

00322

130



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO ONCOGENICO DE LA FURALTADONA EN EL MOLLY *Poecilia sphenops*"

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CARLOS EDUARDO MUÑOZ CORTES

DIRECTORA DE TESIS: M.V.Z. MARIA ESTELA ANA AURO ANGULO
CODIRECTORA DE TESIS: M. en C. MARIA DEL PILAR TORRES GARCIA



2003



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Efecto oncogénico de la Furaltadona en el molly Poecilia sphenops"

realizado por Muñoz Cortés Carlos Eduardo

con número de cuenta 09634173-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M.V.Z María Estela Ana Auro Angulo

Codirector

Propietario

M. en C. María del Pilar Torres García

Propietario

Biól. Teresa Sosa Rodríguez

Suplente

M. en Na. Marcela Fragoso Cervón

Suplente

Dr. Héctor Garduño Argueta

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Quiero agradecer en particular
a Químex por las facilidades
otorgadas para la realización
del experimento.

De igual modo, al Acuario de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
y al
Laboratorio de Invertebrados de la
Facultad de Ciencias.

Agradecimientos

Agradezco a mis sinodales por haberme aceptado como tesista, además de apoyarme y orientarme en esta empresa.

Doy gracias a mis directoras de tesis: a la Dra. María Estela Ana Auró Angulo por permitirme realizar el experimento en el Acuario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la M. en C. María del Pilar Torres García por facilitarme el procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias.

De igual modo quiero agradecer a la Biol. Teresa Sosa Rodríguez por haberme ayudado durante todo el proceso de las muestras.

A la M. en Na. Marcela Fragoso Cervón y al Dr. Héctor Garduño Argueta por aceptar ser mis sinodales (y aguantarme en las clases).

Agradezco enorme y profundamente a mis padres, que siempre han estado detrás de mí, que se han interesado y me han apoyado en mis decisiones y a lo largo de toda mi carrera, en los momentos en que más les necesitaba y por el amor brindado, Gracias!!!

A mi hermana, que siempre me ha apoyado y hemos vivido momentos divertidos y tristes juntos y que en verdad quiero muchísimo más de lo que le demuestro, Gracias Monky!!!

A mis abuel@s, Angelina, José Luis, Beatriz y Roberto, los cuales siempre me apoyaron y se interesaron en mi desde pequeño.

A Claudia le agradezco el estar a mi lado y apoyarme a lo largo de la carrera, por estar conmigo en las buenas y en las malas, siempre conté contigo. Gracias por todos esos momentos que pasamos juntos que nunca olvidaré. Con tu determinación y carácter podrás lograr tus metas, la prueba está en que hasta ahora lo has logrado y en un futuro se que también así será.

Adriana, mi amiga, nunca olvidaré todos los momentos que todos pasamos contigo, las cosas graciosas que pasaban en las prácticas de campo y en la misma facultad, también siempre conté con tu amistad mi querida Botones. Con tu carácter bonachón y tu modo tan simple de ser, me has demostrado que no hay que estar siempre preocupado de todo, y con un poco de suerte las cosas salen por si mismas.

A Nancy que también me apoyó, le agradezco su amistad y admiro su determinación para lograr las cosas, se que vas a lograr tus objetivos porque uno a uno los has ido consiguiendo.

A Erika, que con su carácter sé que podrá lograr sus objetivos.

A Ricardo, por su ayuda durante la realización del experimento y por compartir esos ratos de risa.

A Edgar, Enrique, Jorge y Felipe por ser buenos amigos, además de estar igual de locos que yo. Espero que en el próximo WCG lo logremos.

A Carlitos Iván, que fue una enorme ayuda la que me dió al cortar tantos bloques para obtener mis resultados histológicos para poder realizar esta tesis.

A aquellos maestros con quienes tomé clases que nunca olvidaré como Rosaura Mayen, Octavio Rojas, Nelly Diego, Eduardo Rendón, Luis Felipe Jiménez, a René, Graciela y José, en fin..

No podía olvidar a mis amig@s de la prepa, a Alberto, Francisco, Aldo, Bryseira, al Montes y al Soria, Enrique, Ivonne, Leslie, y a tod@s los demás.

A mis compañer@s de la CONANP (en particular a Pia, Arturo, Fuen, Ruth, Ale e Irán) que se interesaron en mi trabajo y conté con su apoyo.

A tod@s mis amig@s por los momentos divertidos de las prácticas de campo :P

ÍNDICE

Introducción	1
Marco Teórico	2
Objetivo	7
Hipótesis	7
Material y Método	8
Resultados Estadísticos	9
Resultados Histológicos	14
Discusión	22
Bibliografía	25
Apéndice	28

INTRODUCCIÓN

La Furaltadona (FD) 5-morfolinometil-3-(5-nitro-furfuriliden amino)-2-oxazolidinona pertenece al grupo de los nitrofuranos, antibióticos de amplio espectro que ha sido utilizado ampliamente en medicina humana y veterinaria en forma de aditivos alimenticios para el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Leitner, *et al.*, 2001). Los nitrofuranos son una clase médicamente importante de nitroheterocíclicos antimicrobianos. Se ha demostrado que la Furaltadona y otros nitrofuranos poseen capacidad bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* (Murugasu-Oei, 2000).

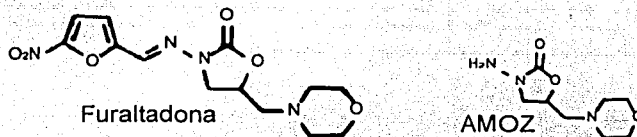


Fig. 1 Estructura de la Furaltadona (Izq.) y de su metabolito (Der.) Tomado de Leitner (2001).

El grupo 5-nitro tiene una amplia actividad antimicrobiana y por esta razón son drogas ampliamente utilizadas en medicina veterinaria. Los nitrofuranos fueron principalmente utilizados en la producción de animales de consumo en forma de aditivos alimenticios y para prevenir y controlar muchas infecciones bacterianas y protozoarias como son el cólera, coccidiosis y enteritis en aves y cerdos y mastitis en cabras. Sin embargo el usar nitrofuranos puede dejar residuos en alimentos de origen animal. Respecto a las propiedades tóxicas de los nitrofuranos, ha sido observada actividad mutagénica en levaduras y hongos, bacterias y sistemas submamíferos. Además, los nitrofuranos han mostrado ser tumorigénicos en roedores y citotóxicos en células de mamíferos cultivadas (Draisci, *et al.*, 1997).

Los efectos de los nitrofuranos parecen estar relacionados con el compuesto en sí mismo y con la formación del metabolito. Debido al rápido metabolismo en el tracto gastrointestinal, la administración de furazolidona a cerdos y aves resulta en concentraciones residuales muy bajas de la droga en músculo e hígado. Estudios realizados en cerdos han demostrado que los metabolitos de la furazolidona se unen covalentemente a proteínas celulares *in vivo*. El riesgo toxicológico potencial al consumidor por la unión del metabolito a proteínas ya ha sido demostrado. Altos niveles de furazolidona se han encontrado en huevos de gallinas tratadas no mucho antes de que ocurriera el metabolismo durante el tiempo de desarrollo del huevo (Draisci, *et al.*, 1997).

MARCO TEÓRICO

El uso de nitrofuranos en la práctica veterinaria se ha vuelto cuestionable en la Unión Europea (UE). Los nitrofuranos son considerados como drogas del Anexo IV de EEC Reg. 2377/90; por ejemplo, no ser utilizados en animales de granja destinados a consumo y por lo tanto no es estable un límite máximo de residuos. Desde 1997, las drogas del Anexo IV ya no son registradas para su uso en ningún animal de granja en la UE (Draisci, *et al.*, 1997).

Otro ejemplo de la toxicidad de los nitrofuranos se observa en la Nitrofurazona, que es un antibiótico de amplio espectro utilizado en medicina veterinaria. Es mutagénico a una variedad de sistemas bacterianos de prueba, incluyendo *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* con o sin su activación metabólica. La nitrofurazona es metabolizada en riñón, hígado, testículos y por células de la mucosa intestinal. Los metabolitos se unen a proteínas, RNA y DNA. Los efectos tóxicos de la nitrofurazona incluyen degeneración testicular y degeneración artropática en roedores (Ito, *et al.* 2002).

