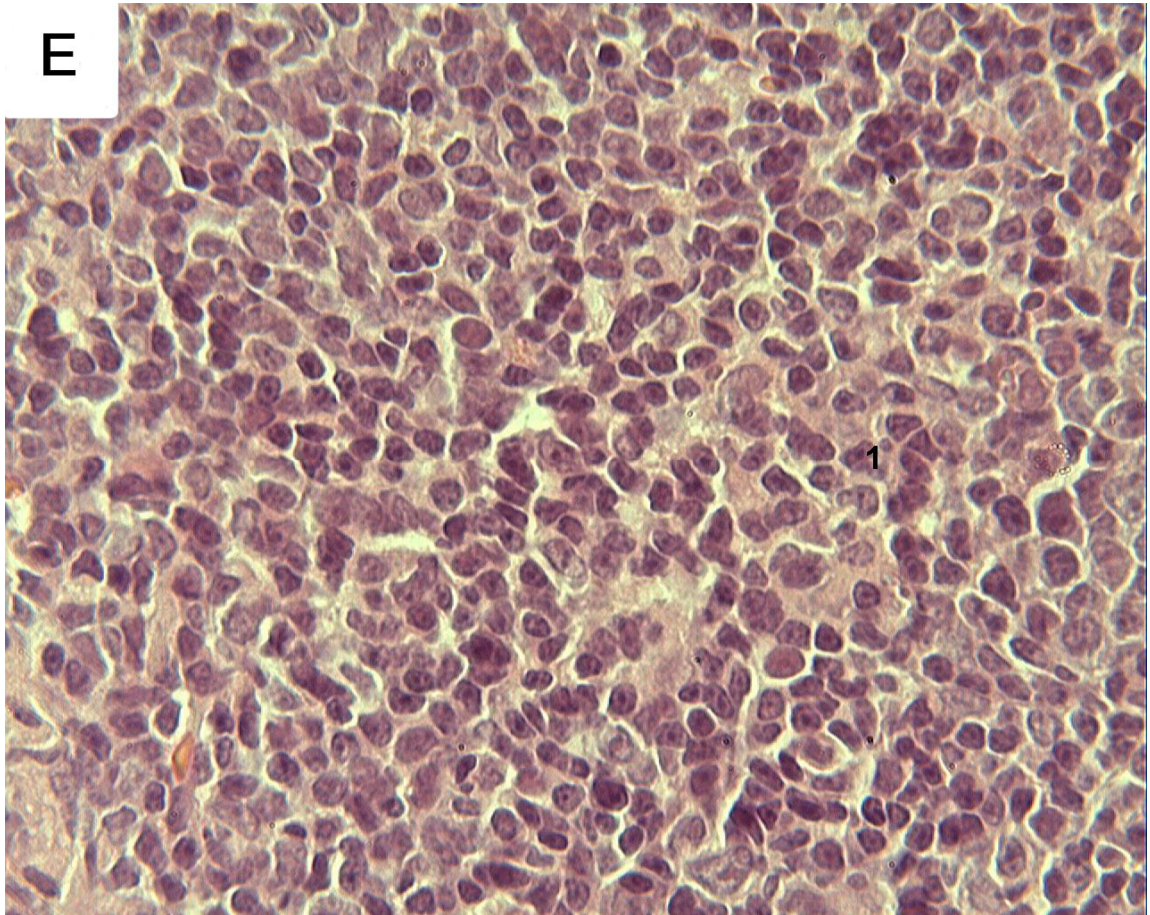


**Figura 9. C.** Aumento 20X de una biopsia hepática, muestra una triada portal, con su vena portal (a), el conducto biliar rodeado por epitelio cuboide (b), y la arteriola hepática (c).

