



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) intraperitoneal de Hematoxilina  
en ratones de laboratorio.

Trabajo de Investigación previo a la obtención del el Título de  
Médico Veterinario Zootecnista

**Autor:** Tapia Pozo Roger Leonardo

**Tutor:** Dr. Javier Vargas Estrella, MSc.

Quito, 2019

## © DERECHOS DEL AUTOR

Yo, ROGER LEONARDO TAPIA POZO en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) intraperitoneal de Hematoxilina en ratones de laboratorio” modalidad presencial, de conformidad con el Art.114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Central del Ecuador una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Central del Ecuador para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Roger Leonardo Tapia Pozo

CC. 1721000576

rltapia@uce.edu.ec

roger\_leonart@hotmail.com

## **INFORME DEL TUTOR**

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado, presentado por el señor ROGER LEONARDO TAPIA POZO, para optar por el Título o Grado de Médico Veterinario y Zootecnista, cuyo título es “Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) intraperitoneal de Hematoxilina en ratones de laboratorio”. Considero que dicho trabajo, reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del tribunal examinador que se designe.

En la ciudad de Quito, a 03 días del mes de marzo de 2019.

---

Dr. Javier Vargas Estrella, MSc.

C.I.: 050159984-9

e-mail: [jvargas@uce.edu.ec](mailto:jvargas@uce.edu.ec)

## APROBACIÓN DEL INFORME FINAL/TRIBUNAL

El Tribunal constituido por:

Presidente: Dra. Martha Naranjo.

Lector 1: Dra. Martha Naranjo.

Lector 2: Dr. Lenin Ron.

Luego de Calificar el Informe Final de Investigación del trabajo de titulación denominado "Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) intraperitoneal de Hematoxilina en ratones de laboratorio" previo a la obtención del título o grado de Médico Veterinario y Zootecnista, presentado por el señor Roger Leonardo Tapia Pozo.

Emite el siguiente veredicto: (aprobado/reprobado) / ordena que se hagan las siguientes correcciones: .....

En la ciudad de Quito, a 02 días del mes de julio de 2019.

Para constancia de lo actuado firman:

	Nombre Apellido	Calificación	Firma
Presidente / Lector 1	_____	_____	_____
Lector 2	_____	_____	_____

## DEDICATORIA

A mi madre, Mercedes Pozo quien me enseñó a que en la vida todo se obtiene con esfuerzo.

A mi padre, Leonardo Tapia por dejarme ver que el mundo es pequeño y que puedo cruzarlo.

A mis hermanas Estefy y Miriam que me ayudaron a salir adelante y por todo el apoyo que me han brindado hasta ahora.

A mi sobrina Laila por dejarme ver esa gran sonrisa todos los días.

A mis amigos Raúl, Majo, Santi, Angie, Karla y Ronnie por estar en la buenas y las malas, por disfrutar juntos de este tiempo y por el que vendrá.

A mis amigos Abel, Omar, Jess, Mayerli, Cata, Dianita, Aleja, Tefa, Yuly, Vivi porque han sido un gran apoyo desde que nos conocimos.

Al Doctor Lance Evans, por darme su confianza y su apoyo, sobre todo por confiar en mí.

Al Doctor Javier Vargas, por compartir sus conocimientos y guía, por su apoyo incondicional y su dedicación

Dedicado a la memoria de Maximus Corazón de León

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Lance Evans por todo el apoyo brindado al estudio, por su guía profesional y por su apoyo moral, por haber brindado todas sus energías y ayuda en todo sentido a pesar de las adversidades, sin su participación no se habría logrado esta investigación.

Al Doctor Javier Vargas por su tiempo y dedicación para darme la guía necesaria para llevar a cabo el proyecto de investigación.

Al Centro de Biología, por su guía y colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Química, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A las Autoridades y Docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
© <b>DERECHOS DEL AUTOR</b> .....	<i>i</i>
<b>INFORME DEL TUTOR</b> .....	<i>ii</i>
<b>APROBACIÓN DEL INFORME FINAL/TRIBUNAL</b> .....	<i>iii</i>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<i>iv</i>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<i>v</i>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<i>viii</i>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<i>ix</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>x</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xi</i>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
1.1.2.    Objetivo General:.....	3
1.1.3.    Objetivos Específicos.....	3
<b>1.2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
1.2.1.    H0.....	3
1.2.2.    H1.....	3
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1.    Antecedentes.....	4
2.1.1.    Análisis Toxicológicos.....	5
2.1.2.    Toxicidad Aguda.....	5
2.1.3.    Clasificación de Toxicidad Aguda.....	5
2.1.4.    Importancia.....	7
2.1.5.    Objetivos de los Estudios de Toxicidad.....	7
2.1.6.    Organismos de Control.....	7
2.1.7.    Estudios Para Clasificación de Toxicidad Aguda.....	8
2.1.8.    Dosis Letal 50.....	8
2.1.9.    OCDE.....	8
2.2.    Hematoxilina.....	10
2.2.1.    Taxonomía.....	10
2.2.2.    Estructura Química.....	11
2.2.3.    Aplicaciones.....	11
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>13</b>

<b>MATERIALES Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIALES .....</b>	<b>13</b>
3.1.1. Materiales de Laboratorio-Bioterio:.....	13
3.1.2. Materiales de Muestreo:.....	13
3.1.3. Material Biológico:.....	13
3.1.4. Material de Estudio: .....	13
<b>3.2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>14</b>
3.2.1. Zona de Estudio .....	14
3.2.2. Recolección de Información.....	14
3.2.3. Factores en Estudio .....	14
3.2.4. Tipo de Investigación .....	14
3.2.5. Características de las Unidades Experimentales .....	15
3.2.6. Manejo del Lugar de Experimentación .....	16
3.2.7. Manejo de los Animales de Experimentación .....	17
3.2.8. Fase Experimental .....	18
3.2.9. Necropsias .....	20
<b>3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Sintomatología de Toxicidad de Hematoxilina en ratones.....	21
4.1.2. Mortalidad Post Inoculación .....	22
4.1.3. Necropsias .....	23
4.1.4. Valor de la Dosis Letal 50 .....	25
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>29</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>34</b>
Anexo 1. Certificado de Análisis de Hematoxilina Cryst. ....	34
Anexo 2. Alimento Balanceado .....	35
Anexo 3. Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador para la prueba 425 de la OCDE.....	36
Anexo 4. Registros de peso, signos, síntomas, mortalidad y necropsias.....	40
Anexo 5. Desarrollo de la fase experimental .....	42
Anexo 6. Certificado del Comité de Ética de la Universidad Central del Ecuador. ..	47
Anexo 7. Cuadro de Pesos Promedios $\bar{x}$ (g) de ratones administrados con hematoxilina vía intraperitoneal. ....	48

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos de Estudios de Dosis Letal 50 Aprobados por la OCDE .....	9
Cuadro 2. Rangos de Toxicidad.....	10
Cuadro 3. Grupo de Dosis para la Determinación DL50 Intraperitoneal. .	15
Cuadro 4. Información Sobre la Sustancia a Evaluar. ....	18
Cuadro 5. Cuadro de Dosis de Hematoxilina a Administrar a los Ratones. ....	19
Cuadro 6. Síntomas de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal. ....	21
Cuadro 7. Mortalidad de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal. ....	22
Cuadro 8. Comparación de Pesos Promedios $\bar{x}$ (g), con Parámetros de los Laboratorios Charles River, en órganos de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal. ....	24

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Gráfico de porcentajes de biodisponibilidad en sangre en función del tiempo de diferentes rutas de exposición.....	6
Figura 2. Fórmula estructural de Hematoxilina. ....	11
Figura 3. Curva de mortalidad Método Probit .....	25
Figura 4. Curva de mortalidad Método Logit.....	26

**TEMA:** DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50) INTRAPERITONEAL DE HEMATOXILINA EN RATONES DE LABORATORIO.

**Autor:** Roger Leonardo Tapia Pozo

**Tutor:** Dr. Javier Vargas, MSc.

**Fecha:** julio, 2019

## RESUMEN

La hematoxilina es un colorante natural, usado como parte de las tinciones histológicas para tejidos celulares. La presente investigación se llevó a cabo para evaluar la seguridad de uso de hematoxilina (*Haematoxylum campechianum*) generando información sobre su grado de toxicidad, mediante el método 425 de arriba y abajo, descritos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Para la determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) se administró en 70 ratones de laboratorio (BALB/c) por vía intraperitoneal, la solución de hematoxilina/DMSO con dosis de 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1100, 2000 mg/kg. Los efectos adversos del comportamiento, mortalidad y necropsias se determinaron hasta el día 15 post inoculación. Observando que estos aumentaron según se incrementó los rangos de dosis. Determinándose así una DL50 de 1257.16 mg/kg de hematoxilina (95% SE:  $\pm 159,10$  mg/kg). En base a su DL50, la hematoxilina no parece tener una toxicidad significativa clasificándose en el rango III y categorizándose como una sustancia nociva según la OCDE.

**Palabras clave:** HEMATOXILINA / DL50 INTRAPERITONEAL / TOXICIDAD / RATONES.

**TITLE:** DETERMINATION OF THE LETHAL DOSE 50 (LD50) INTRAPERITONEAL HEMATOXYLIN IN LABORATORY MICE.

**Author:** Roger Leonardo Tapia Pozo

**Tutor:** Dr. Javier Vargas, MSc.

**Date:** July, 2019

### **ABSTRACT**

Hematoxylin is a natural dye, used as part of histological stains for cellular tissues. The present investigation was carried out to evaluate the safety of using haematoxylin (*Haematoxylum campechianum*), by generating information on its degree of toxicity, using method 425 above and below, described by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). In order to determinate the Lethal Dose 50 (LD50), hematoxylin / DMSO solution was administered in 70 laboratory mice (BALB / c) using the intraperitoneal technique with doses of 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1100, 2000 mg / kg. The adverse effects including behavior, mortality and necropsies were determined until the 15th day post inoculation. Administered doses did affect proportionally established parameters. Considering these results it was determined as LD50 a quantity of 1257.16 mg / kg of hematoxylin (95% SE:  $\pm 159.10$  mg / kg). According to the study, hematoxylin does not seem to have a significant toxicity, so it is established in the range III and considered itself as a harmful substance according to the OECD.

Key words: HEMATOXYLIN / DL50 INTRAPERITONEALLY / TOXICITY / MICE.

I CERTIFY that the above and foregoing is a true and correct translation of the original document in Spanish.

Firma:

Certified Translator:

ID:

## CAPÍTULO I

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La categorización de seguridad de una sustancia para su uso y manejo seguro, depende del grado de toxicidad o nocividad que esta tenga; para lo cual se somete esta sustancia a una serie de pruebas y análisis, con el fin de observar si producen efectos agudos, subagudos y crónicos después de una o varias administraciones.

Generalmente los primeros estudios que se realizaron para la determinación de la toxicidad de una sustancia, se basaron, en encontrar si produce efectos agudos. Mediante el cual buscaron la mortalidad del 50% de los animales de experimentación después de una única inoculación en un tiempo determinado de máximo 24 horas, también llamada Dosis Letal 50 (DL50).

Según, la Toxicology, Environmental Health, and Chemical Databases (TOXNET). Las DL50 para las tinciones de uso común en los laboratorios como el Azul de Evans es de 340 mg/kg, Eosina 500 mg/kg y la Safranina 7060 mg/kg. Sin embargo, la hematoxilina no presentaba información científica publicada que establezca una DL50 administrada por cualquier tipo de vía en animales de laboratorio.

La hematoxilina es una sustancia de origen natural, obtenida del extracto de la planta leguminosa *Haematoxylum campechianum*, forma parte de las principales tinciones que se usan en los laboratorios para diagnóstico de laboratorio, como la tinción hematoxilina- eosina (H & E) y prueba de Papanicolaou, es de importancia mundial debido a que ayuda al reconocimiento de varios tipos de tejidos y los cambios morfológicos, que forman parte de diagnóstico de cáncer.

El presente trabajo estuvo orientado a generar información sobre el grado de toxicidad de la hematoxilina mediante la determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) por vía intraperitoneal, en base a los protocolos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento) de la Facultad de Ciencias Químicas para el método 425 de arriba y abajo, con el fin de establecer la seguridad de uso para los seres vivos, además de generar rangos de dosis para nuevos estudios que determinen los efectos de esta sustancia en el organismo.

### **1.1.1. OBJETIVOS**

#### **1.1.2. Objetivo General:**

Determinar la Dosis Letal 50 intraperitoneal aguda de Hematoxilina en ratones de laboratorio.

#### **1.1.3. Objetivos Específicos**

1. Determinar el estudio de la Dosis Letal 50 intraperitoneal de hematoxilina en ratones de laboratorio, utilizando el protocolo de OCDE y POES del método 425 de arriba y abajo.
2. Categorizar la dosis DL50 de hematoxilina mediante el método 425 de la OCDE.

### **1.2. HIPÓTESIS**

#### **1.2.1. H0**

La hematoxilina no es considerada como sustancia nociva, según la Dosis Letal 50.

#### **1.2.2. H1**

La hematoxilina es considerada como sustancia nociva, según la Dosis Letal 50.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Antecedentes

Los modelos para la aplicación de Dosis Letal 50 se basan en establecer guías para el manejo, la aplicación, la dosis y el uso ético de animales, es así como Carpenter (2008), adaptó los métodos establecidos por U.S. EPA Health Effect Test Guidelines OPPTS 870.1100 (2002) y OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4 (Part 425) (2001) para la determinación de la Dosis Letal 50 oral en ratas para el compuesto 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(heptafluoropropoxy) Ácido propanoico en Delaware Estados Unidos.

En Colombia el estudio realizado por Múnera (2000) determinó la dosis letal 50 (DL50) del Lorazepam en ratones (*Mus musculus*) albinos, por vía intraperitoneal, estableciendo una DL50 estimada de 90.71 mg/kg, con intervalo de confianza del 95% entre 65,02 y 150,13 mg/kg registrando el doble de dosis de lo que se ha reportado en otros estudios.

En el Ecuador se han realizado dos ensayos para la evaluación de la toxicidad de sustancias, mediante el método de Dosis Letal 50:

Bravo (2017), realizó una “EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA AGUDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS DE *Passiflora manicata* Y *Passiflora tripartita* SOBRE *Rattus norvegicus* POR VÍA ORAL” donde administró dos dosis: un alta (2000 mg/kg) y una baja (300 mg/kg) para identificar la toxicidad de la planta en estudio, la cual se administró empleando una cánula intragástrica, estableciendo que los extractos no son tóxicos.

Cacarin (2018), realizó el tema “PROPUESTA DE IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS TOXICOLÓGICAS AGUDAS PARA PRODUCTOS NATURALES ORALES EN EL LABORATORIO DE OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS (OSP) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR” en el cual elaboró procedimientos operativos estándar (POES) para los métodos toxicológicos 420, 423 y 425 establecidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OCDE y aplicó estos mismos métodos para la determinación de la DL50 oral para jarabe el COLESTERMAC en ratones hembras de la especie *Mus musculus*, en la ciudad de Quito.

### **2.1.1. Análisis Toxicológicos**

Los análisis toxicológicos, son aquellos que se encargan de determinar el grado de toxicidad de una sustancia en corto, mediano y largo plazo (OCDE, 2008).

Para lo cual se establecen una serie de pruebas realizadas por métodos in vivo o in vitro, generando así medidas de seguridad para dicha sustancia y garantizar si puede ser o no ser considerada como una sustancia inocua para los seres vivos (Arrebola et al., 2003; INEN, 1996; F. A. M. Múnera et al., 2000).

### **2.1.2. Toxicidad Aguda**

Es aquella que estudia los efectos adversos de las sustancias administradas por una única dosis en un intervalo máximo de 24 horas, seguido de un período de observación de 14 días (EPA, 2002a).

Para la realización de estos estudios se utilizan modelos o grupos de animales de experimentación conformados preferiblemente por ratas o ratones de laboratorio (EPA, 2002; ONU, 2015; Wang et al., 2018).

### **2.1.3. Clasificación de Toxicidad Aguda**

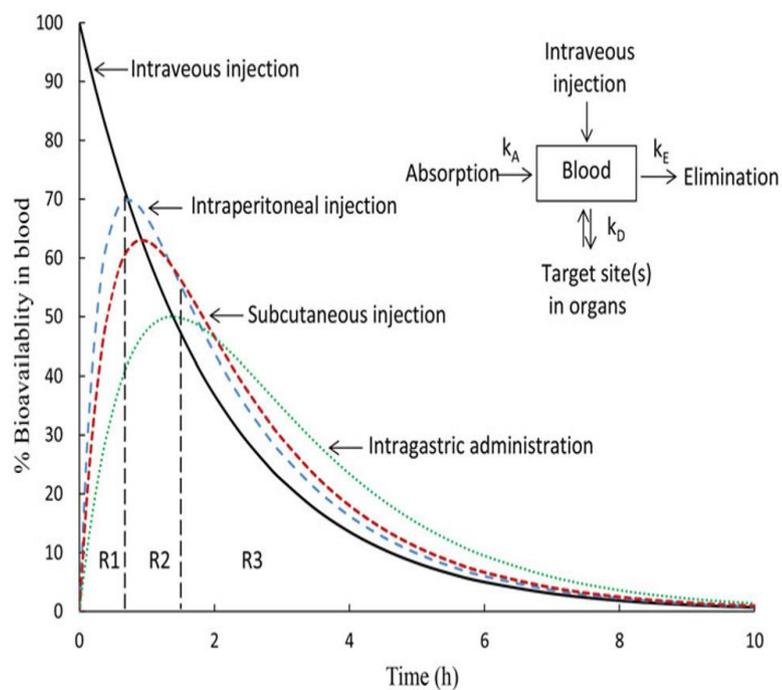
Se clasifica mediante los efectos producidos por la vía de inoculación por la cual ingresan al organismo en:

- Toxicidad Oral
  
- Toxicidad Dérmica
  
- Toxicidad por Inhalación
  
- Toxicidad Parenteral (i.v, i.m, i.p)

La concentración química de la sustancia en un lugar específico del organismo, dependerá de la ruta de administración, generando tasas de distribución y absorción, que producen diferentes tipos de toxicidad (Ning et al., 2015; Wang et al., 2018).

La vía parenteral, es la que genera una mayor velocidad en la aparición de los efectos, debido al contacto más rápido con el torrente sanguíneo. La toxicidad oral generalmente presenta inconvenientes en la absorción de las sustancias porque depende del metabolismo gastrointestinal a la que es expuesta generando efectos tóxicos bajos (ONU, 2015; Wang et al., 2015). Por lo tanto la vía de exposición tiene un profundo impacto en la cuantificación de la toxicidad. Ver Figura 1. (Wang et al., 2018).

Figura 1 Gráfico de porcentajes de biodisponibilidad en sangre en función del tiempo de diferentes rutas de exposición.



Fuente: The impact of exposure route for class-based compounds: a comparative approach of lethal toxicity data in rodent models (Wang et al., 2018).

Además, se debe tomar en cuenta las propiedades hidrofóbicas, polares y volumen molecular de las sustancias porque éstas interactúan significativamente en las tasas de concentración y absorción, provocando diferentes niveles de toxicidad según las rutas de administración (Wang et al., 2018).

#### **2.1.4. Importancia**

Una vez establecidos los estudios para la toxicidad aguda de una sustancia, se procede con la categorización de la misma, de esta forma se genera información sobre los efectos tóxicos o nocivos que puede producir esta sustancia al ingresar al organismo (Bravo, 2017; INEN, 1996; ONU, 2015).

Se establece su importancia en tres niveles:

- A nivel académico, generan protocolos de modelos experimentales, para conocer el comportamiento de la sustancia en el organismo (Arrebola et al., 2003; Gissi, Louekari, Hoffstadt, Bornatowicz, & Aparicio, 2017; ONU, 2015).
- A nivel de Regulación, ayuda a establecer rangos de toxicidad para ser catalogada como una sustancia nociva o tóxica, de esta forma se pueden generar manuales de uso en el caso de ser una sustancia tóxica (Gissi et al., 2017; UE REACH, 2007).
- A nivel poblacional, permite el manejo adecuado de estas sustancias brindando rangos seguros de uso y la implementación de tratamientos en el caso de existir intoxicaciones (Arrebola et al., 2003; Gissi et al., 2017; ONU, 2015).

#### **2.1.5. Objetivos de los Estudios de Toxicidad**

El principal objetivo de los estudios de toxicidad, es la clasificación de las sustancias, mediante la determinación de la toxicidad, que permite predecir los posibles daños de la sustancia en estudio, generando así información para un oportuno diagnóstico y tratamiento en el caso de que la sustancia sea considerada tóxica (EPA, 2002b; Gissi et al., 2017; OCDE, 2008; ONU, 2015; Randhawa, 2009; UE REACH, 2007).

#### **2.1.6. Organismos de Control**

En la actualidad, la entidad encargada que brinda criterios y recomendaciones para la clasificación y determinación en base de sus peligros físicos y riesgos para la salud de las sustancias, es el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación de Sustancias y Mezclas

Químicas (GHS), esta entidad trabaja en actividad conjunta, con las instituciones: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OCDE, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Organización de las Naciones Unidas (ONU) y Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bravo, 2017; Cacarin, 2018; EPA, 2002b; ONU, 2015). Su principal objetivo es establecer una base común y coherente para la clasificación y comunicación de sustancias peligrosas (Bravo, 2017; Cacarin, 2018; EPA, 2002b; ONU, 2015; UE REACH, 2007).

#### **2.1.7. Estudios Para Clasificación de Toxicidad Aguda**

Normalmente se utilizan las pruebas in vivo de toxicidad aguda para determinar una concentración letal que matará al 50 % de la población, conocida como Dosis Letal 50 (DL50) (Arrebola et al., 2003; Bravo, 2017; EPA, 2002a; Ocede, 2009; ONU, 2015). Para estudios in vitro y pruebas de toxicidad aguda por Inhalación se pueden usar los ensayos de concentración letal 50 (CL50), considerando el bienestar animal se sugiere realizar una combinación de ambos métodos de estudios (Arrebola et al., 2003; EPA, 2002b; Mata & Martínez-Vargas, 1998; Ocede, 2009; Randhawa, 2009; Repetto & Repetto, 2009; Wang et al., 2018).

#### **2.1.8. Dosis Letal 50**

Es aquella dosis única, derivada estadísticamente de una sustancia que al ser administrada produce la muerte al 50% de los animales experimentales en un intervalo de 24 horas (EPA, 2002a; OCDE, 2008). Generando umbrales de toxicidad aguda para la sustancia y posteriormente pueda ser clasificada por su peligrosidad, permitiendo su etiquetado, además de la selección de dosis de ensayo para estudios de dosis repetidas en los modelos para estudios de toxicidad subaguda y crónica (Arrebola et al., 2003; Pereira et al., 2014; Randhawa, 2009; Repetto & Repetto, 2009).

#### **2.1.9. OCDE**

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) es un organismo de cooperación internacional, compuesto por 37 estados

al 2008 (OCDE, 2008). Esta organización presenta herramientas útiles para evaluar los efectos potenciales de los productos químicos en la salud humana y el medio ambiente, mediante protocolos de pruebas aceptadas internacionalmente como métodos estándar para determinación de la seguridad de una sustancia (OCDE, 2008; ONU, 2015; UE REACH, 2007).

Los lineamientos presentados por esta organización, pueden ser utilizados tanto por profesionales de la industria, investigación y el gobierno (OCDE, 2008). Los estudios in vivo establecidos por la OCDE, para definir la toxicidad de una sustancia por medio de ensayos de DL50 en la actualidad (Cuadro 1), tienen el objetivo de reducir el número de animales mediante el refinamiento de la dosis, la frecuencia y el tipo de administración (OCDE, 2008; ONU, 2015; UE REACH, 2007).

Además, sugieren que este tipo de estudios deben ser acompañados por ensayos in vitro debido a que ayudan a la predicción de una determinada sustancia con respecto a sus procesos específicos de toxicidad (Arrebola et al., 2003; Gissi et al., 2017; OCDE, 2008; ONU, 2015; Wang et al., 2018).

Cuadro 1. Métodos de Estudios de Dosis Letal 50 Aprobados por la OCDE

Vía Oral	Vía Dérmica	Vía Inhalatoria
OCDE 420: Dosis Fija (5-7)	OCDE 402: LD50 Clásica (10-30)	OCDE 403: LD50 Clásica (40-80)
OCDE 423: Clase Tóxica Aguda (6-7)		OCDE 436: Clase Tóxica Aguda (6-9)
OCDE 425: Arriba y Abajo (6-7)		

Fuente: (OCDE, 2008)

Una vez obtenida la DL50 que es expresada en mg/kg, se procede con su clasificación (Cuadro 2):

Cuadro 2. Rangos de Toxicidad.

<b>Grado</b>	<b>Rango mg/kg</b>	<b>Clase</b>
Grado I	≤ 25	Muy Tóxica
Grado II	≤ 50	Tóxica
Grado III	≤ 2000	Nociva
Grado IV	≥5000	Sin Toxicidad Aguda

Fuente: (OCDE, 2008)

## 2.2. Hematoxilina

La hematoxilina, es un componente obtenido de la madera del árbol *Haematoxylon campechianum*, esta planta fue descubierta en el año 1502 por exploradores españoles en México, donde observaron a los Mayas emplearla con fines medicinales, posteriormente fue llevada a Europa y usada en la industria textil para teñir ropa (Titford, 2005).

En el año de 1863, Waldeyer introduce por primera vez a la hematoxilina como componente de las tinciones histológicas, desde ese momento hasta la actualidad forma parte de las principales tinciones en los laboratorios, especialmente en el área de la patología, como parte fundamental del proceso para diferentes diagnósticos de laboratorio, tanto en el campo de la medicina humana como veterinaria (Allison, 1999; Titford, 2005).

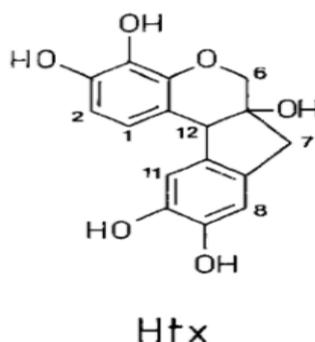
### 2.2.1. Taxonomía

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Fabales
- Familia: Fabaceae
- Género: *Haematoxylum*
- Especie: *Haematoxylum Campechianum*
- Nombre Común: Palo de Campeche o Palo de Tinte.

### 2.2.2. Estructura Química

La hematoxilina es un flavonoide, que presenta un peso molecular de 302,28 g/mol, su fórmula química es C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (Figura.2). En su estado puro la hematoxilina es incolora y solo toma una coloración cuando es oxidada a hematina, siendo así una sustancia anfóterica, presentando un color marrón rojizo o amarillo según el pH en que se encuentra (Fischer, Jacobson, Rose, & Zeller, 2008).

Figura 2. Fórmula estructural de Hematoxilina.



Fuente: New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes(Ch. Bettinger and H.W. Zimmermann, 1991).

### 2.2.3. Aplicaciones

La hematoxilina es considerada un colorante básico de origen natural y es usada en histología y citología como una tinción por su capacidad de unirse principalmente a estructuras nucleares en preparaciones de portaobjetos de microscopio (Indu et al., 2014). Presentan en su interior cargas negativas en forma de ácidos nucleicos, permitiendo su unión, dando una coloración azul oscuro o violeta (Ferreira, 2003).

Una de las ventajas del uso de la hematoxilina, es su versatilidad en la tinción de los tejidos, por medio de la combinación de mordientes, variaciones en su oxidación y adición de otras tinciones (Chan, 2014). Puede ser usada también como un identificador de pH, en soluciones

ácidas, presenta una coloración rojiza, mientras que en soluciones alcalinas, presenta un color azul (Chan, 2014; Fischer et al., 2008).

En los laboratorios de patología la tinción hematoxilina- eosina (H & E) se usa para la elaboración de capas celulares incrustadas en vidrio para la observación en el microscopio (Rao, Patil, Majumdar, & Oswal, 2015). Esta técnica consiste en la sección de cortes de un tejido embebidos en bloques de parafina, los cuales son hidratados y teñidos por hematoxilina acompañados por un mordiente. Posteriormente se aplica un alcohol ácido para la eliminación de la tinción inespecífica en la placa, se procede con la siguiente tinción con eosina, la cual tiñe el citoplasma, después se deshidratan las placas y son cubiertas por un cubreobjetos (Fischer et al., 2008).

En los laboratorios de citología, la hematoxilina se usa mayormente para la detección de signos de malignidad celular, mediante la prueba de Papanicolaou (Mamat, Nasir, Wisnoe, Ngah, & Ramly, 2008). “Esté método consiste en un frotis de células colocadas y teñidas por hematoxilina junto con un contraste de naranja G, posteriormente con una mezcla de FCF verde claro, marrón de Bismarck y finalmente eosina” (Sinkar & Arakeri, 2017).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### 3.1. MATERIALES

- Bata
  - Guantes
  - Zapatones
  - 14 jaulas (malla o plástico)
  - 14 comederos.
  - 14 bebederos para hámster
  - 16 frascos ámbar.
  - 1 quintal de alimento.
  - 1 quintal de viruta.
  - 1 balanza (A:  $\pm 0.1g$ )
  - 1 marcador permanente de punta fina.
  - Jeringas de insulina.
- 
- 1 Equipo básico de disección.
  - Hoja de bisturí N° 15.
  - Éter.
  - Algodón.
  - Embudo de vidrio sin vástago.
  - Guantes
  - Mascarilla
  - Mandil
  - Libreta de apuntes.
  - Ratones *mus musculus balb/C*
- 
- Hematoxilina Monohidrato C.I. 75290 de la empresa Merck, Alemania (**Anexo1**).
  - Dimetilsulfóxido DMSO.

## **3.2. METODOLOGÍA**

Para la determinación de DL50 intraperitoneal, se procedió con el método de arriba y abajo descrito por la OCDE425, además de contar con los POES establecidos para esta prueba por parte del Laboratorio de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador (Anexo 3).

### **3.2.1. Zona de Estudio**

El presente estudio, se lo realizó en la Universidad Central del Ecuador, misma que se encuentra ubicada en la Ciudadela Universitaria, en las calles Gilberto Gato Sobral & Jerónimo Leiton, centro-norte de la ciudad de Quito. En el cual se llevó a cabo los siguientes procedimientos:

- Recepción, sexado, cuarentena y fase experimental del proyecto (Bioterio y Laboratorio del Centro de Biología).
- Preparación de las soluciones y dosis (Laboratorios del Centro de Química).
- Necropsias (Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia).

### **3.2.2. Recolección de Información**

Los registros y toma de datos: del peso, mortalidad, signos de toxicidad y análisis anatomopatológico durante el estudio que se llevó a cabo desde 28 de Abril al 29 de Marzo, siguieron los modelos de registros establecidos por los POES del Laboratorio de Oferta de Servicios de Productos (OSP) (Anexo 4).

### **3.2.3. Factores en Estudio**

Variable independiente: Dosis de Hematoxilina.

Variable dependiente: Mortalidad de diferentes dosis.

### **3.2.4. Tipo de Investigación**

Exploratoria, correlacional, con diseño experimental.

### 3.2.5. Características de las Unidades Experimentales

Se utilizaron un total de 70 ratones *mus musculus balb/C* (30 machos, 40 hembras) pertenecientes al Bioterio del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador, con una edad de 8 a 12 semanas y un peso promedio del  $\pm 20\%$  de la media total de los ratones por grupo. Se procedió a la división de los mismos en 7 grupos según su peso, para facilidad del cálculo y administración de la dosis de hematoxilina, los cuales se conformaron por 10 animales por grupo (Cuadro3).

Estos se encontraban compuestos por machos y hembras distribuidos aleatoriamente, sin embargo; cabe recalcar que, debido a la disparidad en el número, uno de los grupos únicamente se encontró conformado por hembras.

La distribución y el cálculo de las dosis en cada uno de los grupos experimentales, se basó en las guías establecidas por los POES de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador para el método de la OCDE 425, y adaptadas para el método de aplicación intraperitoneal.

Cuadro 3. Grupo de Dosis para la Determinación DL50 Intraperitoneal.

Experimental	Sexo	Peso (g) $\bar{x}$	Dosis mg/kg	# de Repeticiones
E1	M	32,6	5.5	10
	H	22,7		
E2	M	30,26	17.5	10
	H	24,52		
E3	M	30,62	55	10
	H	24,34		
E4	M	31,6	175	10
	H	24,26		
E5	M	32,62	550	10
	H	24,9		
E6	M	29,48	1100	10
	H	25,92		
E7	H	27,52	2000	10
	H	34,06		
<b>Total</b>			<b>70 Ratones</b>	

### 3.2.6. Manejo del Lugar de Experimentación

#### Ambiente

El control del ambiente en el área de experimentación del bioterio, se adaptó mediante el uso de un calefactor y termohigrómetro. Se mantuvo una temperatura promedio de 19°C a 23°C durante toda la fase del estudio.

#### Instalaciones

Para la desinfección de las instalaciones del área de experimentación pisos, estanterías, comederos y bebederos se las realizó con amonio cuaternario al 20%.

#### Seguridad

Todos los desechos infecciosos que se generaron durante el estudio producidos por los ratones, inoculación, equipo de protección y necropsias se eliminaron en fundas de color rojo con su respectivo empaquetado y etiquetado.

#### Equipos de Protección

Durante toda la fase del estudio se mantuvo con el uso obligatorio de mandil, guantes, cofia y zapatones además de seguir las normas de bioseguridad dadas por el Bioterio.

#### Jaulas

Se prepararon, esterilizaron y adaptaron 14 jaulas de plástico con cubierta metálica, con las siguientes dimensiones; 32 cm de largo, con 22 cm de ancho y con 13 cm de altura (Anexo 5) respetando la densidad animal en cada jaula establecido por la guía de manejo de animales de laboratorio (F Fuentes, R Mendoza, A Rosales, & A Cisneros, 2008; National Research Council (US), 2011).

De esta manera, cada animal tuvo el espacio suficiente para poder expresar posturas normales de conducta y sociabilidad.

#### Cama

La cama fue cambiada cada 7 días en todas las jaulas, estuvo hecha de viruta y fue esterilizada por autoclave durante 15 min a 115° C (Anexo 5).

#### **3.2.7. Manejo de los Animales de Experimentación**

Durante la investigación, todas las fases en el manejo de los animales vivos, se llevaron a cabo en el Bioterio del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador, contando con la guía del Doctor Veterinario Javier Tingo.

#### Recepción

Las condiciones de los animales para su cuidado y manejo, durante la recepción y todo el estudio, estuvo acorde con las normas estándar, aceptadas internacionalmente por parte de la OCDE y EPA. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 18-22° C a una humedad relativa de 30-70%, se iluminaron artificialmente en un ciclo de luz / oscuridad de aproximadamente 12 horas, para su alimentación, se usó el balanceado ProCuyes y Conejos fase engorde de la empresa Pronaca (Anexo 2) que se lo administró junto con el cambio de agua cada 24 horas.

#### Cuarentena

Una vez cumplido el rango de 8 a 12 semanas de edad por todas las unidades, se procedió con identificación individual, mediante el marcaje de la cola y la formación de los bloques experimentales separándolos en grupos según el peso (Anexo 7). Posteriormente se identificó cada jaula con su respectivo bloque experimental y se dio inicio con el período de cuarentena de 14 días, el cual consistió en la observación de estos individuos para asegurar su adaptación al ambiente de esta forma se asegura su bienestar y estado de salud. (Anexo 5).

### 3.2.8. Fase Experimental

#### Sustancia de Prueba

Para el estudio se utilizó Hematoxilina Cryst. (CI 75290) MSDS, proveniente de la empresa Merck KGaA Darmstadt, Alemania (Cuadro 4). La sustancia contó con su respectivo análisis y certificación proveniente de los Laboratorios de la misma empresa (Anexo 1).

Cuadro 4. Información Sobre la Sustancia a Evaluar.

<b>Nombre:</b>	Hematoxilina cryst. (CI 75290)
<b>Fórmula:</b>	$C_{16}H_{14}O_6$
<b>Empresa:</b>	Merck KGaA (Alemania)
<b>Lote:</b>	FN1392702
<b>Fecha de Elaboración:</b>	25-06-2018
<b>Fecha de Expiración:</b>	31-07-2026

#### Preparación de las Dosis

Para el estudio se prepararon dos soluciones al 4% y 70% de hematoxilina (Anexo 5) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) usado como vehículo y calentado a una temperatura de 37° C, ambas soluciones fueron colocadas y selladas en frascos ámbar estériles (IACUC, 2014).

Para la preparación de las dosis, se pesaron los animales en el día 14 del período de cuarentena, obteniendo el peso promedio general de cada grupo de machos y hembras.

Todas las dosis se ajustaron a un volumen de 0,2 ml por lo que se tuvo que realizar una disolución de las soluciones madres (4%-70%) en 5 ml de DMSO como se explica en el (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cuadro de Dosis de Hematoxilina a Administrar a los Ratones.

EX	Dosis (mg/kg)	Peso (Kg)	Dosis total mg	Vol (0,2ml) sol. mg/ml	ml al 4% en 5ml
Exp. Machos 1	5,5	0,0326	0,1793	0,8965	0,111905832
Exp. Hembras 1	5,5	0,0227	0,12485	0,62425	0,077922159
Exp. Machos 2	17,5	0,03026	0,52955	2,64775	0,330506042
Exp. Hembras 2	17,5	0,02452	0,4291	2,1455	0,267812562
Exp. Machos 3	55	0,03062	1,6841	8,4205	1,051090973
Exp. Hembras 3	55	0,02434	1,3387	6,6935	0,835517775
Exp. Machos 4	175	0,0316	5,53	27,65	3,451418015
Exp. Hembras 4	175	0,02426	4,2455	21,2275	2,649727881
					<b>ml al 70% en 5ml</b>
Exp. Machos 5	550	0,03262	17,941	89,705	0,640740847
Exp. Hembras 5	550	0,0249	13,695	68,475	0,489100156
Exp. Machos 6	1100	0,02948	32,428	162,14	1,158126312
Exp. Hembras 6	1100	0,02592	28,512	142,56	1,018271168
Exp. Hembras 7	2000	0,02752	55,04	275,2	1,965686204
Exp. Hembras 7	2000	0,03406	68,12	340,6	2,432822388

### Inoculación

Antes de la inoculación, por cada grupo se tomó el peso y se identificó individualmente a cada animal marcándolos en la base de la cola, utilizando un marcador insoluble en agua. Se desinfectó el área mediante torundas de algodón con alcohol.

La inoculación se llevó a cabo por vía intraperitoneal utilizando una jeringa de insulina cargada con un volumen de 0,2 ml de solución e introducida en un ángulo de 35° aproximadamente al lado izquierdo de la línea media del ombligo, para no tocar las vísceras y causar una posible peritonitis.

Las inoculaciones iniciaron con la aplicación del grupo de dosis más baja (5.5mg/kg), una vez terminado el grupo se procedió a su observación y preparación de las siguientes dosis a administrar de forma ascendente, el intervalo por grupo experimental entre dosis fue de 30 minutos. En la fase de Post Inoculación se observó y registró los signos de toxicidad y mortalidad a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 y 48 horas.

Durante los 15 días posteriores a la inoculación, se observó si los animales presentaban signos de enfermedad, lesión, comportamiento anormal o mortalidad.

### **3.2.9. Necropsias**

Se procedió con las necropsias de la mortalidad causada por la inoculación de las dosis del estudio de las 24 a 72 horas.

Al día 14 post inoculación, se sacrificó a todos los animales de los grupos experimentales 5, 6, 7 que representan las dosis altas.

El día 15 post inoculación se procedió con el sacrificio de un macho y una hembra seleccionados aleatoriamente de los grupos experimentales 1, 2, 3, 4 (Dosis bajas).

En todas las necropsias realizadas se observaron si los órganos internos presentaron alteraciones o patologías macroscópicas las cuales fueron tomadas y registradas (Anexo 4). La comparación de los pesos de los órganos se las realizó usando los parámetros establecidos por Laboratorios Charles River.

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos de mortalidad y supervivencia de los ratones en cada uno de los 7 grupos, fueron analizados mediante el modelo dosis respuesta Probit y Logit para el cálculo de la DL50 mediante el Software para análisis estadístico R (versión 3.4.2). Para la tabulación de datos se empleó el programa Microsoft Excel (Microsoft, versión 2013).

Se usaron los Modelos Probit y Logit debido a que a las variables dependiente que ofrecen nuestro estudio son de tipo binario (vivo/muerto) es decir que ambos modelos manejan probabilidades brindando un número  $p$  entre 0 y 1.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la observación efectuada a los grupos experimentales, se obtuvo los siguientes resultados:

#### 4.1.1. Sintomatología de Toxicidad de Hematoxilina en ratones

Los síntomas que se presentaron una vez inoculados, fueron registrados hasta los 15 días, los grupos experimentales expuestos inmediatamente a la aplicación presentaron efectos adversos como Hipoactividad, temblores, e hiperventilación, en los grupos de dosis bajas disminuyeron al cabo de una hora, mientras que a medida que aumentaba la dosis se intensificaban los síntomas presentando otros efectos secundarios hasta la muerte de los individuos, lo que se describe en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Síntomas de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal.

Experimental	Dosis mg/kg	Sexo	Animales	Síntomas
Exp.1	5,5	M	5	Hipoactividad, temblores, hiperventilación.
		H	5	
Exp.2	17,5	M	5	Hipoactividad, temblores, hiperventilación.
		H	5	
Exp.3	55	M	5	Hipoactividad, temblores, hiperventilación.
		H	5	
Exp.4	175	M	5	Hipoactividad, temblores, hiperventilación.
		H	5	
Exp.5	550	M	5	Hipoactividad, temblores, hiperventilación.
		H	5	
Exp.6	1100	M	5	Hipoactividad, astenia, temblores, hiperventilación, espasmos, ahogo, mortalidad.
		H	5	
Exp.7	2000	H	5	Hipoactividad, astenia, temblores, hiperventilación, espasmos, ahogo, mortalidad.
		H	5	

La hipoactividad, temblores e hiperventilación observada en todos los grupos pudieron ser provocados por la vía de administración intraperitoneal, en los estudios realizados por Obici et al., (2008), Mandal, Das, Manna, & Bhattacharyya, (2009) y Cona et al., (2013) observaron los

mismos síntomas, aplicados por vía parenteral y usando DMSO como vehículo, atribuyendo esta sintomatología al dolor causado por la aplicación de los fármacos.

En los grupos experimentales 6 y 7 pertenecientes a las dosis más elevadas, presentaron una sintomatología más marcada, con cuadros de astenia, temblores, hiperventilación, espasmos, ahogo. Las mortalidades generadas en estos grupos se pueden asociar a un paro respiratorio y colapso pulmonar descritos en el estudio de Lahlou et al., (2008) que sugiere la anoxia como un desencadenante para una reacción neurotóxica central.

#### 4.1.2. Mortalidad Post Inoculación

Los resultados de mortalidad del estudio de toxicidad de hematoxilina por dosis única mediante vía intraperitoneal en el período de observación de 15 días se presenta en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Mortalidad de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal.

Experimental	Dosis mg/kg	Sexo	Animales	Mortalidad 24 H	Mortalidad > 24H	Vivos
Exp.1	5,5	M	5	1	0	4
		H	5	0	0	5
Exp.2	17,5	M	5	0	0	5
		H	5	0	0	5
Exp.3	55	M	5	0	0	5
		H	5	0	0	5
Exp.4	175	M	5	0	0	5
		H	5	0	0	5
Exp.5	550	M	5	0	1	4
		H	5	0	0	5
Exp.6	1100	M	5	0	2	3
		H	5	0	2	3
Exp.7	2000	H	5	4	0	1
		H	5	3	2	0
<b>TOTAL</b>			70	8	7	55
				<b>Mortalidad</b>	15	

La mortalidad producida de una unidad en el experimental 1 y una unidad por parte del experimental 7 fueron muertes asociadas a la administración debido a que la primera muerte se produjo por una falla en la manipulación, provocando una alteración en su ritmo cardíaco desencadenando una posible muerte súbita Coto, (2015) y en el experimental 7 una falla en la inoculación de una unidad causó daños en el tejido cutáneo, generando una hemorragia que desencadenó la muerte del animal, como describe el estudio realizado por Fuentes et al., (2008) que menciona que ese tipo de alteraciones son generadas por una inoculación demasiado rápida.

La mortalidad después de las 24 horas pos inoculación, produjo 6 muertes en el grupo experimental 7 (2000 mg/kg). A las 48 horas se produjo la muerte de un animal en el experimental 7, 4 en el experimental 6 (1100 mg/kg), después de las 72 horas en el grupo 5 (550 mg/kg) se produjo la muerte de un animal, se realizaron las respectivas necropsias, observándose en todos los individuos la presencia de líquido en la cavidad abdominal y hemotórax, producido por una vasodilatación y un aumento en la fragilidad vascular debido a la acción tóxica de la sustancia administrada, como se describe en los trabajos realizados por Whalan, (2015) y Vivancos, (2015), los cuales asocian estos hallazgos como parte de un proceso de intoxicación.

#### **4.1.3. Necropsias**

Las necropsias que se realizaron en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia al día 14 y 15 post inoculación, aplicando correctamente el sacrificio humanitario, según lo aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Central del Ecuador (Anexo 6), con el fin de precautelar el bienestar animal. Además de examinar cuidadosamente el aspecto externo así como las cavidades y órganos para determinar la presencia de alteraciones anatomopatológicas.

En todos los grupos examinados se observó que la administración de hematoxilina no produjo un cambio en la forma, peso y tamaño de los órganos internos, manteniendo sus características propias como se detalla en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Comparación de Pesos Promedios  $\bar{x}$  (g), con Parámetros de los Laboratorios Charles River, en órganos de ratones después de la administración única de hematoxilina por vía intraperitoneal.

Experimental	Dosis mg/kg	Sexo	Pulmones $\bar{x}$	Parámetro	Hígado $\bar{x}$	Parámetro	Corazón $\bar{x}$	Parámetro	Riñón $\bar{x}$	Parámetro
Exp.1	5,5	M	0,2	0,215	2,2	1,887	0,2	0,188	0,5	0,494
		H	0,2	0,201	1,8	1,486	0,2	0,155	0,3	0,413
Exp.2	17,5	M	0,2	0,215	2	1,887	0,2	0,188	0,4	0,494
		H	0,2	0,201	1,9	1,487	0,2	0,155	0,4	0,413
Exp.3	55	M	0,2	0,215	2	1,887	0,2	0,188	0,5	0,494
		H	0,2	0,201	1,9	1,486	0,1	0,155	0,3	0,413
Exp.4	175	M	0,2	0,215	2,2	1,887	0,2	0,188	0,5	0,494
		H	0,2	0,201	1,9	1,487	0,1	0,155	0,3	0,413
Exp.5	550	M	0,2	0,215	2,2	1,887	0,2	0,188	0,5	0,494
		H	0,2	0,201	1,9	1,486	0,1	0,155	0,3	0,413
Exp.6	1100	M	0,2	0,215	2	1,887	0,2	0,188	0,4	0,494
		H	0,2	0,201	2	1,487	0,2	0,155	0,4	0,413
Exp.7	2000	H	0,2	0,201	1,9	1,487	0,1	0,155	0,3	0,413
		H	-	0,201	-	1,487	-	0,155	-	0,413

El tipo de balanceado que se manejó en el bioterio durante el estudio, fue de tipo de producción para animales de engorde, que presentó en su composición una concentración más elevada de grasa y proteína, lo que puede ocasionar en el incremento del tamaño de los hígados.

#### 4.1.4. Valor de la Dosis Letal 50

El cálculo del valor para la DL50 se llevó a cabo con los análisis estadísticos Probit y Logit mediante los cuales se lograron establecer modelos de relación de dosis respuesta determinando así las curvas de mortalidad en base de regresiones lineales representadas en las Figuras 3-4. Los valores obtenidos muestran que la Dosis Letal 50 de hematoxilina por vía intraperitoneal estimados tanto en los métodos Probit y Logit es de 1257.16 mg /kg de peso (95%, SE:  $\pm 159.102$  mg/kg).

Figura 3. Curva de mortalidad Método Probit

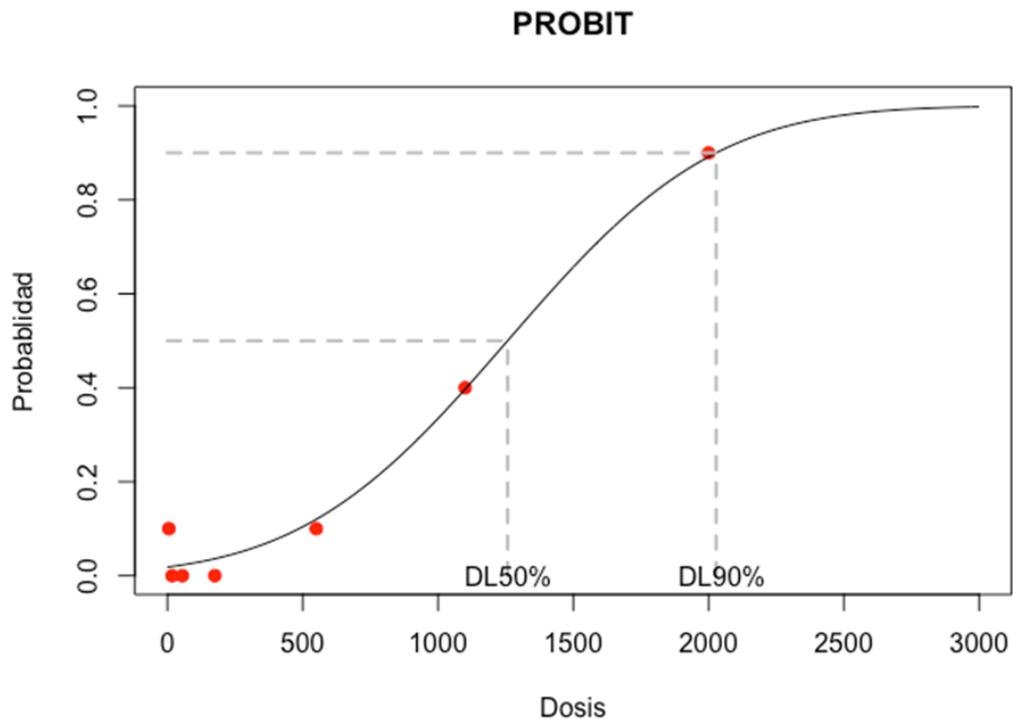


Fig.3 Curva de mortalidad por método Probit producida por la administración de hematoxilina por vía intraperitoneal. El eje X representa las dosis y el eje Y la probabilidad en proporción de individuos muertos.

Figura 4. Curva de mortalidad Método Logit

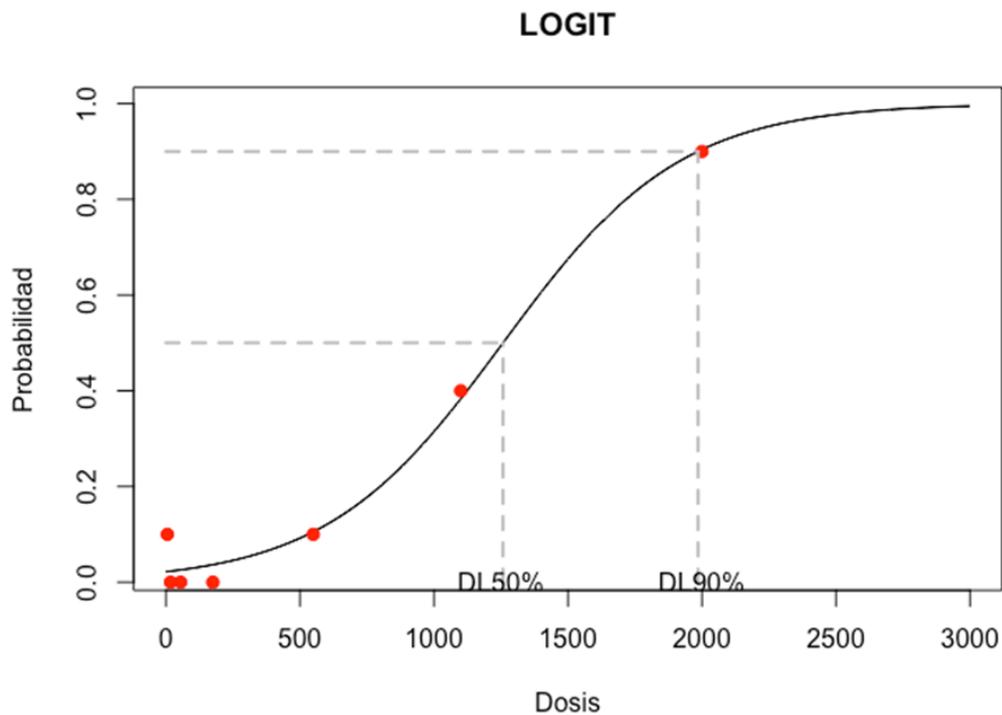


Fig.4 Curva de mortalidad por método Logit, producida por la administración de hematoxilina por vía intraperitoneal. El eje X representa las dosis y el eje Y la probabilidad en proporción de individuos muertos.

En ambos métodos se observa un efecto sigmoide en sus curvas de mortalidad, causado por la relación que existe entre la dosis y la muerte generada por la misma, determinando que, a medida que se aumenta la dosis la tasa de mortalidad también aumenta. Confirmando de esta manera la eficacia de los métodos aplicados para este estudio que cumplen el fundamento de dosis respuesta como en los estudios realizados por (Baliga et al., 2004; Carpenter, 2008; El Hilaly, Israili, & Lyoussi, 2004; Lahlou et al., 2008; A. Múnera, 2000; Obici et al., 2008; Patel, Dadhaniya, Hingorani, & Soni, 2008; Randhawa, 2009).

## CAPÍTULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

- Se estableció la Dosis Letal 50 intraperitoneal de hematoxilina en 1257.16 mg /kg de peso (95%, SE:  $\pm$  159.10 mg/kg) mediante el método 425 de arriba y abajo de la OCDE.
- Según el sistema de clasificación de la OCDE, la hematoxilina correspondería al grado de toxicidad III y es categorizada como una sustancia nociva.
- Se estableció una metodología para el estudio intraperitoneal de DL50, misma que podrá ser empleada en nuevos estudios para otras sustancias farmacéuticas.

## 6.1. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de citotoxicidad de hematoxilina para determinar daños celulares.
- Implementar pruebas bioquímicas sanguíneas e histológicas en estudios de DL50 para la identificación de alteraciones metabólicas y estructurales de los animales de estudio.
- Fijar una dosis segura de trabajo de hematoxilina en los laboratorios, en base a los resultados obtenidos en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allison, R. T. (1999). *Origins Haematoxylin-from the wood*. 527–528.
- Arrebola, D., Arrebola, A., Alfredo, L., Fernández, R., Fera, Y. L., Medina, M. F., & Infante, J. F. (2003). *Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda*. 1–15. Retrieved from [https://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/22001.pdf](https://www.sertox.com.ar/img/item_full/22001.pdf)
- Baliga, M. S., Jagetia, G. C., Ulloor, J. N., Baliga, M. P., Venkatesh, P., Reddy, R., ... Bairy, K. L. (2004). The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of Sapthaparna (*Alstonia scholaris*) in mice and rats. *Toxicology Letters*, 151(2), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.015>
- BRAVO, F. B. (2017). EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA AGUDA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS DE *Passiflora manicata* Y *Passiflora tripartita* SOBRE *Rattus norvegicus* POR VÍA ORAL (Escuela Superior Politécnica De Chimborazo). Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6586/1/20T00839.pdf>
- Cacarin, P. F. (2018). Propuesta de implementación de pruebas toxicológicas agudas para productos naturales orales en el laboratorio de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador (Vol. 15). UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Carpenter, C. (2008). FRD-903: Acute Oral Toxicity Study in Rats - Up-and-Down Procedure. *United States Environmental Protection Agency*. Retrieved from [https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/4223525](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/4223525)
- Ch. Bettinger and H.W. Zimmermann. (1991). *New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes*. 279–288.
- Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12–32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>
- Cona, M. M., Li, J., Chen, F., Feng, Y., Aguiar, Y., Vanstapel, F., ... Sun, Z. (2013). *A safety study on single intravenous dose of tetrachlorodiphenyl glycoluril [iodogen] dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO)*. 8254. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.756559>
- Coto, H. (2015). *Protocolos para la Vigilancia y Control de Roedores Sinantrópicos*. 103. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Marco\\_Antonio\\_Vigilato/publication/299458084\\_Protocolos\\_para\\_la\\_vigilancia\\_y\\_control\\_de\\_roedores\\_sinantrópicos/links/56f9724c08ae38d710a30039.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marco_Antonio_Vigilato/publication/299458084_Protocolos_para_la_vigilancia_y_control_de_roedores_sinantrópicos/links/56f9724c08ae38d710a30039.pdf)

- El Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>
- EPA. (2002a). *Health Effects Test Guidelines*. (December).
- EPA. (2002b). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity. *United States Environmental Protection Agency*, (August), 37. Retrieved from [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/epa/epa\\_870r\\_1100.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/epa/epa_870r_1100.pdf)
- F Fuentes, R Mendoza, A Rosales, & A Cisneros. (2008). Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio:Raton. In *Instituto nacional de salud*. Retrieved from [www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA\\_ANIMALES\\_RATON.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf)
- Ferreira, C. S. (2003). *TECHNICAL REPORT STAINING OF INTESTINAL PROTOZOA WITH HEIDENHAIN ' S IRON HEMATOXYLIN Solutions :* 45(1), 43–44.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Gissi, A., Louekari, K., Hoffstadt, L., Bornatowicz, N., & Aparicio, A. M. (2017). Alternative acute oral toxicity assessment under REACH based on sub-acute toxicity values. *Altex*, 34(3), 353–361. <https://doi.org/10.14573/altex.1609121>
- IACUC. (2014). Administration Of Drugs and Experimental Compounds in Mice and Rats. *Boston University*, 1–11. Retrieved from <http://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/working-with-animals/procedures/administration-of-drugs-and-experimental-compounds-in-mice-and-rats/>
- Indu, S., Ramesh, V., Indu, P., Prashad, K., Premalatha, B., & Ramadoss, K. (2014). Comparative efficacy of cedarwood oil and xylene in hematoxylin and eosin staining procedures: An experimental study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 284. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136167>
- INEN. (1996). Instituto Ecuatoriano de Normalización Plaguicidas Clasificación toxicológica. *Bvsde.Paho.Org*, 2–8. <https://doi.org/10.17226/18948>
- Lahlou, S., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2008). Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.024>
- Mamat, A. M. I., Nasir, R. E. M., Wisnoe, W. K. W., Ngah, Z., & Ramly, R.

- (2008). Modified ultrafast Papanicolaou staining technique: A comparative study. *Journal of Mechanical Engineering*, 5(2), 4–8. <https://doi.org/10.4103/JOC.JOC>
- Mandal, T., Das, S., Manna, S., & Bhattacharyya, D. (2009). Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(3), 160. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.16212>
- Mata, R. C. de la, & Martínez-Vargas, A. Z. (1998). Programa en basic para el calculo de DI50 por método de probits. *Rev. Med. Exp*, Vol. 15, pp. 45–54. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46341998000100009](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341998000100009)
- Múnera, A. (2000). Dosis letal 50 de lorazepam en ratón (*Mus musculus*) Albino, cepa suizo-icr Francisco. *Revista de La Facultad de Medicina; Vol. 48, Núm. 4 (2000); 190-194 2357-3848 0120-0011*, 190–194. Retrieved from <http://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/19629>
- Múnera, F. A. M., Asistente, P., Fisiológicas, D. D. C., Medicina, F. De, Eduardo, M., Martinez, S., ... Nuestra, M. De. (2000). *Dosis letal 50 de lorazepam en ratón ( Mus musculus ) Albino , cepa suizo-icr*. 190–194.
- National Research Council (US), I. for L. A. (2011). *Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Care and Use of Laboratory Animals. and National Institutes of Health (U.S.). Division of Research Resources.: Guide for the care and use of laboratory animals. U.S. Dept. of Health and Human S (Vol. 46)*. [https://doi.org/10.1163/1573-3912\\_islam\\_DUM\\_3825](https://doi.org/10.1163/1573-3912_islam_DUM_3825)
- Ning, Z. H., Long, S., Zhou, Y. Y., Peng, Z. Y., Sun, Y. N., Chen, S. W., ... Zhao, Y. H. (2015). Effect of exposure routes on the relationships of lethal toxicity to rats from oral, intravenous, intraperitoneal and intramuscular routes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(2), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.008>
- Obici, S., Otobone, F. J., Sela, V. R. da S., Ishida, K., Silva, J. C. da, Nakamura, C. V., ... Audi, E. A. (2008). Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.013>
- OCDE. (2008). *Oecd guidelines for the testing of chemicals*. (October).
- Ocde, ©. (2009). *Oecd/Ocde*. (October). Retrieved from <https://doi.org/10.1787/20745788>
- ONU. (2015). Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). *Naciones Unidas, 6th Ed.(ST/SG/AC.10/30/Rev.6)*, 1–573. Retrieved from [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev)

05/Spanish/ST-SG-AC10-30-  
Rev5sp.pdf%0Ahttp://www.mintrabajo.gov.co/documents/20147/5967  
6/SGA+Rev6sp.pdf

- Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., & Soni, M. G. (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2728–2735. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.035>
- Pereira, E. F. R., Aracava, Y., Detolla, L. J., Beecham, E. J., Basinger, G. W., Wakayama, E. J., & Albuquerque, E. X. (2014). *Perspectives in Pharmacology Animal Models That Best Reproduce the Clinical Manifestations of Human Intoxication with Organophosphorus Compounds*. (August), 313–321.
- Randhawa, M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, 21(3), 184–185. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929045>
- Rao, R. S., Patil, S., Majumdar, B., & Oswal, R. G. (2015). Comparison of special stains for keratin with routine hematoxylin and eosin stain. *Journal of International Oral Health : JIOH*, 7(3), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878469%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4385717>
- Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental. Cuarta Edición*. Retrieved from <http://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479788988.pdf>
- Sinkar, P., & Arakeri, S. U. (2017). Utility of modified ultrafast Papanicolaou stain in cytological diagnosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(3), EC28–EC31. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/20882.9532>
- Titford, M. (2005). The long history of hematoxylin. *Biotechnic and Histochemistry*, 80(2), 73–78. <https://doi.org/10.1080/10520290500138372>
- UE REACH. (2007). REGLAMENTO (CE) No 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Su. *Diario Oficial de La Unión Europea*, (7). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:es:PDF>
- Vivancos, M. D. (2015). *Descripción de la situación actual de las intoxicaciones por rodenticidas anticoagulantes en animales de compañía y fauna silvestre*. 1–8. Retrieved from <https://zagan.unizar.es/record/37007/files/TAZ-TFG-2015-3971.pdf>

- Wang, Y., Ning, Z. H., Tai, H. W., Long, S., Qin, W. C., Su, L. M., & Zhao, Y. H. (2015). Relationship between lethal toxicity in oral administration and injection to mice: Effect of exposure routes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.019>
- Wang, Y., Wang, S., Feng, X. N., Yan, L. C., Zheng, S. S., Wang, Y., & Zhao, Y. H. (2018). The impact of exposure route for class-based compounds: a comparative approach of lethal toxicity data in rodent models. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(1), 95–104. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1320405>
- Whalan, J. E. (2015). *A toxicologist's guide to clinical pathology in animals : hematology, clinical chemistry, urinalysis*. Retrieved from <https://books.google.co.uk/books?id=R561BwAAQBAJ&pg=PA62&lpg=PA62&dq=over+mature+right+shifted+neutrophils&source=bl&ots=yXZthwX3Vh&sig=kwUpKGETGgbFyLLmF0quVK9uKJw&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwj19cuM6fjXAhVGPRQKHcT-D44Q6AEIaDAP#v=onepage&q=over mature right shif>

## ANEXOS

### Anexo 1. Certificado de Análisis de Hematoxilina Cryst.



## Certificate of Analysis

1.04302.0025 Hematoxylin cryst. (C.I. 75290) for microscopy  
Batch FN1392702

	Spec. Values	Batch Values
Identity (UV/VIS-Spectrum)	passes test	passes test
Transition range	pH 5.0 - 7.2 yellow - violet	pH 5.0 - 7.2 yellow - violet
Water (according to Karl Fischer)	≤ 10 %	7 %
Suitability for microscopy	passes test	passes test

Date of release (DD.MM.YYYY) 25.06.2018  
Expiry date (DD.MM.YYYY) 31.07.2026

Dr. Ralf Burgert  
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

## Anexo 2. Alimento Balanceado

### ProCuyes y Conejos Engorde



Fuente: Pronaca

Análisis nutricional del balanceado:

Proteína cruda (mín.)	16.0%
Grasa cruda (mín.)	3.0%
Fibra cruda (máx.)	6.0%
Ceniza (máx.)	8.0%
Humedad (máx.)	13.0%

**Fuente:** Pronaca

Anexo 3. Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador para la prueba 425 de la OCDE.

		<b>Laboratorio de Oferta de Servicios y Productos OSP</b>	
<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR</b>			
<b>ANÁLISIS DE TOXICIDAD ORAL AGUDA PARA PRODUCTOS NATURALES.</b>			
<b>MÉTODO DE ARRIBA Y ABAJO – OCDE 425</b>			
<b>PRUEBA PRINCIPAL</b>			
Fecha: 30-04-2018	Código: OP-4.1-05	Página: 1 de 5	
Personas y Departamentos que deben estar informados de este documento			
Dra. Jenny Murillo - Directora de OSP			

**1 Propósito:** Determinar la toxicidad oral aguda de Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal en el laboratorio de OSP de la Facultad de Ciencias Químicas.

**2 Alcance:** Todos los productos naturales procesados de uso medicinal que requieran ser analizados en su toxicología oral aguda y categoría toxicológica tomando como guía la directriz OCDE 425

### 3 Definiciones y abreviaciones

**OCDE:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, es una organización cuya misión es la de promover políticas que permitan mejorar el bienestar económico y social de las personas.

**OCDE 425:** Método de arriba y abajo, es un método toxicológico que permite determinar la toxicidad de los productos que se consideran son altamente tóxicos es decir aquellos que generaran la muerte de los animales a los 2 días luego de la administración.

**OSP:** Oferta de Servicios y Productos (Laboratorio).

**Toxicidad Aguda:** son todas las manifestaciones de alteración del estado normal de un ser vivo ocurridas de forma inmediata luego de ser administrada una sustancia química en una sola ocasión en un período de 24 horas.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Tesista del proyecto de investigación	Asesor/Tutor del proyecto de investigación	Directora del Laboratorio de OSP
Sr. Pablo Cacarin	Dr. Geovanni López	Dra. Jenny Murillo
Fecha: 30-04-2018	Fecha: 30-04-2018	Fecha: 30-04-2018

 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS	<b>ANÁLISIS DE TOXICIDAD ORAL AGUDA          PARA PRODUCTOS NATURALES.          MÉTODO DE ARRIBA Y ABAJO          OCDE 425          PRUEBA PRINCIPAL</b>	CÓDIGO	OP-4.1-05
		VERSIÓN	01
		REVISIÓN	01
		PAGINAS : 2 de 5	

**Pruebas toxicológicas:** son los ensayos que se llevan a cabo ya sea en vivo o in vitro con el único fin de determinar la capacidad toxicológica de una sustancia química demostrando así su seguridad en función de su período de administración.

**Productos naturales procesados de uso medicinal:** son drogas crudas, extractos y formas farmacéuticas que presentan actividad y fines terapéuticos y que en su composición no están combinados con sustancias activas definidas.

#### 4 Responsabilidades

El personal del laboratorio encargado de la aplicación, control y obtención de resultados de las pruebas de toxicología aguda.

#### 5 Materiales

- 4 ratones hembras (mus musculus balb/C) nulíparas de 8 a 12 semanas de edad y peso promedio del  $\pm 20\%$  de la media total.
- Muestra del Producto natural que será sometida al estudio.
- 1 jaula (malla o plástico)
- 1 comedero.
- 1 bebedero para hámster.
- 1 quintal de alimento.
- 1 balanza granataria (A:  $\pm 0.1g$ ).
- 1 marcador permanente de punta fina.
- 1 cánula.
- 1 Equipo básico de disección.
- Éter, algodón y embudo de vidrio sin vástago.
- Equipo de protección (guantes, mascarilla, mandil).
- Libreta de apuntes.

#### 6 Parte experimental

##### 6.1 Inicio estudio principal

1. Seleccionar aleatoriamente 4 ratones hembras en perfecto estado de salud.

 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS	<b>ANÁLISIS DE TOXICIDAD ORAL AGUDA          PARA PRODUCTOS NATURALES.          MÉTODO DE ARRIBA Y ABAJO          OCDE 425          PRUEBA PRINCIPAL</b>	CÓDIGO	OP-4.1-05
		VERSIÓN	01
		REVISIÓN	01
		PAGINAS : 3 de 5	

2. Identificar de forma individual a los animales con marcas en sus colas.
3. Pesar y registrar los pesos para cada animal (Anexo 1), considerar este valor como el peso al inicio del estudio.
4. Calcular la dosis real y el volumen de muestra que será administrada al ratón 1 a partir de la dosis de 175 mg/kg de peso.
 
$$\frac{1\text{kg de peso} \times \text{Dosis mg}}{\text{Peso ratón (kg)}} = X$$
5. Administrar la dosis. Si el volumen de administración es mayor que 2 ml/100g fraccionar en dosis pequeñas y administrar en un intervalo no mayor de 24 horas.
6. Observar y registrar signos de toxicidad y signos de moribundez a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 y 48 horas luego de la administración (Anexo 2). Si existe la muerte del animal o no se observa evidencia de toxicidad se administrara una dosis menor o mayor respectivamente a otro animal.
7. Calcular la dosis para el ratón 2. Esta dosis es el resultado del incremento o decremento de la dosis inicial en un factor de 3,2. (Si se requiere una dosis mayor se multiplica por 3.2 o si es menor se divide la dosis inicial para el mismo factor).
8. Observar y registrar cualquier signo de toxicidad o moribundez durante las próximas 48 horas (Anexo 2).
9. Repetir el proceso para los ratones 3 y 4.
10. Pesar y registrar nuevamente a cada animal a los 7 y 14 días de estudio. (Anexo 1).
11. Mantener en observación a todos los animales administrados durante un periodo de 14 días.

## **6.2 Determinar la categoría toxicológica**

Para identificar la categoría toxicológica según GHS se utiliza el software estadístico desarrollado por Westat.

## **6.3 Estudio anatomopatológico**

Permite verificar si él o los principios activos del Producto Natural han afectado a los órganos internos de los ratones.

1. Seleccionar uno por uno y de forma ordenada todos los ratones. Colocar al ratón dentro del embudo de vidrio invertido y sin vástago.
2. Colocar en la parte superior del embudo (donde falta el vástago) una torunda de algodón humedecida con éter etílico.
3. Dejar el algodón hasta que el animal quede completamente inconsciente
4. Tomar al ratón y realizar una dislocación cervical
5. Colocar boca arriba y con sus extremidades sujetas y completamente extendidas en la tabla de disección.
6. Realizar una pequeña incisión en el abdomen del animal con un bisturí N°15 y con la tijera de punta de roma cortar desde la cavidad pélvica a la cavidad torácica.
7. Observar si los órganos internos presentan alteraciones o patologías macroscópicas. En caso de presentar alteraciones realizar el estudio histopatológico.
8. Pesar cada órgano y registrar sus características en la Tabla del Anexo 3. 7

## **Bibliografía**

OECD (2008), Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, París.

Anexo 4. Registros de peso, signos, síntomas, mortalidad y necropsias

**Pesos del Animal de Experimentación a lo Largo del Estudio.**

<b>Método OCDE</b>	<b>425</b>				
<b>Etapas / Dosis (mg/kg):</b>	<b>Cuarentena/ Experimental</b>				
Sexo: F - M	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5
Peso inicial					
Peso 7 días					
Peso 14 días					

**Autor:** Cacarin

**Signos y Síntomas de Toxicidad**

<b>Producto:</b>	<b>Dosis:</b>								
<b>Ratones N°:</b>							<b>Sexo:</b>		
<b>Hora: NA</b>	<b>Fecha:</b>			<b>Edad:</b>					
	<b>TIEMPO POST DOSIS</b>								
<b>Parámetro</b>	<b>30 min</b>	<b>1h</b>	<b>2 h</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>
<b>Ataxia</b>									
<b>Parálisis de las Patas Anteriores</b>									
<b>Erección de la Cola</b>									
<b>Pilo Erección</b>									
<b>Equilibrio</b>									
<b>Micción</b>									
<b>Defecación</b>									
<b>Mortalidad</b>									
<b>Otras Observaciones</b>									

**O:** No hay presencia de actividad

**+**: Presencia moderada de la actividad

**++:** Presencia de la actividad

**Autor:** Cacarin

## Registros de Resultados de la Necropsia Practicada en los Ratones

<b>Método OECD:</b>				
<b>Fecha:</b>				
<b>Dosis:</b>			<b>Sexo:</b>	
	<b>Tamaño, (cm)</b>	<b>Peso, (g)</b>	<b>Color</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Corazón</b>				
<b>Pulmones</b>				
<b>Hígados</b>				
<b>Estómagos</b>				
<b>Intestinos</b>				
<b>Bazo</b>				
<b>Riñones</b>				

**Autor:** Cacarin

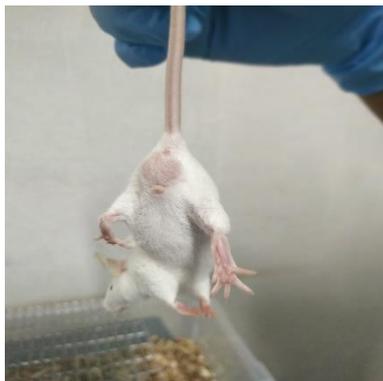
Anexo 5. Desarrollo de la fase experimental



**Preparación de jaulas**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Autoclave de viruta**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Sexado**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



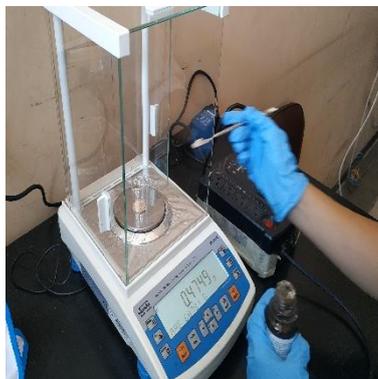
**Identificación**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Pesaje de todos los ratones**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor



**Cantidad de hematoxilina**

**Fuente:** Centro de Química UCE

**Elaboración:** El Autor



**Preparación de las soluciones madre**

**Fuente:** Centro de Química UCE

**Elaboración:** El Autor



**Disoluciones a 5ml**

**Fuente:** Centro de Química UCE

**Elaboración:** El Autor



**Sellado y etiquetado**

**Fuente:** Centro de Química UCE

**Elaboración:** El Autor



**Dosis**

**Fuente:** Bioterio UCE

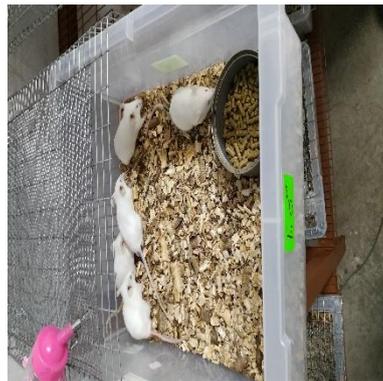
**Elaboración:** El Autor



**Inoculación**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor



**Observación**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor



**Mortalidad post inoculación**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Necropsias mortalidad post inoculación 24 horas**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Necropsias pos inoculación 14 – 15 días.**  
**Fuente:** Bioterio UCE  
**Elaboración:** El Autor



**Necropsias post inoculación 14 – 15 días.**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor



**Pesaje de órganos post inoculación 14 – 15 días.**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor



**Hallazgos de necropsia (Hemotorax)**

**Fuente:** Bioterio UCE

**Elaboración:** El Autor

Anexo 6. Certificado del Comité de Ética de la Universidad Central del Ecuador.

  
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
COMITÉ DE ÉTICA

---

**EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**

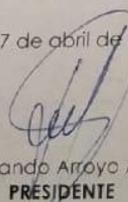
**CERTIFICA:**

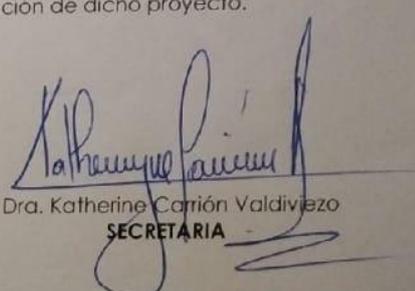
Que, en base al informe de la Comisión de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Proyecto de Investigación presentado por el señor **ROGER LEONARDO TAPIA POZO**, egresado de grado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Código 017-FMV-PG-2019, con el tema:

**"Determinación de la dosis letal 50 (DL) intraperitoneal de Hematoxilina en ratones de laboratorio."**

y una vez analizados los fundamentos metodológicos, éticos y jurídicos del mencionado estudio, se concede la **VIABILIDAD ÉTICA** para la ejecución de dicho proyecto.

Quito, 17 de abril de 2019.

  
Dr. Fernando Arroyo Arellano  
**PRESIDENTE**

  
Dra. Katherine Carrión Valdiviezo  
**SECRETARIA**

*c/c Archivo*

---

Dirección: Ciudadela Universitaria  
Junto a Consejo Universitario

Teléfono: 2904-211 / 2902-192  
E-mail: [comite.etico@uce.edu.ec](mailto:comite.etico@uce.edu.ec)

Anexo 7. Cuadro de Pesos Promedios  $\bar{x}$  (g) de ratones administrados con hematoxilina vía intraperitoneal.

Experimental	Dosis mg/kg	Sexo	Peso $\bar{x}$ sexado	Peso $\bar{x}$ cuarentena	Peso $\bar{x}$ inoculacion	Peso $\bar{x}$ necropsias
Exp.1	5,5	M	26,54	29,34	32,6	33,48
		H	18,28	20,98	22,7	24,46
Exp.2	17,5	M	23,72	27,18	30,26	32,88
		H	20,86	22,56	24,52	26,72
Exp.3	55	M	24,52	27,78	30,62	32,16
		H	21,76	23,46	24,34	25,16
Exp.4	175	M	26,48	27,94	31,6	32,12
		H	22,04	22,58	24,26	25,6
Exp.5	550	M	28,52	31,8	32,62	32,25
		H	22,84	23,74	24,9	25,44
Exp.6	1100	M	21,54	25,1	29,48	31,26
		H	23,62	24,16	25,92	26,33
Exp.7	2000	H	24,74	25,38	27,52	-
		H	31,54	32,46	34,06	33