



Efecto del Cieno de Acetileno sobre la Reproducción en Ratas

Carmen SÁNCHEZ ÁLVAREZ ^{1*}, Miguel A. HERNÁNDEZ BARRETO ²,
María BOFFILL CÁRDENAS ¹, Arianna VALIDO DÍAZ ¹, Gerga I. MENESES MARTÍNEZ ¹,
Osaida SAÍNZ SUÁREZ ¹, Orestes CASTILLO ALFONSO ¹, Freisman E. BLANCO MACHADO ¹,
Belkys VERDECÍA MACHADO ¹ & Luis DÍAZ COSTA ¹

¹ Unidad de Toxicología Experimental del Instituto Superior de Ciencias Médicas.
Carretera a Acueducto y Circunvalación, Apartado 860, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central de Las Villas.
Carretera a Camajuaní Km 5 ^{1/2}, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN. El trabajo se realizó en el UTEX del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba. Se utilizaron ratas Sprague Dawley, acoplándose a razón de 3 hembras por macho. Las hembras que fueron cubiertas fueron separadas aleatoriamente en 4 grupos: Control (agua), vehículo (aceite), cieno de acetileno y control positivo (ASA). Los animales fueron pesados al inicio del experimento y los días 6, 15 y 20. La administración de los tratamientos fue oral mediante cánula gástrica durante los días 6 al 14 de la gestación. Al día 20 se realizó la cesárea de las hembras, obteniéndose los fetos que fueron contados, sexados y pesados. No se encontraron diferencias estadísticas en cuanto al peso de las hembras en los distintos momentos, ni entre el peso del útero, y riñones para los diferentes grupos. Tampoco existieron diferencias estadísticas en cuanto al número de fetos y las reabsorciones fetales tempranas y tardías, que fueron escasas. Se encontraron diferencias ($P < 0,01$) para el peso promedio de los fetos, significativamente mas bajo en el grupo de ASA y en el peso del hígado, significativamente mayor ($P < 0,05$) en este propio grupo en relación a los controles. Se concluye que el Cieno de acetileno no produjo en las ratas gestadas ni evidencias de toxicidad.

SUMMARY. "Effect of Carbide Waste on Reproduction of Rats". The work was carried out at the UTEX in the Superior Institute of Medical Sciences of Villa Clara, Cuba. Sprague Dawley Rats was used, being coupled 3 females per male. The females that were covered were separated aleatorily in 4 groups: Control (sterile water), vehicle (vegetal oil), carbide waste and positive control (ASA). The animals were weighed in the beginning of the experiment and at days 6, 15 and 20. The administration of the treatments was orally by means of gastric stem during the 6 to the 14 days of gestation. At day 20 were carried out the Caesarean operation of the females, being obtained the fetuses that were counted, sexed and weighed. They were not statistical differences for the weight of the females in the different moments of experiment, neither among the weight of the pregnant uterus, and kidneys for the different groups. Neither statistical differences existed for the number of fetuses and the early and late fetal reabsorptions that were scarce. They were differences ($P < 0.01$) for the average weight of the fetuses, significantly lower in the ASA group and in the weight of the liver, significantly bigger ($P < 0.05$) in this own group in relation to the controls. We conclude that the carbide waste didn't take place toxicity evidences in the pregnant rats.

INTRODUCCIÓN

Producto de una serie de investigaciones realizadas, el *cieno de acetileno*, residual industrial también conocido como cenizas de carburo, se ha venido utilizando desde hace casi 20 años como desinfectante ¹, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades de los animales ^{2,3}. También ha sido aplicado en el control de agentes transmisores de enfermedades ^{4,5} y debido a su composición química ⁶, como regulador del

equilibrio ácido-básico de rumiantes o suplemento mineral en diversos animales domésticos y de laboratorio ^{7,9}.

Las primeras guías para Los Estudios de Toxicidad del Desarrollo fueron aprobadas por la Food and Drug Administración (FDA) de los Estados Unidos de Norte América en 1966, donde uno de los protocolos diseñados es determinar los efectos adversos de la exposición de un agente toxico durante el periodo de Organogé-

PALABRAS CLAVE: Cieno de acetileno, Ratas, Reproducción, Fertilidad, Toxicidad.

KEY WORDS: Carbide waste, Rats, Reproduction, Fertility, Toxicity.

* Autor a quien enviar la correspondencia: E-mail: carmensa@iscm.vcl.sld.cu, miguelhb@uclv.edu.cu

nesis sobre el desarrollo embrio/fetal^{10,11}. Los fármacos al atravesar la placenta pueden actuar sobre el embrión o feto y provocar en los primeros períodos de la gestación un efecto embriotóxico y cuando son suministrada en el período fetal pueden ocasionar alteraciones del crecimiento y desarrollo funcional del feto que puede desencadenar una enfermedad posnatal¹².

A pesar de que la valoración de resultados de experimentación toxicológica en animales de laboratorio sigue confrontando controversias en cuanto a la extrapolación al humano, la rata continúa siendo la especie de mayor utilización para estas investigaciones¹³.

Como vía de continuar profundizando en los estudios de toxicidad de este residual industrial, nos propusimos con este trabajo, evaluar las posibles afectaciones en la reproducción que el consumo de este residual pueda provocar, utilizando como modelo Ratas de la línea Sprague Dawley.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad Toxicológica Experimental (UTEX) del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

Durante el experimento, los animales se mantuvieron a una temperatura de 22 ± 2 °C, una humedad relativa entre 40-70% y un ciclo de Luz/Oscuridad de 12 x 12 h.

Se seleccionaron ratas hembras y machos de la línea Sprague Dawley, provenientes del centro de referencia nacional CENPALAB (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio). Las hembras tenían entre 6-8 semanas de edad y 180-220 g de masa corporal.

Todos los animales del estudio se identificaron individualmente por perforación de la oreja. Las cajas fueron identificadas por medio de tarjetas en las cuales se recogió la siguiente información: número del animal, sexo, especie, línea, fecha de administración del producto y grupo de tratamiento.

Se ubicaron 3 hembras por macho en cajas de poli carbonato T3, para el apareamiento, verificándose la ocurrencia de la cópula mediante la realización del smear vaginal en horas de la mañana del día siguiente al apareamiento. Las hembras con smear vaginal positivo se consideraron en ese momento como día "0" de la preñez. y se asignaron aleatoriamente a los 4 grupos de tratamiento previstos, registrándose el peso al inicio de la gestación y los días 6, 15 y 20 de la misma. Los animales fueron inspeccio-

Grupo	Nº de animales	Tratamiento
1	9	Agua (Control)
2	11	Aceite vegetal (Vehículo)
3	12	Cieno de Acetileno
4	12	Aspirina (Teratógeno)

Tabla 1. Conformación de los grupos experimentales.

nados diariamente para verificar su estado de salud según lo establecido.

Los cuatro grupos experimentales quedaron confeccionados como indica la Tabla 1.

En todos los casos, los productos fueron administrados entre los días 6 y 14 de la gestación, etapa importante de la organogénesis¹⁴. La administración se realizó siempre mediante cánula gástrica. El cieno se administró a dosis de 1 000 mg/Kg de peso en suspensión oleosa (aceite vegetal de girasol); la aspirina (ASA) se administró a razón de 250 mg/Kg de peso en suspensión acuosa.

A todas las hembras se les realizó una laparo-histerotomía (operación cesárea) al día 20 de la gestación, procediéndose al pesado del útero grávido y al conteo, sexado y pesado de cada feto. En este momento también se contaron los cuerpos lúteos presentes en cada ovario. Paralelamente se procedió a la obtención y pesado del hígado y los riñones de cada hembra del experimento. También se determinaron las reabsorciones fetales tempranas y tardías mediante observación macroscópica de las estructuras feto-placentarias.

Los resultados primarios fueron procesados por el tabulador electrónico Excel y posteriormente, las valoraciones estadísticas mediante el paquete computarizado SPSS versión 15.0, donde se realizaron análisis de varianza de clasificación simple complementado con una prueba de Dunnett¹⁵ ante la evidencia de heterogeneidad en la varianza de los grupos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el desarrollo del experimento no se observaron alteraciones clínicas de las hembras tratadas con el cieno de acetileno, cuyo comportamiento se mantuvo normal. El peso inicial de los animales experimentales fue similar en todos los grupos, tal y como se expresa en la Tabla 2, no existiendo diferencias estadísticas para este indicador.

Estos pesos se corresponden con los reportados en otros trabajos para este tipo de animal durante el inicio de experimentos toxicológicos¹⁵⁻¹⁷.

Grupo	N	Media	Error Estándar
1	9	193,11	10,49
2	11	199,90	7,78
3	12	195,58	7,66
4	12	206,83	5,22

Tabla 2. Estadística descriptiva del peso Inicial de las hembras (g).

De igual forma (Tabla 3), en los tres pesajes sucesivos no se encontraron diferencias estadísticas al comparar el desarrollo ponderal en los diferentes grupos ($P > 0.05$).

Estos resultados también coinciden con lo reportado en otros trabajos en ratas controles al término de sus experimentos ^{15,16}.

La ganancia media diaria durante el período experimental se refleja en la Tabla 4.

La Ganancia Media Diaria ($g^{1/2d}$) tampoco manifestó diferencias estadísticas entre grupos ($P > 0,05$). No obstante, el grupo 3 (Cieno) fue el del valor más elevado (11,86 g promedio por encima del grupo control), a pesar de haber sido el segundo mas bajo en el promedio de peso inicial. Esta $g^{1/2d}$ fue similar a la reportada por otros investigadores en las ratas controles de sus experimentos ^{15,16}.

El peso del útero de las hembras fue también estadísticamente similar al comparar los

grupos ($P > 0.05$) durante el período estudiado (Tabla 5).

El peso promedio del útero en hembras adultas no gestantes se sitúa en unos 4.8 gramos ¹⁸.

Se obtuvieron en total 531 fetos, de los cuales el 54% fueron hembras. Este predominio de hembras se mantuvo en todos los grupos de estudio. El total de fetos obtenidos por grupo experimental fue similar, con una media global de 12 fetos por hembra, sin diferencias estadísticas entre los mismos (Tabla 6).

Existió una amplia variación para este indicador (entre 4 y 20 fetos), lo cual está reportado no sólo para ratas de experimentación, sino también para ratas comunes ¹⁸.

Los resultados promedios para los pesos de los fetos (Tabla 7) mostraron una diferencia altamente significativa mas baja para el grupo 4 tratado con ASA en relación a los grupos restantes ($P < 0,01$).

Estos resultados coinciden con el criterio de que algunos tóxicos actúan sobre las hembras gestantes disminuyendo el peso de los fetos ¹⁹.

En la Tabla 8 se expresan los resultados comparativos de las reabsorciones fetales tempranas en los distintos grupos experimentales.

Aunque numéricamente hubo mayor cantidad de hembras que recibieron el cieno con re-

Grupo	N	Media ± E.S.		
		6 Días	15 Días	20 Días
1	9	230,33 ± 09,45	273,55 ± 10,98	334,33 ± 14,89
2	11	240,27 ± 08,09	294,72 ± 08,83	344,54 ± 10,05
3	12	233,00 ± 03,28	286,25 ± 06,83	348,66 ± 06,77
4	12	249,91 ± 05,00	289,25 ± 07,17	354,33 ± 07,48

Tabla 3. Peso promedio a los distintos momentos de los pesajes experimentales (g).

Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	141,22	12,62	91,00	198,00
2	11	144,64	6,68	110,00	182,00
3	12	153,08	5,96	133,00	195,00
4	12	147,50	5,49	107,00	181,00

Tabla 4. Ganancia media diaria de peso de las hembras durante todo el experimento (g).

Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	63,16	6,25	34,35	88,60
2	11	68,73	6,23	36,00	103,33
3	12	72,18	4,41	46,00	95,80
4	12	62,57	5,70	21,20	85,60

Tabla 5. Estadística descriptiva para el peso del útero grávido a término (g).

Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	11.44	1.28	6	16
2	11	12.00	1.26	6	20
3	12	12.75	1.07	7	18
4	12	11.67	1.05	4	15

Tabla 6. Resultado promedio del total de fetos.

Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	103	3,65 a	3,698 E-02	2,66	4,40
2	131	3,67 a	3,519 E-02	2,00	4,50
3	153	3,68 a	3,424 E-02	2,60	4,80
4	139	3,28 b	4,921 E-02	0,40	4,70

Tabla 7. Peso promedio de los fetos (g). Letras desiguales en la columna de las medias difieren estadísticamente ($P < 0,01$).

Grupo	N	%
1	9	22,2
2	11	36,4
3	12	41,7
4	12	25,0

Tabla 8. Porcentaje de hembras con reabsorciones fetales tempranas.

absorciones fetales tempranas, no existieron diferencias estadísticas entre los grupos ($P > 0,05$). Sin embargo, el número total de reabsorciones fetales en esta etapa por hembra fue numéricamente mayor en el grupo que recibió ASA (11) frente a 5 del grupo ceno, 5 en el grupo aceite y 2 en el control. Esta valoración tampoco se estadísticamente significativa.

Los abortos y reabsorciones fetales en animales clínicamente sanos pueden ser causados por un agente tóxico pero también estos eventos pueden deberse a causas ambientales u otras iatrogénicas²⁰. Existen numerosos reportes que señalan un aumento de las reabsorciones fetales cuando agentes tóxicos de diversa naturaleza están presentes en hembras gestantes²¹. Las reabsorciones fetales tardías fueron aún más escasas (ninguna en el grupo control; 3 en el grupo aceite; 1 en el grupo ceno y 5 en el grupo ASA). En total se produjeron 3,01 reabsorciones fetales por cada 100 fetos vivos sin diferencias estadísticas entre grupos aunque numéricamente mayor en el grupo ASA. Está comprobado que este fármaco puede producir efectos negativos en ratas gestantes y alteraciones congénitas en los fetos²².

El total de cuerpos lúteos tuvo una casi total coincidencia con la sumatoria fetos + reabsorciones fetales. Sólo en una hembra del grupo ASA se encontró un cuerpo amarillo más que dicha sumatoria.

También se encontraron diferencias estadísticas significativas para el peso del hígado de las hembras entre los grupos 1 y 4 (Control y ASA) y no entre el resto de los grupos experimentales (Tabla 9).

El hígado, producto de sus funciones, es uno de los órganos que con más frecuencia se afecta ante las agresiones toxicológicas y generalmente una de sus manifestaciones es el aumento de tamaño del mismo^{23,24}, mientras que la desnutrición proteica tiende a reducir dicho tamaño en ratas en crecimiento²⁵.

El peso promedio de los riñones de las ratas se expresa en la Tabla 10.

No existieron diferencias estadísticas entre grupos para el peso de ambos riñones. Tampoco existieron diferencias estadísticas entre ambos riñones, aunque la tendencia fue a un poco de mayor peso en el derecho. La suma promedio de ambos riñones en los distintos grupos (1,31-1,77 g) fue muy similar a la reportada por otros autores en animales controles sanos y en trabajos experimentales parecidos^{15,16}, conociéndose que estos órganos, son después del hígado los que más se afectan ante procesos toxicológicos, generalmente con aumento del tamaño de los mismos^{26,27}.

Los resultados de este trabajo corroboran estudios anteriores sobre el Ceno de Acetileno donde se expresaban criterios de la no toxicidad del producto en ratas^{15,16,28-30}.

Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	13,09 a	0,49	11,60	15,60
2	11	14,37 ab	0,43	13,20	18,40
3	12	14,25 ab	0,32	13,00	16,43
4	12	14,82 b	0,51	12,40	19,60

Tabla 9. Estadística descriptiva para el peso del hígado (g). Letras desiguales en la media difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Riñón Derecho					
Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	0,91	5,10E-02	0,77	1,20
2	11	0,85	4,37E-02	0,60	1,00
3	12	0,89	3,66E-02	0,60	1,00
4	12	0,96	2,07E-02	0,80	1,05
Riñón Izquierdo					
Grupo	N	Media	Error Estándar	Mínimo	Máximo
1	9	1,11	0,1223	0,77	2,00
2	11	0,92	2,73E-02	0,01	1,06
3	12	0,89	5,68E-02	0,40	1,20
4	12	1,04	8,76E-02	0,40	1,50

Tabla 10. Estadística descriptiva para el peso promedio de los riñones (g).

CONCLUSIONES

La administración de *cieno de acetileno* a dosis de 1 g/Kg de peso no afectó la ganancia media diaria de peso en ratas gestantes ni tampoco el número ni el peso de las crías o la tasa de reabsorciones fetales. Tampoco se observaron alteraciones clínicas de los animales tratados con el *cieno* ni se produjeron alteraciones macroscópicas del hígado o los riñones. De igual forma, en nuestro trabajo no se presentaron evidencias de toxicidad atribuibles al uso del Ácido Acetil Salicílico (ASA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González, N. (1987) *Utilización de diferentes desinfectantes en unidades pecuarias*. Tesis de Doctorado en Ciencias. CNSA. La Habana.
- Sánchez C., M.A. Hernández, B. Verdecía, I. Rodríguez & E. Brito (1999) *Rev. Medicentro* [Periódico en Línea]. ISSN 1029-3043. 3: 20-3. Disponible en URL: <http://www.capiro.vcl.std.cu/medicentro/v3n299/cie.htm>.
- Brito E., M.A. Hernández & Carmen Sánchez (2004) *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol. 5, nº 12, 2004. Disponible en URL: <http://veterinaria.org/banda.cfm?direccion=http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111104.html>.
- Brito E., M.A. Hernández & R.A. Martín (2004) *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol. 5, nº 7, 7/2004. Disponible en URL: <http://comunidad.veterinaria.org/articulos/articulo.cfm?sesioncomunidad=000ACD85-7660-1117-B5443B09D5AC2840&articulo=08003&pag=1&buscar=&area=1&donde=1>.
- 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.
- Carta Técnica del Cieno (1995) IV Taller de Aplicaciones del Cieno. MINBAS, MINBAS. Varadero, Matanzas, Cuba.
- 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. Res. Págs. 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]. Nº 1. Vol IV. Disponible en URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010103.html>.
- Manzon Jeanne, M and Y. J. Kang (1989) *Test Methods for Assessing Fernales Reproductive*

- and Developmental Toxicology*. In : Principles and Methods of Toxicology. (A.Wallace Hayes, ed), Second Edition. Raven Fless, Ltd. New York.
11. ICH Internacional Conference on Harmonisation (1993) *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products*.
 12. Voronina, T.A., Chobanov, N.G., Molodavkin, G.M. & V.N. Zhukov (1994) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **118** (2): 844-6.
 13. Fritz, H. & K. Geise (1990) *Pharmacology* **40**: 1-28.
 14. Christian, M. (2001) *Test method for assessment female reproductive and development toxicology*. In "Female Reproductive and Developmental Toxicology". Chapter 29. 4th Edition. Taylor and Francis Ed. Philadelphia. Pp. 1301-81.
 15. Sánchez, C., Hernández, M.A., Gonzáles, Y., Rodríguez, I., Boffill, M. & E. Brito (2003) *Acta Farm. Bonaerense* **22**: 239-42.
 16. Sánchez, C., Hernández M.A., González, Y., Boffill, M., Romero, D., Martínez, A. & E. Brito (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24** (2): 172-8.
 17. Moretiet, D.L.C., Lopes, R.A., Vinha, D., Sala, M.A., Semprini, M. & C. Friederich (2005) *Int. J. Morphol.* **23** (2):111-20.
 18. Ventura, J. (2004) Rata de agua - *Arvicola sapidus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.. Disponible en URL: <http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/arvsap.html>.
 19. Germano, J., Tadeo, A., Pereira, J.A., Fácio, F.N. & R. Azoubel (2007) *Efectos del ciclamato de sodio en el riñon fetal de ratas: estudio morfométrico*. University of Liverpool. Online Higher Education.. Disponible en URL: http://findarticles.com/p/articles/mi_m5EOM/is_2_22/ai_n17211222
 20. DeSesso, J.M., Harris, S.B. & S.M. Swain (1996) *The design evaluation and interpretation of developmental toxicity tests*. In " Toxicology and Risk Assessment. Principles, Methods and Applications. Pp. 71-186.
 21. Oetell, J.M. (1996) *Factores que influyen en la aparición de reabsorciones fetales (fetos evanescentes) en ratas sometidas a hipomagnesiemia prolongada*. Ciberneta. Ginecología 13. Disponible en URL: http://www.ciberneta.com/tesis_es/CIENCIAS_MEDICAS/CIENCIAS_CLINICAS/GINECOLOGIA/13
 22. Kimmel, C.A. & J.G. Wilson (1971) *Teratology* **4**: 15-24.
 23. Santidrian, S., Reyes, E. & J. Larralde (1986) *Nutr. Reports Int.* **33**: 821-9.
 24. Monreal, J.I., Rivero. A. De Pablo, P., Gil, M.J., González A. & M.M. Calonge (1997) *Estudio analítico y modificación experimental del metabolismo peroxisómico*. Anales. Suplemento 2. Disponible en URL: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol20/n2/13.html>
 25. Tirapegui, J.O. (1985) Biblioteca virtual de saúde. *Rev. Chil. Nutr.* **13**: 181-7
 26. Ibarra, F.R., Oddo, E., Obika, L.F., Martín, R.S., Bacarat, J.A. & Arrizurieta E. (2001) *Dependencia de la presión sanguínea con el sistema Kalikreina Kinina (SKK) en ratas hembra con masa renal reducida*. Resúmenes de las comunicaciones orales Nefrología I. Medicina. Volumen 61 N^o 5/2. Disponible en URL: <http://www.medicinabuenaosaires.com/vol61-01/52/conefrologia1.htm>
 27. Puldón, G., Herrera A., Lebreo I. & J. Malherbe (2005) *Cambios morfométricos en el riñón de ratas que ingieren etanol desde la adolescencia*. VII Congreso virtual hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de preparaciones Virtuales por Internet. Disponible en URL: <http://www.conganat.org/7congreso/PDF/479.pdf>
 28. Hernández, M.A.; Sánchez, C., Martínez, G., Romero, D., González, A., Rodríguez, L., Brito, E. & Y. González (2002) *Acta Farm Bonaerense* **21**: 9-12.
 29. Hernández, M.A.; Sánchez, C., González, A. & E. Brito (2002) *Acta Farm Bonaerense* **21**: 197-200.
 30. Hernández, M.A., García, P., Sánchez, C., Brito, E. & L. Rodríguez (2005) *Acta Farm Bonaerense* **24**: 559-61.