La FDA (Food & Drugs Administration) de los Estados Unidos de América prohibió a la industria avícola y porcina el tratamiento con furazolidona y nitrofurazona y estableció limitar el uso de estos compuestos en los productos y subproductos que se emplean en la producción de animales de abasto público para evitar el riesgo potencial del consumo de carcinogénicos por el humano.

Es posible detectar residuos de la droga mediante un HPLC (high-performance liquid chromatography) (Galeano, *et al.*, 1997) debido a la gran estabilidad y gran tiempo de residencia (entre 4 y 9 días de vida media) de los metabolitos (Leitner, *et al.*, 2001). Además del HPLC se han reportado otros métodos para determinar la presencia de la furaltadona (ver 1-15 en Khalil, 2002), como la espectrofotometría con irradiación UV (Mahedero, *et al.*, 2002).

El efecto carcinógeno de la furaltadona se manifiesta en una neoplasia. Neoplasia significa "nuevo crecimiento" o multiplicación de células de modo aberrante, que resulta en un número excesivo de células, cuyo crecimiento no es coordinado y persiste aún después de que el estímulo que lo inició ha cesado su efecto. Esta definición incluye a la mayoría de las neoplasias o "tumores". La formación de tumores es normalmente asociada con un incremento de la tasa mitótica, y un menor grado de diferenciación de los constituyentes celulares. Los tumores pueden surgir de casi cualquier tejido, excepto en las neuronas adultas que son

incapaces de dividirse. Sin embargo, surgen generalmente en tejidos donde la proliferación celular es normalmente activa y donde hay particularmente exposición a influencias nocivas como toxinas en el alimento o contaminantes en el agua. De modo que la piel, branquias, hígado y estómago son más susceptibles a una neoplasia que el hueso o músculo (Roberts, 1989).

Debido al metabolismo y a la relación del tracto gastrointestinal, el hígado es un blanco importante para la toxicidad de las drogas, xenobióticos y el estrés oxidativo (Jaeschke, *et al.*, 2002).

La furaltadona es metabolizada (tanto en peces como en mamíferos) vía citocromo P450. El sistema del citocromo microsomal hepático P450-monooxigenasa dependiente, desempeña un papel fundamental en el metabolismo de una gran variedad de compuestos hidrofóbicos endógenos y exógenos incluyendo drogas así como químicos carcinógenos y co-carcinógenos. La actividad del sistema puede resultar en una desintoxicación benéfica o en un decremento de la actividad de dichos compuestos. Los grupos del citocromo P450 tienen diferentes características. CYP 1, CYP 2 y CYP 3 son responsables del metabolismo de muchas drogas y forma cerca del 70% del contenido hepático de isoenzimas P450.

El patrón responsable de la enzima para la generación y disposición de metabolitos constituye uno de los más importantes aspectos tempranos del control de la carcinogénesis química. El citocromo P450-monooxigenasa dependiente, puede dar lugar a la formación metabólica de metabolitos electrofílicos. Por virtud de ser electrofílicos cada compuesto es capaz de unirse covalentemente a los constituyentes esenciales nucleofílicos de la célula, incluyendo DNA, RNA y proteínas. Esas alteraciones a las principales macromoléculas pueden llevar finalmente a la bien conocida expresión de citotoxicidad y carcinogenicidad. El principal interés en la investigación sobre los mecanismos de genotoxicidad se ha centrado recientemente en el sistema enzimático responsable del control de moléculas reactivas, especialmente sobre la inducción de isoenzimas CYP 1A y CYP 2B. Es bien conocido que la inducción del citocromo P450 monooxigenasa es tóxica (iniciación y promoción de cáncer y necrosis de tejido) (Rahden-Staron, *et al.* 2001).

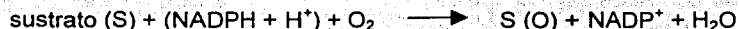
El citocromo P450 comprende una superfamilia de enzimas que catalizan la oxidación de varios xenobióticos, incluyendo drogas, químicos tóxicos y carcinógenos. La mayor parte del

metabolismo del CYP resulta en la destoxificación de los xenobióticos, mientras que algunos químicos son activados. El radical superóxido puede ser producido en el proceso de destoxificación del citocromo P450. CYP1A1 desempeña un papel muy importante en el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del tabaco. CYP1A1 puede catalizar la activación de esos hidrocarburos a metabolitos reactivos que pueden iniciar el daño del DNA de las células. CYP1A1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 15. Los polimorfos del gen CYP1A1 están relacionados con el desarrollo de serias maligniscencias (Yen, *et al.* 2003).

El citocromo P450 monooxigenasa se encuentra involucrada tanto en el metabolismo endógeno como en el metabolismo de xenobióticos. En insectos por ejemplo, esas actividades son esenciales para la síntesis y degradación de las hormonas esteroides para la muda y hormonas juveniles, así como también en el metabolismo de feromonas. Las enzimas del CYP también son importantes para los mecanismos adaptativos de los insectos a los químicos tóxicos sintetizados por la planta hospedera. Esta adaptación es notable por el hecho de que la biosíntesis de esas enzimas pueden ser inducidas por la presencia de toxinas en el alimento.

El mecanismo de reacción es el siguiente:

Las enzimas del citocromo P450 unen a una molécula de oxígeno y recibe electrones del NADPH para inducir a un átomo de oxígeno hacia el sustrato y a formar agua con el otro átomo de oxígeno de acuerdo a la siguiente reacción:



Los electrones necesarios para esta reacción son transferidos por el nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato (NADPH) sobre el complejo "sustrato-P450" por un NADPH citocromo P450 reductasa.

Los P450 constituyen una de las más importantes superfamilias de proteínas considerando el gran número de formas (Bergé, *et al.* 1998). Al ser degradada la furaltadona se libera el AMOZ (3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona), que es el metabolito producto de esta reacción. EL potencial redox de los nitrofuranos es alto y debido a ésto pueden ser más fácilmente reducidos y activados (Murugasu-Oei, 2000).

Citocromo P450 es un término genérico para una superfamilia del grupo de las hemoproteínas que incluye muchas de las enzimas que metabolizan esteroides y colesterol, además de aquellas que metabolizan xenobióticos (González y Kimura, 2003). Contienen monooxigenasas que han existido a lo largo de la naturaleza desde el inicio de la vida hace unos 3.5 billones de años. El P450 responsable del metabolismo de compuestos extraños evolucionó hace unos 400-500 millones de años para permitir a los animales que pudieran destoxicarse de los químicos en las plantas. Las enzimas del citocromo P450 son los más poderosos agentes oxidantes *in vivo*, los cuales son capaces de catalizar la biotransformación oxidativa de una amplia gama de sustratos exógenos y endógenos químico y biológicamente no liberados. Hay muchas enzimas P450 diferentes, las cuales son producto de los genes de una superfamilia de genes.

El ser humano tiene 57 genes CYP y 33 pseudogenes distribuidos en 18 familias (enzimas que muestran $\geq 40\%$ de identidad) y 42 subfamilias (enzimas que muestran $\geq 55\%$ de identidad). Tres familias principales de CYP (CYP1, 2 y 3) son responsables del metabolismo de drogas terapéuticas Tabla 1).

Tabla 1
Polimorfismos en los genes del citocromo P450 involucrados en reacciones adversas a las drogas (adverse drug reactions "ADR")

Enzima P450	Alelos Variantes y frecuencia en Caucásicos	Ejemplos de ADRs asociados con las variantes de los alelos P450.
CYP1A2	CYP1A2*1F (68%)	Antipsychotics, tardive dyskinesia
CYP2C9	CYP2C9*2 (8_ 13%), CYP2C9*3 (7_ 9%)	Warfarin, haemorrhage Phenytoin, phenytoin toxicity
CYP2C19	CYP2C19*2 (13%), CYP2C19*3 (0%)	Tolbutamide, hypoglycaemia Mephenytoin, toxicity
CYP2D6	CYP2D6*4 (12_ 21%), CYP2D6*5 (4_ 6%) CYP2D6*10 (1_ 2%), CYP2D6*17 (0%)	Diazepam, prolonged sedation Propafenone, arrhythmias Metoprolol, bradycardia Nortriptyline, confusion Opioids, dependence Phenformin, lactic acidosis
CYP3A4	CYP3A4*1B (5.5%)	Perhexilene, hepatotoxicity Epidophyllotoxins, treatment-related leukaemia

Tomada de Pirmohamed (2003).