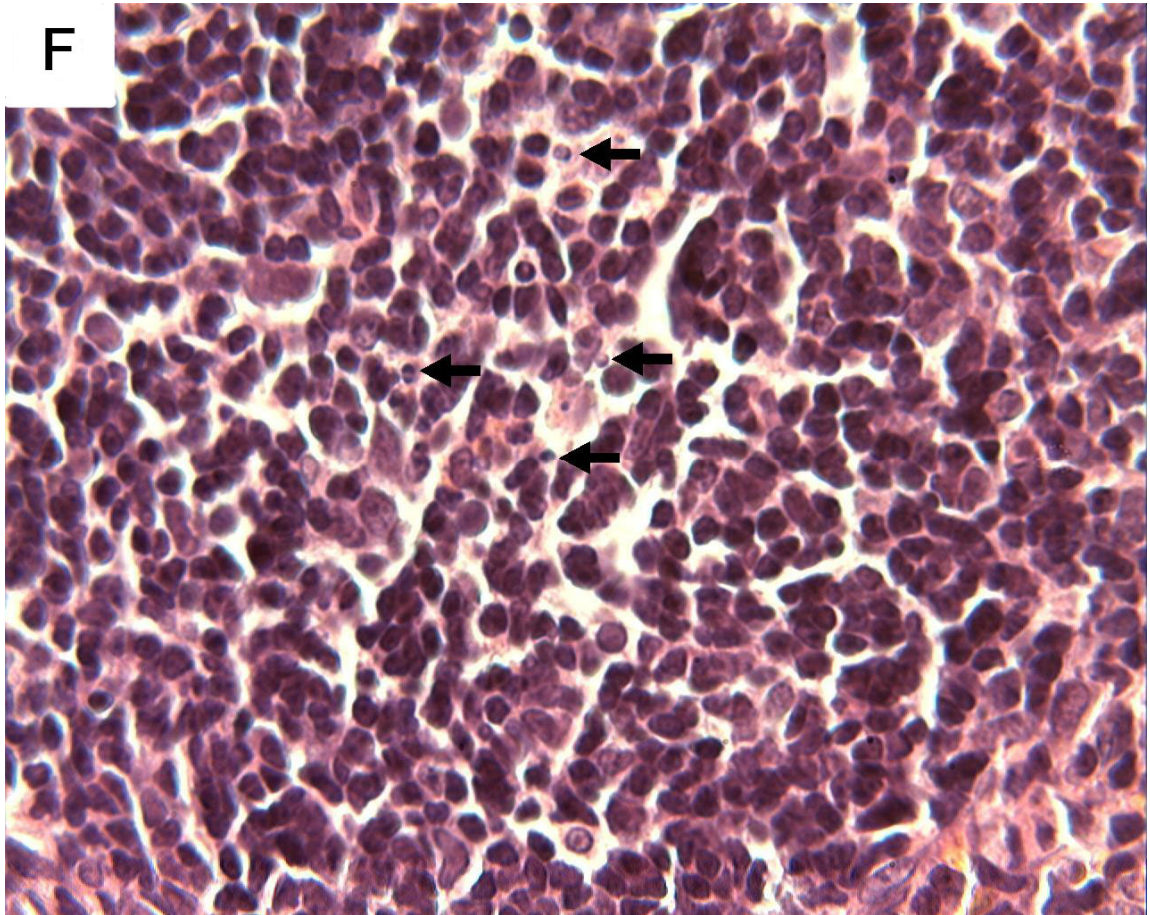


**Figura 9. D.** Aumento 20X de una biopsia de bazo, muestra las pulpas rojas (1) y blancas (2), con un centro germinativo en este último.



