

# Estudio de toxicidad dérmica aguda de HeberNem® en ratas

✉ Odette Beiro<sup>1</sup>, Gastón García<sup>2</sup>, Onelio Carballo<sup>1</sup>, Yamilka Ramírez<sup>3</sup>, Arturo Valdivieso<sup>2</sup>, Luis A Dios<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Toxicología. Avenida 31 y 114  
E-mail: cenatox@infomed.sld.cu

<sup>2</sup>Grupo de Control Biológico (Laboratorios LIORAD)

<sup>3</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey

## RESUMEN

El HeberNem® es un nematocida biológico constituido básicamente por *Tsukamurella paurometabola*, capaz de controlar de manera eficaz la fitopatogenia de las poblaciones de nemátodos en varios cultivos. Se determinó el potencial tóxico del HeberNem® sobre la piel, como objetivo fundamental. Para realizar este estudio se utilizaron 10 ratas Wistar (5 de cada sexo) a las cuales se les rasuró aproximadamente el 10% de la superficie corporal, para aplicar 24 horas después 4 mL/rata de 200 g con la dosis del producto de 10<sup>8</sup> ufc/mL; el contacto con la piel se mantuvo 24 horas. Durante 14 días, se realizaron observaciones clínicas diariamente; se pesaron los animales los días 1, 7 y 14, y se sacrificaron humanamente el día 14 del experimento. Luego, se analizaron macroscópicamente los siguientes órganos: corazón, pulmones, riñones, hígado, estómago, bazo y piel, en los cuales no se observó ningún signo clínico atribuible a la administración del producto. Se detectó una ganancia de peso corporal entre una y otra semana para uno y otro sexo. En las necropsias no se encontraron alteraciones macroscópicas en ningún órgano. Por lo cual concluimos que bajo las condiciones de este experimento no se observó toxicidad, por lo que el producto se considera potencialmente no tóxico por esta vía.

**Palabras claves:** *Tsukamurella paurometabola*, HeberNem®, toxicidad dérmica aguda, rata

*Biotecnología Aplicada* 2006;23:40-42

TÉCNICA

## ABSTRACT

**A study of acute dermal toxicity for HeberNem® in rats.** HeberNem® is a biological nematicide, basically composed by *Tsukamurella paurometabola*; it can effectively control the phytopathogenicity of nematode populations in several target crops. To evaluate the skin toxicity of high doses of this compound. Five male and five female Wistar rats of 200 g shaved in a 10% of the body surface. Twenty four hours later 4 mL of 10<sup>8</sup> ufc / mL dose were applied to the skin during 24 hours. Daily clinical observations were carried out for 14 days. The weight of the animals was checked at days 1, 7 and 14. Animals were humanely sacrificed on day 14. Heart, lungs, kidneys, liver, stomach, spleen and skin were macroscopically analyzed. Any clinical sign related to the administration of the product was observed; both sexes increased their weight. In the necropsies, no macroscopic alterations were found in the organs. Toxicity was not observed, at least under the conditions of this testing, so HeberNem is potentially considered as a non toxic product.

**Key words:** *Tsukamurella paurometabola*, HeberNem®, acute dermal toxicity, rat

## Introducción

Los nemátodos son una de las especies más fitopatogénicas en la agricultura. Se encuentran entre las plagas de mayor repercusión en las zonas tropicales, subtropicales y templadas [1]; aunque se pueden controlar mediante el empleo de plaguicidas químicos o biológicos.

Los plaguicidas biológicos son más eficaces, ya que su efecto perdura un tiempo prolongado; además de que permiten reducir el riesgo del excesivo uso de las sustancias químicas que tienen un elevado porcentaje de toxicidad. Numerosos autores han planteado que las sustancias de mayor toxicidad para los mamíferos, es decir, las de dosis letales más bajas, son precisamente de origen biológico, como ocurre con la toxina botulínica D, que posee una dosis letal 50 (DL50) en ratón de 3.2 x 10<sup>7</sup> mg/kg por vía intraperitoneal, muy inferior a la de reputados tóxicos químicos como el ácido cianhídrico, de DL50 igual a 3 mg/kg, para iguales especie y vía. En la actualidad, varias organizaciones mundiales como la de la Salud han reconocido que cualquier material de origen biológico que se pueda introducir como plaguicida

deberá ser sometido a los mismos estudios de toxicidad que se aplican a los productos sintéticos [2].

