

Carta al Editor

Toxicología Experimental

## Estrategia en las evaluaciones de toxicidad aguda por vía inhalatoria

---

**María Elena Cañizares Graupera, Yusleidys Cala Felipe y Zurya Sánchez Estrada**

Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Ave. Universidad entre ronda y G,  
Vedado, La Habana, Cuba

Correspondencia: [mari@fq.uh.cu](mailto:mari@fq.uh.cu)

## Resumen

Son muchos los compuestos químicos que llegan a diario a nuestro cuerpo por la vía inhalatoria, sin embargo son pocos los estudios toxicológicos que aparecen para evaluar esta vía de exposición. Con el objetivo de fomentar las evaluaciones que utilicen la vía inhalatoria para evaluar los efectos tóxicos de sustancias inhalables se hace un recuento de las exigencias, requisitos y restricciones fundamentales para la conducción de los ensayos *in vivo*. Las limitaciones fundamentales son el diseño del equipo que se utilice y la metodología analítica que se emplee para garantizar la dosis exacta.

**Palabras claves:** vía inhalatoria, aguda, requisitos

## Abstract

### Strategy on evaluations of acute toxicity by inhalation

There are a lot of chemical compound that arrive inside our body every day by inhalation way, but there are few toxicological studies in literature conducted in order to evaluate this way of exposition. With the main objective of encourage evaluations that uses inhalator way in order to study toxic effects of inhalator substances, fundamentals exigencies, requisites and restrictions for the conduction of test in vivo are recorder. Fundamental limitations are the design of the equipment for the conduction of test and the analytical methodology employed in order to guarantee the exact dose.

**Key Words** inhalator way, ague, requirements

## Introducción

Son múltiples los compuestos químicos que llegan a diario a nuestro organismo por la vía inhalatoria, entre ellos tenemos los perfumes, talcos, detergentes, que en ocasiones nos hacen estornudar incontrolablemente. Este puede ser un síntoma de alergia, enfermedad que crece cada año representada por los casos de asma. Sin embargo, en la literatura abundan muy poco ensayos para evaluar la toxicidad por la vía inhalatoria.

El hecho se debe a las dificultades materiales y técnicas para llevar a cabo esos ensayos, mayores que para las otras vías. Con el propósito de iniciar algunas propuestas para solucionar esa deficiencia se decidió abordar el tema por lo importante que pudiera ser para resolver y comprender muchas patologías asociadas a tóxicos inhalables.

El paso inicial para la evaluación de la toxicidad de materiales inhalables, tales como gases, líquidos volátiles, sólidos que subliman, aerosoles o materiales que diseminan partículas como los asbestos o el polen de las flores, es el diseño y la evaluación de las características toxicológicas en un ensayo agudo. Como cualquier otro ensayo agudo, los datos que se obtengan servirán como base para la clasificación de las nuevas sustancias y el etiquetado correcto. Es el paso inicial para establecer el régimen de dosis en estudios sub crónicos y en dependencia de la estrategia que se siga en la investigación, incluyendo ensayos clínicos específicos como las características hematológicas de los especímenes o la histología de los órganos fundamentales puede ofrecer información adicional del modo de acción tóxica de esa sustancia.

Se considera como toxicidad inhalatoria aguda al conjunto de efectos totales causados por una sustancia luego de una exposición única por inhalación durante un periodo corto de tiempo, menor a 24 horas. En este caso particular se expresa la dosis en términos de concentración de la sustancia de ensayo por el volumen de aire en la cámara, CL50 (mg/L). Esto se debe a que no es posible determinar la dosis exacta que inhalará cada animal en particular, que depende de la velocidad de respiración específica de cada uno de ellos, que no es la misma en igual período de tiempo.

El objetivo del presente trabajo es llamar la atención sobre las posibilidades reales de evaluar esta vía, tomando como base fundamental los requisitos de la normativa vigente de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD).

### **Desarrollo de los experimentos**

Para llevar a cabo los experimentos por vía inhalatoria se confeccionan varios grupos con los animales que se exponen durante un periodo de tiempo definido a una sustancia de ensayo a concentraciones conocidas graduales, una diferente para cada grupo, espaciadas entre sí, para disponer de un amplio intervalo de efectos tóxicos.

En ocasiones es apropiado usar un vehículo, o gas portador para facilitar que se genere una concentración apropiada de la sustancia en la atmósfera. En ese caso es necesario usar un grupo de animales controles para ese vehículo, que muy a menudo es aire comprimido. Luego se efectúa la observación de los efectos tóxicos y las muertes. Si estas ocurren durante el periodo de ensayo, los animales se someten a necrosis.

El periodo preparativo es igual al de cualquier otro ensayo toxicológico. Los animales jóvenes adultos sanos se aclimatan a las condiciones del vivario durante al menos 5 días previo al ensayo. Luego se asignan aleatoriamente a cada grupo. El animal preferido para estos ensayos es la rata. Esto se debe a que es el animal del que se dispone mayor información, aunque puede usarse otras especies de mamíferos, de las líneas comunes en los ensayos de laboratorios. En tal caso es importante tener en cuenta las dimensiones del animal y las de la cámara de inhalación que se disponga para cumplimentar con los requisitos restrictivos de la norma, que se darán más adelante.

### **Equipamiento**

El equipamiento es la mayor dificultad en la ejecución de los ensayos inhalatorios. Pueden conducirse ensayos estáticos que son los más sencillos. Esto significa que se dispondrá de una concentración única inicial, que es muy fácil de obtener cuando se conocen las dimensiones de la cámara y las características químico – físicas de la sustancia en estudio.

Esta concentración inicial irá decayendo en el tiempo por deposición dentro de las paredes de la cámara, por el consumo, o por salida al exterior.

Otro método de exposición más deseable es el modo dinámico. La concentración del gas contaminante se mantiene igual durante todo el período en que se desarrolle el experimento. Para ello, estos equipos deben estar diseñados de modo que permitan un flujo de aire dinámico, con un recambio del aire de 12 a 15 veces por hora y asegurando un contenido de oxígeno del 19 %. Como regla general para asegurar la estabilidad de la atmósfera de la cámara, el volumen total que ocupan los animales no debe exceder el 5 % del volumen de la cámara. Para efectuar los ensayos dinámicos es indispensable disponer de un método analítico que permita verificar la concentración del contaminante mientras dure el ensayo.

En la figura 1 se muestra un esquema del equipamiento necesario para conducir este tipo de ensayo.

El equipamiento está compuesto por un compresor de aire, al que se interpone una llave de tres vías que permite regular el flujo de entrada del aire según se necesite. Se interpone también un filtro que evite la entrada de aceite proveniente del compresor, y un flujómetro que mide continuamente el flujo al que se trabaja.

En el tubo borboteador se deposita la sustancia en estudio que entra a la cámara por la parte superior por un tubo que llega hasta el fondo de la cámara. La distribución del contaminante de abajo hacia arriba evitará turbulencias que disturben a los animales. La tubuladura lateral se conecta a un frasco colector con un líquido apropiado en su interior que sea capaz de recoger residuos de la sustancia contaminante, para evitar su salida a los locales de trabajo.

Pueden usarse diferentes tipos de cámaras. En el esquema se muestra una en que el animal se introduce totalmente en el ambiente contaminado. No es la más deseada porque tiene la desventaja de que el pelo de los animales queda contaminado con un compuesto tóxico, lo que debe tenerse en cuenta para conducir el experimento en los períodos de no exposición, aunque tiene la ventaja de que es representativa de los ambientes naturales de exposición.

Otra es la oro - nasal, que se prefiere porque se limita la exposición a la vía oral e inhalatoria. En estas cámaras cada animal está encerrado en un compartimiento independiente de la cámara en una disposición en que solo la región nasal de la cara queda ubicada en el orificio por donde circula el aire contaminado por el tubo central de la cámara, como se muestra en la figura 2.

El otro aspecto de gran importancia y dificultad para conducir los ensayos por la vía inhalatoria es disponer de un sistema de control analítico para medir la concentración del contaminante que sea apropiado. Esto significa que sea sensible, sencillo, económico y reproducible. Que sea capaz de brindar la información requerida en un corto período de tiempo para poderlo aplicar varias veces durante la conducción del ensayo. Entre los ensayos que se pueden usar están las técnicas de espectroscopia infrarroja, (IR), ultravioleta, colorimétricas en la zona visible, cromatografía gaseosa y otras. Las técnicas que consumen mucho tiempo, como aquellas que requieren la concentración previa del analito no deben usarse, ya que se requiere registrar esta información en cortos períodos de tiempo y varias veces. Toda técnica que se utilice debe ser previamente validada incluyendo los métodos que se utilicen para el muestreo, que debe ser muy exacto, para evitar las pérdidas que falseen los resultados.

Los puertos de las cámaras de inhalación por donde se extraigan las muestras deben estar bien resguardados, de modo que no cambie la concentración de equilibrio que se logró inicialmente en la cámara. Es apropiada la toma de muestras a través de tapones de goma que puedan pincharse para la extracción.

La velocidad de flujo de aire debe ser ajustada para asegurar que las condiciones dentro del equipo son siempre las mismas. Si se mantiene una ligera presión negativa dentro de la cámara, o fuera de ella, como puede ser el uso de una campana extractora, se puede evitar la pérdida de la sustancia de ensayo en el área circundante que provocaría la contaminación de los locales de trabajo, el riesgo a los operarios que conducen los ensayos y la contaminación de los animales controles que se inutilicen en el ensayo.

Las concentraciones usadas deben ser suficientes y usualmente son tres, separadas de modo que permita obtener un gradiente de efectos tóxicos y producir una curva de mortalidad

que permita determinar la  $CL_{50}$ . En el caso de sustancias de ensayo potencialmente explosivas, hay que verificar cuales concentraciones son permitidas para que no ocurra ningún accidente.

### **Ensayo limite, tiempo de exposición y período de observación**

Se considera el ensayo a 5 mg/L como el de máxima concentración respirable posible. En ocasiones no es posible efectuar ensayos a tan alta concentración debido a las características químicas, físicas y toxicológicas de la sustancia de ensayo. Cuando esto ocurra, se buscará la máxima concentración posible. El periodo de exposición se mide a partir de que se logre equilibrar la cámara a la concentración seleccionada para el contaminante. Esta concentración tiene que ser verificada previamente mediante la determinación analítica seleccionada para estimar la concentración del contaminante.

El periodo de observación debe ser de al menos 14 días. Sin embargo, la duración de las observaciones no se debe fijar con rigidez. Deben ser determinadas por las reacciones toxicas que se observen, la velocidad en que aparecen y el periodo de recobrado, y pudiera incluso extenderse si fuera necesario. Es muy importante registrar el tiempo al cual los signos de toxicidad o muertes aparecen.

### **Procedimiento para los ensayos**

Los animales se pesan antes de efectuar el experimento y el agua y los alimentos se retiran durante este procedimiento. Cada animal debe observarse a diario procurando efectuar la necropsia o refrigerar aquellos animales que fallezcan para que sean necropsados. Debe observarse los cambios en la piel, ojos, membranas mucosas, respiración, circulatorios, sistema autónomo central y actividad somato motora. Son importantes la aparición de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letárgica, sueño y coma. El peso de los animales debe registrarse semanalmente luego de la exposición y antes del sacrificio.

Deben registrarse los cambios macroscópicos fundamentalmente del tracto respiratorio o de otros órganos que se sospechen involucrados. Puede considerarse el examen microscópico si se espera obtener información útil. Los datos se recogen en tablas, que incluye <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

el número de animales utilizados, el tiempo de defunción de los animales y el nivel de exposición, descripción de los efectos tóxicos y los hallazgos de la necropsia.

Deben ofrecerse datos como la velocidad de flujo a través del equipo, temperatura y humedad, concentración nominal (se refiere a cantidad de sustancia dentro del equipo por volumen de aire). De los animales se debe dar la especie y línea, respuesta por sexo y por nivel de exposición.

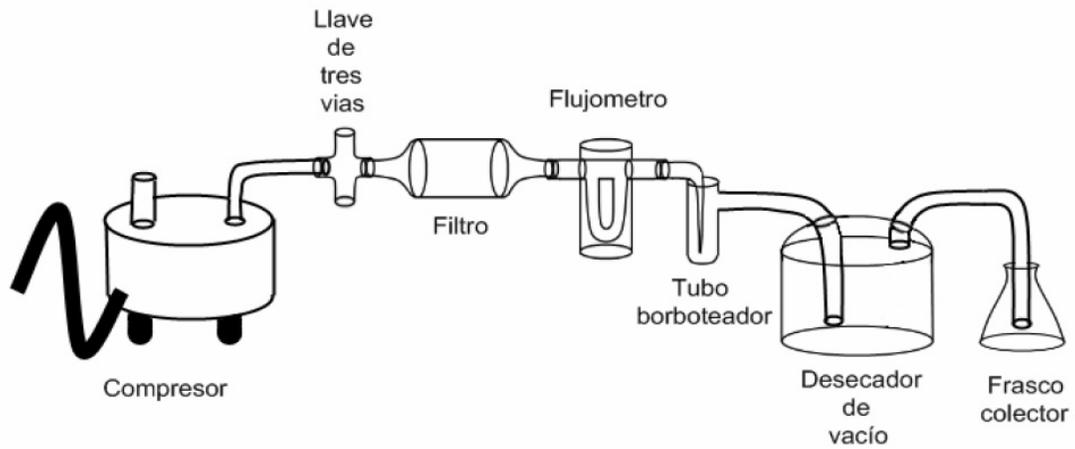
Otro ensayo relacionado es la evaluación del riesgo por la manipulación de sustancias volátiles o sustancias de ensayo sólidas que sublimen. Para ello se debe primero identificar la sustancia en cuestión así como determinar su grado de pureza, conocer su presión de vapor y su temperatura de ebullición, así como su posibilidad de explosión.

El riesgo de manipular sustancias volátiles no solo depende de su toxicidad, sino también de su volatilidad. Para caracterizar el riesgo, no es suficiente realizar la  $CL_{50}$ , sino considerándolo junto a la volatilidad de la sustancia. Esto significa que es igualmente riesgoso manipular sustancias muy volátiles de baja toxicidad, por su poder asfixiante, que sustancias menos volátiles de elevada toxicidad, debido a su letalidad.

## **Conclusiones**

La vía inhalatoria ofrece información valiosa en las enfermedades de las vías respiratorias, muchas de origen tóxico. A pesar de las dificultades reales que represente la evaluación de esa vía para evaluar los tóxicos ambientales, no son inalcanzables y pueden ponerse a punto.

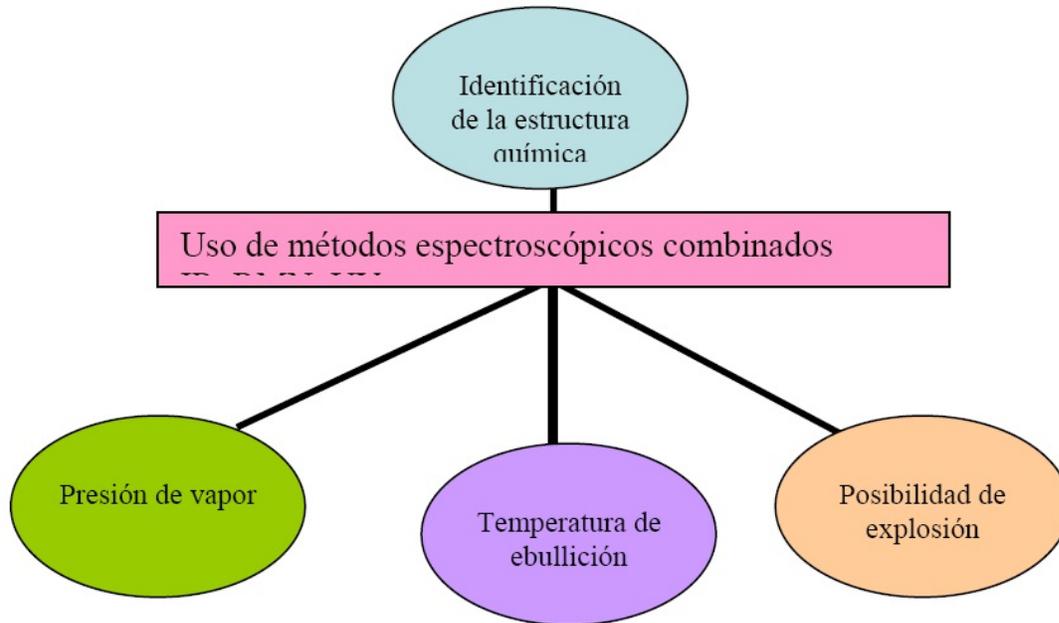
**Figura 1. Equipamiento para conducir ensayos inhalatorios**



**Figura 2. Ejemplo de una cámara de inhalación oro –nasal**



Figura 3 Datos químicos que deben conocerse para conducir la evaluación de riesgo



## **Bibliografía**

1. OECD 403 Guideline for testing of chemicals, "Acute Inhalation Toxicity" 1981
2. Donal E. Garner and Gerald L. Kennedy. Methodologies and Technology for Animal Inhalation Toxicology Studies. Toxicology of the lung, 2<sup>nd</sup>. Ed. Edited by Gandar. Raven Press, New York, 1993.
3. Hayes, A. W. Principles and methods of toxicology. 3ra ed. New York Raven Press, 1994.  
Presión de vapor Posibilidad de explosión Identificación de la estructura química  
Temperatura de ebullición Uso de métodos espectroscópicos combinados IRRMNUV
4. Ibarra, E. (2000) "Química Sanitaria Ocupacional", Ministerio de Salud Pública de Cuba Edición 01, Quito, Ecuador.
5. República de Cuba, NC 19 – 01 – 60, (1987). Requisitos generales. Determinación y evaluación de las concentraciones de las sustancias nocivas. Aire en la zona de trabajo. Sistema de normas de protección e higiene del trabajo.

**Recibido: 17/06/10**

**Aceptado: 23/06/10**