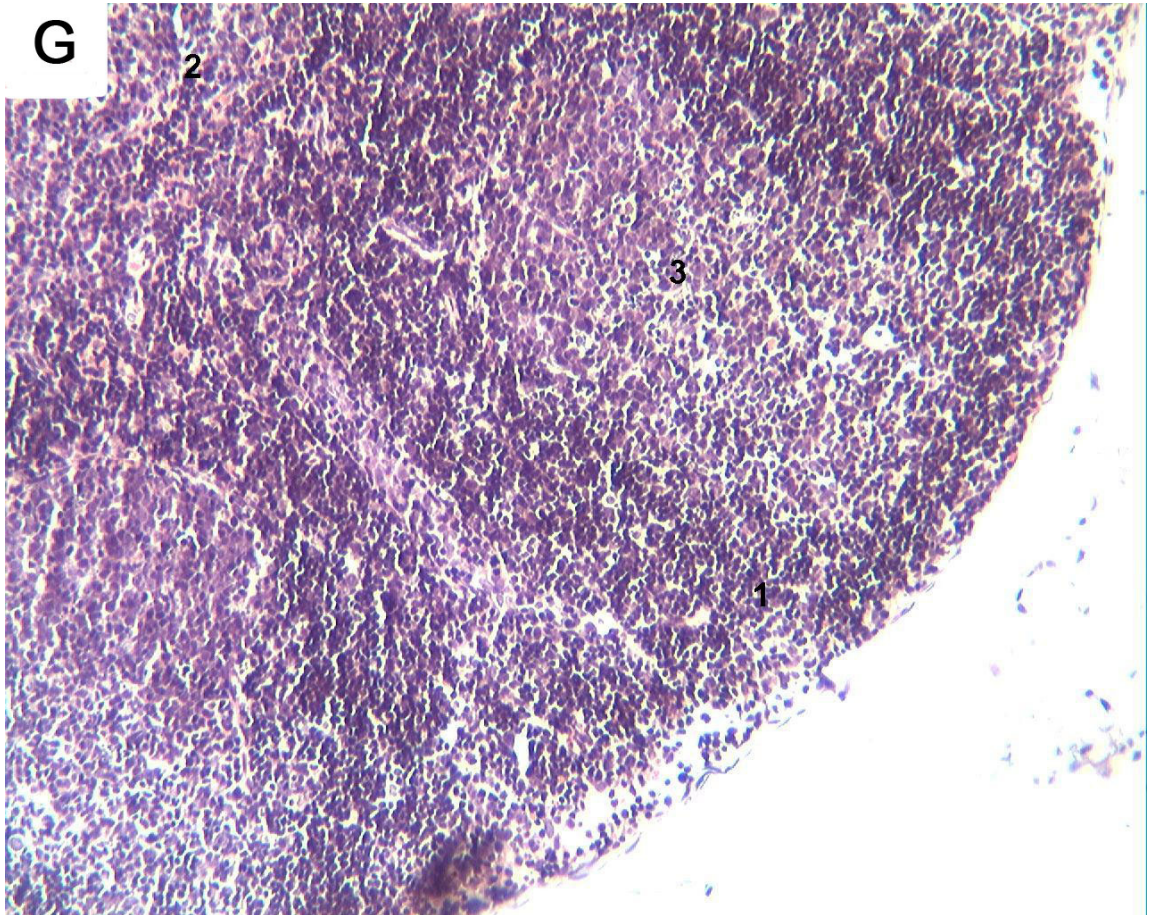


**Figura 9. E.** Aumento 40X de una biopsia de bazo, muestra el centro germinativo de una pulpa roja esplénica.



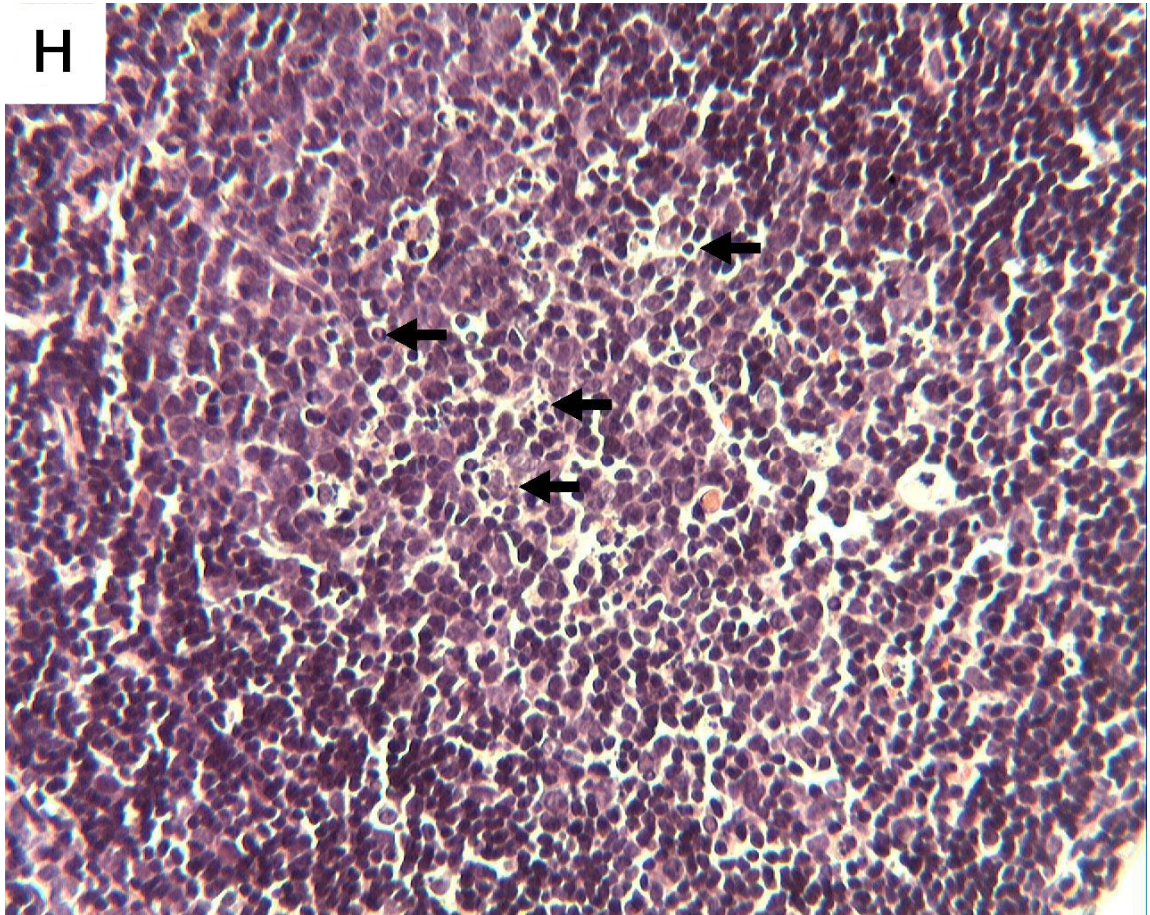
**Figura 9. F.** Centro germinativo de una pulpa roja esplénica, donde se muestran cuerpos apoptóticos (flechas).



