

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 992**

51 Int. Cl.:
A61K 31/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01972783 .3**
96 Fecha de presentación: **28.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1322315**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **FORMULACIONES PARA REDUCIR O ELIMINAR LA TOXIDIDAD DE HORMONAS
AMBIENTALES QUE CONTIENEN ÁCIDO URSODESOXICÓLICO.**

30 Prioridad:
04.10.2000 KR 2000058127

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
**DAEWONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
223-23, SANGDAEWON DONG, JOONGWON-KU
SUNGNAM, KYUNGGI-DO 461-120, KR**

72 Inventor/es:
**YEON, Jae-Duck;
BAIK, Kyong-Up;
JUNG, Kyu-Hyuck y
PARK, Seung-Kook**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 368 992 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones para reducir o eliminar la toxicidad de hormonas ambientales que contienen ácido ursodesoxicólico

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con las formulaciones para reducir o eliminar la toxicidad de hormonas ambientales que contienen como un agente detoxificante el ácido ursodeoxicólico (3 α , 7 β -dihidroxi-5 β -ácido colanoico; de ahora en adelante, denominado como udca), o sales farmacéuticamente aceptables o ésteres de este.

Antecedentes del oficio

10 UDCA (el peso molecular: 392.58; la fórmula molecular: C₂₄H₄₀O₄) tiene diversos efectos farmacológicos *in vivo*. Por ejemplo, limpia los canalículos biliares eliminando así el producto de desecho y el ácido biliar tóxico de este, estabiliza la membrana celular hepática y protege las células hepáticas. También incrementa el volumen de flujo sanguíneo en el hígado, inhibe la absorción y biosíntesis del colesterol, disuelve los cálculos biliares y suprime la formación de este, y normaliza las respuestas inmunes. Por lo tanto, se utiliza actualmente para el tratamiento clínico de colelitiasis, enfermedades del tracto biliar, enfermedades hepáticas crónicas, la insuficiencia hepática, dispepsia post-enterectomía, hígado graso y similares. UDCA es un ingrediente de la bilis de los animales, pero 15 presente en bilis humana en cantidades extremadamente pequeñas. En cambio, CDCA (ácido quenodesoxicólico), un estereoisómero de UDCA, está presente en bilis humana, usualmente en la forma de conjugado con la glicina o la taurina.

20 Las hormonas ambientales son sustancias químicas, que alteran las funciones normales del sistema endocrino. Se liberan al ambiente y se absorben en el cuerpo para tener funciones similares a la hormona *in vivo*. Por lo tanto, se les suele denominar como disruptores endocrinos. Como las hormonas ambientales, 67 sustancias químicas están registradas actualmente en la lista WWF (World Wildlife Fund), y 142 sustancias tales como sustancias químicas industriales, medicinas y aditivos alimentarios, etc. se registran en Ministry of Health and Welfare in Japan. Los disruptores endocrinos registrados en la lista WWF pueden ser clasificados en 6 compuestos de cloro orgánicos incluyendo dioxina, 44 pesticidas incluyendo DDT, 8 ftalatos incluyendo butilbencil ftalato, 3 metales pesados 25 incluyendo cadmio, bisfenol A y benzopireno.

Tales hormonas ambientales tienen diversos efectos en los organismos, por ejemplo masculinización así como feminización, trastornos de conducta, y promoción tumoral, etc. Recientemente, se ha revelado por muchos investigadores que tienen efectos significantes sobre el ecosistema salvaje y que tienen efectos similares en los humanos. La mayoría de tales disruptores endocrinos muestran toxicidad *in vivo* incluso en cantidades 30 extremadamente pequeñas debido a su actividad similar al estrógeno y de tal manera, se denominan como estrógeno exógeno dentro del ambiente.

En muchos países incluyendo Corea, una amplia variedad de hormonas ambientales se detectan de los plásticos, materiales de recubrimiento interior de latas de aluminio, envases de fideos instantáneos, productos de degradación de detergentes, gases de escape a partir de un incinerador, pesticidas, etc. Extremadamente pequeñas como la 35 cantidad desalojada, migran entre el medio y se concentran biológicamente a través de la cadena alimentaria, debido a su alta lipofilicidad y persistencia dentro del ambiente. Por lo tanto, tienen efectos sumamente adversos sobre el ecosistema.

Entre los disruptores endocrinos, el DDT y el bisfenol A son representativos, los cuales tienen actividad similar al estrógeno *in vivo*. El bisfenol A se utiliza como un solubilizador de polivinil cloruro, un ingrediente principal en la 40 fabricación de plásticos, y contenido en una gran cantidad de artículos plásticos ampliamente utilizados en el hogar. Por lo tanto, los humanos están en un peligro particularmente alto de estar expuestos a este. Se sabe que el DDT y el bisfenol A, los cuales ejercen efectos sobre los órganos reproductivos femeninos, por ejemplo, causan hipertrofia uterina, dicha hipertrofia uterina conduce al aumento en el peso del útero en experimentos de animales. Su mecanismo biológico molecular conocido es que se une al receptor del estrógeno mostrando, así actividad similar al 45 estrógeno. Por consiguiente, el DDT y el bisfenol A muestran el mismo efecto sobre el peso y forma del útero como el estrógeno en animales ovario-ligados. Especialmente, los compuestos de hidrocarburos aromáticos halogenados tales como compuestos de benceno policlorinados y la dioxina, las sustancias más notables entre las hormonas

Los hidrocarburos aromáticos halogenados incluyendo dibenzodioxinas policlorinadas y dibenzofurano policlorinado son los contaminantes ambientales más representativos evacuados por la quema de combustibles fósiles o la 50 incineración de desechos médicos, o en el blanqueo del papel. TCDD, el nombre químico del cual es 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, es el compuesto más tóxico entre los hidrocarburos aromáticos policlorinados que muestran toxicidad por el mecanismo de reacción común. Los humanos generalmente se exponen a tales compuestos, que han sido incorporados en alimentos, agua potable, suelo, polvo, humo o aire. En particular, los trabajadores encargados de la producción, uso o destrucción de tales sustancias encuentran una mayor posibilidad

de estar continua o intermitentemente expuestos a una concentración relativamente alta de hidrocarburos aromáticos polihalogenados y de tal manera, su salud es muy amenazada por estos. Estos compuestos se concentran biológicamente en los peces y luego, los pescadores de oficio o por afición se exponen oralmente a estos. Los agricultores alrededor de las instalaciones de incineración también se pueden exponer oralmente a estos. Además, se liberan a una alta concentración a través de accidentes industriales y la disposición inadecuada de desechos industriales. La dioxina volátil contenida en las cenizas que salen después de combustión en el incinerador se somete a la absorción en el pulmón. La dioxina está presente en el suelo, el aire y el sedimento a una concentración muy baja, pero se puede concentrar biológicamente a través de la cadena alimentaria debido a su estabilidad duradera y su lipofilicidad. Los humanos usualmente se exponen a la dioxina a través de productos alimenticios. La concentración de dioxina expuesta a los humanos a través de los productos alimenticios se supone que es aproximadamente 0.1-0.3 pg/kg/día.

La lipofilicidad de la dioxina y las sustancias relacionadas conduce al incremento de sus concentraciones en la leche materna y de la liberación de tejidos adiposos en el pecho por un periodo de lactancia. Por lo tanto, los recién nacidos alimentados con leche materna se exponen diariamente a aproximadamente concentraciones 10-20 veces más altas de dioxina. Los estudios precedentes de agentes de bloqueo y desintoxicantes de dioxina revelaron que causa inmunosupresión, trastornos endocrinos, carcinogénesis y enfermedades cardíacas isquémicas mediante la unión al receptor de hidrocarburo aromático.

Casper R F., et al. (Mol. Phar. Macol. 1999 Oct.: 56(4): 784-790) reportaron que el Resveratrol extraído del vino rojo tiene los efectos preventivos de la toxicidad de dioxina, mediante el enlace al receptor de hidrocarburo aromático al cual los compuestos de dioxina se unen. Como se revela por los estudios precedentes, Resveratrol tiene efectos farmacológicos apropiados y además, es una sustancia no-tóxica. En el futuro, de este modo, será desarrollado como un agente para prevenir la toxicidad de dioxina después de muchas pruebas clínicas. Sin embargo, aunque este compuesto tiene actividades inhibitoras competitivas sobre la dioxina que ha sido previamente absorbida en el cuerpo, no se puede suprimir la absorción continua de la dioxina *per se*, ni puede mejorar la excreción de esta. Por lo tanto, la dioxina previamente absorbida se acumula en los tejidos, particularmente, en el hígado o los tejidos adiposos. Por lo tanto, es incapaz de suprimir completamente la toxicidad de la dioxina.

Adicionalmente, olestra (Lancet, 1999, Oct. 9; 354(9186): 1266-1267) conocido como una sustancia que tiene potenciales actividades de absorción y de excreción sobre la dioxina es un éster del ácido poligraso en donde muchos ácidos grasos se unen a la sacarosa y que no pueden ser degradados por las enzimas pancreáticas. Este compuesto tiene una fuerte actividad de adsorción sobre la dioxina y en consecuencia, puede excretar eficientemente la dioxina, la cual es reabsorbida vía circulación gastrointestinal, y puede bloquear la reabsorción *per se* y de tal manera, es muy útil clínicamente. Sin embargo, también tiene la actividad de adsorción sobre las vitaminas lipofílicas, por ejemplo vitaminas A, D, E, K y carotenoides y por lo tanto, tiene el inconveniente de interrumpir la absorción de estas vitaminas esenciales.

Además, el carbón activado puede ser utilizado como un adsorbente de la dioxina, pero tiene la dificultad de uso común, debido a una baja selectividad en la absorción, de forma similar al olestra.

Tamoxifen y Faslodex (ICI 182,780, AstraZeneca) conocidos como inhibidores contra el estrógeno o sustancias de actividad análoga han sido desarrollados como agentes terapéuticos del cáncer de mama y se prueban clínicamente en la actualidad. Pueden ser aplicados clínicamente para la desintoxicación de la dioxina. Sin embargo, el tamoxifen actualmente utilizado como el agente terapéutico del cáncer de mama tiene efectos secundarios tales como actividad uterotrópica y de tal manera, tiene el límite en su uso como un agente para reducir el riesgo de hormonas ambientales en los humanos. Basándose en los resultados de los estudios precedentes, Faslodex reduciendo el efecto secundario de tamoxifen utilizado como el agente terapéutico del cáncer de mama tiene una excelente eficacia clínica. Pero su actividad se limita a actividad anticáncer y su actividad anti-estrogénica se limita sustancialmente a solo la acción inhibitora competitiva en el receptor del estrógeno. Por lo tanto, se puede distinguir claramente de UDCA que tiene la actividad eliminadora *in vivo* en la carga de estrógeno y los análogos de actividad estrogénica.

Divulgación de la invención

Los presentes inventores encontraron que UDCA aumenta el volumen de flujo biliar, por lo cual facilita la excreción de las sustancias tóxicas. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones según se definen en las reivindicaciones.

UDCA facilita la excreción de sustancias tóxicas por el incremento del volumen de flujo biliar. También protege las células hepáticas normales mediante la eliminación eficiente de la dioxina, que se acumula más fácilmente en el hígado que en cualquier otro órgano. Al mismo tiempo, no inhibe la absorción de sustancias lipofílicas esenciales y por lo tanto, puede desintoxicarlas de manera muy eficiente sin ningún efecto secundario grave.

Cualquier tipo de toxicidad, que puede ser causado por la exposición a varias hormonas ambientales, se puede mejorar o eliminar por el uso de UDCA o equivalentes de este. En la presente invención, los equivalentes de UDCA incluyen cualquier sal farmacéuticamente aceptable o éster de este, conocido en el oficio por tener los efectos farmacológicos equivalentes a UDCA. Ejemplos representativos de este son la sal de sodio de UDCA y el conjugado de taurina de UDCA.

Como se utiliza en este documento, el término "hormonas ambientales" incluye hidrocarburos aromáticos halogenados tales como PCB y compuestos de dioxina, y disruptores endocrinos tales como DDT, ftalatos, alquil fenol, bisfenol A, etc.

Se demostró que varias condiciones tóxicas causadas por la dioxina, por ejemplo la muerte, la pérdida de peso, la supresión del crecimiento, pérdida de regulación de la glucosa sanguínea, disminución del peso testicular, etc. pueden ser suprimidas o normalizadas por la administración de dioxina a animales de experimentación que fueron expuestos artificialmente a la dioxina. Además, se descubrió que la hipertrofia uterina por sustancias similares al estrógeno se puede inhibir efectivamente mediante el uso de UDCA. Con base en lo anterior, se confirmó que UDCA tiene efectos anti-estrogénicos *in vivo*.

TCDD se inyectó por vía subcutánea a ratones administrados con una cantidad farmacológicamente efectiva de UDCA, y después de los tiempos indicados, su efecto desintoxicante sobre TCDD fue evaluado por la medición de los cambios en la tasa de mortalidad, pruebas hematológicas, extracción de órganos y método de inmunotinción. A continuación, con el fin de verificar dicho efecto, se comparó con la del carbón activado, que se ha conocido para bloquear y eliminar la toxicidad de TCDD mostrada continuamente a través de la circulación enterohepática por la inhibición de su absorción *in vivo*.

UDCA se solubiliza en sustancias biliares altamente lipofílicas tales como DDT, ftalatos, alquil fenol, bisfenol A, etc., que muestran toxicidad por acumulación continua *in vivo*, por lo tanto, para excretarlos de manera eficiente y desintoxicarlos. Por consiguiente, pueden minimizar *in vivo* los efectos de estas sustancias.

Aunque los experimentos se llevaron a cabo utilizando TCDD, un representante de los hidrocarburos aromáticos halogenados, y el bisfenol A, el alcance no será limitado a aquellas sustancias específicas, porque ninguna de las hormonas ambientales se conoce por mostrar similar toxicidad por el mecanismo de reacción común. Por lo tanto, pruebas clínicas utilizando UDCA sería efectivo para la desintoxicación, y supresión y prevención de la toxicidad de cualquier otra hormona ambiental. Por lo tanto, la toxicidad de hormonas ambientales puede prevenirse o tratarse con eficacia, independientemente de la clase o cantidad de las mismas.

Las presentes formulaciones pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables convencionalmente utilizados en el oficio y ser fabricados en comprimidos, polvos, gránulos, soluciones, jarabe, cápsulas, etc. en mezcla con los portadores farmacéuticamente aceptables. Además, pueden ser fabricados en soluciones inyectables administradas vía muscular o intravenosa. UDCA puede ser administrado vía cualquier ruta farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con esta invención, UDCA se administra a una cantidad efectiva para suprimir la toxicidad por hormonas ambientales, preferiblemente, 10 a 2,000 mg con una dosis dividida varias veces al día.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 es una microfotografía óptica de los túbulos seminíferos en el control administrado con solvente (x200).

Fig 2 es una microfotografía óptica de los túbulos seminíferos en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD sola (X200). Como se muestra en la figura, se observó que la espermatogénesis se reduce notablemente. Debido a la interrupción del citoplasma, la forma de la mayoría de las células no fue clara. Las células endoteliales reproductoras en la porción basilar se disolvieron considerablemente. En los túbulos seminíferos de testículos, se demostró la separación de espermatogonia a partir de la porción basilar. Hubo una gran diferencia entre las porciones basilar y lumenal. La espermatogénesis normal en túbulos seminíferos apenas se observó y los túbulos seminíferos que tienen solo células de Sertoli sin células reproductoras fueron observados.

Fig 3 es una microfotografía óptica de túbulos seminíferos en el grupo co-administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y 0.5% en peso de UDCA (x200). Como se muestra en la figura, túbulos seminíferos normales fueron observados, y algunos túbulos seminíferos deteriorados y también fueron observadas células de esperma inmaduras en el centro de los túbulos seminíferos.

Fig 4 es una microfotografía electrónica de las células de Sertoli y las células reproductoras en el control administrado con solvente (x3,000). Las células de Sertoli se pusieron en contacto íntimo con las células reproductoras y se observó una estrecha unión.

Fig 5 es una microfotografía electrónica de células de Leydig y organelos citoplasmáticos (X2,500). Formas normales de células de Leydig y organelos fueron bien retenidas.

Fig 6 es una microfotografía electrónica de células de Leydig en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD sola (X4,000). Fueron observados fagolisosomas en el citoplasma de células de Leydig.

5 Fig 7 es una microfotografía electrónica de las células de Sertoli en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD sola (X4,000). Grandes gotas de lípidos fueron observadas en el citoplasma de las células de Sertoli, y también fueron observadas las vacuolas citoplásmicas y fagolisosomas.

Fig 8 es una microfotografía electrónica de cabezas de espermatozoides en el control administrado con solvente (X25,000). Cabezas de espermatozoides normalmente desarrolladas fueron observadas.

10 Fig 9 es una microfotografía electrónica de cabezas de espermatozoides en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD sola (X10,000). Las cabezas de espermatozoides se observaron frecuentemente en vacuolas citoplásmicas de células de Sertoli.

15 Fig 10 es una microfotografía electrónica de cabezas de espermatozoides en el grupo co-administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y 0.5% en peso de UDCA (X8,000). Las formas normales de las cabezas de espermatozoides fueron retenidas.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

20 Esta invención se comprenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos. Sin embargo, alguien de habilidad en el oficio apreciará fácilmente que los materiales específicos y los resultados descritos son solamente ilustrativos, y no tienen la intención, ni deben tener como objeto, limitar la invención según se describe más completamente en las reivindicaciones, que siguen a continuación.

Ejemplo 1: Efecto desintoxicante de UDCA sobre TCDD

1. Animales de experimentación

25 Ratones C57B1/6J machos de 5 semanas de edad, que tienen el peso promedio de 18-22 g los cuales han sido criados en CRJ (Charles River in Japan) fueron adquiridos y utilizados en este ejemplo como animales de experimentación. Los ratones fueron aclimatados bajo la condición de reproducción constante, i.e. la temperatura de 24±1 °C, la humedad de 60±10% y el ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, durante una semana y después de esto, se utilizaron en el experimento.

30 Los animales de experimentación fueron suministrados con pienso en polvo Purina (adquirido de Hae Eun Trade) y se les suministró agua *ad libitum*. Todos los animales fueron pesados dos veces por semana durante la experimentación.

2. Preparación y administración de materiales de prueba

35 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) disuelta en tolueno (pureza del 95% o más como resultado del análisis de cromatografía de gases), fabricada por Chem. Services Inc. en USA, fue volatizada con nitrógeno para obtener el polvo. El polvo obtenido fue disuelto en un solvente mezclado que contiene acetona y aceite de maíz con una relación de volumen de 1:6. Cada solución resultante contiene 110, 27.5 y 6.9 µg/kg de TCDD se inyectó vía subcutánea a los ratones a un volumen de 5 ml por peso corporal. UDCA como un material de prueba fue incorporado en el pienso en polvo a una cantidad de 0.5, 0.25 y 0.125% en peso, respectivamente. Los ratones fueron suministrados con el pienso de 10 días antes (pre-administración) a 60 días después de la administración de TCDD (post-administración).

40 3. Muestreo y pruebas

45 Una vez finalizado el experimento por 60 días, los animales de experimentación se sometieron a ayuno durante 24 horas y se anestesiaron con éter. A continuación, se les hizo una incisión abdominal y la sangre se recolectó a partir de la vena cava abdominal. Se sacrificaron mediante la liberación de la sangre. El hígado, riñones, testículos y epidídimos fueron extraídos y todos los órganos extraídos se pesaron. Solo los testículos se mantuvieron por separado y se observaron con microscopios electrónicos y ópticos. Para pruebas de hallazgos bioquímicos, el suero se separó de la sangre con una centrifuga y el suero separado fue analizado con un analizador bioquímico de sangre automatizado, Dimension (Dupont, USA). La sangre se colocó en otra botella de recolección de sangre y luego, se analizó con un analizador de células sanguíneas automatizado, Celdyn (Abbott, USA).

4. Microscopía óptica de testículos

5 Los testículos extraídos se fijaron en solución reguladora de formalina al 10% neutralizada, durante 24 horas y se lavó con el agua corriente. Posteriormente fue deshidratado con etanol y se aclaró con xileno y a continuación, se incrustaron con parafina. Se seccionaron con un micrótopo (microm HM 440E) a un espesor de 2-3 μm y a continuación, se tiñeron dos veces con hematoxilina y eosina para observar bajo un microscopio óptico.

5. Microscopía electrónica de testículos

10 Los testículos extraídos se empaparon con un pre-fijador (2.5% de glutaraldehído) preparada de solución reguladora de fosfato pH 7.3 y se cortaron en pedazos de un tamaño de 1 mm^3 . Se pre-fijaron en el pre-fijador a 4 °C durante 4 horas y a continuación, se lavaron con la misma solución reguladora. Posteriormente, se fijó con 1% de tetróxido de osmio (pH 7.3) durante 2 horas y se lavaron con la misma solución reguladora. Fue deshidratado con etanol y se sustituyó con óxido de propileno, y se incrustaron en solución mezclada de epon. El tejido incrustado se preparó en una sección ultra-delgada con un espesor de 60-70 nm utilizando un ultramicrotopo (Reichert-Jung, Ultracut E) y a continuación, se tiñeron dos veces con acetato de uranilo y citrato de plomo para observar bajo un Microscopio Electrónico de Transmisión (H-600, Hitachi, Japan).

15 6. Determinación de Puntuación de Johnsen

Para la evaluación del nivel de espermatogénesis, la Puntuación de Johnsen se determinó de 10 a 1 basándose en la presencia o ausencia de células principales organizadas de acuerdo con la maduración de la espermatogénesis. Las bases de la Puntuación de Johnsen en testículos fue la siguiente:

20 10: Espermatogénesis perfecta que tiene muchos espermatozoides, organización de células epiteliales embrionarias con un espesor constante, y lumen abierto

9: A pesar de muchos espermatozoides, separación significativa de las células epiteliales embrionarias a partir de la membrana basal y la interrupción de esta, o pérdida de lumen

8: Presencia de 5 a menos de 10 espermatozoides en la sección

7: Muchas células espermáticas sin espermatozoides

25 6: 5 a menos de 10 células espermáticas sin espermatozoides

5: Varios o muchos espermatozoides sin espermatozoides y células espermáticas

4: Menos de 5 espermatozoides sin espermatozoides y células espermáticas

3: Presencia de solo espermatogonia como células reproductoras

2: Presencia de solo células de Sertoli sin ninguna célula reproductora

30 1: Ninguna de las células en la sección de túbulos seminíferos

7. Estadística

35 Los resultados se expresan como valores de Media \pm Desviación Estándar. Para el análisis estadístico del peso corporal, absorción de pienso y agua, hallazgos bioquímicos, hallazgos hematológicos y el peso del órgano en una prueba de toxicidad aguda, la verificación se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) en el caso de distribución igual. En el caso de significancia fue reconocida en ANOVA, el test t de Student se realizó en los niveles de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

8. Resultados

(1) Efecto sobre la tasa de mortalidad y el tiempo de muerte

Tabla 1.

Efecto de UDCA en la muerte de ratones por una única inyección subcutánea de TCDD				
Dosis (µ/kg)	Aditivo (% en peso)	No. de ratones muertos/ No. de ratones administrados	Tasa de mortalidad (%)	Tiempo de muerte(días) (Media±DS)
0	Solvente control	0/10	0	-
6.9	UDCA(0)	0/10	0	-
	UDCA(0.125)	0/10	0	-
	UDCA(0.25)	0/10	0	-
	UDCA(0.5)	0/10	0	-
27.5	UDCA(0)	3/10	30	55±5
	UDCA(0.125)	0/10	0	-
	UDCA(0.25)	0/10	0	-
	UDCA(0.5)	0/10	0	-
110.0	UDCA(0)	10/10	100	35±7
	UDCA(0.125)	10/10	100	33±4
	UDCA(0.25)	9/10	90	34±5
	UDCA(0.5)	4/10	40	51±8
	Activado C(0.5)	7/10	70	35±6

- Grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD: Ningún animal muerto, independientemente de la exposición a UDCA.

5 - Grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD: Sin la exposición a UDCA, la tasa de mortalidad fue 30% y el tiempo de muerte fue 5.5±5 días, es decir, los animales murieron aproximadamente en el final de la experimentación. Por lo contrario, ningún animal murió con la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA independientemente de su dosis.

10 - Grupo administrado con la dosis de 110 µg/kg de TCDD: Sin la exposición a UDCA, todos los animales murieron a los 35±7 días. Con exposición a 0.125% en peso de UDCA, todos los animales murieron a los 33±4 días. Con exposición a 0.25% en peso de UDCA, 90% de los animales murieron a los 34±5 días. Con exposición a 0.5% en peso de UDCA, 40% de los animales murieron a los 51±8 días. En comparación, con la exposición a 0.5% en peso de carbón activado, 70% de los animales murieron a los 35±6 días.

(2) Efecto en los cambios en peso corporal

15

Tabla 2.

Efecto de UDCA en los cambios en peso corporal por una única inyección subcutánea de TCDD								
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Cambios en peso corporal después de la administración de TCDD						
		0 día	12 días	22 días	32 días	39 días	50 días	59 días
0	0	20.67±0.29	22.99±0.42	24.54±0.49	25.86±0.58	27.15±0.62	28.73±0.62	29.28±0.76
6.9	0	20.22±0.31	22.27±0.37	23.68±0.36	24.37±0.48	25.35±0.66	27.03±1.35	25.98±1.44**
	UDCA (0.125)	19.77±0.21	21.95±0.28	23.16±0.32	24.15±0.38	25.21±0.46	26.62±0.56	27.06±0.60
	UDCA (0.25)	20.13±0.34	22.18±0.38	23.81±0.43	24.21±0.47	25.69±0.45	27.15±0.46	27.74±0.48
	UDCA (0.5)	19.97±0.28	21.81±0.32	23.26±0.37	24.28±0.50	25.22±0.49	27.15±0.49	27.06±0.56
27.5	0	19.54±0.22	20.91±0.52**	19.82±1.14**	18.54±1.16**	17.80±1.40**	16.74±1.22**	15.72±1.17**
	UDCA (0.125)	19.80±0.25	22.04±0.26	23.59±0.28	24.17±0.33##	25.48±0.36##	26.63±0.28##	26.93±0.34##
	UDCA (0.25)	19.96±0.30	22.22±0.29	23.56±0.37#	24.34±0.38##	25.38±0.37##	26.94±0.50##	27.27±0.51##
	UDCA (0.5)	19.08±0.20	21.09±0.32	22.52±0.33	23.33±0.32##	24.07±0.34##	25.31±0.43##	24.52±0.42##

110.0	0	19.36±0.31	19.96±0.32**	20.02±0.47**	19.84±0.55**	17.62±1.14**	-	-
	UDCA (0.125)	19.48±0.29	19.40±0.40	18.44±0.87	12.61	-	-	-
	UDCA (0.25)	19.65±0.44	20.64±0.50	19.69±1.03	18.78±1.14	14.26	14.85	17.10
	UDCA (0.5)	19.71±0.14	20.52±0.32	21.15±0.82	20.76±1.04	19.81±1.37	18.19±1.80	18.53±1.59
	C Activado (0.5)	20.10±0.32	21.06±0.35	20.46±0.87	21.25±1.20	20.54±1.76	19.20±0.77	18.28±1.58
**: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01 #: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.05 ##: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01								

- : Muerte de todos los animales

5 - Grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD: No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin exposición a UDCA y el grupo control con solvente. Pero, el peso se disminuyó significativamente 59 días después de la administración de TCDD. Por lo contrario, dicha pérdida de peso estadísticamente significativa fue suprimida con la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA.

- Grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD: Sin la exposición a UDCA, el peso se disminuyó continua y significativamente en comparación con el grupo control con solvente de 12 días después de la administración de TCDD.

10 Sin embargo, con la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, dicha pérdida de peso estadísticamente significativa fue suprimida y el peso se mantuvo en casi el mismo nivel que el control con solvente.

15 - Grupo administrado con la dosis de 110 µg/kg de TCDD: Sin la exposición a UDCA, el peso se disminuyó continua y significativamente en comparación con el grupo control con solvente de 12 días después de la administración de TCDD. Además, con la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, el peso se disminuyó continuamente de la misma manera que el grupo sin exposición a UDCA.

(3) Absorción de pienso y agua

Tabla 3.

Efecto de UDCA en la absorción del alimento por una única inyección subcutánea de TCDD							
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Cambios en la absorción del alimento después de la administración de TCDD					
		10 días	20 días	30 días	40 días	50 días	60 días
-	Solvente control	4.61± 0.58	4.31± 0.58	4.44± 0.79	3.89± 0.44	3.90± 0.35	4.31± 0.95
6.9	-	4.76± 0.74	4.33± 0.84	4.97± 1.00	4.97± 1.00	3.51± 0.31	3.28± 1.56
	UDCA/ 0.125	4.64± 0.73	4.55± 0.44	3.83± 0.36	3.83± 0.36	3.19± 0.13	2.59± 0.23
	UDCA/0.25	4.39± 0.79	4.86± 0.90	3.78± 0.57	3.78± 0.57	3.18± 0.56	2.90± 0.30
	UDCA/0.5	4.48± 0.67	4.00± 1.11	4.66± 0.67	4.66± 0.67	3.12± 0.40	3.35± 1.56
27.5	-	3.86± 0.87	3.17± 1.68	2.37±0.37**	1.90±0.27**	1.50±0.16**	1.58±0.32**
	UDCA/0.125	4.15± 0.64	3.85± 0.43	3.99±0.34##	3.72±0.21##	2.90±0.98##	2.96±0.29##
	UDCA/0.25	4.07± 0.40	3.41± 0.71	3.59±0.38##	3.32±0.39##	3.16±0.24##	3.10±0.77##
	UDCA/0.5	4.31± 1.49	4.67± 1.13	3.99±0.36##	3.49±0.57##	3.18±0.55##	3.17±0.49##
110.0	-	4.19± 0.96	3.21± 1.13	3.88± 0.96	2.23± 0.56	-	-
	UDCA/0.125	3.77± 0.43	3.64± 1.16	2.94± 0.64	1.99± 0.58	-	-
	UDCA/0.25	3.65± 0.33	3.09± 0.44	3.23± 0.55	3.06±1.89	-	-
	UDCA/0.5	3.87± 0.57	3.77± 0.62	3.39± 0.24	2.72± 0.72	2.19± 0.22	2.05± 0.62
	C Activado/0.5	3.64±0.52	3.53±0.24	3.12±0.47	2.54±0.33	1.69±0.33	3.76±1 1.79
**: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01 ##: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en P<0.01							

- : Muerte de todos los animales

Como se muestra en la anterior Tabla 3, la absorción del pienso se redujo notablemente según la concentración expuesta de TCDD se incrementó.

5 - Grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD: No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin y con exposición a UDCA.

- Grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD: Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin exposición a UDCA y con exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, de 30 días después de la administración de TCDD. Es decir, la disminución en la absorción del pienso fue suprimida por la administración de UDCA

10 - Grupo administrado con la dosis de 110 µg/kg de TCDD: La absorción del pienso no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin y con exposición a UDCA.

Tabla 4.

Efecto de UDCA en la absorción de agua por una única inyección subcutánea de TCDD							
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Cambios en la absorción de agua después de la administración de TCDD					
		10 días	20 días	30 días	40 días	50 días	60 días
-	Solvente control	4.39±0.46	4.36±0.33	4.82±0.13	5.36±0.13	6.25±1.70	7.07±0.58
6.9	-	4.23± 0.52	4.08± 0.72	4.70± 0.42	4.30±0.42**	4.72±0.39**	4.88±0.17**
	UDCA/0.125	4.54± 0.71	3.75± 0.90	4.00± 0.00	4.00± 0.00	4.06± 1.34	4.64± 0.51
	UDCA/0.25	4.27± 1.16	3.83± 1.04	4.00± 0.00	3.60± 0.57	4.28± 1.02	4.69± 0.43
	UDCA/0.5	4.12± 0.94	3.80± 0.70	4.00± 0.63	3.78± 0.31	4.35± 1.08	5.06± 0.70
27.5	-	3.38± 0.75	3.58±0.14*	3.10±0.14**	3.10±0.14**	2.89±0.63**	3.19±0.21**
	UDCA/0.125	3.67± 1.10	3.92± 1.13	4.30±0.42###	4.20±0.28###	4.44±0.79###	4.81±0.26###
	UDCA/0.25	4.04±0.75	3.92±0.63	4.00±0.00###	4.00±0.00###	4.44±0.79###	4.81±0.26###
	UDCA/0.5	3.91±0.95	4.35± 0.98	4.44±0.00###	4.44±0.00###	4.41±1.00###	4.88±0.33###
110.0	-	3.27± 0.78	4.00± 0.66	4.70± 0.42	-	-	-
	UDCA/0.125	4.03± 1.21	4.07± 0.64	3.33± 0.94	-	-	-
	UDCA/0.25	3.79± 1.06	3.83± 0.14	4.67± 0.94	4.14± 0.20	-	-
	UDCA/0.5	3.75± 0.50	3.42± 0.80	4.20± 0.28	3.50± 0.71	3.14± 0.59	3.32± 0.33
	Carbón vegetal/2.5	4.21± 1.04	4.64± 0.47	4.70± 0.42	3.30± 0.990	7.67± 1.41	7.04± 0.44

*: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 **: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 ###: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

- : Muerte de todos los animales

15 Como se muestra en la anterior Tabla 4, la absorción de agua se redujo notablemente según la concentración expuesta de TCDD se incrementó.

- Grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD: No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin y con exposición a TCDD.

20 - Grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD: Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin exposición a UDCA y con exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, de 30 días después de la administración de TCDD. Es decir, la disminución en la absorción de agua fue suprimida mediante la administración de UDCA

- Grupo administrado con la dosis de 110 µg/kg de TCDD: La absorción de agua no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sin y con exposición a UDCA.

25 (4) Hallazgos bioquímicos

Para los hallazgos bioquímicos en el suero, los niveles de glucosa (GLU), GOT, GPT, Triglicérido (TG), lipoproteína de alta densidad (HDL-C), lipoproteína de baja densidad (LDL-C) y fosfatasa alcalina (ALP) en suero se midieron y los resultados se muestran a continuación.

Tabla 5.

Efecto de UDCA sobre los cambios bioquímicos sanguíneos en ratones por una única inyección subcutánea de TCDD								
Dosis (µPg/kg)	Aditivo (% en peso)	GLU (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	ALP (IU/l)
-	Solvente control	140.38±19.48	52.00±3.82	21.25±5.87	81.38±11.67	52.88±4.91	35.75±6.45	66.88±9.95
6.9	-	96.00±15.15**	55.16±6.65	21.66±5.39	76.14±14.03	39.29±9.38**	24.43±11.81*	69.67±8.80
	UDCA (0.125)	128.00± 27.26#	49.80± 2.74	23.50±8.32	79.56±11.29	45.67±2.74	14.56±6.28#	66.78±7.21
	UDCA (0.25)	104.60±24.87	57.30±4.83	24.00±6.39	75.90±11.55	46.30±5.08	21.20±5.25	72.05±6.63
	UDCA (0.5)	125.50±14.98##	47.11± 1.9	18.78±5.07	84.20±7.66	44.83±2.04	28.33±4.63	85.24±10.28
27.5	-	28.20±8.23**	230.40±72.90**	70.4±23.46*	92.67±16.79	21.80±6.76**	43.80±14.99	65.4±19.05
	UDCA (0.125)	55.22±9.34##	75.22±6.38##	54.67±23.28	98.78±17.14	34.78±4.35##	2.40±1.14##	75.14±18.33
	UDCA (0.25)	82.44±13.04##	58.67±5.54##	42.11±22.05#	97.00±17.68	37.44±3.64	4.29±4.03##	79.63±6.07
	UDCA (0.5)	64.22±9.35##	96.67±31.63#	45.38±21.74#	133.33±13.17##	47.00±7.66##	15.33±3.35##	80.57±14.52

*: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 **: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 #: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.05
 ##: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

5

GLU se redujo significativamente en proporción a la dosis de administración de TCDD. En cada dosis de administración de TCDD, la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA mostró efecto inhibitor notable sobre la disminución en los niveles de glucosa en suero. En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, GOT se incrementó significativamente en comparación con el control con solvente y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal incremento. Sin embargo, en el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD, GOT no se disminuyó significativamente en comparación con el control con solvente. En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, GPT se incrementó significativamente en comparación con el control con solvente y la exposición a 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal incremento. HDL-C se redujo significativamente en proporción a la dosis de administración de TCDD y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal disminución. En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, LDL-C no disminuyó significativamente en comparación con el control con solvente y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA resultó en la diferencia significante. En el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD, LDL-C se redujo significativamente en comparación con el control con solvente y la exposición a 0.125% en peso de UDCA resultó en la diferencia significante. TG y ALP no tuvo cambio significante.

20 (5) Hallazgos hematológicos

Para hallazgos hematológicos, recuentos de glóbulos blancos (WBC), neutrófilo (NEU), linfocito (LYM), monocito (MONO), eosinófilo (EOS), basófilo (BASO) y glóbulos rojos (RBC), y concentración de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen celular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), amplitud de distribución de glóbulos rojos (RDW) y recuento de plaquetas (PLT) fueron determinados y los resultados son como sigue.

25

Tabla 6

Efecto de UDCA en los cambios hematológicos por una única inyección subcutánea de TCDD en ratones								
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	WBC (10 ³)	NEU (10 ³)	LYM (10 ³)	MONO (10 ³)	EOS (10 ³)	BASO (10 ³)	RBC (10 ⁶)
-	Solvente control	6.29±2.06	0.36±0.11	5.72±1.92	0.06±0.05	0.02±0.04	0.14±0.09	9.74±0.24
6.9	-	5.94±1.85	0.40±0.24	4.27±2.05	0.10±0.07	0.01±0.01	0.21±0.12	9.29±0.85
	UDCA (0.125)	5.55±1.91	0.32±0.13	5.06±1.70	0.05±0.06	0.004±0.005	0.12±0.07	9.66±0.24
	UDCA (0.25)	5.68±1.50	0.28±0.07	5.17±1.49	0.04±0.02	0.003±0.002	0.09±0.04	9.42±0.37
	UDCA (0.5)	5.76±1.13	0.34±0.11	5.12±1.13	0.04±0.03	0.002±0.002	0.10±0.06	9.64±0.26
27.5	-	4.29±1.05	2.58±0.97**	1.43±0.60**	0.07±0.04	0.018±0.028	0.17±0.07	9.10±0.71
	UDCA (0.125)	3.69±0.72	0.34±0.10#	2.06±0.81	0.02±0.01	0.002±0.003	0.09±0.04	9.61±0.29
	UDCA (0.25)	3.78±1.19	0.48±0.09#	2.9±1.06###	0.05±0.03	0.008±0.007	0.18±0.07	9.48±0.29
	UDCA (0.5)	3.71±0.99	0.59±0.23#	3.04±0.77#	0.05±0.04	0.005±0.003	0.14±0.07	9.57±0.25
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)	PLT (10 ³)
-	Solvente control	14.60±0.35	46.00±1.32	47.20±0.81	14.98±0.20	31.73±0.56	20.27±1.00	1073.80±69.74
6.9	-	13.65±1.34*	43.12±5.04	46.33±1.97	14.70±0.41	31.76±0.70	20.38±1.21	1140.88±133.39
	UDCA (0.125)	14.35±0.37	44.61±1.14	46.18±0.55	14.87±0.22	32.18±0.43	20.17±1.07	1117.7±88.65
	UDCA (0.25)	14.16±0.44	44.77±1.57	47.56±0.81	15.04±0.25	31.63±0.58	19.73±0.91	1141.22±67.79
	UDCA (0.5)	14.47±0.29	45.35±0.93	47.08±0.63	14.98±0.19	31.87±0.41	20.19±0.72	1112.89±76.53
27.5	-	12.90±1.00**	39.12±3.25* *	42.97±0.56* *	14.17±0.40**	33.02±0.86**	20.97±2.27	1473.17±110.35**
	UDCA (0.125)	14.64±0.67#	43.77±1.37###	45.51±0.35###	15.32±0.39#	33.65±1.04	20.08±1.20	1172.44±80.58###
	UDCA (0.25)	14.23±0.55#	43.65±1.24###	46.09±0.42###	15.01±0.44#	32.58±0.73	19.99±1.08	1069.70±128.48###
	UDCA (0.5)	14.80±0.78#	44.49±1.63###	46.46±0.86###	15.46±0.59#	33.23±1.04	20.44±0.82	1068.14±84.28###

*: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 **: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 ###: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

5 WBC, MONO, EOS, BASO, RBC y RDW no se modificaron significativamente por la administración de TCDD. NEU se incrementó significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal incremento. LYM se redujo significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal

5 disminución. HGB se redujo significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal disminución. HCT se redujo significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal disminución. MCV se redujo significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal disminución. MCH se redujo significativamente en comparación con el control con solvente y la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal disminución. MCHC se redujo significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición a UDCA no podría suprimir tal disminución. PLT se incrementó significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD y la exposición de 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA suprimió notablemente tal incremento. PLT no se modificó significativamente en comparación con el control con solvente en el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD.

15 (6) Determinación de pesos de órganos

Los órganos, i.e. hígado, riñones, testículos y epidídimos, se pesaron y los resultados se muestran a continuación.

Tabla 7.

Efecto de UDCA en los cambios en peso corporal, y peso y peso relativo de hígado por una única inyección subcutánea de TCDD en ratones				
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Peso (g)	Hígado	
			Peso(g)	Peso Relativo del Hígado (%)
-	Solvente control	26.88±2.11	0.966±0.049	3.605±0.181
6.9	-	22.96±3.97*	0.935±0.173	4.092±0.403**
	UDCA/0.125	24.12±1.83	0.980±0.073	4.069±0.167
	UDCA/0.25	24.72±1.39	0.954±0.057	3.870±0.289
	UDCA/0.5	24.19±1.38	1.028±0.073	4.258±0.327
27.5	-	16.18±2.51**	0.734±0.151**	4506±0.304**
	UDCA/0.125	24.58±1.07##	1.187±0.086##	4.832±0.327
	UDCA/0.25	24.62±1.44##	1.088±0.030##	4.428±0.198
	UDCA/0.5	22.15±1.14##	1.057±0.069##	4.773±0.250
110.0	UDCA/0.125	15.93	0.8153	5.118
	UDCA/0.25	18.53±3.79	1.379±0.327	8.600±3.276
	Carbón vegetal/2.5	17.36±4.99	1.066±0.319	6.145±0.880

*: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 **: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 ##: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

20 En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, el peso de hígado se redujo significativamente y su peso relativo se incrementó significativamente, en comparación con el control con solvente. Tal disminución en el peso se suprimió notablemente por la exposición a 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, pero el aumento en el peso relativo no fue suprimido por el mismo. En el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD, solo el peso relativo se incrementó significativamente en comparación con el control con solvente. Tal aumento no fue suprimido por la exposición a UDCA.

25

Tabla 8.

Efecto de UDCA en los cambios en peso y peso relativo de riñones por una única inyección subcutánea de TCDD en ratones					
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Riñón izquierdo		Riñón derecho	
		Peso Relativo (g)	Peso (%)	Peso (g)	Peso Relativo (%)
-	Solvente control	0.133±0.013	0.495±0.033	0.130±0.012	0.48S±0.046
6.9	-	0.115±0.018	0.508±0.050	0.117±0.022	0.513±0.066
	UDCA(0.125)	0.116±0.014	0.480±0.050	0.123±0.008	0.511±0.049
	UDCA(0.25)	0.119±0.009	0.484±0.036	0.123±0.013	0.500±0.048
	UDCA(0.5)	0.121±0.007	0.500±0.025	0.125±0.009	0.316±0.043
27.5	-	0.101±0.012**	0.625±0.037**	0.092±0.012**	0.571±0.030**
	UDCA(0.125)	0.127±0.012###	0.517±0.056###	0.120±0.013###	0.489±0.055###
	UDCA(0.25)	0.125±0.010###	0.508±0.038###	0.123±0.007###	0.508±0.029###
	UDCA(0.5)	0.119±0.011###	0.539±0.040###	0.119±0.009###	0.338±0.045###
110.0	UDCA(0.25)	0.1069	0.6711	0.0963	0.6045
	UDCA(0.5)	0.121±0.022	0.704±0.199	0.113±0.010	0.659±0.133
	Act. C(0.5)	0.113±0.031	0.652±0.017	0.107±0.025	0.622±0.017

** : Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 ### : Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

5 En el grupo administrado con 27.5 µg/kg de TCDD, los pesos de los riñones se disminuyeron significativamente y sus pesos relativos se incrementaron significativamente, en comparación con el control con solvente. Tales cambios fueron suprimidos por la exposición a UDCA. En el grupo administrado con 6.9 µg/kg de TCDD, no se observó ningún cambio significativo en comparación con el control con solvente.

Tabla 9.

Efecto de UDCA en los cambios en peso y peso relativo de testículos por una única inyección subcutánea de TCDD en ratones					
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Testículo izquierdo		Testículo derecho	
		Peso(g)	Peso relativo (%)	Peso(g)	Peso relativo (%)
-	Solvente control	0.076±0.006	0.283±0.024	0.075±0.005	0.281±0.023
6.9	UDCA(0.125)	0.067±0.011*	0.296±0.030	0.65±0.010**	0.285±0.035
	UDCA(0.25)	0.072±0.006	0.297±0.020	0.073±0.007#	0.304±0.020
	UDCA(0.25)	0.071±0.008	0.287±0.030	0.072±0.008	0.290±0.030
	UDCA(0.5)	0.075±0.010	0.310±0.050	0.074±0.007#	0.307±0.031
27.5	-	0.058±0.014**	0.356±0.051**	0.058±0.015**	0.3S2±0.059**
	UDCA(0.125)	0.070±0.005#	0.284±0.025###	0.070±0.003#	0.285±0.016###
	UDCA(0.25)	0.072±0.007#	0.293±0.032###	0.071±0.007	0.290±0.030#
	UDCA(0.5)	0.067±0.011	0.304±0.040#	0.067±0.007	0.301±0.030#
110.0	UDCA(0.25)	0.343	0.2153	0.363	0.2279
	UDCA(0.5)	0.057±0.019	0.316±0.074	0.057±0.019	0.314±0.067
	Act. C(0.5)	0.057±0.014	0.332±0.037	0.056±0.016	0.326±0.22

* : Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 ** : Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 # : Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.05
 ### : Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

10 En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, los pesos de testículos se disminuyeron significativamente y sus pesos relativos se incrementaron significativamente, en comparación con el control con solvente. Tales cambios fueron suprimidos por la exposición a UDCA en un grado variable dependiendo de las concentraciones de UDCA. En el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD, solo el peso se redujo

significativamente en comparación con el control. Tal disminución fue suprimida por la exposición a 0.125 y 0.5% en peso de UDCA.

Tabla 10.

Efecto de UDCA en los cambios en peso y peso relativo de epidídimos por una única inyección subcutánea de TCDD en ratones					
Dosis (µg/kg)	Aditivo (% en peso)	Epidídimo izquierdo		Epidídimo derecho	
		Peso (g)	Peso Relativo (%)	Peso (g)	Peso Relativo (%)
-	Solvente control	0.029±0.002	0.107±0.007	0.029±0.004	0.108±0.012
6.9	-	0.023±0.005**	0.101±0.012	0.025±0.007	0.110±0.027
	UDCA(0.125)	0.029±0.003###	0.121±0.011##	0.029±0.003	0.121±0.014
	UDCA(0.25)	0.030±0.003###	0.121±0.011##	0.029±0.002	0.115±0.009
	UDCA(0.5)	0.029±0.003###	0.121±0.010##	0.027±0.004	0.114±0.015
27.5	-	0.021±0.006**	0.124±0.024*	0.021±0.006**	0.129±0.027*
	UDCA(0.125)	0.027±0.003#	0.112±0.017	0.026±0.003	0.105±0.015#
	UDCA(0.25)	0.029±0.003###	0.120±0.018	0.030±0.005###	0.124±0.020
	UDCA(0.5)	0.025±0.004	0.115±0.015	0.029±0.011	0.132±0.041
110.0	UDCA(0.25)	0.0195	0.122	0.0128	0.080
	UDCA(0.5)	0.021±0.007	0.114±0.025	0.024±0.009	0.127±0.024
	Act. C(0.5)	0.022±0.007	0.128±0.017	0.030±0.011	0.152±0.015

*: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.05
 **: Diferencia significativa del control con solvente en p<0.01
 #: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.05
 ##: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en p<0.01

5 En el grupo administrado con la dosis de 27.5 µg/kg de TCDD, los pesos de epidídimos se disminuyeron significativamente y sus pesos relativos se incrementaron significativamente, en comparación con el control con solvente. Tales cambios fueron suprimidos por la exposición a UDCA con un grado variable dependiendo de las concentraciones de UDCA. En el grupo administrado con la dosis de 6.9 µg/kg de TCDD, solo el peso del epidídimo izquierdo se redujo significativamente en comparación con el control y tal disminución fue suprimida por la exposición a UDCA. Los pesos relativos se incrementaron significativamente en comparación con el grupo administrado con TCDD sola.

7) Hallazgos histopatológicos bajo un microscopio óptico

15 En el grupo administrado con TCDD sola, la mayoría de las células reproductoras incluyendo espermatogonia mostró la diferenciación de disminución. Debido a la disolución de células epiteliales reproductoras, la separación de espermatogonia al rededor de la membrana basal y la expansión del espacio entre las células adyacentes fueron observadas. También se encontró la expansión del espacio entre sección basal y lumen (sección adyacente de espacio interior). Además, se observó la detención del crecimiento de espermatocitos y las células espermáticas. En algunos grupos, regiones de enfermedad necrótica y túbulos seminíferos que tienen solo las células de Sertoli fueron observados. Por lo tanto, se demostró que TCDD causa cambios muy severos. Por lo contrario, en el grupo expuesto a UDCA, se encontró que los túbulos seminíferos tienen la forma similar a aquella del control con solvente y en algunos casos, la espermatogénesis se incrementó a la inversa (ver Figs 1, 2 y 3).

8) Cambios en microestructuras celulares bajo un microscopio electrónico

25 La formación de vacuolas citoplásmicas en células de Leydig, hinchazón y desnaturalización de las mitocondrias, y la disminución y deformación del retículo endoplasmático liso fueron observados en el grupo administrado con TCDD sola. Aumento de fagolisosomas y gránulos de lípidos, y condensación nuclear también fueron observadas. En los túbulos seminíferos, la separación entre membrana basal y las células reproductoras se encontró de manera característica, y formas irregulares de núcleos en células reproductoras y condensación de cromatina también fueron observadas. Además, se encontraron la interrupción y pérdida de organelos citoplasmáticos. Por lo contrario, en el grupo administrado con UDCA, en casi todos los casos, una forma celular y microestructura similar a la del control con solvente fueron retenidos y en algunos casos, la microestructura celular se desarrolló bien (ver Figs 4 a 10).

9) Determinación de Puntuación de Johnsen para la cuantificación de hallazgos histopatológicos

Tabla 11.

Puntuación de Johnsen del tejido de testículo		
Dosis de TCDD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Aditivo contenido en el alimento (% en peso)	Puntuación
0.0	Solvente control	9.22 \pm 0.07
6.9	UDCA(0.000)	8.06 \pm 0.09**
	UDCA(0.125)	8.7 \pm 0.09##
	UDCA,(0.250)	8.84 \pm 0.10##
	UDCA(0.500)	9.10 \pm 0.08##
27.5	UDCA(0.000)	7.42 \pm 0.11**
	UDCA(0.125)	8.40 \pm 0.10##
	UDCA(0.250)	8.42 \pm 0.08##
	UDCA(0:500)	8.81 \pm 0.07##
**.: Diferencia significativa del control con solvente en $p<0.01$		
##.: Diferencia significativa del grupo administrado con TCDD sola en $p<0.01$		

5 Como se muestra en la anterior Tabla 11, en el grupo administrado, cada uno con la dosis de 6.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD sola y 27.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sola, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$) en comparación con el control con solvente. La diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$) se observó entre el grupo administrado con la dosis de 6.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD sola y el grupo co-administrado con la dosis de 6.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD, y 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, respectivamente. Además, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$) entre el grupo administrado con la dosis de 27.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD sola y el grupo co-administrado con la dosis de 27.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD, y 0.125, 0.25 y 0.5% en peso de UDCA, respectivamente. Por lo tanto, el efecto bloqueador de UDCA sobre la toxicidad de TCDD se demostró. Además, tales efectos se incrementaron en forma dependiente de la dosis en ambos grupos administrados con la dosis de 6.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCDD y 27.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ejemplo 2: Efecto del bisfenol A sobre la proliferación uterina

1. Animales de experimentación y diseño de administración

15 Ratones B6C3F1 hembras ovariectomizadas de 5 semanas de edad, el peso medio de los cuales fue 18 a 22 g y habían sido criados en CRJ, fueron adquiridos. Fueron aclimatados bajo la condición de reproducción constante, i.e. la temperatura constante de 24 ± 1 °C, la humedad de $60\pm 10\%$ y el ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, durante una semana y a continuación, se utilizaron en el experimento. Los animales fueron suministrados con pienso sólido adquirido de Purina y se les suministró agua *ad libitum*. Después de la aclimatación, los materiales de prueba disueltos en aceite de maíz se inyectaron por vía subcutánea una vez al día durante 4 días. Los materiales de prueba utilizados en este documento, soluciones stock de bisfenol A y UDCA se prepararon utilizando etanol. 2 mg de bisfenol A disuelto en 0.2 ml de aceite de maíz, fue administrado solo o en combinación con UDCA a los ratones, una vez al día. La dosis de administración de UDCA fue 0.2 o 2.0 mg, y el aceite de maíz fue administrado al control con solvente.

25 2. Determinación del peso del útero

Los animales de experimentación fueron observados para la exposición de toxicidad clínica una vez al día y al término del experimento, el útero fue extraído y se pesó.

3. Análisis estadístico

30 Los resultados se expresan como valores Promedio \pm Desviación Estándar. Se realizó ANOVA, para evaluar la distribución media de los grupos administrados. En el caso que la significancia fuera reconocida en ANOVA, el test t de Student se llevó a cabo en los niveles de $p<0.05$ y $p<0.01$.

4. Resultados

Tabla 12.

Efecto de UDCA en los cambios en el peso del útero por el bisfenol A		
Administración	No. de animales de prueba	Peso medio del útero \pm DS
Control(aceite de maíz)	10	7.03 \pm 1.25
Bisfenol A(2 mg/día)	10	13.5 \pm 1.75**
Bisfenol A(2 mg/día) + UDCA(0.2 mg/día)	10	11.74 \pm 1.36
Bisfenol A(2 mg/día) + UDCA(2 mg/día)	10	9.16 \pm 1.35##
UDCA(2 mg/día)	10	6.96 \pm 1.34
**.: Diferencia significativa del control (administrado con aceite de maíz) en $p < 0.01$		
##.: Diferencia significativa del grupo administrado con la dosis de bisfenol A 2 mg/día en $p < 0.01$		

5 Como se muestra en la anterior Tabla 12, el peso de útero se incrementó aproximadamente dos veces mediante la administración de 2 mg de bisfenol A, una vez al día. La co-administración de 0.2 mg de UDCA no dio lugar a ningún cambio significativo, pero la co-administración de 2.0 mg de UDCA redujo el incremento del peso de útero debido a la administración de bisfenol A, con el del control administrado con aceite de maíz.

10 En conclusión, el bisfenol A, un estrógeno exógeno, se confirmó que tiene la misma actividad fisiológica que el estrógeno *in vivo*, representativamente ejemplificado por la causa de proliferación uterina que da lugar al aumento del peso del útero. UDCA mostró actividad antagónica contra dicho efecto.

Formulación 1: Gránulos

UDCA	10 % en peso
Lactosa	65 % en peso
Almidón	19 % en peso
15 Hidroxipropilcelulosa	5 % en peso
Estearato de magnesio	1 % en peso

20 Los ingredientes anteriores fueron mezclados y la mezcla completa se amasó utilizando 30 % en peso de etanol como un agente de aglutinante. A continuación, la mezcla amasada fue granulada de acuerdo con un método convencional, y a continuación, se seca. Los gránulos fueron introducidos en bolsas a una cantidad de 1 g/bolsa, suministrando gránulos que contienen cada una 100 mg de UDCA seco.

Formulación 2: Comprimidos

Los gránulos preparados en la anterior Formulación 1, fueron comprimidos en forma de comprimidos a una cantidad de 500 mg/comprimido, proporcionando comprimidos que contienen cada uno 50 mg de UDCA, de acuerdo con un método convencional.

Formulación 3: Jarabe

UDCA	0.6 % en peso
Sacarosa	50 % en peso
Sodio carboximetilcelulosa	0.05 % en peso
Metil parabeno	0.08 % en peso
30 Sabor	0.1 % en peso
Agua purificada	q. s.

5 A 49.17 partes en peso de agua purificada se le adicionó sodio carboximetilcelulosa y a continuación, se hincha. Fueron adicionados Sacarosa y metil parabeno a la mezcla resultante para disolverlos por calentamiento. A la solución resultante se le adicionó UDCA y el conjunto se agitó para proporcionar una solución homogénea. Sabor se adicionó a esta y se mezcla. La solución resultante se ajustó a un volumen de 100 ml y a continuación, se filtra. El filtrado se llenó en botellas a un volumen de 33 ml/botella, proporcionando un jarabe que contiene cada uno 200 mg de UDCA.

Formulación 4: Inyecciones

	UDCA	2 % en peso
	Alcohol etílico	2 % en peso
10	Polietileno glicol	0.5 % en peso
	Cloruro de sodio	q. s.

Los ingredientes anteriores se ajustaron para tener un pH 6.5, mediante la adición de solución de hidróxido de sodio 2M. A continuación, se adicionó agua destilada para inyección a esta a un volumen total de 100 ml.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

15 De acuerdo con la presente invención, UDCA tiene excelente eficacia para suprimir la toxicidad causada por hormonas ambientales y de tal manera, para prevenir o tratar cualquier enfermedad causada por la exposición a esta, por ejemplo, pérdida de peso, supresión del crecimiento, hipoglicemia, inmunosupresión, toxicidad reproductiva, inmunotoxicidad, etc.

20 Además, UDCA suprime los disruptores endocrinos por actividad antagonista contra sustancias exógenas que tienen actividad similar al estrógeno.

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones que contienen como un ingrediente activo el ácido ursodeoxicólico, o una sal de sodio o conjugado de taurina de este, para utilizar en un método de tratamiento de hipertrofia uterina causada por una hormona ambiental que tiene actividad similar al estrógeno.
- 5 2. Las formulaciones de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hormona ambiental es el bisfenol A.
3. Las formulaciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además contienen un portador farmacéuticamente aceptable.
4. Las formulaciones de acuerdo con la reivindicación 3, que se adaptan para una administración por vía oral o para inyección.
- 10 5. Las formulaciones de acuerdo con la reivindicación 4, que se adaptan para inyección muscular o intravenosa.

Fig. 1



Fig. 2

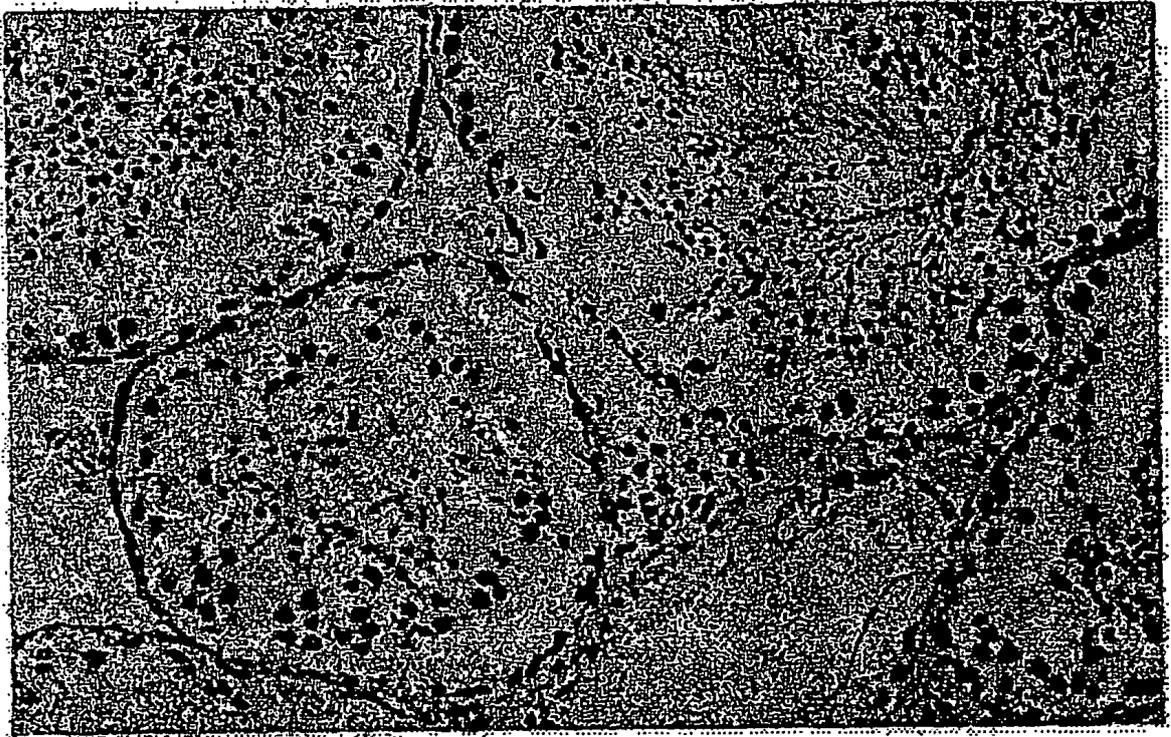


Fig. 3

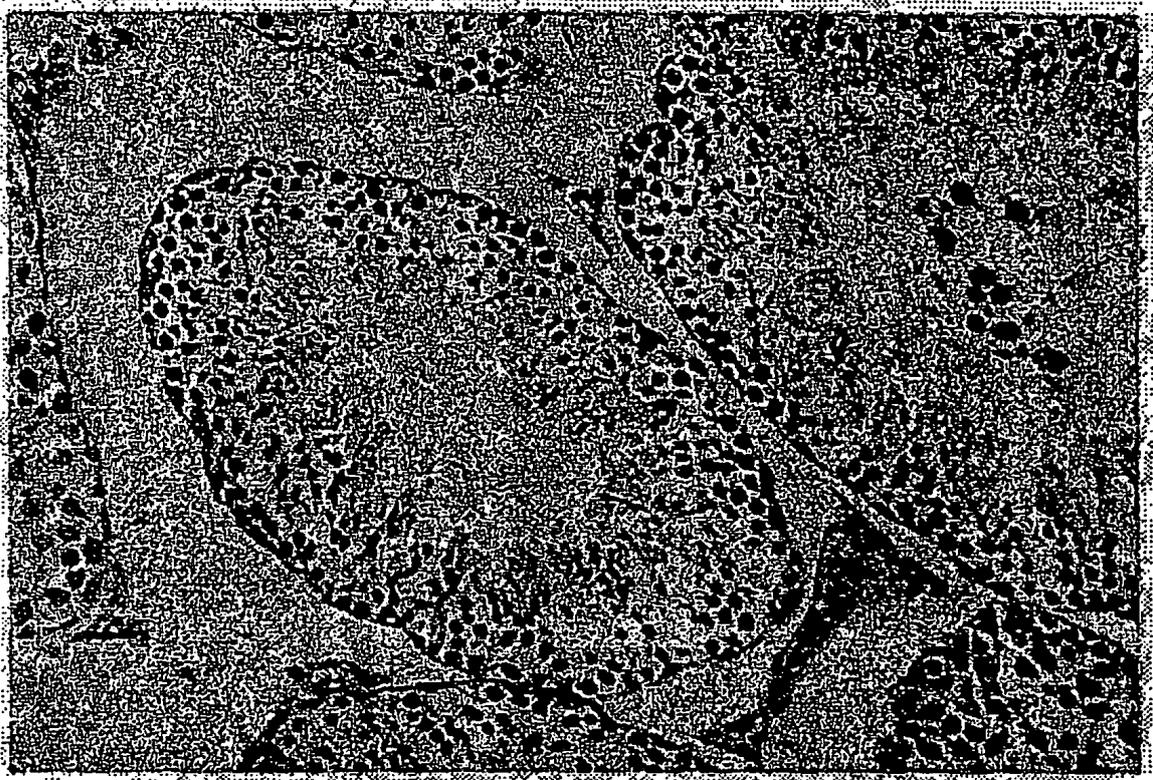


Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

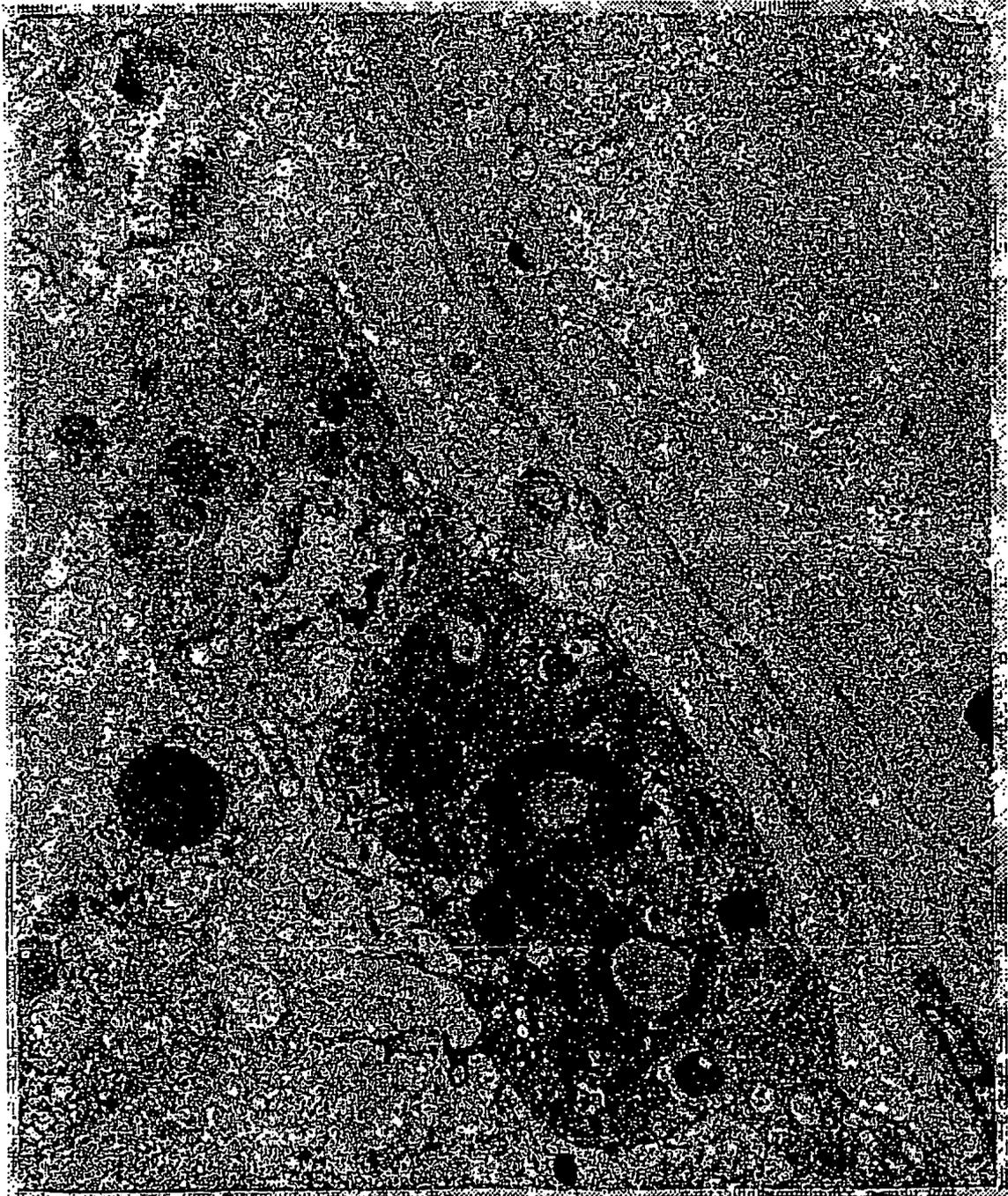


Fig. 7

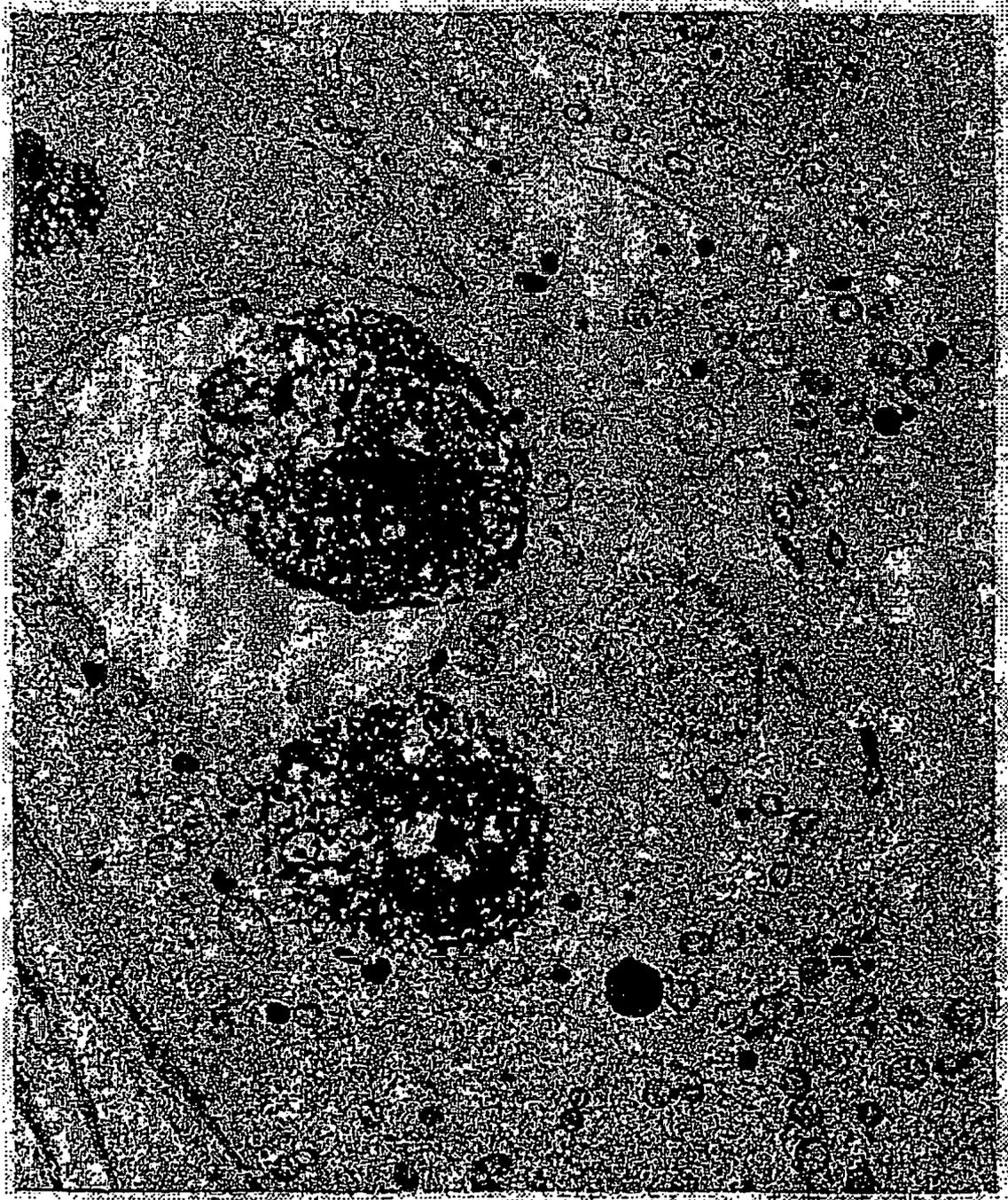


Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 **Literatura no-patente citada en la descripción**

- **Casper R F. et al.** *Mol. Phar. Macol.*, October 1999, vol. 56 (4), 784-790 **[0009]**
- *Lancet*, 09 October 1999, vol. 354 (9186), 1266-1267 **[0010]**