

# Toxicidad a dosis repetida del extracto alergénico de *Blomia tropicalis*

Lizet Aldana Velazco, Alexis Labrada Rosado,\* Bárbara González Navarro,\*\* Ana Margarita Bada Barro,\*\*\* María Elena Arteaga Pérez,\*\*\*\* Avelina León Goñi,\*\*\*\*\* Edilis Santana Gómez.\*\*\*\*\*

Departamento de Neurotoxicología, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Finca "Tirabeque", Carretera El Cacahual km 2½, Bejucal, La Habana. \*Departamento de Alérgenos, Centro Nacional de Biopreparados, Carretera Beltrán km 2½, Bejucal, La Habana. \*\*Departamento de Patología, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, \*\*\*Departamento de Toxicología General, \*\*\*\*Departamento de Experimentación Animal, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, \*\*\*\*\*Departamento Laboratorio Clínico, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, \*\*\*\*\*Departamento Laboratorio Clínico, Centro de Toxicología y Experimentación Animal, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.

Recibido: 12 de junio del 2000. Aceptado: 25 de abril del 2001.

Palabras clave: extractos alergénicos, toxicidad, dosis repetida, *Blomia tropicalis*.

Key words: allergenic extracts, toxicity, repeated dose, *Blomia tropicalis*.

**RESUMEN.** Los extractos alergénicos se emplean en tratamientos de inmunoterapia, ya que son capaces de inducir cambios inmunológicos en la respuesta alérgica, reduciendo de forma significativa los síntomas clínicos de la enfermedad. Por la importancia de su uso médico y con el objetivo de determinar los probables efectos nocivos, funcionales y morfológicos en la administración a dosis repetida, en ratones NMRI, del extracto *Blomia tropicalis*, se llevó a cabo este ensayo. Para su realización, se dividieron los animales en dos grupos experimentales, control y tratado ( $n = 20$ ) y se utilizó como vía de administración la subcutánea. Los animales se observaron diariamente para detectar signos de toxicidad. Al finalizar el ensayo, se les realizaron determinaciones de hematología y química sanguínea, se hizo su necropsia y se les practicaron exámenes anatómo-patológico e histopatológico. No se detectaron alteraciones en el peso corporal, el consumo de agua y alimento, ni en los indicadores de la química sanguínea. En los resultados hematológicos se observó que los leucocitos, en ambos grupos, fueron inferiores a los reportados para la especie y línea. En el análisis anatómo-patológico se encontraron lesiones hemorrágicas e inflamatorias, las cuales fueron observadas tanto en el grupo experimental como en el control en el área de aplicación. Los resultados demostraron que la dosis de 166,6 UB (unidades biológicas) no produce letalidad, en el biomodelo utilizado.

**ABSTRACT.** The allergenic extracts are used in immunotherapy treatments, since they are able to induce immunologic changes in the allergic response, reducing in a significant way the clinical symptoms of the illness. For the importance of their medical use and with the objective of determining the probable noxious, functional and morphological effects in the administration to repeated dose, in NMRI mice, of the *Blomia tropicalis* extract, was carried out this rehearsal. For the realization of the same one the animals were divided in two experimental groups, control and treaty ( $n = 20$ ), and using as administration road the subcutaneous one. The animals were observed daily to detect toxicity signs. When concluding the rehearsal, hematologic and sanguineous chemistry determinations were carried out and the animals were gross necropsied, accomplishing anatomopathologic and histopathologic exams. Alterations in the corporal weight, the water and food consumption, neither in the values of the sanguineous chemistry were not detected. In the hematologic parameters it was observed that the leukocytes, in both groups, went inferior to those reported for the species and line. In the anatomopathologic analysis were found hemorrhagic and inflammatory injuries which were observed in the experimental group as well as in the control group in the application area. The results demonstrated that the dose of 166,6 UB doesn't produce mortality in this model.