Las diferentes isoformas P450 varían en su abundancia en el hígado; sin embargo, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4 son el 60-70% de toda la fase I de biotransformación metabólica de drogas. La expresión y actividad de muchas de las enzimas están sujetas en buen grado a la

variabilidad interindividual; parte de la variabilidad es determinada ambientalmente debido a la incorporación concomitante de drogas y comestibles que causan la inducción e inhibición de las diferentes isoformas P450. Sin embargo, ha sido ampliamente reconocido que hay una variabilidad constitutiva en la expresión de diferentes isoformas P450 (Pirmohamed 2003).

Otro aspecto importante del metabolismo de los xenobióticos que tiene un impacto mayor en la salud pública es la existencia de los polimorfismos. En los humanos hay diferencias interindividuales marcadas en toda la magnitud del metabolismo de los xenobióticos. Los polimorfismos humanos en las enzimas del metabolismo de xenobióticos han sido caracterizadas extensamente con la mayoría de las principales variantes alélicas que han sido identificadas y desarrollado pruebas de diagnóstico genotípico. Los polimorfismos pueden causar problemas terapias con drogas y pueden potencialmente jugar un papel en la susceptibilidad a los tóxicos y carcinógenos (González y Kimura, 2003).

CYP1A2 en comparación con otros CYP tiene relativamente un papel menor en el metabolismo de las drogas, llevando el metabolismo del 5% de las drogas de uso terapéutico, a pesar de representar el 15% del total del contenido de CYP en el hígado. CYP1A2 está involucrado en el metabolismo de drogas como son el paracetamol, teofilina, propranolol y algunos antipsicóticos como la olanzaprina y clozapina.

CYP2D6 fue la primera isoforma descubierta por ser su expresión polimórfica. Es más importante con respecto al metabolismo de drogas que CYP1A2 porque es el responsable del metabolismo de aproximadamente 25% de las drogas de uso terapéutico, a pesar del hecho de que suma menos del 5% del total del contenido de CYP.

La subfamilia CYP2C cuenta con el 15-20% del contenido total de P450 en el hígado, y metaboliza aproximadamente 20% de todas las drogas. CYP2C9 es el miembro más grande de la subfamilia, es responsable del metabolismo de varios compuestos incluyendo la warfina, phenytoin, losartan, tolbutamida entre otros.

La subfamilia CYP3A comprende el 30% del contenido total de P450 y es responsable del metabolismo de cerca del 50% de las drogas terapéuticas.

En resumen, las enzimas del citocromo P450 metabolizan drogas a dos tipos de metabolitos, estables y tóxicos; si posteriormente no hay detoxificación, se pueden unir irreversiblemente a macromoléculas celulares esenciales y permitir por tanto una toxicidad directa o, actuando como haptenos, permitir una toxicidad inmune mediada (Pirmohamed, 2003).

Las enzimas CYP3A están involucradas en el metabolismo de una gran variedad de químicos y diversas sustancias, incluyendo contaminantes ambientales, pesticidas, drogas terapéuticas, productos dietéticos y esteroides. Se cree que estas enzimas actúan como una primera línea de defensa para prevenir la bioacumulación de sustancias lipofílicas que entran al cuerpo principalmente por vía respiratoria y tracto digestivo. En adición a la detoxificación, el metabolismo mediado por CYP3A también puede liberar la activación de protoxinas y procarcinógenos.

Los principales sitios de la expresión de CYP3A son el hígado y el intestino delgado. En mamíferos la expresión de CYP3A se ha observado en varios tejidos como son el tracto digestivo y respiratorio, el cardiovascular, las gónadas, glándulas adrenales y cerebro.

Recientemente los genes CYP3A han sido identificados en especies de vertebrados silvestres como peces, reptiles y aves (Hegelund, 2003).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es el evaluar el efecto carcinógeno de la Furaltadona en *P. sphenops* y de su metabolito AMOZ (3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona).

HIPÓTESIS

El tiempo de consumo de la FD es un factor decisivo en la formación de lesiones (tiempo dependiente) y además, los tres tratamientos son diferentes entre sí en la formación de lesiones (dosis dependiente).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 220 molluscos que fueron distribuidos en 10 acuarios (cada uno con 20 molluscos) con capacidad de 14 litros, provistos de agua de cloro para aireación para constituir 3 grupos experimentales con 3 réplicas cada uno distribuidos de la siguiente manera:

Grupo Control (no tratado).

Grupo 1 (3 réplicas): Tratado con 0.011 g de Furaltadona/kg alimento/día/60 días.

Grupo 2 (3 réplicas): Tratado con 0.022 g de Furaltadona/kg alimento/día/60 días.

Grupo 3 (3 réplicas): tratado con 1 ng de AMOZ (3-amino-5-morfolinometil-2-ozazolidinona).

Diariamente se sifonearon de 4 a 6 litros para eliminar las heces y alimento remanente.

El fármaco se adicionó al alimento que fue racionado al 3% de la biomasa, dividido en dos raciones para el mejor aprovechamiento del mismo. Tanto el fármaco como el alimento fueron pesados en una balanza analítica Sartorius i1800.

Una vez iniciado el experimento en el Acuario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, cada 15 días se sacrificaron 5 peces de cada grupo mediante desmedulación y fueron fijados en formol al 10% para su procesamiento histológico.

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias, donde se deshidrataron en un histoquinet American Optical modelo TP800 para ser incluidas en parafina 56°-58°. Los cortes se hicieron con un microtomo American Optical modelo 820 Spencer, utilizando navajas desechables Leica.

Se realizaron cortes de 7µm a los que se les aplicó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (Aguilar, *et al.*, 1996). Las preparaciones se observaron en un microscopio Nikon SE.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la prueba no paramétrica de probabilidad exacta de Fisher con el programa True Epistat (1978).

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios en las 3 réplicas de los 3 tratamientos y el grupo control)

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Control
Temperatura (°C)	22	22	22	22
Oxígeno (ppm)	5.3	5.3	5.3	5.3
pH	7.2	7.2	7.2	7.2
Amoniaco (mg)	0.6	0.6	0.6	0.6
Fosfatos (mg)	3	3	3	3
Dureza (mg)	154	154	154	154
Nitritos (mg)	0.5	0.5	0.5	0.5

Cuadro 2. Mortalidades observadas a lo largo del bioensayo

	T15	T30	T45	T60	Total
Grupo 1	4	6	9	9	28
Grupo 2	2	6	8	8	24
Grupo 3	5	6	8	6	25
Control	0	0	0	0	0

Hubo un total de 77 muertes, representan el 42% de los organismos al comenzar el bioensayo.

Cuadro 3. Resultados del análisis de Probabilidad exacta de Fisher por grupo.

Grupo 1				
Esteatosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0657	0.0462	0.0346
T30			0.0449	0.0332
T45				0.042
T60				
Melanohistiocitomas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0121	0.0052	0.0038
T30			0.005	0.0037
T45				0.042
T60				
Fibrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0121	0.0052	0.0038
T30			0.005	0.0037
T45				0.042
T60				
Prot. Tubulo Renal	T15	T30	T45	T60
T15		0.0897	0.0135	0.0135
T30			0.0254	0.0254
T45				0
T60				

Cuorp. Inc. Citoplas.	T15	T30	T45	T60
T15		0.0121	0.0052	0.0052
T30			0.005	0.005
T45				0
T60				
Necrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0121	0.0038	0.0038
T30			0.0037	0.0037
T45				0
T60				
Fibromas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0121	0.0038	0.0038
T30			0.0037	0.0037
T45				0
T60				

TESIS DE
FALLA DE

Grupo 2				
Esteatosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.1276	0.0127	0.0127
T30			0.034	0.034
T45				0
T60				
Melanohisticitomas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0485	0.0287	0.0287
T30			0.0204	0.0204
T45				0
T60				
Fibrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0372	0.0287	0.0287
T30			0.0262	0.0262
T45				0
T60				
Prot. Tubulo Renal	T15	T30	T45	T60
T15		0.0721	0.0155	0.0016
T30			0.034	0.0038
T45				0.0072
T60				