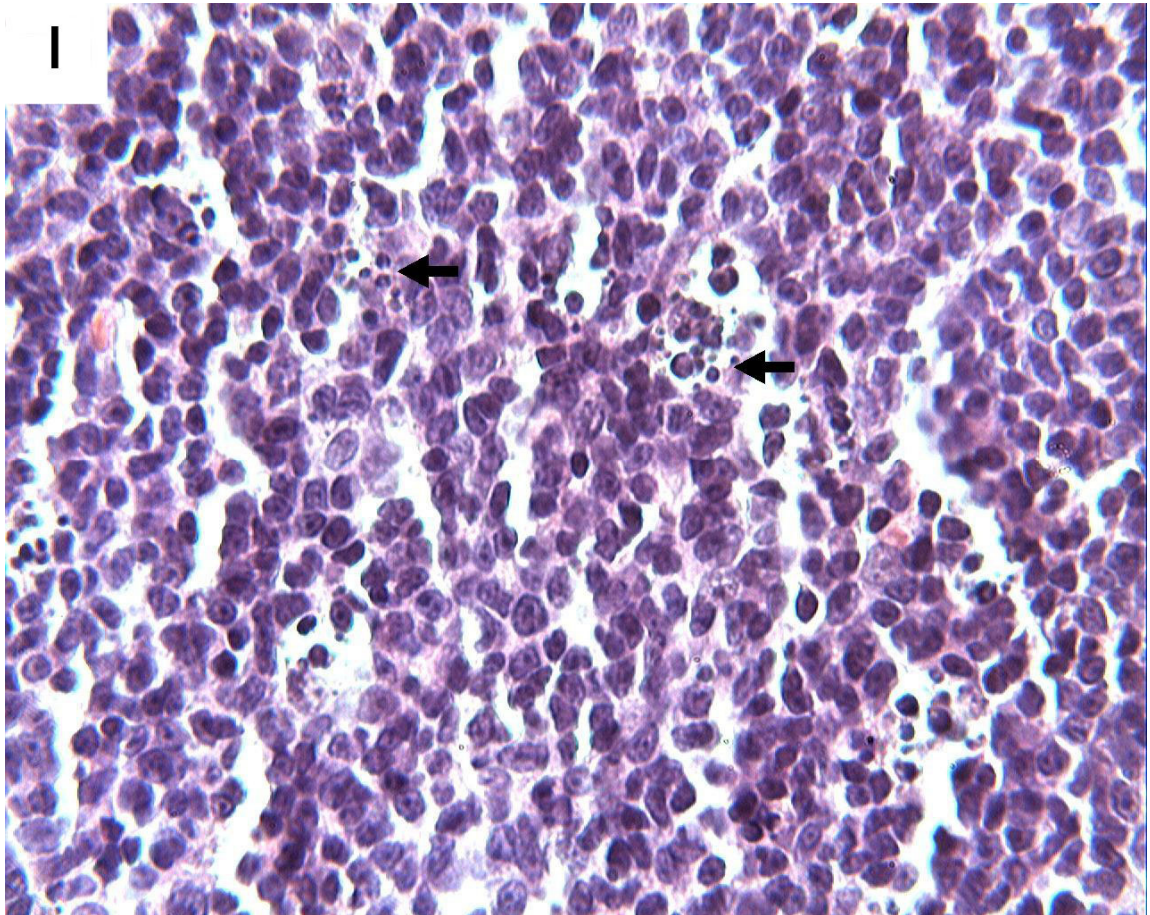


**Figura 9. G.** Aumento 10X de la biopsia de un ganglio linfático, en donde se distinguen la corteza y parte de la médula (2). Se pueden apreciar dos folículos linfoides (1), con sus centros germinativos respectivos (3).