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey se han reportado varias cepas bacterianas con posibilidades de ser empleadas como nuevos nematocidas biológicos. Entre ellas se destaca, por su efectividad y factibilidad de ser llevada a escala comercial, con el nombre de HeberNem®, la bacteria grampositiva (No. ATCC 8368) [3] cepa C-924, que pertenece a la familia *Nocordiaceae* del género *Tsukamurella*, identificada inicialmente como *Corynebacterium paurometabolum* y, posteriormente, como *Tsukamurella paurometabola* [4].

Los compuestos como este, que pueden entrar en contacto con la piel humana, deberán ensayarse para conocer su potencial irritante, así como otros signos tóxicos que se pudieran generar. Por esa razón, es necesario realizar ensayos en animales, según lo que está normado internacionalmente, conocidos como ensayos de toxicidad aguda [5-7].

El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad aguda por la vía dérmica del nematocida

1. Nickle WR. Manual of agricultural nematology. New York: Ed. Elsevier 1991.

2. Repetto M. Evaluación de la toxicidad de los plaguicidas biológicos. Revista de Toxicología 1992;9(1):3-9.

3. Catálogo ATCC N° 8368; 2000.

4. Steinhilber EA. A study of the bacteria associated with thirty species of insects. J Bacteriol 1941;42:757-90.

5. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemical "acute/ eye/ irritation". Paris: OECD 1987;405.

6. Environmental Protection Agency. Microbial Pesticide Test Guidelines OPPTS 885.3100 Acute dermal toxicity/ pathology. EEUU: EPA; 1996.

7. Repetto M. Toxicología experimental. En: Repetto M. Toxicología fundamental. 3ª ed. Madrid: Díaz Santos; 2002:291-314.

biológico HeberNem®, empleando la rata como modelo de experimentación y siguiendo las pautas descritas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) [5] de los Estados Unidos, la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) [6] y Ensayos de la Toxicología Alternativa [8].

## Materiales y métodos

### Sustancia de ensayo

Como sustancia de ensayo, en este estudio se empleó el producto final que se aplicará en la agricultura, es decir, una preparación con el microorganismo y su correspondiente medio de cultivo (levadura torula), y preservante (goma xantano).

### Caracterización del sistema de ensayo

Para el estudio se utilizó una especie roedora, la rata Wistar, procedente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Al inicio del ensayo, el peso corporal fue de 175 a 206 g en las hembras y de 263 a 292 g en los machos, acorde con lo referido por la OECD para este ensayo [9].

Se utilizaron 10 animales, divididos en dos grupos, de acuerdo con el sexo, a los que se les aplicó el producto objeto de estudio.

### Condiciones ambientales y de alojamiento

Los animales se distribuyeron al azar en jaulas individuales.

Durante el experimento, la administración del agua y la comida (pienso ratonina, CENPALAB, Cuba) fue *ad libitum*. Las ratas se mantuvieron a la temperatura de  $20 \pm 2$  °C, la humedad relativa fue entre 50 y 70% y el ciclo de luz-oscuridad, de 12 x 12 horas.

### Diseño experimental

Este estudio describe un ensayo de toxicidad/patogenicidad a dosis única por vía dérmica, similar al designado como el 885.3100, desarrollado por la Oficina para la Prevención de Sustancias Tóxicas y Plaguicidas (OPPTS) [6], en conciliación con las normativas establecidas por la OECD [5], y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [10].

### Vía y métodos de administración de la sustancia de ensayo

Previo al inicio del ensayo (24 horas), se rasuró aproximadamente el 10% de la superficie corporal de los animales. Posteriormente, se aplicaron 4 mL del producto por rata, mediante el sistema de parches [8].

La sustancia en estudio se dejó en contacto con la piel durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se removió la cubierta y se eliminó el agente residual por lavado con solución de cloruro de sodio al 0.9%, con ayuda de una almohadilla de gasa estéril.

### Dosis y grupos de tratamientos

Se separaron dos grupos de 5 ratas cada uno, divididos de acuerdo con el sexo. A cada rata de 200 g se les aplicaron 4 mL del producto, que contenían  $10^8$  ufc/mL, según lo estipulado por las guías internacionales para la evaluación de productos de origen biológico [6].

### Observación de los animales durante el experimento

Después de la administración del producto, se realizaron observaciones frecuentes durante el primer día, y se observó una vez al día durante los restantes 13 días, o sea, la observación fue durante 14 días.

La prueba tuvo una duración de 21 días (7 de aclimatación y 14 de ensayo). Se registraron sistemáticamente los signos clínicos de los principales sistemas de órganos que pudieron apreciarse macroscópicamente, y que incluían: piel, ojos y membranas mucosas, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrones de comportamiento.

### Pesaje de los animales y frecuencia

Durante los días 1, 7 y 14 del estudio, se registraron los pesos individuales de las ratas.

### Sacrificio, necropsias y estudios histopatológicos

Transcurridos los 14 días del experimento, se sacrificaron los animales con éter para narcosis y se revisó los siguientes órganos: corazón, pulmones, riñones, hígado, estómago y bazo. En caso necesario, se tomaron muestras de ellos, así como fragmentos de piel, y se procedió a su estudio histopatológico por parte del personal especializado.

### Análisis estadístico

Los pesos de los animales se procesaron estadísticamente, empleando para ello el análisis de varianza de una sola vía de clasificación y la posterior prueba de Student-Newman-Keuls, para el contraste de las medias, con una  $p < 0.05$ .

## Resultados y discusión

### Observaciones clínicas

El estudio de toxicidad dérmica aguda está diseñado para detectar efectos provocados por componentes tóxicos o no biológicos de la preparación del agente microbiológico para el control de plagas (MPCA) [11]. Los resultados de estos estudios sirven de base para la clasificación de la toxicidad de las sustancias, así como para la selección de la dosis en los estudios de toxicidad a largo plazo [8].

HeberNem® es un MPCA con grandes posibilidades de utilizarse como bionematicida. Posee una dosis letal media para el control de los nemátodos de  $10^6$  a  $10^7$  ufc/mL de la solución final del producto que se aplica al suelo, específicamente en la zona que ocupa el sistema radicular de las plantas. En este estudio se utilizó una dosis entre 10 y 100 veces superior a la letal media del control del fitonemátodo, con la cual no se obtuvieron alteraciones que pudieran atribuirse a la aplicación del producto en la actividad somatomotora de los animales, en los patrones del comportamiento, ni en los sistemas nervioso central y autónomo, respiratorio y circulatorio, como tampoco en la piel, ojos y membranas mucosas.

Esos resultados están en concordancia con los obtenidos anteriormente en el Ensayo de toxicidad/patogenicidad dérmica aguda, desarrollado por el Centro de Toxicología Experimental (CETEX, Cuba).

8. García S. Los ensayos toxicológicos de primera barrera. Ensayos de la Toxicología Alternativa. [Trabajo para optar por el título de Máster en Ciencias]. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana; 2000.

9. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Acute Dermal Irritation and Corrosion. Paris: OECD 1992:404.

10. World Health Organization. WHO/PCS: The WHO Recommended Classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2001. Geneva: WHO 2000.

11. Environmental Protection Agency. Microbial Pesticide Test Guidelines OPPTS 885.0001 Overview for microbial pests control agents. EEUU: EPA; 1996.

Ese estudio se realizó con el principio activo, es decir, con *Tsukamurella paurometabola*, y en él se comprobó que el producto no provocaba efectos tóxicos en conejos albinos [12].

Estos resultados también son similares a los obtenidos previamente por otros autores, al evaluar plaguicidas de origen microbiológico como: el *Bt var kenyae*, que no provocó efectos tóxicos en ratas tras la administración de una dosis única por igual vía [13]; el hongo *Metharhizium anisoplia*, recientemente licenciado, que no provocó toxicidad en mamíferos [14]; así como con la *Pseudomona aureofaciens* cepa Tx-1, que no resultó tóxica al aplicarla a la piel [15].

#### Peso corporal

Los resultados de la evolución del peso corporal durante los 14 días de observación se muestran en la tabla 1.

En los dos sexos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas: en los machos hubo diferencias entre el día 14 y el primero del ensayo, no así entre los días 1 y 7, 7 y 14.

Es de destacar que, a pesar de que en algunos casos no se manifestó una diferencia estadísticamente significativa, sí se observó ganancia en peso entre una y otra pesada, lo que se ajusta con la ganancia de

Tabla 1. Peso corporal de las ratas durante los 14 días de observación (media  $\pm$  desviación estándar)(g)

Sexo	Tiempo (días)		
	1	7	14
Hembras	193.0 $\pm$ 11.77a	200.8 $\pm$ 11.58a,b	214.8 $\pm$ 11.43b
Machos	278.2 $\pm$ 11.48c	292.0 $\pm$ 13.06c,d	302.4 $\pm$ 10.16d

a, b, c, d Significación estadística. (p < 0.05)

Recibido en septiembre de 2005. Aprobado en febrero de 2006.

peso para esta línea, en correspondencia con el tiempo, lo cual coincide con lo reportado por IFFA CREDO [16].

En el CETEX, perteneciente al CENPALAB, se condujeron ensayos de toxicidad/patogenicidad aguda dérmica [12] y de irritación ocular [17] con el principio activo *Tsukamurella paurometabola*, en los cuales se comprobó que, bajo las condiciones de cada uno, el producto no provocaba efectos tóxicos ni en la piel ni en las estructuras oculares de conejos albinos de Nueva Zelanda.

Estos resultados son también similares a los alcanzados con el funguicida *Pseudomona aureofaciens* cepa Tx-1 [15].

#### Hallazgos macroscópicos

Luego de la eutanasia de los animales, se observaron sus órganos, incluyendo la piel. Desde el punto de vista macroscópico, no mostraron alteración alguna, por lo que no fue necesario la toma de muestras para su procesamiento histopatológico, según el criterio del patólogo. El ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda dérmica del agente activo del HeberNem® [12], realizado anteriormente en el CETEX, demostró que *Tsukamurella paurometabola* no es tóxica ni patogénica para el biomodelo empleado, resultados que, conjuntamente con lo planteado en la guía [6], avalan la no realización de estudios histopatológicos, a menos que exista algún hallazgo.

En las condiciones del ensayo, el producto HeberNem® no resultó tóxico a la piel, luego de su aplicación única y tópica en ratas.

Recomendamos realizar estudios de toxicidad aguda por la vía respiratoria con HeberNem®.

12. Centro de Toxicología y Experimentación Animal. Informe Final ADCP0299. Ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda dérmica del *Corynebacterium paurometabolum*, agente activo del nematocida biológico C-924. La Habana; 1999.

13. Meher SM, Bodhankar SL, Arunkumar, Dhuley JN, Khodape DJ, Naik SR. Toxicity studies of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis var kenyae* in rats, rabbits and fish. Int J Toxicol 2002;21(2):99-105.

14. Ward MD, Madison SL, Sailstad DM, Gavett SH, Selgrade MK. Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. Toxicology 2000;21:143(2):141-54.

15. Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Biopesticide Fact Sheet. *Pseudomonas aureofaciens* Strains Tx-1 (006473). Disponible en URL: <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/>. [Consultado el 4 de octubre de 2003].

16. IFFA CREDO. Products and Services. France: s.e.; 1998.

17. Centro de Toxicología y Experimentación Animal. Informe Final IOC0299. Ensayo de irritación ocular del *Corynebacterium paurometabolum*, agente activo del nematocida biológico C-924. La Habana; 1999.