Cuorp. Inc. Citoplas.	T15	T30	T45	T60
T15		0.0055	0.0041	0.0032
T30			0.0842	0.0204
T45				0.0441
T60				
Necrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0372	0.0287	0.0287
T30			0.0262	0.0262
T45				0
T60				
Fibromas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0372	0.0287	0.0287
T30			0.0262	0.0262
T45				0
T60				
T60				

TESIS CON
FALLA DE EDICIÓN

Grupo 3				
Esteatosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0562	0.0018	0.002
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Melanohisticitomas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0575	0.0015	0.0016
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Fibrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0575	0.0015	0.0016
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Prot. Túbulo Renal	T15	T30	T45	T60
T15		0.056	0.0023	0.0024
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Cuorp. Inc. Citoplas.	T15	T30	T45	T60
T15		0.0183	0.0348	0.0016
T30			0.0455	0.0075
T45				0.0051
T60				

Necrosis	T15	T30	T45	T60
T15		0.0575	0.0015	0.0016
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Fibromas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0575	0.0015	0.0016
T30			0.0051	0.0052
T45				0.0119
T60				
Lipomas	T15	T30	T45	T60
T15		0.0076	0.0038	0.002
T30			0.0341	0.0176
T45				0.0455
T60				
Cuorp. Inc. Intranuc.	T15	T30	T45	T60
T15		0.0183	0.0348	0.0016
T30			0.0455	0.0075
T45				0.0051
T60				

Cuadro 4. Resultados del análisis de Probabilidad exacta de Fisher por tiempo entre grupos.

Esteatosis T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0379	0.0481
Grupo 2			0.0927
Grupo 3			
Melanohistio. T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0077	0.0055
Grupo 2			0.049
Grupo 3			
Fibrosis T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0077	0.0055
Grupo 2			0.049
Grupo 3			
Prot. Tub. Ren T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0752	0.0908
Grupo 2			0.1294
Grupo 3			
Cuorp. Inc .Cit. T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0122	0.0076
Grupo 2			0.0077
Grupo 3			
Necrosis T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0077	0.0055
Grupo 2			0.049
Grupo 3			
Fibromas T15	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0077	0.0055
Grupo 2			0.049
Grupo 3			

Esteatosis T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0276	0.0219
Grupo 2			0.0875
Grupo 3			
Melanohistio. T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0052	0.0024
Grupo 2			0.0546
Grupo 3			
Fibrosis T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0039	0.0024
Grupo 2			0.0686
Grupo 3			
Prot. Tub. Ren T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.1198	0.0686
Grupo 2			0.0875
Grupo 3			
Cuorp. Inc .Cit. T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0052	0.0019
Grupo 2			0.0219
Grupo 3			
Necrosis T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0039	0.0024
Grupo 2			0.0686
Grupo 3			
Fibromas T30	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0039	0.0024
Grupo 2			0.0686
Grupo 3			

Esteatosis T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.043	0.0049
Grupo 2			0.0072
Grupo 3			
Melanohistio. T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.043	0.0769
Grupo 2			0.0441
Grupo 3			
Fibrosis T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.043	0.0049
Grupo 2			0.0072
Grupo 3			
Prot. Tub. Ren T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0071
Grupo 2			0.0072
Grupo 3			
Cuorp. Inc .Cit. T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0778	0.0778
Grupo 2			0
Grupo 3			
Necrosis T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0071
Grupo 2			0.0072
Grupo 3			
Fibromas T45	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0071
Grupo 2			0.0072
Grupo 3			

Esteatosis T60	Grupo1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0073
Grupo 2			0.0074
Grupo 3			
Melanohistio. T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0632
Grupo 2			0.0641
Grupo 3			
Fibrosis T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0073
Grupo 2			0.0074
Grupo 3			
Prot. Tub. Ren T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.0071	0.0073
Grupo 2			0.0119
Grupo 3			
Cuorp. Inc .Cit. T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.043	0.005
Grupo 2			0.0074
Grupo 3			
Necrosis T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0073
Grupo 2			0.0074
Grupo 3			
Fibromas T60	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		0.062	0.0073
Grupo 2			0.0074
Grupo 3			

*T15= 15 días; T30= 30 días; T45= 45 días y T60= 60 días. Los números en **Negritas** corresponden a datos estadísticamente significativos.

Como se puede ver en los resultados estadísticos, existen diferencias significativas durante el bioensayo (60 días) en cada uno de los grupos; además los hay también entre tratamientos en cada uno de los períodos, por lo tanto son aceptadas las Hipótesis alternas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

Las lesiones encontradas se localizan en intestino, riñón y en hígado; siendo este último el más afectado por los diversos tratamientos.

En riñón hubo presencia de abscesos en túbulo renales, gran acumulación de proteína en la luz de los túbulo renales, necrosis, melanohistiocitomas y descamación del epitelio de los túbulo renales.

En el hígado se identificaron lesiones del tipo de melanohistiocitomas, fibromas, cuerpos e inclusión citoplasmáticos e intranucleares y esteatosis .

En intestino se observaron tumores en el tejido conjuntivo del intestino.

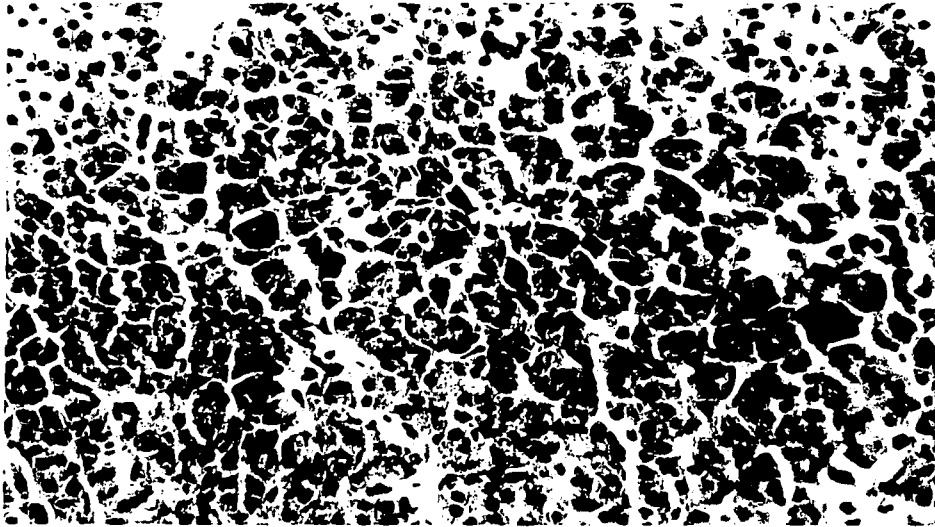


Figura 1. Hígado de un control SCPA (400x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 2. Melanohistiocitomas en un organismo del Grupo 1, a los 15 días (i: intestino, h: hígado, cb: conducto biliar 400x).

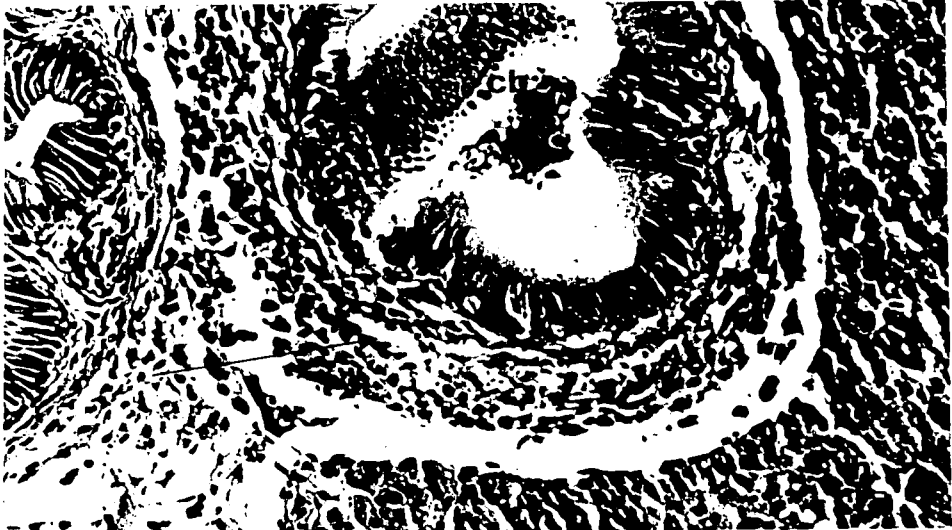


Figura 3. Fibrosis peribiliar en Grupo 1 a los 30 días (cb: conducto biliar, h: hígado, 400x).

