

Estudio de toxicidad del Cieno de Acetileno administrado oralmente a dosis repetida (28 días) en ratas Wistar.

Carmen SÁNCHEZ ÁLVAREZ, Miguel A. HERNÁNDEZ BARRETO *,
Yisel GONZÁLEZ MADARIAGA, María BOFFILL CÁRDENAS,
Delina Romero LOYNAZ DEL CASTILLO, Antonio MARTÍNEZ DEL PINO & Elio BRITO ALBERTO

*Unidad de Toxicología Experimental.
Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara.
Carretera de Circunvalación y Acueducto. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.*

RESUMEN. El trabajo se desarrolló en el Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, con el objetivo de valorar los posibles efectos tóxicos del Cieno de Acetileno administrado por vía oral a dosis repetida durante 28 días. Se utilizaron 80 ratas Wistar de ambos sexos, con edades y pesos similares. Tanto machos como hembras se dividieron en 4 grupos experimentales: Tratamiento, Control Vehículo, Control, y Centinela. Al primer grupo se le suministró durante 28 días 1 g/Kg de peso de Cieno de Acetileno suspendido en aceite de girasol; al segundo grupo se le administró aceite de girasol; el tercer grupo recibió agua destilada. Estos tres grupos fueron sacrificados al día 29° de iniciado el experimento. El cuarto grupo recibió el mismo tratamiento que el primero, pero se mantuvo vivo 4 semanas más. Los animales fueron pesados semanalmente y el día del sacrificio. A todos los animales se les realizó una evaluación de indicadores hematológicos y de bioquímica clínica y se determinó su ganancia media diaria de peso. Se realizaron asimismo, evaluaciones anatomopatológicas macro y microscópicas. La ganancia media diaria mantuvo diferencias estadísticamente significativas solo para el grupo Vehículo dentro de los machos. Los valores hematológicos fueron muy similares en todos los grupos, con algunas diferencias para los Leucocitos Totales (hembras y machos centinela) con más del 95% de los animales dentro de los rangos fisiológicos. En la mayoría de los indicadores de bioquímica clínica no se encontraron diferencias en los distintos grupos dentro del sexo. Solamente las aminotransferasas estuvieron por debajo en todos los grupos. Los estudios anatómicos e histopatológicos no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Se concluye que el Cieno de Acetileno administrado a dosis repetidas de 1000 mg/Kg durante 28 días, no produjo efectos tóxicos en los animales experimentales.

SUMMARY. "Toxicity of Carbide Waste administered orally to repeated dose during 28 days to Wistar rats". The work was developed in the Superior Institute of Medical Sciences of Villa Clara, with the aim to evaluate the possible toxic effects of Carbide Waste administered orally to repeated dose during 28 days. Eighty Wistar rats of both sexes with similar ages and weight were used. Both, males and females, were divided in 4 experimental groups: Treatment, Control Oil, Control, and Sentry. The first group received 1 g/Kg of Waste suspended in sunflower oil during 28 days; the second group received sunflower oil; the third group received distilled water. These three groups were killed on day 29 of the experiment. The fourth group received the same treatment that the first one, but they stayed alive for other 4 weeks. The animals were weighed weekly and the day of the sacrifice. Haematology and of clinical biochemistry evaluations were carried out to all the animals and their daily half gain of weight ($g^{1/2d}$) was determined; anatomopathological evaluations were also carried out. Only the males belonging to the Control Oil group maintained $g^{1/2d}$ values statistically significant. The haematological values were very similar in all the groups, with some differences for Total Leukocytes (females and male sentry) but with 95% of the animals within physiologic ranges. In most of the indicators of clinical biochemistry they were not differences in the different groups within the sex. Only the aminotransferases were low in all the groups. The anatomopathological studies didn't show significant results among the groups. It can be concluded that Carbide Waste administered to repeated dose during 28 days didn't produce toxic effects in the experimental animals.

INTRODUCCIÓN

El Cieno de Acetileno, también conocido como Cenizas de Carburo, es un residual industrial que desde hace más de 10 años se ha venido

utilizando en diversas formas como desinfectante^{1,2}, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades de los animales³⁻⁵, como control de vectores de enfermedades de los animales y el

PALABRAS CLAVE: Cenizas de Carburo, Cieno de Acetileno, Ratas, Toxicidad.

KEY WORDS: Acetylen Mud, Carbide Waste, Rats, Toxicity.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: miguelhb@agronet.uclv.edu.cu

hombre⁶⁻⁷. Por su constitución química (magnesio, hierro, cobre, zinc, sodio y altas concentraciones de carbonatos y bicarbonatos)⁸, también se ha utilizado como suplemento mineral de animales domésticos y de laboratorio y en la regulación del equilibrio ácido-básico de rumiantes⁹⁻¹³.

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos con el uso del residual, se han realizado diversas investigaciones recientemente para la evaluación de posibles efectos tóxicos del producto, encontrándose que la DL50 en ratones lo sitúa como relativamente inocuo¹⁴ (por encima de 20 000 mg/Kg), de acuerdo a la clasificación de Hodge y Sterner¹⁵, no afecta el cuadro hematológico en ratones¹⁶ ni su fertilidad¹⁷, no encontrándose tampoco niveles tóxicos de plomo en diversos tejidos en rumiantes y aves que lo ingirieron por períodos prolongados¹⁸. Recientemente, nuestro colectivo llevó a cabo un estudio de toxicidad a dosis única en ratas con resultados similares¹⁹.

Teniendo en cuenta estos antecedentes hemos procurado con el siguiente trabajo, contribuir a la profundización de los estudios toxicológicos de dicho residual, mediante el estudio de toxicidad a dosis repetida de 28 días en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en la Unidad Toxicológica Experimental (UTEX) del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Se utilizaron 80 ratas Wistar de categoría sanitaria convencional provenientes del Centro Nacional Productor de Animales de Laboratorio (CENPALAB) (40 hembras y 40 machos) de 6-8 semanas de edad y 160-180 g de peso corporal, sometidos previamente a una cuarentena de 5 días.

Los animales fueron separados de forma aleatoria por cada sexo en 4 grupos experimentales a saber: Grupo Tratamiento (10 hembras y 10 machos), que recibió Cieno de Acetileno suspendido en Aceite de Girasol a dosis de 1 g/Kg de peso corporal diariamente y durante 28 días; Grupo Vehículo (10 hembras y 10 machos), que recibió solamente aceite de Girasol (1 ml); Grupo Control (10 hembras y 10 machos), que recibió 1 ml de Agua Destilada. Estos tres grupos fueron sacrificados al día 29 de iniciado el experimento. El cuarto grupo (10 hembras y 10 machos), recibió el mismo tratamiento que el primero (Cieno) pero se mantuvo vivo 4 semanas más, suspendiendo el suministro de Cieno durante este período y sirviendo como Centinela,

con vistas a determinar la posible reversibilidad de los efectos tóxicos o la ocurrencia de acción retardada. La identificación se realizó por marcaje de oreja. Durante el período experimental, todos los animales se mantuvieron en jaulas individuales previamente identificadas con el número correspondiente, especie, línea, sexo y tipo de tratamiento y fueron pesados en una balanza analítica digital tipo Sartorius al momento de iniciado el experimento y luego semanalmente y en el momento del sacrificio. Durante todo el experimento, la totalidad de los animales se mantuvo establemente bajo las condiciones de temperatura, humedad ambiental y luminosidad controlada (12 h de luz y 12 de oscuridad) requerida para este tipo de experimento, cumpliéndose además, las especificaciones contempladas en el Código de Ética. El alimento consistió en pienso industrial a razón de 20 g promedio/día/animal y recibieron suministro de agua *ad libitum*. La administración de los tratamientos se realizó mediante cánula intragástrica siempre a la misma hora en la mañana. Durante todo el período experimental, los animales fueron observados al menos 4 veces por día en búsqueda de síntomas clínicos anormales.

Al momento del sacrificio, se extrajo sangre por el método de la aorta abdominal, para determinaciones hematológicas: Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Hto) y Leucocitos Totales (Leuc), así como para bioquímica clínica: Glicemia, Proteínas Totales (PT), Aminotransferasas: Aspartato (AST) y Alanina, (ALT) y Colesterol. Los animales del grupo Centinela también fueron sacrificados y estudiados al final del experimento de la misma forma que el resto de los animales.

Los resultados hematológicos y de bioquímica clínica están expresados de acuerdo a la terminología internacional (g/L= gramos/Litro; L/L= Litro/Litro; Mmol/L= milimol/Litro; U/L= Unidades/Litro). El sacrificio se llevó a cabo mediante narcosis con éter y desangramiento.

Durante la necropsia se observaron todos los órganos, describiéndose las lesiones detectadas, atendiendo a color, forma, tamaño y consistencia de la misma. Los órganos (hígado, corazón, bazo, pulmón, estómago, duodeno, riñón, encéfalo y timo) se pesaron de forma individual, recolectándose muestras que fueron fijadas en solución de formol neutro tamponado al 10% para su posterior inclusión en parafina con vistas a estudios histopatológicos donde se utilizó el método de coloración de Hematoxilina-Eosina.

Los resultados obtenidos fueron procesados

estadísticamente por análisis de varianza de clasificación simple y comparación de las medias mediante prueba de Duncan o por el método de comparación de proporciones, según el caso. Estas valoraciones se realizaron a partir del paquete estadístico computarizado SPSS versión 8.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución ponderal de los animales durante el período experimental se expresa en la Figura 1. Para las hembras, la ganancia media diaria de peso ($g^{1/2d}$) se mantuvo como promedio entre los 2,01 y los 2,41 g, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Por su parte, los machos tuvieron una $g^{1/2d}$ promedio entre 2,85 y 3,59 g, presentando el grupo Vehículo un aumento significativo ($P < 0,05$) en relación al resto de los grupos (Tabla 1) (En todas las tablas se refleja la Media \pm Desviación Estándar).

Es de señalar de todas formas que tanto en hembras como en machos, los animales suplementados con Cieno tuvieron numéricamente mayor $g^{1/2d}$ que los controles y se corresponde con lo reportado por otros autores para animales sanos¹⁹⁻²¹.

Durante todo el período experimental, no se observaron síntomas clínicos adversos en los animales de experimentación.

Los resultados hematológicos se expresan en las Tablas 2 y 3. (Valores Promedios \pm DS y % de animales dentro del Rango Fisiológico).

Grupo Experimental	Ganancia Media Diaria ($g^{1/2d}$) en gramos	
	Hembras	Machos
Cieno	2,41 \pm 0,58	3,03 \pm 0,65 a
Vehículo	2,22 \pm 0,61	3,59 \pm 0,40 b
Centinela	2,01 \pm 0,42	3,00 \pm 0,38 a
Control	2,19 \pm 0,33	2,85 \pm 0,50 a

Tabla 1. Resultados comparativos de la $g^{1/2d}$ en los diferentes grupos experimentales por sexo. Letras no comunes en la misma columna difieren estadísticamente: ($P < 0,05$).

Como puede observarse, en ningún caso existieron diferencias estadísticas en la comparación de las medias para la hemoglobina y el hematocrito y si para los leucocitos que estuvieron significativamente por debajo del resto de los grupos en el caso del centinela (hembras y machos). Es de destacar que en los grupos tratados con cieno, el 100 % de los animales se encontraba dentro de los rangos fisiológicos expresados por diversos autores para la especie y línea¹⁹⁻²³.

Los resultados de bioquímica clínica son reflejados en las Tablas 4 y 5. Como puede observarse, solamente las aminotransferasas mostraron diferencias significativas, tanto en hembras como en machos, con resultados más bajos, fundamentalmente en el grupo Centinela. De forma general este indicador se encuentra como

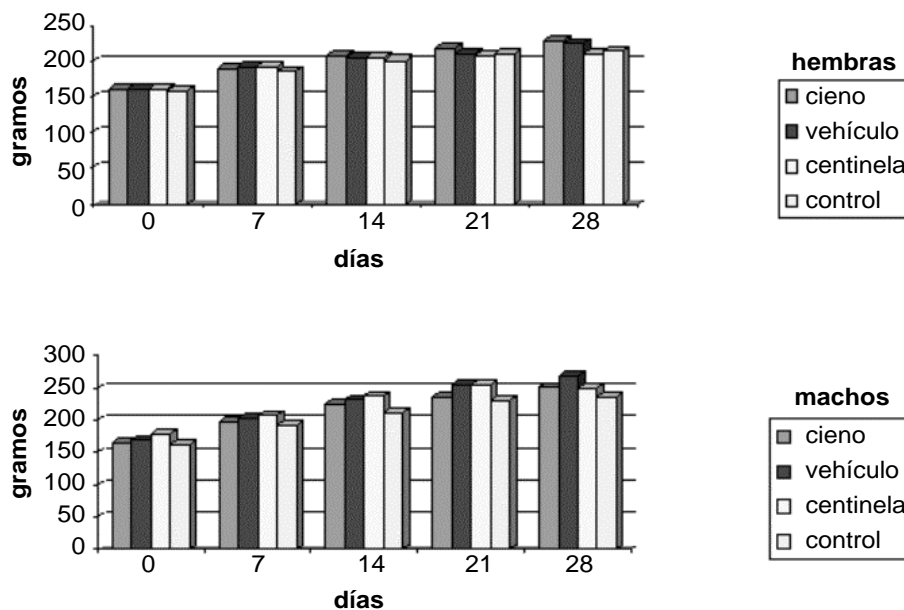


Figura 1. Evolución ponderal del peso corporal de los animales.

	Grupo experimental	Hb (g/L)	Hto(L/L)	Leuc (x10 ⁹)
Media ± DS	Cieno	130,5 ± 7,90	0,42 ± 2,1E-02	6,71 ± 0,56 ab
	Vehículo	125,0 ± 7,70	0,41 ± 2,8E-02	6,61 ± 0,53 a
	Centinela	129,2 ± 4,90	0,42 ± 1,4E-02	5,53 ± 0,43 c
	Control	123,3 ± 11,5	0,40 ± 2,7E-02	7,50 ± 1,20 b
Rango Fisiológico (RF) ⁽²²⁾		115 - 160	0.37 - 0.49	4 - 10.2
% en RF	Cieno	100	100	100
	Vehículo	90	90	100
	Centinela	100	100	100
	Control	70	80	100

Tabla 2. Resultados hematológicos en las Hembras. Letras no comunes en la misma columna difieren estadísticamente: (P < 0,05).

	Grupo experimental	Hb (g/L)	Hto (L/L)	Leuc (x10 ⁹)
Media ± DS	Cieno	133,7 ± 6,04	0,42 ± 1,7E-02	7,41 ± 0,81 a
	Vehículo	1 132,2 ± 11,05	0,42 ± 2,0E-02	7,01 ± 1,04 a
	Centinela	138,0 ± 0,58	0,44 ± 2,3E-02	5,67± 0,67 b
	Control	1 136,2 ± 10,12	0,43 ± 2,5E-02	7,04 ± 0,89 a
Rango Fisiológico (RF) ⁽²²⁾		115 - 160	0.37 - 0.49	4 - 10.2
% en RF	Cieno	100	100	100
	Vehículo	90	100	100
	Centinela	100	100	100
	Control	100	100	100

Tabla 3. Resultados hematológicos en los Machos. Letras no comunes en la misma columna difieren estadísticamente: (P < 0,05).

	Grupo experimental	Glicemia (Mmol/L)	PT (g/L)	ALT, (TGP) (U/L)	AST, (TGO) (U/L)	Colesterol (Mmol/L)
Media ± DS	Cieno	4,21 ± 1,02	69,6 ± 7,9	18,4 ± 3,3 a	39,3 ± 6,8 a	2,12 ± 0,2
	Vehículo	4,65 ± 1,26	68,1 ± 6,9	22,2 ± 11,6 b	38,8 ± 8,8 a	2,23 ± 0,3
	Centinela	ND	67,8 ± 4,1	15,7 ± 3,5 a	25,4 ± 3,3 b	2,02 ± 1,4
	Control	4,55 ± 1,73	68,0 ± 10,9	23,9 ± 4,5 c	45,5 ± 13,9 a	2,27 ± 0,2
Rango Fisiológico (RF) ⁽²²⁾		4,7 - 7,3	63 - 86	17 - 50	39 - 92	1,2 - 2,38
% en RF	Cieno	33 %	70 % a	78 % a	56 % a	100 % a
	Vehículo	40 %	60 % a	70 % a	50 % a	60 % b
	Centinela	ND	90 % b	40 % b	0 % b	90 % ab
	Control	10 %	50 % a	100 % a	60 % a	60 % b

Tabla 4. Resultados de Bioquímica Clínica en las Hembras. Letras no comunes en la misma columna difieren estadísticamente: (P < 0,05). ND: No se determinó.

	Grupo experimental	Glicemia (Mmol/L)	PT (g/L)	ALT, (TGP) (U/L)	AST, (TGO) (U/L)	Colesterol (Mmol/L)
Media ± DS	Cieno	3,89 ± 1,03	66,6 ± 7,2	19,2 ± 3,0 ab	44,1 ± 6,6 a	1,98 ± 0,6
	Vehículo	4,52 ± 1,15	67,9 ± 7,1	22,1 ± 13,5 a	41,3 ± 8,5 a	1,98 ± 0,3
	Centinela	ND	62,0 ± 3,7	14,1 ± 2,8 b	26,7 ± 3,8 b	2,20 ± 1,5
	Control	3,71 ± 1,69	67,7 ± 9,9	22,8 ± 4,1 a	45,9 ± 12,7 a	2,10 ± 0,4
Rango Fisiológico (RF) ⁽²²⁾		4,7 - 7,3	63 - 86	17 - 50	39 - 92	1,2 - 2,38
% en RF	Cieno	10 %	60 %	50 % a	70 % a	100 %
	Vehículo	20 %	60 %	70 % a	60 % a	100 %
	Centinela	ND	50 %	00 % b	10 % b	80 %
	Control	20 %	60 %	100 % a	70 % a	100 %

Tabla 5. Resultados de Bioquímica Clínica en los Machos. Letras no comunes en la misma columna difieren estadísticamente: (P < 0,05). ND: No se determinó.

Órgano	GRUPOS DE HEMBRAS			
	Cieno	Vehículo	Control	Centinela
Hígado	7,48 ± 0,76 a	7,45 ± 0,97 a	7,21 ± 0,64 a	7,82 ± 0,59 b
Encéfalo	1,75 ± 9,7E-02	1,70 ± 0,14	1,67 ± 0,10	1,76 ± 8,43E-02
Bazo	0,68 ± 0,20	0,63 ± 9,49E-02	0,60 ± 1,00E-02	0,68 ± 0,11
Corazón	0,73 ± 6,74E-02	0,71 ± 5,67E-02	0,68 ± 9,72E-02	0,73 ± 8,23E-02
Estómago	2,01 ± 0,23 a	1,76 ± 7,60E-02 b	1,88 ± 0,19 ab	1,67 ± 0,16 b
Riñón	1,39 ± 1,19 a	1,45 ± 0,13 a	1,46 ± 0,11 a	1,57 ± 0,16 b
Pulmón	1,15 ± 0,14 a	1,53 ± 0,58 b	1,12 ± 0,13 a	1,22 ± 0,14 a
Timo	0,40 ± 6,67E-02	0,30 ± 4,71E-02	0,34 ± 3,87E-02	0,40 ± 0,23 a
	GRUPOS DE MACHOS			
Hígado	7,01 ± 0,64 ab	7,76 ± 0,59 c	6,72 ± 0,56 a	7,68 ± 0,55 b
Encéfalo	1,66 ± 8,46E-02	1,71 ± 0,17	1,71 ± 0,17	1,69 ± 0,26
Bazo	0,61 ± 0,12 a	0,75 ± 0,11 b	0,59 ± 0,12 a	0,66 ± 0,11 a
Corazón	0,74 ± 8,43E-02	0,81 ± 5,67E-02	0,72 ± 6,33E-02	0,80 ± 8,17E-02
Estómago	1,81 ± 0,21	1,85 ± 0,18	1,84 ± 0,12	1,96 ± 0,45
Riñón	1,65 ± 9,72E-02 a	1,80 ± 0,11 b	1,69 ± 0,15 ab	1,92 ± 0,12 c
Pulmón	1,13 ± 0,13 ab	1,36 ± 0,18 b	1,08 ± 0,18 a	1,27 ± 0,25 ab
Timo	0,34 ± 3,65E-02 a	0,32 ± 2,98E-02 ab	0,32 ± 2,98E-02 ab	0,25 ± 0,17 ab

Tabla 6. Resultados ponderales de los pesos en gramos de los órganos estudiados. Letras no comunes en la misma fila difieren estadísticamente: (P < 0,05).

promedio en todos los grupos por debajo del límite fisiológico establecido para la especie y línea ²⁰⁻²¹ aunque esto no representa de manera absoluta un criterio diagnóstico.

El peso de los diferentes órganos mostró pocas diferencias estadísticas entre los diferentes grupos dentro del sexo y sus promedios se en-

cuentran dentro de los rangos descritos para la especie y línea ²² (Tabla 6). Es de destacar que en todos los casos, los resultados comparativos entre Cieno y Control fueron estadísticamente similares (P > 0,05).

Al estudio macroscópico se encontraron las siguientes lesiones: en el Grupo de Cieno: 2 le-

siones pulmonares (1 macho y 1 hembra, 1 con absceso encapsulado); en el Grupo Vehículo: 1 lesión pulmonar petequial (hembra); en el Grupo Centinela: 3 lesiones petequiales en pulmón. (2 machos y 1 hembra); en el Grupo Control: 1 lesión petequial (1 macho) en pulmón y 2 gastritis (1 macho y 1 hembra).

Al estudio microscópico, se detectaron en todos los grupos y de manera proporcional, procesos de neumonitis (neumonía Intersticial, entre un 30 y un 40 %).

También se presentaron algunos casos de

megacariocitos en bazo, repartidos igualmente de manera proporcional en todos los grupos de estudio, lo que está descrito en diversos tratados de histología consultados, al menos en mamíferos domésticos ^{24,25}.

Las lesiones observadas en este experimento se confrontarán con los de experiencias futuras.

Se concluye que no existieron evidencias de efectos de toxicidad del Cieno de Acetileno administrado oralmente a dosis repetida de 1000 mg/Kg durante 28 días, prueba de evaluación toxicológica recomendada internacionalmente ²⁶⁻²⁸.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González, N. (1987) *Utilización de diferentes desinfectantes en unidades pecuarias*. Tesis de Doctorado en Ciencias. CNSA. La Habana. Pp 155.
- Pérez S. (1995) *Desinfección de Unidades Pecuarias con Cenizas de Carburo mediante su aplicación con carro Duck*. Forum Provincial de Ciencia y Técnica Villa Clara.
- Brito, E. & M.A. Hernández (1995) *Tratamiento de la Tricofitosis de los terneros mediante la aplicación tópica del Cieno de Acetileno*. IV Taller Nacional del Cieno. MINBAS. Varadero, Matanzas, Cuba. 23-24 Noviembre.
- Brito, E. & M.A. Hernández (1997) *Utilización de un residual industrial, el Cieno de Acetileno en la prevención y/o tratamiento de la Pododermatitis necrótica de los ovinos*. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. Santa Clara. Villa Clara, Cuba 14-16 Mayo. Res. Pág 87.
- Sánchez C., M.A. Hernández, B. Verdecia, I. Rodríguez & E. Brito (1999) *Rev. Medicentro* [Periódico en Línea]. ISSN 1029-3043. 3: 20-23. Disponible en URL: <http://www.capiro.vcl.std.cu/medicentro/v3n299/cie.htm>
- Brito, E., R.A. Martín & M.A. Hernández (1995) *Utilización del Cieno de Acetileno en el control de caracoles hospederos intermediarios de la Fasciolosis hepática*. III Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba. Octubre. Res. Pág. 68.
- Hernández, M.A., E. Brito, R. González, C. Sánchez & S. Estévez (1999) *Efectividad del Cieno de Acetileno (Residual Industrial) en el control de larvas de mosquito en condiciones de campo (Fosas)*. I Simposio Internacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial. Centro de Convenciones Plaza de las Banderas, Varadero, Matanzas, Cuba. 8-10 Septiembre.
- Carta Técnica del Cieno. (1995) IV Taller de Aplicaciones del Cieno. MINBAS. Varadero, Matanzas, Cuba. 23-24 Noviembre.
- Díaz, R.A., M.A. Hernández & E. Brito (1993) *El Cieno de Acetileno como suplemento en la dieta de cerdos en desarrollo*. II Encuentro Nacional del Cieno. Sancti Spiritus, Cuba. 20 Febrero.
- Hernández, M.A., E. Brito & A. Mollineda (1997) *Suplementación mineral y regulación del equilibrio ácido-básico en bovinos mediante la administración oral de un residual industrial: el Cieno de Acetileno. Repercusión en la reproducción*. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Mayo 14-15. Res. Pág. 87-88
- Hernández, M.A., E. Brito, A. Mollineda, S. González, M.E. Sánchez & M. Iglesias (1998) *Rev. Cub. Ciencias Avícolas*. 22: 115-9.
- Brito E., M.A. Hernández & R. Álvarez (2003) *Revista REDVET*. [Periódico en línea]. N° 1. Vol IV. ISSN 1695-7504. Disponible en URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010103.html>
- Hernández, M.A., G. Martínez, C. Sánchez, L. Rodríguez & E. Brito (1997) *Valoraciones toxicológicas preliminares del Cieno de Acetileno suministrado a la dieta de ratones*. VIII Jornada Provincial de Ciencias Veterinarias. Villa Clara, Cuba. 13 Diciembre.
- Hernández, M.A., C. Sánchez, E. Brito, & G. Martínez (1999) *Contribución al estudio toxicológico del Cieno de Acetileno, residual industrial, utilizado en la prevención y/o tratamiento de enfermedades del hombre y los animales*. III Congreso Universitario Internacional de Medicina Natural y Tradicional. ISCM, Villa Clara. Santa Clara, 15-18 Diciembre. Res. Pág. 53-54.
- Hodge HC & J.H. Sterner (1943) *Amer. Indus. Hyg. Ass. Quart.* 10 (4):93

16. Hernández M.A., C. Sánchez, G. Martínez, D. Romero, A. González, L. Rodríguez, E. Brito, & Y. González (2002) *Acta Farm. Bonaerense* **21**: 9-12.
17. Hernández M.A., C. Sánchez, A. González & E. Brito (2002) *Acta Farm. Bonaerense*. **21**: 197-200.
18. Brito E, M.A. Hernández, A. Mollineda & M. Guerra (1972) *Utilización del Cieno de Acetileno en la Prevención de la Salud Animal y la Protección de Viveros Agrícolas*. VII Forum Provincial de Ciencia y Técnica Villa Clara. Dic. 17.
19. Sánchez C., M.A. Hernández, Y. González, I. Rodríguez, M. Boffill, & E. Brito (2003) *Acta Farm. Bonaerense* **22**: 239-42.
20. Sauderson, J.H. & C.E. Phillips (1981) *An Atlas of Laboratory Animal Haematology*. Clarendon Press. Oxford.
21. Duncan, J.R. & K.W. Prasse (1986) *Veterinary Laboratory Medicine*. 2nd. Ed. Iowa State Univ. Press.
22. Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. (1998) Vol. 1. Consejo Canadiense de Protección de los Animales. 2da Edición. Pp281-284
23. The Merck Veterinary Manual. (1991) 7th Edit. Merck & CO., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. Pp. 967
24. Jubb, K.V.F. & P.C.Kennedy (1973) *Patología de los Animales Domésticos*. Ed. Cienc y Téc. La Habana. Pp 219-241.
25. Runnels, R.A., W.S. Monlux & A.W. Monlux (1975) *Principios de Patología Veterinaria. Anatomía Patológica*. 1ra Ed. Ed. CECSA. México. Pp 501.
26. 799.9305 TSCA (2000) Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Disponible en URL: <http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/get-cfr.cgi?TITLE=40&PART=799&SECTION=9305&YEAR=2001&TYPE=TEXT>
27. OPPTS Harmonized Test Guidelines. U.S. Environmental Protection Agency. 870.3050 Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Disponible en URL: http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/
28. OECD Test Guidelines for Testing. (1981-1995). 407 Health effects. Disponible en URL: <http://w-chemdb.nies.go.jp/kis-plus/OECD2.htm>