## INTRODUCCION

El interés en los ácaros como causas posibles de enfermedades alérgicas ha aumentado en las tres últimas décadas. Los ácaros del polvo están distribuidos en todo el mundo, por lo que millones de personas están expuestas a ellos.

En los Estados Unidos se ha demostrado que entre las especies de ácaros más comunes del polvo está *Blomia tropicalis*.<sup>1</sup> Este pertenece a la familia *Glycyophagidae* y se encuentra comúnmente en el polvo de las casas de los climas tropicales y subtropicales.<sup>2,3</sup> En muestras de polvo de Suramérica, está presente en un 96 % y constituye un 40 % de la población total de ácaros.<sup>4</sup> Por otro lado, en un estudio en Sao Paulo, Brasil, se encontró que el 65 % de 20 niños asmáticos presentaron anticuerpos IgE contra *Blomia tropicalis* y en Colombia el 85,5 % de pacientes de un estudio, resultaron RAST positivos (*radioallergosorbent test*) a *Blomia tropicalis*.<sup>5</sup> Estos datos demuestran la gran difusión de este ácaro, las posibles consecuencias de su acción sobre el humano y de ahí la importancia de una vacuna contra él.

Se entiende por extracto alergénico una preparación de un alérgeno, obtenido mediante la extracción de constituyentes activos de las sustancias animal o vegetal con un

disolvente apropiado.<sup>8</sup> Las proteínas alergénicas presentes en el extracto de *Blomia tropicalis* se encuentran en los extractos de polvo doméstico producidos artesanalmente en los Laboratorios de Alergeología y son usados con los mismos propósitos.<sup>8</sup> Sobre el sistema inmunológico se conoce que este alérgeno produce cambios en el perfil de citoquinas de las células Th, provocando un desplazamiento desde Th2 hacia Th1, además de un incremento de anticuerpos IgG (subclase IgG<sub>1</sub>) y reducción de IgG específica.<sup>7</sup> En investigaciones clínicas previas se ha observado actividad biológica en humanos sensibilizados, provocando una reacción cutánea similar a la producida por una disolución de histamina HCl a 10 mg/mL.<sup>7</sup>

La inmunoterapia alérgica consiste en la administración gradual en cantidades ascendentes de una vacuna alérgica a un sujeto alérgico para mejorar los síntomas asociados con la exposición a la causa de su afección. Este tratamiento se introdujo para tratar la rinitis alérgica por Noon y Freeman en 1911. En los siguientes 80 años la inmunoterapia se ha usado para tratar un conjunto de enfermedades alérgicas causadas por inhalación de alérgenos y venenos de Hymenoptera.<sup>9</sup>

La inmunoterapia alérgica, al igual que las vacunas utilizadas, son modificadores del sistema inmune, además es el único tratamiento que puede afectar el curso natural de las enfermedades alérgicas. El conocimiento obtenido a partir de estudios de los mecanismos alérgicos, como la importancia de las células Th1 y Th2, la regulación de las citoquinas en las respuestas inmunes y la inhibición específica de respuestas inmunes patogénicas por medio de la inducción de la tolerancia, pueden aplicarse a una variedad de enfermedades alérgicas e inmunológicas.<sup>6</sup>

Al extracto en estudio, se le realizó la toxicidad aguda. Durante el periodo experimental no se observaron síntomas de toxicidad, muerte, ni lesiones macroscópicas evidentes en los animales de ensayo. Teniendo en cuenta la información inicial existente sobre el producto, los conocimientos sobre sus efectos terapéuticos y los datos farmacológicos conocidos,<sup>7</sup> se consideró procedente y necesario realizar este ensayo a dosis repetida. El ensayo fue concebido como se estipula en las guías y regulaciones<sup>8,9</sup> de extractos alérgeni-

cos, para el registro de cualquier sustancia o componente relacionado.