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

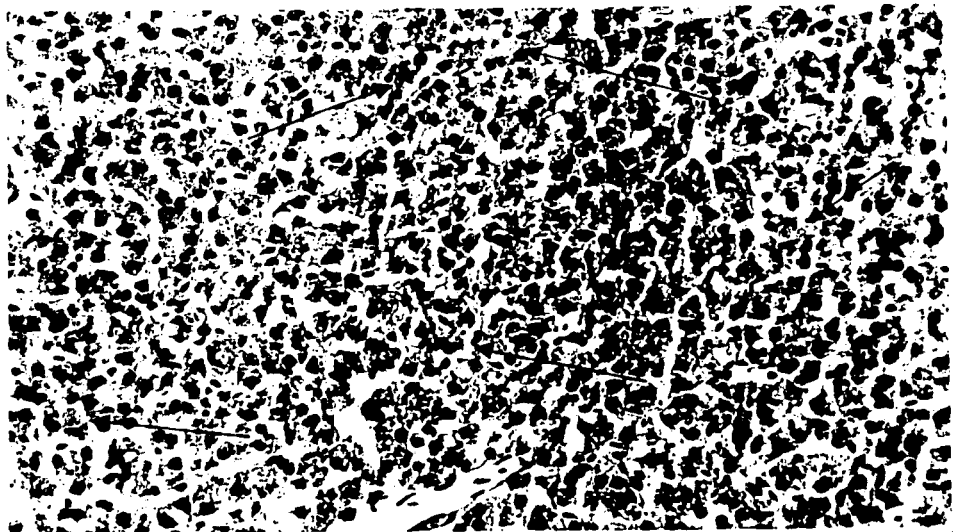


Figura 4. Cuerpos de Inclusión Citoplasmáticos (agregosomas) en el hígado de un organismo del Grupo 1 a 60 días (400x).

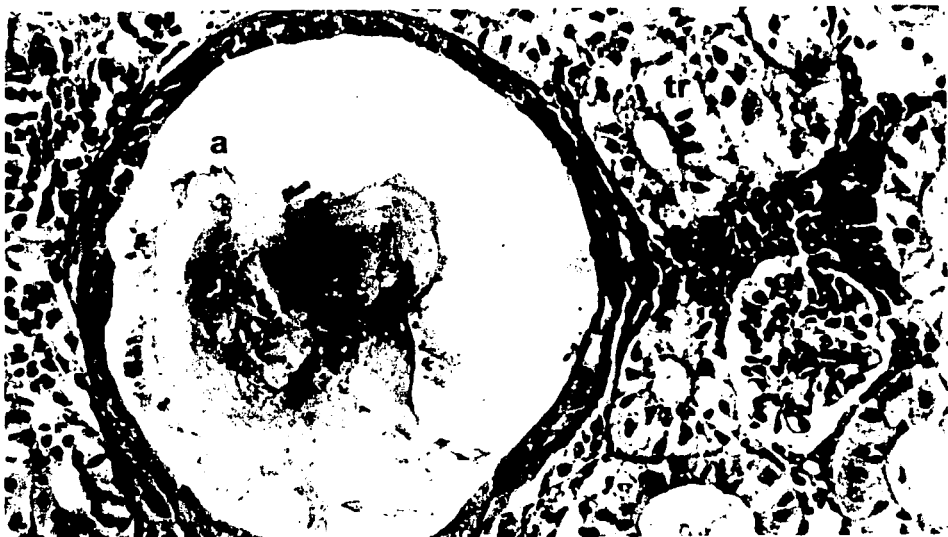


Figura 5. Absceso en un túbulo renal de un individuo de 45 días, Grupo 2 (a: absceso, tr: túbulo renal, gl: glomérulo, 400x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

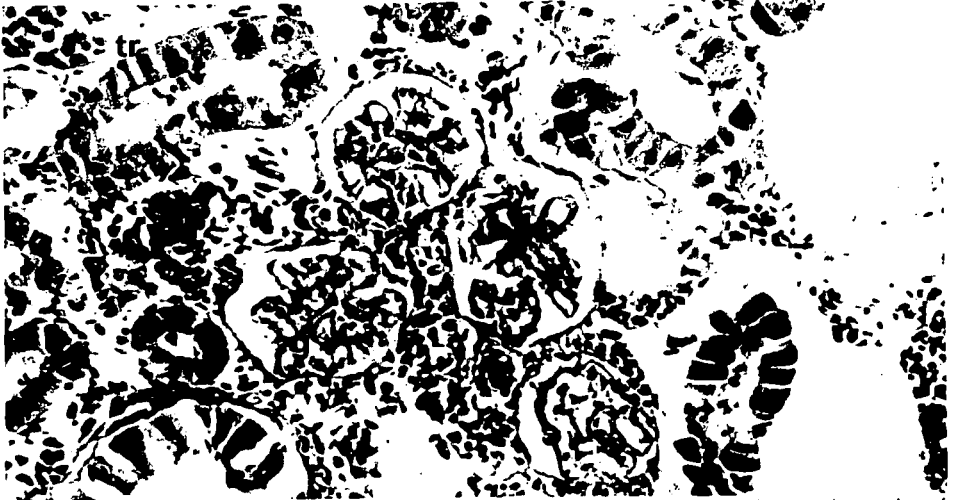


Figura 6. Necrosis en riñón de un organismo Grupo 2 a 45 días (tr: túbulo renal, g: glomérulo, 400x).

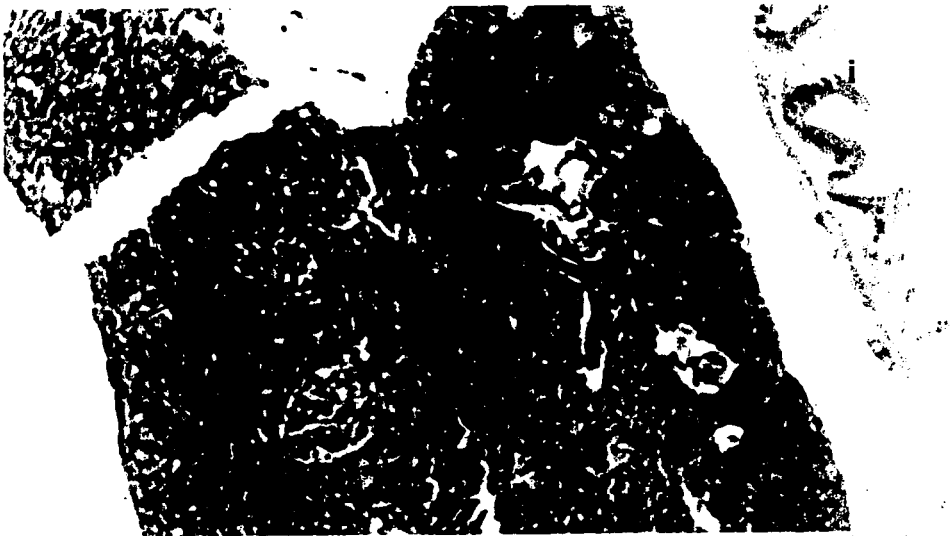


Figura 7. Melanohistiocitomas en un organismo del Grupo 2 a los 15 días (h: hígado, i: intestino, 400x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

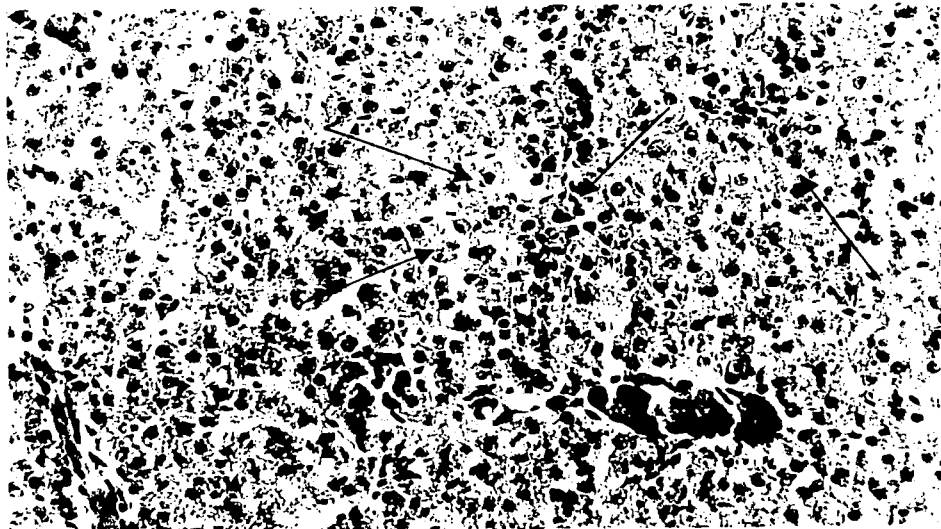


Figura 8. Cuerpos de Inclusión Citoplasmáticos (agregosomas) en un organismo del Grupo 2 a los 30 días (400x).

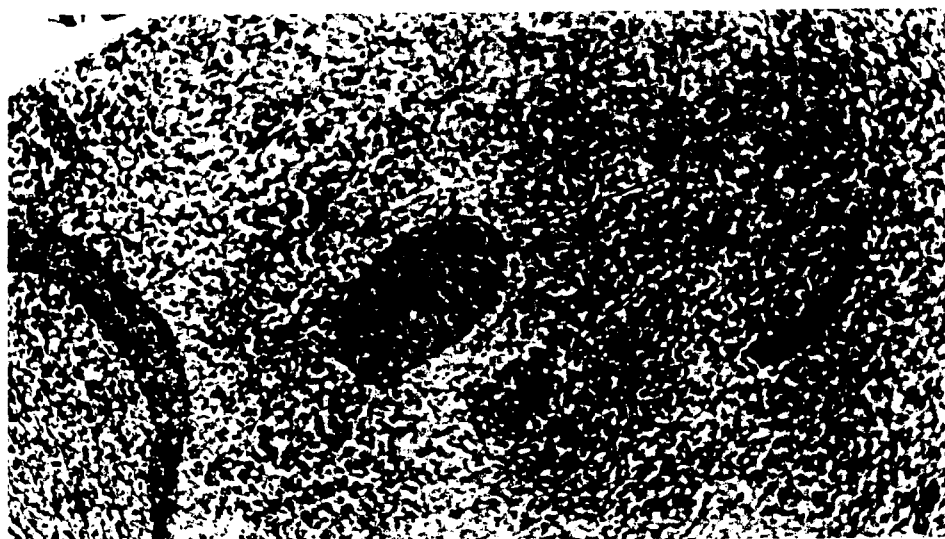


Figura 9. Melanohistiocitoma en hígado, Grupo 2 con 45 días (100x).

TESIS CON
FALLA LE OR GEN

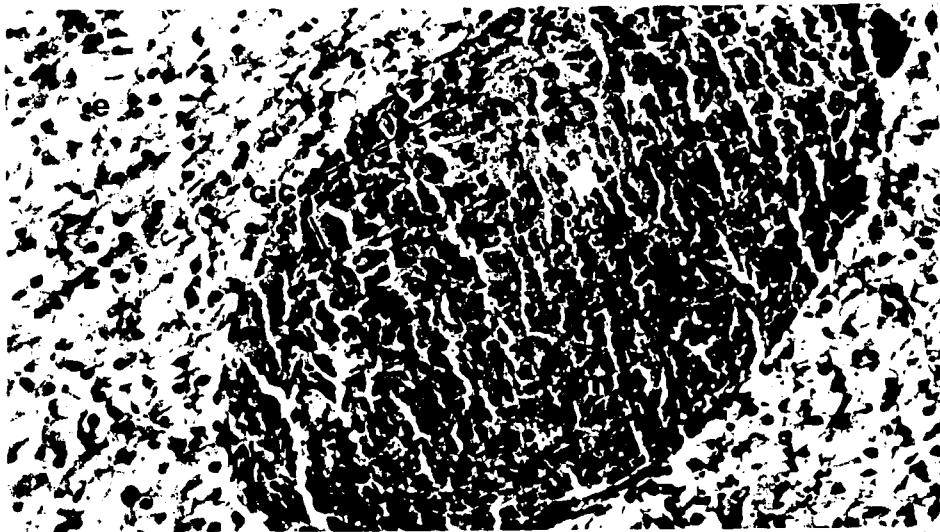


Figura 10. Melanohistiocitoma en hígado, Grupo 2 con 45 días (e: esteatosis, m: melanohistiocitoma, cic: cuerpos de inclusión citoplasmáticos, 400x).

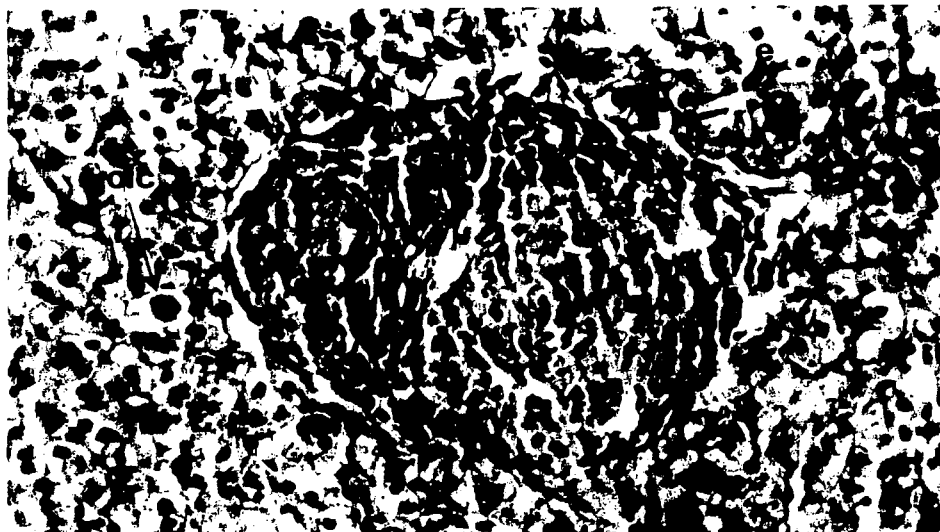


Figura 11. Melanohistiocitoma de un organismo del Grupo 2 a los 45 días (e: esteatosis, cic: cuerpo de inclusión citoplasmático, m: melanohistiocitoma, 400x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 12. Lipoma en hígado de un organismo del Grupo 3 a 60 días (400x).

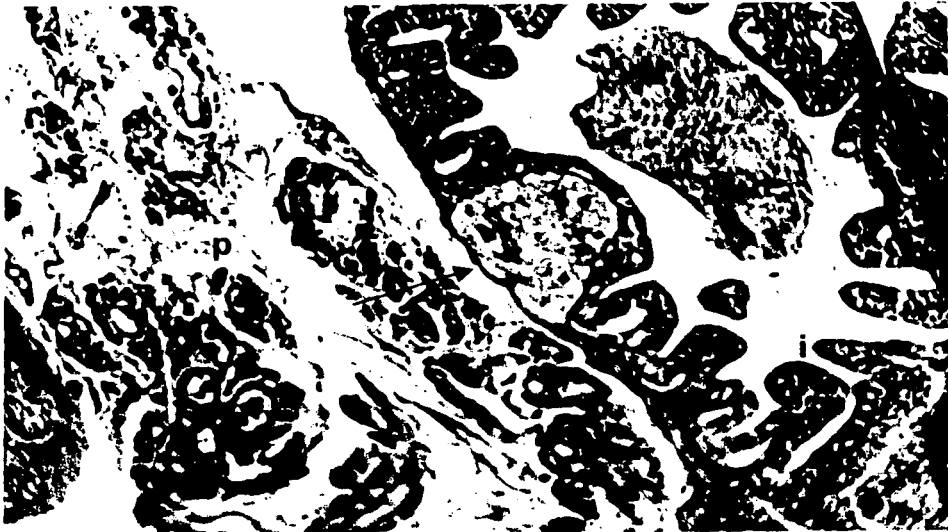


Figura 13. Tumor en el intestino de un organismo del Grupo 3 a los 45 días (p: páncreas, i: intestino, 400x).

TESIS CON
FALLA LE OR:GEN



Figura 14. Melanohistiocitoma en riñón de un organismo del Grupo 3 a 30 días (400x).

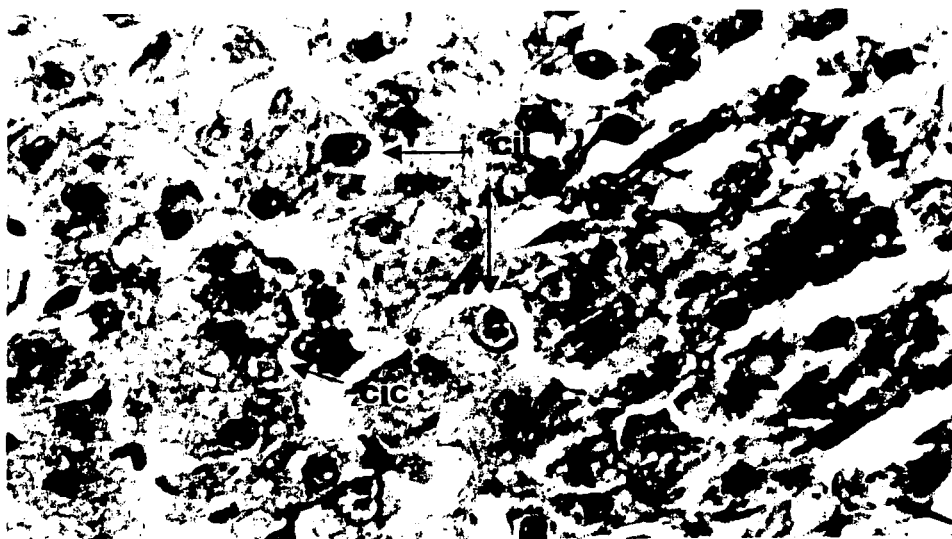


Figura 15. Cuerpos de Inclusión Citoplasmáticos (cic) e Intranucleares (cii) de un organismo del Grupo 3 a 45 días (1000x).

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

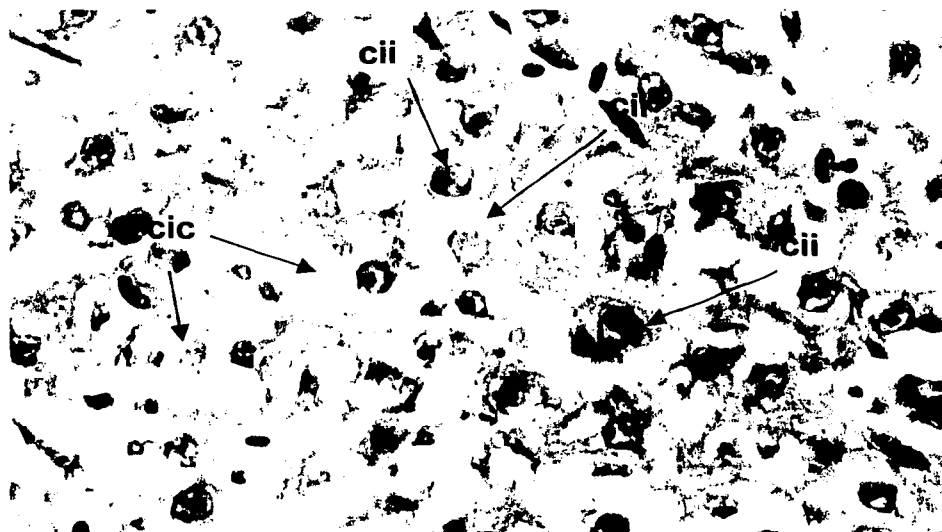


Figura 16. Cuerpos de inclusión citoplasmáticos (cic) e intranucleares (cii) de un organismo del Grupo 3 a 60 días (1000x).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las anteriores imágenes podemos observar como gradualmente el organismo se fue intoxicando por la acumulación de la FD, evidencia de esto es el aumento en la frecuencia de las lesiones conforme el tiempo aumentó.

Aunque no se presentaron en el análisis estadístico debido a que solo se encontró una vez este tipo de lesiones, es importante darles mención. En los grupos tratados se hallaron un tumor en el intestino (figura 13), un absceso de naturaleza no bacteriana en un túbulo del riñón (figura 5) y en el grupo control se encontró un absceso de origen bacteriano, lo cual nos indica la capacidad bactericida de la FD para evitar la formación de abscesos por causa de bacterias.

Como muestran los datos estadísticos, existe una relación tanto dosis dependiente (entre los tres tratamientos) como a lo largo del bioensayo en cada uno de los grupos tratados (tiempo dependiente). Sin embargo, esto no aplica para todas las lesiones. Por ejemplo, la proteinuria (proteína en la luz del túbulo renal) puede deberse a otros factores y no precisamente a la FD, ya que se encontró en tanto en los grupos tratados como en los controles desde las primeras

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muestras de 15 días, quizás pueda deberse a contaminantes del agua como metales pesados por ejemplo.

En las figuras 6 y 14 se puede observar como se va degenerando el riñón, los núcleos se vuelven picnóticos, lo que indica necrosis y descamación del epitelio renal, además de la proteinuria encontrada desde las primeras muestras.

El origen de las lesiones encontradas en el hígado puede explicarse de la siguiente manera. El hígado sintetiza, concentra y secreta ácidos biliares y excreta sustancias tóxicas. El daño inducido a los hepatocitos y a las células de los conductos biliares por drogas puede inducir colestasis. La colestasis causa una acumulación intrahepática de ácidos biliares tóxicos y productos de excreción, los cuales promueven un daño hepático posterior. Afortunadamente, el hígado posee una enorme capacidad regenerativa, pero la regeneración de los hepatocitos perdidos por muerte celular necrótica y apoptótica puede enmascarar el descubrimiento de un daño inducido por drogas.

Células hepáticas no parenquimatosas, células de Kupffer, células del endotelio sinusoidal y células estrelladas (almacén de grasa) y leucocitos reclutados recientemente como monocitos y neutrófilos, por ejemplo, pueden contribuir a la patogénesis de la toxicidad hepática. Las células de Kupffer y los neutrófilos son una fuente de citocinas y quimiocinas y de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) y de nitrógeno (NOS) las cuales promueven el estrés oxidativo y daño inducido por sustancias tóxicas.

La toxicidad en el hígado inducida por drogas (al igual que sepsi/endotoxemia, hepatitis alcohólica e isquemia) está caracterizada por una inflamación local y sistémica con presencia de macrófagos y neutrófilos dentro del sistema vascular del hígado. La principal función de estos fagocitos es el destruir microorganismos invasores y remover las células muertas y restos celulares en preparación para la regeneración tisular. Debido a la naturaleza de los mediadores tóxicos generados por los fagocitos, las células saludables también pueden ser afectadas, lo cual puede agravar la lesión original.

Las células hepáticas estrelladas desempeñan un papel principal en la respuesta fibrótica del daño hepático, y ROS activa a las células estrelladas. CYP2E1 produce ROS, la expresión de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CYP2E1 etanol inducida, puede promover la biosíntesis de colágeno tipo 1 por las células estrelladas (Jaeschke, *et al.*, 2002)

La hipótesis fue acertada, ya que las lesiones se incrementaron conforme al tiempo y entre los tratamientos, siendo en la dosis terapéutica (grupo 1) donde se presentaron menos lesiones en comparación con el tratamiento con AMOZ (grupo 3).

La mortalidad fue muy alta (42%) y muy probablemente se debió a la FD, ya que los parámetros fisicoquímicos del agua eran los mismos para las tres réplicas de los tres grupos y desafortunadamente no se realizaron cortes de los organismos que morían, debido a la rápida descomposición del animal.

A pesar de la alta toxicidad que posee la FD, es poco probable que un consumidor ingiera tales cantidades de FD por consumir un animal tratado con esta droga, debido a que en estas condiciones se probaron dosis altas (grupo 2) y por tiempos prolongados, cosa que normalmente no ocurre, además de que es improbable que el consumidor ingiera tales cantidades durante 60 días. En las figuras 9 y 10 encontramos asociados al melanohistiocitoma, con cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Estos cuerpos de inclusión no pueden ser de naturaleza viral, ya que a excepción de los controles, se encontraron en los tres grupos tratados.

Por otra parte, existen estudios de terapia génica utilizando el citocromo P450. El objetivo de la terapia génica contra el cáncer consiste en administrar una droga que active al gen CYP de las células cancerosas, permitiendo la formación de metabolitos citotóxicos activados directamente dentro del tumor más que en el mismo hígado (Baldwin, *et al.*, 2003). De este modo se puede utilizar la misma ruta metabólica por la cual en este estudio causó tumores, para contrarrestarlos.

Sin embargo, esta tecnología aún no está desarrollada del todo. Un problema con todas las terapias génicas (incluyendo esta terapia de enzimas dirigidas basadas en genes CYP) es la dificultad de lograr una expresión eficiente del gen terapéutico a lo largo del tumor. Las células del tumor pueden no expresar el gen terapéutico y continuar proliferándose. Al presente, ningún vector de terapia génica o método de entrega puede asegurar la expresión del gen terapéutico en un 100% de las células de tumor *in vivo*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Morales, M., B. Coutiño Bello y P. Salinas Rosales. 1996. Manual General de Técnicas Histológicas y Histoquímicas. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. 130 pp.
- Baldwin, A., Z. Huang, Y. Jounaidi and D. J. Waxman. 2003. Identification of novel enzyme-prodrug combinations for use in cytochrome P450-based gene therapy for cancer. Archives of Biochemistry and Biophysics. 409:197-206.
- Bergé, J-B, R. Feyereisen and M. Amichot. 1998 Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353: 1701-1705.
- Draisci, R., L. Giannetti, L. Lucentini, L. Palleschi, G. Brambilla, L. Serpe and P. Gallo. 1997. Determination of nitrofurantoin residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by chromatography-ionspray mass spectrometry. Journal of Chromatography. 777: 201-211.
- Ferguson, H. W. 1989. Systemic Pathology Of Fish. Iowa State University Press.
- Galeano Díaz, T., A. Guiberteau Cabanillas, M. I. Acedo Valenzuela, C. A. Correa and F. Salinas. 1997. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography. 764: 243-248.
- Galeano Díaz, T., L. López and F. Salinas. 1994. Kinetic Determination of Furazolidone and Furaltadone Based on Alkaline Hydrolysis Reaction. Microchemical Journal. 49: 61-68.
- Gonzalez, F. J. and S. Kimura. 2003. Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. Archives of Biochemistry and Biophysics. 409: 153-158.
- Hegelund, T. and M. C. Celander. 2003. Hepatic versus extrahepatic expresión of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*). Acuatic Toxicology. 64: 277-291.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Hernández, M., L. F. Bückle. 2002. Temperature tolerance polygon of *Poecilia sphenops* Valenciennes (Pisces: Poeciliidae). *Journal of Thermal Biology*. 27: 1-5
- Hernández, M., L. F. Bückle and S. Espina. 2002. Temperature preference and acclimation in *Poecilia sphenops* (Pisces, Poeciliidae). *Aquaculture Research*. 33: 933-940.
- Huveneers-Oorsprong, M. B. M., L. A. P. Hoogenboom and H. A. Kuiper. 1997. The use of the MTT Test for Determining the Cytotoxicity of Veterinary Drugs in Pig Hepatocytes. *Toxicology in vitro*. 11: 385-392.
- Ito, K., K. Ishida, A. Takeuchi, A. Nii, H. Okamiya and K. Doi. 2002. Nitrofurazone induces non-regenerative hepatocyte proliferation in rats. *Exp. Toxic Pathol*. 53: 421-426.
- Jaeschke, H., G. J. Gores, A. J. Cederbaum, J. A. Hinson, D. Pessayre and J. J. Lemasters. 2002. FORUM. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*. 65: 166-176.
- Kalil, S. and M. A. El-Ries. 2002. AAS and AES determination of furaltadone, methadone and trazodone in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 27: 117-122.
- Leitner A., P. Zöllner and W. 2001. Lindner. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 939: 49-58.
- Mahedero, M. C., T. Galeano and S. Galán. 2002. Resolution of ternary mixtures of nitrofurantoin, furaltadone and furazolidone by partial least-square analysis to the spectrophotometric signals after photo-decomposition. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 29: 477-485.
- Markowitz, J. S., C. L. DeVane, K. D. Chavin, R. M. Taylor, Y. Ruan and J. L. Donovan. 2003. Effects of garlic (*Allium sativum* L.) supplementation on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 74 (2): 170-177.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Murugasu-Oei, B. and Dick, T. 2000. Bactericidal activity of nitrofurans against growing and dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 917-919.
- Neuman, M. G., R. G. Cameron, J. A. Haber, G. G. Katz, I. M. Malkiewicz and N. H. Shear. 1999. Inducer of Cytochrome P450 2E1 Enhance Methotrexate-Induced Hepatocytotoxicity. *Clinical Biochemistry*. 32, 7: 519-536.
- Pirmohamed, M and B. K. Park. 2003. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology*. 192 (1): 23-32.
- Rahden-Staron, I., Czeczot, H. and Szumilo, M. 2001. Induction of rat liver cytochrome, P450 isoenzymes CYP 1A y CYP 2B by different fungicides, nitrofurans, and quercetin. *Mutation Reserch*. 498: 57-66.
- Roberts, R. J., 1989. *Fish Pathology 2nd Edition*. Baillière Tindall. London. 153-172.
- Rock, D. A., Perkins, B. N. S., Wahlstrom and Jones, J. P. 2003. A method for determining two substrates binding in the same active site of cytochrome P450_{BM3}: an explanation of high energy ω product formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 416: 9-16.
- Teraoka, H., W. Dong, Y. Tsujimoto, H. Iwasa, D. Endoh, N. Ueno, J. J. Stegeman, R. E. Peterson and T. Hiraga. 2003. Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304: 223-228.
- Yen J-H, W-C Tsai, C-J Chen, C-H Lin, T-T Ou, C-J Hu and H-W Liu. 2003. Cytochrome P450 1A1 and manganese superoxide dismutase genes polymorphism in ankylosing spondylitis. *Immunology Letters*. 88: 113-116.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE: Técnica de Hematoxilina-Eosina.

Esta técnica nos da un panorama general, que nos permite decidir que estructuras en especial queremos resaltar posteriormente. Los núcleos tiñen de color morado, mientras que el citoplasma tiñe de naranja a rojo. Reactivos: Hematoxilina de Harris y Eosina, xilol, alcohol al 100%, 96%, 70%, 50%, agua destilada y agua corriente.

Procedimiento:

1. Fijación en formol 10%.
2. Deshidratación e inclusión en parafina.
3. Cortes de un grosor de 6 a 8 micras.
4. Montaje de los cortes en portaobjetos.
5. Desparafinar e hidratar (xilol, alcohol 100%, 96%, 70% y 50%)
6. Colocar los cortes en agua destilada
7. Tefir con hematoxilina de Harris de 40 segundos a 5 minutos.
8. Lavar con agua corriente para virar el color carmesí a violáceo.
9. Lavar con agua destilada.
10. Deshidratar en alcoholes al 50% y 70%.
11. Tefir con Eosina de 1 a 2 segundos.
12. Continuar la deshidratación en alcoholes al 96%, 100%, xilol y montar.

Fórmula para la Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina	1 g
Óxido rojo de mercurio	0.5 g
Alumbre de amonio o potasio	20 g
Alcohol absoluto	100 ml
Agua destilada	200 ml

Disolver la Hematoxilina en alcohol, en baño María y taparlo. Disolver el alumbre en 100 ml de agua calentándolo. Mezclar las dos soluciones y lavar los dos recipientes en los restantes 100 ml de agua destilada. Hervir lo más rápido posible, en cuanto empieza a hervir, agregar el óxido rojo (poco a poco y con cuidado pues puede explotar), llegando al color púrpura, dejar enfriar. Filtrar en papel filtro 10 veces, agregar 3 a 5 gotas de ácido acético por cada 10 ml.

Fórmula de la Eosina:

Eosina de Bluish	1 g
Orange G	1g
Alcohol al 70%	100 ml

Disolver la Eosina y el Orange G en el alcohol, agregando poco a poco las dos sustancias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN