

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS (90
DIAS) POR VIA ORAL DEL CONCENTRADO DE PROTEINA DE
POTA (*Dosidicus gigas*), EN RATAS SPRAGUE DAWLEY”**

**Presentado por
DANIEL PERCY ROJAS HURTADO**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2009

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS (90
DIAS) POR VIA ORAL DEL CONCENTRADO DE PROTEINA DE
POTA (*Dosidicus gigas*), EN RATAS SPRAGUE DAWLEY”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presentado por
DANIEL PERCY ROJAS HURTADO**

Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado:

**Mg. Sc. Carlos Elías Peñafiel
PRESIDENTE**

**Dra. Patricia Glorio Paulet
PATROCINADORA**

**Mg. Sc. Elva Ríos Ríos
MIEMBRO**

**Mg. Sc. David Roldán Acero
MIEMBRO**

**Lima – Perú
2009**

INDICE GENERAL

	Pág
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO PRINCIPAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA POTA	3
2.1.1 Clasificación taxonómica	3
2.1.2 Composición química y nutricional	3
2.2 CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO	6
2.2.1 Definición	6
2.2.2 Proceso de fabricación	7

2.3	CONCENTRADO DE PROTEINA DE POTASSIO	8
2.4	FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA	12
2.4.1	Factores implicados en la intoxicación	13
a.	Carácter tóxico del agente xenobiótico	13
b.	Sistema biológico	14
c.	Vía o ruta de absorción	14
d.	Tiempo de interacción del agente tóxico	16
e.	Excreción del agente tóxico	17
2.5	PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN	18
2.5.1	Panorama general	19
2.5.2	Absorción	20
a.	Reacciones de Fase I	20
b.	Reacciones de Fase II	20
2.6	DESCRIPCIÓN DE ÓRGANOS FRECUENTEMENTE EVALUADOS PARA OBSERVAR DAÑOS POR PRODUCTOS TOXICOS	21
2.6.1	Los Riñones	21
a.	Generalidades	21
b.	La Nefrona	21
c.	Corpúsculo renal	22
d.	Cortes histológicos de la corteza renal	24
2.6.2	El Hígado	25
a.	Generalidades	25
b.	El hígado degrada fármacos y toxinas	26
c.	Lobulillos Hepáticos	26
2.6.3	Los Pulmones	28
2.7	RELACIÓN DOSIS RESPUESTA	30
2.7.1	Dosis letal media (DL50)	31
2.7.2	Respuesta Acumulativa	31

2.8	DOSIS LETAL MEDIA Y MÉTODOS ALTERNATIVOS	33
2.9	ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE DOSIS REPETIDAS	36
2.10	TOXINAS EN PECES Y MARISCOS	37
2.10.1	Tetradotoxina	39
2.10.2	Ciguatera	39
2.10.3	Toxina paralizante de moluscos bivalvos (PSP)	40
2.10.4	Toxina diarreica de moluscos bivalvos	41
2.10.5	Toxina neurotóxica de moluscos bivalvos	41
2.10.6	Toxina amnésica de moluscos bivalvos	41
2.10.7	Histamina	42
III	MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	43
3.2.	MATERIA PRIMA	43
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	43
3.3.1	Para la instalación del bioterio	43
3.3.2	En la administración por vía orogástrica de proteína de pota	43
3.3.3	En el sacrificio de los ratones	44
3.3.4	Para los ensayos bioquímicos y hematológicos	44
3.3.5	En la preparación de cortes histológicos	44
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS Y PROCEDIMIENTO	44
3.4.1.	Preparación del Concentrado de Proteína de Pota	44
3.4.2	Análisis Sensorial del Concentrado de Proteína de Pota	47
3.4.3	Composición química proximal	48
3.4.4	Toxicidad a Dosis repetidas por 90 días	48
a.	Exámenes hematológicos	49
b.	Bioquímica clínica	49

b.1.	Determinación de Albúmina	49
b.2	Determinación de Creatinina	50
b.3	Determinación de la Actividad Transaminasa	50
c.	Análisis Anatomopatológico	51
d.	Análisis histopatológico	51
3.5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	51
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1.	DE LA MATERIA PRIMA	53
4.1.1.	Evaluación Sensorial del Concentrado de Proteína de Pota Composición	53
4.1.2	química proximal	53
4.2.	TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS POR 90 DÍAS	54
4.2.1.	Evaluación del Peso Corporal	57
4.2.2	Bioquímica Clínica	59
a.	Albúmina	59
b.	Creatinina	61
c.	Actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)	62
4.2.3	Indicadores Hematológicos	64
a.	Hemoglobina	65
b.	Hematocrito	66
c.	Leucocitos	67
c.1.	Linfocitos	71
c.2.	Neutrófilos segmentados	72
c.3.	Neutrófilos abastoados	73
c.4	Monocitos	74
c.5	Eosinófilos	75
4.2.4	Estudio Anatomopatológico	76

a.	Evaluación del Peso de los órganos	77
b.	Evaluación Macroscópica de los órganos	79
4.2.5	Estudio Histopatológico	81
a.	Tejido Renal	81
b.	Tejido Hepático	87
c.	Tejido Pulmonar	93
V	CONCLUSIONES	99
VI	RECOMENDACIONES	100
VII	BIBLIOGRAFÍA	101
VIII	ANEXOS	107

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Composición química proximal del manto de la pota	4
2	Aminoácidos detectados en el músculo del manto de la pota	4
3	Contenido de ácidos grasos en el manto de la pota	5
4	Contenido de macroelementos en el manto de la pota	6
5	Especificaciones técnicas para los CPP	7
6	Resultados del análisis sensorial de la harina de pota precocida.	8
7	Composición química proximal del concentrado de proteína de pota	9
8	Resultados del análisis microbiológico del concentrado de proteína de pota	9
9	Contenido de ácidos grasos en el concentrado de proteína de pota	10
10	Perfil de Aminoácidos en el concentrado de proteína de pota	11
11	Vías o rutas de administración y su velocidad de absorción	15
12	Rango de toxicidad aguda	31
13	Clasificación de la Toxicidad	32
14	Intoxicaciones de origen marino	38
15	Evaluación Sensorial para Concentrado de Proteína de Pota	47
16	Dosis administradas a los grupos	49
17	Composición química proximal del Concentrado de Proteína de Pota	53
18	Variación del peso corporal de las ratas tratadas con diferentes dosis del Concentrado de Proteína de Pota	57
19	Variación Semanal del peso corporal de las ratas (g) tratadas con el Concentrado de Proteína de Pota	58

20	Indicadores Bioquímicos para cada tratamiento al finalizar el estudio y datos basales antes del tratamiento	59
21	Indicadores Hematológicos para cada tratamiento al finalizar el estudio y datos basales antes del tratamiento	65
22	Porcentaje (%) del peso de los órganos versus el peso del animal tratadas con diferentes dosis del Concentrado de Proteína de Pota	77
23	Características macroscópicas de los órganos de los grupos con tratamiento y el grupo control	80
24	Cambios histopatológicos de los riñones según dosis de Concentrado de Proteína de Pota	82
25	Cambios histopatológicos del Hígado según dosis de Concentrado de Proteína de Pota	87
26	Cambios histopatológicos de los Pulmones según dosis de Concentrado de Proteína de Pota	93

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Vías de administración de xenobióticos (absorción)	15
2	Principales vías de excreción y absorción de xenobióticos	19
3	Corte Esquemático del Riñón	21
4	Componentes de una nefrona	22
5	Corpúsculo renal	23
6	Vista panorámica de la corteza renal	24
7	Región cortical del riñón	25
8	Microfotografía del hígado	28
9	Principales ramificaciones del Aparato Respiratorio	29
10	Diagrama del flujo del proceso de elaboración del concentrado de proteína de pota	45
11	Metodología Experimental	52
12	Concentrado de Proteína de Pota	54
13	Valores promedio de la albúmina al inicio y al final de la investigación	61
14	Valores promedio de la creatinina al inicio y al final de la investigación	62
15	Valores promedio de la TGP al inicio y al final de la investigación	64
16	Valores promedio de la Hemoglobina al inicio y al final de la investigación	66
17	Valores promedio de Hematocrito al inicio y al final de la investigación	67
18	Valores promedio de los Leucocitos al inicio y al final de la investigación	68
19	Variaciones diferenciales promedio de los Leucocitos granulocitos y agranulocitos	70

20	Valores promedio de los Linfocitos al inicio y al final de la investigación	71
21	Valores promedio de los Segmentados al inicio y al final de la investigación	72
22	Valores promedio de los Abastionados al inicio y al final de la investigación	73
23	Valores promedio de los Monocitos al inicio y al final de la investigación	64
24	Rata control después del sacrificio para realizar el análisis de los órganos	76
25	Muestras de Hígado, Riñón y Pulmones de los Grupos tratados	77
26	Porcentaje del peso del Hígado (versus el peso del animal) promedio de los grupos	78
27	Porcentaje del peso del Riñón (versus el peso del animal) promedio de los grupos	78
28	Porcentaje del peso del Pulmón (versus el peso del animal) promedio de los grupos	79
29A	Tejido renal de aspecto normal de rata de grupo I (Dosis 500 mg/Kg). Corpúsculo Renal (CR). (4X HE)	83
29B	Tejido renal de aspecto normal de rata de grupo I (Dosis 500 mg/Kg) a mayor aumento. Corpúsculo Renal (CR). (10X HE)	83
29C	Corpúsculo Renal (CR) de rata de Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. (40X HE).	84
30A	Tejido Renal de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (4X HE)	84
30B	Tejido Renal de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (10X HE).	85
30C	Corpúsculo Renal (CR) de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (40X HE)	85
31	Tejido Renal de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. (10X HE)	86
32	Tejido Renal de rata Grupo IV (Control). (10X HE)	86
33A	Tejido hepático de aspecto normal de rata de Grupo I (Dosis 500 mg/Kg). (4X HE)	89
33B	Tejido hepático de aspecto normal de rata de Grupo I (Dosis 500 mg/Kg). (10X HE)	89
33C	Tejido hepático de aspecto normal de rata de Grupo I (Dosis 500 mg/Kg). (40X HE)	90
34A	Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (4X HE)	90

34B	Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (10X HE)	91
34C	Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (40X HE)	91
35	Tejido hepático de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. (10X HE)	92
36	Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo IV (Control). (10X HE)	92
37A	Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. (4X HE)	95
37B	Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. (10X HE)	95
37C	Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. (40X HE)	96
38A	Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (4X HE)	96
38B	Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (10X HE)	97
38C	Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. (40X HE)	97
39	Tejido pulmonar de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. (10X HE)	98
40	Tejido pulmonar de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. (10X HE)	98

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Título	Pág.
1	Informe de la Prueba Piloto realizada en ratas y ratones	108
2	Resultados Bioquímicos y Hematológicos iniciales (Datos Basales)	114
3	Resultados Bioquímicos y Hematológicos Finales (90 días tratamiento)	115
4	Incremento de peso corporal	116
5	Variación del peso corporal (g) de las ratas	117
6	Fotos de Extracción de la sangre de las ratas para los análisis Bioquímicos y Hematológicos	118
7	Evaluación estadística del incremento de peso	120
8	Evaluación estadística de la variación semanal del peso corporal de las ratas	121
9	Evaluación estadística de los indicadores bioquímicos	130
10	Evaluación estadística de los indicadores hematológicos	132
11	Evaluación estadística del peso de los órganos	136
12	Conclusiones del Informe Histopatológico del Médico Daniel Carrera	138
13	Composición nutricional para alimentos de ratas	139

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el potencial tóxico del concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) que viene desarrollando la Facultad de Pesquería de la UNALM, fue evaluado mediante el estudio de toxicidad de dosis repetidas a 90 días en ratas *Sprague Dawley*. Los métodos empleados fueron los descritos por las normas OECD. Se conformaron cuatro grupos a los cuales se les administró por vía oral durante tres meses la dosis de 500 mg/kg/día (grupo I), 1000 mg/kg/día (grupo II) y 2000 mg/kg/día (grupo III) del producto y solución salina fisiológica al grupo IV (control). Se realizó diariamente el control del peso corporal y exámenes físicos no mostrando alteraciones en el comportamiento de los animales tratados y se observó un incremento similar en todos los grupos de tratamiento respecto al control. Se determinaron algunos índices bioquímicos y hematológicos, sin que se encontrarán efectos de toxicidad atribuibles a la administración del producto. Se realizaron los estudios anatomopatológicos (por inspección macroscópica) e histopatológico del hígado, los riñones y los pulmones. La inspección de los órganos no evidenció alteraciones macroscópicas en el hígado y en los riñones pero si en los pulmones. Los resultados del estudio histopatológico mostraron lesiones en los pulmones (infiltrado inflamatorio, grados variables de atelectasia, cuadros de neumonía y bronconeumonía), no así en el hígado ni en los riñones. Las lesiones en los pulmones se presentaron aleatoriamente en todos los grupos, incluido el control, por lo que se puede afirmar que su aparición no estuvo relacionada con el tratamiento del producto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que el consumo diario del concentrado de proteínas de pota desarrollado en la UNALM, no producen alteraciones que puedan atribuirse a efectos tóxicos en ratas

Palabras clave: Concentrado de Proteína de Pota, toxicidad de dosis repetidas, ratas *Sprague Dawley*.

I. INTRODUCCIÓN

El calamar gigante o pota (*Dosidicus gigas*), es una especie pelágica oceánica que realiza migraciones hacia la costa relacionadas con procesos de alimentación y reproducción. Tiene una amplia distribución en el Pacífico Oriental, desde México hasta Chile, y las áreas de mayor concentración se ubican frente a las costas de Perú y México.

La Pota, es un recurso hidrobiológico de gran abundancia en nuestro País y de bajo precio en el mercado por lo que diferentes investigadores vienen trabajando en darle un valor agregado para poder generar mayores utilidades, además de ser una excelente fuente de proteína animal que podría ayudar a mejorar los niveles de desnutrición de la población en pobreza total y pobreza extrema.

Los diferentes gobiernos del Estado Peruano e instituciones de ayuda internacional, han venido desarrollando programas de asistencia alimentaría en el marco de la lucha contra la pobreza y la desnutrición. Estos programas tienen como una de sus principales actividades el reparto de sustitutos lácteos (papillas lácteas) a sus beneficiarios, las mismas que tienen a la leche en polvo como principal fuente de proteína animal, lo cual hace que estos productos tengan un elevado precio. Además, considerando que estos programas van dirigidos a la población que se encuentra en situación de pobreza y de pobreza extrema, según estadísticas del INEI (2003) al año 2002, el 54.3 por ciento de la población peruana era pobre, del cual el 23.9 por ciento se encuentra en pobreza extrema (en la sierra el 69.9 por ciento de la población es pobre y 43 por ciento se encuentra en pobreza extrema) y que nuestro país no cuenta con los suficientes recursos económicos para llevar la ayuda a toda esta población (lo que obliga, en cierta medida, a minimizar los costos de esta clase de programas) se debe buscar fuentes de proteína animal de bajo costo para este tipo de productos, de iguales o mejores características nutricionales que la leche en polvo.

Es por ello que la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), viene desarrollando estudios de un concentrado de proteína de pota con la finalidad de sustituir parcialmente las fuentes de proteína tradicional como son la leche en polvo y las proteínas del huevo. Se han obtenido concentrado de proteína de pota cuyos valores de proteína alcanzan el 86 por ciento (Lazo, 2006).

No existen antecedentes de estudios de toxicidad del concentrado de proteína de pota por ser un producto nuevo, es por ello que antes de utilizar esta nueva fuente proteica se decidió estudiar algún posible efecto toxicológico del producto en su consumo por los seres humanos como una medida de seguridad alimentaría.

1.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la toxicidad a dosis repetidas (90 días) del concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) elaborado en la UNALM en ratas *Sprague Dawley*.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la patología clínica (análisis bioquímico y hematológico), con la finalidad de determinar si existen cambios significativos con respecto al grupo control.
- Evaluar los resultados histopatológicos con la finalidad de determinar si existen cambios significativos con respecto al grupo control.
- Determinar el efecto de la administración del concentrado de proteína de pota sobre el peso vivo en ratas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA POTA

2.1.1 Clasificación taxonómica

Carrillo (1996), señala que la pota o calamar gigante presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Phyllum	:	Mollusca
Clase	:	Cephalopoda
Subclase	:	Coloidea
Orden	:	Teuthoidea
Suborden	:	Oegopsidae
Familia	:	Ommastrephidae
Subfamilia	:	Ommastrephinae
Genero	:	Dosidicus
Especie	:	<i>Dosidicus gigas</i>
Nombre común	:	Calamar gigante

2.1.2 Composición química y nutricional

La carne del calamar gigante es rica en proteínas así como el pescado de carne blanca. En su composición tiene todos los aminoácidos esenciales, además de tener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales juegan un rol importante en la dieta, protegiendo a los adultos mayores de los problemas cardiovasculares (Kreuzer, 1984).

Asimismo, el calamar gigante es recomendado en la dieta de niños debido a la presencia de lisina, la cual es vital para el crecimiento (Bravo, 2001).

En el Cuadro 1 se puede observar los valores de la composición química proximal de la carne de pota, según diferentes autores.

Cuadro 1: Composición química proximal del manto de la pota

COMPONENTES	Músculo ¹ %	Músculo ² %	Filete con piel ³ %	Filete sin piel ⁴ %
Humedad	81.10	80.36	85.30	84.00
Proteína cruda	16.00	17.45	12.10	12.70
Grasa cruda	1.10	0.68	1.40	1.60
Ceniza		1.44	1.10	1.40
Carbohidratos	0.0	0.50	0.10	0.30
Sales minerales	1.70			

Fuente: 1 IMARPE - ITP (1996); 2 Bravo (2001); 3 y 4 Pedreschi (1993).

En el cuadro 2 se pueden apreciar los aminoácidos hallados en el manto de la pota.

Cuadro 2: Aminoácidos detectados en el músculo del manto de la pota

AMINOACIDOS	MUSCULO	FRACCION MIOFIBRILAR	FRACCION SARCOPLASMATICA
Ac, Aspartico	+	-	-
Serina	+	+	+
Treonina	+	-	-
Ac. Glutámico	+	+	+
Prolina	+	-	+
Glicina	+	+	+
Alanita	+	+	+
Cisterna	+	-	+
Valina	-	-	-
Metionina	+	-	-
Leucina	+	-	+
Isoleucina	+	-	-
Tirosina	+	+	-
Fenilalanina	+	+	+
Lisina	+	-	+
Histidina	-	-	-
Arginina	+	+	+
Triptófano	+	-	-

Fuente: Pedreschi (1993).

IMARPE - ITP (1996) afirman que la carne de la pota posee los ácidos grasos de mayor importancia nutricional, el Docosahexanoico (DHA) y Eicosapentanoico (EPA), ambos omega - 3.

En el Cuadro 3 se muestran los ácidos grasos presentes en la grasa de pota. Como se puede observar, contiene altos porcentajes de ácidos grasos omega - 3.

Cuadro 3: Contenido de ácidos grasos en el manto de la pota

ACIDO GRASO		%
C14:0	Mirístico	1.40
C15:0	Palmitoleico	0.50
C16:0	Palmítico	19.90
C16:1	Palmitoleico	Traz.
C17:0	Margárico	Traz.
C18:0	Estearico	3.50
C18:1	Oleico	4.00
C18:2	Linoleico	Traz.
C18:3	Linolénico	Traz.
C20:0	Araquídico	6.40
C20:1	Eicosaenoico	Traz.
C20:3	Eicosatrienoico	0.20
C20:4	Araquidónico	Traz.
C20:5	Eicosapentanoico	16.70
C22:3	Docosatrienoico	0.20
C22:4	Docosatetraenoico	0.30
C22:5	Docosapentaenoico	0.20
C22:6	Docosahexaenoico	46.90

Fuente: IMARPE - ITP (1996).

En cuanto a los minerales, determinaron que el mayor contenido de éstos está dado por el potasio, seguido del sodio, magnesio y calcio (Cuadro 4).

Cuadro 4: Contenido de macronutrientes en el manto de la pota

MACROELEMENTOS	
Sodio (mg/100g)	198.20
Potasio (mg/100g)	321.90
Calcio (mg/100g)	9.10
Magnesio (mg/100)	45.60

Fuente: IMARPE - ITP (1996).

2.2 CONCENTRADO PROTEICO DE PESCADO

2.2.1 Definición

Suzuki (1987) define a los concentrados proteicos de pescado de la siguiente manera: harina de pescado, que va a ser utilizada como alimento, se obtiene con métodos higiénicos a partir de grandes cantidades de especies heterogéneas. Esto da como resultados un producto nutritivo e higiénico para consumo humano, que se llama “concentrado de proteína de pescado”, no extraído con solventes (CPP tipo B). Otro tipo es el concentrado de proteína sometido a procesos de extracción con solventes. Indica que es así como se obtiene dos tipos de concentrado proteico de pescado: “CPP tipo A”, el cual es más puro que el “CPP tipo B”. Los dos son altamente nutritivos pero mientras el tipo B carece de palatabilidad, el tipo A es demasiado caro para suplementar la deficiencia proteica de las regiones del mundo más pobres y carece de la aceptación comercial para ser usada con otros alimentos en países avanzados. Los concentrados proteicos carecen de capacidad de rehidratación lo cual crea dificultades a la hora de ser procesados con otros alimentos. La definición más simple de concentrado proteico de pescado es la propuesta por Madrid *et al.*, (1994) que dice que los concentrados proteicos de pescado son básicamente harinas de pescado aptas para el consumo humano.

En el Cuadro 5 se muestran las exigencias técnicas para los concentrado proteicos tipo A (sometidos a la extracción de grasas con solventes) y el tipo B (sin extracción de grasas).

Cuadro 5: Especificaciones técnicas para los Concentrados Proteicos de Pescado (CPP)

DESCRIPCIÓN	TIPO A	TIPO B
Proteína	Mín. 75%	Mín. 60%
Humedad	Máx. 10%	Máx. 10%
Grasa	Máx. 0.5%	Sin límite
Ceniza	Máx. 15%	Máx. 20%
Arena	Máx. 0.5%	Máx. 0.5%
Flúor	Máx. 250 ppm	Máx. 250 ppm
Lisina disponible (respecto a la proteína)	Mín. 6.5%	Mín. 6.5%
Bacterias:		
- Bacterias totales/g	Máx. 10 ⁴	Máx. 10 ⁵
- Bacterias coliformes totales/g (37°C)	Ausencia	Máx. 10 ²
- Bacterias coliformes fecales/g (44°C)	Ausencia	Máx. 10
- Enterococos/g	Ausencia	Máx. 10 ²
- <i>Salmonella</i> /g	Ausencia	Ausencia
- Bacterias desdobladoras de lecitina/g	Ausencia	Máx. 10 ²
- Clostridios sulfito reductores/g	Ausencia	Máx. 10 ²
Olor y sabor	Inodoro, insípido	Amplio margen

Fuente: Madrid *et al.* (1994).

2.2.2 Proceso de fabricación

Los principales procedimientos para la elaboración de los Concentrados Proteicos de Pescado (CPP), fueron desarrollados entre 1950 y 1970. La mayor parte de estos procedimientos incluye el empleo de un solvente orgánico o una mezcla de solventes. Los principales procesos de fabricación de CPP se efectúan con isopropanol, etanol, dicloroetileno y hexano. Por razones de seguridad se ha limitado el empleo de solventes muy volátiles (hexano, éter de petróleo), que por otro lado están prohibidos en barcos de captura. Se han efectuado estudios con dodecilsulfato de sodio (S.D.S), también llamado laurilsulfato de sodio, en Chile y Escocia (Caiozzi *et al.*, 1968 y Connell, 1969 mencionados por Lazo, 2006).

Roldán (2002) elaboró una harina precocida a partir de surimi de falso volador (*Prionotus stephanophrys*). El producto obtenido fue de alto contenido de proteínas y bajo en grasa; sin embargo, según los resultados de la evaluación sensorial al que fue sometido, presentó ligero olor y sabor residual de pescado, lo cual lo podría catalogar como un concentrado proteico de pescado de tipo B.

Lazo (2006) elaboró un concentrado de proteína a partir de pota precocida. Dicho producto elaborado por la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), fue el que se ha evaluado en la investigación. En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la evaluación sensorial realizada al concentrado de proteína de pota. Estas características se mantienen inalterables hasta los 90 días de almacenamiento, a temperatura ambiente.

Cuadro 6: Resultados del análisis sensorial del concentrado de proteína de pota.

CARACTERÍSTICAS	1º DÍA	90º DÍA
Color	Blanco lechoso	Blanco cremoso
Olor	Agradable y suave, sin olor a pota	Agradable y suave, tenue olor a pota
Sabor	Agradable y neutro; sin sabor a pota	Agradable, tenue sabor a pota
Textura	Suave al tacto y pulverulenta	Suave al tacto y pulverulenta

Fuente: Lazo (2006).

2.3 CONCENTRADO DE PROTEINA DE POTA

Es una proteína concentrada en polvo, de consumo humano directo, con un valor biológico del 90%, con una concentración de 86% de proteína y 3% de grasas (40% de las cuales son omega 3 y 6). Se obtiene de la fracción muscular de la pota (*Dosidicus gigas*) y en su proceso no se utiliza la piel, vísceras, cartílagos ni tentáculos y se elabora sin el uso de solventes ni agentes químicos de ninguna especie (Roldan y Lazo, 2005).

El Cuadro 7 muestra la composición química proximal del concentrado de proteína de pota. Estos resultados son similares, en cuanto al contenido de proteína, ceniza y humedad, a lo propuestos por el Comité Consultivo sobre Proteínas para el Concentrado Proteico de Pescado del tipo A. La mayor diferencia se dio en el contenido de grasas (Lazo, 2006).

Cuadro 7: Composición química proximal del concentrado de proteína de pota

COMPONENTE	%
Proteínas	86.04
Grasas	2.70
Cenizas	4.96
Humedad	6.30

Fuente: Lazo (2006).

Los resultados de los análisis microbiológicos realizados al concentrado de proteína de pota por Lazo (2006) se muestran en el Cuadro 8. Los mismos indican que el producto en mención cumple con las exigencia microbiológicas de los concentrados proteicos de pescado del tipo A y B reportados por Madrid *et al.* (1994).

Cuadro 8: Resultados del análisis microbiológico del concentrado de proteína de pota

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	RESULTADOS
Conteo de aerobios en placa	< 10 ufc/g
<i>E. coli</i>	Ausencia
<i>S. aureus</i>	Ausencia
Hongos (mohos y levaduras)	< 10 ufc/g
<i>Salmonella</i>	Ausencia/25 g

Fuente: Lazo (2006).

En el Cuadro 9 se muestran los ácidos grasos presentes en el concentrado de proteína de pota. Como se puede observar, al igual que en el manto de la pota, contiene altos porcentajes de ácidos grasos omega – 3 son ácidos grasos esenciales (el organismo humano no los produce internamente). Se ha demostrado experimentalmente que el consumo de

grandes cantidades de omega-3 (ω -3) aumenta considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre, lo cual explica por qué en comunidades que consumen muchos alimentos con omega-3 (esquimales, japoneses, etc.) la incidencia de enfermedades cardiovasculares es sumamente baja y omega – 6 (ω -6), que son ácidos grasos que también son esenciales, pero tienden a consumirse en exceso en las dietas modernas, sobre todo por su inclusión en productos de comida elaborada.

Cuadro 9: Contenido de ácidos grasos en el concentrado de proteína de pota.

ACIDO GRASO	NOMBRE	RESULTADOS
C16:0	Ácido hexadecanoico	26.0 %
C16:1 ω -7	Ácido hexadecenoico	0.3 %
C17:0	Ácido heptadecanoico	1.0 %
C18:0	Ácido octadecanoico	7.8 %
C18:1 ω -9	Ácido octadecenoico	1.4 %
C18:1 ω -7		1.4 %
C18:2 ω -6	Ácido octadecadienoico	0.4 %
C18:3 ω -6	Ácido octadecatrienoico	0.2 %
C20:0	Acido eicosanoico	0.4 %
C20:1 ω -11 + 20:1 ω -9	Acido eicosenoico	8.3 %
C20:2 ω -6		0.2 %
C20:3 ω -3		0.3 %
C20:4 ω -3	Acido eicosatetraenoico	1.5%
C20:5 ω -3	Acido eicosapentaenoico	12.9%
C21:5 ω -3		0.2 %
C22:0	Acido behénico	0.3 %
C22:1 ω -9		2.0 %
C22:4 ω -6		0.1 %
C22:5 ω -6		0.5 %
C22:5 ω -3	Acido docosapentaenoico	0.4 %
C22:6 ω -3	Acido docosaheptaenoico	31.3 %
C24:1 ω -9		0.6 %

Fuente: Eurofins Danmark A/S de Dinamarca (Roldán y Lazo, 2005).

En el cuadro 10 se puede apreciar el contenido de aminoácidos hallados en el concentrado de proteína de pota, de los cuales presentó una distribución de los ocho aminoácidos esenciales similar a los presentados por la leche en polvo y el huevo deshidratado. La cantidad de triptófano, aminoácido limitante en el concentrado de pota, fue similar al que presenta la carne de res (FAO, 1970).

Cuadro 10: Contenido de aminoácidos del concentrado de proteína de pota

AMINOACIDOS ESENCIALES	RESULTADOS
Lisina	7.9 g/100 g
Triptófano	0.94 g/100 g
Treonina	4.1 g/100 g
Valina	4.3 g/100 g
Metionina	3.0 g/100 g
Isoleucina	4.8 g/100 g
Leucina	7.9 g/100 g
Fenilalanina	3.8 g/100 g
Histidina	2.1 g/100 g
Total	38.84 g/100 g
NO ESENCIALES	
Arginina	6.7 g/100 g
Acido aspártico	9.5 g/100 g
Serina	4.3 g/100 g
Acido glutámico	14.5 g/100 g
Prolina	3.5 g/100 g
Glicina	4.0 g/100 g
Alanina	5.0 g/100 g
Cisteina + Cistina	1.06 g/100 g
Tirosina	3.2 g/100 g
Total aminoácidos	90.6 g/100 g
R = Esenciales/Total x 100	42.87%

Fuente: Eurofins Danmark A/S de Dinamarca (Roldán y Lazo, 2005).

2.4 FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA

Silbergeld (2001) define a la toxicología como el estudio de los venenos o, en una definición más precisa, la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. La toxicología abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. Aporta una importante información tanto a la medicina como a la epidemiología de cara a comprender la etiología de las enfermedades, así como sobre la plausibilidad de las asociaciones que se observan entre éstas y las exposiciones, incluidas las exposiciones profesionales.

Según Repetto (1997), un tóxico es una sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, y como la vida, tanto vegetal como animal, es una continúa sucesión de equilibrios dinámicos, los tóxicos son los agentes químicos, o físicos, capaces de alterar algunos de estos equilibrios.

De acuerdo con esto, cualquier sustancia puede actuar como tóxico, ya que tanto los productos exógenos como los propios constituyentes del organismo, cuando se encuentran en él en excesivas proporciones, pueden producir trastornos tóxicos. Dichos compuestos exógenos se denominan xenobióticos.

De aquí que se deriva que el concepto de toxicidad posea un carácter relativo. No hay sustancias atóxicas; cualquier producto químico actuará como tóxico, a unas determinadas condiciones del sujeto, de la dosis y del ambiente. Este concepto fue enunciado por Paracelso (siglo XVI), cuando afirmó que “todo depende de la dosis”. Una sustancia que administrada en pequeñas cantidades produzca daño, será más tóxica que otra sustancia que precisa de mayor dosis para originar el mismo daño. Por ejemplo, el agua es indispensable para la vida, muchos organismos están constituidos en más de sus dos terceras partes por agua; sin embargo, un exceso de agua ingerida, o una enema rectal de agua destilada, puede producir la muerte por intoxicación hídrica. El oxígeno o la glucosa son imprescindibles para la mayoría de los organismos, pero sabemos que su exceso conduce a graves trastornos y a la muerte. De la misma manera, la vida se hace

imposible en una atmósfera de oxígeno puro, porque se consume rápidamente el ácido gammaaminobutírico, moderador de la transmisión nerviosa central, y como consecuencia, se producen graves alteraciones nerviosas, convulsiones y la muerte (Repetto, 1997).

Repetto (1997) define a la toxicología como la ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.

La toxicología de los alimentos o también conocida como toxicología bromatológica, es una especialidad de la toxicología ambiental, cuyo interés esta creciendo rápidamente; en consecuencia, están aumentando los programas académicos que abarcan la enseñanza, el adiestramiento y la investigación de esta materia (Shibamoto y Bjeldanes, 1993).

2.4.1 Factores implicados en la intoxicación

Según Valle y Lucas (2000) la acción de un agente tóxico sobre un organismo vivo denominado como intoxicación, es un proceso relativamente complejo, en el cual están involucrados muchos factores. Sin embargo, hay por lo menos cinco factores que están íntimamente ligados al fenómeno de la intoxicación:

a. Carácter tóxico del agente xenobiótico

Aunque un agente que produce una intoxicación puede ser químico o físico, en toxicología de alimentos se refiere exclusivamente a sustancias químicas. Un término muy usado en el área farmacológica para definir cualquier sustancia extraña al organismo en cuestión, es la de agente xenobiótico. No obstante como Paracelso mencionó: “no hay sustancia que no sea venenosa”, que indica que el efecto benéfico y dañino de una sustancia depende de la dosis. Sin embargo, para cada sustancia química hay un determinado grado de toxicidad.

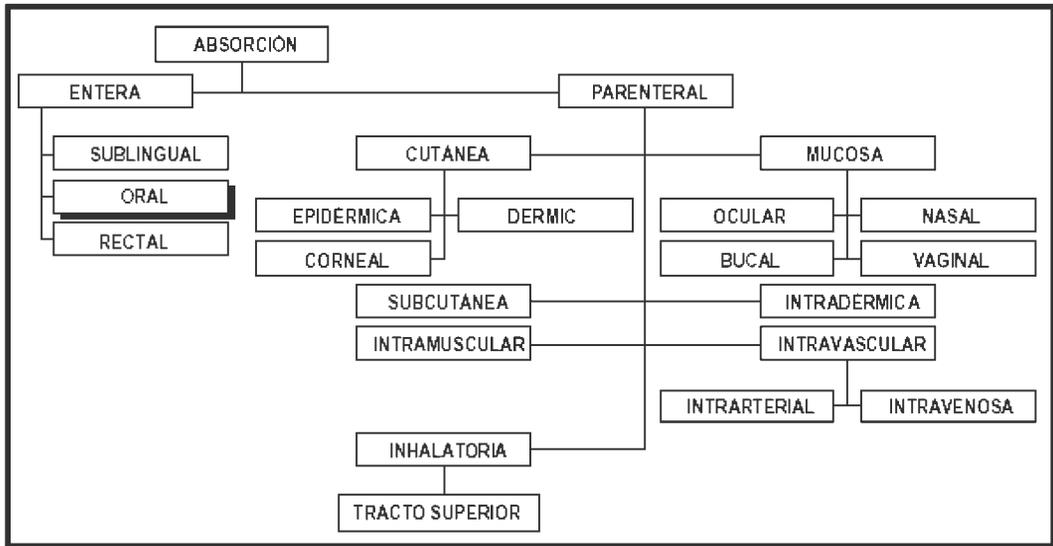
b. Sistema biológico

El sistema biológico sobre el cual actúa el agente tóxico es de suma importancia, ya que el efecto variará notablemente según el organismo. Dicho factor debe ser tomado en cuenta, ya que es bien conocido que entre las diferentes especies de animales y el hombre hay una gran variación en la sensibilidad hacia los agentes tóxicos. El conocimiento del origen, desarrollo y curso de una intoxicación en un animal particular debe ser establecido para con bases científicas, extrapolarlo al hombre.

c. Vía o ruta de absorción

Es bien conocido que un mismo agente tóxico puede producir efectos muy diferentes, dependiendo de la ruta por la cual el sistema biológico lo absorba. Como ejemplo tenemos el caso del disolvente hexano, el cual si una persona adulta inhala sus vapores, en un lapso de 1 a 3 minutos puede perder el conocimiento; sin embargo, esta misma persona puede ser capaz de beber hasta algunas decenas de mililitros sin que se observe efecto alguno de toxicidad aguda. Lo anterior se debe a que para que un agente xenobiótico produzca su efecto tóxico debe llegar a los receptores específicos, atravesando una o varias membranas tisulares (Fabre y Truhaut, 1976).

Ya que históricamente la principal vía de administración por la cual se absorbe un agente xenobiótico fue la oral, en la actualidad se reconocen dos grandes rutas de administración, que son la enteral, se usa el tracto gastrointestinal, (oral, sublingual y rectal) y la parenteral, se refiere a todas las vías en las que se evita el paso por el aparato digestivo como se observa en la figura 1.



Fuente: Valle y Lucas (2000).

Figura 1: Vías de administración de xenobióticos (absorción).

Para que un agente xenobiótico pueda manifestar su efecto benéfico (remedio) o dañino (veneno), debe atravesar y alcanzar los receptores específicos del órgano o tejido, por lo cual debe ser capaz de atravesar las diferentes barreras biológicas. Así tenemos que de todas las anteriores vías o rutas de absorción de un agente xenobiótico su velocidad de absorción es diferente como se puede observar en el cuadro 11.

Cuadro 11: Vías o rutas de administración y su velocidad de absorción

VÍA	PODER DE PENETRACIÓN
Intravenosa	Muy alto
Inhalatoria	Muy alto
Intraperiotenal	Alto
Subcutánea	Alto
Intramuscular	Alto
Gastrointestinal	Bajo
Cutánea o tópica	Muy bajo

Fuente: Pascuzzo (2008).

d. Tiempo de interacción del agente tóxico

El efecto de un agente tóxico sobre un sistema biológico se traduce en una alteración del equilibrio fisiológico (homeóstasis), por lo que una intoxicación es una enfermedad y como tal debe considerarse bajo un criterio patocrónico, es decir estimando su curso o evolución en función del tiempo, así podemos clasificarla como intoxicación aguda, crónica o subaguda.

La intoxicación aguda se define como la exposición hacia un agente xenobiótico que produce una manifestación casi inmediata (en ocasiones en minutos) con una sola administración del tóxico, que puede llevar al intoxicado a la muerte, o a una recuperación total o parcial, de la cual pueden quedar o no secuelas o lesiones persistentes. En muchos de los casos de una intoxicación aguda se presenta un fenómeno de reversibilidad con excepción de la muerte.

En general la intoxicación subaguda (llamada también subcrónica), no implica un menor grado de gravedad de la intoxicación aguda, sino que se presenta una evolución de la intoxicación con trastornos subclínicos. Aunque este tipo de intoxicación requiere la administración repetitiva del tóxico, al inicio no se presentan trastornos visibles; sin embargo, a corto plazo se pueden presentar evidencias de la intoxicación y algunos toxicólogos consideran que para que se presente ésta, se debe exponer el sistema biológico al tóxico en un lapso que puede variar de un mes a tres meses.

La intoxicación crónica se presenta como consecuencia a la repetida exposición hacia el agente tóxico. Esta absorción se produce con cantidades relativamente pequeñas del tóxico, que por sí mismo no producen trastornos visibles en un inicio, pero la acumulación del agente xenobiótico en el organismo (normalmente en un órgano o tejido específico) y con el transcurso del tiempo, se presentan estados patológicos, y en la mayoría de los casos son de carácter irreversible.

e. Excreción del agente tóxico

La excreción de los tóxicos se efectúa por medio de la orina, bilis, heces y una alta proporción de los compuestos volátiles, por el aire expirado. Menores cantidades se eliminan por la leche, el sudor y la saliva, y que aunque cuantitativamente no sean relevantes, en algunos casos cobra importancia, como es el caso de madres en lactancia que sean fumadoras, bebedoras o drogadictas.

El mejor sistema de excreción es la vía urinaria; ya que en un adulto, las arteriolas precedentes de la arteria renal aportan un flujo de 1.2 a 1.3 l/min. (aproximadamente el 25% del gasto cardíaco) así, la excreción urinaria es la más importante para eliminar del organismo las sustancias tóxicas ingeridas en la dieta. El riñón excreta los tóxicos por la misma ruta que excreta las sustancias endógenas.

Los capilares glomerulares tienen poros relativamente grandes (40 Angstroms), que permiten el paso de sustancias de peso molecular de hasta 70,000; por lo tanto, salvo proteínas de alto peso molecular, se pueden filtrar en el glomérulo. Los únicos tóxicos que no se filtran, son los que están unidos a proteínas de alto peso molecular. Todos los compuestos que se encuentran en la orina tubular podrán excretarse con ella o reabsorberse pasivamente a la corriente sanguínea. Las sustancias polares o hidrosolubles generalmente no se absorben y pasan a la orina; sin embargo, los compuestos con alto coeficiente de partición lípido/agua serán reabsorbidos, pasivamente a través de las membranas tubulares. Ya que las sustancias con un alto grado de liposolubilidad no pasan al tubo renal o son reabsorbidas, es necesario que el sistema biológico para eliminarlas deba transformarlas introduciéndoles grupos funcionales a la molécula (especialmente hidroxilos) para que se aumente su polaridad o conjugarlas con sustancias acarreadoras, que incrementen su hidrosolubilidad; al primer objetivo contribuye el elevado nivel de enzimas oxidasas en el tejido renal. Además, en este proceso de excreción renal es de suma importancia el pH, y en este caso será conveniente que el compuesto ionizable se encuentre en su forma iónica para que se facilite su excreción (Hodgson y Levi, 1989).

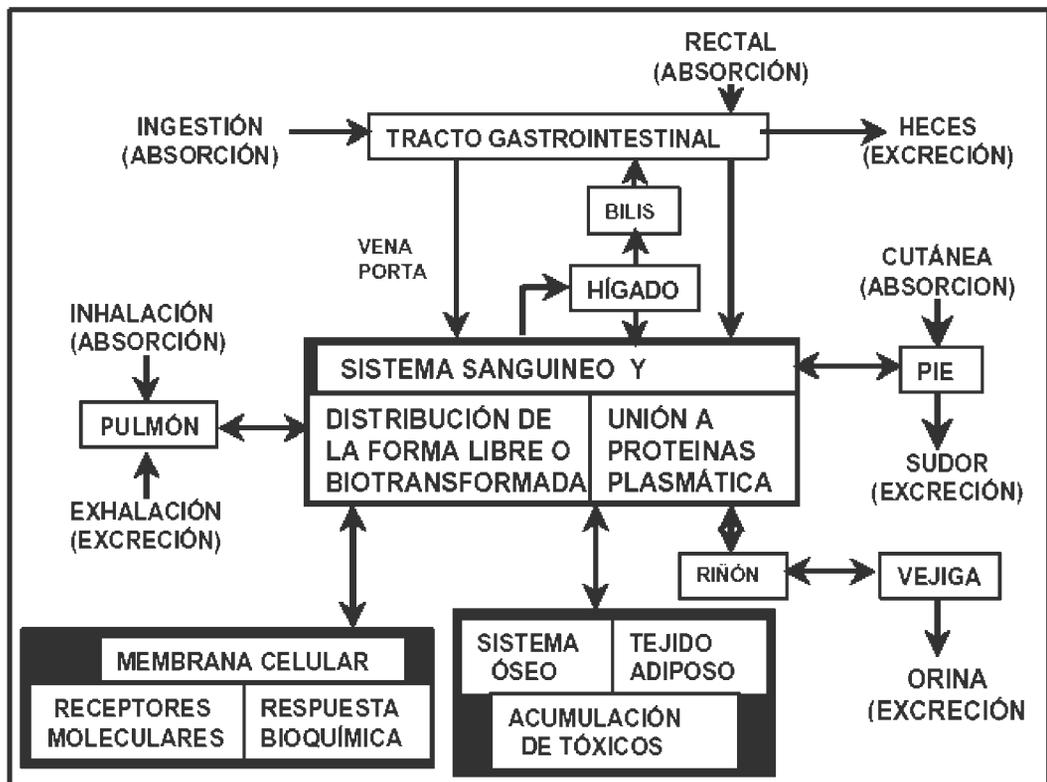
A través de la bilis, debido a sus cualidades tensoactivas, el hígado elimina sustancias de elevado peso molecular (>300), ya sean polares o no polares y ionizadas o no ionizadas. Normalmente, la excreción se realiza contra un gradiente de concentración. La velocidad de formación de bilis es mucho menor que la de orina; una importante diferencia anatómica entre el hígado y el riñón, es que el primero dispone de una doble vía de aporte sanguíneo constituido por la vena porta y por la de la arteria hepática. La sangre del hígado, contrariamente a la del riñón, circula a una velocidad relativamente lenta, lo que da tiempo para que las sustancias liposolubles penetren en los hepatocitos y puedan ser secretadas por la bilis. No obstante que la bilis vierte directamente al intestino delgado, éstos compuestos son excretados con las heces o en ocasiones son biotransformados por las bacterias intestinales de tal forma que se pueden reabsorber, en el último caso se establece un ciclo que se conoce como Ciclo Enterohepático (Shibamoto y Bjeldanes, 1996).

2.5 PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN

Los humanos y muchos otros animales están constantemente expuestos en su medio ambiente a una vasta variedad de agentes xenobióticos; los cuales pueden ser de origen natural o formados por intervención del hombre. En general los compuestos más lipofílicos son más fácilmente absorbidos a través de la piel, pulmones o del tracto gastrointestinal. La constante exposición a este tipo de sustancias podría resultar en su acumulación dentro del organismo, al menos que se presente un sistema eficaz de eliminación. Con excepción de la exhalación, para que un agente xenobiótico pueda ser eliminado del organismo, requiere que sea soluble en fase acuosa, lo anterior funciona para compuestos no volátiles y en consecuencia serán excretados por la orina y las heces, que son las predominantes rutas de eliminación. Sin embargo, los compuestos lipofílicos que se encuentran en los fluidos de excreción tienden a difundir hacia las membranas y en consecuencia son reabsorbidos, mientras que los compuestos solubles en agua son excretados, lo que dejaría aparentemente una acumulación de los agentes xenobióticos lipofílicos dentro del organismo (Klaassen et al, 1986).

2.5.1 Panorama general

De acuerdo a la estructura de la membrana celular, esta le confiere una selectividad en la absorción tanto de las sustancias endógenas como xenobióticas. Esta selectividad permite que existan vías de absorción específica para los nutrimentos hidrosolubles con un gasto energético (transporte activo), pero por otra parte aunque la mayoría de los organismos vivos son casi impermeables a la gran mayoría de las sustancias hidrosolubles no deseables, no pueden prevenir la absorción de la mayoría de las sustancias liposolubles. En la figura 2 tenemos resumido en un esquema ilustrativo, las principales vías de absorción y eliminación tanto de compuestos endógenos como exógenos (Shibamoto y Bjeldanes, 1996).



Fuente: Valle y Lucas (2000).

Figura 2: Principales vías de excreción y absorción de xenobióticos.

2.5.2 Absorción

Los animales superiores han desarrollado un número de sistemas metabólicos que convierten los agentes xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de eliminación. A esta actividad bioquímica se le ha denominado proceso de Biotransformación, el cual se ha dividido a su vez en dos grandes grupos de actividad enzimática: reacción de Fase I y Fase II (Anders, 1985).

a. Reacciones fase I.

La función de este tipo de reacciones, es modificar la estructura química de la molécula, por introducción de grupos funcionales como son hidroxilo, amino, carboxilo entre otros. También, se puede obtener una mayor polaridad del agente xenobiótico por exposición de grupos funcionales como es el proceso de hidrólisis. Posiblemente la oxidación es la reacción más importante de las reacciones de fase I; en general estas reacciones están mediadas por el sistema de oxidación microsomal que contiene el citocromo P-450, también conocido como “sistema oxidasa de función mixta”, el cual requiere del cofactor nicotin-adenin-dinucleótido-reducido (NADPH) como donador inicial de electrones y oxígeno molecular como oxidante (Valle y Lucas, 2000).

b. Reacciones de fase II.

Este tipo de reacciones metabólicas son de biosíntesis por lo cual requieren de un gasto energético (formación de enlaces químicos); por lo tanto, son reacciones enzimáticas que aparte de requerir de ciertos cofactores, necesitan de substratos de alta energía como es el ATP.

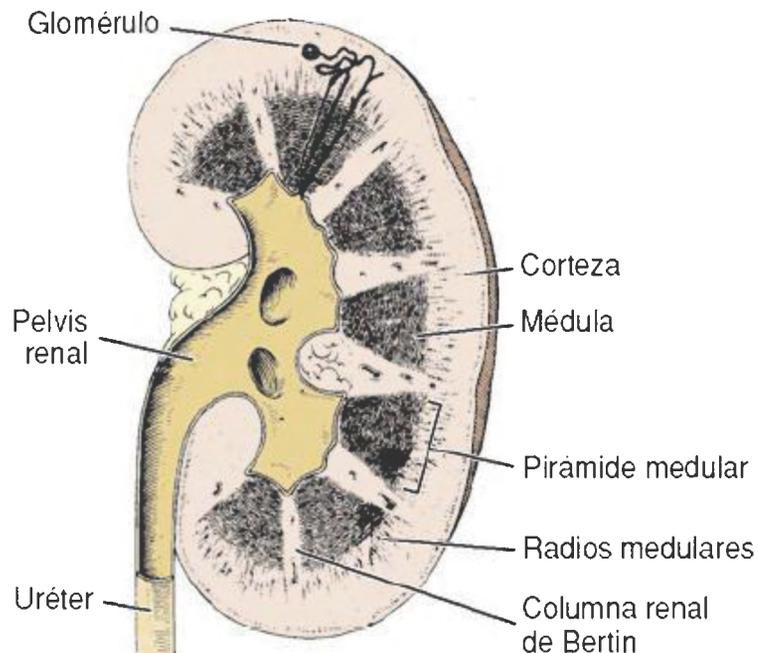
Las reacciones de fase II también se denominan como reacciones de conjugación, involucran la adición a los compuestos xenobióticos de moléculas endógenas, las cuales generalmente son polares y de alta disponibilidad por parte del organismo. Estos grupos endógenos son adicionados a grupos funcionales presentes ya en los compuestos xenobióticos, o que fueron introducidos o expuestos en la fase I del proceso de biotransformación. El propósito final es de obtener moléculas polares y con bajo coeficiente de partición lípido/agua, para que se facilite su excreción al disminuir substancialmente su carácter lipofílico (Klaassen et al, 1986).

2.6 DESCRIPCIÓN DE ÓRGANOS FRECUENTEMENTE EVALUADOS PARA OBSERVAR DAÑOS POR PRODUCTOS TOXICOS

2.6.1 Los Riñones

a. Generalidades

Los riñones (Figura 3) son órganos grandes, rojizos, con forma de habichuela que están situados en el retroperitoneo a ambos lados de la columna vertebral. Se extienden desde la duodécima vértebra torácica hasta la tercera vértebra lumbar y el riñón derecho está ubicado apenas más alto que el izquierdo (Ross, 2005).



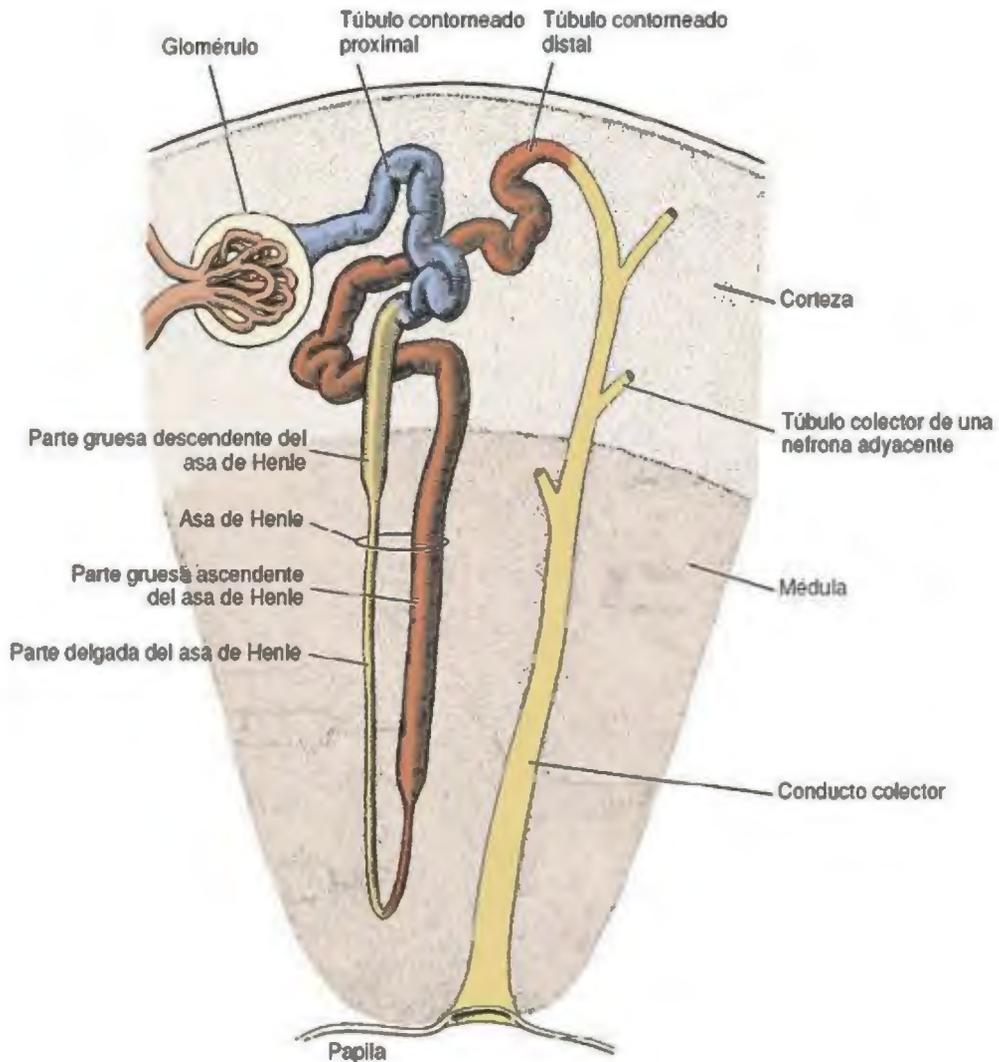
Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 3: Corte Esquemático del Riñón.

b. La Nefrona

La nefrona es la unidad estructural y funcional fundamental del riñón. Cada riñón está constituido por entre 1 y 4 millones de nefronas. Cada nefrona está formada por una parte delimitada, el corpúsculo renal o de Malpighi, por el túbulo contorneado proximal,

por las partes delgada y gruesa del asa de Henle, por el túbulo contorneado distal y por los túbulos y conductos colectores (Figura 4). La nefrona es la unidad funcional del riñón. Los componentes de la nefrona están rodeados por una lámina basal, que se continúa con el escaso tejido conjuntivo del riñón (Junqueira y Carneiro, 2005).



Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

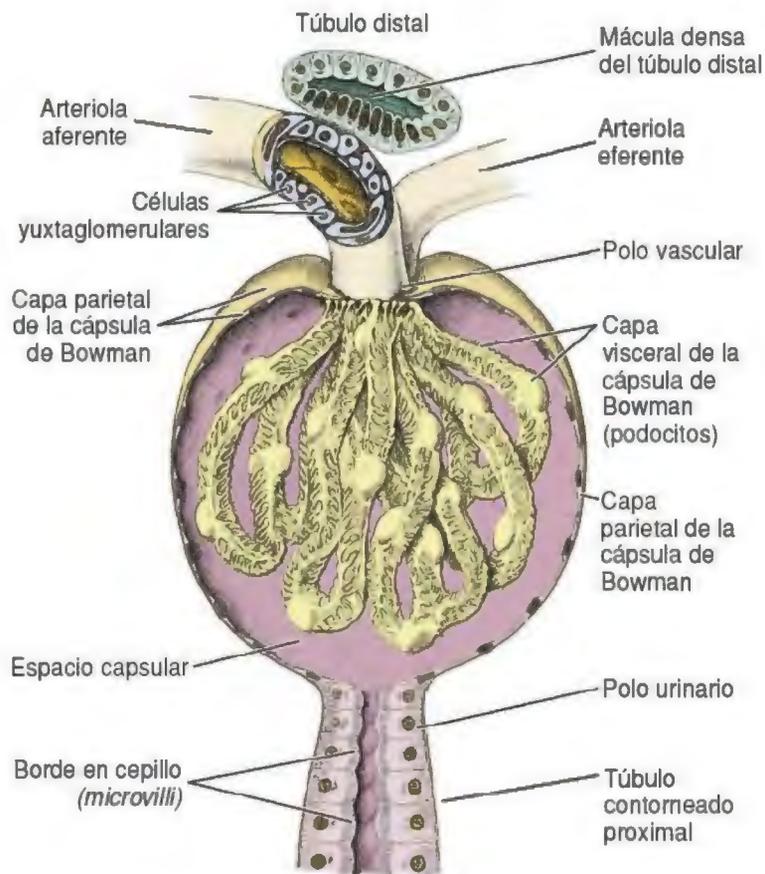
Figura. 4. Componentes de una nefrona.

c. Corpúsculo renal

El corpúsculo renal se forma cuando el conjunto de asas capilares o glomérulo se invagina en el extremo dilatado revestido de epitelio de la nefrona, denominado cápsula de Bowman. Como consecuencia, la cápsula de Bowman adopta forma de copa y adquiere por

tanto doble pared, de manera que el epitelio reviste las asas capilares y delimita la pared opuesta de la cápsula. Por tanto, el corpúsculo renal está formado por glomérulo y de la cápsula de Bowman. El epitelio que recubre cada capilar es el epitelio glomerular o la capa visceral de la cápsula de Bowman y el que reviste la pared opuesta se llama epitelio capsular o la capa parietal de la cápsula de Bowman. En el tejido renal en vivo el conjunto de capilares glomerulares llena la cápsula, pero como consecuencia de la retracción experimentada por el procesado histológico del órgano, queda generalmente un espacio entre los capilares y la cápsula que se denomina espacio capsular o espacio de Bowman. Esta región del corpúsculo renal en la que se sitúan las arteriolas aferente y eferente se designa polo vascular. Opuesto al polo vascular se halla el polo urinario, en donde el epitelio capsular se continúa con el epitelio cúbico del túbulo contorneado proximal (Dellman y Brown, 1976).

En la Figura 5 se puede apreciar el corpúsculo renal.



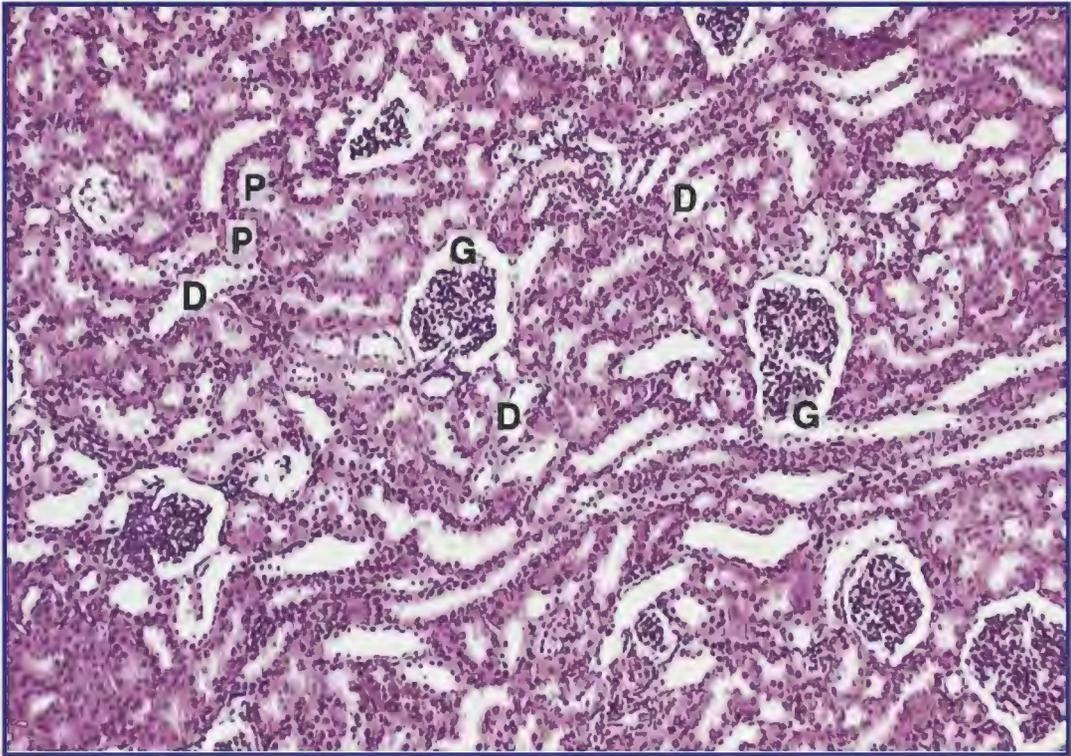
Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 5: Corpúsculo renal.

d. Cortes histológicos de la corteza renal

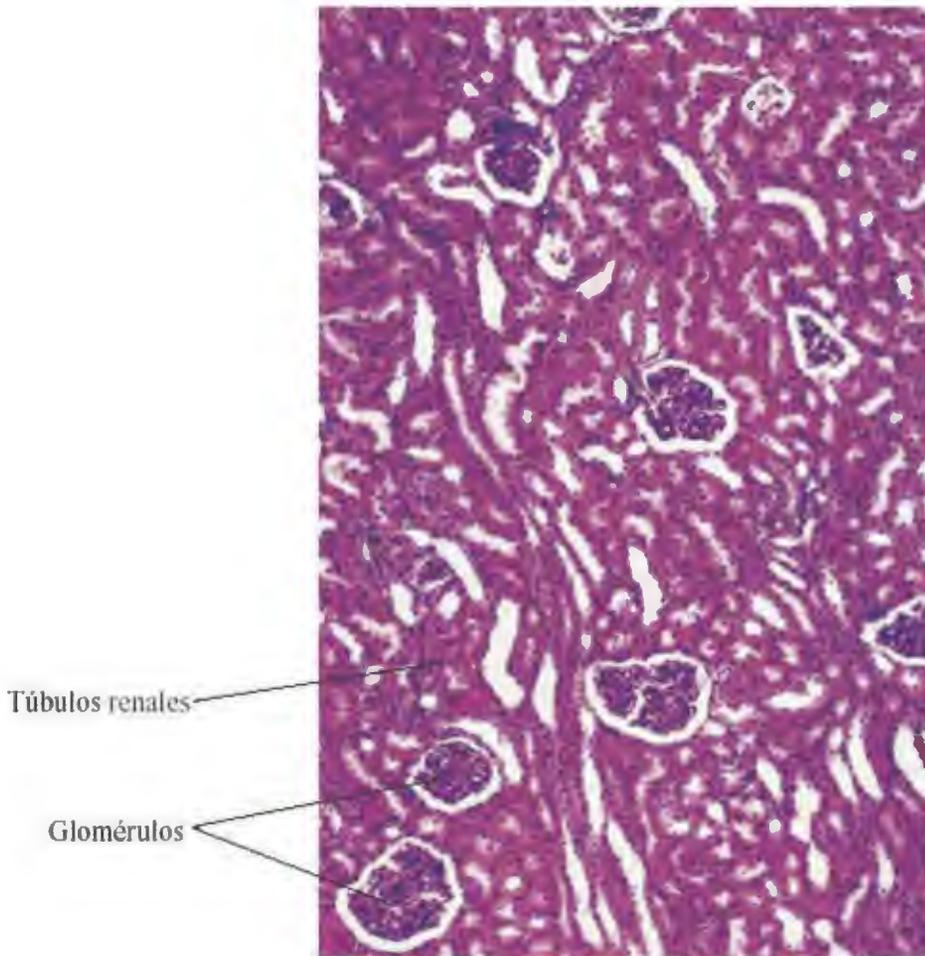
En los cortes histológicos la distinción entre los túbulos contorneados distales y los proximales, ambos presentes en la zona cortical y formados por epitelio cúbico, se sustenta en los datos siguientes: sus células son más pequeñas (mayor número de núcleo en cada corte transversal), no poseen borde en cepillo y son menos acidófilas (poseen menor cantidad de mitocondrias). El túbulo contorneado distal está situado junto al corpúsculo de Malpighi de la misma nefrona y, en ese punto, su pared se modifica (Junqueira y Carneiro, 2005).

En las Figuras 6 y 7 se observa cortes histológicos de la corteza renal.



Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 6: Vista panorámica de la corteza renal, que esta constituida principalmente por túbulos contorneados proximales (P), túbulos contorneados distales (D) y glomérulos (G). Tinción de pararrosanilina y azul de toluidina. Pequeño aumento.



Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 7: Región cortical del riñón que muestra los glomérulos y los túbulos renales. Tinción de hematoxilina y eosina. Pequeño aumento. (Junqueira y Carneiro, 2005).

2.6.2 El Hígado

a. Generalidades

El hígado es la más grande de las glándulas y la víscera más voluminosa del organismo. Pesa alrededor de 1.500 g corresponde más o menos al 2,5% del peso corporal total del adulto. Está ubicado principalmente en la región del abdomen llamada hipocondrio derecho aunque también se extiende un poco hacia el hipocondrio izquierdo y está protegido por la parrilla costal (Ross, 2005).

El hígado está dividido anatómicamente por surcos profundos en dos lóbulos grandes (derecho e izquierdo y en otros dos más pequeños (lóbulo cuadrado y lóbulo

caudado o de Spiegel). Esta división anatómica sólo tiene importancia topográfica porque relaciona los lóbulos hepáticos con otros órganos abdominales. La división en segmentos funcionales/quirúrgicos que corresponden a la irrigación sanguínea y el drenaje biliar tiene mayor importancia clínica (Ross, 2005).

b. El hígado degrada fármacos y toxinas

Los hepatocitos participan en la degradación de fármacos, toxinas y proteínas extrañas al organismo (xenobióticos). Muchos fármacos y toxinas no son hidrosolubles, por lo que no pueden eliminarse de la circulación con eficacia por los riñones. El hígado convierte estas sustancias en forma más solubles en agua. Este proceso lo realizan los hepatocitos en dos fases (Ross, 2005):

La *fase I*, llamada *oxidación*, comprende la hidroxilación (adición de un grupo ---OH) y la carboxilación (adición de un grupo ---COOH) en un compuesto extraño. Esta fase ocurre en el retículo endoplasmático liso y las mitocondrias de los hepatocitos. Comprende una serie de reacciones bioquímicas con proteínas que colectivamente reciben el nombre de citocromo P450.

La *fase II*, llamada *conjugación*, comprende la asociación (conjugación) de la sustancia extraña con ácido glucorónico, glicina o taurina. Este proceso torna el producto de la fase I todavía más hidrosoluble de modo que se pueda eliminar con facilidad por los riñones.

c. Lobulillos Hepáticos

Según Dellmann y Brown (1976) la estructura lobulillar puede interpretarse de tres modos diferentes, dependiendo de las relaciones funcionales que se consideren. El *lobulillo hepático*, llamado en ocasiones lobulillo clásico, es una unidad estructural organizada alrededor de la vena central. Los contornos de los cortes transversales de este lobulillo tienen forma hexagonal aproximadamente, con los sinusoides irradiando desde la periferia a la vena central en la que desembocan. Las *áreas portales* se hallan presentes en aproximadamente tres de los seis ángulos del lobulillo hepático. Estas zonas, de forma triangular, de tejido conjuntivo contienen ramas de la vena porta, arteria hepática, vasos linfáticos, uno o más conductillos biliares y nervios. El lobulillo hepático está especialmente bien delimitado en el cerdo, ya que se halla completamente rodeado por

tabiques de tejido conjuntivo. En otras especies los tabiques son menos visibles y el parénquima de un lobulillo aparece mezclado con los lobulillos adyacentes, sin una línea de delimitación clara.

El *lobulillo portal* es una unidad funcional centrada alrededor del canalículo biliar del área portal. Se define como un área triangular compuesta de parénquima de tres lobulillos hepáticos adyacentes, que desaguan por el canalículo biliar localizado en la zona portal. De esta forma, el eje del lobulillo portal es el canalículo biliar interlobulillar del área portal y la periferia se halla delimitada por tres venas centrales.

Además de las unidades funcionales tradicionales de la estructura antes descrita, se ha propuesto una tercera unidad, el ácino hepático. Este es aproximadamente una zona oval del parénquima, cuyo eje gira alrededor de la rama terminal de la vena porta y el comienzo de los conductos biliares. Una vena central se halla en cada extremo del ácino y un área portal en un lado. Se hacen ostensibles tres zonas de diversa actividad metabólica entre el eje y la vena central, que se producen por la disminución del aporte de nutrientes y de oxígeno conforme la sangre fluye hacia la vena central. De esta forma, las células de la zona 1 reciben la mayor parte del oxígeno y nutrientes, mientras que las de las zonas 2 y 3 reciben progresivamente menos.

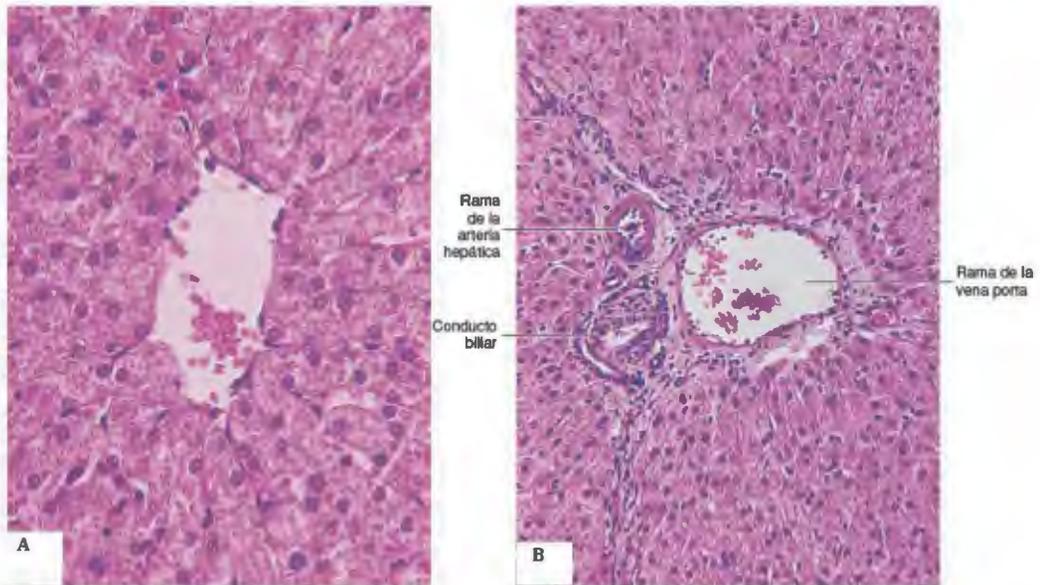
Según Ross (2005), los hepatocitos en cada ácido hepático se describen dispuestos en tres zonas elípticas concéntricas que rodean el eje menor:

La zona 1 es la más cercana al eje menor y a la irrigación proveniente de las ramas penetrantes de la vena porta y de la arteria hepática. Esta zona corresponde a la periferia de los lobulillos clásicos. La zona 3 es la más lejana al eje menor y la más cercana a la vena centrolobulillar (vénula hepática postsinusoidal). Esta zona corresponde al centro del lobulillo clásico cuyos hepatocitos rodean la vena centrolobulillar. La zona 2 está entre las zonas 1 y 3 pero no tiene límites nítidos.

La descripción en zonas es importante en la descripción y la interpretación de los modelos de degeneración, regeneración y efectos tóxicos específicos del parénquima hepático en relación con el grado o la calidad de la perfusión vascular de los hepatocitos. Las células de la zona 1 son las primeras en recibir oxígeno, nutrientes y toxinas desde la

sangre sinusoidal y son las primeras en exhibir alteraciones morfológicas tras la obstrucción de la vía biliar (estasis biliar). Estas células también son las últimas en morir si hay trastornos de la circulación y son las primeras en regenerarse. En cambio, las células de la zona 3 son las primeras en sufrir necrosis isquémica (necrosis centrolobulillar) en las situaciones en las que la perfusión y las primeras en acumular lípidos.

En la Figura 8 se observa cortes histológicos de los lóbulos hepáticos.



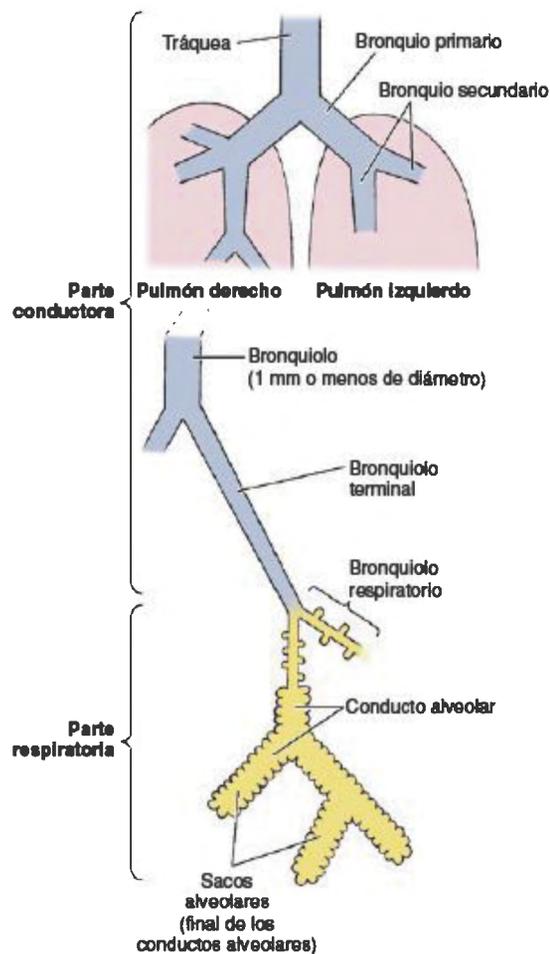
Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 8: Microfotografía del hígado. A) Vena Central (VC). B) Espacio porta que contiene una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar rodeados por tejido conjuntivo. (Junqueira y Carneiro, 2005).

2.6.3 Los Pulmones

Los pulmones derecho e izquierdo se subdividen en cierto número de lóbulos y lobulillos característicos de cada especie. Los conductos aéreos se componen de una parte conductora de aire, los bronquios y los bronquiolos y de una parte respiratoria (intercambio de gases), los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alveolos. Los *bronquios*, macroscópicamente, se subdividen en bronquios lobares o lobulares, segmentarios y subsegmentarios, denominados también bronquios extra e intrapulmonares o bronquios primarios, secundarios y terciarios. Las ramas de los

bronquios intrapulmonares se dicotomizan, dando lugar a *bronquiolos* de diferentes órdenes, designados con los nombres primarios, secundarios, terciarios o terminales y bronquiolos respiratorios. *Los conductos alveolares* se extienden posteriormente a los bronquiolos respiratorios y no son realmente más que un conducto en los que se abren numerosos alvéolos uno al lado del otro. Las grandes estructuras sacciformes en las que se abren los alvéolos que las rodean se llaman *sacos alveolares*. Los intercambios de gases tienen lugar a nivel de *los alvéolos*. En la Figura 9 se puede apreciar las ramificaciones del aparato respiratorio (Dellman y Brown, 1976).



Fuente: Junqueira y Carneiro (2005).

Figura 9: Principales ramificaciones del Aparato Respiratorio.

2.7 RELACION DOSIS RESPUESTA

La *relación dosis-efecto* es la relación entre la dosis y el efecto a nivel individual. Un incremento de la dosis puede incrementar la intensidad de un efecto o su gravedad. Puede obtenerse una curva de dosis-efecto a nivel de todo el organismo, de la célula o de la molécula diana. Hay algunos efectos tóxicos, como la muerte o el cáncer, que no tienen grados, sino que son efectos “de todo o nada” (Holmberg, 2001).

La *relación dosis-respuesta* es la relación entre la dosis y el porcentaje de individuos que presentan un determinado efecto. Al incrementarse la dosis lo normal es que aumente el número de individuos afectados en la población expuesta. El establecimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta es esencial en toxicología. En los estudios médicos (epidemiológicos) suele utilizarse como criterio para aceptar una relación causal entre un agente y una enfermedad el hecho de que el efecto o la respuesta sean proporcionales a la dosis (Holmberg, 2001).

En la realización de un experimento donde se quiere determinar la relación “dosis-respuesta” de un determinado xenobiótico sobre un definido organismo, se deben considerar como mínimo los siguientes factores: a) Selección del tipo de respuesta para ser monitoreada en términos cuantitativos. b) Definición del organismo de prueba (sistema biológico). c) Período de experimentación o duración del ensayo. d) Serie de dosis a probar: dosis simple (lo que generalmente implica un estudio de toxicidad aguda); dosis repetitiva a corto plazo (estudio subagudo); dosis repetitiva a largo plazo (toxicidad crónica). e) Vía de administración (Valle y Lucas, 2000).

La respuesta de un organismo hacia un agente xenobiótico no varía únicamente con las diferentes especies animales (variabilidad interespecie); sino que ésta, normalmente también puede variar dentro de la misma especie (variabilidad intraespecie (Valle y Lucas, 2000).

2.7.1 Dosis letal media (DL50)

La DL50 (dosis letal) es la dosis que produce una mortalidad del 50 % en una población animal. La DL50 solía considerarse en la bibliografía más antigua como una medida de la toxicidad aguda de las sustancias químicas. A mayor DL50, menor toxicidad aguda. De una sustancia química muy tóxica (con una DL50 baja) se dice que es *potente*. No hay una correlación necesaria entre la toxicidad aguda y la toxicidad crónica (Holmberg *et al.*, 2001).

En el cuadro 12 se tiene una clasificación del grado de toxicidad de un agente xenobiótico, en el cual se aprecia que sustancias con valores de DL50 menores de 1 mg/Kg por vía oral de son sumamente tóxicas, y de las cuales podemos encontrar presentes en los alimentos.

Cuadro 12: Rango de toxicidad aguda

Denominación	ADMINISTRACIÓN			
	DL50 Dosis oral única (rata)	DL50 Dosis cutánea única (conejo)	CL50* Inhalación de vapor 4 horas (rata)	Posible dosis oral letal a un hombre adulto
Extremadamente tóxico	< 1 mg/Kg	< 5 mg/Kg	10	1 gota, 1 grumo
Altamente tóxico	1-50 mg/Kg	5-50 mg/Kg	10-100	1 cucharita (4 ml)
Moderadamente tóxico	50-500 mg/Kg	50-350 mg/Kg	100-1,000	30 g
Ligeramente tóxico	0.5-5 g/Kg	0.35-0.3 g/Kg	1,000-10,000	250 g
Prácticamente no tóxico	5-15 g/Kg	3-25 g/Kg	10,000-100,000	1 L
Relativamente inocuo	> 15 g/Kg	25 g/Kg	> 100,000	> 1 L

* Concentración letal media, expresada en ppm

Fuente: Deichmann y Gerarde (1969).

2.7.2 Respuesta Acumulativa

En toxicología, se expresan los efectos de un tóxico en forma de porcentaje acumulativo respecto a la concentración del tóxico. Para esto, un grupo homogéneo de

animales de prueba (por ejemplo, ratón), se les administra un compuesto a diferentes series de concentraciones y en base a una ruta preestablecida. Las dosis que se administren, deben ser tales, que no todos los animales mueran, ni que todos sobrevivan. Además la dosis inicial debe ser lo suficientemente baja para que no manifieste ningún efecto adverso o que interfiera con la determinación. En grupos subsecuentes la dosis, se incrementa en base logarítmica o exponencial. La dosis final, debe causar la muerte en todos los animales de prueba (Valle y Lucas, 2000).

Según Deshpande (2002), los agentes tóxicos pueden ser clasificados en una variedad de formas. Por ejemplo, pueden ser clasificadas en función de sus órganos diana (hígado, riñones, pulmones, piel, sistema nervioso, sistema hematopoyético, etc.), su utilización (pesticidas, disolventes, aditivos alimentarios, etc.), su origen (animal, vegetal, microbiano, toxinas), y sus efectos (cáncer, mutaciones, daño hepático, etc.). También pueden ser agrupados en función de su estado físico (gas, polvo, líquido), sus requisitos de etiquetado (explosivos, inflamables inflamabilidad, oxidante), sus propiedades químicas (aminas aromáticas, hidrocarburos policíclicos, hidrocarburos halogenados, etc.), o su potencial tóxico, como se muestra en el cuadro 13.

Cuadro 13: Clasificación de la Toxicidad

CLASIFICACION	PROBABLE DOSIS ORAL LETAL MEDIA PARA HUMANOS
Prácticamente no tóxico	> 15 g/kg
Ligeramente tóxico	5–15 g/kg
Moderadamente tóxico	0.5–5 g/kg
Muy tóxico	50–500 mg/kg
Extremadamente tóxico	5–50 mg/kg
Supertóxico	< 5 mg/kg

Fuente: Deshpande (2002).

2.8 DOSIS LETAL MEDIA Y MÉTODOS ALTERNATIVOS

La Unión Europea parece decidida a acabar con la actual situación de desconocimiento sobre los riesgos reales que las sustancias y preparados químicos suponen para la salud humana y el medio ambiente. A partir de 1981 se estableció un sistema de notificación de sustancias nuevas para garantizar el control de los productos comercializados. Aunque para las “nuevas sustancias” se exige una evaluación bastante completa, de las “existentes” o comercializadas antes de 1981 existe un absoluto desconocimiento sobre sus características toxicológicas (Repetto et al, 2004).

Para las más de 30,000 sustancias producidas en cantidades superiores a 1 TM será necesario conocer urgentemente sus propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas antes de 2012. Para ello puede ser necesario utilizar más de 12 millones de animales vertebrados. Sin embargo, la nueva estrategia pretende fomentar los ensayos sin animales. De hecho, los ensayos de sustancias producidas entre 1 y 10 TM deberían limitarse a métodos *in vitro*. Nos encontramos por tanto en un momento crucial y una oportunidad para considerar la utilidad de los procedimientos que serán más necesarios, incluyendo los de toxicidad aguda, irritación, corrosividad, ecotoxicidad, etc. (Repetto et al, 2004).

Existen protocolos de los diferentes ensayos toxicológicos que se realizan *in vivo*, de acuerdo con los criterios de la *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). En éstos se han introducido diferentes criterios de reducción del número de animales y de refinamiento de las técnicas, si bien existen pocos métodos de reemplazo que hayan sido aceptados en el plano legislativo.

La armonización de los protocolos utilizados en todo el mundo ha reducido de forma significativa el uso de animales con estos fines. Desde 1982 la OECD fue la primera organización internacional en establecer unos criterios de armonización de los ensayos realizados en animales, siendo aceptados por todos los países miembros de dicha organización.

La OCDE ha sustituido el ensayo de la determinación de *la toxicidad aguda por vía oral* (DL50 según TG 401) por sus tres alternativas (420, 423 y 425). Estos ensayos reducen significativamente el número de animales empleados, y en muchos casos, el dolor y estrés asociado a los mismos. Desde julio del 2001, la comunidad reguladora no usa más el ensayo de la DL50.

Existe un gran interés por conocer si es posible predecir la Dosis Letal por vía oral en Rata a través de métodos *in vitro*. Para ello, Halle y Gores (1988) prepararon una gran base de datos denominada como Registro de Citotoxicidad. En ella incluyeron 1912 concentraciones inhibitorias de sustancias seleccionadas de centenares de estudios *in vitro* y las DL50 de 347 compuestos.

En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios de validación para comprobar la utilidad de esta correlación, siendo los resultados preliminares muy esperanzadores. Por lo tanto es muy probable que en un futuro podrá estimarse con fiabilidad la DL50 con cultivos celulares, y que mientras tanto deberían usarse estudios *in vitro* al menos para seleccionar las dosis de inicio de los ensayos para determinar la DL50 *in vivo*.

Asimismo, se ha considerado que el ensayo del nódulo linfático local (LLNA) en ratón está científicamente validado y debiera usarse para la evaluación de la capacidad de **sensibilización dérmica** en lugar del ensayo en cobayo, que es más doloroso y estresante, además de emplear más animales. Ha sido aceptado por 4 agencias norteamericanas (the Consumer Product Safety Commission, the Environmental Protection Agency, the Occupational Safety and Health Administration, Food and Drug Administration) como alternativa al ensayo en cobaya. ESAC/ECVAM también apoyó la preferencia del LLNA sobre el método en cobayo, que debería reservarse para casos especiales.

En forma paralela la OECD (Actualización de la Directriz 406) y la Comunidad Económica Europea (CEE) permiten el uso de métodos animales menos lesivos para detectar la capacidad sensibilizante sobre la piel. Para el ensayo de maximización pueden usarse 15 en vez de 30 cobayos, excepto en casos de duda. Como ensayo de criba puede usarse el método en ratón del LLNA (Kimber et al., 1991).

También se propone el empleo del ensayo en la Oreja del Ratón (MEST), la liberación de IgE en cultivos expuestos y la aplicación de parches dérmicos en humanos (CAN). Los procedimientos más prometedores in vitro son el cultivo de células dendríticas humanas a partir de mononucleares periféricos evaluando la liberación de IL-1 β o la producción de sus ARNm, junto al empleo de modelos de piel humana reconstituida, cultivos de células de Langerhans, cultivos de queratinocitos y cocultivos de células T y células dendríticas.

El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) ha propuesto una estrategia para evaluar la capacidad de sensibilización dérmica (Worth y Balls, 2002) que comenzaría por la búsqueda de datos previos sobre el compuesto, seguida de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del mismo y la estimación mediante sistemas predictivos computacionales. A continuación se realizaría un estudio de los parámetros de partición, un ensayo in vitro de sensibilización, y finalmente, si no se han podido excluir los efectos, el ensayo de nódulo linfático local.

La Directriz 407 de la OCDE de estudio por dosis repetidas de 28 días fue revisada en 1995 para permitir su uso como primera etapa para detectar efectos inmunotóxicos (Barlow et al., 2002). Se incluyó la pesada del timo y el estudio histopatológico de las placas de Peyer, timo, nódulos linfáticos y médula ósea. Para una mejor evaluación se sugirió posteriormente realizar un estudio histopatológico especializado de las células y los órganos linfoides y linfáticos, y en caso de detectar alteraciones, aplicar un ensayo de eritrocitos de carnero.

El estudio de 90 días, Directriz 408 de la OECD, puede ser más sensible, no sólo por el periodo de exposición, sino también por el empleo de mayor número de animales.

La 52ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial aprobó el 7 de octubre de 2000 por unanimidad la 5ª revisión desde que fueron adoptados por primera vez en 1964 los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, es decir, la Declaración de Helsinki. En la línea de la propuesta efectuada en el 3 Congreso Mundial de Métodos Alternativos, ya no se exige realizar siempre ensayos con animales previamente a los humanos. En concreto, el Artículo 11 queda redactado así: “La

investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno". Por lo tanto, los procedimientos alternativos pueden proporcionar un considerable ahorro en el número de animales empleados (Repetto et al, 2004).

En la 31ª Reunión Conjunta de la OCDE en Noviembre de 2000 se decidió que debe ser eliminado el ensayo actual de la determinación de la toxicidad agua por vía oral (DL50 según TG 401). Una decisión que en buena medida fue debida al intenso trabajo y presión ejercida durante largos años de negociación y reuniones de expertos por los miembros de la Unión Europea y de la OECD (Asociación Española de Toxicología, 2001).

El 25 de Enero de 2001 fue aprobada una Directiva de la Comisión Europea que, entre otras muchas cosas, decreta la eliminación del método B.1 (equivalente a la determinación de la DL50 o TG 401) del Anexo V de la Directiva 67/548 que contiene los métodos de test oficiales en la EU para evaluar las propiedades de las sustancias químicas (Asociación Española de Toxicología, 2001).

2.9 ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE DOSIS REPETIDAS

Los estudios de toxicidad de dosis repetidas tienen como objetivo caracterizar el perfil toxicológico de la sustancia tras la administración repetida. De ellos es posible obtener información sobre los efectos tóxicos, la identificación de los órganos blancos, los efectos sobre las funciones fisiológicas, hematológica, patológica, histopatológica, y la determinación del valor NOEL. Estos estudios pueden tener duraciones pequeñas (por ejemplo, 14 y 28 días) o involucrar un período más extensivo de la administración de la droga (por ejemplo, 90 días, 180 días). (Souza, 2006)

Generalmente realizados en ratas y perros (a veces en los primates), debido a los amplios conocimientos de fisiología y patología de estas especies, el costo y la

disponibilidad en el número de animales sanos. Tres dosis son generalmente empleados para demostrar la relación entre el efecto/dosis y para determinar el Valor NOEL (Souza, 2006).

El *NOEL (NOAEL)* es el nivel sin efecto (adverso) observado, o la dosis más alta que no produce efecto tóxico. Para establecer un NOEL se necesitan múltiples dosis, una población amplia e información complementaria para garantizar que la ausencia de respuesta no es un mero fenómeno estadístico. El LOEL es la mínima dosis efectiva observada en una curva de dosis-respuesta, (es decir, la dosis mínima) que produce un efecto. Un *factor de seguridad* es un número convencional, arbitrario, por el que se divide el NOEL o el LOEL obtenidos en experimentos con animales para establecer una dosis permisible provisional en los seres humanos. Suele utilizarse en la esfera de la toxicología alimentaria, pero puede emplearse también en la toxicología laboral (Holmberg *et al.*, 2001).

El 27 de julio del 2006 el FDA (Food And Drug Administration) termina de elaborar la Guía para la industria N° 147 - Estudios para Evaluar la Seguridad de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Humanos: Estudios de Toxicidad de Dosis Repetidas (90 días). El objetivo de esta guía es recomendar estudios de toxicidad de dosis repetidas por 90 días armonizados internacionalmente, es por ello que esta guía fue desarrollada después de considerar las prácticas vigentes para la evaluación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para humanos en la Unión Europea (UE), Japón, Estados Unidos (E.E.U.U.), Australia, Nueva Zelandia, y Canadá. Básicamente recomienda que los estudios de dosis repetidas (90 días), la necropsia y el examen histopatológico se realicen de acuerdo a las guías de OECD 408 (Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents) y 409 (Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-rodents).

2.10 TOXINAS EN PECES Y MARISCOS

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*), presenta una dieta que cambia continuamente durante su ontogénia, presentando una gran adaptabilidad alimenticia; es un carnívoro oportunista, lo que le permite alimentarse de la presa más accesible sin realizar una

búsqueda específica. Su dieta puede ser muy variada que puede incluir pelágicos menores, langostilla, mictofidos, camarón, plancton, peces pequeños, etc. Asimismo, cuando la dieta es escasa, puede llegar a practicar el canibalismo, una conducta común dentro de los cefalópodos, ya que en diferentes estudios sobre alimentación se ha encontrado un porcentaje considerable de picos y trozos de calamar gigante en el tracto digestivo de especies capturadas (Ibarra, 2006). Razón por la cual puede alimentarse de especies que pueden contener algunas toxinas marinas.

Algunas de las intoxicaciones de origen marino son causadas por ingerir pescados y mariscos que se han alimentado con dinoflagelados o algas productoras de toxinas. Con la tendencia actual de consumo de productos marinos, se podrían producir intoxicaciones que pueden ser leves o de mayores consecuencias. Entre los mariscos que se alimentan con algas están los mejillones, almejas, ostiones y los peces “ciguatera” (Colwell, 1983).

También pueden presentarse otros problemas y causas como las que se presentan en el Cuadro 14.

Cuadro 14: Intoxicaciones de origen marino

PROBLEMA	ALIMENTO	MICROORGANISMOS	OBSERVACIONES
Histamina	Peces <i>Scombroide</i> (atún, macarela, bonito, etc.) otros peces (sardina, anchoveta)	<i>Morganela morgani</i> <i>Klebsiella</i>	Acumulación de histamina en pescado descompuesto, minutos a horas.
Ciguatera	Barracuda Huachinango Róbalo	Dinoflagelados <i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Prorocentrum concavum</i> <i>P. mexicana</i>	Gastrointestinal, neurotóxicos, dolores abdominales, náusea, vómito, diarrea, dolor muscular, aturdimiento, sequedad de boca, ansiedad, cianosis, escalofríos, sudación, dilatación ocular, visión nublada, ceguera temporal, parálisis y muerte.
Parálisis por mariscos	Mejillones Almeja Caracol, etc.	Dinoflagelados <i>Gonyaulax catebella</i> <i>G. tamerensis</i>	
Neurotóxicos	Mariscos Golfo México	Dinoflagelados <i>Ptychodiscus brevis</i> (<i>Gymnodium breve</i>) marea roja, Brebetoxina A y B (poliéter)	Adormecimiento de labios, lengua, garganta; dolor muscular, problemas gastrointestinales, raramente fatal.
Diarrea	Mariscos	<i>Dinophysis fortis</i> , <i>D. acuminata</i> (Chile, países nórdicos, Japón)	Problemas gastrointestinales.

Fuente: Valle y Lucas (2000).

2.10.1 Tetrodotoxina

A diferencia del resto de las biotoxinas que se acumulan en productos pesqueros, la tetrodotoxina no es producida por las algas. El mecanismo preciso de la producción de esta toxina tan potente no está claro, pero al parecer intervienen bacterias simbióticas que están presentes con bastante frecuencia (Noguchi *et al.* 1987).

La tetrodotoxina se encuentra fundamentalmente en el hígado, ovarios e intestino de varias especies de peces sopladores (globo), siendo los más tóxicos los miembros de la familia *Tetraodontidae*, aunque no todas las especies de esta familia contienen la toxina. El tejido muscular de los peces tóxicos normalmente carece de la toxina, pero existen excepciones. La intoxicación por el pez globo produce síntomas neurológicos de 10 a 45 minutos después de la ingestión. Los síntomas son sensación de hormigueo en la cara y en las extremidades, parálisis, síntomas respiratorios y colapso cardiovascular. En los casos fatales, la muerte sobreviene en menos de 6 horas (Huss, 1997).

2.10.2 Ciguatera

La intoxicación por ciguatera ocurre como consecuencia de la ingestión de pescado que se ha vuelto tóxico al alimentarse de dinoflagelados tóxicos, que son algas planctónicas marinas microscópicas. La principal fuente es el dinoflagelado bentónico *Gambierdiscus toxicus*, que vive en las proximidades de los arrecifes coralinos fuertemente fijado a las macroalgas. Se observa un aumento de la producción de dinoflagelados tóxicos cuando los arrecifes se alteran ecológicamente (huracanes, derribo de arrecifes, etc.). La toxina puede detectarse en el intestino, en el hígado y tejidos musculares mediante ensayos con ratones y por cromatografía. Algunos peces son capaces de eliminar la toxina de su organismo (Taylor 1988).

Aunque la incidencia de intoxicación por ciguatera comunicada en los informes es baja (Taylor 1988), se ha estimado que la incidencia mundial puede ser del orden de 50.000 casos/año (Ragelis 1984).

El cuadro clínico es variable, pero el tiempo de aparición es unas pocas horas después de la ingestión de la toxina. Los sistemas gastrointestinales y neurológicos son los afectados (vómitos, diarrea, sensación de hormigueo, ataxia, debilidad). La duración de la enfermedad puede ser de 2–3 días, aunque puede prolongarse durante semanas o incluso años en los casos graves. La muerte sobreviene como consecuencia de un colapso circulatorio (Huss, 1997).

2.10.3 Toxina paralizante de moluscos bivalvos (PSP)

La intoxicación después del consumo de moluscos bivalvos es un síndrome que se conoce desde hace siglos, siendo la más común la parálisis tóxica por ingestión de moluscos (PSP). La PSP es causada por un grupo de toxinas (saxitoxinas y sus derivados) producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*.

Históricamente, se ha asociado la PSP con las proliferaciones de dinoflagelados ($> 10^6$ células/litro) que pueden causar una coloración rojiza o amarillada del agua. No obstante, la coloración del agua puede ser causada por la proliferación de muchos tipos de especies planctónicas que no siempre son tóxicas, y no todas las proliferaciones de algas tóxicas dan color.

La proliferación de dinoflagelados es una función de la temperatura del agua, luz, salinidad, presencia de nutrientes y otras condiciones ambientales. No obstante, se desconoce la naturaleza precisa de los factores que ponen en marcha un clon tóxico. La temperatura del agua debe ser $> 5-8^{\circ}\text{C}$ para que tengan lugar las proliferaciones. Si las temperaturas caen por debajo de 4°C , los dinoflagelados sobreviven en forma de quistes enterrados en las capas superiores de los sedimentos.

Los mejillones, almejas, berberechos y veneras (conchas de abanico) que se han alimentado de dinoflagelados tóxicos retienen la toxina durante períodos de tiempo variables que dependen del tipo de molusco. Algunos eliminan la toxina muy rápidamente y son tóxicos únicamente durante el momento de la proliferación, mientras que otros retienen la toxina durante un largo período, incluso año (Schantz 1984).

2.10.4 Toxina diarreica de moluscos bivalvos

Se ha dado parte de miles de casos de enfermedades gastrointestinales causados por la intoxicación diarreica por ingestión de moluscos bivalvos (DSP) en Europa, Japón y Chile. Los dinoflagelados causantes de la producción de las toxinas pertenecen a los géneros *Dinophysis* y *Aurocentrum*. Estos dinoflagelados están ampliamente distribuidos, lo que significa que esta enfermedad también puede producirse en otros lugares del mundo. Al menos se han identificado 7 toxinas, incluido el ácido okadoico. La aparición de la enfermedad se produce entre la media hora y unas pocas horas después del consumo del marisco que se ha estado alimentando de algas tóxicas. Los síntomas son desórdenes gastrointestinales (diarrea, vómitos, dolor abdominal) y las víctimas se recuperan en 3–4 días. Nunca se ha registrado ninguna muerte (Huss, 1997).

2.10.5 Toxina neurotóxica de moluscos bivalvos

La intoxicación neurotóxica por ingestión de moluscos bivalvos (NSP), se ha descrito en personas que consumieron moluscos que habían estado expuestos a “mareas rojas” de dinoflagelados (*Ptychodiscus breve*). La enfermedad ha estado restringida al Golfo de México y otras zonas frente a la costa de Florida. Las brevetoxinas en general son muy letales para los peces y además las mareas rojas de estos dinoflagelados también están relacionadas con muertes masivas de peces. Los síntomas de la (NSP) son semejantes a los de la PSP, excepto que no tiene lugar la parálisis. La NSP rara vez es mortal (Huss, 1997).

2.10.6 Toxina amnésica de moluscos bivalvos

El primer caso de intoxicación masiva por esta toxina se presentó en 1987 en Canadá. La toxina es producida por las diatomeas *Pseudonitzschia pungens*, forma *multiserie* *Pseudonitzschia australis* (*Nitzschia pseudoseriata*), *Nitzschia pseudodelicatissima*. Se caracterizan por formar largas filas de células dispuestas una sobre otra.

La toxina corresponde al ácido domoico, que es un derivado del ácido kainico, el cual es análogo del ácido glutámico. El ácido domoico es un ácido tricarbóxico débil, con estructura rígida, soluble en agua y termoestable. Compite con el ácido glutámico por los receptores de éste, activándolos y permitiendo la entrada de cloruro, calcio y agua, lo que lleva a la ruptura y muerte celular.

Los síntomas son gastrointestinales y neurológicos: calambres, diarrea, vómitos, náuseas, dolor abdominal, pérdida de la concentración, pérdida del equilibrio, entorpecimiento, debilidad, dolor de cabeza, visión borrosa, confusión, vértigo, pérdida de la memoria de corto tiempo (daña las células del hipocampo), coma y muerte. La dosis máxima aceptada internacionalmente es de 20 µg/g de marisco (Huss, 1997).

2.10.7 Histamina

La intoxicación por histamina es una intoxicación química debida a la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de histamina. Históricamente, esta intoxicación se denominó intoxicación por escómbridos debido a la frecuente asociación con peces de la Familia *Scombridae*, entre los que se incluyen el atún y la macarela o caballa.

La intoxicación por histamina es un problema de alcance mundial en los países donde los consumidores ingieren pescado que contiene altos niveles de histamina. Es una enfermedad benigna, su período de incubación es muy corto (de pocos minutos a pocas horas) y la duración de la enfermedad es corta (pocas horas). Los síntomas más comunes son los cutáneos, como el rubor facial o bucal, urticaria, o edema localizado, pero también puede verse afectado el tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea), o producirse complicaciones neurológicas (dolor de cabeza, hormigueo, sensación de quemazón en la boca) (Huss, 1997).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente estudio se llevó a cabo dentro de las instalaciones de los laboratorios de Procesos de la Facultad de Pesquería y en el Bioterio de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 MATERIA PRIMA

En el presente trabajo se utilizó como materia prima el Concentrado de Proteína de Pota (*Dosidicus gigas*), la misma que fue elaborada en los Laboratorio de Procesos Pesqueros de la Facultad de Pesquería de la UNALM según la metodología seguida por Lazo (2006).

3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1 Para la instalación del bioterio

- 40 ratas de la cepa *Sprague Dawley* de ambos sexos.
- Alimento balanceado cuya composición cubre los requerimientos nutricionales.
- Balanza analítica.
- Materiales de limpieza.

3.3.2 En la administración por vía orogástrica de proteína de pota

- Cánula metálica.
- Jeringas desechables estériles.
- Vasos de precipitado

3.3.3 En el sacrificio de los ratones

- Heparina Sódica (inhibe la coagulación de la sangre)
- Éter.
- Jeringas desechables estériles.
- Tijeras quirúrgicas
- Cajitas plásticas
- Formol al 10%.

3.3.4 Para los ensayos bioquímicos y hematológicos

- Tubos capilares para microhematocrito.
- Espectrofotómetro semiautomático Metrolab® 1600.
- Analizador hematológico automático Sysmex ®1800.
- Reactivos para la determinación bioquímica de la concentración de albúmina, creatinina y transaminasa glutamicopirúvica (TGP).

3.3.5 En la preparación de Cortes Histológicos

- Bisturí.
- Alcohol etílico.
- Xilol.
- Hematoxilina.
- Eosina al 1%.

3.4 METODOS DE ANÁLISIS Y PROCEDIMIENTO

3.4.1 Preparación del Concentrado de Proteína de Pota

Se preparó el concentrado de proteína de pota según la metodología seguida por Lazo (2006). El manto de la pota fue limpiado, cortado, lavado en agua, precocido, molido, lavado nuevamente, centrifugado, deshidratado y, finalmente, sometido a una molienda fina. El producto obtenido presentaba buenas características organolépticas. El olor y sabor fueron agradables y neutrales, sin olor a pota. Estas características se mantuvieron inalterables durante los tres meses que duró el experimento, sin usar ningún tipo de preservante o antioxidante. El diagrama de flujo del proceso de elaboración de concentrado de proteína de pota se muestra en la Figura 10.

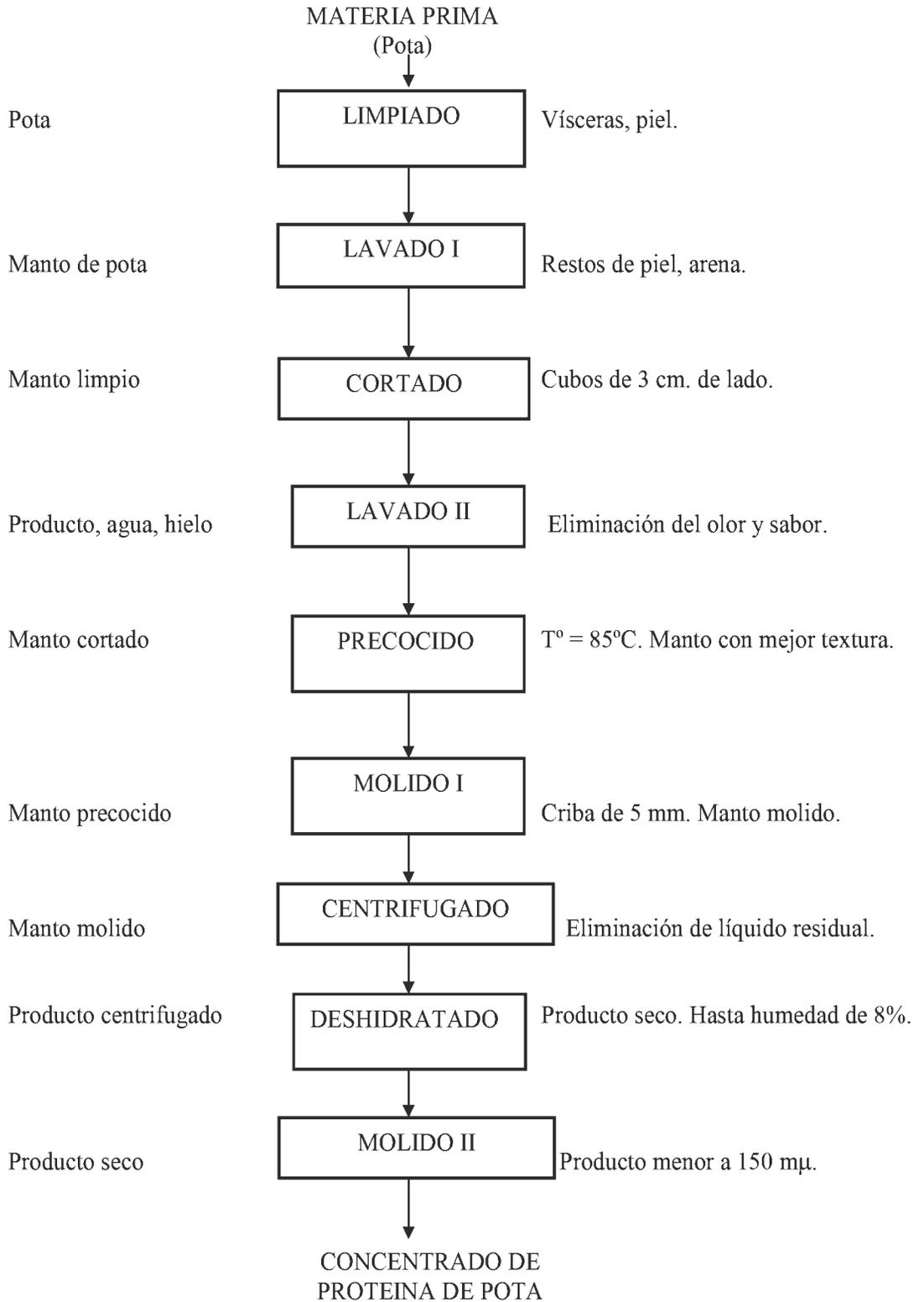


Figura 10: Diagrama del flujo del proceso de elaboración del concentrado de proteína de pota

Dicho Diagrama de flujo fue elaborado en base a lo reportado por Roldán (2002) y Lazo (2006) con modificaciones para el caso específico de la pota. Una breve descripción del mismo es la siguiente:

a. Recepción de materia prima

La pota entera eviscerada fue recepcionada en cajas de plástico con hielo. Se realizó el respectivo análisis organoléptico para determinar el grado de frescura y posteriormente se procedió a separar el manto, la aleta y la cabeza.

b. Limpiado

El manto previamente pelado fue abierto para su limpieza, se le retiró los restos de vísceras, la pluma y la piel delgada de la parte interna del manto.

c. Lavado I

Este lavado fue realizado con el objetivo de eliminar los restos de piel, arena y otros que estén adheridos al manto.

d. Cortado

El manto limpio fue cortado en cubos de 3 cm de lado con la finalidad de hacer más efectiva la siguiente operación (Lavado II).

e. Lavado II

Se realizó con agua más hielo a temperatura de 2° C durante 10 minutos con la finalidad de eliminar el olor y el sabor amargo característico de la pota.

f. Precocido

Se realizó en agua caliente a 85° C, con proporción agua : manto cortado de 1:1, con la finalidad de conseguir una mejor textura del manto de la pota para el molido.

g. Molido I

Se utilizó una moledora de carne con criba de 5 mm de diámetro para facilitar el lavado final

h. Centrifugado

Con la finalidad de eliminar el líquido residual del lavado y reducir el tiempo de secado.

i. Deshidratado

Con aire caliente a 65 °C hasta una humedad final de 8%. Se utilizó un secadero por convección.

j. Molido II

La molienda se realizó en un molino de martillos hasta una granulometría promedio de menos de 150 μ .

3.4.2 Análisis Sensorial del Concentrado de Proteína de Pota

Para el análisis sensorial del Concentrado de Proteína de Pota, se empleó el cuadro 15, diseñado por Lazo (2006), el cual elaboró dicho cuadro sensorial teniendo en cuenta las características de color, olor, sabor y textura.

Cuadro 15: Evaluación Sensorial para el Concentrado de Proteína de Pota

CARACTERÍSTICAS		PUNTAJE
Color	Blanco lechoso	3
	Blanco cremoso	2
	Amarillo opaco	1
Olor	Sin olor a pota	3
	Ligero olor a pota	2
	Con olor a pota	1
Sabor	Sin sabor a pota	3
	Ligero sabor a pota	2
	Con sabor a pota	1
Textura	Suave al tacto y pulverulenta	3
	Aspero y pulverulenta	2
	Duro y granuloso	1

Calificación

Puntuación	Calidad
10 a 12	Buena
7 a 9	Regular
Hasta 6	Mala

Fuente: Lenin Lazo (2006)

3.4.3 Composición química proximal

La composición química proximal de la materia prima (Concentrado de Proteína de Pota) se realizó según los métodos recomendado por Nagakura (1972).

3.4.4 Toxicidad a dosis repetidas por 90 días

Se llevó a cabo según lo establecido en las Directrices de la Guía 408 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 1998) y en la Guía para la Industria N° 147 del FDA (2006) para este tipo de estudio. Se emplearon 40 ratas de la cepa *Sprague Dawley* de ambos sexos, con peso corporal entre 200 y 300 g. Los animales fueron adaptados a las condiciones del bioterio durante una semana previa a los experimentos. Todos procedentes del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN).

Los animales se mantuvieron en una sala con temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y ciclo luz – oscuridad de 12/12 horas, permaneciendo 2 animales por jaula. La alimentación consistió en dieta estándar para ratas y ratones proveniente la Planta de alimentos balanceados de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. El agua era de calidad apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua era *ad libitum*. Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio. Se confeccionaron 4 grupos de tratamiento (Cuadro N° 16) a razón de 10 animales por grupo. Los grupos fueron: Grupo I tratado con 500 mg/kg/día, Grupo II tratado con 1000 mg/kg/día, Grupo III tratado con 2000 mg/kg/día y Grupo IV control que no recibió tratamiento. Antes de comenzar el ensayo se realizó extracción sanguínea del plexo ocular para determinar valores basales hematológicos y bioquímicos. La administración se realizó por vía oral mediante cánula intragástrica durante 13 semanas (equivalente a 90 días), para lo cual se reconstituyó el concentrado de pota en agua destilada al 20%, y se administraron diariamente 0,6 – 1, 1,1 – 1,9 y 2,1 – 3,5 mL para conseguir las dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg/día, respectivamente. Al finalizar los 90 días de administración, se efectuó la obtención de muestras de sangre de los animales del plexo ocular, previamente anestesiados con éter; empleando capilares para microhematocrito, con el objetivo de realizar el examen hematológico y los análisis de bioquímica clínica.

Cuadro 16: Dosis Administradas a los Grupos

Grupo	N° de Ratas	Dosis (mg/Kg peso)
Grupo I	10	500
Grupo II	10	1000
Grupo III	10	2000
Grupo IV (Control)	10	0*

* Se le administra a cada rata del grupo control solución salina fisiológica.

a. Exámenes hematológicos

Para la realización de los exámenes de hematología se empleó un analizador hematológico automático Sysmex 1800®. Los parámetros medidos por el analizador fueron: hematocrito, hemoglobina, recuento de leucocitos. Para el recuento diferencial de blancos se procedió a la realización de extensiones sanguíneas a partir de la sangre conservada en EDTA a la llegada al laboratorio. Una vez realizada la extensión sanguínea se procedió a fijarla y teñirla con tinción panóptica. Se realizó el estudio microscópico del frotis sanguíneo, llevando a cabo un recuento celular de 100 células nucleadas, obteniendo el recuento diferencial de las poblaciones leucocitarias: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos.

b. Bioquímica clínica

Se utilizó un equipo de alta fiabilidad el Metrolab 1600 DR® y se procedió a utilizar el sistema de cubetas y la técnica óptica estándar de fotolorímetro con filtro rojo o verde a 620-650 nm. Fueron hechas pruebas para analizar albúmina, creatinina y transaminasa glutamicopirúvica (TGP) (Wiener lab., 2005).

b.1. Determinación de Albúmina (Método Colorimétrico)

Se utilizó el método de Wiener lab. (2005), introducido por Rodkey en 1965, el cual consiste en la unión de albúmina. La albúmina reacciona específicamente (sin

preparación previa) con la forma aniónica de la 3,3',5,5' tetrabromo cresosulfon flateina (BCF), en presencia de un exceso de colorante en medio tamponeado a pH 3.9. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

b.2 Determinación de Creatinina (Método Colorimétrico Cinético o de punto final)

La creatinina y otros compuestos de la muestra reaccionan con el ácido pícrico en medio alcalino dando un complejo color rojo que se cuantifica mediante lectura fotométrica.

La determinación de creatinina puede llevarse a cabo por medio de una técnica de punto final, o por una técnica cinética eliminándose en ambas el color que se debe a los cromógenos no creatinina.

En el primer caso, la adición de ácido al medio, destruye el picrato de creatinina pero no el color formado por los demás compuestos. Por lo tanto la diferencia entre la lectura fotométrica antes y después del agregado de ácido, permite cuantificar la creatinina en forma específica.

En la técnica cinética, los cromógenos no creatinina, reaccionan dentro de los primeros 30 segundos de iniciada la reacción, que se comporta como cinética de primer orden para la creatinina. De manera que entre los 30 segundos y los 5 minutos posteriores al inicio de la reacción, el incremento de color se debe exclusivamente a la creatinina.

b.3. Determinación de la Actividad Transaminasa

La enzima alanina amino transferasa (GPT) cataliza la reacción entre la L-alanina y el 2-oxoglutarato, dando piruvato y L-glutamato. El piruvato formado reacciona inmediatamente con el NADH en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) para dar L-lactato + NAD⁺. La velocidad de consumo del NADH se determina espectrofotométricamente a 340 nm y es proporcional a la actividad de la GPT en la muestra (Wiener Lab., 2005). Todo esto lo podemos ver en la siguiente reacción:



c. Análisis Anatomopatológico

Al día siguiente de la última administración se procedió a sacrificar por elongación cervical para efectuar la extracción de los siguientes órganos: riñón, hígado y pulmón, los cuales fueron examinados macroscópicamente y fijados en solución de formol al 10 % para el posterior estudio histopatológico. También se determinó el peso relativo de órganos (riñón, hígado y pulmón). La metodología a seguir fue la recomendada por Castillo et al (2006).

d. Análisis histopatológico

Las muestras extraídas de las necropsias se conservaron en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron en un micrótopo con un grosor de 4 a 5 mm. Se usó la técnica tradicional de coloración con hematoxilina-eosina para la realización de los estudios de histopatología. La metodología seguida fue la recomendada por Castillo et al (2006).

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la Figura 11 se muestra el diseño experimental que se siguió en la presente investigación.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresarán con la media \pm desviación estándar. Para determinar diferencias significativas entre los grupos se empleó el análisis de varianza (ANVA) para un criterio de clasificación de una vía (One Way) y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (para evaluar la significancia de todas las diferencias entre tratamientos) y Dunnet (para comparar a cada uno de los tratamientos contra el control), considerando un nivel de significancia de cinco por ciento (5%). Se utilizó el programa estadístico Minitab versión 15.

MATERIA PRIMA	PRUEBA PILOTO	TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS (90 DÍAS)		EVALUACION PATOLOGICA	LABORATORIO CLINICO
		Grupos	Dosis		
		(10 ratas*/grupo)	(mg/kg)		
		I	500		
		II	1000		
		III	2000		
IV	Control				
Factores a controlar					
1. Análisis sensorial	Evaluación de la Toxicidad aguda oral	1. Observación de la actividad y comportamiento	* Ratas cepa Sprague Dawley	1.- Diagnóstico Anatómico - Patológico (Evaluación Macroscópica mediante necropsia)	1. Análisis Bioquímicos Creatinina, Albúmina y Transaminasa glutamicopirúvica (TGP).
2. Composición química.		2. Control del peso diario			

Figura 11: Metodología Experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DE LA MATERIA PRIMA

4.1.1 Evaluación Sensorial del Concentrado de Proteína de Pota

Los resultados de la evaluación sensorial del concentrado de proteína de pota utilizada como materia prima muestran como características lo siguiente: color blanco lechoso; sin olor a pota; sin sabor a pota y suave al tacto y pulverulenta. Obteniendo el puntaje máximo de 12 puntos, calificado como “buena calidad” según el cuadro 15 de Evaluación Sensorial diseñado por Lazo (2006). Estas características se mantuvieron inalterables durante los 90 días que duró la investigación (Figura 12).

4.1.2 Composición química proximal

La composición química proximal del Concentrado de Proteína de Pota utilizado en la presente investigación se muestra en el Cuadro 17.

Cuadro 17: Composición química proximal del Concentrado de Proteína de Pota

COMPONENTE	%
Proteínas	85.70
Grasas	3.90
Cenizas	1.84
Humedad	7.60

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Lazo (2006) y a lo propuesto por Madrid (ver cuadro 5) para el Concentrado Proteico de Pescado del tipo A pero con la diferencia que no usamos solventes, por lo tanto es un producto con más aceptación en el mercado.

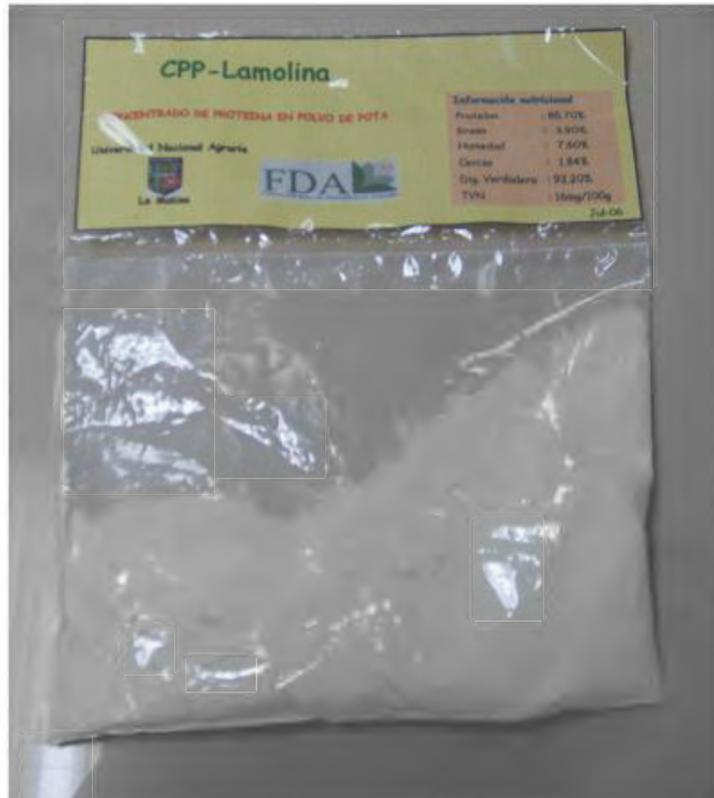


Figura 12: Concentrado de Proteína de Pota.

4.2 TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS POR 90 DÍAS

La administración del Concentrado de Proteína de Pota no demostró alteraciones en el comportamiento, ni en el examen físico de los animales tratados durante el período de experimentación, además de no producir mortalidad en ningún grupo experimental. El consumo de alimento y agua por los animales de ambos sexos se mantuvo similar tanto para el grupo control, como para los tratados con diferentes dosis del producto.

La administración durante los 90 días de la dosis límite de 2000 mg/Kg no provocó muertes de los animales o síntomas indicativos de toxicidad. Este resultado enmarca al concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) en la categoría “sin clasificar” (2000 < DL50) de acuerdo a las Clases de Toxicidad de la Comunidad Europea ya que no se

observó mortalidad ni signos tóxicos atribuibles a la administración de la sustancia de prueba a la dosis de 2000 mg/kg que fue la dosis más alta empleada (Grupo I tratado con 500 mg/kg, Grupo II tratado con 1000 mg/kg, Grupo III tratado con 2000 mg/kg y Grupo IV Control).

El método de la dosis fija aceptado en la Guía 420 de la OECD (2001) plantea que si a dosis de 2000 mg/kg no ocurren muertes, no es necesario realizar estudios a dosis mayores, reduciendo el número de animales el sufrimiento de los mismos.

De acuerdo a este resultado podemos afirmar que el concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) no produjo toxicidad significativa a la dosis límite en el ensayo de toxicidad a dosis fijas.

Según Pérez et al (2008). Actualmente se acepta desde el punto de vista regulatorio que no es necesario definir un valor puntual de DL50 para una sustancia y que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un rango. Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen informes anteriores de toxicidad de la sustancia que se investiga es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal, lo que se ajusta a nuestro estudio dado que de la sustancia en estudio no se ha señalado toxicidad en su extenso uso tradicional. 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.

Según Bermúdez et al. (2007) en diciembre de 2002 quedó abolida por la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) la ejecución del test clásico para la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal 50 (DL50) que fue sustituido por tres métodos alternativos cuyo objetivo común es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos, estos métodos comprenden el test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad (Toxic Class Method, TCM), Procedimiento de Sube y Baja (Up-and-Down Method, UDP) y el Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP). El Procedimiento de Dosis Fijas fue

adoptado en la Guía No. 420 de la OECD como alternativa a la prueba clásica aguda. El método se basa en la evaluación de dosis prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA). La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante.

Según Repetto (1997) el método de dosis fija que ha sido admitida por la UE en 1990 y por OECD en 1992, se basa en la aplicación sucesiva de cuatro niveles de dosis. Las dosis están comprendidas entre 5 mg/kg y 2000 mg/kg.

La Comisión de las Comunidades Europeas (2008) en el Reglamento (CE) N° 440 referente al Método B.26. Ensayo de Toxicidad Oral Subcrónica por Administración Continuada (90 días) en Roedores menciona que se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite. En la Guía OECD 408 Estudio de Toxicidad Oral a Dosis Repetidas (90 días) en roedores dice respecto al ensayo límite que si en un ensayo con una dosis equivalente, al menos, a 1000 mg / kg peso corporal / día, utilizando los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto adverso que se observe toxicidad y si no se espera sobre la base de datos de compuestos relacionados estructuralmente, realizar un estudio completo con tres niveles de dosis no pueden considerarse necesarias. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de un mayor nivel de dosis que se utilizarán.

Es por ello que nuestra dosis elegidas están dentro del rango mencionado por Repetto (Grupo I tratado con 500 mg/kg/día, Grupo II tratado con 1000 mg/kg/día, Grupo III tratado con 2000 mg/kg/día y Grupo IV control), utilizando las directrices de la Guía OECD 408.

De los resultados se puede afirmar que la administración de la dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal no provocó muertes de los animales o síntomas indicativos de toxicidad ni las otras dosis.

Además, antes de llevar a cabo estos estudios a dosis repetidas por 90 días se realizó una prueba piloto en ratas y ratones del concentrado de proteína de pota al 10% y 20% de concentración con valores límites hasta de 6500 mg/kg para ratones y 6000 mg/kg para

ratas (Anexo 1).

4.2.1 Evaluación del Peso Corporal

En el Cuadro 18 se observa que los animales tratados del grupo II (1000 mg/Kg) y III (2000 mg/Kg), mostraron un menor incremento promedio del peso corporal con respecto al grupo I (500 mg/Kg) y al grupo IV (Control). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Anexo 7). En el análisis estadístico (ANVA) se observó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y de acuerdo a la prueba de comparación de Tukey ($p > 0.05$) tampoco existieron diferencias entre cada uno de los tratamientos.

Cuadro 18: Variación del peso corporal de las ratas tratadas con diferentes dosis del Concentrado de Proteína de Pota (media aritmética \pm desviación estándar)

Grupo (mg/Kg)	Nº Ratas	Peso Promedio Inicial (g)	Peso Promedio final (g)	Incremento Promedio de peso $W_f - W_o$ (%)
I (500)	8	269.2 \pm 32.5	336.3 \pm 59.4	24.9 \pm 7.2
II (1000)	8	267.2 \pm 30.5	316.0 \pm 55.1	18.3 \pm 8.7
III (2000)	8	246.4 \pm 33.0	286.5 \pm 47.4	16.3 \pm 8.4
IV (Control)	8	295.6 \pm 35.1	369.9 \pm 69.7	25.1 \pm 11.2

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y $p > 0.05$ en los demás

La administración del producto debe realizarse todos los días, pues se observó en otras investigaciones que si sólo se administra 5 días a la semana, en lugar de los 7, el descanso de las 48 horas puede permitir la recuperación de los efectos tóxicos (Repetto, 1997). Es por ello que el control del peso corporal fue diario y la administración también durante los 90 días. En dicho período se observó que el incremento de peso vivo diario de todos los grupos, incluido el control, sigue un patrón de variación más o menos similar entre la mayoría de los animales.

En el cuadro 19 se muestra como fue la variación semanal del peso corporal de las ratas de todos los grupos. Al analizar el comportamiento semanal del incremento del peso corporal y el consumo acumulativo de alimentos se observó un incremento similar en todos los grupos de tratamiento respecto al control. En el Anexo 5 se puede observar gráficamente las comparaciones del grupo I, II y III versus el grupo IV (Control).

Cuadro 19: Variación Semanal del peso corporal de las ratas (g) tratadas con el Concentrado de Proteína de Pota (media aritmética \pm desviación estándar, n=10)

Grupo	Días durante el tratamiento								
	Peso Inicial	7	14	21	28	35	42	49	56
I	265.2 \pm 30.0	277.4 \pm 36.7	289.6 \pm 44.9	288.4 \pm 53.0	299.6 \pm 47.4	301.3 \pm 49.9	308.7 \pm 53.3	314.0 \pm 53.6	321.2 \pm 58.0
II	269.7 \pm 28.5	271.9 \pm 32.5	274.2 \pm 41.1	278.7 \pm 43.1	288.2 \pm 48.3	288.5 \pm 51.2	293.3 \pm 54.2	295.0 \pm 58.3	300.6 \pm 58.5
III	251.5 \pm 33.6*	258.7 \pm 36.4*	265.7 \pm 40.9	267.4 \pm 45.7*	274.7 \pm 48.5*	277.5 \pm 46.2	280.2 \pm 48.8	271.4 \pm 46.9*	282.6 \pm 44.1*
Control	288.6 \pm 38.8	302.4 \pm 46.4	316.2 \pm 54.4	327.9 \pm 59.1	333.9 \pm 64.4	338.9 \pm 70.7	343.7 \pm 69.0	352.6 \pm 72.2	357.0 \pm 75.6

*p<0,05; **p<0,01 y p> 0.05 en los demás

En las pruebas estadísticas para la variación semanal del peso corporal de las ratas de todos los grupos (Anexo 8) se encontraron diferencias significativas (p<0.05) y de acuerdo a la prueba de comparación Dunnett se verifica dichas diferencias entre el grupo control y el grupo III (2000 mg/Kg) desde el inicio, semana 1, 3, 4, 7 y 8. Ello se debe a que las ratas del grupo I fueron las que inicialmente tuvieron menos peso en promedio al inicio de la investigación y el grupo control por el contrario el grupo de mayor peso promedio al inicio. Ello se debió a que por precaución las ratas de menor peso según los cálculos de dosificación del producto (anexo 14) iban a necesitar menos volumen de dosificación y para evitar problemas con la administración del concentrado de proteína de pota se procedió a agrupar a las ratas de mayor peso en el grupo control ya que ellas no iban a recibir el producto.

Para esta comparación solo se tomo como datos los valores de las primeras 8 semanas (56 días), debido a que en la semana 9 se presentó un cuadro gripal ocasionado por cambios climáticos. Por ello se decidió trabajar sólo con esos datos..

4.2.2 Bioquímica Clínica

La media aritmética \pm desviación estándar de los datos de Bioquímica (Albúmina, Creatinina y Actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica - TGP) obtenidos para cada grupo de tratamiento al finalizar el estudio se observan en la cuadro 20, donde también se aprecia los datos basales (examen inicial que servirá de base para controlar el desarrollo de una enfermedad o los resultados de un tratamiento), es decir que al inicio del experimento se procedió a sedar a todas las ratas (40 animales) para obtener la muestra de sangre (Anexo 6) para los análisis bioquímicos y hematológicos iniciales (Anexo 2). Al final del experimento (90 días) se procedió a realizar el mismo procedimiento para obtener los datos finales (Anexo 3).

Cuadro 20: Indicadores Bioquímicos para cada tratamiento al finalizar el estudio y datos basales antes del tratamiento (media aritmética \pm desviación estándar)

Grupo (mg/Kg)	Nº Ratas	Albúmina (g/dl)	Creatinina(mg/dl)	TGP (UI/L)
I (500)	6	3.5 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	10.9 \pm 1.8
II (1000)	7	4.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	12.4 \pm 3.8
III (2000)	7	3.7 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	12.4 \pm 2.4
IV (Control)	6	3.8 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2	10.3 \pm 1.4
Datos Basales (al inicio)	40	3.6 \pm 0.37 2.7 – 4.2 (Rango)	1.2 \pm 0.16 0.8 – 1.7 (Rango)	6.7 \pm 0.16 3 – 14 (Rango)

*p<0,05; **p<0,01 y p> 0.05 en los demás

En el análisis estadístico (ANVA) se observó que para los índices bioquímicos evaluados (Albúmina, Creatinina y TGP) no existieron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos evaluados y de acuerdo a la prueba de comparación de Tukey ($p>0.05$) tampoco existieron diferencias entre cada uno de los tratamientos (Anexo 9).

a. Albúmina

La albúmina es la proteína más abundante del plasma y es producida exclusivamente por el hígado. La medición de la albúmina en sangre es un buen indicador de la función sintética del hígado, es decir, de la capacidad del hígado de formar las proteínas que normalmente produce. Los niveles de albúmina pueden descender

rápidamente ante estrés, trauma o sepsis. Esto puede deberse a una acelerada redistribución desde el espacio intravascular, una disminución en su síntesis y/o un aumento en su catabolismo (Levit, 2008).

Según Fernández (2007) en los últimos años, la fisiología renal en relación con las proteínas, y especialmente el comportamiento en relación con la albúmina, está adquiriendo un gran interés en la investigación renal básica, a la vez que gana una creciente importancia en la nefrología clínica, así como en la medicina cardiovascular. Por ejemplo, la excreción de la albúmina con la orina final, que conocemos como *albuminuria*, está siendo reconocida, cada vez más, como un importante factor de riesgo de enfermedades renales y cardiovasculares. Aunque es evidente una clara correlación epidemiológica, no existe aún una explicación racional para estas relaciones; recientemente se ha sugerido que el daño de los podocitos inducidos por la presión arterial intraglomerular y mediada por los receptores de los mineralcorticoides podría ser la explicación de esta conexión entre la albuminuria y el riesgo de las enfermedades cardiovasculares.

Domínguez et al (2001) trabajando con ratas wistar trabajando con dos grupos de ratas Grupo A (desnutridas) y Grupo B (nutridas) encontró valores iniciales de albúmina 1.61 g % (Grupo A) y 1.65 g% (Grupo B) y al final del experimento obtuvo valores de 1.17 g% (Grupo A, disminuyo) y 3.58g% (Grupo B, aumento). En general, la disminución de los niveles plasmáticos de albúmina puede ser signo de una enfermedad hepática crónica. Sin embargo, la disminución de la albúmina no es específica de las enfermedades hepáticas. No se han descrito enfermedades específicas que se asocien a niveles elevados de albúmina por lo que su hallazgo en exámenes de rutina no es indicador de anormalidad, sino más bien es un hallazgo relativamente frecuente de animales o personas bien nutridas. En nuestros resultados (Figura 13 y anexo 2 y 3) hemos encontrado que nuestras medias de los valores de albúmina al inicio (Grupo I: 3.8 g/dl; Grupo II: 3.9 g/dl; Grupo III: 3.7 g/dl y Grupo IV: 3.1 g/dl) y al final permanecen casi iguales (Grupo I: 3.5 g/dl; Grupo II: 4.0 g/dl; Grupo III: 3.7 g/dl y Grupo IV: 3.8 g/dl); además de no haberse encontrado diferencias estadísticas, por lo que podemos inferir que el tratamiento con el concentrado de proteína de pota no ha dañado el hígado o riñón (la creatinina es mas utilizada para determinar algún daño a este órgano). Esto se confirmó cuando se analizó los cortes histológicos de los órganos.

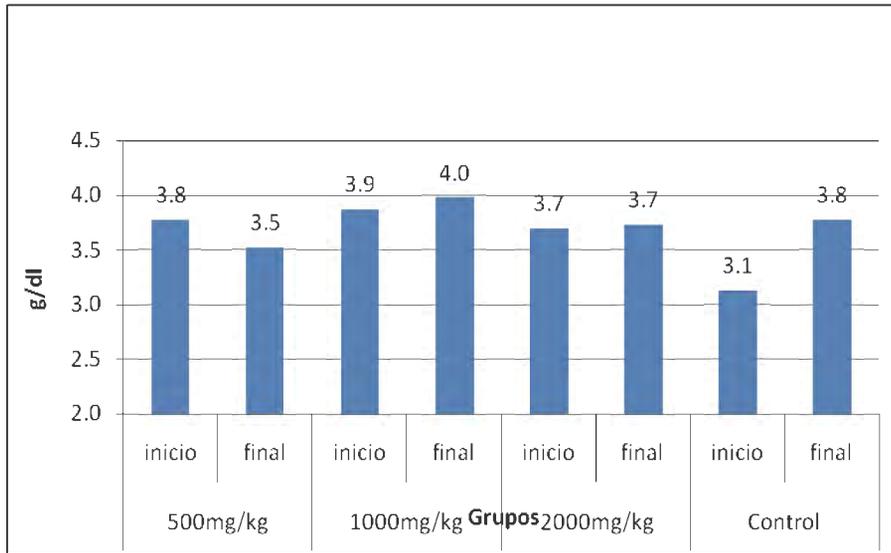


Figura 13: Valores promedio de la albúmina al inicio y al final de la investigación

b. Creatinina

Para evaluar la función del riñón se miden los niveles de creatinina en la sangre, sustancia que se elimina por la orina como parte del proceso de depuración normal en el organismo. Cuando el órgano falla, la eliminación no se produce y la concentración de la sustancia en la sangre se ve aumentada.

Rodríguez et al (2001) encontró en ratas Sprague Dawley valores de creatinina entre 0.4 – 0.7 mg/dl. y Lausada et al (2007) utilizando ratas de la cepa ratas Wistar sus ratas controles tenían valores de creatinina de 1.10 ± 0.05 mg/dl.

En la Figura 14 se observa que al inicio de las pruebas los valores de creatinina fluctuaron entre 1.1 hasta 1.3 mg/dl y al final de la prueba entre 1.2 hasta 1.3 mg/dl. Prácticamente no hubo diferencias entre los datos basales y al final de la investigación. Esto es verificado estadísticamente en el Anexo 9 donde en el análisis estadístico (ANVA) se observó que para los valores de Creatinina no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados y de acuerdo a la prueba de comparación de Tukey ($p > 0.05$) tampoco existieron diferencias entre cada uno de los tratamientos.

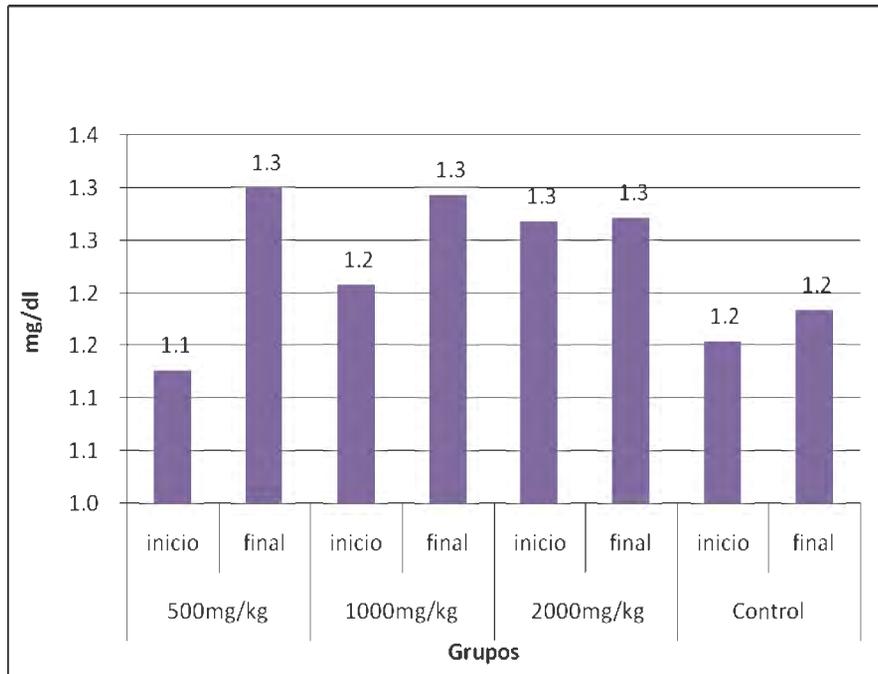


Figura 14: Valores promedio de la Creatinina al inicio y al final de la investigación

c. Actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)

La transaminasa glutámico pirúvica (TGP) también conocida como alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima citoplasmática hepatocelular, con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando hay alguna lesión de estos órganos la TGP es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis. Como es una aminotransferasa más específicamente hepática que la Aspartato aminotransferasa (AST) aparece más elevada en las enfermedades hepáticas que en otras.

Porras (2002) trabajo con la cepa de ratas *Sprague Dawley* que es la misma que hemos usado en el trabajo y menciona que dicha cepa representa un modelo animal usado para evaluar el potencial terapéutico y tóxico de drogas y permite la elaboración de diseños experimentales para estudiar órgano toxicidad, siendo el hígado uno de los órganos mas estudiados. Porras determinó en su trabajo como rango de referencia de marcadores hepáticos para la Actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) el rango de 23 – 42 UI/L en ratas hembras y menciona que entre especies de animales existen variaciones en los valores normales séricos que están relacionadas con diferencias de edad, sexo, hábitos alimenticios, climáticos, de cautiverio e incluso con la técnica empleada para su determinación. Lo anterior pudiera explicar las semejanzas y diferencias observadas entre

los rangos de valores reportados por otros autores. Nomura et al. (1975) reportan en ratas hembras Wistar valores de TGP 22.5 ± 2.5 (20.0-25.0). Czerwek, (1981), Berlanga et al. (1998), por su parte, reportan TGP en ratas hembras Sprague Dawley de 16.5 ± 2.8 (3) y 23 ± 9 , respectivamente. Tales variaciones pueden evaluarse si se establece el rango de referencia de metabolitos para una determinada población en estudio.

Según Pérez (2001) las ratas de la cepa *Sprague Dawley* que maneja el Instituto Nacional de Oncología de la Habana Cuba presentan como datos normales para la TGP el rango de 9.6 – 42.6 UI/L y como media 22.94 UI/L con una desviación estándar de 17.38 analizadas a 34 ratas. Estos valores a diferencia de los encontrados por Porras (2002) se parecen más a los hallados en nuestra investigación.

En los resultados obtenidos (Fig. 15 y anexo 2 y 3) se han encontrado que las medias de los valores de la Actividad Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) al inicio fueron Grupo I: 7.3 mg/dl; Grupo II: 5.7 mg/dl; Grupo III: 6.0 mg/dl y Grupo IV: 7.8 mg/dl y al final se incrementan en todos los grupos Grupo I: 10.9 mg/dl; Grupo II: 12.4 mg/dl; Grupo III: 12.4 mg/dl y Grupo IV: 10.3 mg/dl. En el análisis estadístico (ANVA) se observó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados y de acuerdo a la prueba de comparación de Tukey ($p > 0.05$) tampoco existieron diferencias entre cada uno de los tratamientos (Anexo 9).

Según Pérez (2006) algunas características de la elevación de las transaminasas pueden tener un valor orientador acerca de la causa que origina la lesión hepática. Así elevaciones superiores a 10 veces del límite superior de la normalidad, sólo se encuentran en las lesiones tóxicas, isquémicas o virales.

En la investigación dichos valores no se incrementaron diez veces como menciona Pérez; además de no haberse encontrado diferencias significativas en el análisis estadístico, por lo que se puede inferir que el tratamiento con el concentrado de proteína de pota no ha dañado el hígado. Esto se confirmó cuando se analizó los cortes histológicos dicho órgano.

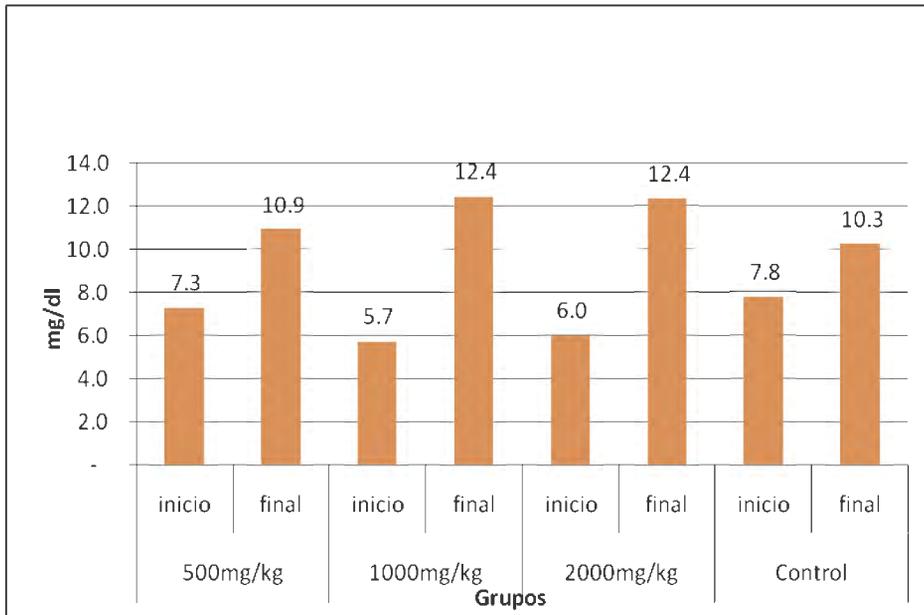


Figura 15: Valores promedio de la TGP al inicio y al final de la investigación.

4.2.3 Indicadores Hematológicos

La media aritmética \pm desviación estándar de los indicadores hematológicos por grupo de tratamiento puede apreciarse en el cuadro 21, estos fueron comparados con los valores basales determinados en el muestreo inicial (a las 40 ratas *Sprague Dawley*) que también se muestran en el mismo cuadro. En el análisis estadístico (ANVA) se observó que para los índices hematológicos evaluados sólo en el caso de la hemoglobina y hematocrito del grupo I se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey y Dunnet se verifica dichas diferencias entre el grupo Control y el grupo I (500 mg/Kg), donde se observó una media aritmética menor de dichos índices hematológicos en los animales tratados, aunque las disminuciones se encuentran comprendidas dentro del rango normal calculados para la especie con relación a los valores normales reportados en ratas pertenecientes a esta especie (Pérez et al, 2001). La evaluación estadística la podemos observar en el Anexo 10.

Cuadro 21: Indicadores Hematológicos para cada tratamiento al finalizar el estudio y datos basales antes del tratamiento (media aritmética \pm desviación estándar)

Grupo	Ratas	Hemoglobina	Hematocrito	Leucocito	Contaje Diferencial (%)			
mg/Kg	n	g/dl	%	Células/mm ³	Linfocitos	Segmentado	Abastados	Monocitos
I (500)	6	13.9 \pm 0.6**	42.0 \pm 1.7**	8008 \pm 950.0	61.5 \pm 19.4	34.8 \pm 19.8	1.7 \pm 2.7	1.8 \pm 1.6
II (1000)	7	15.5 \pm 0.5	47.0 \pm 1.6	8207 \pm 425.7	67.3 \pm 10.6	29.6 \pm 9.0	1.4 \pm 1.5	0.6 \pm 0.8
III (2000)	7	14.9 \pm 0.7	45.1 \pm 2.2	7836 \pm 1104.4	56.6 \pm 22.0	40.4 \pm 20.8	1.3 \pm 1.0	1.3 \pm 1.1
IV (Control)	6	15.6 \pm 0.8	47.3 \pm 2.3	7825 \pm 1435.2	70.0 \pm 6.8	26.0 \pm 6.2	2.3 \pm 2.1	1.7 \pm 1.6
Datos Basales (al inicio)	40	15.5 \pm 1.6 13.2 – 21.5 (Rango) ¹	46.8 \pm 4.9 40 – 65 (Rango) ¹	6430 \pm 834.9 5000 – 9200 (Rango) ¹	68.4 \pm 9.1 42 – 85 (Rango) ¹	29.2 \pm 8.9 14 – 55 (Rango) ¹	0.7 \pm 0.9 0 – 5 (Rango) ¹	1.4 \pm 1.3 0 – 3 (Rango) ¹

*p<0,05; **p<0,01 y p> 0.05 en los demás.

(Rango)¹: Se muestra el valor mínimo y máximo hallado por cada grupo al inicio de la investigación.

a. Hemoglobina

En los resultados para la hemoglobina (Fig. 16 y anexo 2 y 3) se ha encontrado que el promedio de los valores de la Hemoglobina al inicio fueron para el Grupo I: 15.1 g/dl; Grupo II: 15.2 g/dl; Grupo III: 14.9 g/dl y Grupo IV: 16.7 g/dl y al final Grupo I: 13.9 g/dl; Grupo II: 15.5 g/dl; Grupo III: 14.9 g/dl y Grupo IV: 15.6 g/dl.

Observando la figura 16 notamos un descenso del valor de la hemoglobina del grupo I y del grupo control. Realizando el análisis estadístico (ANVA) de la hemoglobina se encontraron diferencias altamente significativas (p<0.01) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey y Dunnet se verifica dichas diferencias entre el grupo Control y el grupo I (500 mg/Kg).

El Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de la Habana, Cuba (Pérez et al, 2001), maneja valores normales de Hemoglobina para la cepa de la rata *Sprague Dawley* de 13.8 – 16.7 g/dl y si se observa la figura 16 se verá que los valores reportados se encuentran en dicho rango.

La Universidad de Zaragoza (2005) menciona que hay que tener en cuenta que hay influencias considerables de raza, sexo y edad. Dicha Universidad maneja como valores

normales de Hemoglobina el rango entre 12 – 18 g/dl y el Canadian Council on Animal Care (1984) valores normales entre 11.5 – 16 g/dl.

Se puede afirmar entonces que a pesar que existe una diferencia altamente significativa entre el grupo I y el control, los valores de hemoglobina se encuentran dentro de los valores normales para esta especie.

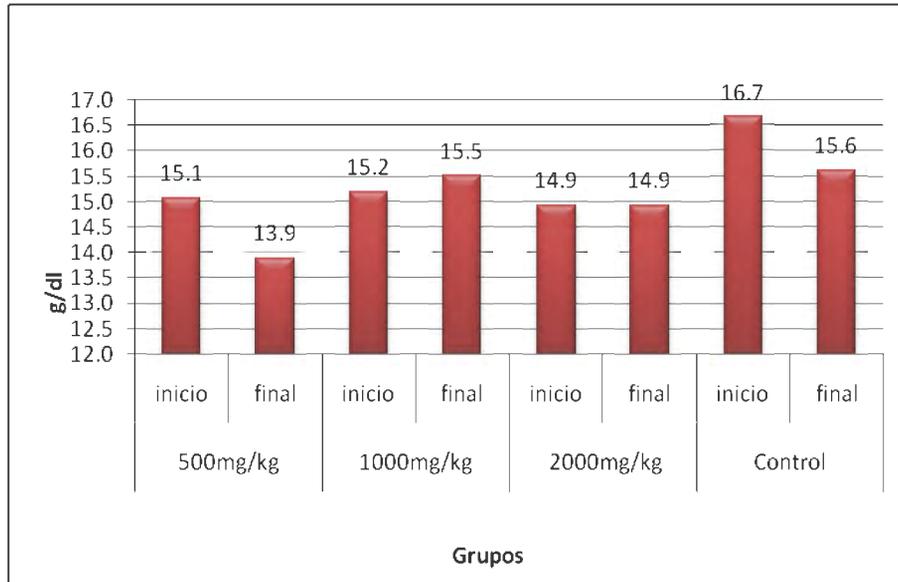


Figura 16: Valores promedio de la Hemoglobina al inicio y al final de la investigación.

b. Hematocrito

En los resultados para hematocrito (Figura 17 y Anexo 2 y 3) se ha encontrado que el promedio de los valores de Hematocrito (porcentaje del volumen de la sangre que ocupa la fracción de los glóbulos rojos) en el inicio del estudio fueron para el Grupo I: 45.6%; Grupo II: 46.0%; Grupo III: 45.2% y Grupo IV: 50.4% y al final del tratamiento fueron Grupo I: 42.0%; Grupo II: 47.0%; Grupo III: 45.1% y Grupo IV: 47.3%. Al igual que en el valor de la hemoglobina se observa en la figura 17 un descenso del valor del porcentaje de hematocrito del grupo I y del grupo IV (control). Realizando el análisis estadístico (ANVA) del hematocrito se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey y Dunnet se verifica dichas diferencias entre el grupo IV (control) y el grupo I (Anexo 10).

El Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de la Habana, Cuba (Pérez et al, 2001), maneja valores normales de hematocrito para la cepa de la rata *Sprague Dawley* de 40 – 51% y la Universidad de Zaragoza (2005) valores de 35 – 45% y si se observa el cuadro 21 y la figura 17 se verá que los valores se encuentran en dicho rango. Podemos afirmar entonces que a pesar que hay una diferencia altamente significativa entre el grupo I y el control, los valores de hematocrito hallados se encuentran dentro de los valores normales para esta especie.

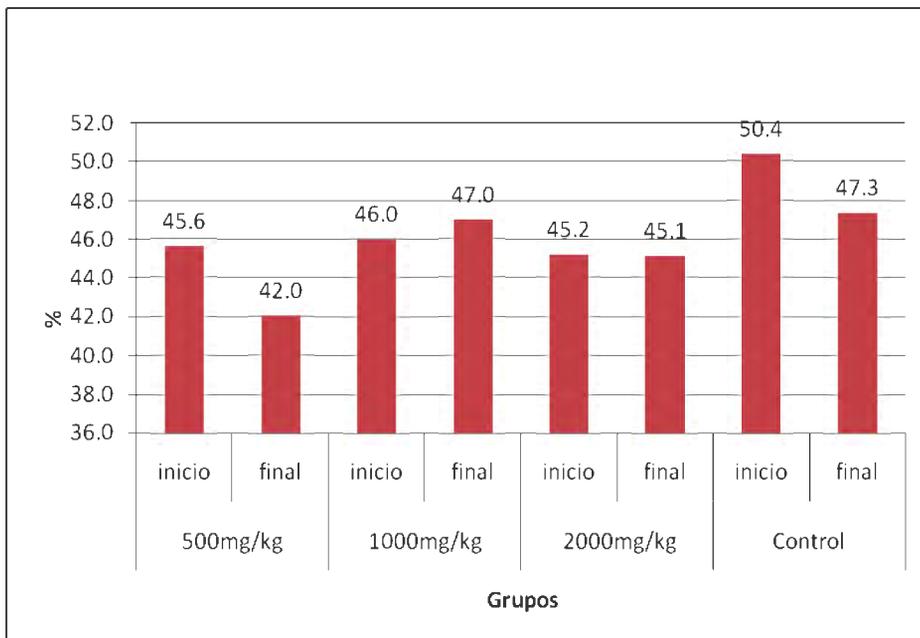


Figura 17: Valores promedio de Hematocrito al inicio y al final de la investigación.

c. Leucocitos

En los resultados para Leucocitos (Figura 18 y anexo 2 y 3) se encontró que los promedios de los valores (células x mm^3) en el inicio del estudio fueron para el Grupo I: 6070 células/ mm^3 , Grupo II: 6120 células/ mm^3 ; Grupo III: 6000 células/ mm^3 y Grupo IV: 7530 células/ mm^3 y al final del tratamiento fueron Grupo I: 8008 células/ mm^3 ; Grupo II: 8207 células/ mm^3 ; Grupo III: 7836 células/ mm^3 y Grupo IV: 7825 células/ mm^3 . Realizando el análisis estadístico (ANVA) de los leucocitos y de los tipos de leucocitos que existen los granulocitos: Neutrófilos (abastados y segmentados), eosinófilos y basófilos y los agranulocitos: Linfocitos y Monocitos; se encontraron que no existen

diferencias significativas ($p>0.05$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey se verifica que no hay diferencias significativas entre los grupos (Anexo 10). Sin embargo, se observó un aumento de los leucocitos (glóbulos blancos) en todos los grupos, estas son las encargadas de la defensa contra la infección, bien como productoras de anticuerpos (linfocitos), bien participando en la destrucción de microorganismos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos).

El Canadian Council on Animal Care (1984) presenta valores normales de leucocitos para ratas entre los 4000 a 10000 células/mm³.

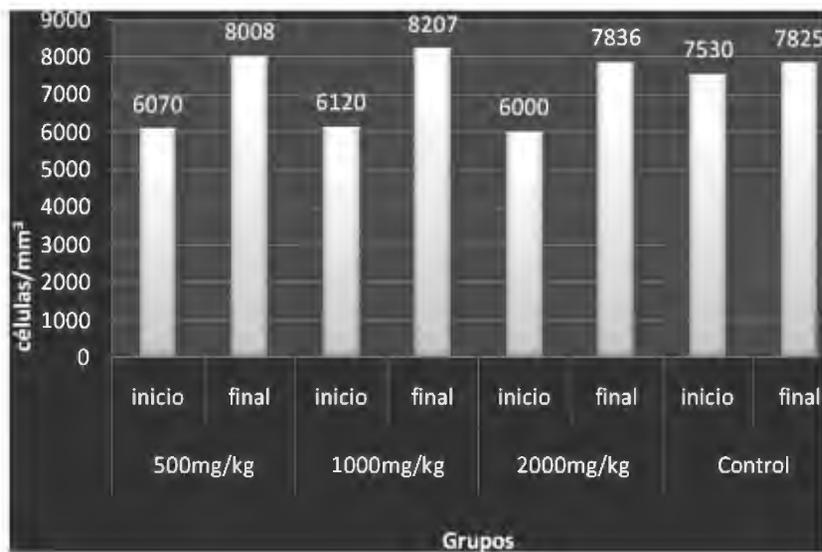


Figura 18: Valores promedio de los Leucocitos al inicio y al final de la investigación.

Analizando las variaciones diferenciales promedio de los leucocitos granulocitos y agranulocitos (Figura 19) al inicio y final del tratamiento de los Grupo I (500mg/Kg.), Grupo II (1000mg/Kg.) y Grupo III (2000mg/Kg.) se observó que hay una elevación de los neutrófilos segmentados (Grupo I de 27% a 35%, Grupo II de 25% a 30% y Grupo III de 35% a 41%) y una reducción de los linfocitos en dichos grupos.

Según el Instituto Nacional de salud (2005) existe aumento de neutrófilos en infecciones bacterianas, abscesos y septicemias, procesos inflamatorios y necrosis tisular, trastornos metabólicos por intoxicación, hemorragias, etc. Este aumento de los neutrófilos segmentados es el que origina el aumento de los leucocitos (Leucocitosis). En el Grupo IV (Control) sucedió lo contrario.

El Laboratorio Servet (2009) presenta valores promedio de neutrófilos segmentados para ratas que fluctúan entre 10 – 30% y los linfocitos de 65 – 85%; comparándolo con los valores de la investigación observaremos que no se alejan de dichos rangos mencionados.

El neutrófilo maduro (segmentado) tiene más lóbulos nucleares que las jóvenes o también llamadas en *banda* o neutrófilos abastados. Las enfermedades bacterianas determinan generalmente un incremento en el número de neutrófilos abastados (Dellmann y Brown, 1976).

Es importante anotar que si aumenta el número de abastados la médula ósea esta liberando nuevas células para combatir la infección. Es un signo de pronóstico favorable. Por el contrario una cantidad anormal de neutrófilos segmentados puede ser un signo de pronóstico desfavorable o el síntoma de una infección crónica.

El Laboratorio Servet (2009) presenta valores promedio de monocitos para ratas que fluctúan entre 0 – 5%. Rango que concuerda con nuestros valores hallados. En general los monocitos forman parte del sistema mononuclear fagocítico.

Si bien se determinó algunos resultados de los eosinófilos (defensa contra helmintos parásitos; modulación del proceso inflamatorio) y basófilos (Liberación de histamina y otros mediadores de la inflamación) la mayoría estuvieron abajo del 1% razón por la cual no los hemos considerado como datos reportados en el cuadro 21, debido a que el equipo empleado no cuantificaba valores menores a 1%. Pero si se ha reportado en el anexo 2 y 3.

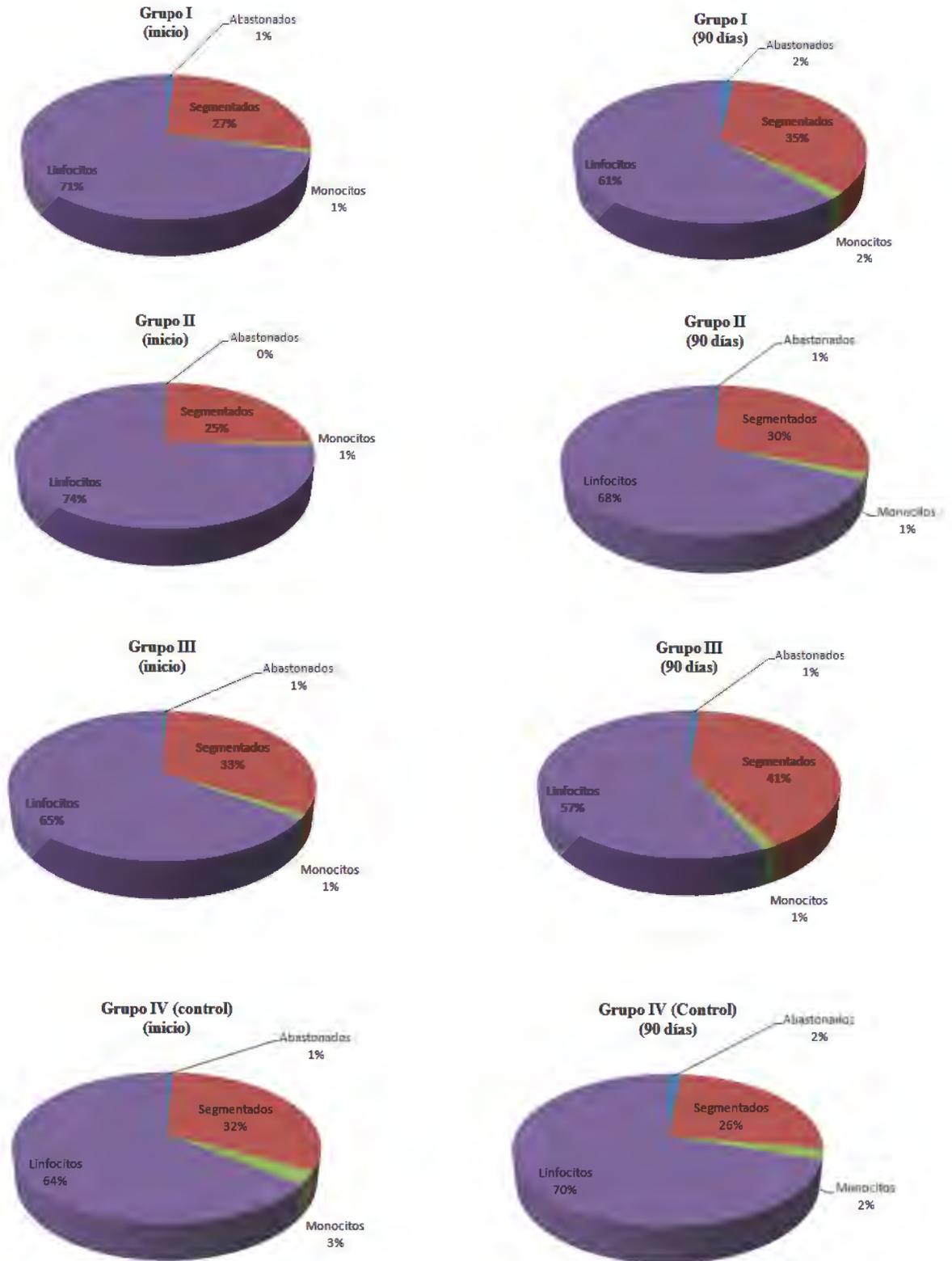


Figura 19: Variaciones diferenciales promedio de los Leucocitos granulocitos y agranulocitos.

c.1 Linfocitos

En los resultados para linfocitos (Figura 20 y anexo 2 y 3) se encontraron que el promedio de los valores al inicio fueron para el Grupo I: 71%; Grupo II: 74%; Grupo III: 65% y Grupo IV: 64% y al final del tratamiento Grupo I: 62%; Grupo II: 67%; Grupo III: 57% y Grupo IV: 70%.

El Laboratorio Servet (2009) presenta valores promedio de linfocitos para ratas que fluctúan entre 65 – 85%. Rango que concuerda con nuestros valores hallados. Sólo el grupo III presenta un valor de leucocito de 57% al final del experimento (Figura 20). Esto se debe debería a una infección bacteriana aumentando como se ve los valores de los neutrófilos segmentados de 33% a 41% (Figura 19). De los datos se observa que los linfocitos disminuyen en todos los grupos al final del tratamiento a excepción del grupo control. Sin embargo, realizando el análisis estadístico (ANVA) de los linfocitos se encontraron que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey se verifica que no hay diferencias significativas entre los grupos (Anexo 10).

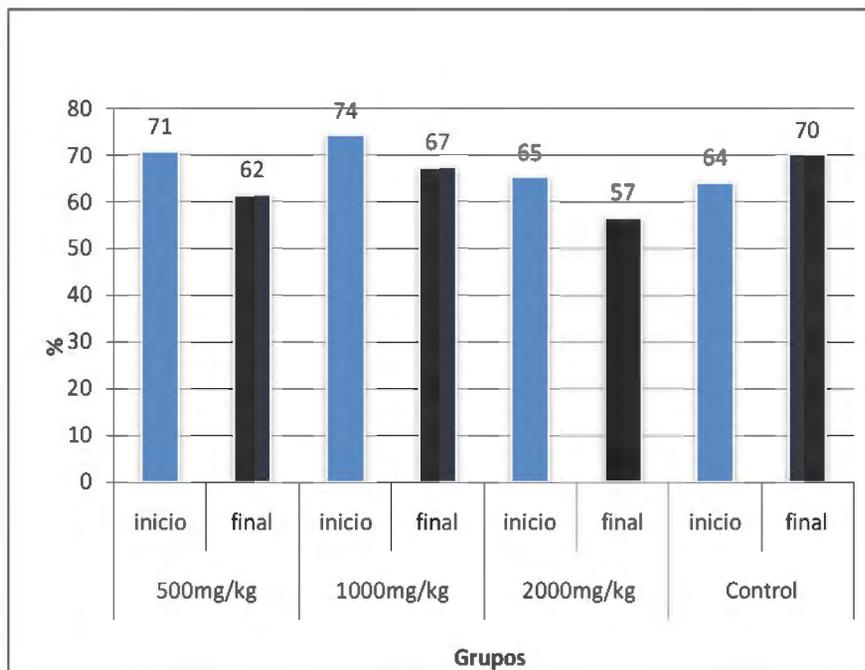


Figura 20: Valores promedio de los Linfocitos al inicio y al final de la investigación.

c.2 Neutrófilos Segmentados (maduros)

En los resultados para neutrófilos segmentados (Figura 21 y Anexo 2 y 3) se ha encontrado que el promedio de los valores al inicio fueron para el Grupo I: 27%; Grupo II: 25%; Grupo III: 33% y Grupo IV: 32% y al final del tratamiento Grupo I: 35%; Grupo II: 30%; Grupo III: 40% y Grupo IV: 26%.

De los datos se observa que los neutrófilos segmentados aumentaron en todos los grupos al final del tratamiento a excepción del grupo control. Esto puede ser un signo de pronóstico desfavorable o el síntoma de una infección crónica. A pesar que los análisis estadísticos (ANVA) de los neutrófilos segmentados se encontraron que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey se verifica que no hay diferencias significativas entre los grupos (Anexo 10). Luego se halló que al analizar los cortes histológicos de todos los grupos, incluido el control, se encontraron daños en el pulmón y por ello se infiere que esto fue la causa del aumento de los neutrófilos segmentados.

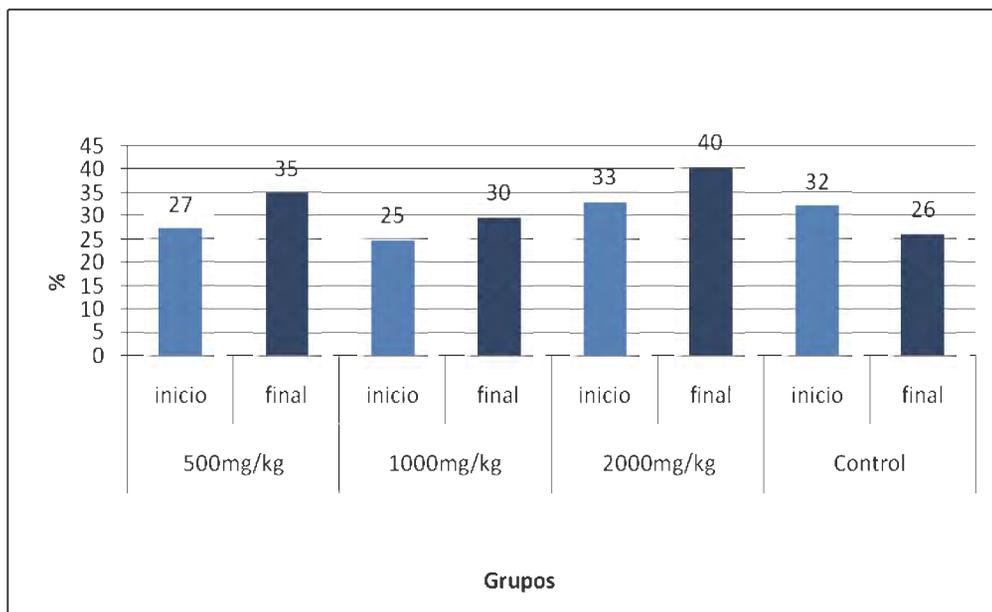


Figura 21: Valores promedio de los Segmentados al inicio y al final de la investigación.

c.3 Neutrófilos abastoados (jóvenes)

En los resultados para neutrófilos abastoados (Figura 22 y Anexo 2 y 3) se encontraron que el promedio de los valores al inicio fueron para el Grupo I: 1.2%; Grupo II: 0.2%; Grupo III: 0.6% y Grupo IV: 0.7% y al final del tratamiento Grupo I: 1.8%; Grupo II: 0.6%; Grupo III: 1.3% y Grupo IV: 1.7%.

Los neutrófilos abastoados aumentaron en todos los grupos al final del tratamiento. Según Dellmann y Brown (1976) esto sucede cuando el organismo necesita combatir una infección.

En los análisis estadísticos (ANVA) de los neutrófilos abastoados se encontró que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey se verifica que no hay diferencias significativas entre los grupos (Anexo 10).

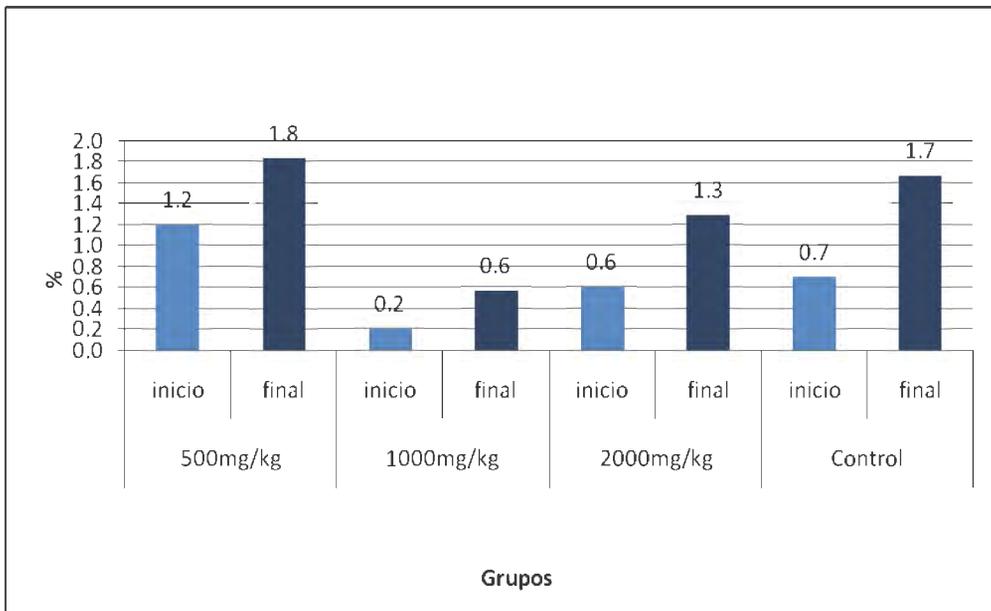


Figura 22: Valores promedio de los Abastoados al inicio y al final de la investigación.

c.4 Monocitos

En los resultados para monocitos (Figura 23 y Anexo 2 y 3) se encontraron que el promedio de los valores al inicio fueron para el Grupo I: 0.8%; Grupo II: 0.7%; Grupo III: 1.1% y Grupo IV: 2.8% y al final del tratamiento Grupo I: 1.7%; Grupo II: 1.4%; Grupo III: 1.3% y Grupo IV: 2.3%.

Los monocitos aumentaron en todos los grupos al final del tratamiento a excepción del grupo control que más bien sufrió un descenso. El Laboratorio Servet (2009) presenta valores promedio de monocitos para ratas de 0% – 5%. Arango *et al.* (2005) encontró valores de 2- 4.2% en sus ratas control y Moreno *et al.* (2007) valores de 3.81%±1.79. Por lo tanto se puede decir que los datos hallados se encuentran dentro de los datos normales hallados por otros investigadores.

En los análisis estadísticos (ANVA) de los monocitos se encontró que no existen diferencias significativas ($p>0.05$) y de acuerdo a la prueba de comparación Tukey se verifica tampoco hay diferencias significativas entre los grupos (Anexo 10).

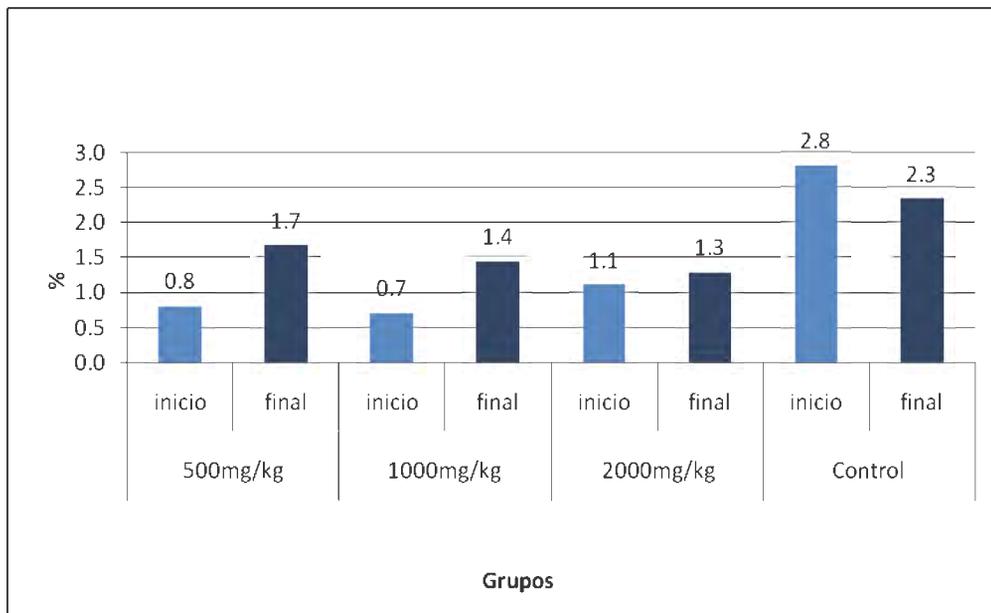


Figura 23: Valores promedio de los Monocitos al inicio y al final de la investigación.

c.5 Eosinófilos

En los resultados para eosinófilos (Anexo 2 y 3) se encontró que el promedio de los valores al inicio fueron para el Grupo I: 0.3%; Grupo II: 0.3%; Grupo III: 0.4% y Grupo IV: 0.8% y al final del tratamiento Grupo I: 0.2%; Grupo II: 0.4%; Grupo III: 0.4% y Grupo IV: 0%.

Se decidió presentar los datos en los anexos, pero se prefirió no realizar el análisis estadístico porque los valores son muy discutibles y porque los resultados hallados para los eosinófilos como se observa en los anexos 2 y 3 presentan en muchos casos valores de 0%.

Según Junqueira y Carneiro (2005) los eosinófilos son gránulos específicos, sustancias farmacológicamente activas cuyas principales funciones son la defensa contra helmintos parásitos y modulación del proceso inflamatorio. Los eosinófilos fagocitan y digieren complejos de antígenos que aparecen en casos de alergia como, por ejemplo, el asma bronquial.

Diaz et al. (1973) en un estudio del valor del recuento de eosinófilos en secreción nasal en el diagnóstico diferencial de los cuadros bronquiales obstructivos del niño encontraron que hay una evidente diferencia entre la gran magnitud de eosinofilia encontrada en los niños asmáticos y la escasa presencia de eosinófilos en los niños sin alergia demostrada, con o sin sintomatología bronquial crónica. En un grupo de 12 niños con bronquitis crónica no alérgica 11 no tenían eosinófilos o tenían sólo hasta 1% y sólo uno tenía una eosinofilia importante de 9%. En el grupo de 15 niños normales 12 no presentaban eosinófilos o presentaban hasta 0.5% y los otros 3 que presentaban eosinófilos estos valores estuvieron siempre por debajo de 5%. En cambio en el grupo de los niños asmáticos 12 del grupo de 15 presentaban eosinófilos por encima de 5%.

El Laboratorio Servet (2009) presenta valores promedio de eosinófilos para ratas que fluctúan entre 0% – 6%. Y Moreno *et al.* (2007) encontró valores de 1% \pm 0.98 en sus ratas control. Datos que concuerdan con los valores hallados.

4.2.4 Estudio Anatomopatológico

Durante las necropsias, se realizó la descripción macroscópica de los órganos extraídos y se registro su peso. Se extrajeron el hígado, riñón y pulmón. Las muestras extraídas se conservaron en formol. Durante la realización del ensayo se observó el estricto cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Las observaciones anatomopatológicas, que consistieron en la inspección externa y macroscópica de los órganos, no mostraron la existencia de alteraciones que pudieran relacionarse con el tratamiento con el concentrado de proteína de pota. El análisis de los pesos relativos de los órganos, tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En la figura 24 podemos observar una rata del grupo IV (grupo control) que acaba de ser sacrificada al final de los 90 días para realizar el análisis de sus órganos. Es muy importante como se realiza el sacrificio para evitar algún daño de los órganos y evitar el sufrimiento de los animales. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical.

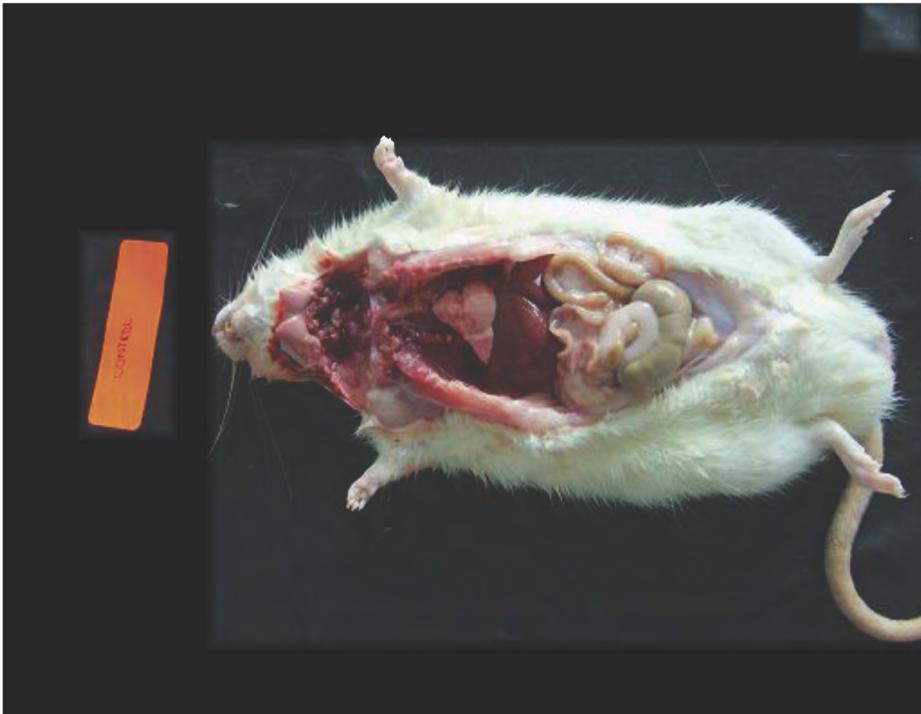


Figura 24: Rata control después del sacrificio para realizar el análisis de los órganos.

Las muestras de Hígado, Riñón y Pulmón se colocaron en frascos separados, debidamente rotulados por grupo, que contenían Formol al 10% (Figura 25).

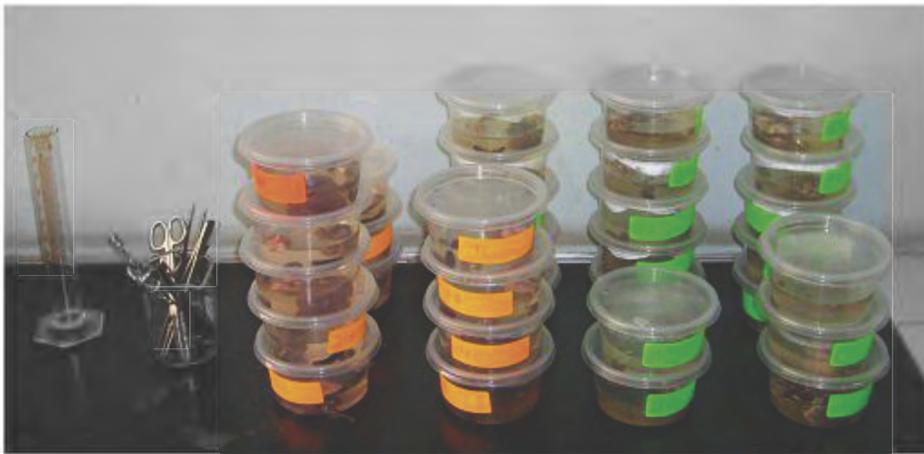


Figura 25: Muestras de Hígado, Riñón y Pulmones de los Grupos tratados.

a. Evaluación del Peso de los órganos

En el Cuadro 22 se observa los resultados del porcentaje del peso de los órganos (riñón, hígado y pulmón) versus el peso del animal de todos los grupos. Dichos datos fueron analizados estadísticamente (Anexo 11). En el análisis estadístico (ANVA) se observó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados y de acuerdo a la prueba de comparación de Tukey ($p > 0.05$) tampoco existieron diferencias entre cada uno de los tratamientos.

Cuadro 22: Porcentaje (%) del peso de los órganos versus el peso del animal tratadas con diferentes dosis del Concentrado de Proteína de Pota (media aritmética \pm desviación estándar, $n=5$)

Grupo (mg/Kg)	Rata (g) $X \pm S$	Hígado		Riñones		Pulmones	
		(g) $X \pm S$	(%) $X \pm S$	(g) $X \pm S$	(%) $X \pm S$	(g) $X \pm S$	(%) $X \pm S$
I (500)	324.6 \pm 60.2	10.6 \pm 1.6	3.3 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2	4.2 \pm 1.0	1.4 \pm 0.6
II (1000)	297.3 \pm 42.6	10.2 \pm 2.1	3.4 \pm 0.5	2.5 \pm 0.5	0.8 \pm 0.1	2.3 \pm 0.4	0.8 \pm 0.1
III (2000)	317.3 \pm 63.8	10.2 \pm 2.8	3.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	3.6 \pm 1.0	1.2 \pm 0.5
IV (Control)	345.1 \pm 82.6	11.3 \pm 2.3	3.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.4	0.7 \pm 0.1	3.3 \pm 0.4	1.0 \pm 0.2

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y $p > 0.05$ en los demás.

En la Figura 26 se aprecia el porcentaje del peso del Hígado en relación al peso del animal, se observa que no hay una mayor diferencia porcentual entre los grupos tratados y el grupo control. Analizado esto estadísticamente (Anexo 11) se comprobó que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control ($p>0.05$).

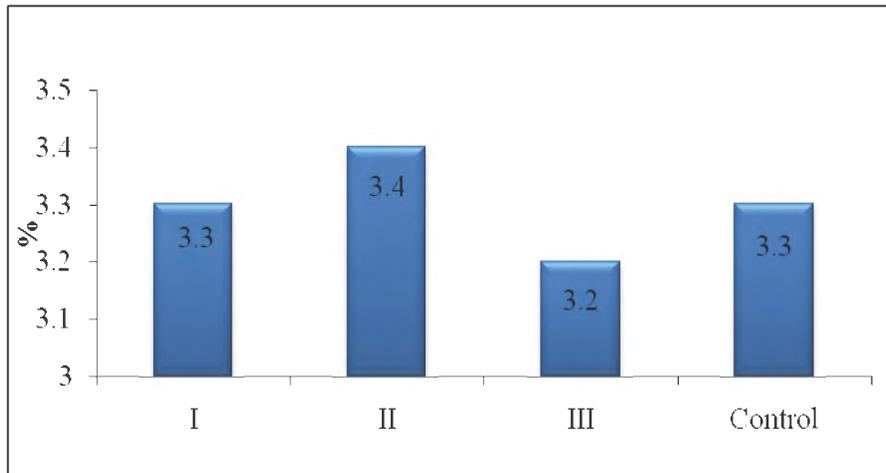


Figura 26: Porcentaje del peso del Hígado (versus el peso del animal) promedio de los grupos.

En la Figura 27 se observa que el porcentaje del peso del Riñón tanto de las ratas control como de los otros grupos no presentan mayor diferencia porcentual con respecto al peso total (apenas 0.1% de diferencia entre los grupos tratados y el control). Analizado esto estadísticamente (anexo 11) se confirmó que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control ($p>0.05$).

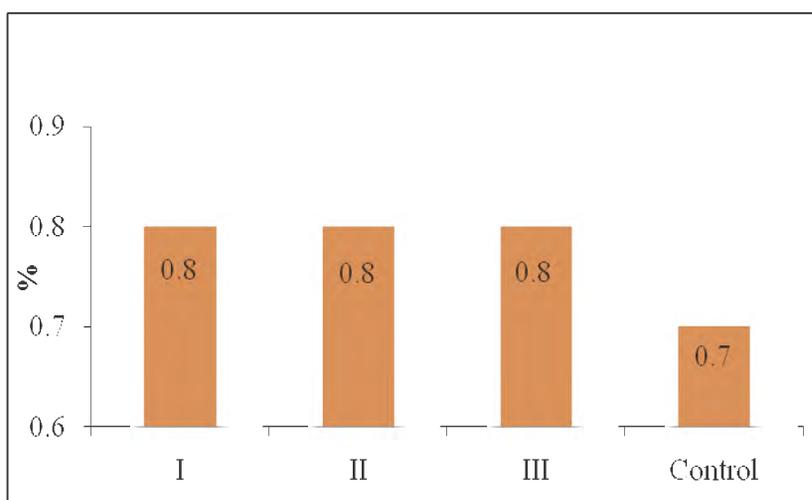


Figura 27: Porcentaje del peso del Riñón (versus el peso del animal) promedio de los grupos.

Al igual, que en el caso del hígado y los riñones, el porcentaje del peso de los pulmones en relación al peso del animal (Figura 28) de los grupos tratados no presentó diferencias significativas entre ellos y el grupo control (anexo 11).

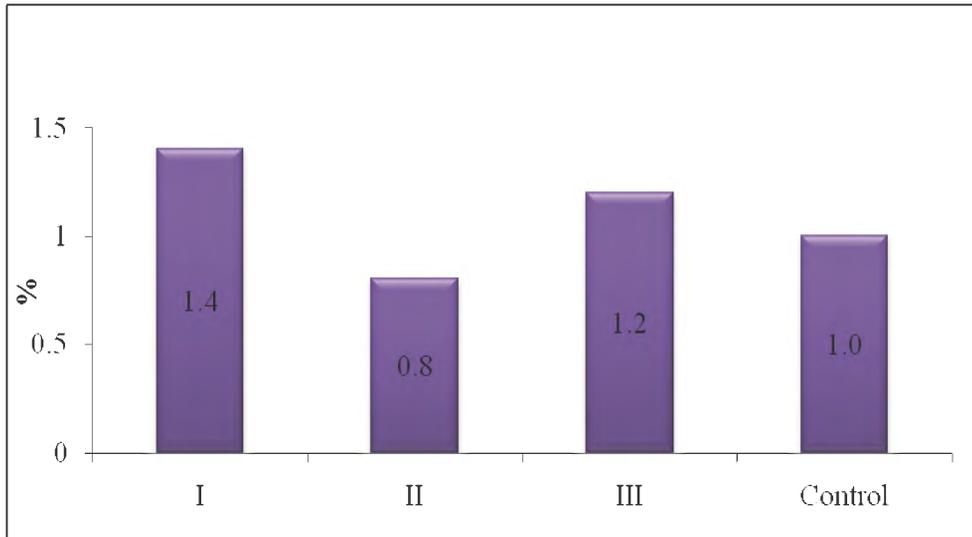


Figura 28: Porcentaje del peso del Pulmón (versus el peso del animal) promedio de los grupos

b. Evaluación Macroscópica de los órganos

En el cuadro 23 se puede observar los resultados de las características macroscópicas de los órganos para todos los grupos. Esta Evaluación fue realizada con el apoyo del Médico Cirujano Fabricio Gamarra Castillo (CMP N° 43675), Docente de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres.

Del cuadro 23 se puede observar que los riñones en todos los grupos presentan características macroscópicas normales con una presencia de una rata (14%) de riñones hipotrófico (poco desarrollado) del grupo II y los riñones de una rata (14%) con signos hemorrágicos del grupo III. Pero de la figura 26 y cuadro 22 se observa que no hay una diferencia significativa en relación a los demás grupos del peso de dicho órgano en relación al peso del cuerpo (expresado en %).

Según el cuadro 23 el hígado en el 72% de todos los casos es normal. Presentando cierto cuadro congestivo en el grupo I, y II e indicios de hepatomegalia (aumento del tamaño del hígado) en el grupo II y III y IV y una rata del grupo III presentaba un hígado hipotrófico.

En relación a los pulmones se observó que sólo en el caso del grupo control se encontraron animales con los pulmones normales en un 50% (3 muestras). En general los pulmones presentaban fibrosis y hemorragia pulmonar en todos los grupos, incluido el grupo control.

Cuadro 23: Características macroscópicas de los órganos de los grupos con tratamiento y el grupo control

Órgano	Características Macroscópicas	Grupo I (n = 6)	Grupo II (n = 7)	Grupo III (n = 7)	Grupo IV (n = 6)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Hígado	-Normal.	5 (83%)	5 (72%)	5 (72%)	5 (83%)
	-Congestivo hemorrágico	1 (17%)	1 (14%)	---	---
	-Hepatomegalía ligera	---	1 (14%)	---	---
	-Hepatomegalía marcada	---	---	1 (14%)	1 (17%)
	-Hipotrófico	---	---	1 (14%)	---
Riñones	- Normales.	6 (100%)	6 (86%)	6 (86%)	6 (100%)
	-Hipotróficos	---	1 (14%)	---	---
	- Signos hemorrágicos	---	---	1 (14%)	---
Pulmones	-Normales.	---	---	---	3 (50%)
	-Fibrosis pulmonar con presencia de necrosis	2 (34%)	2 (28%)	---	---
	-Fibrosis y hemorragia pulmonar	4 (66%)	5 (72%)	7 (100%)	3 (50%)

4.2.5 Estudio Histopatológico

Según los resultados del estudio histopatológico, no se observaron diferencias entre el grupo control (IV) y los demás grupos de tratamiento grupo I (500 mg/kg), grupo II (1000 mg/Kg) y el grupo III de la dosis máxima del ensayo (2000 mg/kg de peso).

En todos los grupos (incluido el grupo control), los cortes histológicos del hígado y riñón no mostraron ningún tipo de alteración histológica estructural en relación a toxicidad por la ingesta alimentaría.

El estudio del pulmón en todos los grupos, incluidos el control, mostraron lesión alveolar intersticial difusa, daño bronquial, cuadros neumónicos y bronco-neumónicos en la mayoría de los casos estudiados, esto no guarda relación de toxicidad con la ingesta alimentaría y estaría en relación al hábitat de las ratas (bioterio), la patología respiratoria sería por inhalación viral y compromiso bacteriano posterior y a posibles neumonías durante la alimentación de estas según el Médico Cirujano Anatómo Patólogo Daniel Carrera Palao (CMP N° 22697), del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Nacional “Edgardo Reblagliati” quien apoyó en la interpretación de las láminas de los cortes histológicos (Anexo 12).

a. Tejido Renal

Según el Médico Cirujano Anatómo Patólogo Daniel Carrera Palao (CMP N° 22697), manifiesta que el estudio del riñón de todos los grupos (incluido el control) no muestran ningún tipo de alteración histológica estructural en relación a toxicidad por la ingesta alimentaria. En general describe que las estructuras glomerulares son de caracteres normales, las estructuras vasculares sin alteraciones histológicas significativas, las estructuras tubulares asas de caracteres normales, el intersticio renal de caracteres normales y que no se observa infiltrado inflamatorio en ninguna estructura (Cuadro 24).

Cuadro 24: Cambios histopatológicos de los riñones según dosis de concentrado de proteína de Pota

Estructuras	Características Macroscópicas	Grupo I (n = 6)	Grupo II (n = 7)	Grupo III (n = 7)	Grupo IV (n = 6)
		(%)	(%)	(%)	(%)
Estructura glomerulares	-Normales.	100%	100%	100%	100%
	-Anormales	---	---	---	---
Estructuras vasculares	- Sin alteraciones significativas	100%	100%	100%	100%
	- Con alteraciones	---	---	---	---
Estructuras tubulares asas	-Normales.	100%	100%	100%	100%
	-Anormales	---	---	---	---
Intersticio renal	- Normales.	100%	100%	100%	100%
	- Con alteraciones	---	---	---	---
Infiltrado inflamatorio en alguna estructura	-No se observa	100%	100%	100%	100%
	-Se observa	---	---	---	---

En las Figuras 29A, 29B y 29C se observa el tejido renal de aspecto normal de rata del grupo I (Dosis 500 mg/Kg) a diferentes aumentos. Nótese el corpúsculo renal (CR), el glomérulo (GLO) y la Cápsula de Bowman que están conservados sin aparente daño histológico.

En las Figuras 30A, 30B y 30C se observa el tejido renal de aspecto normal de rata del grupo II (Dosis 1000 mg/Kg) a diferentes aumentos. Nótese el corpúsculo renal (CR), el glomérulo (GLO) y la Cápsula de Bowman que están conservados sin aparente daño histológico. Se pueden apreciar también los túbulos contorneados (TC).

En la Figura 31 se observa el tejido renal de aspecto normal de rata del grupo III (Dosis 2000 mg/Kg). Si bien las estructuras no han sufrido daño se aprecia presencia de eritrocitos. Tal vez esto es causado por el corte.

En la Figura 32 se observa el tejido renal de aspecto normal de rata del grupo IV (Control).

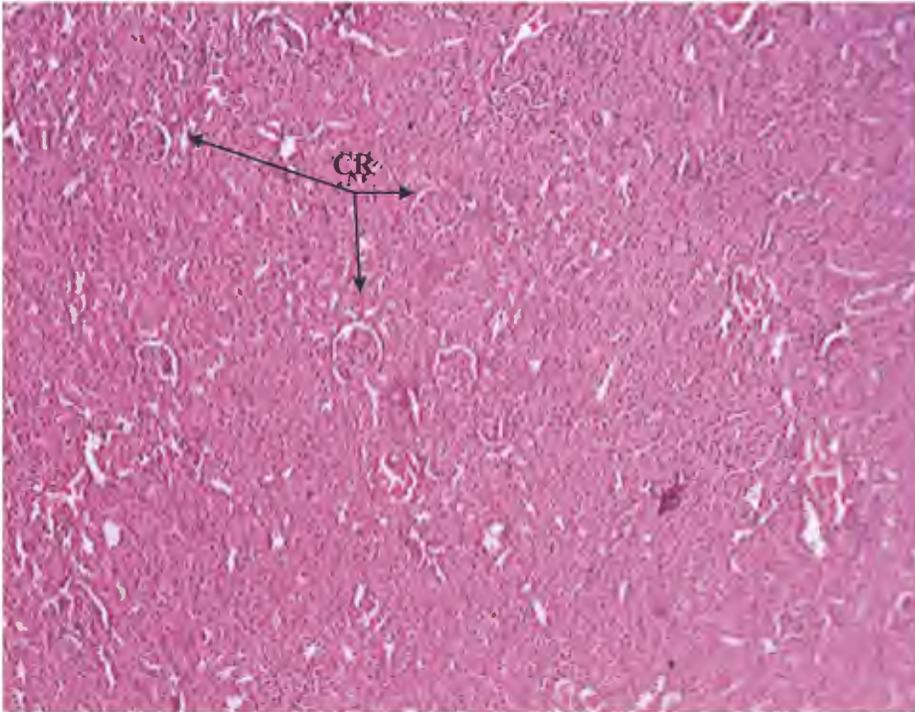


Fig. 29A. (4X HE). Tejido renal de aspecto normal de rata de grupo I (Dosis 500 mg/Kg). Corpúsculo Renal (CR).

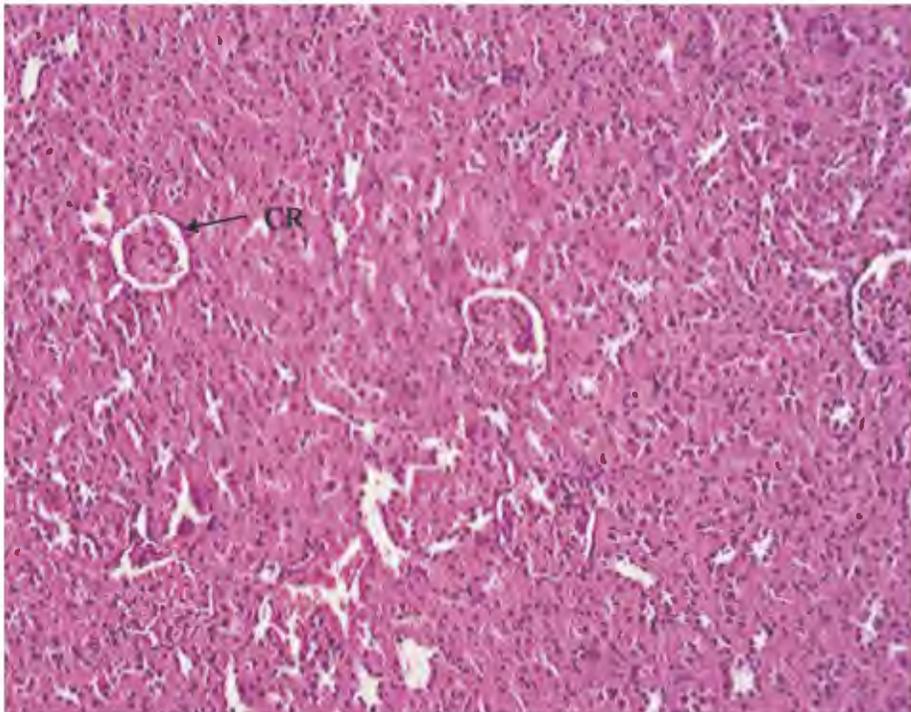


Figura 29B: (10X HE). Tejido renal de aspecto normal de rata de grupo I (Dosis 500 mg/Kg) a mayor aumento. Corpúsculo Renal (CR).

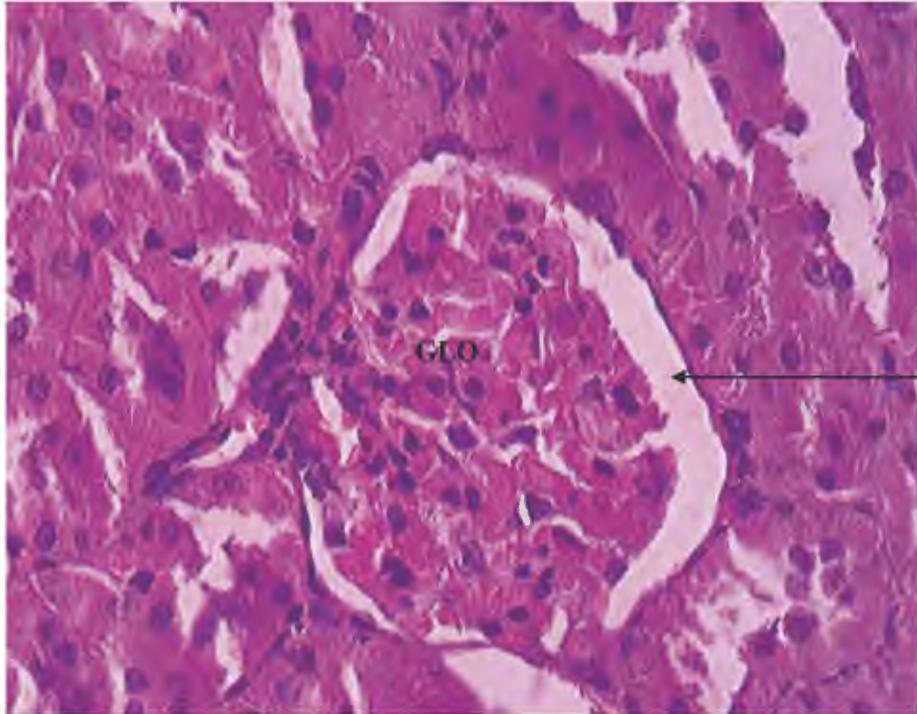


Figura 29C: (40X HE). Corpúsculo Renal (CR) de rata de Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. Glomérulo (GLO).

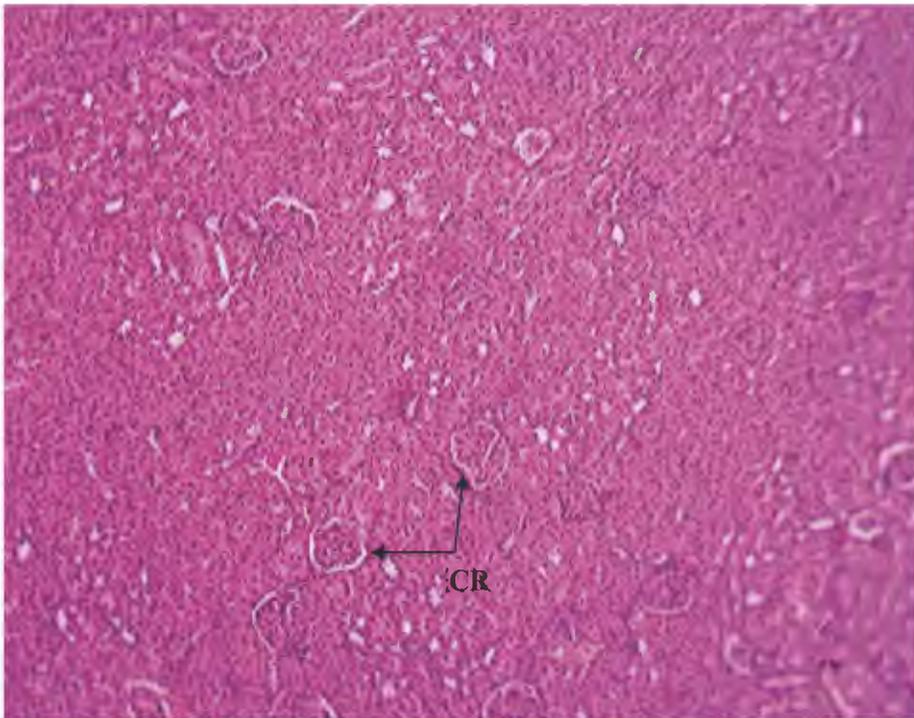


Figura 30A: (4X HE). Tejido Renal de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Corpúsculo Renal (CR).

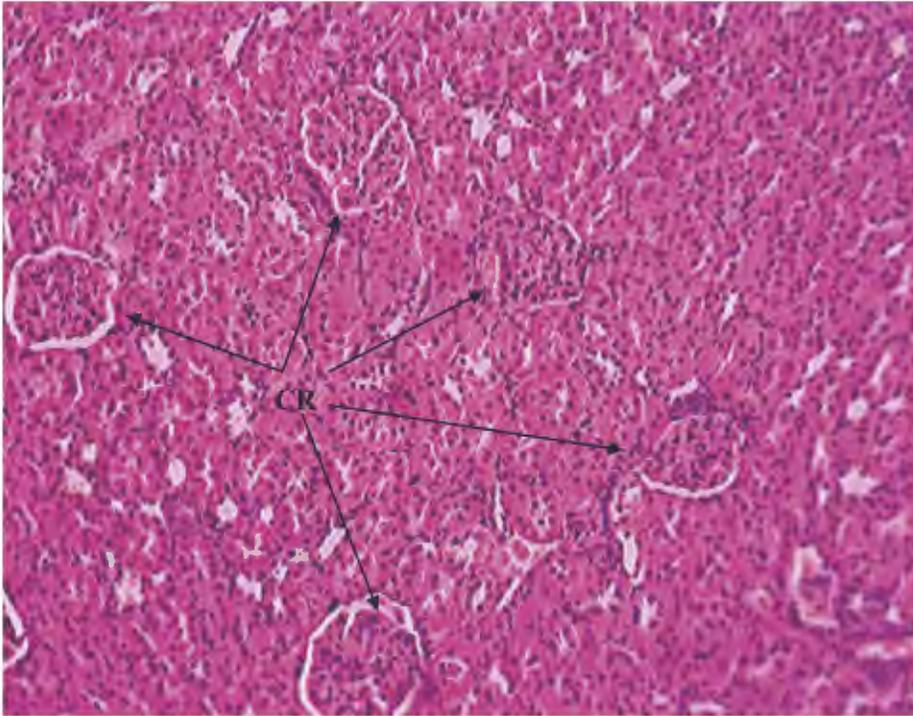


Figura 30B: (10X HE).Tejido Renal de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Corpúsculo Renal (CR).

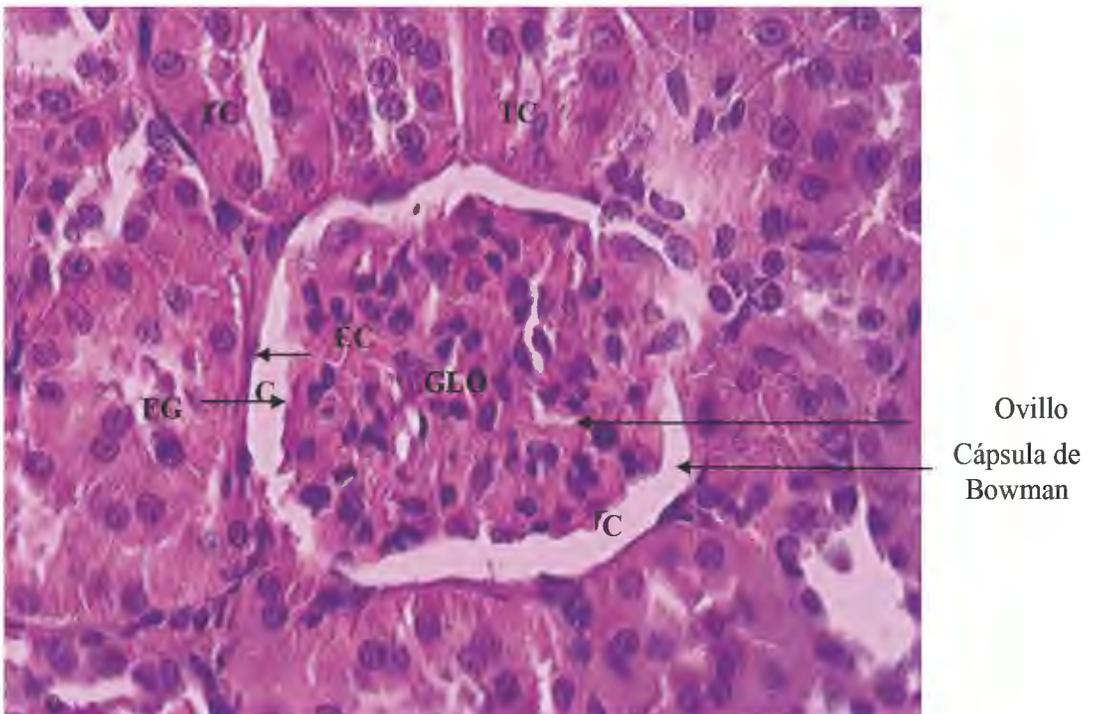


Figura 30C: (40X HE). Corpúsculo Renal (CR) de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Glomérulo (GLO); espacio capsular o espacio de Bowman (C); Túbulo contorneado (TC); Epitelio capsular (EC); Epitelio glomerular (EG).

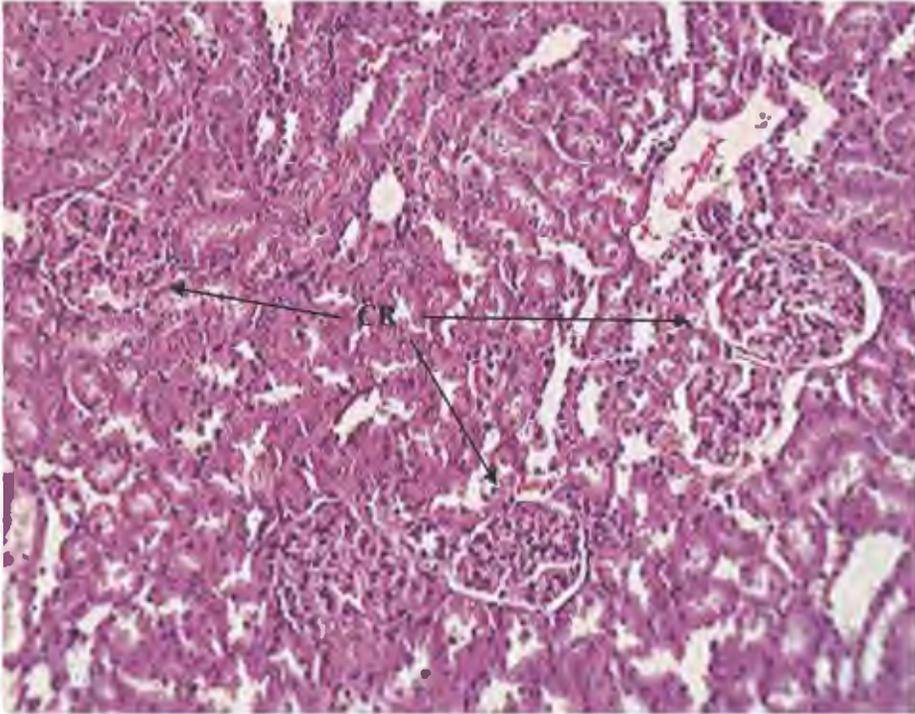


Figura 31: (10X HE).Tejido Renal de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. Corpúsculo Renal (CR).

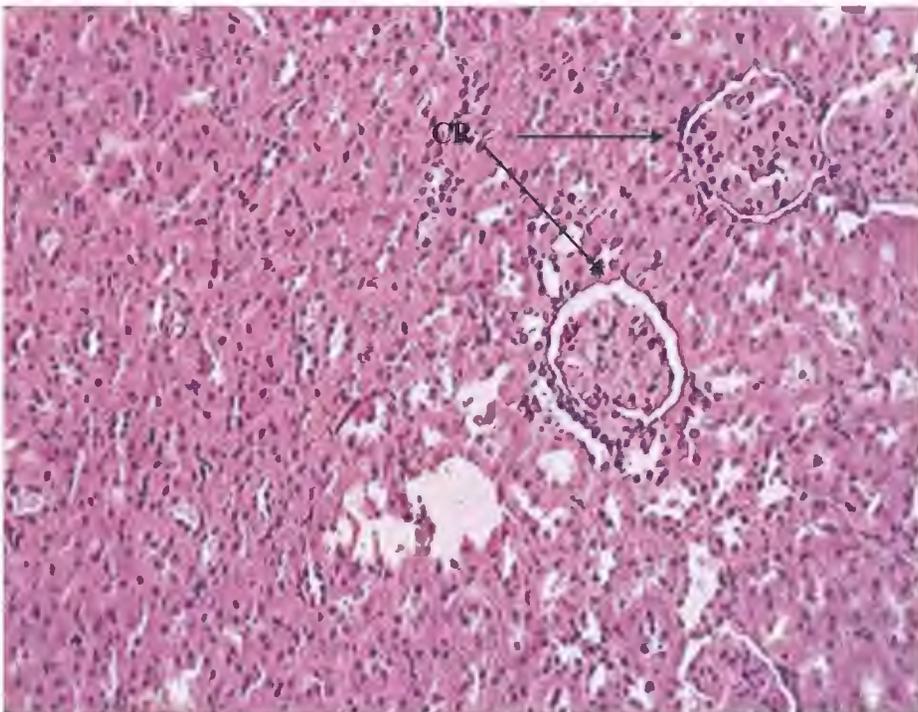


Figura 32: (10X HE).Tejido Renal de rata Grupo IV (Control). Corpúsculo Renal (CR).

b. Tejido Hepático

Según el Médico Cirujano Anatómo Patólogo Daniel Carrera Palao (CMP N° 22697), manifiesta que el estudio del hígado de todos los grupos (incluido el control) no muestran ningún tipo de alteración histológica estructural en relación a toxicidad por la ingesta alimentaria. En el cuadro 25 podemos apreciar los cambios histopatológicos del hígado de todos los grupos tratados y del control (grupo IV).

Cuadro 25: Cambios histopatológicos del hígado según dosis de concentrado de proteína de pota

Estructuras	Características Macroscópicas	Grupo I (n = 6)	Grupo II (n = 7)	Grupo III (n = 7)	Grupo IV (n = 6)
		(%)	(%)	(%)	(%)
Estructura Trabecular hepática	- Preservada.	100%	100%	100%	100%
	- Dañada.	---	---	---	---
Vasos Centro lobulillar	- Congestivos ligeramente	100%	100%	100%	100%
	- No congestivos	---	---	---	---
Sinusoides hepáticos	- Congestivos ligeramente	100%	100%	100%	100%
	- No congestivos	---	---	---	---
Espacios porta	- Normales.	100%	100%	100%	100%
	- Con alteraciones	---	---	---	---
Canalículos biliares	- Normales.	100%	100%	100%	100%
	- Con alteraciones	---	---	---	---

En las Figuras 33A, 33B y 33C se observa el tejido hepático de aspecto normal de rata del grupo I (Dosis 500 mg/Kg) a diferentes aumentos. Nótese los **lobulillos hepáticos (LB)** que son descritos clásicamente como hexagonales, es decir, un polígono de seis lados, es muy raro encontrar alguno que se vea con esta forma exacta, lo que tenemos que hacer es buscar en espacios abiertos la **vena central (VC)** y tenemos q imaginarnos que en los vértices o rodeándola vamos a ver otras venas que tienen tejido conectivo circundante porque son venas portales, cualquier alteración de esta arquitectura es la base para

reconocer las enfermedades hepáticas. Se puede apreciar, además, los **hepatocitos (H)** que es el componente estructural básico del hígado. Estas células epiteliales se hallan agrupadas en tabiques interconectados. Entre los espacios de dichos tabiques contienen capilares que son los **sinusoides hepáticos (S)**.

Según Junqueira y Carneiro (2005) los sinusoides contienen macrófagos conocidos como **células de Kupffer**, cuyas principales funciones son: metabolizar hemáties viejas, digerir la hemoglobina, secretar proteínas relacionadas con procesos inmunológicos y destruir bacterias que finalmente penetran en la sangre portal a partir del intestino grueso.

En las Figuras 34A, 34B y 34C se observa el tejido hepático de aspecto normal de rata del grupo II (Dosis 1000 mg/Kg) a diferentes aumentos. Nótese la **vena central (VC)** rodeada por las **venas portas (VP)**.

En las Figuras 35 (Grupo III) y 36 (grupo control) se aprecia el tejido hepático de las ratas de aspecto normal igual que los anteriores grupos.

Según Junqueira y Carneiro (2005) el hígado es un órgano poco común por el hecho de recibir sangre de dos fuentes distintas: un 80% de la sangre deriva de la vena porta, que transporta la sangre poco oxigenada y rica en nutrientes procedente de las vísceras abdominales, mientras que el 20% restante deriva de la arteria hepática, que aporta una sangre rica en oxígeno.

Por lo observado en las láminas podemos concluir el tejido hepático de todos los grupos (incluido el control) no muestran ningún tipo de alteración histológica a pesar que en el examen macroscópico se indicaba que alrededor de un 20% de ratas en todos los grupos presentaba un cuadro congestivo y en algunos casos indicios de hepatomegalia.

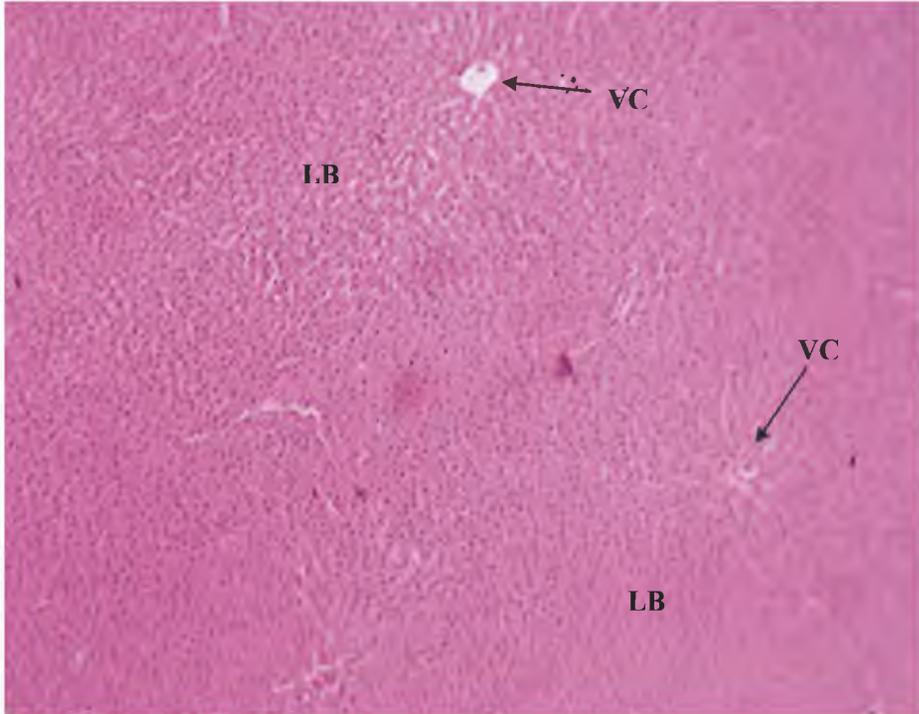


Figura 33A: (4X HE). Tejido hepático de aspecto normal de rata de Grupo I (Dosis 500 mg/Kg). Obsérvese los Lobulillos hepáticos (LB) y la vena central (VC).

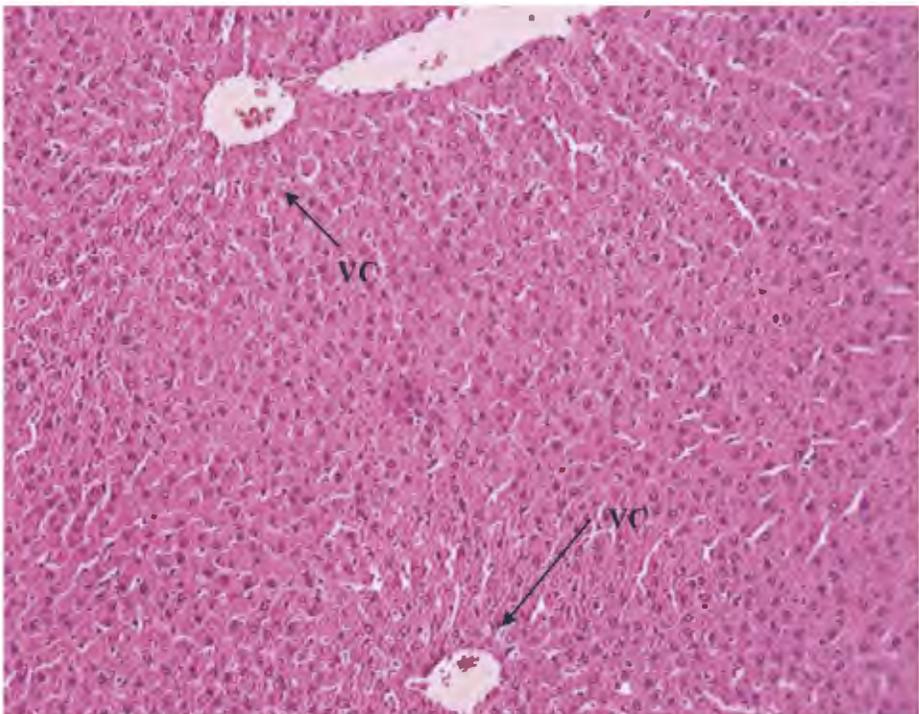


Figura 33B: (10X HE). Tejido hepático de aspecto normal de rata de Grupo I (Dosis 500 mg/Kg). Obsérvese la vena central y los sinusoides hepáticos (S).

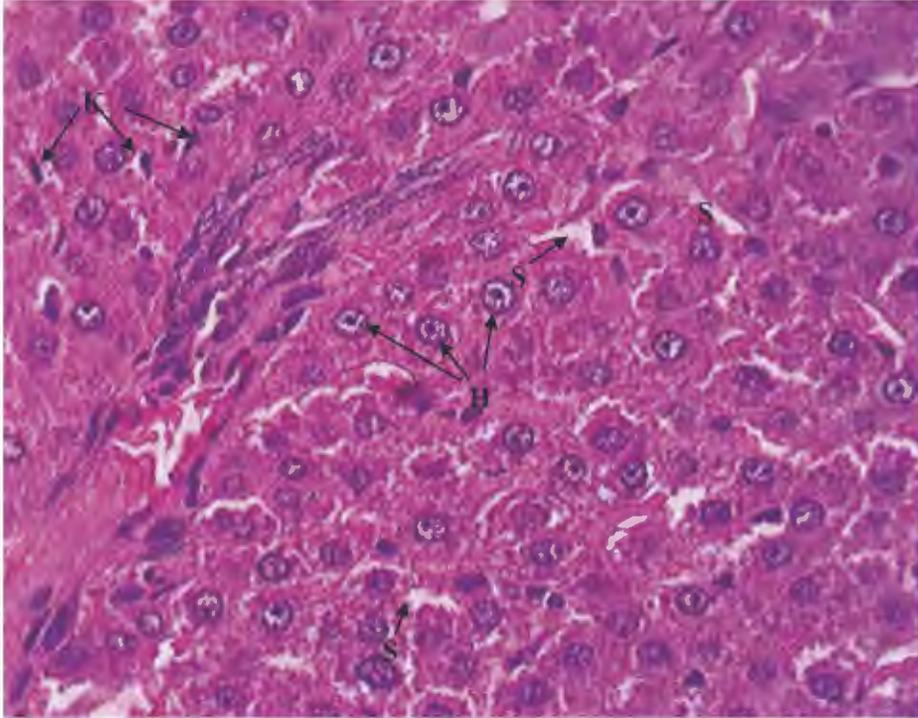


Figura 33C: (40X HE). Tejido hepático de rata de aspecto normal del Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. Hepátocitos (H); células de Kupffer (fagocitarias); sinusoides hepáticos (S).

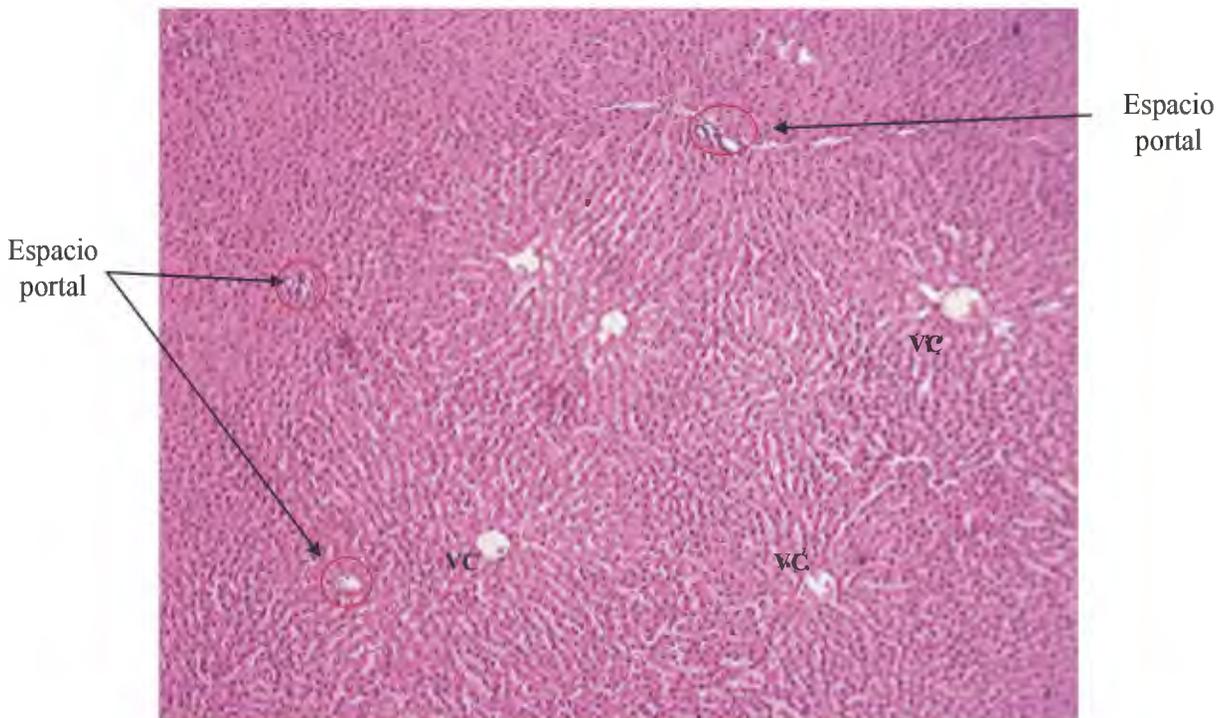


Figura 34A: (4X HE). Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Obsérvese el Espacio portal donde puede apreciarse la triada portal (conducto biliar, vena porta y la arteria hepáticas).

VP

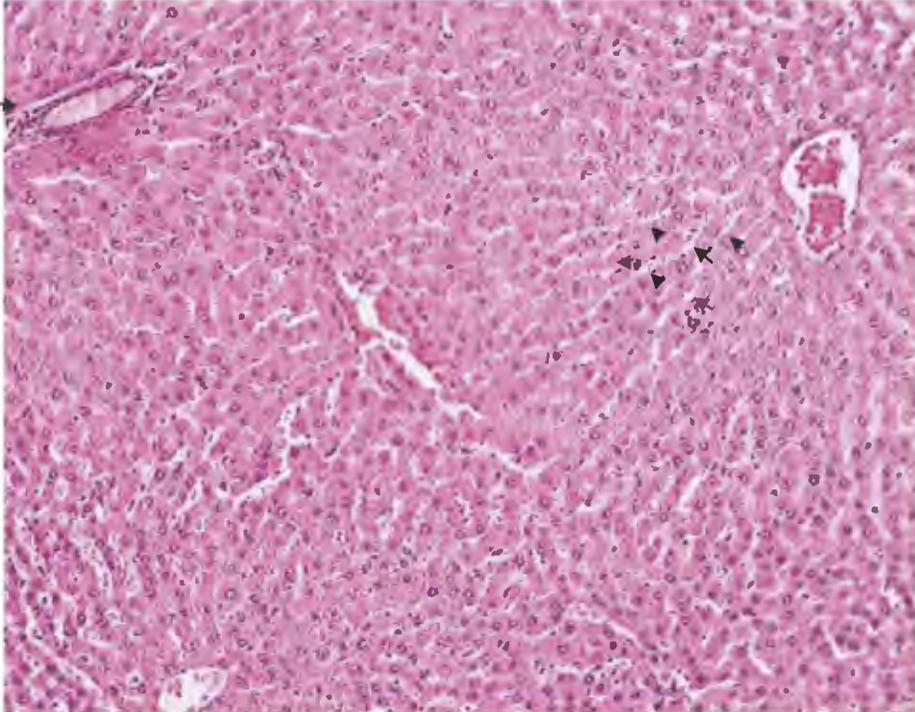


Figura 34B: (10X HE).Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Vena porta a mayor aumento, obsérvese como salen los sinusoides en forma radiada (*flechas*).

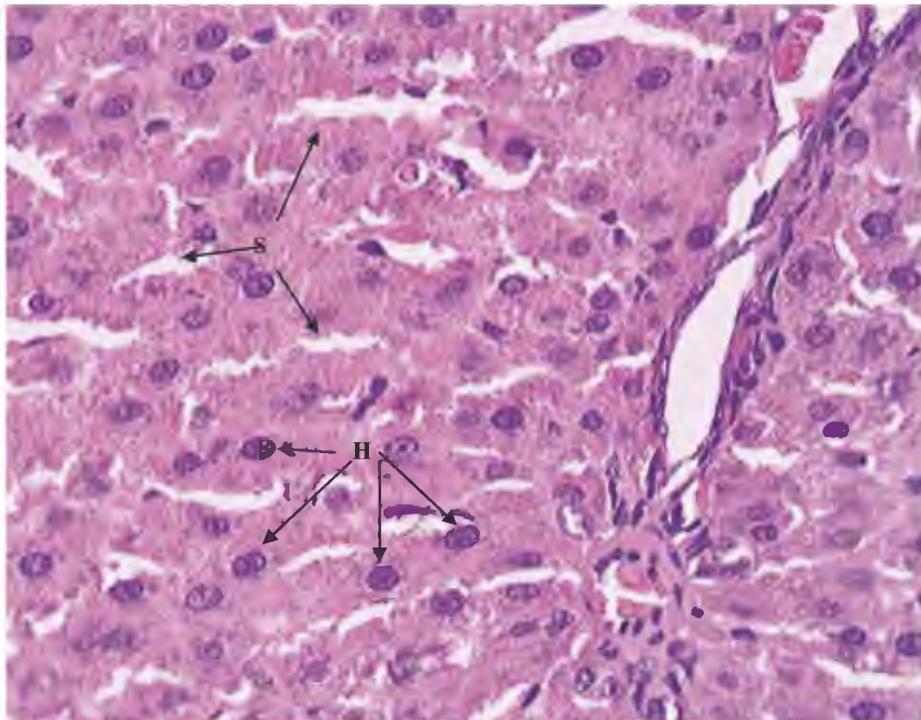


Figura 34C: (40X HE).Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Sinusoides (S) a mayor aumento.

Vena
central

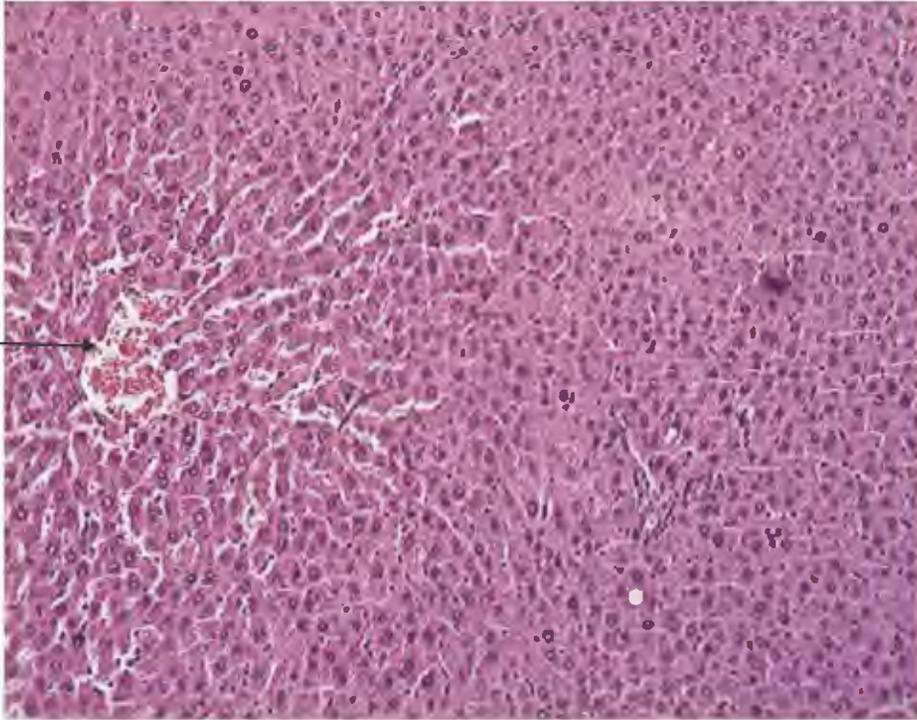


Figura 35: (10X HE).Tejido hepático de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg.

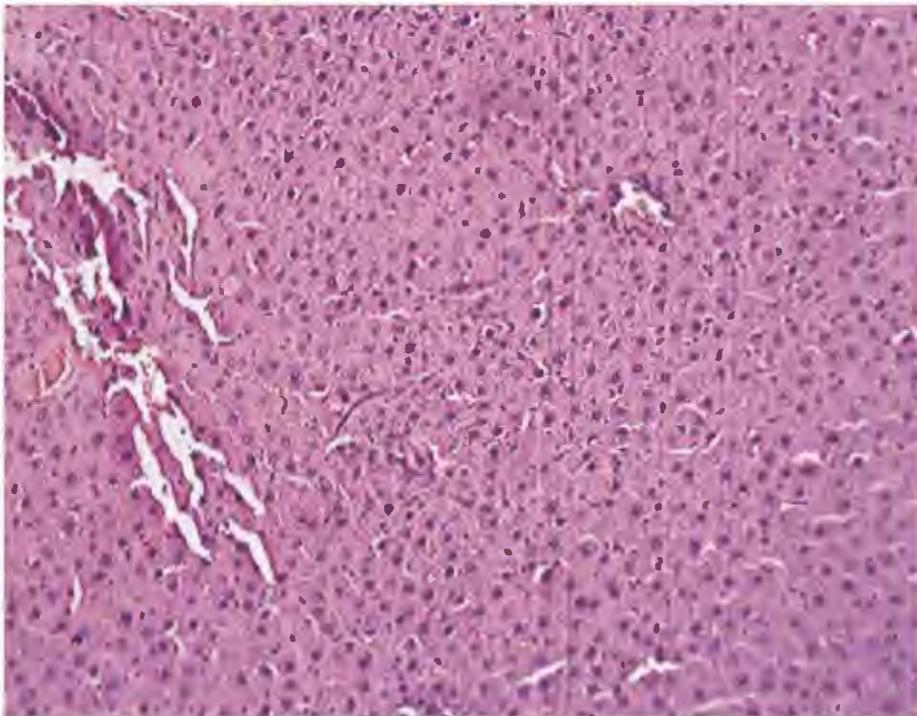


Figura 36: (10X HE).Tejido hepático de rata de aspecto normal de Grupo IV (Control).

c. Tejido Pulmonar

Según el Médico Cirujano Anatómo Patólogo Daniel Carrera Palao, manifiesta que el estudio los pulmones de todos los grupos (incluido el control) presentan alteración histológica estructural pero que esta no esta en relación a toxicidad por la ingesta alimentaria (Anexo 12). En el cuadro 26 podemos apreciar los cambios histopatológicos de los pulmones de todos los grupos tratados y del control (grupo IV).

Cuadro 26: Cambios histopatológicos de los pulmones según dosis de concentrado de proteína de pota

Estructuras	Características Macroscópicas	Grupo I (n = 6)	Grupo II (n = 7)	Grupo III (n = 7)	Grupo IV (n = 6)
		(%)	(%)	(%)	(%)
Arquitectura pulmonar	-Preservada.	100%	100%	100%	100%
	-Grados variables de distorsión.	---	---	---	---
Septos alveolares	-Infiltrado inflamatorio	100%	100%	100%	100%
	linfocitario Congestión vascular	---	---	---	---
	-Preservado				
Alveolos	- Grados variables de atelectasia	100%	100%	100%	100%
	- Preservado	---	---	---	---
Distribución peribronquial	-Compromiso inflamatorio	100%	100%	100%	100%
	crónico y agudo variable, en forma segmentaria.	---	---	---	---
	- Sin alteraciones				

En las figuras 37A, 37B y 37C se observa el tejido pulmonar de rata del grupo I (Dosis 500 mg/Kg) a diferentes aumentos. Obsérvese que presentan alteraciones estructurales. Se observa congestión vascular, neumonitis crónica multifocal. Esto va a ocasionar que se presente grados variables de atelectasia, que es la disminución del volumen pulmonar. Los sacos alveolares están llenos de exudados compuestos por leucocitos (sobretudo neutrófilos), eritrocitos y fibrina. Esto es indicativo de cuadros de neumonía y bronconeumonía.

Lo apreciado en el tejido pulmonar del grupo I, se va a repetir en los demás grupos, incluido el grupo control.

En la figura 38C (rata grupo II) podemos apreciar como en los septos alveolares infiltrado inflamatorio. Además dicho septos se han engrosado.

En la figura 39 (rata grupo III) se aprecia un cuadro de neumonía crónica.

En la figura 40 (Grupo control) igualmente los espacios aéreos están llenos de leucocitos, eritrocitos y fibrina.

Según Pérez *et al* (1999) la neumonía alveolar proliferativa puede deberse a enfermedades sistémicas en estos animales. No obstante, esta lesión también puede aparecer como respuesta a la inhalación del éter, que fue la sustancia empleada durante la obtención de muestras para los análisis bioquímicos y hematológicos.

Estas lesiones en los pulmones no fueron específicas de un grupo, sino que se presentaron aleatoriamente en todos los grupos incluidos el control, sin preferencia por alguno de ellos, por lo que se puede afirmar que su aparición no está relacionada con el tratamiento del concentrado de proteína de pota.

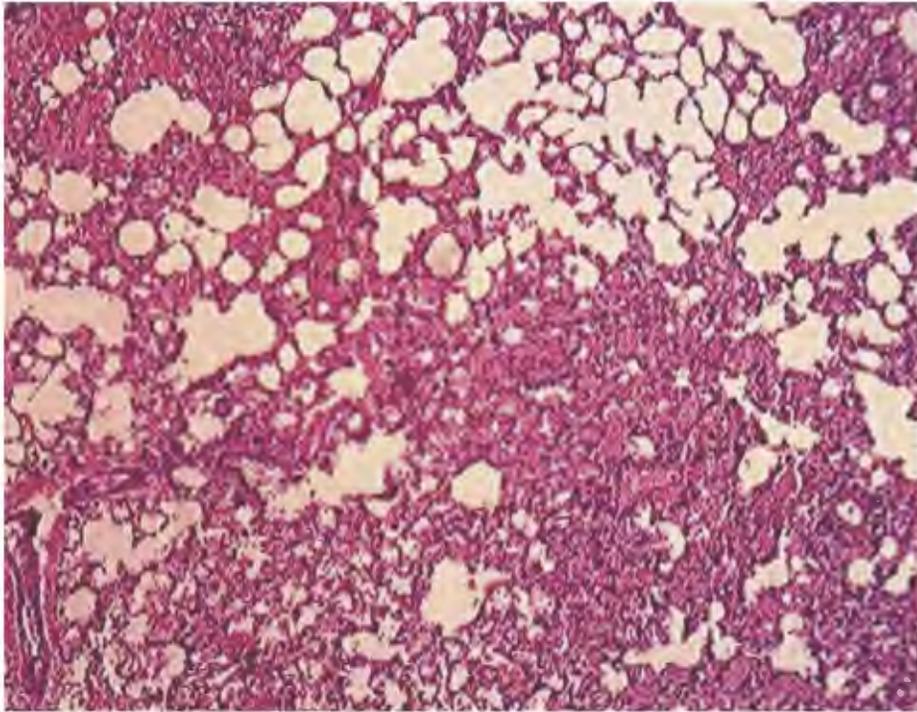


Figura 37A: (4X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. Se observa congestión vascular, abundante tejido leucocitario y se observa que los alveolos han perdido su estructura característica.

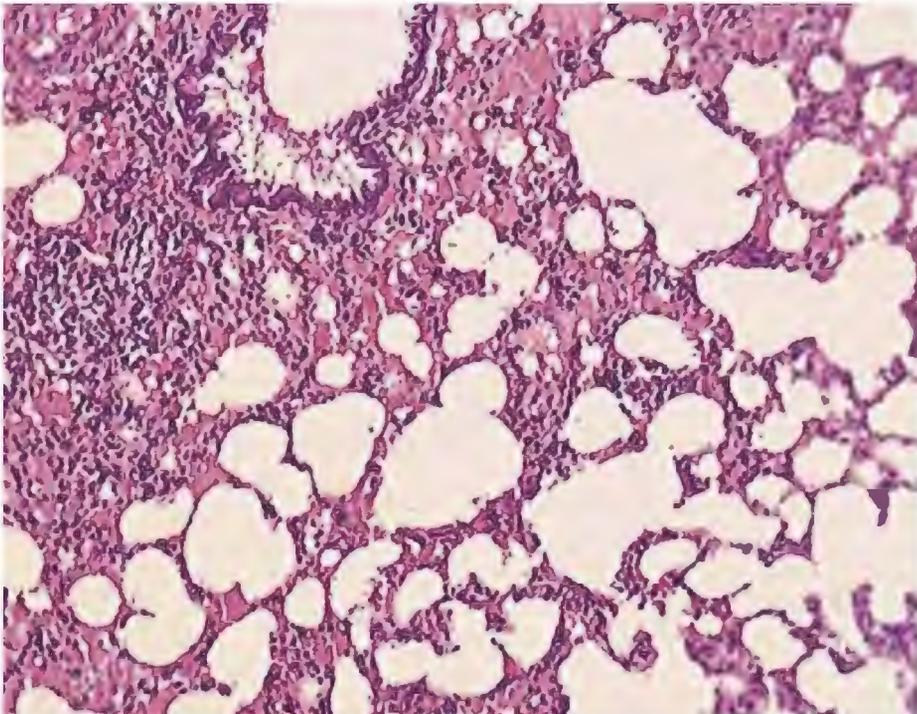


Figura 37B: (10X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. Obsérvese que los espacios aéreos están llenos de exudado compuesto por leucocitos (sobretudo neutrófilos), eritrocitos y fibrina.

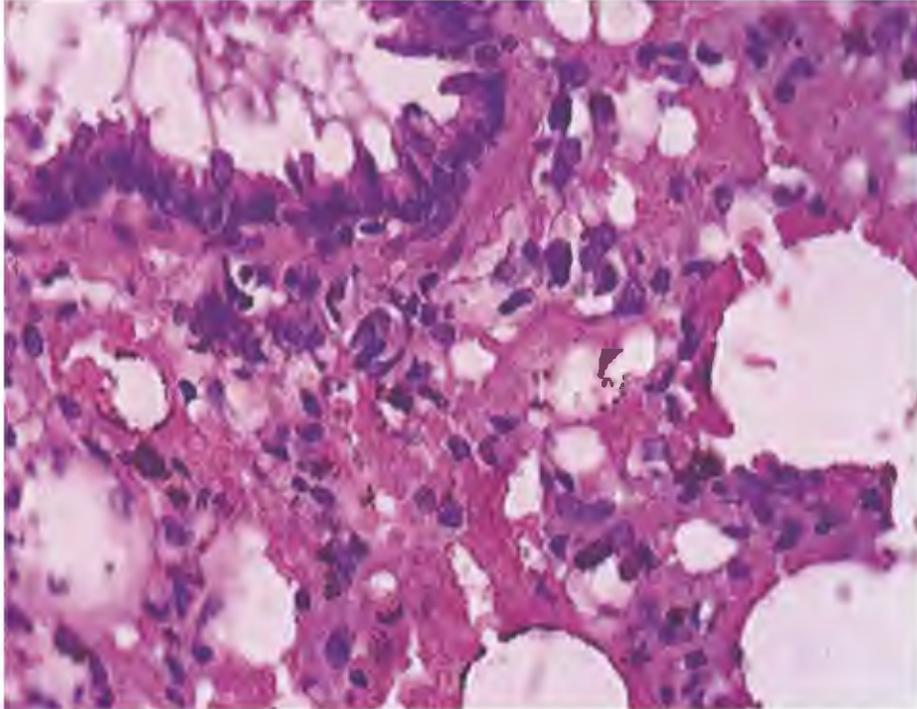


Figura 37C: (40X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo I. Dosis 500 mg/Kg. Obsérvese el cuadro de bronconeumonía.

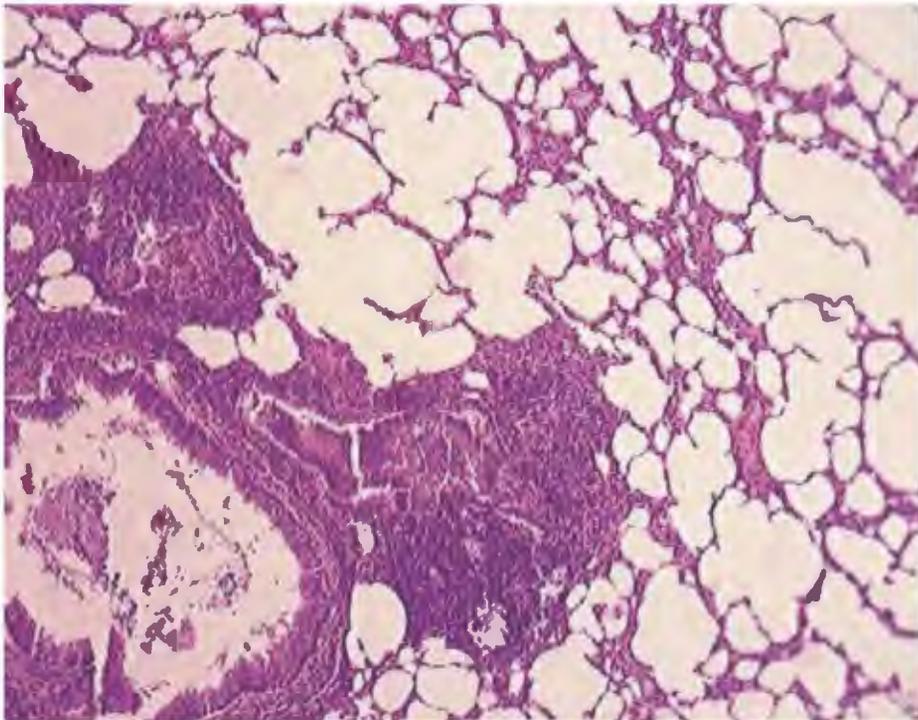


Figura 38A: (4X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Distorsión de la arquitectura pulmonar con infiltrado linfocitario. Bronconeumonía.

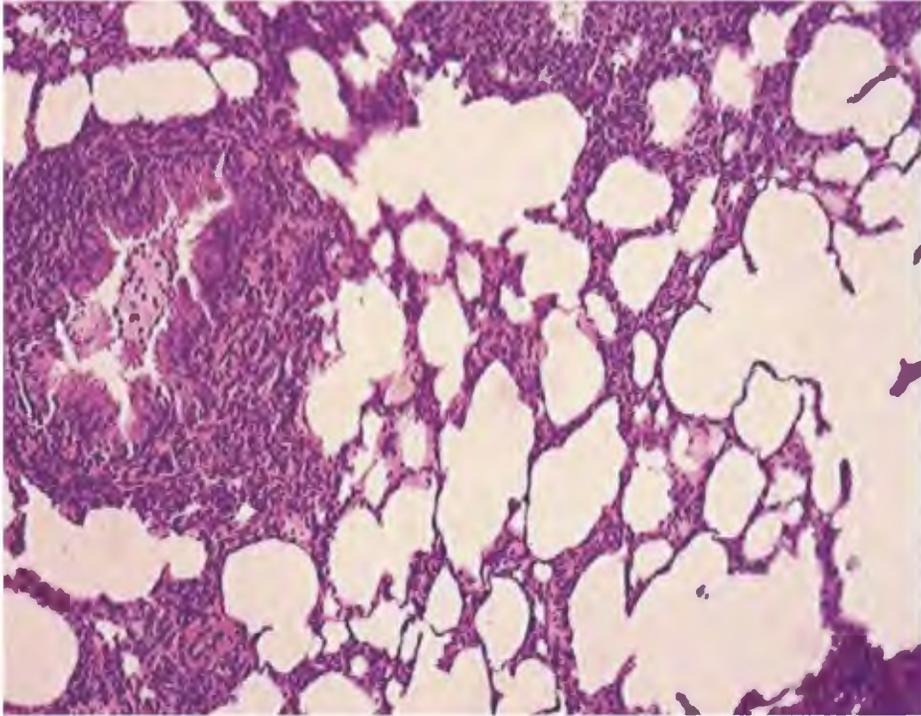


Figura 38B: (10X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Compromiso inflamatorio crónico (Bronconeumonía).

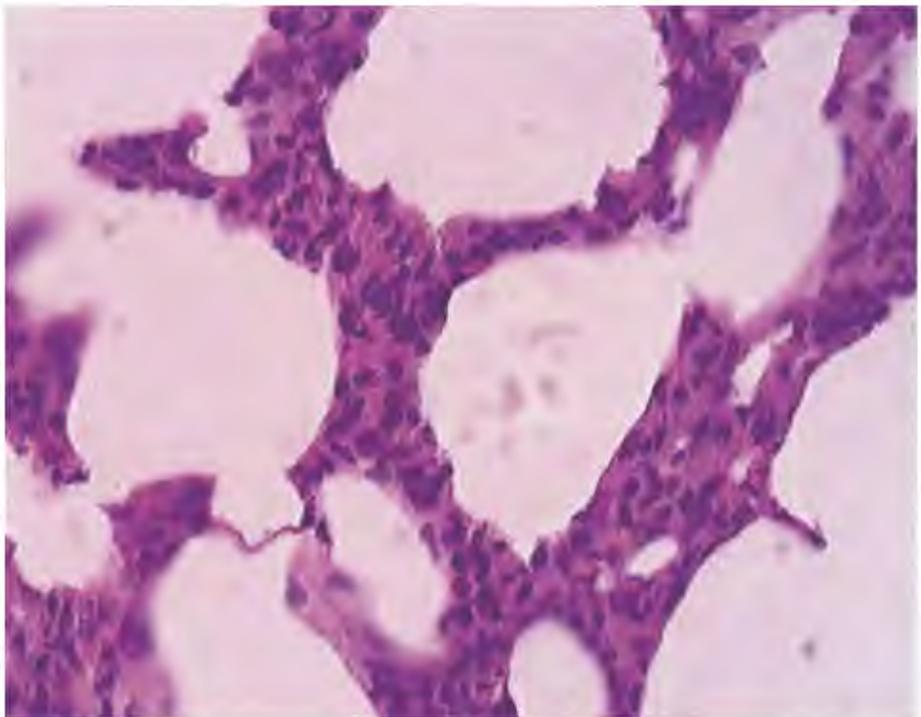


Figura 38C: (40X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo II. Dosis 1000 mg/Kg. Obsérvese infiltrado inflamatorio en los septos alveolares.

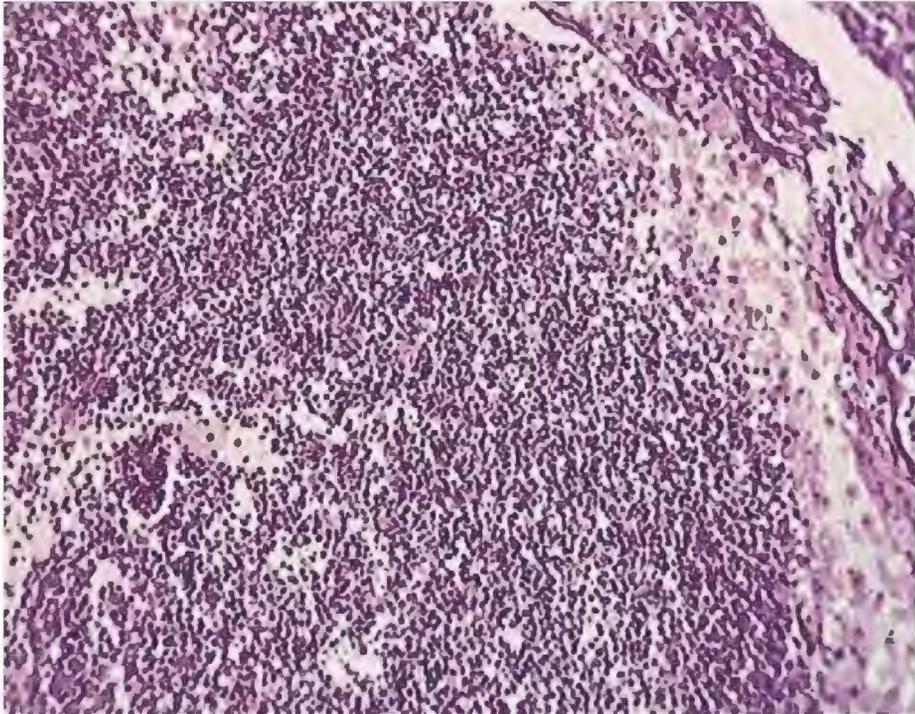


Figura 39: (10X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo III. Dosis 2000 mg/Kg. Obsérvese la neumonía crónica. Los espacios aéreos y los alveolos están llenos de leucocitos, eritrocitos y fibrina.

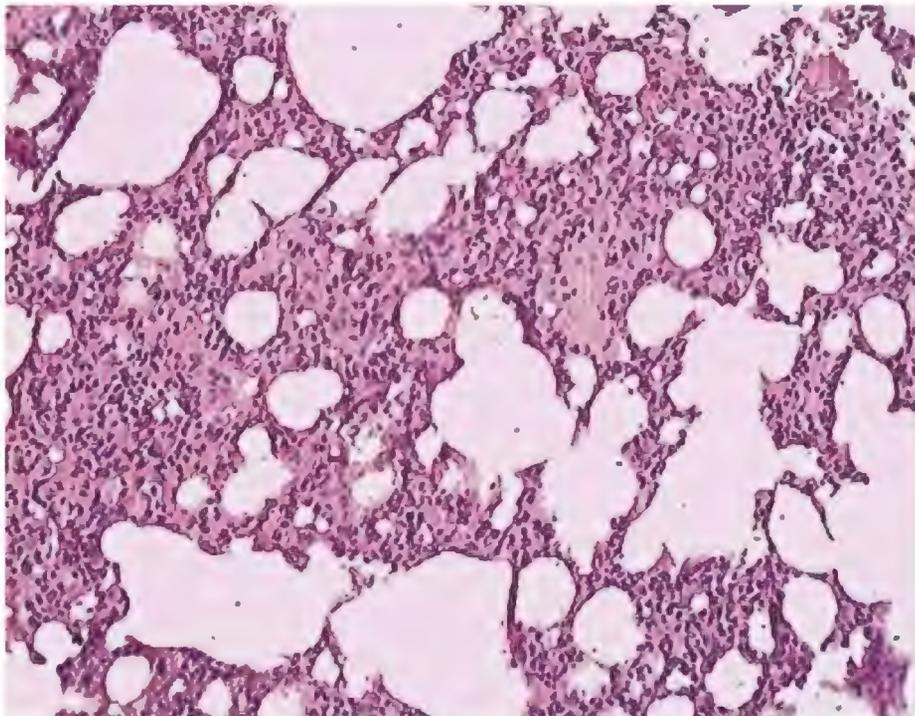


Figura 40: (10X HE).Tejido pulmonar de rata Grupo IV (Control). Distorsión de la arquitectura pulmonar. Los espacios aéreos están llenos de leucocitos, eritrocitos y fibrina.

V. CONCLUSIONES

- La administración del concentrado de proteínas de pota (*Dosidicus gigas*) elaborado en la UNALM no causó alteración histológica estructural en el hígado ni en los riñones.
- La DL50 del concentrado de proteína de pota elaborado en la UNALM se encontró por encima de 2000 mg/kg de peso corporal, calificándose según el Sistema Global Armonizado (OECD), como “No clasificado” (“No tóxico”).
- El peso corporal como indicador de toxicidad se comportó en ascenso y estuvo dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea de estudio.
- Los índices bioquímicos y hematológicos no muestran diferencias entre los grupos de experimentación que puedan ser atribuidas al producto. En los casos en que se manifestaron diferencias significativas, los valores obtenidos nunca se alejaron de los valores normales descritos para la especie.
- La alteración histológica estructural en los pulmones de todos los grupos tratados, incluido el control, no está en relación a toxicidad y no es un efecto dosis respuesta a la ingesta del concentrado de proteína de pota.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir finalmente que la administración a dosis repetida del concentrado de proteína de pota elaborado en la UNALM, no produce alteraciones que puedan atribuirse a efectos tóxicos en ratas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar las evaluaciones en otra especie.
- Si se desea replicar el experimento analizar otros parámetros bioquímicos y posibles lesiones sobre otros órganos.
- A raíz de la demostración de que el concentrado de proteína de pota no presenta características tóxicas se recomienda iniciar investigaciones en la elaboración de nuevos productos en base al producto. Por ejemplo papillas, panes, fideos, etc.
- Realizar estudios de toxicidad en productos elaborados a partir del concentrado de proteína de pota.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. ANDERS, M. (1985) *Biochemical Pharmacology and Toxicology*. Academic Press, New York.
2. ARANGO, M., ISAZA, G., BOHORQUEZ, A., LOPEZ, R., CHILCA, L. (2005). Determinación de la Toxicidad Subaguda de *Zebrina pendula* en Ratas. *Ciencias Básicas Biosalud*. 14:56-66.
3. ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA (2001). Boletín GTEMA Nº 21. Editado por Guillermo Repetto. Instituto Nacional de Toxicología. Sevilla, España.
4. BERMÚDEZ, D., MONTEAGUDO, E., BOFFIL, M., DIAZ, L., ROCA, A., BETANCOURT, E. y SILVEIRA, E. (2007). Evaluación de la Toxicidad Aguda de Extractos de Plantas Medicinales por un Método Alternativo. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 9(3).Marzo 2007.
5. BOURGEOIS, C. y LE ROUX, P. (1986). *Proteínas Animales*. Edit. El Manual Moderno S.A. México D.F. 346 p.
6. BRAVO, V. (2001). Desarrollo de una Tabla de Evaluación por Análisis Sensorial del Calamar Gigante o Pota (*Dosidicus gigas*). Tesis. UNMSM. Lima.
7. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL (1984). Hematology and Clinical Biochemistry Reference Values. In: Guide to the care and use of experimental animals: Editorial CCAC, Ottawa, Canadá. Vol. 1, 1984:86-8.
8. CARRILLO, L. (1996). Estudio de la Elaboración de Marinado de Pota (*Dosidicus gigas*). Tesis. UNALM. Lima. 77 p.
9. CASTILLO, O., GAMARRA, F., y ROSSEL, J. (2008). Toxicidad Sub-crónica en ratas del extracto de Herb Cut (hojas de mora, yacón y olivo). Artículo Científico por publicar. Universidad San Martín de Porres. Lima.
10. COLWELL, R. (1983). Biotechnology in the Marine Science. *Science* 222(4619):19.
11. COMISION DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS (2008). Reglamento (CE) Nº 440/2008 de la Comisión de 30 de Mayo de 2008. Método B.26. Ensayo de Toxicidad Oral Subcrónica por Administración Continuada (90 días) en Roedores. Diario Oficial Nº L 142 de 31/05/2008 p. 0001 – 0739. Consultado el 11 de abril 2009. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008R0440:ES:HTML>.

12. CONNELL, J. y HARDY, R. (1987). Avances en la Tecnología de los Productos Pesqueros. Edit. Acribia. España. 124 p.
13. DEICHMANN, W. and GERARDE, H. (1969) Toxicology of drugs and chemicals. Academic Press, New York.
14. DELLMANN, H. y BROWN, E. (1976). Histología Veterinaria. Edit. Acribia. España. 529 p.
15. DESHPANDE, S. (2002). Handbook of Food Toxicology. Ed. Marcel Dekker. USA. 920 p.
16. DIAZ, A., BRAVO, M., CERUTI, E. y CASAR, C. (1973). Valores del recuento de eosinófilos en secreción nasal en el diagnóstico diferencial de los cuadros bronquiales obstructivos del niño. *Revista Chilena de Pediatría*, 44(4): 341:343.
17. DOMINGUEZ, G., ATHIE, A., MIJARES, J., CARDENAS, E. y PEREZ, E. (2001). Efecto de la Desnutrición en la Anastomosis Colónica de la Rata. *Cirujano General*, 23(2): 81-86.
18. FABRE, R. y TRUHAUT, R. (1976). Tratado de toxicología. Tomo I, Paraninfo, S.A., Madrid.
19. FAO (1970). Contenido de Aminoácidos de los Alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Servicio de Ciencia y Política de la Alimentación. Dirección de Nutrición. FAO. Roma. 285 p.
20. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2006). Guía para la industria #147 - Estudios para Evaluar la Seguridad de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Humanos: Estudios de Toxicidad de Dosis Repetidas (90 días). VICH GL31 – Guía Final. Julio 27, 2006.
21. FERNÁNDEZ, E. (2007). Nefropatías Glomerulares y Tubulointersticiales. *Nefrología e Hipertensión*, 3(9): 298-313.
22. HOLMBERG, B., HOGBER, J. y JOHANSON, G. (2001). Principios Generales de la Toxicología. En: ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL TRABAJO. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. 3ª ed. España.
23. HODGSON, E. and LEVI, P. (1989). A textbook of modern toxicology. 2th. edition Rzaeven Press. New York.
24. HUSS, H. (1997). Aseguramiento de la Calidad de los Productos Pesqueros. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Pesca. Roma, Italia.

25. IBARRA, L. (2006). Efectos sobre la Calidad y Funcionalidad del músculo de manto de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) sometidos al almacenamiento en hielo. Tesis Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico TEPIC. México. 77 p.
26. IMARPE - ITP (1996). Compendio Biológico Tecnológico de las Principales Especies Hidrobiológicas Comerciales del Perú. Ed. Stella. Lima. 143 p.
27. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA E INFORMATICA (2003). Encuesta Nacional de Hogares (ENAHOG) 2002 – IV Trimestre INEI. Boletín N° 55.
28. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (2005). Manual de Procedimiento de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología. Ministerio de Salud. Serie de Normas Técnicas; 40. Lima, Perú. p. 88.
29. JUNQUEIRA, L. y CARNEIRO, J. (2005). Histología Básica. 6ª Ed. Editorial Masson S.A. España. 488 p.
30. KLAASSEN, A., AMDUR, M. and FOULL, J. (1986). Casarett and Doull's Toxicology (the basic science of poison). Macmillan Publishing Co., N.Y.
31. KREUZER, R. (1984). Cephalopods: Handling, processing and products. FAO Fish, Tech. Pap., (254): 108 p.
32. LABORATORIO SERVET (2009). Valores Normales en Sangre. Consultado el 03 de Mayo de 2009. Disponible en: <http://www.proclave.com/servet/valoresref.htm>.
33. LAUSADA ET AL. (2007). Estudio del Perfil Lipídico de Ratas con Trasplante Renal bajo el Tratamiento con distintos Inmunosupresores. Asociación Médica Argentina, 41(2): 86-92.
34. LAZO, L. (2006). Elaboración de Harina de Pota (*Dosidicus gigas*) precocida para consumo humano. Tesis Facultad de Pesquería. UNALM. 104 p.
35. LEVIT, G. y RODRIGUEZ, M. (2008). Uso de la Albúmina en la Práctica Clínica. 1º Cátedra de Clínica Médica y Terapéutica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Rosario – Argentina. P. 1-2.
36. MADRID, A. MADRID, J. MADRID, R. (1994). Tecnología del Pescado y Productos Derivados. 1º Edición. AMV Ediciones. Mundiprensa. España. 376 p.
37. MINISTERIO DE LA PRODUCCION (2003) Anuario Estadístico Pesquero 2002. Oficina General de Tecnología de la Información y Estadísticas Produce. 227 p.
38. MINISTERIO DE PESQUERIA - OFICINA GENERAL DE ECONOMIA PESQUERA. (1998). Explotación del Calamar Gigante o Pota en Aguas Peruanas. Ministerio de Pesquería. Lima. Perú. 43 p.

39. MORENO, E., ARAUJO, M., ALARCON, M., LUGO, A., MORENO, E. y BORGES, R. (2007). Alteraciones Hematológicas y de Glucosa Sanguínea en Ratas Wistar con Infección Chagásica Aguda durante la Gestación. *Revista de Investigaciones Clínicas de Universidad de Los Andes, Mérida*; 48(2): 187-198.
40. NAGAKURA, K. (1972). General Analysis. En "Utilization of Marine Products". M. Okada (Ed.). Overseas Technical Cooperation Agency. Tokio. 311 p.
41. NOGUCHI, T., HWANG, O., ARAKAWA, H., SUGITA, Y., DEGUCHI, Y. AND HASHIMOTO, K. (1987). *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin producing bacterium in the intestines of the fish *Fugu vermiculans vermicularis*. *Mar. Biol.* **94**, 625.
42. OECD (1998). Test Guideline 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. Consultado el 15 de Marzo de 2008. Disponible en: <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9740801E.PDF>.
43. OECD (2001). Test Guideline 420. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. Consultado el 11 de Abril de 2009. Disponible en: <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9742001E.PDF>.
44. PASCUZZO, C. (2008). Farmacología Básica. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. 927 p.
45. PEDRESCHI, F. (1993). Determinación de la Composición Proteica del Músculo del Manto de la Pota (*Dosidicus gigas*). Tesis Facultad de Pesquería. UNALM. Lima. 79 p.
46. PEÑA, E. (1978). Producción y Evaluación Biológica de un Concentrado Proteico a partir de un Hidrolizado de Machete (*Brevoortia maculata chilcae*). Tesis Facultad de Pesquería. UNALM. Lima. 112 p.
47. PEREZ, J.L. (2006). Manual de Patología General. Editorial Masson El Servier. 6ª Edición. España. 784 p.
48. PEREZ, M., MONTEAGUDO, E., MENDEZ, R. y VERDECIA, B. (2008). Evaluación de la Toxicidad Aguda por el Procedimiento de Dosis Fijas de un Extracto de *Boldoa purpurascens* Cav. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 9(3). Marzo 2008.
49. PÉREZ, R., BELLO, J., RODRIGUEZ, J., CALDERON, CARLOS., DAVILA, A., MONTALVO, M. y MARTINEZ, R. (1999). Evaluación toxicológica del anticuerpo monoclonal IOR C5 en administraciones reiteradas en ratas hembras. *Biotecnología Aplicada*, 17(1): 30-33.
50. PEREZ, R., MONTALVO, M., RODRIGUEZ, J., CALDERON, C., CRUZ, JULIA. Y BELLO, J. (2001). Determinación de la Toxicidad en Dosis Reiteradas del Asencial. *Revista Cubana de Oncología*, 17(2): 111-117.

51. PORRAS, N., ZEIDAN, Q., STRAUSS, M., y ANSELMINI, G. (2002). Valores Séricos de Marcadores Hepáticos en Ratas: Aporte de un Patrón de Referencia. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(2): 201-204.
52. RAGELIS, E. (1984). Ciguatera seafood poisoning. Overview. In *Seafood Toxins*. Ed: E.P. Ragelis. ACS Symposium Series 262. Washington D.C., 25–36.
53. REPETTO, G., DEL PESO, A. y ZURITA, J. (2004). Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en la Evaluación de la Seguridad. Jornadas de Toxicología Ambiental - Torre Guil (Murcia). Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses y Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla. 10 p.
54. REPETTO, M. (1997). Toxicología Fundamental. Editorial Díaz de Santos. 3^o edición. Madrid, España. 500 p.
55. RODRIGUEZ, J., CABRERA, J., ANABITARTE, A., PLAZA, M., LOSADA, A., GARCÍA, P., y AFONSO, J. (2001). Efectos del Carvedilol en Ratas con Insuficiencia Renal Crónica Inducida. *Nefrología*, 21(1): 52-58.
56. ROLDAN, D. (2002). Elaboración y Evaluación de Harina pre-cocida a partir de surimi de Falso Volador (*Prionotus stephanophys*) para Consumo Humano. Tesis Maestría en Tecnología de Alimentos. UNALM. Lima. 105 p.
57. ROLDAN, D. y LAZO L. (2005). Características Nutricionales del Concentrado de Proteína de Calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Facultad de Pesquería. UNALM. Artículo por publicar.
58. ROSS, M.; ROMRELL, L.J. Y KAYE, G.I (2005). Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 4^a ed. Editorial Panamericana.
59. SCHANTZ, E. (1984). Historical perspective on paralytical shellfish poisoning. In *Seafood Toxins*. Ed: E.P. Ragelis. ACS-Symposium Series 262, 99–111.
60. SHIBAMOTO, T. y BJELDANES, L. (1996). Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, 203 p.
61. SILBERGELD, E. (2001). Toxicología. En: ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL TRABAJO. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. 3^a ed. España.
62. SOUZA, F. (2006). Proposta de Guia para a realização de Estudos não Clínicos de Segurança, necessários ao desenvolvimento de Medicamentos Antineoplásicos. Tesis Maestría en Vigilancia Sanitaria. Universidad Federal de Bahía. Brasil. 110 p.
63. SUZUKI, T. (1987). Tecnología de las Proteínas de Pescado y Krill. Edit. Acribia. España. 230 p.
64. TAYLOR, S. (1988). Marine toxins of microbial origin. *Food Technol.* 42, 94–98

65. TORRES, C. (2003). Efecto de Maca Sobre el Peso Vivo, Dosaje de Hemoglobina y Toxicidad a Nivel Hepático y Renal en Ratones. Tesis Facultad de Biología. UNALM. Lima. 102 p.
66. UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (2005). Valores Hematológicos Normales en Ratas. Vicerrectorado de Investigación. Comisión Ética asesora para la Experimentación Animal. Consultado el 01 de Mayo de 2009. Disponible en: http://cea.unizar.es/Disenos_experimentales/Sangre/VALORES%20HEMATOLOGICOS.pdf.
67. VALLE, P. y LUCAS, B. (2000). Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. México D.F. 261 p.
68. VICETTI, R. (1986). Solubilidad y Gelificación de las Proteínas Miofibrilares. II Curso Internacional Tecnología de Procesamiento de Productos Pesqueros. 3 al 28 febrero, 1986. ITP - JICA. Callao. Perú. 17 p.
69. WIENER LAB. (2005). Adaptaciones de Métodos Químicos en WL-M1600 DR. Manual Técnico. 68 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. INFORME DE LA PRUEBA PILOTO REALIZADA EN RATAS Y RATONES

INTRODUCCION

El ensayo de toxicidad aguda que se realizó esta sujeto a la dosis máxima que pueda soportar el animal y también la forma de administración. Existieron inconvenientes respecto a la preparación de la solución en base a concentrado de proteína de pota a administrar debido a su poca capacidad de solubilización en agua y suero fisiológico por lo que se pudo experimentar, en tal sentido se procedió a preparar dosis ascendentes a las concentraciones de 10% y 20% y se administro aleatoriamente a los animales de experimentación. En el presente ensayo no se encontró mortalidad debido al producto.

La Toxicidad aguda por lo general se define como el cambio adverso que ocurren inmediatamente o poco tiempo después de una única o breve período de exposición a una sustancia o sustancias o efectos adversos que ocurren dentro de un corto tiempo de administración de una dosis única de una sustancia o habida cuenta de dosis múltiples dentro de las 24 horas.

Objetivo General

Definir los parámetros a utilizar en la investigación.

Objetivos Específicos

- Determinar la Selección de la Dosis.
- Determinar la cantidad máxima a administrar a los animales.
- Determinar el Método a utilizar.

MATERIALES Y METODOS

LUGAR DE EJECUCIÓN

La prueba piloto se llevó a cabo en el Bioterio de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

MATERIA PRIMA

En el presente trabajo se utilizó como materia prima el concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*), elaborada por la Facultad de Pesquería de la UNALM.

METODOS DE ANÁLISIS Y PROCEDIMIENTO

Preparación de la solución stock del Concentrado de Proteínas de Pota al 10 % y 20%

Se procedió a preparar soluciones stock del Concentrado de Proteína de Pota (CPP) al 10% inicialmente y luego al 20%. Para ello se peso 10 ó 20 gramos del Concentrado de Proteína de Pota, en una balanza analítica, posteriormente, se diluyo en un vaso de prueba con agua bidestilada, en razón de 100 ml. Obteniendo se una solución stock p/v de CPP al 10% Y 20%.

Ensayo de la toxicidad aguda del concentrado de proteína de pota

a) Prueba 1 con ratones

Para este ensayo, se trabajo con 10 ratones albinos de 34.8 ± 2.2 g de peso adquiridos en el bioterio de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. Antes del ensayo se mantuvo 24 horas a los animales con agua ad libitium, y se procedió a clasificarlo en 3 grupos de 3 ratones cada uno, y un ratón control.

Se pesó a cada animal, para calcular su dosificación, y diferenciación individual de acuerdo a lo siguiente: Grupo 1: 3500 mg/Kg; Grupo 2: 4500 mg/Kg; Grupo 3: 6500 mg/Kg y Grupo 4: Control.

La mortalidad se evaluó, a 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 24 horas, después de la administración del concentrado de proteína de pota.

b) Prueba 2 con ratas

Para este ensayo, se trabajó con 10 ratas albinas de 56.58 ± 10.42 g de peso adquiridas en el bioterio de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. Antes del ensayo se mantuvo 24 horas a los animales con agua ad libitum, y se procedió a clasificarlo en 5 grupos de 2 ratones cada uno.

Se pesó a cada animal, para calcular su dosificación, y diferenciación individual de acuerdo a lo siguiente: Grupo 1: 4000 mg/Kg; Grupo 2: 4500 mg/Kg; Grupo 3: 5000 mg/Kg ; Grupo 4: 5500 mg/Kg y Grupo 5: 6000 mg/Kg.

La mortalidad se evaluó, a 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 24 horas, después de la administración del concentrado de proteína de pota.

RESULTADOS Y DISCUSION

a) PRUEBA 1 CON RATONES

(Con solución stock al 10% del concentrado de proteína de pota)

Grupo 1

Ratón	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
1	3500	0,64	36,6	0/3	0
2	3500	0,59	33,9	0/3	0
3	3500	0,62	35,9	0/3	0

Grupo 2

Ratón	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
4	4500	0,73	32,6	0/3	0
5	4500	0,73	32,7	0/3	0
6	4500	0,76	34,1	0/3	0

Grupo 3

Ratón	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
7	6500	1,17	36,2	0/3	0
8	6500	1,27	39,3	0/3	0
9	6500	1,08	33,4	0/3	0

Grupo 4 (Control)

Ratón	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
10	0	0	33	NO	0

Se realizó el ensayo con una solución stock de concentrado de proteína de pota al 10%, y se observó que no hubo ningún inconveniente en el momento de la administración por vía oral del producto. Se calculó la dosis según el peso de cada animal.

La cánula empleada para la administración oral de la solución stock del concentrado de proteína de pota debería ser rígida y de un calibre apropiado de tal manera que no sea un factor de error en el momento de administrar el producto y ocasionar una lesión o muerte al animal.

b) PRUEBA 2 CON RATAS**(Con solución stock al 20% del concentrado de proteína de pota)****Grupo 1**

Rata	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
1	4000	1.2	36,6	0/2	0
2	4000	1.4	33,9	0/2	0

Grupo 2

Rata	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
3	4500	1.0	45.2	0/2	0
4	4500	1.1	49.3	0/2	0

Grupo 3

Rata	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
5	5000	1.8	72.5	0/2	0
6	5000	1.5	59.3	0/2	0

Grupo 4

Rata	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
7	5500	1.5	54.5	0/2	0
8	5500	1.1	39.2	0/2	0

Grupo 5

Rata	Dosis (mg/Kg)	Dosificación (ml.)	Peso (g.)	Mortalidad	% Mortalidad
9	6000	1.6	54.0	0/2	0
10	6000	1.8	61.4	0/2	0

Según la Comisión de las Comunidades Europeas (2008) señala que La especie idónea para el estudio de toxicidad es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Razón por la cual trabajamos en esta segunda prueba con la rata. Pero se observó que el estudio de la investigación final iba a durar 90 días, por lo tanto si bien al inicio no iba a ver problemas con los animales con respecto a la administración de las dosificaciones según pasarán las semanas los animales iban a crecer y ganar peso por lo tanto las dosificaciones iban a aumentar en volumen (mL). Las soluciones podrían alcanzar valores encima de 4 mL y podríamos tener problemas con la recepción del producto razón por la cual se decidió preparar una solución stock al 20% para poder utilizar menos producto (no fue muy espeso) y reducir el volumen de dosificación del concentrado de proteína de pota. Realizada la administración no presentaron problemas.

Los estudios de toxicidad aguda cuyo objetivo es determinar el potencial tóxico de una sustancia química tras una sola exposición. La clasificación de toxicidad aguda por vía oral según la DL₅₀ los clasifica en cuatro grupo: Grupo I Muy tóxica ($DL_{50} \leq 25$ mg/Kg); Grupo II Tóxica ($DL_{50} \leq 250$ mg/Kg); Grupo III Nociva ($DL_{50} \leq 2000$ mg/Kg) y Grupo IV Sin toxicidad aguda ($DL_{50} \geq 5000$ mg/Kg). De dichos datos podríamos decir que el concentrado de proteína de pota, al no causar muertes, en niveles encima de los 5000 mg/Kg. No presenta toxicidad aguda.

CONCLUSIONES DE LA PRUEBA PILOTO

1. De los resultados obtenidos se plantea realizar un Estudio de Toxicidad con Dosis Repetidas. El objetivo de este estudio recomendado por la OECD (1998) es conocer los efectos de las sustancias en animales de experimentación tras administración de dosis repetidas y posible extrapolación al hombre. Se plantea que dicho estudio sea de un período de exposición de 90 días.
2. Las condiciones que plantea la OECD (1998) para este tipo de estudios son: a) 4 lotes de animales b) 3 niveles de dosis (una que produzca toxicidad, una intermedia y otra que sea ligeramente tóxica) c) administración y observación diaria. Es por ello que se plantea para la investigación final 4 grupos: Grupo I (500 mg/kg), Grupo II (1000 mg/kg), Grupo III (2000 mg/kg) y grupo IV (control).

ANEXO 2. RESULTADOS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS INICIALES (DATOS BASALES)

		BIOQUÍMICOS			HEMATOLÓGICOS											
		Albumina	Creatinina	TGP	Hb	Hto	Leucocitos	Abastionados	Segmentados	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos			
CONCENTRADO PROTEICO DE POTASSIO	500 mg/kg	Nº Rata	Sexo	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	Inicio	
		1	M	3.6	1.1	8.0	14.5	44.0	5300.0	0.0	20.0	0.0	1.0	0.0	79.0	
		2	M	3.6	1.1	13.0	15.5	47.0	6000.0	1.0	27.0	4.0	0.0	0.0	68.0	
		3	M	3.4	1.0	7.0	16.2	49.0	6400.0	0.0	26.0	1.0	0.0	0.0	73.0	
		4	M	3.8	1.2	14.0	14.9	45.0	6200.0	1.0	22.0	0.0	1.0	0.0	76.0	
		5	M	4.0	1.0	5.0	14.5	44.0	6300.0	3.0	33.0	0.0	0.0	0.0	64.0	
		6	M	3.9	1.2	4.0	15.5	47.0	6400.0	1.0	32.0	0.0	0.0	0.0	67.0	
		7	H	3.8	1.2	6.0	14.9	45.0	6250.0	0.0	27.0	0.0	0.0	0.0	73.0	
		8	H	3.9	1.3	6.0	14.9	45.0	6050.0	1.0	26.0	3.0	1.0	0.0	69.0	
		9	H	3.7	1.3	6.0	15.2	46.0	6000.0	3.0	29.0	0.0	0.0	0.0	68.0	
		10	H	4.0	1.1	4.0	14.5	44.0	5800.0	2.0	29.0	0.0	0.0	0.0	69.0	
	PROMEDIO				3.8	1.1	7.3	15.1	45.6	6070.0	1.2	27.1	0.8	0.3	0.0	70.6
	1000 mg/kg	11	M	3.4	1.0	6.0	15.5	47.0	6200.0	0.0	25.0	1.0	0.0	0.0	74.0	
		12	M	4.0	1.0	4.0	15.5	47.0	6100.0	2.0	20.0	1.0	1.0	0.0	76.0	
		13	M	3.7	1.2	5.0	15.2	46.0	6400.0	0.0	30.0	0.0	0.0	0.0	70.0	
		14	M	4.0	1.2	3.0	13.9	42.0	6400.0	0.0	22.0	0.0	0.0	0.0	78.0	
		15	H	4.2	1.4	7.0	13.9	42.0	6100.0	0.0	14.0	1.0	0.0	0.0	85.0	
		16	H	3.9	1.1	6.0	15.2	46.0	6300.0	0.0	15.0	2.0	0.0	0.0	83.0	
		17	H	4.0	1.3	5.0	15.5	47.0	5800.0	0.0	41.0	0.0	0.0	0.0	59.0	
		18	H	4.0	1.3	7.0	15.2	46.0	6000.0	0.0	20.0	1.0	0.0	0.0	79.0	
		19	H	3.5	1.3	5.0	17.5	53.0	5600.0	0.0	32.0	1.0	0.0	0.0	67.0	
		20	H	4.0	1.3	9.0	14.5	44.0	6300.0	0.0	28.0	0.0	2.0	0.0	70.0	
		PROMEDIO				3.9	1.2	5.7	15.2	46.0	6120.0	0.2	24.7	0.7	0.3	0.0
	2000 mg/kg	21	M	3.7	1.1	5.0	15.5	47.0	6000.0	0.0	55.0	1.0	2.0	0.0	42.0	
		22	M	3.7	1.3	11.0	15.8	48.0	6200.0	1.0	23.0	3.0	0.0	0.0	73.0	
		23	M	3.7	1.4	6.0	15.2	46.0	6050.0	1.0	34.0	1.0	0.0	0.0	64.0	
		24	M	3.7	1.0	5.0	15.2	46.0	5700.0	1.0	19.0	1.0	0.0	0.0	80.0	
		25	H	3.8	1.6	5.0	14.2	43.0	6800.0	0.0	52.0	0.0	0.0	0.0	48.0	
		26	H	3.9	1.1	5.0	15.5	47.0	5950.0	1.0	25.0	0.0	1.0	0.0	73.0	
		27	H	3.6	1.4	10.0	15.8	48.0	6100.0	0.0	25.0	2.0	0.0	0.0	73.0	
		28	H	3.5	1.3	3.0	13.9	42.0	5800.0	0.0	34.0	2.0	0.0	0.0	64.0	
		29	H	3.5	1.3	4.0	13.2	40.0	5300.0	0.0	32.0	0.0	0.0	0.0	68.0	
30		H	3.8	1.3	6.0	14.9	45.0	6100.0	2.0	30.0	1.0	1.0	0.0	66.0		
PROMEDIO				3.7	1.3	6.0	14.9	45.2	6000.0	0.6	32.9	1.1	0.4	0.0	65.1	
CONTROL	51	M	3.0	1.3	4.0	15.0	46.0	7600.0	2.0	22.0	3.0	1.0	0.0	72.0		
	52	M	3.8	0.9	9.0	16.9	50.7	7300.0	1.0	25.0	2.0	1.0	0.0	71.0		
	53	M	2.8	1.0	3.0	14.8	44.0	5900.0	1.0	34.0	3.0	1.0	0.0	61.0		
	54	M	3.2	1.1	11.0	16.0	49.0	6800.0	2.0	19.0	3.0	1.0	0.0	75.0		
	55	M	3.0	1.3	9.0	21.0	65.0	6900.0	0.0	43.0	2.0	0.0	0.0	55.0		
	56	M	2.7	0.8	7.0	14.5	43.6	8300.0	0.0	40.0	3.0	2.0	0.0	55.0		
	57	H	3.2	1.3	5.0	21.5	64.5	9200.0	0.0	29.0	4.0	0.0	0.0	67.0		
	58	H	3.2	1.4	8.0	15.6	47.0	7800.0	0.0	33.0	2.0	0.0	0.0	65.0		
	59	H	3.3	1.2	12.0	15.0	45.0	8400.0	0.0	33.0	3.0	1.0	0.0	63.0		
	60	H	3.0	1.2	10.0	16.3	49.0	7100.0	1.0	41.0	3.0	1.0	0.0	54.0		
	PROMEDIO				3.1	1.2	7.8	16.7	50.4	7530.0	0.7	31.9	2.8	0.8	0.0	63.8

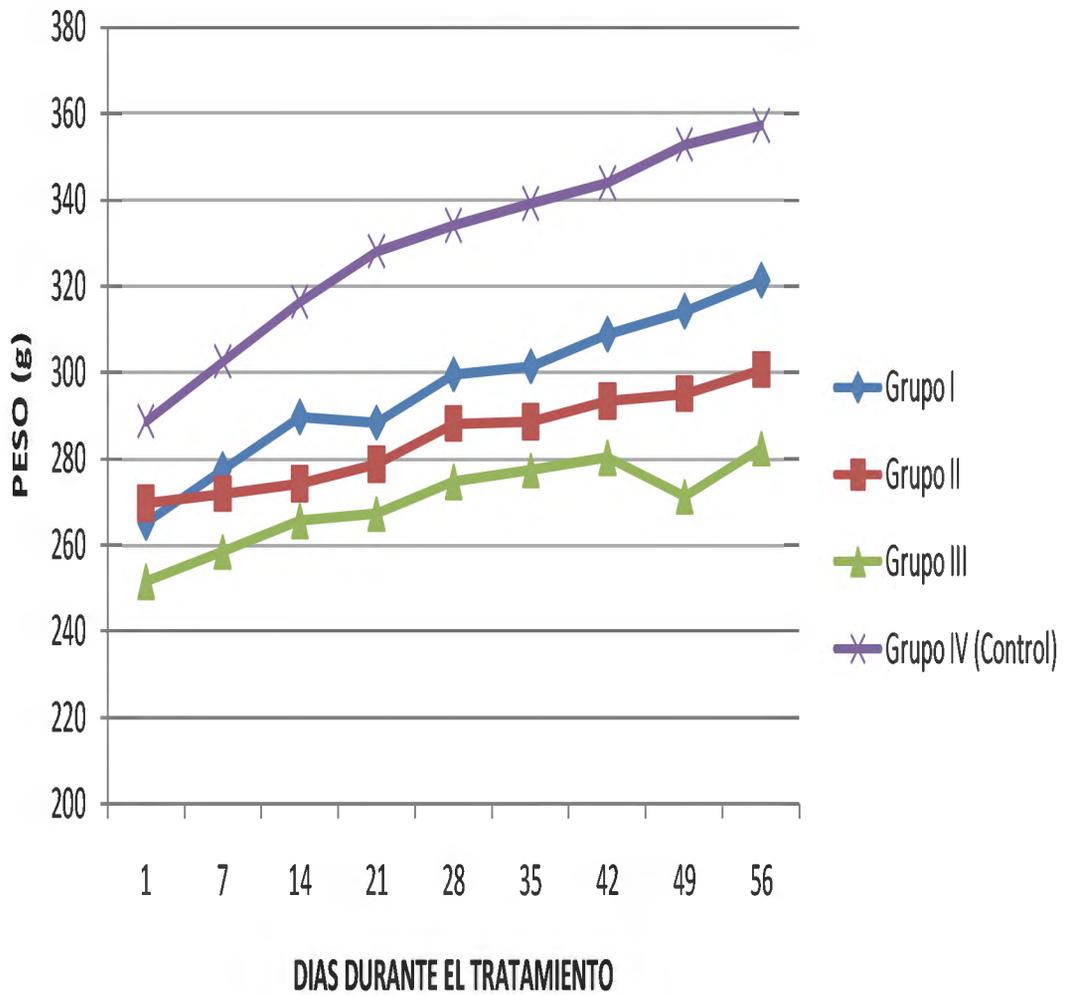
ANEXO 3. RESULTADOS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS FINALES (90 DÍAS TRATAMIENTO)

		BIOQUÍMICOS						HEMATOLÓGICOS						
		Albumina	Creatinina	TGP	Hb	Hto	Leucocitos	Abastondos	Segmentados	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	
		Nº Rata	Final	Final	Final	Final	Final	Final	Final	Final	Final	Final	Final	
CONCENTRADO PROTEICO DE POTA	500 mg/kg	1	3.2	1.3	9.0	14.0	42.0	6500.0	1.0	74.0	1.0	1.0	0.0	23.0
		2	3.7	1.3	12.0	14.2	43.0	7800.0	1.0	24.0	0.0	0.0	0.0	75.0
		3	3.0	1.5	12.0	14.2	43.0	8750.0	2.0	23.0	1.0	0.0	0.0	74.0
		4	3.5	1.2	11.0	13.2	40.0	8900.0	1.0	34.0	0.0	0.0	0.0	65.0
		5	3.7	1.2	13.0	13.2	40.0	8700.0	1.0	32.0	1.0	0.0	0.0	66.0
		6	4.0	1.3	8.5	14.5	44.0	7400.0	5.0	22.0	7.0	0.0	0.0	66.0
		Promedio	3.5	1.3	10.9	13.9	42.0	8008.3	1.8	34.8	1.7	0.2	0.0	61.5
		D. estándar	0.4	0.1	1.8	0.8	1.7	950.0	1.6	19.8	2.7	0.4	0.0	19.4
	1000 mg/kg	1	3.6	1.5	17.0	15.8	48.0	7950.0	0.0	17.0	2.0	3.0	0.0	81.0
		2	3.9	1.2	6.0	15.8	48.0	7950.0	1.0	22.0	4.0	0.0	0.0	73.0
		3	3.9	1.1	17.0	15.5	47.0	8200.0	1.0	31.0	2.0	0.0	0.0	66.0
		4	4.0	1.5	11.0	15.2	46.0	7800.0	2.0	35.0	0.0	0.0	0.0	63.0
		5	4.5	1.4	13.0	14.5	44.0	8700.0	0.0	23.0	2.0	0.0	0.0	77.0
		6	4.0	1.3	12.0	16.2	49.0	8900.0	0.0	39.0	0.0	0.0	0.0	61.0
		7	3.9	1.1	11.0	15.5	47.0	7950.0	0.0	40.0	0.0	0.0	0.0	50.0
		Promedio	4.0	1.3	12.4	15.5	47.0	8207.1	0.6	29.6	1.4	0.4	0.0	67.3
	D. estándar	0.3	0.2	3.8	0.5	1.6	425.7	0.8	9.0	1.5	0.0	0.0	10.6	
	2000 mg/kg	1	3.8	1.3	13.0	14.9	45.0	7750.0	1.0	32.0	1.0	0.0	0.0	66.0
		2	3.8	1.2	8.5	14.5	44.0	7100.0	0.0	68.0	3.0	0.0	0.0	29.0
		3	3.4	1.7	15.0	15.5	47.0	7500.0	1.0	17.0	2.0	0.0	0.0	80.0
		4	3.9	1.3	10.0	14.2	43.0	7650.0	0.0	22.0	0.0	0.0	0.0	78.0
		5	3.4	1.3	13.0	16.2	49.0	8500.0	2.0	33.0	1.0	1.0	0.0	63.0
		6	3.9	1.0	12.0	15.0	45.0	6450.0	3.0	69.0	1.0	2.0	0.0	25.0
		7	3.9	1.1	15.0	14.2	43.0	9900.0	2.0	42.0	1.0	0.0	0.0	55.0
Promedio		3.7	1.3	12.4	14.9	45.1	7835.7	1.3	40.4	1.3	0.4	0.0	56.6	
D. estándar	0.2	0.2	2.4	0.7	2.2	1104.4	1.1	20.8	1.0	0.8	0.0	22.0		
CONTROL	1	3.5	0.9	11.0	16.5	50.0	6600.0	4.0	32.0	3.0	0.0	0.0	61.0	
	2	3.4	0.9	11.0	15.5	47.0	8800.0	1.0	26.0	2.0	0.0	0.0	71.0	
	3	3.9	1.3	9.4	15.8	48.0	10000.0	0.0	27.0	1.0	0.0	0.0	72.0	
	4	3.8	1.2	8.1	15.8	48.0	6700.0	2.0	17.0	0.0	0.0	0.0	81.0	
	5	4.0	1.5	12.0	15.8	48.0	8300.0	3.0	21.0	6.0	0.0	0.0	70.0	
	6	4.0	1.3	10.0	14.2	43.0	6550.0	0.0	33.0	2.0	0.0	0.0	65.0	
	Promedio	3.8	1.2	10.3	15.6	47.3	7825.0	1.7	26.0	2.3	0.0	0.0	70.0	
D. estándar	0.3	0.2	1.4	0.8	2.3	1435.2	1.6	6.2	2.1	0.0	0.0	6.8		

ANEXO 4. INCREMENTO DE PESO CORPORAL

CONCENTRADO PROTEICO DE POTA	500 mg/kg (0.0025)	Nª Rata	Trat	1º día	Ultimo día	Wf-Wo (%)
		1	T1	300.6	370.3	23.2%
		2	T1	296.2	394.0	33.0%
		3	T1	276.5	339.1	22.6%
		4	T1	302.8	388.6	28.3%
		5	T1	254.9	322.4	26.5%
		6	T1	274.5	363.4	32.4%
		7	T1	214.2	248.7	16.1%
		8	T1	233.9	263.7	12.7%
		PROMEDIO		269.2	336.3	24.9%
Desv estándar		32.5	54.9	7.2%		
1000 mg/gk (0.005)	1	T2	307.4	367.2	19.5%	
	2	T2	294.0	373.1	26.9%	
	3	T2	290.2	355.7	22.6%	
	4	T2	283.4	369.3	30.3%	
	5	T2	252.2	276.4	9.6%	
	6	T2	249.9	268.8	7.6%	
	7	T2	223.2	241.4	8.2%	
	8	T2	237.0	276.2	16.5%	
	PROMEDIO		267.2	316.0	18.3%	
	Desv estándar		30.5	55.1	8.7%	
2000 mg/kg (0.01)	1	T3	285.7	334.3	17.0%	
	2	T3	261.0	352.3	35.0%	
	3	T3	299.7	336.1	12.1%	
	4	T3	230.7	243.6	5.6%	
	5	T3	209.0	239.2	14.4%	
	6	T3	244.3	283.6	16.1%	
	7	T3	224.6	258.1	14.9%	
	8	T3	216.1	244.5	13.1%	
	PROMEDIO		246.4	286.5	16.3%	
	Desv estándar		33.0	47.4	8.4%	
CONTROL	1	T4	302.9	370.6	22.4%	
	2	T4	294.8	347.9	18.0%	
	3	T4	342.8	435.0	26.9%	
	4	T4	305.0	366.6	20.2%	
	5	T4	315.4	444.0	40.8%	
	6	T4	316.3	445.0	40.7%	
	7	T4	239.9	271.1	13.0%	
	8	T4	247.3	278.6	12.7%	
	PROMEDIO		295.6	369.9	25.1%	
	Desv estándar		35.1	69.7	11%	

ANEXO 5. VARIACION DEL PESO CORPORAL (g) DE LAS RATAS



ANEXO 6. FOTOS DE EXTRACCIÓN DE LA SANGRE DE LAS RATAS PARA LOS ANÁLISIS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS



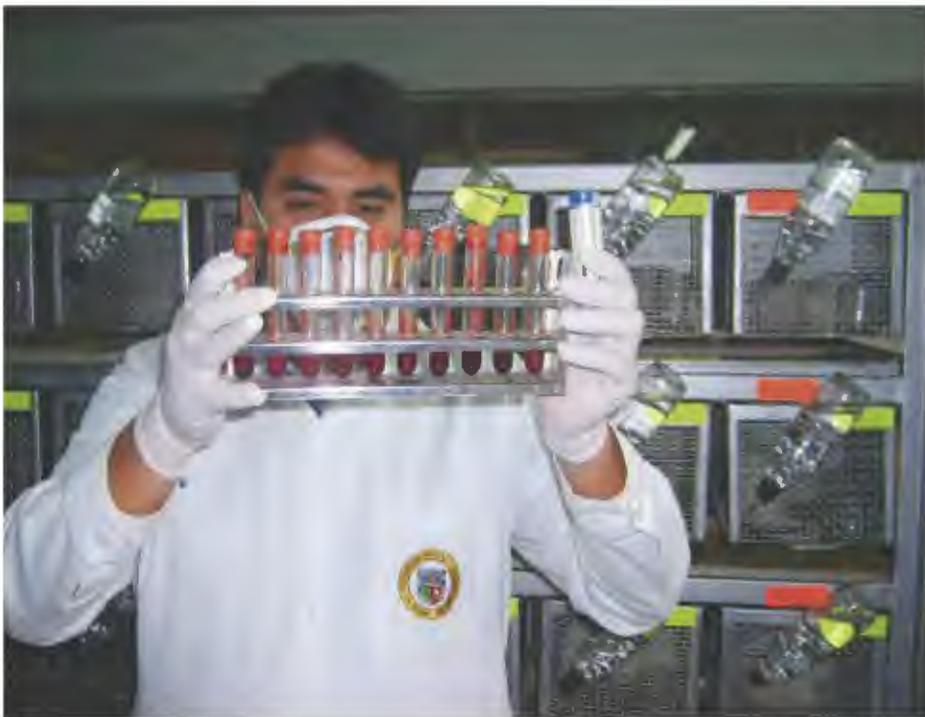
Fotografía del proceso de adormecimiento de las ratas con éter.



Fotografía de la Extracción de muestra de sangre del seno venoso orbital. El animal se recupera rápidamente del adormecimiento.



Fotografía de las cánulas con heparina (evita la coagulación) conteniendo la sangre de uno de los grupos tratados (muestra de diez ratas).



Fotografía del investigador verificando que ninguna muestra se haya coagulado y la cantidad adecuada de muestra de sangre.

ANEXO 7

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL INCREMENTO DE PESO

A) Análisis de Varianza del Incremento de Peso

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	460.841809	153.613936	1.90	2.95	n.s.
Error Experimental	28	2264.573662	80.877631			
Total	31	2725.415472				

C.V.%: 23.6%

 $\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey del Incremento de Peso

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T1	24.364	A
T4	24.324	A
T2	17.635	A
T3	16.041	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Leyenda:

T1 (Grupo I = 500mg/Kg)**T2 (Grupo II = 1000mg/Kg)****T3 (Grupo III = 2000mg/Kg)****T4 (Grupo IV = Control)**

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0193

Critical value = 2.48

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-11.126	0.040	11.206	(-----*-----)
T2	-17.854	-6.689	4.477	(-----*-----)
T3	-19.448	-8.282	2.883	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-16.0 -8.0 0.0 8.0

ANEXO 8

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA VARIACION SEMANAL DEL PESO CORPORAL DE LAS RATAS

A) Peso inicial (día 1)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso inicial (primer día)

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	6620	2207	2.05	2.88	n.s.
Error Experimental	35	37611	1075			
Total	38	44231				

C.V.%: 12.22%

 $\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Peso inicial

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	288.63	A
T2	269.70	A
T1	265.18	A
T3	251.62	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Prueba Dunnett para el Peso inicial:

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-60.35	-23.45	13.44	+-----+-----+-----+-----+ (-----*-----)
T2	-55.83	-18.93	17.96	(-----*-----)
T3	-73.91	-37.01	-0.12	(-----*-----)
				+-----+-----+-----+-----+
				-75 -50 -25 0

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

B) Peso Semana 1 (día 7)**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 7**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	9433	3144	2.17	2.88	n.s.
Error Experimental	35	50794	1451			
Total	38	60228				

C.V.%: 13.75%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para peso semana 1**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	302.43	A
T1	277.39	A
T2	271.94	A
T3	258.68	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-67.91	-25.04	17.84	(-----*-----)
T2	-73.37	-30.49	12.38	(-----*-----)
T3	-86.62	-43.75	-0.87	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
-60 -30 0 30

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

C) Peso Semana 2 (día 14)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	13850	4617	2.24	2.88	n.s.
Error Experimental	35	72080	2059			
Total	38	85930				

C.V.%: 15.88%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	316.22	A
T1	289.60	A
T2	274.17	A
T3	265.74	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-77.70	-26.62	24.45	(-----+-----+-----+-----+)
T2	-93.13	-42.05	9.02	(-----+-----+-----+-----+)
T3	-101.56	-50.48	0.59	(-----+-----+-----+-----+)

-----+-----+-----+-----+
-70 -35 0 35

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg), T2 (1000mg/Kg) y T3 (2000mg/Kg)”.

D) Peso Semana 3 (día 21)**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	19315	6438	2.54	2.88	n.s.
Error Experimental	35	88700	2534			
Total	38	108014				

C.V.%: 17.38%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	327.90	A
T1	288.42	A
T2	278.72	A
T3	267.43	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-96.14	-39.48	17.18	(-----*-----)
T2	-105.84	-49.18	7.48	(-----*-----)
T3	-117.13	-60.47	-3.81	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-105 -70 -35 0

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

E) Peso Semana 4 (día 28)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	17992	5997	2.20	2.88	n.s.
Error Experimental	35	95561	2730			
Total	38	113553				

C.V.%: 17.52%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	333.86	A
T1	299.57	A
T2	288.18	A
T3	274.69	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-93.09	-34.29	24.52	(-----+-----+-----+-----+)
T2	-104.48	-45.68	13.13	(-----*-----)
T3	-117.97	-59.17	-0.36	(-----*-----)
				(-----+-----+-----+-----+)
				-80 -40 0 40

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

F) Peso Semana 5 (día 35)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	20014	6671	2.22	2.88	n.s.
Error Experimental	35	105068	3002			
Total	38	125082				

C.V.%: 18.23%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	338.90	A
T1	301.33	A
T2	288.53	A
T3	277.47	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-99.23	-37.57	24.09	(-----*-----)
T2	-112.03	-50.37	11.29	(-----*-----)
T3	-123.09	-61.43	0.23	(-----*-----)

-+-----+-----+-----+-----
-120 -80 -40 0

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg), T2 (1000mg/Kg) y T3 (2000mg/Kg)”.

G) Peso Semana 6 (día 42)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	21103	7034	2.21	2.88	n.s.
Error Experimental	35	111502	3186			
Total	38	132605				

C.V.%: 18.47%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	343.70	A
T1	308.68	A
T2	293.30	A
T3	280.24	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-98.54	-35.02	28.50	(-----*-----)
T2	-113.92	-50.40	13.12	(-----*-----)
T3	-126.98	-63.46	0.06	(-----*-----)

-120 -80 -40 0

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg), T2 (1000mg/Kg) y T3 (2000mg/Kg)”.

H) Peso Semana 7 (día 49)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	33323	11108	3.29	2.88	*
Error Experimental	35	118014	3372			
Total	38	151337				

C.V. %: 18.91%

$\alpha = 5\%$

* Diferencia significativa

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	352.59	A
T1	313.97	A
T2	295.04	A
T3	271.36	B

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-103.97	-38.62	26.73	(-----+-----+-----+-----+)
T2	-122.90	-57.55	7.80	(-----+-----+-----+-----+)
T3	-146.58	-81.23	-15.88	(-----+-----+-----+-----+)

-100 -50 0 50

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

I) Peso Semana 8 (día 56)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para el peso del día 14

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	28850	9617	2.71	2.88	n.s.
Error Experimental	35	124386	3554			
Total	38	153236				

C.V. %: 18.97%

$\alpha = 5\%$

* Diferencia significativa

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	357.04	A
T1	321.18	A
T2	300.55	A
T3	282.61	B

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0195

Critical value = 2.45

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-102.96	-35.86	31.23	(-----+-----+-----+-----+)
T2	-123.59	-56.49	10.60	(-----+-----+-----+-----+)
T3	-141.53	-74.43	-7.34	(-----+-----+-----+-----+)

-----+-----+-----+-----+
-100 -50 0 50

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg) y T2 (1000mg/Kg), pero si existe diferencia significativa con el tratamiento T3 (2000mg/Kg)”.

ANEXO 9

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS INDICADORES BIOQUÍMICOS

A) Albúmina

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Albúmina

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	0.67437729	0.22479243	2.83	3.05	n.s.
Error Experimental	22	1.75023810	0.07955628			
Total	25	2.42461538				

C.V.%: 7.51%

 $\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Albúmina

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey	
T2	3.9714	A	
T4	3.7667	A	B
T3	3.7286	A	B
T1	3.5167		B

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Prueba Dunnett para la Albúmina:

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.05

Individual error rate = 0.0197

Critical value = 2.52

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-0.6597	-0.2500	0.1597	(-----*-----)
T2	-0.1900	0.2048	0.5995	(-----*-----)
T3	-0.4329	-0.0381	0.3567	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
-0.35 0.00 0.35 0.70

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T1 (500mg/Kg), T2 (1000mg/Kg) y T3 (2000mg/Kg)”.

B) Creatinina**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Creatinina**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	0.05622711	0.01874237	0.50	3.05	n.s.
Error Experimental	22	0.82261905	0.03739177			
Total	25	0.87884615				

C.V.%: 15.28%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para la Creatinina.**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T2	1.3000	A
T1	1.3000	A
T3	1.2714	A
T4	1.1833	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

C) Transaminasa (TGP)**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Transaminasa (TGP)**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	22.5086996	7.5028999	1.11	3.05	n.s.
Error Experimental	22	148.8747619	6.7670346			
Total	25	171.3834615				

C.V.%: 22.51%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Transaminasa (TGP)**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T2	12.429	A
T3	12.357	A
T1	10.917	A
T4	10.250	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Legenda:**T1 (Grupo I = 500mg/Kg)****T2 (Grupo II = 1000mg/Kg)****T3 (Grupo III = 2000mg/Kg)****T4 (Grupo IV = Control)**

ANEXO 10

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS INDICADORES HEMATOLÓGICOS

A) Hemoglobina

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Hemoglobina

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	11.42699634	3.80899878	8.93	3.05 (5%) 4.82 (1%)	* **
Error Experimental	22	9.38261905	0.42648268			
Total	25	20.80961538				

C.V.%: 4.35%

$\alpha = 5\%$ o 1%

* ($\alpha = 0.05$) diferencia significativa

** ($\alpha = 0.01$) hay diferencia altamente significativa

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Hemoglobina (($\alpha = 0.01$))

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey	
T4	15.6000	A	
T2	15.5000	A	
T3	14.9286	A	
T1	13.8833		B

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Prueba Dunnett para la Hemoglobina:

Dunnett's comparisons with a control

Family error rate = 0.01

Individual error rate = 0.0037

Critical value = 3.24

Control = level (T4) of C1

Intervals for treatment mean minus control mean

Level	Lower	Center	Upper	
T1	-2.9399	-1.7167	-0.4935	(-----*-----)
T2	-1.2787	-0.1000	1.0787	(-----*-----)
T3	-1.8501	-0.6714	0.5073	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
-2.4 -1.2 0.0 1.2

“No hay diferencia significativa entre el Tratamiento T4 (Control) con respecto a los tratamientos T2 (1000mg/Kg) y T3 (2000mg/Kg), pero si existe diferencia altamente significativa con el tratamiento T1 (500mg/Kg)”.

C) Leucocito

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Leucocitos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	654606.23	218202.08	0.21	3.05	n.s.
Error Experimental	22	23216547.62	1055297.62			
Total	25	23871153.85				

C.V.%: 12.88%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Leucocitos

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T2	8207.1	A
T1	8008.3	A
T3	7835.7	A
T4	7825.0	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

D) Abastoados (Neutrófilos jóvenes)

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Abastoados

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	6.22893773	2.07631258	1.22	3.05	n.s.
Error Experimental	22	37.30952381	1.69588745			
Total	25	43.53846154				

C.V.%: 19.58%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Leucocitos

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T1	1.8333	A
T4	1.6667	A
T3	1.2857	A
T2	0.5714	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

E) Segmentados (Neutrófilos maduros)**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Segmentados (Neutrófilos)**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	782.391941	260.797314	1.10	3.05	n.s.
Error Experimental	22	5238.261905	238.102814			
Total	25	6020.653846				

C.V.%: 26.92%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Neutrofilos**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T3	40.429	A
T1	34.833	A
T2	29.571	A
T4	26.000	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

F) Linfocitos**Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Linfocitos**

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	712.895604	237.631868	0.92	3.05	n.s.
Error Experimental	22	5676.642857	258.029221			
Total	25	6389.538462				

C.V.%: 25.22%

 $\alpha = 5\%$ **Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para Linfocitos**

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T4	40.429	A
T2	34.833	A
T1	29.571	A
T3	26.000	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Leyenda:**T1 (Grupo I = 500mg/Kg)****T2 (Grupo II = 1000mg/Kg)****T3 (Grupo III = 2000mg/Kg)****T4 (Grupo IV = Control)**

ANEXO 11

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL PESO DE LOS ÓRGANOS

A) Pulmones

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Pulmones

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	0.930	0.310	1.73	3.24	n.s.
Error Experimental	16	2.862	0.179			
Total	19	3.791				

C.V.%: 28.99%

 $\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para los Pulmones

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T1	1.3562	A
T3	1.2103	A
T4	0.9820	A
T2	0.7916	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

B) Hígado

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Hígado

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	0.160	0.053	0.35	3.24	n.s.
Error Experimental	16	2.459	0.154			
Total	19	2.619				

C.V.%: 11.87%

 $\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para el Hígado

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T2	3.4334	A
T1	3.3155	A
T4	3.2934	A
T3	3.1813	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

C) Riñones

Cuadro ANVA en el Análisis Estadístico para Riñones

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	F Tabular	Significancia
Tratamientos	3	0.0380	0.0127	0.88	3.24	n.s.
Error Experimental	16	0.2308	0.0144			
Total	19	0.2688				

C.V.%: 14.88%

$\alpha = 5\%$

Comparación de las medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey para los riñones

Tratamiento	Medias	Agrupación de Tukey
T2	0.8378	A
T1	0.8331	A
T3	0.8229	A
T4	0.7314	A

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Leyenda:

T1 (Grupo I = 500mg/Kg)

T2 (Grupo II = 1000mg/Kg)

T3 (Grupo III = 2000mg/Kg)

T4 (Grupo IV = Control)

ANEXO 12

CONCLUSIONES DEL INFORME HISTOPATOLOGICO DEL MEDICO DANIEL CARRERA

Conclusiones

Se efectuó el estudio de los cortes histológicos de órganos:

- Hígados
- Riñón
- Pulmón

Los órganos fueron fijados en formol y procesados con técnicas convencionales para cortes histológicos y coloración con hematoxilina y eosina.

El estudio de hígado y riñón no muestra ningún tipo de alteración histológica estructural en relación a toxicidad por la ingesta alimentaria.

El estudio de pulmón muestra lesión alveolar intersticial difusa, daño bronquial, y cuadros neumónicos y bronco-neumónicos en la mayoría de los casos estudiados, esto no guarda relación de toxicidad con la ingesta alimentaria y estaría en relación al hábitat de las ratas, la patología respiratoria sería por inhalación viral y compromiso bacteriano posterior y a posibles neumonías por aspiración durante la alimentación de estas.

El cuadro congestivo encontrado en los diferentes órganos está en relación a la patología intersticial y parenquimal del pulmón y al mecanismo con el que se dio muerte a las ratas para su estudio.



Dr. Daniel Carrera Palao
Médico Cirujano
Anátomo Patólogo
CMP. 22697 RN°. 12017

ANEXO 13**COMPOSICIÓN NUTRICIONAL PARA ALIMENTO DE RATAS**

Nutrientes	Alimento para Ratas
Carbohidratos (g /100 g de muestra original)	60 - 62
Energía Total (Kcal / 100 g de muestra original)	350 - 360
Cenizas Totales (g /100 g de muestra original)	4 - 5
Grasa Cruda (g /100 g de muestra original)	3.0 - 3.5
Humedad (g /100 g de muestra original)	10 -11
Proteína Cruda (g /100 g de muestra original)	20 - 22
Fibra Cruda (g /100 g de muestra original)	2.5 – 3.0

PROGRAMA DE INVESTIGACION Y PROYECCION SOCIAL EN ALIMENTOS. UNALM