



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

**INVESTIGACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS DE
COMPUESTOS DE NUEVA SÍNTESIS (fenilcarbamatos de etilo) EN
RATA, MEDIANTE UN ESTUDIO HISTOLÓGICO.**

TESIS.

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**

PRESENTA:

BASTIDA ROSAS MARCO ANTONIO.

ASESORES:

M.V.Z. Jorge Torres Martínez.

M. en FC. Ma. Eugenia Posada Galarza.

Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2006



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.

RECONOCIMIENTOS:

Mi reconocimiento a M. En FC Ma. Eugenia Posada Galarza, por todos sus conocimientos y experiencias compartidas en la realización de este trabajo. Agradezco profundamente la disposición que me brindó en todo momento.

A M.V.Z. Jorge Torres Martínez mi admiración y reconocimiento por todo el tiempo invertido en la parte experimental de este trabajo y por todas los conocimientos compartidos.

A el Dr. Enrique Ángeles Anguiano por todas las facilidades prestadas y especialmente por proporcionar los compuestos de nueva síntesis sometidos al estudio.

De la misma forma a quienes con su apoyo contribuyeron en este trabajo de investigación : Dr. Andrés Romero por facilitar un espacio en el bioterio de la FESC.

M.V.Z. Germán Garrido por su apoyo en el procesamiento histológico de todas las muestras.

ÍNDICE GENERAL.

	<i>PÁG.</i>
<i>I. Índice de figuras</i>	4
<i>II. Índice de tablas</i>	5
1. Introducción.....	6
2. Generalidades.....	8
2.1 Desarrollo de fármacos.....	8
2.1.1 Normas en el desarrollo de nuevos fármacos.....	8
2.1.2 Organismos que realizan investigación farmacéutica.....	11
2.1.3 Investigadores en el desarrollo de fármacos.....	11
2.2 Estudios preclínicos.....	12
2.2.1 Evaluación de la toxicidad de los fármacos.....	13
2.3 Estudios clínicos.....	14
2.3.1 Estudios de fase I.....	16
2.3.2 Estudios de fase II.....	17
2.3.3 Estudios de fase III.....	18
2.3.4 Estudios de fase IV.....	18
3. Reacciones adversas.....	20
3.1 Definición.....	20
3.2 Clasificación.....	20
3.3 Factores causantes de reacciones adversas.....	25
4. Toxicidad.....	28
4.1 Definición.....	28
4.2 Clasificación.....	29
4.3 Potencia.....	30
5. Características generales de los bencimidazoles-carbamatos.....	31
5.1 Síntesis química.....	31
5.2 Mecanismo de acción.....	33
5.3 Farmacocinética.....	35
6. Anatomía e histofisiología normales de los órganos de interés para el estudio.....	36

6.1 Estómago.....	36
6.1.1 Anatomía.....	36
6.1.2 Histología.....	37
6.1.3 Fisiología.....	40
6.2 Intestino delgado.....	41
6.2.1 Anatomía.....	41
6.2.2 Histología.....	42
6.2.3 Fisiología.....	44
6.3 Hígado.....	47
6.3.1 Anatomía.....	47
6.3.2 Histología.....	47
6.3.3 Fisiología.....	50
6.4 Riñón.....	54
6.4.1 Anatomía.....	54
6.4.2 Histología.....	54
6.4.3 Fisiología.....	57
6.5 Cerebro.....	58
6.5.1 Anatomía.....	58
6.5.2 Histología.....	60
6.5.3 Fisiología.....	64
7. Factores de susceptibilidad a toxicidad por fármacos.....	65
7.1 Estómago e Intestino delgado.....	65
7.2 Hígado.....	67
7.3 Riñón.....	68
7.4 Cerebro.....	70
8. Fundamentos histológicos.....	72
8.1 Pasos de la técnica histológica.....	73
8.2 Revisión microscópica de las muestras.....	75
9. Objetivos.....	78
10. Metodología.....	79
10.1 Fase de inducción.....	79
10.2 Procesamiento de las muestras.....	82

10.3 Revisión microscópica.....	84
11. Resultados.....	85
11.1 Características generales.....	85
11.2 Control de peso.....	86
11.3 Revisión histológica.....	88
12. Discusión.....	93
13. Conclusiones.....	95
14. Anexos.....	Error!
	Reference source not found.
14.1 Preparación del fijador de Bouin.....	96
14.2 Tren de coloración de Hematoxilina-Eosina.....	97
14.3 Análisis estadístico (diferencia de proporciones).....	98
15. Referencias bibliográficas.....	99

