

VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA *IN VIVO* DEL ÁCIDO ÚSNICO

Elvira Navarro G.^a, Juan Antonio Ávila I.^a, Patricia Mollinedo P.^b, José Luis Vila C.^b, Grace Ruiz P.^a

^aInstituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), Facultad de Ciencias, Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra N°2224, Miraflores, La Paz, Bolivia, ^bInstituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN), Facultad de Ciencias Puras, Universidad Mayor de San Andrés, Campus Cota Cota, La Paz - Bolivia

Keywords: Toxicidad aguda | DL₅₀ | *Usnea spp* | ácido úsnico

ABSTRACT

An experimental study was realized, the main objective was evaluated, toxic effect of usnic acid, isolated from a lichen *usnea spp.* determination of lethal dose at 50% mortality (dl₅₀) throughout reed muench mathematical method and the probit graphical method. The selected animals were albino female swiss mice, weighted between 18 and 20g, using a 2000 mg/kg, 1000 mg/kg, 775 mg/kg, 662 mg/kg, 550 mg/kg and 175 mg/kg by kilogram corporal weight, as dose administrated by orogastric via under study during 14 days. The result comes out a dl₅₀ between 798.47 mg/kg and 776.25 mg/kg. according to the williams criteria, usnic acid is considered a lightly toxic product. The methodology and the experimental designed was carried out following the described orientation by the epa (ambient protection agency) 870.1100, oecd 425 (economic organization for trade and development), that covers the 24 most develop nations of the world, for the application of the acute toxicity class method (cta).

Corresponding author: juan_antonio_avila@hotmail.com

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico del ácido úsnico, aislado de una especie liquénica, *Usnea spp.* mediante la determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀), a través del método matemático de Reed Muench y por el método gráfico de Probit. Los animales seleccionados fueron ratones Swiss albinos hembras, con un peso comprendido entre 18 y 20 g, empleando dosis de 2000 mg/kg, 1000 mg/kg, 775 mg/kg, 662 mg/kg, 550 mg/kg y 175 mg/kg, administradas por vía orogástrica, realizándose observaciones durante 14 días. Los resultados según el método matemático de Reed Muench y el gráfico de Probit mostraron una DL₅₀ de 798,47 mg/kg y 776,25 mg/kg, respectivamente. Según el criterio de Williams el ácido úsnico es considerado un producto ligeramente tóxico. La metodología y el diseño experimental se llevó a cabo siguiendo la orientación descrita por la norma EPA (Agencia de Protección Ambiental) 870.1100, OECD 425 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo), que abarca las 24 naciones más desarrolladas del mundo, para la aplicación del método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA).

INTRODUCCION

Las plantas, las bacterias y los hongos al igual que el hombre, tienen células que guardan en su interior gran diversidad de sustancias que se vuelven objetos de estudio en la producción de medicamentos nuevos en busca de soluciones para la cura de enfermedades. Además de combatir las enfermedades emergentes, es necesario vencer las resistencias a los tratamientos actuales contra, el paludismo, la leishmaniasis, el chagas y las infecciones bacterianas. En la investigación terapéutica, la necesidad de descubrir nuevos tratamientos es imperiosa. De ahí el interés de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración. El ácido úsnico es un metabolito secundario obtenido de un liquen del género *Usnea spp.*, colectada en la localidad de Pazña (Oruro-Bolivia) al cual se le atribuye una variedad de usos medicinales como antibacteriano, antifúngico y sobre todo leishmanicida, con un efecto citotóxico *in vitro* mínimo. La búsqueda bibliográfica revela que hasta la fecha, no se realizaron estudios toxicológicos que evalué su inocuidad. El presente trabajo se lleva a cabo a fin de determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) del ácido úsnico en ratones Swiss albinos hembras por vía orogástrica.

RESULTADOS

Peso Corporal

Respecto al peso corporal se observó un incremento normal hasta la finalización del ensayo.

Observación de Signos Clínicos

La evaluación de los signos clínicos incluyó la relación entre los ratones tratados y no tratados durante todo el ensayo. Todos los parámetros evaluados permanecieron normales durante el período de ensayo hasta la dosis de 775 mg/kg (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla de Irwing – Test Principal

Producto: Ácido úsnico		Dosis:775 mg/kg							
Ratones N° 3		Peso: 18.4 g		Sexo: Hembras		Edad:	6 semanas		
Hora de administración 10:30 am		Fecha:04/05/2010							
		Tiempo Post Dosis							
Parámetro	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	7 días	14 días
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parálisis de las patas anteriores	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parálisis de las patas posteriores	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reacción de Alarma	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Palidez	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erección de la cola	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerección	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equilibrio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micción	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecación	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Act. Motora	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflejo corneal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test de la Chimenea (neuromuscular)	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Otras observaciones									

O = No hay presencia de la actividad

+ = Presencia moderada de la actividad

++ = Presencia de la actividad

Tabla 2. Mortalidad y supervivencia en ratones Swiss albinos hembras

Dosis mg/kg	Muertos	Vivos	Vivos Acumulados	Muertos Acumulados	Vivos + muertos acumulados	Porcentaje Mortalidad
175	0	3	6	0	6	0
550	0	3	6	0	6	0
662	0	3	5	0	5	0
775	1	2	2	1	2	33.3
1000	3	0	0	4	2	100
2000	3	0	0	6	0	100

Método matemático Reed Muench:

Se determina en base a la siguiente relación:

$$\text{Log DL}_{50} = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log A}$$

A = Dosis superior / Dosis inferior

$$A = \frac{2000}{175}$$

$$A = 11,43$$

Remplazando:

$$\text{Log DL}_{50} = \text{Log } 175 + 0,5 \times \text{Log } 11,43$$

$$\text{Log DL}_{50} = 2,9$$

$$\text{DL}_{50} = 798,47 \text{ mg/kg}$$

B = 50 - % inferior / % superior - % inferior

$$B = \frac{50-0}{100-0}$$

$$B = 0.5$$

Método gráfico Probit Vs Log:

El método gráfico de Probit muestra 2,89 del Log de la dosis por lo tanto la DL₅₀ es de 776,25 mg/kg (Figura1)

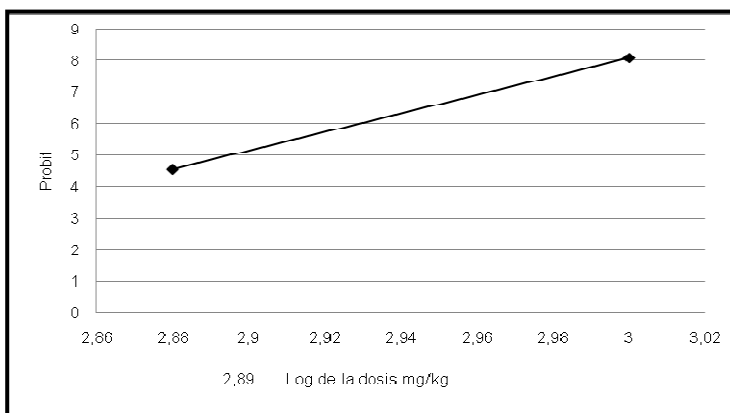


Figura 1 Método gráfico Probit Vs. Logaritmo de la dosis para la determinación de la DL₅₀ del ácido úsnico

Clasificación de tóxicos según criterios de Williams (1985)

La DL₅₀ es de 798,47 mg/kg por el método matemático de Reed Muench y por el método gráfico de Probit es de 776,25 mg/kg por lo tanto según el criterio de Williams el ácido úsnico es considerado un producto ligeramente tóxico (tabla 3)

Tabla 3 Clasificación de tóxicos CYTED

Clasificación de tóxicos	DL ₅₀ mg/Kg (ratones vía oral)
Extremadamente tóxica	≤ 1
Altamente tóxica	≤ 50
Moderadamente tóxica	≤ 500
Ligeramente tóxica	≤ 5000
Prácticamente no tóxica	≤ 15000
Relativamente inocuo	≥ 15000

DISCUSION

En la evaluación de la toxicidad aguda se observa según la tabla de Irwing que mide el efecto sobre el SNC, una mortalidad por encima de la dosis de 1000 mg/kg donde los signos clínicos muestran ataxia a las 4 horas, lo que significa que el ácido úsnico tenga un efecto depresor sobre SNC, y no se evidencia a menores dosis.

El test de la Chimenea que evalúa la actividad sobre el sistema neuromuscular refuerza el test de Irwing que muestra actividad depresora por encima de 1000 mg/kg. La tabla de Williams publicada en el Manual de Técnicas de Investigación CYTED 1995 para productos naturales administrados por vía orogástrica permite clasificar al ácido úsnico con una DL_{50} 776,25 mg/kg según el método de Probit y una DL_{50} 798,47 mg/kg según el método matemático de Reed Muench como ligeramente tóxico ≤ 5000 mg/kg, esta clasificación avala los resultados obtenidos.

SECCION EXPERIMENTAL

Material Vegetal

El líquen *Usnea spp* fue colectado en el altiplano boliviano en Pazña – Oruro (18 -19° S y 77° W, a 3.800 metros sobre el nivel del mar). La clasificación taxonómica del líquen fue realizada por el Herbario Nacional de Bolivia. Fueron pulverizados 61,0 g del material seco y tratados con acetona a temperatura ambiente por 72 horas, para luego concentrar el extracto al vacío hasta obtener un extracto crudo (12,8 g). Posteriormente se lavó varias veces con CH_2Cl_2 . El extracto CH_2Cl_2 proporcionó un producto sólido amarillo, denominado ácido úsnico, con un rendimiento de 2,1 % y una pureza de 99 %.

Ensayos biológicos

El ensayo se inició con el test límite, seguido de un test principal, la sustancia se administró mediante cánulas por vía orogástrica a una dosis por única vez, durante el período de administración se controló y observó los cambios de comportamiento de los animales, mediante la tabla de Irwing, paralelamente se comparó al grupo control que recibió el vehículo (agua).

Selección de los Ratones

Ratones Swiss albinos (hembras) máximo 3 ratones por test, con una masa corporal de 18 a 20 g, no debe diferir del 20 % del peso promedio del grupo.

Los ratones deben estar en ayunas de 12 horas con agua *ad libitum* mantenidos en ambientes aclimatados a una temperatura de $20 \pm 2^\circ C$, con una humedad relativa entre 30 y 70 % y ciclos de luz/oscuridad 12/12.

Test límite

Para la determinación del test límite se procedió con la administración de una dosis de 2000 mg/kg de ácido úsnico disuelto en agua, por vía orogástrica a 3 ratones hembras, los volúmenes de administración no excedieron los 100 μL . Se procedió a la evaluación mediante la tabla de Irwing, posteriormente se procedió a realizar el test principal.

Test principal

Se conformó el grupo experimental constituido por 3 ratones hembras por grupo de dosis. El primer grupo recibió una dosis de 1000 mg/kg, el segundo 775 mg/kg, el tercero 662 mg/kg, el cuarto 550 mg/kg y último grupo fue de 175 mg/kg por vía orogástrica, el volumen administrado no excede los 100 μL /ratón. Se evaluó según la tabla de Irwing, que mide la actividad sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), además se incluyó el test de la Chimenea que mide actividad neuromuscular.

Evaluación del ensayo

La evaluación incluyó la relación que puede existir entre los ratones tratados y grupo control que recibió el vehículo (agua), observándose la incidencia y severidad de respuestas anormales clínicas y de comportamiento y si estas son reversibles, cambios en el peso corporal, mortalidad y cualquier otro efecto tóxico. Los ratones fueron observados individualmente a los 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 7 días hasta los 14 días. Las observaciones están dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos y síntomas de toxicidad: Ataxia, parálisis de patas anteriores y posteriores, alarma, piloerección, equilibrio, palidez, erección de la cola, actividad motora, reflejo corneal y mortalidad. El test de la chimenea está dirigido para evaluar actividad neuromuscular, incluyendo su inicio y duración, además se controla el peso de los ratones durante el ensayo.

Determinación de la DL_{50} - método Reed Muench

La DL_{50} se determinó a través del método de Reed Muench basándonos en los datos de los ratones vivos y muertos en todas las dosis. Por lo cual la distribución de la frecuencia de los valores se conoce también como la distribución de tolerancia; la media de esta distribución es la dosis letal media.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) de la Facultad de Ciencias Puras- UMSA, al Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas - UMSA, por los reactivos biológicos proporcionados.

REFERENCIAS

1. Ríos Terán Cecilia. Evaluación de la actividad citotóxica del ácido úsnico en células BHK-21, Hep-2, MDCK y en células de sangre periférica humana. Tesina de Licenciatura. La paz - Bolivia: Instituto de Investigación Fármaco-Bioquímicas; Universidad Mayor de San Andrés; 2009
2. Scirpa P , Scambia G , Masciullo V , Battaglia F , Foti E , Lopez R , Villa P. Malecore M, Mancuso S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. *Minerva Ginecol*, 1999; 51;6; 255-60
3. Cocchietto M , Skert N , Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002; 89: (4) 137-46
4. Markey C.M. The development of Acute Toxicity in mouse study. *Biol. Repro* 2001; 65:1215-1223.
5. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline no. 425: Acute Oral Toxicity- Up-and-Down Method. Approved: June 1998. (Definitions for reference dose and threshold); 1998; 6-8.
6. Ariens E.J. Introduction to General Toxicology. Acute Toxicity University of Washington USA; 2005; 234-236.
7. Stewart C.H, Newton P.; Expanded acute toxicity study in rats and dogs.mpi research proposal 2004; 128: 2-3.
8. Alemán C, Mesa R, Noa M, Rodeiro I, Menéndez R, Gamez R.; Toxicología aguda del D 002 en dos especies no roedoras. *Rev. CENIC Cien. Biol* 2001; 32(1):51-55.
9. Schlede E, Mischke U, Diener W, Kayser D.; The International Validation Study of the Acute Toxic Class Method (oral). *Arch. Toxicol* 1995; 69: 659-670.
10. Auletta C. Acute Systemic Toxicity Testing. In: *Product Safety Evaluation Handbook*: Ed. Gad S.C.; Ed. Marcel Dekker, Inc. U.S; 1999; 43-86.
11. Gámez R, Más R, Noa M, Menendez R. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. *Toxicol Letters* 2000; 118:31-41.
12. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Guideline no. 420: Acute oral toxicity class method, Paris; 2002; 5-6.
13. Repetto M. Toxicología Fundamental. Toxicología Experimental. Toxicidad Aguda. Tercera Edición. Editado por ENPSES-MERCIE GROUP, España; 2002; 295-298
14. Gonzales Eduardo, Ávila Juan A., Arias Juan L., Torrico Bernardo, Contribución al estudio de la plunbagina determinación de la dosis letal media, *Biofarbo*; Vol. IV; 1995; 63-66.