## MATERIALES Y METODOS

### Sustancia de ensayo

Fue entregada por el centro productor acompañada de un expediente que avala su calidad. Este extracto se obtiene a partir de la extracción en disolución de bicarbonato de amonio de las proteínas solubles del cultivo completo del ácaro. El producto es sometido posteriormente, a procesos de purificación filtración esterilizante y liofilización. Contiene proteínas y glicoproteínas de más de 10 kD de peso molecular. Su actividad alérgica radica en varios componentes proteicos fundamentalmente de bajo peso molecular (12 a 21 kD). Fueron realizados análisis a la sustancia de ensayo, para su identificación desde el punto de vista físico-químico, microbiológico e inmunológico que constan en la información entregada.<sup>7</sup>

### Animales

Se empleó un lote de 60 ratones C57BL/6J (30 de cada sexo) procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales se mantuvieron en condiciones protegidas. Los animales, de 5 semanas de edad, se recibieron con un peso promedio de 21,02 g las hembras y 24,09 g los machos. Al culminar el periodo de readaptación de 7 d,<sup>10</sup> se pesaron para seleccionar los animales y se tomaron solo aquellos cuyos pesos se encontraban dentro de los extremos mínimo y máximo de  $\pm 20\%$  del peso corporal promedio y habían sido clasificados como clínicamente sanos. Posteriormente, se distribuyeron en dos grupos experimentales de 20 animales (10 por sexo) formados al azar. Fueron alojados individualmente en cajas T<sub>2</sub> (Techniplast) y se mantuvieron en ambiente controlado de temperatura y humedad relativa, con fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Se les suministró dieta comercial EMO 1001 (ALYCO®, CENPALAB) y agua potable esterilizada, *ad libitum*.<sup>11</sup>

### Dosificación, vía y zona de administración

A solicitud del usuario y teniendo en cuenta que no existen aclaraciones con respecto a los grupos de dosis establecidos, el ensayo se realizó con un solo nivel de dosis. La administrada en cada inyección (0,5 mL) fue de 166,6 UB, 10 veces inferior a la dosis empleada en el ensayo agu-

do en ratones y 50 veces superior a la dosis terapéutica máxima propuesta para los humanos.<sup>7</sup> Para el grupo control se inoculó el mismo volumen, utilizando el diluyente del extracto según recomiendan las Guías y regulaciones<sup>8,9</sup> de estos productos.

La administración se llevó a cabo por vía subcutánea, teniendo en cuenta que es la utilizada en humanos,<sup>7</sup> así como lo que ha sido reportado al efecto.<sup>8,9</sup> Las aplicaciones se realizaron alternadas a cada lado de la zona de aplicación, la cual se localiza detrás del área escapular, en los pliegues derecho e izquierdo que se forman a ambos lados de la columna vertebral.

### Diluyente y duración del ensayo

El diluyente del extracto es una disolución estabilizadora de fosfato pH = 7,4 con fenol al 0,4% como preservativo y albúmina sérica humana al 0,03% como esterilizante,<sup>7</sup> el cual es el típico diluyente utilizado para estos productos.<sup>8,9</sup>

El tratamiento se aplicó diariamente (de lunes a domingo) a los animales durante los 28 d del ensayo.

### Observaciones realizadas

A partir del primer día de aplicación se comenzaron a realizar las observaciones clínicas diarias a cada animal. Estas consistieron en la inspección del área de aplicación y en específico del sitio de inyección, del comportamiento, estado físico general y las mucosas nasales y oculares en busca de secreciones. Se palpó abdomen y tórax para detectar masas palpables. Se revisó la integridad y coloración de la piel y las mucosas, las características del pelo y otros. Además, se revisaron periódicamente las heces y orina en las bandejas colectoras para detectar posibles alteraciones en su aspecto, consistencia y características. El peso corporal, así como el consumo de agua y alimento se determinaron semanalmente.

