

Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2},
Yulieé López Feria^{3*}, Mildrey Fariñas Medina^{1*}, Juan Francisco Infante
Bourzac^{4*}, Daiyana Díaz Rivero^{5*}, Jorge Luis Prieto Díaz^{5*}**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Doctor en Medicina Veterinaria

⁴Doctor en Medicina Veterinaria. PhD

⁵Técnico Medio en Veterinaria.

* Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

** Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

La toxicidad aguda se refiere al desarrollo rápido de síntomas y efectos después de la aplicación de una dosis única relativamente alta o comúnmente se relaciona con los daños inmediatos generados por dosis únicas suficientemente grandes. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y analizados anatomopatológicamente. Para cumplir con el principio de las 3 "R" (reducción, refinamiento y reemplazo) se han aprobado tres métodos de reducción y refinamiento de la toxicidad aguda: el de la dosis fija, el de la clase tóxica aguda y el método arriba y abajo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos trazamos como objetivo de este trabajo dar algunas consideraciones actualizadas sobre la determinación de la toxicidad aguda de una sustancia, según el principio antes mencionado. Para lo cual incluimos los tipos de datos, tipos de daños causados por los materiales tóxicos, objetivos de la toxicidad aguda, su importancia, clasificación de las evaluaciones agudas, efectos tóxicos generales, determinación de la dosis letal media (DL50), principio de las 3 "R", métodos clásicos y alternativos y por último como se debe medir la toxicidad aguda de una sustancia.

Palabras clave: Toxicidad aguda, métodos alternativos, principio de las 3 "R", exposición única.

Abstract

Some considerations on the acute toxicity determination.

The acute toxicity refers to the quick development of symptoms and effects after the application of a relatively high unique dose or it commonly is related with the immediate damages generated by sufficiently big unique dose. The animals observation is carried out after the administration of the substance and it lasts up to 14 days, after which the animals are sacrificed and anatomopatological analyzed. To fulfill 3 " R " principles they have been approved the three reduction methods and refinement of the acute toxicity: the fixed dose, the acute toxic class and the up/down method. Keeping in mind these antecedents, we trace ourselves as objective of this work to give some current considerations on the determination of the acute toxicity of a substance, according to the principle before mentioned. For that which we include the types of data, types of damages caused by the toxic materials, objectives of the acute toxicity, their importance, classification of the acute evaluations, general toxic effects, median lethal dose determination (DL50), 3 "R" principles (Replacement, Reduction and Refinement), classic and alternative methods and lastly like the acute toxicity of a substance should be measured.

Key words: Acute toxicity, alternative methods, 3 "R" principles, unique exhibition.

Introducción

La toxicidad aguda describe los efectos adversos que son el resultado de una sola exposición a una sustancia, por esto difiere de la toxicidad crónica que describe la acción tóxica de la sustancia en exposiciones repetidas en un periodo de tiempo más largo (meses a años).¹

Existen dos modos principales a través de los cuales pueden ejercer los productos químicos su toxicidad. Los efectos locales tienen lugar en la zona del cuerpo que ha estado en contacto con el producto. Así ocurren las quemaduras provocadas por ácidos o los daños pulmonares por inhalación de gases reactivos.² Los efectos sistémicos tienen lugar después o una vez que el producto se ha absorbido y distribuido desde el punto por el que penetró hasta otras zonas del organismo. Casi todos los compuestos causan efectos sistémicos, aunque algunos pueden causar ambos. Tal es el caso del aditivo tetraetilo de plomo para gasolinas, que provoca efectos cutáneos en la zona de contacto y por otra parte, se absorbe y causa efectos característicos sobre el sistema nervioso central y en otros órganos.³

La frecuencia de exposición se refiere al número o el tiempo en el cual una persona u animal es expuesta y el tiempo entre las exposiciones. Típicamente las exposiciones pueden ser clasificadas según la duración de la exposición. La duración de la exposición puede ser aguda, subcrónica o crónica.⁴

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada "toxicología reguladora".

Por ende es de vital importancia que los profesionales en esta rama de la toxicología experimental conozcan los métodos abreviados que existen hoy en el mundo para evaluar la toxicidad aguda de un producto, las cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 "R" (reducción, refinamiento y reemplazo), y de esta forma trata de utilizar la menor cantidad de animales posibles y que la muerte no fuese el objetivo fundamental de este tipo de investigación sino la aparición de la llamada toxicidad evidente o signos y síntomas de toxicidad como criterio de punto final (endpoint) de su protocolo de trabajo investigativo.

Para lo cual nos trazamos como objetivo de este trabajo dar algunas consideraciones actualizadas sobre la determinación de la toxicidad aguda de una sustancia, Para lo cual incluimos los tipos de datos, tipos de daños causados por los materiales tóxicos, objetivos de la toxicidad aguda, su importancia, clasificación de las evaluaciones agudas, efectos tóxicos generales, determinación de la dosis letal media (DL50), principio de las 3 "R", métodos clásicos y alternativos y por último como se debe medir la toxicidad aguda de una sustancia.

Desarrollo

La toxicidad aguda se refiere al desarrollo rápido de síntomas y efectos después de la aplicación de dosis única relativamente altas o daños inmediatos generados por dosis únicas suficientemente grandes. Un solo compuesto puede generar efectos tóxicos agudos y " crónicos estos dependen de la dosis y duración a la exposición.⁵ La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados.⁶ En general el estudio se realizaba con 5 grupos o 5 niveles de dosis del producto a administrar, de 10 animales por sexo, pero en nuestros días existen algunos métodos abreviados ya aceptados, que intentan reducir el número de animales a sacrificar. En estos estudios se tienen en cuenta la dosificación la cual incluye dosis, frecuencia y duración de la administración.⁷

Para que las predicciones sean de interés, es necesario contar con cierta información sobre los aspectos siguientes:

- El compuesto y sus propiedades físicas y químicas.
- El organismo afectado.
- Los efectos o la respuesta que el compuesto causa.
- La exposición (dosis, tiempo, situación).

En toxicología existen dos tipos de datos:

- Datos Cuánticos:
 1. Mortalidad.
 2. Incidencia de signos fármaco-tóxicos.
- Datos Graduados:
 1. Peso corporal.
 2. Consumo de alimento.

Hay cuatro tipos básicos de daños causados por los materiales tóxicos: ⁸

1. El daño fisiológico: Pueden ser reversibles o irreversibles, dañan a la salud del organismo.
2. Carcinogénesis: La inducción de la aparición de cáncer.
3. Mutagénesis: La inducción de daños genéticos.
4. Teratogénesis: La inducción de defectos en el nacimiento.

Objetivos de la toxicidad aguda:

1. Es el primer paso en los estudios toxicológicos
2. Definir toxicidad intrínseca.
3. Predecir daños en las diferentes especies en las que se lleva a cabo.

4. Identificar especies más susceptibles.
5. Identificar órgano u órganos diana.
6. Proveer información acerca de riesgos de exposición aguda de la sustancia, ya que evalúa las características tóxicas de la sustancia.
7. Proveer información acerca del diseño y los posibles niveles de dosis en los estudios de administraciones prolongadas (subcrónicos y crónicos).
8. Proveer información a clínicos para el diagnóstico y tratamiento a la sobre exposición aguda de la sustancia, ya que da información sobre el modo de acción, relación entre dosis y severidad del daño incluidas conductuales y clínicas, reversibilidad del daño, lesiones, mortalidad y otros efectos tóxicos.¹³

Importancia:

- Población: Formulación de medidas de seguridad por investigadores y una parte de los trabajadores durante tempranos estadios del desarrollo de la sustancia.
- Regulatorio: Clasificación, marcaje y manejo de sustancias.
- Académico: Relación estructura-efecto, mecanismo de acción del tóxico.

Clasificación de las evaluaciones agudas:

- Toxicidad oral.
- Toxicidad dérmica.
- Toxicidad por inhalación.
- Estudios de irritabilidad tópica.
- Estudios de irritabilidad oftálmica.

Hay dos tipos generales de efectos tóxicos:

- Los Efectos letales: Los cuales producen la muerte de los individuos.
- Los efectos subletales: Clasificados como otros efectos que no producen directamente la muerte, mediante los cuales se incluyó el término de toxicidad evidente.

Algunas consideraciones a tener en cuenta en la evaluación de una sustancia mediante el ensayo de toxicidad aguda (determinación de la dosis letal media DL50):

Normalmente se utilizaban las pruebas de toxicidad agudas para determinar una concentración letal que matará al 50 % de la población de la prueba durante un tiempo dado.

La dosis respuesta es la relación existente entre la dosis y proporción de la población con evidencia de efectos definidos.⁹ La dosis letal media es la estimación estadística que relaciona la dosis que ocasiona el 50 % de las muertes cuando se realiza una administración única, la cual se encuentra expresada en peso de la sustancia por peso corporal y se expresa miligramos por kilogramos.¹⁰

Es importante señalar la especie en la que se realizó el ensayo, ya que los valores de DL50 o CL50 dependen de varios factores: el sistema biológico o animal, la raza, el sexo, la edad, la dieta, etc. En el caso del insecticida DDT, la DL50 es de 87 mg/kg de peso corporal cuando se administra por vía oral en ratas, pero alcanza 150 mg/kg de peso corporal en perros.

La DL50 correspondiente a la dioxina es de 0,02 mg/kg de peso corporal en ratas y de 0,001 mg/kg de peso corporal en perros; es decir: la rata tolera una dosis veinte veces superior a la que toleran los perros.¹¹ Aunque para valorar cómo respondería un organismo humano no basta una extrapolación directa de los resultados obtenidos con animales, estos sí dan idea del grado de toxicidad.¹²

La determinación de la DL50 se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (I.V, I.M, IP, S.C y oral). En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce severos efectos adversos, aunque se debe destacar que estos últimos en ocasiones ya no se utilizan para este tipo de estudio.¹³

Métodos clásicos y alternativos:

A pesar del gran esfuerzo realizado en el desarrollo de métodos alternativos, son pocos los totalmente aceptados por las autoridades reguladoras. La organización para la cooperación y el desarrollo económico (OECD) ha aprobado tres métodos de reducción y refinamiento de la toxicidad aguda: el de la dosis fija, el de la clase tóxica aguda y el método arriba y abajo.¹⁴

El principal problema para determinar la viabilidad de un método *in vitro* es la dificultad de comparar estos resultados, basados en el mecanismo de acción de un compuesto, con los obtenidos *in vivo*. Los métodos *in vitro* son muy fiables pero, debido a que son más restrictivos, sólo sirven para predecir la toxicidad de un determinado tipo de sustancia o de un aspecto concreto del proceso de toxicidad, por lo cual es necesario realizar una batería de ensayos.

Desde Julio de 2001 la OECD sustituyó y eliminó el método clásico de determinación de la toxicidad aguda por sus tres alternativas, la Unión Europea sigue aproximadamente el mismo calendario, ya que por el año 2002 fue eliminado en su totalidad el procedimiento clásico de determinación de la dosis letal o DL50. Los métodos admitidos permiten determinar una dosis aproximada que provoca toxicidad aguda por vía oral y, también, clasificar a los productos en función de dicha toxicidad.¹⁵

Sin embargo, el desarrollo de la investigación biomédica permite que muchos estudios que hasta hace algunos años sólo podían realizarse con animales hoy puedan hacerse *in vitro*, aportando una mayor información sobre los mecanismos implicados en el proceso. Se sigue trabajando para buscar alternativas a los ensayos de toxicidad. A pesar de las dificultades para su aceptación, no se pierde la esperanza de que muchos de estos métodos sean totalmente abolidos en los próximos años.¹⁴⁻¹⁵

Por la vía oral, se usan tres ensayos en animales: La dosis fija, clase tóxica aguda y los métodos arriba/abajo usan menos animales, aunque con efectos tóxicos similares y algunas muertes ocurren. Nuevos proyectos de la Unión Europea apuntan a reemplazar completamente los ensayos de toxicidad aguda y a generar información sobre toxicidad a largo plazo.

En 1997 el Comité para los productos medicinales (CPMP) definió la regla de las 3R como objeto para reducir el número de animales sacrificados anualmente en los estudios de toxicidad.

