



# Toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del agua termomineral de San Antonio de Putina, Puno

 José A. Llahuilla Q<sup>1</sup>, Jorge L. Arroyo A<sup>2</sup>

## Información del artículo

### Historia del artículo

Recibido: 09/07/2018

Aprobado: 09/08/2018

### Autor corresponsal

Jose Antonio Llahuilla Quea

Jr. Puno 1002- Lima 01

e-mail: jllahuillaq@unmsm.edu.pe,

josellahuillaquea@gmail.com

### Financiamiento

Autofinanciado

### Conflictos de interés

Ninguno

### Citar como

Llahuilla JA, Arroyo JL. Toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del agua termomineral de San Antonio de Putina, Puno. Rev Peru Med Integrativa.2018;3(2):78-84.

## Resumen

**Objetivo.** Determinar la toxicidad a dosis repetidas durante 28 días, de la ingestión por vía oral del agua termal de San Antonio de Putina-SAP-(Puno), en un modelo murino. **Materiales y métodos.** Diseño experimental, se utilizaron diez ratas de experimentación de cepa Holtzman, los que fueron divididos en dos grupos de cinco cada uno: un grupo de estudio, al que se le administró en forma repetida, agua termal traída de SAP, en una dosis de 1000 mg/kg en un volumen de 2 mL/100g, y un grupo control con agua potable esterilizada en el mismo volumen. Se realizaron observaciones clínicas diarias, determinación semanal del peso corporal, y después de 28 días se procedió con el estudio histopatológico de órganos (corazón, riñón, hígado y pulmón) y la determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos; previo sacrificio de los animales de experimentación. **Resultados.** No se produjeron muertes ( $LD_{50} > 1000$  mg/kg) ni alteraciones permanentes de signos clínicos. Se observó aumento de peso, sin diferencias estadísticas entre los grupos. Los resultados hematológicos y bioquímicos reflejaron ligeras variaciones no significativas entre grupos, pero dentro del rango de la normalidad. No se observaron alteraciones histopatológicas. **Conclusiones.** No se encontraron signos de toxicidad aguda ante la administración de agua termomineral de San Antonio de Putina (Puno) en dosis repetidas por un periodo de 28 días.

**Palabras clave:** Manantiales de Aguas Termales; Balneología; Pruebas de Toxicidad Aguda; Animales de Experimentación (Fuente: DeCS)

## Repeated dose 28-day oral toxicity study of hot springs water from San Antonio de Putina, Puno

### Abstract

**Objective.** To determine 28-day oral acute toxicity at repeated doses of hot springs water from San Antonio de Putina –SAP- (Puno) in rats. **Materials and methods.** Experimental design, ten Holtzman rats were used, which were divided into two groups of five each: a study group that was exposed to repeated administration of SAP hot spring water in a dose of 1000 mg / kg in a volume of 2 mL/100g; and a control group, which sterilized water was given in the same volume. Daily clinical observations were made, weekly determination of body weight; and after 28 days; previous sacrifice of animals, the histopathological study of organs (heart, kidney, liver and lung) and determination of hematological and biochemical parameters were made. **Results.** No deaths ( $LD_{50} > 1000$  mg/kg) or permanent alterations of clinical signs were observed. Weight gain without statistical differences between the groups was observed. The hematological and biochemical results showed slight non-significant variations between groups, but in normality levels. No histopathological alterations were observed. **Conclusions.** No signs of acute toxicity were found after 28-days repeated administration of hot spring water from San Antonio de Putina (Puno).

**Keywords:** Hot Springs; Balneotherapy; Toxicity Tests, Acute; Animal Experimentation (Source: MeSH)

<sup>1</sup> Laboratorio de Toxicología y Química Legal Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Clínicas, Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

## Introducción

La medicina termal o balneoterapia es la disciplina que estudia las características de estrategias terapéuticas que involucran el uso de aguas termales, así como sus efectos biológicos y farmacológicos en los seres vivos <sup>[1]</sup>. Estas aguas termominerales tienen componentes distintos y, por ende, distintos mecanismos de acción biológica con el consiguiente potencial terapéutico <sup>[2]</sup>.

Estudios previos han encontrado resultados prometedores en enfermedades reumatológicas como artritis reumatoide <sup>[3]</sup>, lumbalgias <sup>[4]</sup>, fibromialgia <sup>[5]</sup>, y enfermedades dermatológicas como psoriasis o dermatitis atópica <sup>[6]</sup>. Asimismo, el tratamiento de diversas afecciones por medio del uso de aguas termales fue considerado por la Organización Mundial de la Salud, como un recurso a tener en cuenta en la mejora del bienestar y la calidad de vida de pacientes con enfermedades crónicas <sup>[7]</sup>. Por ejemplo, una reciente revisión sistemática de Antonelli *et al.* encontró que el tratamiento con balneoterapia incrementaba significativamente la calidad de vida de pacientes con osteoartritis de rodilla (tamaño de efecto = -1,03 (IC 95% -1,66 a -0,40). Por lo tanto, resulta de interés científico que los países con riqueza en estos recursos naturales destinen esfuerzos para la realización de estudios que permitan evaluar los posibles efectos terapéuticos o tóxicos posadministración <sup>[8]</sup>.

De acuerdo con reportes elaborados por el Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico (INGEMET) del sector Energía y Minas, durante los años 1998-2001, en nuestro país se encontraron aproximadamente, 472 fuentes de aguas termales, cada una con diferentes componentes geológicos, minerales, y propiedades físicas <sup>[9-13]</sup>. En Puno se encuentra el complejo de aguas termominerales de San Antonio de Putina, que incluye las aguas termales: Huayna Putina, Libertad, Wenceslao Molina, El Ruedo y Vidal Lama. Estos recursos son clasificados, según los análisis de INGEMET, en el grupo de aguas cloradas, con pH neutros (6,5-6,8) y temperaturas que oscilan los 36-51 °C <sup>[11]</sup>; además, son empleadas por su municipio con fines turísticos, por lo que son ampliamente conocidas por la población en general <sup>[14,15]</sup>. Un estudio previo, que clasificó estas aguas como sódicas, cloruradas y sulfatadas, determinó la presencia de actividad antioxidante; y la ausencia de toxicidad a los 14 días de administración <sup>[16]</sup>. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad a dosis repetidas durante 28 días de la ingestión por vía oral, del agua termal de San Antonio de Putina (Puno), en un modelo murino.

## Materiales y métodos

### Recursos naturales

Se recolectó una muestra de agua de la fuente termal Huayna Putina, a 3810 m de altitud, 14°54'40" latitud sur y 69° 51'57" longitud oeste del meridiano de Greenwich, de San Antonio de Putina-Puno. Para conservar la muestra, se transportó a una temperatura de 4-8 °C, en un recipiente estéril, hacia la ciudad de Lima.

### Animales de experimentación

Se emplearon 20 ratas *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman (diez de cada sexo) con cinco semanas de edad y un peso de 259-267 g, los cuales fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS, Lima-Perú). Estos animales se readaptaron durante cinco días en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a una temperatura ambiente (22-26 °C), humedad de 60-70%, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h; en donde se les suministró agua y alimentación *ad libitum* <sup>[17]</sup>.

Durante el estudio se siguieron las especificaciones propuestas por el documento de tópicos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA, ILAR), y se respetó la normativa vigente sobre el tema: Ley 27265-Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Silvestres Mantenidos en Cautiverio.

### Estudio de toxicidad a dosis repetidas

El estudio de toxicidad durante 28 días por vía oral se realizó según las directrices de la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) ensayo 407 <sup>[18]</sup>. Se formaron dos grupos de diez ratas de manera aleatoria (cinco de cada sexo): un grupo experimental, en el que se empleó un solo nivel de dosis de 1000 mg/kg de agua termomineral, que fue administrada de forma directa sin diluir en un volumen de 2 mL/100 g y un grupo control que recibió agua potable esterilizada en dosis de 2 mL/100 g. Las intervenciones fueron administradas una vez al día, por vía oral durante 28 días con la ayuda de una sonda intragástrica.