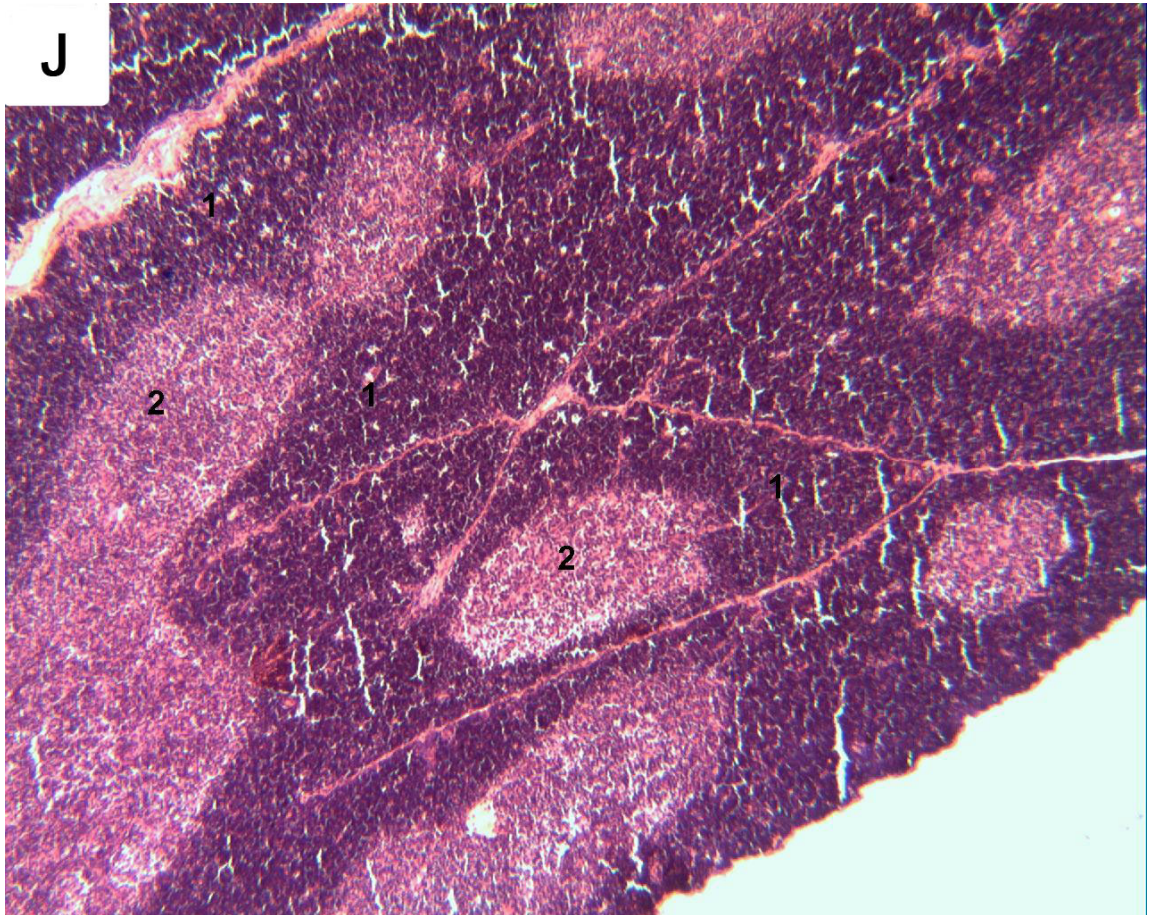


**Figura 9. H.** Aumento 20X de un centro germinativo de un folículo de ganglio linfoide, donde se aprecian numerosos cuerpos apoptóticos (flechas).

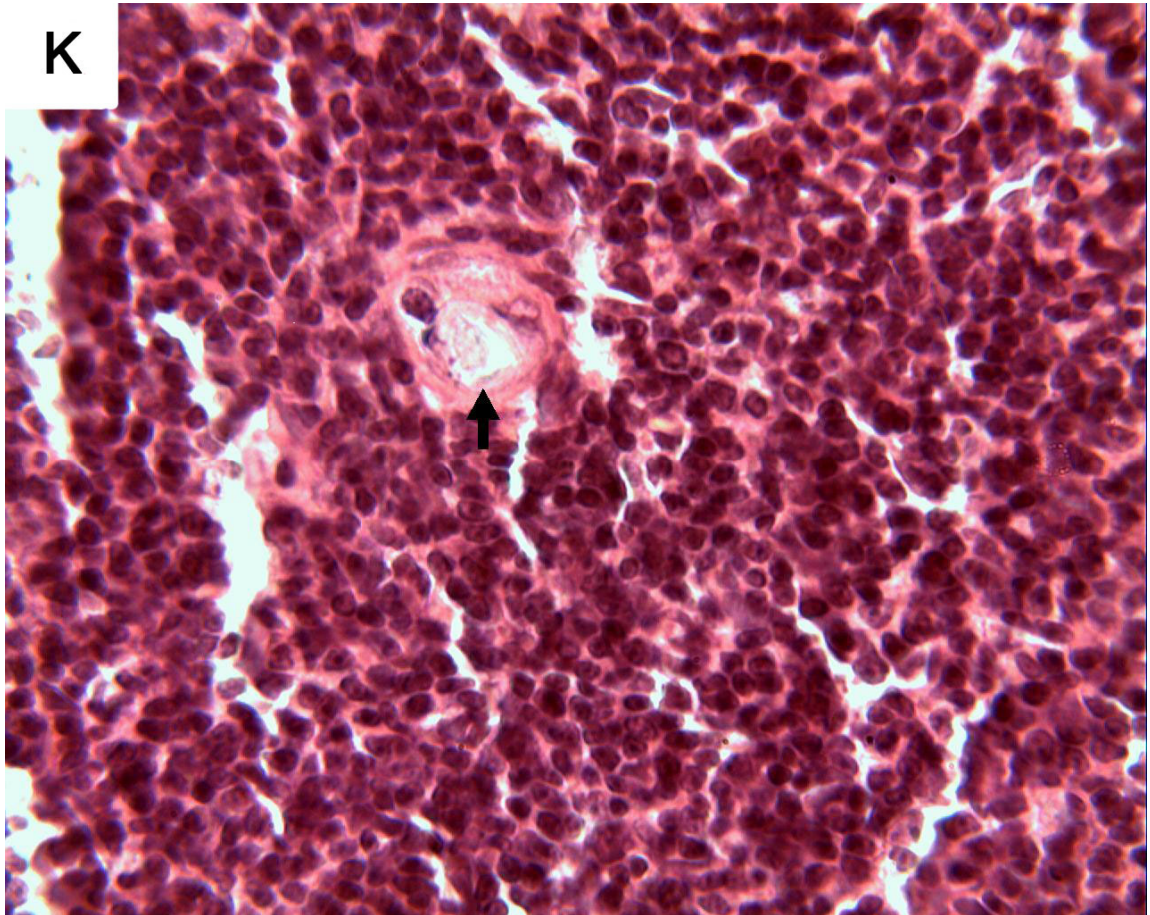


**Figura 9. I.** Aumento 40X de un centro germinativo de un folículo de ganglio linfoide, con una mejor vista de los cuerpos apoptóticos (flechas).



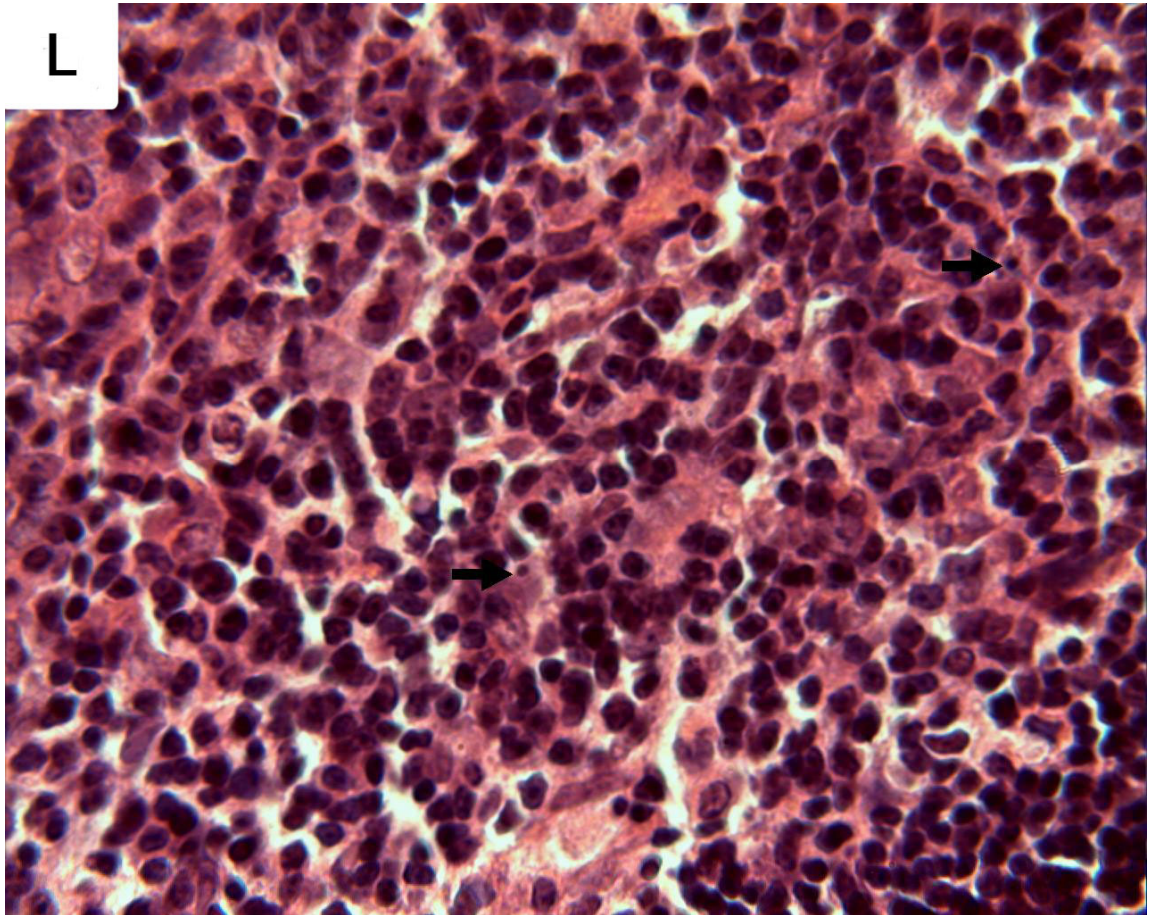


**Figura 9. J.** Aumento 4X de la estructura de un lóbulo tímico, donde se aprecia claramente la corteza (1), y la medulla (2).



**Figura 9. K.** Aumento 40X de una biopsia de timo, donde se aprecia un cuerpo de Hassall (flecha), con una arquitectura normal.





**Figura 9. L.** Aumento 40X de la zona medular de un lóbulo tímico, donde se muestran escasos cuerpos apoptóticos (flechas).