### Determinaciones hematológicas y química sanguínea

La determinación de los indicadores fue realizada al finalizar el ensayo.<sup>11</sup> Para su selección se tuvo en cuenta los reportes de la literatura especializada<sup>8,9</sup> y el interés del usuario.<sup>7</sup>

Los indicadores hematológicos determinados por el contador de células Micros ABX (Roche Diagnostic Systems) con autodilución, el cual aspira 12  $\mu$ L de sangre total con EDTA, diluyéndola en 2,20 mL de

disolución diluyente Minidil LMG con previa calibración con los reactivos patrones *Minitol* fueron: hemoglobina, hematocritos, leucocitos totales y conteo de plaquetas. El conteo diferencial de leucocitos que incluye neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos, se realizó mediante un frotis sanguíneo, siendo fijados con metanol, teñidos con Giemsa y observados al microscopio con lente 100x. Para el análisis de estos resultados se crearon los intervalos normales de  $X \pm 2DE$  (para cada indicador) tomados a partir de los valores correspondientes a los animales del grupo control.

En química sanguínea se determinó creatinina, proteínas totales, glucosa, ácido úrico y nitrógeno ureico sanguíneo. Estos indicadores se procesaron en el analizador automático Hitachi 704. Los resultados bioquímicos se interpretaron según la frecuencia de datos en la distribución normal, estableciéndose dos intervalos de distribución,<sup>12,13</sup> el normal y el patológico.

**Anatomía patológica**

El estudio anátomo-patológico comenzó el día 29 para cada grupo experimental. Los animales fueron anestesiados con vapores de éter y desangrados por la vena femoral, para lograr una mejor observación. Asimismo, fue necesario su sacrificio por dislocación atlanto-axoidea. Se realizó el examen de la superficie corporal, de todos los orificios naturales y mucosas además de: ojos, ano, estómago, tracto gastrointestinal, ganglios linfoides, páncreas, vejiga, cerebro, tiroides, hipófisis, músculo esquelético y se tomaron muestras de piel, tanto del área de aplicación como no tratada.

Se extrajeron y pesaron los órganos siguientes: bazo, riñones, hígado, ovario-testículos, timo, corazón, pulmones y encéfalo. Se tomaron muestras de hígado, riñones, piel y lesiones observadas.

**Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante sistema de programas estadísticos para un nivel de significación de  $p < 0,05$  y una prueba de Student de dos colas. Los indicadores del estudio (bioquímicos, hematológicos y peso corporal) se analizaron de manera independiente para cada sexo. El análisis estuvo apoyado por consultas.<sup>14</sup>

**RESULTADOS Y DISCUSION**  
**Mortalidad**

No se reportaron muertes por lo que sobrevivieron al ensayo el 100 % de los animales.

**Reportes clínicos**

Los hallazgos clínicos reportados para ambos grupos de estudio, control y tratado, se observaron en el área de aplicación, con mayor intensidad en los machos y consistieron en: piloerección, endurecimiento y marcada cianosis.

**Peso corporal**

En cuanto al peso corporal se observó un aumento normal durante el estudio, en ambos sexos (Fig. 1). En el análisis estadístico realizado, no se observaron diferen-

cias significativas entre los grupos de estudio.

**Indicadores hematológicos**

Las determinaciones de hemoglobina y plaquetas no arrojaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Este mismo comportamiento fue observado en los hematocritos para el caso de las hembras, mientras que se observaron diferencias ( $p < 0,05$ ) en los machos. En los leucocitos totales las diferencias se hicieron significativas ( $p < 0,05$ ) para ambos sexos. En la Tabla 1 se reportan otros valores de población ( $n$ ), dados por  $n'$  (población del conteo diferencial), estos varían porque algunos animales mostraron una leucopenia severa, siendo imposible el conteo de leucocitos en la lámina periférica.

Esta situación se hizo crítica y evidente en los machos del grupo tratado; un solo animal mostró un comportamiento que hizo posible la determinación; en las hembras de este grupo aunque significativamente escaso, fue posible su conteo. Existen reportes de una disminución en el conteo de células blancas sanguíneas como una respuesta de adaptación general al estrés provocado por la propia manipulación.<sup>15</sup>

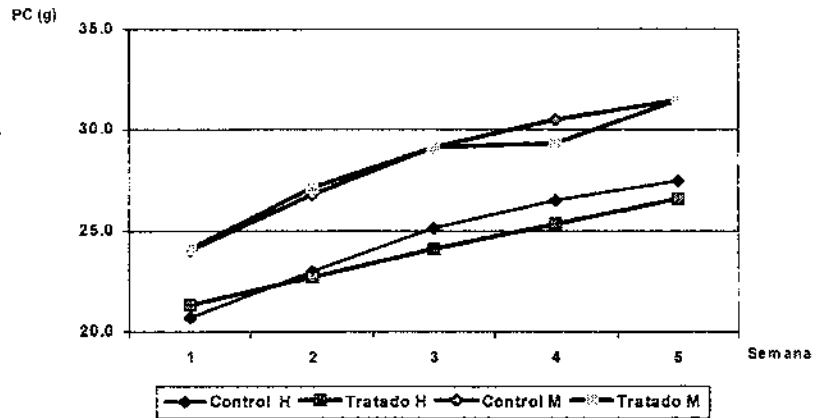


Fig. 1. Comportamiento del peso corporal (PC) durante el estudio.

Tabla 1. Resultados correspondientes a la determinación de los indicadores hematológicos.

Controles										
Sexo	n	Hemoglobina (g/dL)	Hematocritos (%)	Plaquetas ( $\cdot 10^3/mL$ )	Leucocitos ( $\cdot 10^3/mL$ )	$n'$	N	L (%)	M	E
H	10	12,01 $\pm$ 1,91	33,97 $\pm$ 5,43	566,10 $\pm$ 143,74	3,15 $\pm$ 1,08	9	6,3	93,5	0	0
M	10	13,37 $\pm$ 1,18	39,43 $\pm$ 4,10	68,60 $\pm$ 92,35	3,26 $\pm$ 1,55	8	4,75	95,1	0	0
Tratados										
H	10	13,09 $\pm$ 1,40	41,26 $\pm$ 9,28	625,60 $\pm$ 171,47	2,21 $\pm$ 0,52	10	5,2	94,5	0	0
M	10	12,76 $\pm$ 2,06	36,50 $\pm$ 6,09	655,80 $\pm$ 81,63	1,18 $\pm$ 0,70	1	5	95	0	0

Los resultados se expresan como: media  $\pm$  desviación estándar.  
N neutrófilos; L linfocitos; M monocitos; E eosinófilos.

**Tabla 2.** Resultados correspondientes a la determinación de los indicadores de química sanguínea.

Sexo	n	Controles				
		Creatinina (mg/dL)	Proteínas totales (g/dL)	Acido úrico	Glucosa (mg/dL)	Nitrógeno ureico
H	10	0,32 ± 0,06	6,16 ± 0,36	5,33 ± 0,92	137,50 ± 90,37	79,70 ± 14,52
M	10	0,44 ± 0,11	6,12 ± 0,34	4,91 ± 1,68	94,40 ± 19,53	120,20 ± 33,33
Tratados						
H	10	0,35 ± 0,06	6,43 ± 0,33	3,43 ± 1,17	120,60 ± 35,36	87,10 ± 20,81
M	10	0,45 ± 0,05	6,60 ± 0,39	3,39 ± 1,04	137,80 ± 32,87	179,10 ± 35,66

Los resultados se expresan como: media ± desviación estándar.

**Tabla 3.** Resultados correspondientes a la relación de los pesos de órganos en relación con el peso corporal.

Sexo/n	Organo	Control	Tratado
		Peso del órgano/peso corporal (%)	
H/10	Corazón	0,54 ± 0,05	0,62 ± 0,06
	Pulmones	0,83 ± 0,06	0,88 ± 0,08
	Timo	0,28 ± 0,07	0,31 ± 0,07
	Bazo	0,50 ± 0,09	0,45 ± 0,09
	Hígado	5,40 ± 0,34	5,86 ± 1,51
	Riñón izquierdo	0,73 ± 0,06	0,72 ± 0,09
	Riñón derecho	0,74 ± 0,05	0,72 ± 0,07
	Ovarios	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,02
	Encéfalo	1,89 ± 0,14	2,12 ± 0,14
M/10	Corazón	0,56 ± 0,06	0,67 ± 0,10
	Pulmones	0,76 ± 0,11	0,80 ± 0,06
	Timo	0,25 ± 0,05	0,23 ± 0,05
	Bazo	0,45 ± 0,07	0,42 ± 0,05
	Hígado	5,67 ± 0,56	5,88 ± 0,29
	Riñón izquierdo	0,85 ± 0,11	0,92 ± 0,10
	Riñón derecho	0,92 ± 0,13	0,92 ± 0,13
	Testículos	0,41 ± 0,05	0,44 ± 0,15
	Encéfalo	1,69 ± 0,12	1,70 ± 0,05

Los resultados se expresan como: media ± desviación estándar.

**Indicadores bioquímicos**

En las determinaciones bioquímicas (Tabla 2) con excepción del ácido úrico para las hembras y la glucosa para los machos, se observó que el resto de los indicadores se comportó normalmente de acuerdo con el intervalo preestablecido. El ácido úrico arrojó un valor medio por debajo del límite inferior y la glucosa se encontró aumentada, alcanzando un valor medio superior al límite máximo. Sin embargo, al aplicar la prueba t de Student no hubo diferencias significativas entre grupos.

**Anatomía patológica**

Como hallazgos macroscópicos, en ambos grupos, se observaron áreas de hemorragia en el sitio de aplicación, que al parecer estaban

asociados con el trauma mecánico que produce la inoculación del producto. Microscópicamente, las hemorragias se localizaron en el tejido celular subcutáneo, por debajo de la capa muscular fina. En el sitio de aplicación, tanto de los animales tratados como controles, se observó un infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia de leucocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilos, linfocitos, macrófagos, fibrocitos y células plasmáticas; mientras que en las muestras de piel alejadas del sitio de aplicación no se apreciaron estos cambios. La presencia de células cebadas no caracterizó el cuadro y las diferencias entre grupos en un análisis cualitativo no se evidenciaron.

Las alteraciones anatómo-patológicas encontradas en el área de aplicación pudieran ser debidas a la inyección repetida de la sustancia de ensayo, así como al diluyente empleado: fenol, el cual es una sustancia irritante y corrosiva.<sup>16,17</sup> En los órganos linfoides analizados: bazo, ganglios y timo no se encontraron cambios significativos de expresión patológica, ni en el resto de los órganos estudiados.

**Estudio de los pesos relativos de órganos**

En los machos, se apreciaron diferencias significativas en el corazón (p = 0,009). En el caso de las hembras, se detectaron diferencias significativas para el corazón (p = 0,007), encéfalo (p = 0,002) y ovario (p = 0,003) siendo mayor el valor de las tratadas que las controles (Tabla 3). Al aplicar la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para las variables donde se apreciaron diferencias significativas, desaparecieron las existentes para el peso absoluto de riñón izquierdo de las hembras, así como para el peso relativo de ovario.

Teniendo en cuenta que el producto evaluado es un alérgeno, y que su acción fundamental es sobre los órganos del sistema linfóide; las diferencias encontradas, tanto en peso absoluto de órganos, como en su relación con el peso corporal no tienen significación biológica.

**CONCLUSIONES**

La aplicación del extracto alérgico del *Blomia tropicalis* en ratones a una dosis de 166,6 UB, no produce alteraciones en el peso corporal, química sanguínea ni en el consumo de agua y alimento. Los efectos negativos observados, leucopenia severa y lesiones en el área de aplicación, no permite descartar la relación de estos con el biomodelo, la dosis y la formulación, aunque es evidente la mayor incidencia en el grupo tratado.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Arlian L., Bernstein D., Bernstein IL et al. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90, 292, 1992.
2. Bronswijk J.V., de Cock A., Oshima S. The genus *Blomia Oudemans* (Acari: Glycyphagidae) I. Description of *Blomia tropicalis* spp. from house dust in tropical and subtropical regions. *Acarología*, 15, 477, 1973.
3. Hurtado I., Parini M. House dust mites in Caracas, Venezuela. *Ann. Allergy*, 59, 128, 1987.
4. Fernández-Caldas E., Puerta L., Mercado D., Lockey R., Caraballo L. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergy leves in the tropical environment. *Clinical and Experimental Allergy*, 23, 292, 1993.
5. Hage-Hamsten M. Dermatophagoides *siboney* and *Blomia tropicalis*-dust mites of subtropical and tropical areas. *Clinical and Experimental Allergy*, 25, 905, 1995.
6. WHO Position Paper, Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for allergic diseases, Draft 7, Geneva: 27-29 January, 1-20, 1997.
7. A. Labrada Documento Informativo sobre el extracto *Blomia tropicalis*. Instrucciones a los proveedores, 1-11, 1998.
8. Nordic Council on Medicine. Registration of allergen preparations. Nordic Guidelines. Publication No. 23, 2nd Edition, Uppsala, 18-19, 1989.
9. Göran Jonsson B.J. Toxicity Studies With Allergens-requirements, Guidelines. Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institute, dem Georg-Speyer Haus und den Ferdinand-Blum Institute. Heft 78 Gustav Fischer Verlag. Stuttgart New York, 1983.
10. Centro de Toxicología Experimental, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Proyecto Código Práctico para el Uso de los Animales de Laboratorio, marzo, 1992.
11. Centro de Toxicología Experimental, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Proyecto Código de Buenas Prácticas de Laboratorio, marzo, 1992.
12. Thielmann Klaus, Principios de Metodología en Bioquímica Clínica, Edición Leipzig, 112-115, 1973.
13. Comunidad Económica Europea, Directrices sobre la Calidad, Seguridad y Eficacia de los medicamentos de uso humano. Normas Sobre Medicamentos, Volumen III, Edición Comisión de las Comunidades Europeas, 1991.
14. Hayes A.W., Principles and Methods of Toxicology. Chapter 15, 2nd. Ed., Raven Press Ltd., New York, USA, 435-483, 1989.
15. McGill M., Rowan N. Biological effects of blood loss: Implications for sampling volumes and techniques. *Perspectives on Animal Use*, 31, 5, 1989.
16. Merck & Co, Inc. EUA. Manual Merck de Veterinaria. En Antisépticos y desinfectantes. Fenoles y compuestos. Cuarta Edición en Español, 1760, 1993.
17. Alfred Goodman Gilman and Louis S. Goodman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Tomo II, 950-953, 1994.

**ACTIVIDADES CIENTIFICAS  
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA**

**II CONFERENCIA CIENTIFICA INTERNACIONAL  
MEDIO AMBIENTE SIGLO XXI**

Del 20 al 24 de noviembre del 2001.  
Universidad Central de Las Villas.

**TEMATICAS:**

- Energía y medio ambiente.*
- Gestión ambiental.*
- Educación ambiental.*
- Agricultura orgánica.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 200,00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Dr. Andrés Olivera Ranero.

TELEFONO: (53) (422) 81630/ 81194. FAX: (53) (422) 22113/ 81608. E-MAIL: candidoq@uclv.etcscu

**I SIMPOSIO INTERNACIONAL DE ATENCION A PERSONAS AUTISTAS  
Y SINDROME DOWN**

Del 13 al 16 de noviembre del 2001.  
Universidad de la Habana.

**TEMATICAS:**

- Se tratarán temas de interés científico y profesional sobre la intervención en el Autismo y Síndrome Down desde la óptica Psicopedagógica y Biológica, así como el manejo familiar.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 100.00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Dra. María T. García Eligio de la Puente

TELEFONO: (53) (7) 326645. FAX: (53) (7) 553523. E-MAIL: autisd@usa.net