### Medición de signos de toxicidad

Se evaluó la variación del peso corporal a los 0, 7, 14, 21 y 28 días; así como la modificación de signos clínicos que evidencien toxicidad a la media hora, 3, 4, 48 y 72 h después de la administración. Se observó la presencia

de reflejo de aprehensión, definido como la fuerza empleada para sujetarse a una superficie reticular; reflejo de enderezamiento (tiempo en posición decúbito dorsal); actividad espontánea, desordenes gastrointestinales y cantidad de consumo de alimentos.

El día 28, los animales fueron sometidos a anestesia general con pentobarbital 10 mg/kg para la extracción de sangre por punción intracardiaca. Con esta muestra se procedió a realizar estudios hematológicos (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos y leucocitos (absoluto y relativo); y bioquímicos (glucosa, urea, creatinina, aminotransferasa de alanina [TGP], y aminotransferasa de aspartato [TGO]).

#### Estudio histopatológico

Los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg), posteriormente se obtuvieron muestras de tejidos cardiaco, renal, pulmonar y hepático. Estas muestras fueron fijadas en parafina y teñidas con hematoxilina & eosina, con la finalidad de buscar signos de toxicidad celular o pérdida de la estructura tisular. Las láminas resultantes fueron interpretadas por un médico anatomopatólogo con experiencia en el tema.

#### Análisis estadístico

La descripción de variables se expresó en medias y desviación estándar. Por otro lado, la comparación estadística de los

valores de los estudios bioquímicos y hemáticos se desarrolló mediante la prueba T de Student para medias independientes. De forma similar, la medición de la variación de pesos en el tiempo por grupo de estudio se evaluó a través del ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Este análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics para Windows, versión 17.0. SPSS Inc. Released 2008<sup>®</sup>. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas, aquellas con  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los resultados muestran un incremento del peso corporal en el grupo al que se le administró agua termal de San Antonio de Putina ( $\Delta 10,5$  g); a diferencia del grupo control que mostró un incremento menor ( $\Delta 7,2$  g). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sin encontrarse efectos del grupo y del tiempo en los pesos ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 1).

Durante la evaluación de los signos clínicos se evidenció que los animales de experimentación mantuvieron reflejos protectores normales, conservaron el reflejo de enderezamiento y presentaron actividad espontánea durante los 28 días. No se encontró casos de alteraciones gastrointestinales; asimismo, el consumo de alimentos y agua fue homogéneo en todos los grupos, mostrando un patrón estable (Tabla 1).

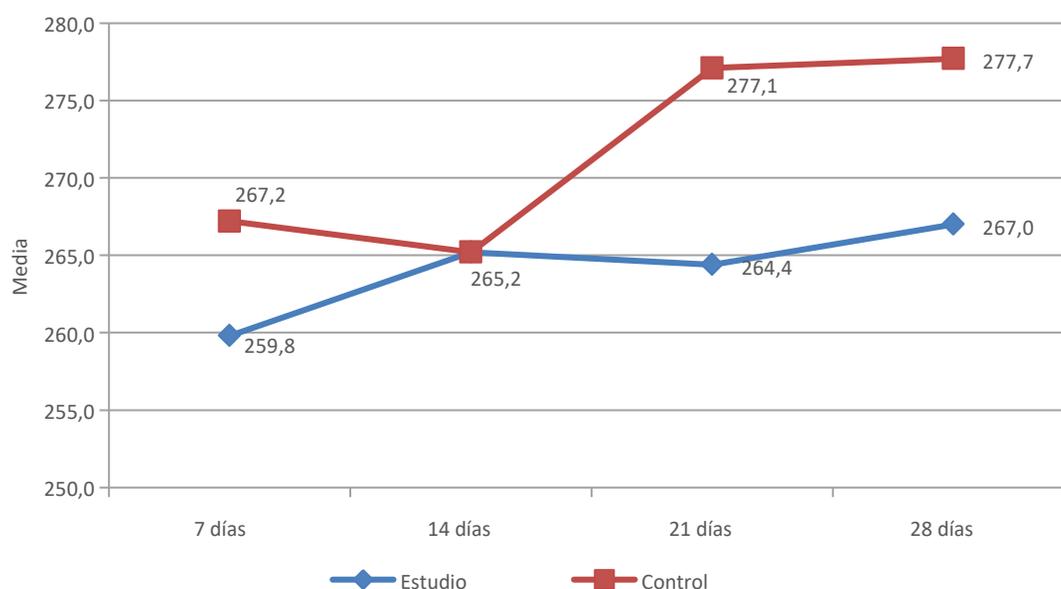


Gráfico 1. Comportamiento de las medias de pesos del control y el grupo de estudio durante los 28 días del estudio.

**Tabla 2.** Signos clínicos observados después de la administración de agua termomineral de San Antonio de Putina-Puno en forma repetida durante 28 días.

Periodo de Observación	Signos Clínicos
Media hora después de la administración	Somnolencia y agrupación al centro de la jaula
A partir de las 3 h de la administración	Signos de recuperación
A partir de 4 h de la administración	Reflejo postural normal, hábitos de aseo y consumo de alimento y agua normales
Segundo día	Agrupación intermitente en los extremos de la jaula
Desde el tercer día, hasta el final del estudio	No se apreciaron signos de toxicidad, los animales se mostraron normales en su comportamiento y hábito de vida

Durante el análisis de parámetros hemáticos no se encontraron diferencias significativas en algún elemento de análisis entre el grupo de estudio y el grupo control. De forma similar, el análisis bioquímico a los 28 días determinó que no hubo variación significativa en los niveles de glicemia, urea, colesterol, TGP o TGO entre los grupos de estudio (Tabla 2).

Con respecto a la evaluación histopatológica, tampoco se evidenciaron signos de necrosis celular ni de distorsión de

la estructura tisular en alguna de las muestras de tejido cardiaco, hepático, renal o pulmonar (Gráfico 2).

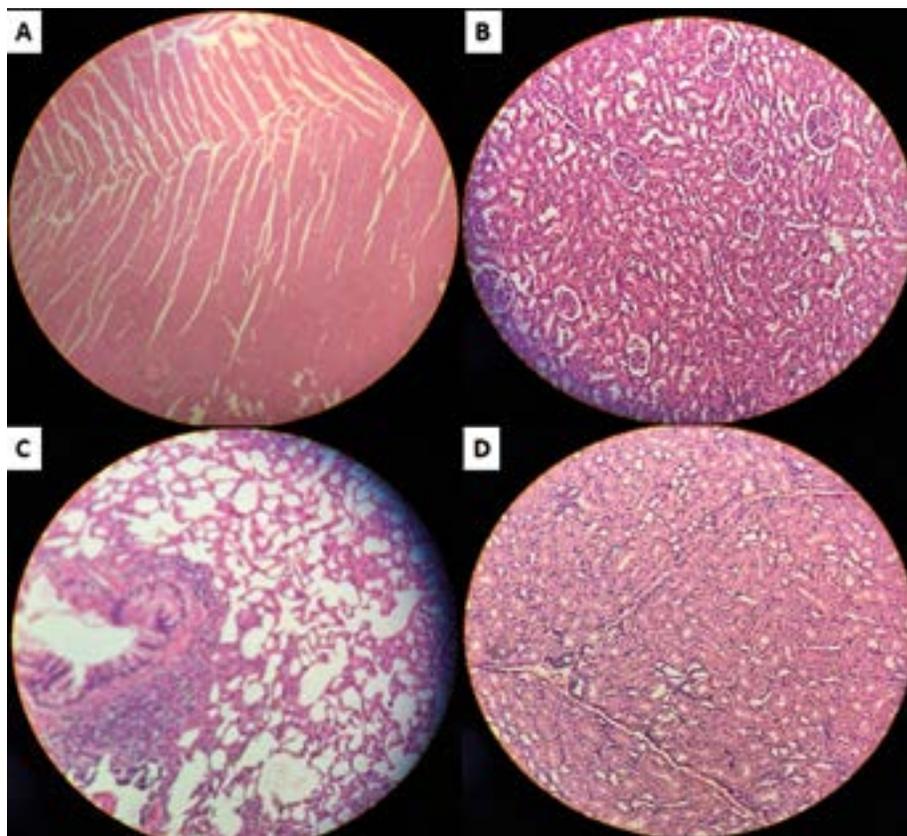
## Discusión

Al probar el efecto toxicológico de las aguas termales de Huayna Putina se observó que la administración repetida de dichas aguas a una dosis límite de 1000 mg/kg de masa corporal, por 28 días, no provocó signos de toxicidad en el modelo animal utilizado.

**Tabla 2.** Comparación de valores promedio de parámetros hemáticos entre grupos de estudio.

Parámetro	Grupo Estudio	Grupo Control	Valor p
<b>Hemáticos</b>			
Hemoglobina (g/dL)	14,2 ± 1,1	14,6 ± 0,7	0,433
Hematocrito (%)	41,8 ± 3,2	43,2 ± 2,1	0,433
Hematíes (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,6 ± 0,3	4,7 ± 0,2	0,433
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /mL)	11,3 ± 1,2	10,4 ± 1,0	0,192
Linfocitos (%)	77,0 ± 5,4	81,8 ± 4,9	0,181
Neutrófilos segmentados (%)	19,8 ± 4,9	16,2 ± 4,6	0,266
Monocitos (%)	3,0 ± 1,7	1,6 ± 0,8	0,147
Neutrófilos encayados (%)	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,545
Eosinófilos (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NA
Basófilos (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NA
<b>Bioquímicos</b>			
Glucosa (mg/dL)	103,6 ± 12,5	99,0 ± 8,5	0,469
Urea (mg/dL)	40,2 ± 6,3	30,3 ± 17,7	0,276
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,609
TGO (UI/L)	161,4 ± 23,5	135,1 ± 77,9	0,491
TGP (UI/L)	130,9 ± 40,4	85,9 ± 48,8	0,152

Resultados expresados en promedio ± desviación estándar.



**Gráfico 2.** Cortes histológicos de órganos en animales de experimentación expuestos a la administración repetida de termomineral de San Antonio de Putina-Puno. Tinción hematoxilina & eosina (10x). A. Corazón; B. Riñón; C. Pulmón; D. Hígado.

El análisis estadístico de comparación del peso corporal entre el grupo de estudio y el grupo control no encontró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ); sin embargo, sí se observó un aumento de peso en ambos grupos. Vilcanqui-Pérez *et al.* <sup>[19]</sup> estimaron que una dieta control en ratas machos Holtzman con  $45 \pm 2$  días de nacidos, ocasiona un aumento de peso de  $5,1 \pm 0,5$  g/día. Por otro lado, Cossio-Bolaños *et al.* <sup>[20]</sup>, establecieron curvas de crecimiento fisiológicas en ratas Wistar, las que mencionan que ratas machos entre siete y nueve semanas deberían tener un percentil 50 (p50) de peso de 108,2 g - 158 g, lo cual está debajo de lo hallado en este estudio. Asimismo, las variaciones de peso entre el p50 y p75 en estas edades, se encuentran entre 50,1g – 54,1g. Sin embargo, al no encontrarse curvas de crecimiento específicas para la cepa Holtzman, no queda claro si la información de estos estudios es extrapolable a los animales de experimentación de nuestra investigación; además, otros estudios como el de Ochoa *et al.* <sup>[21]</sup> muestran valores de peso corporal similares a los encontrados en este estudio. Se recomienda que futuros estudios puedan abordar la posibilidad de elaborar curvas estandarizadas para esta cepa, que es de uso común en nuestro medio.

La administración de la sustancia de ensayo no produjo mortalidad, aunque se evidenció una alteración transitoria de algunos signos clínicos (somnolencia, inquietud), lo que, por su rápida recuperación, podría ser atribuida a un estado de estrés, característico del inicio de la fase experimental de cualquier estudio [22]. Asimismo, no se encontraron signos de toxicidad aguda en la evaluación de las muestras histopatológicas de tejidos susceptibles (cardiaco, renal, pulmonar y hepático); lo que difiere ligeramente de lo encontrado en un estudio anterior realizado por este mismo equipo de investigación [16], en donde se evidenciaron signos de alteraciones leves en el ámbito hepático y renal durante la experiencia de evaluación de toxicidad aguda, 14 días después de la administración única de este recurso natural. Esto podría reafirmar la hipótesis planteada en el mencionado estudio, en donde se sugiere que estas alteraciones podían ser atribuidas a la ingesta de “agentes extraños” y eran susceptibles a regeneración.

Por otro lado, los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos estaban dentro de los valores de referencia estimados por estudios previos como el de Filho *et al.* <sup>[23]</sup>

en el caso de valores de hemoglobina, conteo de hematíes, y leucocitos (conteo total y fórmula diferenciada). Mientras que los valores de glucosa, urea, creatinina y enzimas hepáticas, estuvieron acorde a los límites de normalidad encontrados por Sharp y Villano [22].

Estos resultados permiten establecer que la  $DL_{50}$  del consumo vía oral de aguas termales de Huayna Putina se encuentra por encima de 1000 mg/kg, lo que, de acuerdo a la guía 420 de la OECD/OCDE, permite reservar pruebas con dosis mayores a situaciones extremadamente necesarias

debidamente justificadas [24]. Sin embargo, a pesar de ya contar con evidencia de no toxicidad aguda tanto a dosis fijas como a dosis repetidas, sugerimos considerar el uso de biomarcadores de toxicidad, así como probar el efecto crónico de estas aguas termales en modelos animales, antes de plantear su uso en estudios clínicos.

Se concluye, que la administración vía oral, a dosis repetida, por 28 días, de agua termo mineral de San Antonio de Putina (Puno) no mostró signos de toxicidad aguda ni de letalidad en ratas Holtzman de 7-9 semanas de edad.

## Referencias bibliográficas

- Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Rocchia MG, Fioranelli M, Gianfaldoni R, *et al.* History of the Baths and Thermal Medicine. Open Access Maced J Med Sci 2017;5(4):566–8.
- Gutenbrunner C, Bender T, Cantista P, Karagülle Z. A proposal for a worldwide definition of health resort medicine, balneology, medical hydrology and climatology. Int J Biometeorol 2010;54(5):495–507.
- Fraioli A, Mennuni G, Fontana M, Nocchi S, Ceccarelli F, Perricone C, *et al.* Efficacy of Spa Therapy, Mud-Pack Therapy, Balneotherapy, and Mud-Bath Therapy in the Management of Knee Osteoarthritis. A Systematic Review. Biomed Res Int 2018;2018:1042576.
- Karagülle M, Karagülle MZ. Effectiveness of balneotherapy and spa therapy for the treatment of chronic low back pain: a review on latest evidence. Clin Rheumatol 2015;34(2):207–14.
- Ablin JN, Häuser W, Buskila D. Spa Treatment (Balneotherapy) for Fibromyalgia—A Qualitative-Narrative Review and a Historical Perspective. Evid Based Complement Alternat Med [Internet] 2013 [citado 2018 nov 8];2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747489/>
- Huang A, Seité S, Adar T. The use of balneotherapy in dermatology. Clin Dermatol 2018;36(3):363–8.
- Organizacion Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional (2014-2023) [Internet]. 1ª ed. Hong Kong: Organizacion Mundial de la Salud; 2013. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js21201es/>
- Maraver Eyzaguirre F, Armijo Castro F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. 1ª ed. España: Editorial Complutense, S.A; 2010.
- Steinmüller K, Zavala Carrión BL. Hidrotermalismo en el sur del Perú. Proyecto: Vigilancia de la actividad volcánica e hidrotermalismo en el Sur del Perú - [Boletín D 18]. Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico - INGEMMET [Internet] 1997 [citado 2018 nov 7];Available from: <http://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/ingemmet/335>
- Steinmüller K, Núñez Juárez S. Hidrotermalismo en el sur del Perú: Sector Cailloma-Puquio - [Boletín D 19]. Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico - INGEMMET [Internet] 1998 [citado 2018 nov 7];Available from: <http://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/ingemmet/316>
- Huamaní Huaccán A. Aguas termales y minerales en el suroriente del Perú (Dptos. Apurímac, Cusco, Madre de Dios y Puno) - [Boletín D 24]. Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico - INGEMMET [Internet] 2001 [citado 2018 nov 7];Available from: <http://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/ingemmet/337>
- Huamaní Huaccán A. Aguas termales y minerales en el norte del Perú - [Boletín D 22]. 2000 [citado 2018 nov 7];Available from: <http://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/ingemmet/344>
- Steinmüller K, Huamaní Huaccán A. Aguas termales y minerales en el centro del Perú - [Boletín D 21]. info:eu-repo/semantics/openAccess [Internet] 1999 [citado 2018 nov 7];Available from: <http://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/ingemmet/338>
- Figueroa L, Omar E. Necesidad de capacitación sobre aspectos sanitarios y atención al cliente en el personal operativo de la Piscina Municipal de Putina, orientados a mejorar la calidad de servicio: periodo 2011 y 2013. Universidad Nacional del Altiplano [Internet] 2013 [citado 2018 nov 6];Available from: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2801>
- Peralta Quilla R, Miranda Rodríguez RE. Análisis de estudio de la energía geotérmica de las aguas termales de Putina empleando isobutano para la generación de energía eléctrica para la localidad de Putina. Universidad Nacional del Altiplano [Internet]

- 2017 [citado 2018 nov 6];Available from: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/5722>
16. Llahuilla JA, Bonilla PE, Arroyo JL, Suárez S, Armijo F. Efecto antioxidante y toxicidad aguda oral de las aguas termales de San Antonio de Putina-Puno. *Ciencia e Investigación* 2017;17(2):64–8.
  17. Fuentes Paredes FdM, Mendoza Yanavilca RA, Rosales Fernández AL, Cisneros Tarmeño RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2008.
  18. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico(OCDE.). Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents [Internet]. 2008 [citado 2018 nov 12];Available from: <http://www.oecd.org/env/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents-9789264070684-en.htm>
  19. Vilcanqui-Pérez F, Villanueva-Espinoza ME, Vílchez-Perales C. Efecto del endospermo de semilla de tara y polvo de las hojas de Agave americana en el peso corporal y velocidad de tránsito intestinal en ratas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2018;35(2):214–20.
  20. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Hochmuller Fogaça RT, Arruda M de. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria* 2013;28(6):2151–6.
  21. Ochoa C, Granda C, Chapoñan M, Borja R, Borjas P, Ortiz J, *et al.* Efecto Protector de Peumus Boldus en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana* 2008;13(1):20–5.
  22. Villano J, Sharp P. The laboratory rat. 2ª ed. Florida: CRC Press; 2012.
  23. Filho WJ, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, *et al.* Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *The Aging Male* 2018;21(2):145–8.
  24. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico(OCDE.). OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. [Internet]. 2001;Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_gl420.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf)