

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación de la toxicidad aguda mediante el Test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases (CTA) de un preparado de sulfato de cobre.

Dr. MV. Yusnel Martínez Bernal¹, Dra. María Esther Tejera Aguilar², Lic. Raylen Escobar Román³, Dra. Yanicel Sori León⁴

1. Dr. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Santa Clara, Villa Clara. Profesor Instructor y Aspirante a investigador. E-mail: yusnelmb@ucm.vcl.sld.cu
2. Ms. Toxicología Clínica. Especialista en Primer Grado en Medicina General Integral. Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Santa Clara, Villa Clara. Profesor asistente e Investigador Agregado. E-mail: mariata@ucm.vcl.sld.cu
3. Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Profesor asistente e Investigador Agregado. E-mail: raylener@ucm.ssp.sld.cu
4. Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Policlínico Centro. Sancti Spíritus. Profesor Instructor. e-mail. dra_yanicelsorileon@yahoo.es

Resumen

Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico de una solución acuosa de sulfato de cobre. Para el desarrollo del mismo se utilizó el Método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA), variando las dosis según lo establecido por las técnicas. Los animales seleccionados fueron ratas de la línea *Sprague Dawley*, con un peso corporal comprendido entre 180 y 220g. Los resultados demostraron la toxicidad del preparado al observarse signos y síntomas de toxicidad. El peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento de la especie y se apreciaron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados, todo lo que permite afirmar que la DL50 se ubica entre 5 y 50 mg/kg PV, considerando el producto como muy tóxico.

Palabras Claves: Cobre, CTA, método de las clases, toxicidad aguda, sulfato de cobre.

Abstract

Evaluation of acute toxicity of a cooper's sulphate preparation by the classe's method (CTA).

An experimental study was performed to assess the possible toxic effect of a cooper's sulphate preparation. For the success of this study, the CTA (Method's classes of the acute toxicity) was used. A change in a dose was necessary, of course, taking into account the provisions of the techniques. Targeted animals were Sprague Dawley Rats, their body weight ranging from 180g and 220g. The results showed the toxicity of the cooper's sulphate preparation since some signs and symptoms of its toxicity were observed. Body weight was consistent with the growth curve of such kind of rats. Macroscopic abnormalities were found in the organs studied which allow us to assert that DL50 is located between 5 and 50mg/kgPV. This result is a clear indication of the preparation toxicity.

Key Word: Acute toxicity, classe's method, cooper, cooper's sulphate, CTA.

Introducción

El cobre es un mineral que desempeña funciones importantes, asociadas directamente con la salud y producción de los rumiantes¹ la deficiencia del mismo en el ganado, ha sido reportada en casi todas las regiones del mundo, siendo uno de los minerales críticos para los rumiantes en pastoreo,² en tal sentido algunos autores plantean que el retardo en la aparición de la pubertad, el retardo en la involución del útero, abortos, anestros, retenciones placentarias y repeticiones de servicios, entre otros síntomas en el ganado bovino, se deben a la hipocupremia,³⁻⁵ por lo que no es de extrañar que en el mundo se elaboren productos para contrarrestar estas deficiencias.

Teniendo en cuenta que la caracterización farmacológica de un producto a nivel preclínico no está completa si no se ha examinado exhaustivamente sus posibles reacciones tóxicas, el primer paso en la estimación del potencial tóxico de una sustancia es la evaluación de la toxicidad aguda, referida como el estudio cualicuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.⁶

La aplicación de los métodos alternativos en el campo de la toxicología es reciente y coincide con la oposición social al uso indiscriminado de animales de experimentación, así como la necesidad que tenía esta ciencia de dar un paso de avance en la evaluación del riesgo de toxicidad. Corrientes Regulatorias Medioambientales han considerado por razones éticas y económicas el uso racional y humano de los animales de experimentación, contribuyendo a la adopción internacional de criterios regulatorios en la validación y análisis de métodos alternativos científicamente seguros, menos costosos, rápidos y extrapolables que favorezcan la implantación de las 3R propuestas por Rusell y Burch(1959) referidas a Reducir (disminución), Refinar (perfeccionamiento) y Reemplazar (sustitución) el uso animal, unido a una 4R de Responsabilidad por parte de los investigadores.⁷

El test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases fue adoptado en la Guía # 423 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) como

alternativa a la prueba clásica aguda.⁸ El método se basa en evaluaciones biométricas con dosis fijas separadas adecuadamente para permitir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado y utiliza 90% menos de animales que la determinación de la toxicidad aguda y la DL50.⁹

El objetivo de este trabajo, es evaluar el potencial tóxico de un preparado de sulfato de cobre, tras su administración por vía SC y clasificar el mismo de acuerdo a la metodología internacional establecida para este modelo.

Materiales y Métodos

Se emplearon ratas Sprague Dawley, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), de rango de peso comprendido entre 180 y 220 gramos, adultas, jóvenes y de ambos sexos, las que fueron mantenidas en las siguientes condiciones ambientales: temperatura: 22 ± 2 °C, humedad relativa: 40-70%, ciclo luz-oscuridad: 12 / 12 horas, intensidad luminosa: 200-250 Lux. Recibieron como alimento la dieta peletizada estipulada para la especie, con el correspondiente certificado de calidad. Consumieron agua de la pila apta para consumo humano. Se permitió libre acceso tanto al agua como a los alimentos.¹⁰ Se utilizaron 6 animales distribuidos por sexo en 2 grupos de 3 animales cada uno, para la evaluación de cada dosis del preparado. Se alojaron en cajas de policarbonato, modelo T-3 de fondo de rejilla.

La sustancia de ensayo fue elaborada en el centro de investigaciones agropecuarias (CIAP) según los procedimientos establecidos para dicha elaboración. Se elaboró una solución acuosa de cobre que estuvo compuesta por agua destilada y Sulfato de Cobre a razón de 2:1.

Se retiró el alimento a los animales la tarde anterior (16-18 horas). La sustancia fue administrada por vía subcutánea, en dosis única mediante aguja hipodérmica comenzando por la dosis de 50 mg/Kg de peso vivo, teniendo en cuenta reportes de toxicidad de productos de cobre,^{11, 12} al ocurrir muerte en el grupo de machos, se

administró una dosis menor de 5 mg/kg de peso vivo. Siempre se comenzó por las hembras y posteriormente, de acuerdo a la mortalidad se dosificaron los machos. Los animales fueron observados de manera sistemática durante los primeros 30 min, periódicamente durante las primeras 24 h, con especial atención durante las primeras 4 h y diariamente hasta los 14 días del experimento. Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte, tiempo de ocurrencia de la muerte, signos y síntomas de toxicidad además de su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, también, en el sistema respiratorio, circulatorio, sistema nervioso central y autónomo y en la actividad somatomotora y conducta, se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de tremor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.

El peso corporal fue controlado los días 1, 7 y 14 del experimento. Se procedió al sacrificio de los animales el día 14 postadministración, previamente se efectuó una rigurosa inspección clínica de los animales (piel, mucosas, masas palpables y sistema osteomioarticular) y posteriormente se efectuaron estudios anatomopatológicos macroscópicos. Finalmente se procedió a la evaluación de los resultados experimentales del producto en estudio y su clasificación atendiendo a la siguiente escala:

CTA 0: Mortalidad > 2000 mg/Kg No clasificable

CTA 1: Rango de mortalidad 250mg/Kg < 2000 mg/Kg Peligrosa

CTA 2: Rango de mortalidad > 25 < 250 mg/Kg Tóxica

CTA 3. Rango de mortalidad < 25 mg/Kg Muy Tóxica

La Técnica fue realizada de acuerdo con la metodología establecida por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) # 423 (Fig.1)

Resultados y discusión

Actualmente según Kennedy y colaboradores,¹³ se plantea que a efectos regulatorios no es necesario definir con un valor puntual la DL50 de un compuesto, que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un rango, en este caso se utilizó una dosis límite de 50 mg/kg de peso vivo no habiéndose observado mortalidad, pero si síntomas indicativos de toxicidad en el grupo de las hembras, como son estiramiento de las extremidades posteriores, ligera depresión respiratoria, lesión de tipo granulomatosa en el sitio de administración, estos síntomas se agravaban según transcurría el tiempo pero no hubo muerte, por lo que se le realizó la administración a los machos donde hubo un 100% de muertes a los tres días (Tabla 1), por este motivo y siguiendo lo que esta regulado por la OECD,⁸ se procedió a la disminución de la dosis en este caso a 5mg/kg. PV, no ocurriendo muerte en ninguno de los dos grupos pero si existieron síntomas de toxicidad como ligera depresión respiratoria, excitación (Tabla 2), lo que coincide con lo planteado por Costas y colaboradores.¹⁴

Por tanto se llega a la conclusión que la DL50 del preparado de cobre estudiado por vía subcutánea se encuentra entre 5 y 50mg/kg de peso vivo, la cual es mayor que la vía intramuscular que es de 1 a 2 mg/kg de peso vivo, a pesar de que el peso corporal, como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea en estudio.

Respecto al estudio anatomopatológico macroscópico, se observó una congestión generalizada fundamentalmente hepática y vascular, concordando con lo planteado por Goldfrank y Klassen,^{11,12} además se evidenció irritación en el sitio de absorción, el producto por sus características se considera como muy tóxico por vía subcutánea.

Conclusiones

El preparado de cobre estudiado es considerado como muy tóxico, encontrándose la DL50 de la sustancia estudiada en un rango entre 5 y 50 mg/kg. de peso vivo.

Tabla 1. Estudio de toxicidad aguda por el método de las Clases a dosis de 50mg/Kg. n=6

Grupos	# Animales	Sexo	Síntomas presentados	Mortalidad
Grupo I	3	H	-Estiramiento de las extremidades posteriores. -Ligera depresión respiratoria. -Lesión de tipo granulomatosa. -Irritación en el sitio de absorción.	0%
Grupo II	3	M	-Estiramiento de las extremidades posteriores. -Ligera depresión respiratoria. -Lesión de tipo granulomatosa. -Irritación en el sitio de absorción.	100%

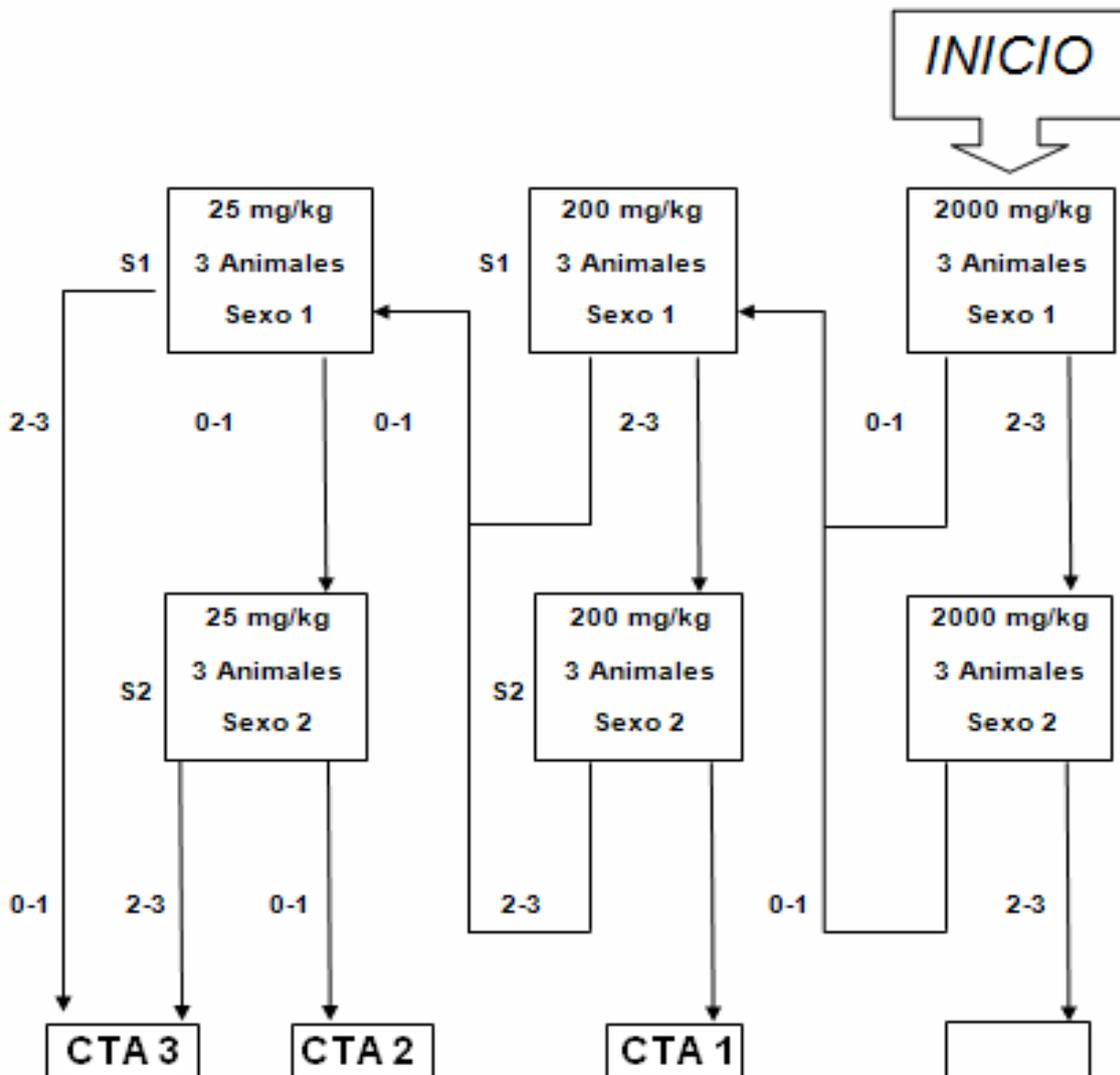
Leyenda:
H: hembras, M: machos

Tabla 2. Estudio de toxicidad aguda por el método de las Clases a dosis de 5mg/Kg. n=6.

Grupos	# Animales	Sexo	Síntomas presentados	Mortalidad
Grupo I	3	H	-Ligera depresión respiratoria. -Excitación. -Irritación en el sitio de absorción.	0%
Grupo II	3	M	-Ligera depresión respiratoria. -Excitación. -Irritación en el sitio de absorción.	0%

Leyenda:
H: hembras, M: machos

Fig. 1. Técnica realizada



LEYENDA:

S1, S2: Número de pasos.

0,1,2,3: Número de animales moribundos o muertos.

CTA: Clase de Toxicidad Aguda.

Bibliografía

- 1.** Huerta BM. Nutrición de rumiantes en pastoreo. Memorias del curso Alternativas de Manejo en Bovinos para Carne en Pastoreo. Chapingo, México. 1997.
- 2.** Huerta BM. Respuesta a la corrección de deficiencias minerales sobre el comportamiento del animal. Memorias II seminario internacional Estrategias de Suplementación a bovinos. Chapingo, México. 1999.
- 3.** Pedroso R. Conferencia sobre reproducción de la hembra bovina. XVIII PANVET. Palacio de Las Convenciones La Habana, Cuba. 2002.
- 4.** Corah, L. Trace mineral requirements of grazing cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 59: 61-70. 1996.
- 5.** García JR et al. Efecto del cobre sobre la reproducción en novillas lecheras de CUBA. Rev.MVZ Cordoba; 2006. 11(2).
- 6.** Dipascuale L, Wallace H. Acute toxicity and eye irritancy. En: Principles and methods of toxicology. 4 Ed. Philadelphia: Taylor and Francis: 2001; 853-917.
- 7.** Stokes WS, Schechtman L.M, Hill RN. The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Altern Lab Anim; 2002. Dec 30 Suppl 2. 23-32.
- 8.** OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. No. 423. Revised Draft Guideline October. 2000. Disponible en: URL:<http://www.oecd.org>. Consultado Junio 2013.
- 9.** Diener W, Siccha L, Mischke U. The biometric evaluation of the acute-toxic class method (oral). Arch Toxicol; 1994. 68:599-610.
- 10.** Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCAC). Manual sobre cuidado y uso de los animales de experimentación. In: Stol L, editor. Ontario: CCAC. 1998. Disponible en: [URL:http://www.ccac.ca](http://www.ccac.ca). Consultado junio 2013.
- 11.** Goldfrank L, Flomenbaum N, Lewin N. Toxicologic Emergencies. 7th Ed, 82: 2002.

- 12.** Klaassen C. CassareTT and Doull´s Toxicology: The basic science of poisons. 6th Ed, 23: 2001.811- 869.
- 13.** Kenedy, GL; Jr Ferenz, R and Burgess, BA. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. J. Appl. Toxicol; 2000.12: 267-270.
- 14.** Costa EF, Fazzio LE, Traveria GE, Sánchez RO, Alvarado Pinedo MF, Mattioli, GA, *et al.* Causas de mortandad y abortos en bovinos - Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la Provincia de Buenos Aires. Revista de Medicina Veterinaria. 2004.

Recibido: 14/10/13

Aceptado: 15/11/13