REDUCCIÓN: Evitar duplicaciones de estudios; evitar estudios que han mostrado ser irrelevantes para el hombre por extrapolación; desarrollando estudios complementarios *in vitro* y *ex vivo*; aumentando la calidad de las pruebas; obteniendo más información con un menor número de animales.¹⁶

REFINADO: Utilizando nuevas tecnologías y definiendo nuevos "end-points" más humanos (por ejemplo, que la muerte no sea un "end-point" en los estudios de toxicidad aguda).¹⁵⁻¹⁶

REEMPLAZO: Desarrollando métodos alternativos, como cultivos de células humanas. De hecho, en algunos países de la Unión Europea, para los productos cosméticos está prohibido el uso de animales de experimentación.¹⁶

Ponemos a su disposición los métodos existentes para determinar la toxicidad aguda:

- Tradicional (3 dosis), realizada en ratas, utilizando 5 animales por sexo y por grupo de 8 a 12 semanas de edad, dosis que permite estimar la dosis letal media, el punto final es la muerte del animal y la prueba límite se realiza a 2 000 mg/kg. Este tipo de método fue eliminado desde el año 2002.¹⁷
Fue eliminada y se incluyó a partir de aquí el término de toxicidad evidente es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del riesgo y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, pueda esperarse la aparición de signos tóxicos desde superficiales, graves y una mortalidad probable o no.
- Prueba límite, se administra una dosis de 2 000 mg/kg de peso vivo a 5 animales por sexo de no existir una mortalidad conocida no se necesita seguir subiendo la dosis.
- Prueba de las dosis fijas: son dosis dadas a 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg a 5 animales por sexo por grupo, si a una sola dosis se encuentra mortalidad se puede pasar a la otra, esta incorpora el término de toxicidad evidente, es una alternativa de la prueba clásica aguda.
- Método de las clases, el cual determina el rango de dosis a la cual se espera letalidad (25,200 y 2 000 mg/kg) a 3 animales por sexo por grupo, donde se le atribuye el mismo peso a la toxicidad evidente. El método de las clases tóxicas agudas (CTA), tiene como objetivo fundamental determinar los posibles efectos adversos de una sustancia para estimar la relación cuantitativa entre la intensidad de la respuesta biológica medible y la

concentración de la sustancia a administrar. A través de este método se reduce el número de animales de experimentación.¹⁸

- Método hacia arriba y abajo, donde se administra un solo animal, un solo sexo por dosis, sino hay muerte se pasa a la dosis siguiente, si dos dosis sucesivas son letales entonces 4 animales se prueban en una de esas dosis, utilizando 2 000 mg/kg de dosis máxima).

En el caso en que su sustancia a evaluar se administrada por vía oral, para el caso de los roedores el volumen a administrar no debe exceder de 1 ml por 100 g de peso vivo para no acuosos, en el caso de los acuosos es de 2 ml por 100 g de peso vivo. Se recomienda que los animales sean observados por un período de 14 días lo cual no debe de ser tan rígido ya que puede estar dado por las reacciones tóxicas y el ritmo de recuperación. El tiempo al cual aparecen, su duración y el tiempo de muerte son datos importantes.¹⁹ La dosis letal media siempre se debe considerar en conjunción con los efectos tóxicos observados clasificado como toxicidad evidente y los hallazgos patológicos. Los síntomas más comunes son pérdida de peso, nauseas, salivación, distensión abdominal, pérdida de equilibrio, dificultades respiratorias, convulsiones y postración.

Como se debe medir la toxicidad aguda de una sustancia:

La dosis es la cantidad de exposición a un agente potencialmente tóxico y es normalmente moderado en los miligramos por kilogramo (mg/kg), o mg por litro (el mg/l).

La DL50 y CL50 miden los efectos agudos, y por consiguiente no proporcionan la información sobre la conexión de un químico a crónico (a largo plazo) en los efectos de salud. La dosis necesaria para producir un efecto adverso varía enormemente entre los diferentes compuestos.

Es posible establecer una clasificación basada en los valores de DL50 o CL50. La evaluación de los efectos se efectúa en laboratorios mediante el uso de animales (principalmente, ratas, ratones y conejos). Para esto se debe administrar el compuesto, ya sea por vía oral, bajo la piel, por inhalación, en el abdomen o en vena.

Los parámetros DL50 y CL50 se emplean para cuantificar los resultados de ensayos diversos, a fin de poder compararlos.²⁰ (Ver figura 1)

Una dosis letal alta significa la toxicidad aguda baja, y una dosis letal baja significa la toxicidad aguda alta.

Normalmente la cantidad de la sustancia tóxica a probar exigida para causar la muerte se usa como una indicación de toxicidad relativa.²¹ Esto se expresa más a menudo como DL50, por ejemplo el DL50 para el azúcar es >10 000 mg/kg, mientras para la toxina de botulismo es ~ 0.0001 mg/kg. Obviamente la toxina del botulismo es muy tóxica incluso en las dosis relativamente bajas, causando síntomas graves en animales.

Con los resultados obtenidos del estudio de toxicidad aguda se generan las curvas de dosis-respuesta del producto en cuestión según el por ciento de la población que estuvo afectada en cada una de las dosis hasta llegar a la mayor que provoco la muerte del 50 % de <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

la población, (en mg/kg). Al examinar los gráficos a menudo se puede observar una concentración mínima (o "umbral") de dosis baja indicando que no hay efecto notable en la población que se utilizó para determinar la prueba de toxicidad aguda, lo cual es conocido como NOEL (Ningún límite de efectos notable).²²

Esto genera dos tipos de valores: ADA (la administración diaria aceptable) y DDM (la dosis diaria máxima). Mientras estos valores hacen pensar en un margen grande de seguridad, en la realidad es bastante posible que los individuos más sensibles en una población todavía puedan sufrir los efectos dentro de los límites de dosis puestos. La seguridad farmacéutica se establece por el índice del IT (índice terapéutico). El índice terapéutico es la proporción de DL50 / DE50. Un valor de IT alto indica un tratamiento eficaz a las dosis bajas y un efecto letal a las dosis más altas. Un valor de IT bajo indica un tratamiento ineficaz a las dosis bajas y un efecto letal a los mismos niveles bajos. El objetivo de usar el índice terapéutico es tener un producto farmacéutico que sea muy eficaz en las dosis bajas con los efectos mínimos del tóxico.

Luego de la administración, las observaciones se deben realizar cada 4 horas durante 12 horas como máximo, y los restantes días se realizan dos veces al día durante 14 días para de esta forma llevar a cabo el control de la mortalidad y de los animales moribundos, así como los síntomas clínicos de toxicidad evidente.²³ En el caso de las observaciones clínicas detalladas se realizan diariamente así como el control del peso corporal y el consumo de alimento. Los exámenes físicos deben estar dirigidos por un veterinario antes de ser iniciada la administración y una vez por semana en los días que más convengan.²³⁻²⁴

Se deben determinar los parámetros tales como hematología y bioquímica sanguínea en el día 3 y 14 de observación, en algunos casos de no existir toxicidad evidente no se suele determinar ningún parámetro. Se debe realizar la autopsia a todos los animales y se pesan las adrenales, cerebro, corazón, los riñones, el hígado, los pulmones, los ovarios con los oviductos, la glándula pituitaria, próstata, las glándulas salivales, el bazo, la tiroides con el paratiroides, el timo, los testículos y el útero.²⁴ Muchos autores plantean que se al análisis microscópico de órganos y cavidades el patólogo no observa ninguna lesión no es necesario realizar el análisis histopatológico de los órganos analizados.

En cuanto a las observaciones se determina la presencia de signos y síntomas así como la determinación de reflejos, algunos ejemplos de los más frecuentes encontrados se expondrán en la siguiente tabla:

Tabla 1. Evaluación de signos y síntomas de toxicidad, reflejos y otros.

Signos y síntomas evaluados	Evaluación del:
Alopecia	
Ataxia	Nivel de actividad general
Catalepsia	Aspecto general
Convulsiones	Aspecto de la cola
Apnea	Aspecto de los ojos
Disnea	Aspecto de los genitales
Edema en las patas	Aspecto de las heces
Epistaxis	Aspecto de la orina
Piloerección	Características de la marcha
Lesiones en la piel (Especificar sitio)	
Nódulos o abscesos (Especificar sitio)	REFLEJOS
Ptosis palpebral	Reflejo al dolor
Taquipnea	Reflejo corneal
Lacrimación	Reflejo de agarre
Salivación	Reflejo de enderezamiento
Sangrado ocular	Reflejo de escape
Temblores	

En las siguientes imágenes encontrarán ejemplos de algunos signos y síntomas observados en un estudio de toxicidad aguda oral por el método de las clases en ratas Sprague Dawley (SD) y ratones NMRI.

Figura 1. Relación entre la dosis letal y la toxicidad.



- (1) Dosis Letal ALTA = Evaluada como Toxicidad BAJA
- (2) Dosis Letal MEDIA = Evaluada como Toxicidad MEDIA
- (3) Dosis Letal BAJA = Evaluada como Toxicidad ALTA

Figura 2. Cianosis de las patas y postración en ratas SD



Figura 3. Piloerección y agresividad en ratas SD.



Figura 4. Aspecto general desfavorable y erizamiento en una rata SD.



Figura 5. Hematuria en rata SD.



Figura 6. Problemas en la marcha, ataxia y hemiplejia en una rata SD.



Figura 7. Ratón con conducta flemática.

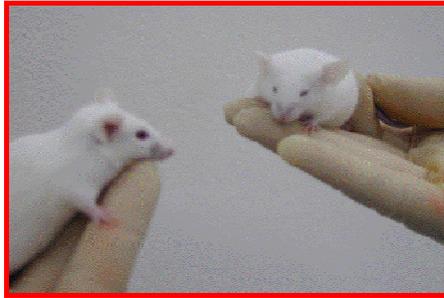


Figura 8. Ratón NMRI aislado con conducta flemática a la derecha, en la izquierda un animal control.



Bibliografía

1. Goodman J.L. The traditional toxicologic paradigm is correct: Dose influences mechanism. *Environ. Health Persp* 1998; 106(1):285-288.
2. Markey C.M. The development of Acute Toxicity in mouse study. *Biol. Repro* 2001; 65:1215-1223.
3. Extension Toxicology Network. [Dose-response relationships in toxicology](#); 1993.p.32-35.
4. Stelijes M. E. Toxicology for non-toxicologists. Rockville, MD: Government Institutes; 2000.p.28-29.
5. EPA. U.S. Integrated Risk Information System. Glossary of IRIS terms, 1999. [Citado 23 Agosto 2009]. Disponible en: www.epa.gov/iris/gloss8.htm.
6. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline no. 425: Acute Oral Toxicity– Up-and-Down Method. Approved: June 1998. (Definitions for reference dose and threshold); 1998.p.6-8.
7. GTEMA. Boletines, 22-29 del grupo de trabajo especializado en métodos alternativos; 2004.p.1-3.
8. Gordon V.C. The scientific basis of the EYTEX system. *Alternatives to Laboratory Animals* 1999; 20:537-548.
9. Combs R.D. The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:151-165.
10. Axelrod D. [It's time to rethink dose](#): The case for combcancer and birth and developmental defects. *Environ. Health Persp* 2001; 109:246-249.
11. IPCS. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas, Chemical Safety, Fundamentals of Applied Toxicology, Módulo de formación núm. 1, Ginebra; 1992.p.3-5.
12. Leng G, Lewalter J. Role of individual susceptibility in risk assessment of pesticides. *Occup. Environ. Med* 1999; 56:449-453.
13. Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation* 2003; 20:3-61.
14. Curren R.D, Harbell J.W. Ocular safety: a silent (*in vitro*) success story. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:69-74.
15. Clemedson C, McFarlane-Abdulla E, Andersson M. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. *ATLA* 1999; 24:273-311.
16. Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles-the view of the validator. *Developmental Biology (Basel)* 2002;111:199-206.
17. Ariens E.J. Introduction to General Toxicology. Acute Toxicity. University of Washington USA; 2005.p.234-236.

18. Stewart C.H, Newton P. Expanded acute toxicity study in rats and dogs.mpi research proposal 2004; 128: 2-3.
19. Alemán C, Mesa R, Noa M, Rodeiro I, Menéndez R, Gamez R. Toxicología aguda del D-002 en dos especies no roedoras. Rev. CENIC Cien. Biol 2001; 32(1):51-55.
20. Schlede E, Mischke U, Diener W, Kayser D. The International Validation Study of the Acute Toxic Class Method (oral). Arch. Toxicol 1995; 69:659-670.
21. Auletta C. Acute Systemic Toxicity Testing. In: Product Safety Evaluation Handbook: Ed. Gad S.C.; Ed. Marcel Dekker, Inc. U.S; 1999.p.43-86.
22. Gámez R, Más R, Noa M, Menendez R. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. Toxicol Letters 2000; 118:31-41.
23. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Guideline no. 420: Acute oral toxicity class method, Paris; 2002.p.5-6.
24. Repetto M. Toxicología Fundamental. Toxicología Experimental. Toxicidad Aguda. Tercera Edición. Editado por ENPSES-MERCIE GROUP, España; 2002.p.295-298.

Recibido: 02/10/09

Aceptado: 03/10/09