I. INDICE DE FIGURAS.

<i>FIGURA</i>	<i>PÁG.</i>
1. Desarrollo de nuevos fármacos y normas.....	10
2. Fases de obtención e investigación de un fármaco.....	16
3. Principales factores que causan reacciones adversas.....	26
4. Anatomía del estómago.....	36
5. Capas histológicas del estómago.....	39
6. Tipos de células epiteliales del estómago.....	39
7. Anatomía del intestino delgado.....	41
8. Características histológicas de la pared del intestino delgado.....	45
9. Tipos de células epiteliales en intestino delgado.....	45
10. Anatomía del hígado (A); formas de ver el hígado para su estudio histológico (B).....	48
11. Lobulillo hepático clásico (A); principales características histológicas de una porción del lobulillo hepático (B).....	49
12. Anatomía del riñón.....	54
13. Dos tipos de nefronas y sus principales componentes.....	56
14. Características de las células epiteliales en la nefrona.....	56
15. Anatomía del cerebro.....	60
16. Tipos de neuronas y principales características histológicas.....	61
17. Localización de sustancia gris y sustancia blanca en cerebro.....	63
18. Representación de una sinápsis.....	64
19. Esquema en el que se ilustran los diferentes aspectos de los cortes efectuados en una estructura tubular.....	77
20. Gráfico de pesos de las ratas tratadas con LQM-919.....	86
21. Gráfico de pesos de las ratas tratadas con LQM-996.....	87
22. Fotografías de estómago (control y tratado).....	91
23. Fotografías de intestino delgado (control y tratado).....	91
24. Fotografías de hígado.....	92
25. Fotografías de riñón.....	92
26. Fotografías de cerebro.....	92

II. ÍNDICE DE TABLAS.

<i>TABLA</i>	<i>PÁG.</i>
1. Algoritmo para estimar la causalidad de una reacción adversa (Según Naranjo).....	Error!
Reference source not found. Error! Reference source not found.	24
2. Categorías toxicológicas según DL ₅₀	30
3. Coloración y reacciones histológicas frecuentes.....	75
4. Actividades desarrolladas en la experimentación.....	79
5. Cronología de actividades.....	79
6. Número de sacrificios por cada semana.....	79
7. Tren de deshidratación con alcohol para las muestras.....	83
8. Pesos correspondientes a los animales tratados con Br-FCE (LQM-919).....	86
9. Pesos registrados correspondientes al grupo control.....	87
10. Pesos correspondientes a los animales tratados con CI-FCE (LQM 996).....	87
11. Resultados del análisis estadístico por diferencia de proporciones (al 95% de confianza) de los daños histológicos de cada órgano para los dos compuestos y el lote control.....	88

1. INTRODUCCIÓN

Desde que existe un registro de estadísticas vitales (1922) hasta nuestros días, las enfermedades infecciosas ocupan los primeros lugares como causas de enfermedad y muerte. En conjunto las enfermedades infecciosas y parasitarias causan casi la mitad del total de las muertes ocurridas en los países en desarrollo, sin embargo la morbilidad que ocasionan afecta a un número considerablemente mayor de personas y quizá refleje mejor los aspectos de salud pública de dichas enfermedades. (36), (37).

En general, la letalidad de casi todas las enfermedades infecciosas particularmente en lactantes y preescolares menores, es mas alta en México que en países desarrollados, así tenemos que en 1975 casi el 40% de las muertes registradas ocurrieron en menores de 15 años, de las cuales más de la cuarta parte se debió a enfermedades infecciosas y parasitarias. (36), (38).

Existen fármacos para el tratamiento de las infecciones parasitarias como albendazol y mebendazol, sin embargo la investigación farmacéutica busca siempre mejorar sus características o bien el desarrollo de nuevos compuestos con mayor eficiencia y espectro de acción y menor toxicidad.

Por esto en el Laboratorio de Química Medicinal, de la Unidad de Posgrado FESC-UNAM, recientemente se han sintetizados nuevos compuestos derivados de fenil carbamatos, mediante un diseño molecular, los cuales después de caracterizarlos por los métodos espectroscópicos comunes como Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y de Carbono-13, Espectroscopia de Infrarrojo y espectrometría de masas, se sometieron a pruebas de actividad antiparasitaria, en las que se encontró que estos compuestos presentan actividad anticestódica con eficacia de alrededor del 80% contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1, adicionalmente se observó que tienen efecto sobre la microvellosidades que recubren a los parásitos, (39), (42), (47). confirmando los estudios en los que se han reportado que los fenil carbamatos poseen afinidad por la β -tubulina, impidiendo la polimerización de las subunidades para conformar los microtúbulos. (17), (18), (19)

Con esto se tiene la posibilidad de emplear estos compuestos como agentes para tratar las infecciones por *Helicobacter pylori*; bacteria que se ha identificado como principal causa en úlceras gástricas y duodenales. Algunas estadísticas indican que en países en desarrollo, más de 75% de los adultos se ven afectados y la prueba más contundente es que *Helicobacter Pylori* está presente del 90% al 100% de los pacientes con gastritis crónica y úlcera duodenal, y que estas afecciones disminuyen desde 80% en individuos con la bacteria hasta menos del 20% en los que se erradica *H. Pylori*. (16), (24), (25).

Algunos problemas en la erradicación de *H. Pylori*, es que la mayoría de los antibióticos disponibles presentan sensibilidad in vivo muy baja contra *H. pylori*, ya que la bacteria vive en la capa de moco que recubre la mucosa gástrica y es difícil que los antibióticos alcancen allí las concentraciones requeridas, a esto se suma que la bacteria posee flagelos conformados de tubulina, siendo un factor determinante en la colonización de estómago e intestino delgado. (24), (41)

Con el desarrollo de estos nuevos compuestos es necesario llevar a cabo estudios para evaluar sus posibles reacciones adversas (tóxicas) y como parte de éstas, el presente trabajo investiga los daños histopatológicos, para lo cual se han empleado ratas Wistar administradas por vía oral con los compuestos en estudio, posteriormente se tomaron muestras de estómago, intestino delgado, hígado, riñón y cerebro, que después de ser procesadas mediante la técnica de rutina se sometieron a revisión microscópica.

2. GENERALIDADES

2.1 Desarrollo de fármacos.

Una de las principales funciones de la industria farmacéutica es crear fármacos sintéticos o biológicos que posean un impacto perceptible en los sistemas de atención sanitaria. Casi todos los compuestos candidatos, se obtienen por uno o más de los siguientes procedimientos. 1) Modificación química de una molécula conocida, 2) Estudios aleatorios sobre la actividad biológica de productos naturales 3) Diseño basado en la comprensión de mecanismos biológicos y estructura química. 4) El uso de la biotecnología y la clonación de genes para producir proteínas y péptidos mas grandes. ^{(4), (30)}

Una vez que se encuentra que un compuesto tiene un efecto determinado, se introducen numerosas modificaciones químicas y se prueban hasta encontrar algunas que reúnan las características adecuadas para una evaluación posterior. De esta forma pueden sintetizarse de 5 000 a 10 000 moléculas por cada fármaco nuevo útil que es introducido al mercado. ^{(1), (30)}

El desarrollo de un producto farmacéutico depende generalmente de la enorme y creciente base de conocimientos científicos generados por los organismos dedicados a la investigación, como son las universidades, los institutos privados, los laboratorios oficiales y las investigaciones industriales, todos ellos desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de los nuevos conocimientos que sirven de base para un nuevo producto. ⁽⁴⁾

2.1.1 Normas en el desarrollo de nuevos fármacos.

Existen autoridades reguladoras que según la International Conference Of Armonitation (ICH), se trata de organismos que tienen el poder de regular la investigación, e incluyen las autoridades que revisan los datos sometidos y las que realizan inspecciones. La Food and Drug Administration (FDA) es una agencia

federal de USA que protege al consumidor, y se encarga de las regulaciones para el desarrollo de los medicamentos. La FDA exige que se realice suficiente investigación farmacológica y toxicológica en animales antes de probar un producto en seres humanos. Los datos de los estudios mencionados deben enviarse a la FDA mediante una solicitud para la investigación de un nuevo fármaco⁽³⁾ (IND, del inglés *investigational New Drug*) este es un documento que ofrece una descripción completa del nuevo fármaco, dónde y cómo se fabrica información acerca de los controles y estándares de calidad, estabilidad, métodos analíticos, farmacología, toxicidad, documentación de su eficacia en animales, además informa de los médicos (y sus calificaciones) que realizarán los estudios clínicos y protocolos completos de los estudios clínicos propuestos. ^{(4), (30)}

Posteriormente, habrá de realizarse la investigación clínica, para lo cual se han definido tres fases, esto tiene como objetivo el generar los datos que se utilizan en la creación de la solicitud para comercializar un nuevo fármaco (NDA, del inglés *New Drug Application*), la FDA podrá devolverla al solicitante para que agregue datos clínicos básicos. *(figura 1)* ⁽³⁾

En México, el organismo en materia de salud que se encarga de establecer los lineamientos y principios generales a los que deberá someterse la investigación científica destinada a la salud, es la Secretaría de Salud (SSA). Conforme a lo dispuesto en la ley general de salud en su Título quinto, art. 97 al 99, donde establece los organismos que orientarán la investigación así como el establecimiento de las comisiones encargadas tanto de la investigación, ética y bioseguridad en caso necesario. En cuanto a la investigación en seres humanos, se desarrollará conforme a las bases establecidas en los artículos 100 a 103, y conforme a los aspectos éticos establecidos en su título segundo capítulo I.⁽⁴⁰⁾

En cuanto a la investigación farmacológica, en el capítulo II de la ley general de salud se señalan las disposiciones generales que deben cumplirse y en el título séptimo se establecen las normas en cuanto a la investigación en animales de experimentación. ⁽⁴⁰⁾

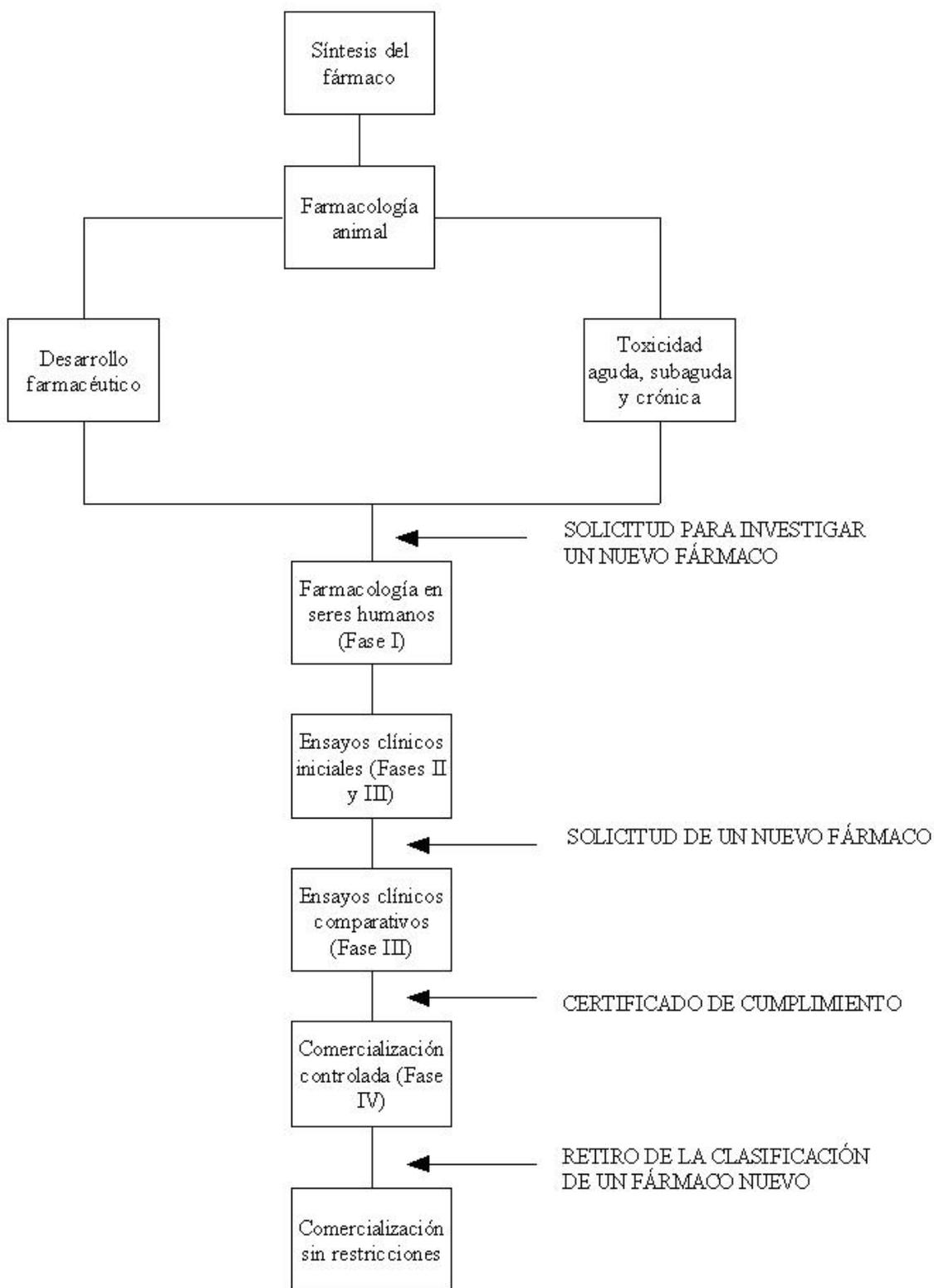


Figura 1. Desarrollo de nuevos fármacos y normas. En la figura se muestra las fases en el desarrollo de un nuevo fármaco y los requisitos que debe cumplir. (3)

2.1.2 Organismos que realizan investigación farmacéutica.

Las industrias biotecnológicas y farmacéuticas son líderes, entre todas las industrias, en el apoyo que brindan a la investigación y el desarrollo. Una significativa parte de cada dólar vendido se dedica a la investigación de fármacos. Por ejemplo, las compañías farmacéuticas de los Estados Unidos, dedicaron a investigación y el desarrollo cada año, entre 1967 y 1980, un promedio de más del 11% de sus ingresos totales por ventas en los Estados Unidos. Para 1986, esta cifra se aproximó al 15%. Desde 1970, las inversiones en investigación y el desarrollo se han duplicado cada 5 años. El costo promedio de desarrollo de un nuevo medicamento va de 100 millones hasta más de 500 millones de dólares, con tiempos que fluctúan entre los 8 y 15 años. ^{(4), (9), (30)}

La comunidad académica sigue jugando un papel vital en el desarrollo de nuevos fármacos. Su papel ha sido la evaluación clínica inicial, el desarrollo de bases racionales bioquímicas o fisiológicas para su producción, el conocimiento básico de los estados patológicos y la capacitación de los científicos. ⁽⁴⁾

2.1.3 Investigadores en el desarrollo de fármacos.

La investigación y desarrollo de medicamentos, no se compara con la de ningún otro producto, no sólo por su especial importancia social, sino por ser un proceso en el que deben intervenir de manera totalmente integrada numerosos profesionales, con diversas especializaciones (químicos, biólogos, farmacólogos, médicos, patólogos, farmacéuticos, etc.), tanto de empresas multinacionales, como de instituciones académicas, de investigación, hospitales, y autoridades gubernamentales. ⁽⁹⁾

Los especialistas en química orgánica sintetizan las nuevas sustancias candidatas así como también aíslan y caracterizan productos naturales, por ejemplo, los alcaloides. En ambos casos, existe interés en las complejas relaciones existentes entre estructura y acción farmacológica.

Por su parte los microbiólogos buscan entre una amplia variedad de hongos y bacterias para encontrar sustancias con actividad antibiótica principalmente.

Después de descubrir un nuevo fármaco, debe determinarse la dosis, la toxicidad, el modo de acción, el metabolismo y la excreción del mismo por parte del organismo, ya que es raro encontrar un fármaco nuevo y potente que no tenga efectos colaterales en algunos individuos.

El farmacólogo diseña y opera sistemas y modelos con el fin de detectar y evaluar la actividad de compuestos para el control de las enfermedades. Así como también realiza trabajos experimentales en una variedad de especies de animales de laboratorio, para en cierto grado predecir la dosis efectiva para el hombre que es más probable que tenga efectos colaterales mínimos.

Para estar seguros que un nuevo fármaco es inocuo, se realizan estudios detallados de los efectos de distintas dosis y de la administración prolongada de dicho fármacos. El farmacólogo proporciona los datos de toxicidad aguda. El toxicólogo debe luego, refinar las mediciones de toxicidad aguda en animales de laboratorio y comenzar los estudios de toxicidad subaguda y crónica. (4)

2.2 Estudios preclínicos

La introducción de cualquier compuesto químico nuevo en la práctica médica, en la industria o en la vida diaria implica ciertos riesgos potenciales que es preciso evaluar antes de utilizar el compuesto, por lo que se hace necesario realizar estudios para conocer los efectos metabólicos y bioquímicos provocados por el compuesto químico.⁽³¹⁾ Los estudios preclínicos tienen como finalidad conocer parámetros como toxicidad, estabilidad, actividad farmacológica, farmacocinética, la relación dosis-respuesta, etc. El estudio inicial de dicha toxicidad potencial se lleva a cabo en animales de laboratorio, y el tipo de pruebas realizadas depende de la aplicación a que vaya destinado el nuevo compuesto. (5),

(8), (10), (25)

2.2.1 Evaluación de la toxicidad de los fármacos.

Son muy frecuentes los ensayos que utilizan ratas y ratones, por su economía y por la facilidad con la que se pueden alojar y alimentar. Las pruebas adicionales se han de realizar al menos en otra especie animal, que no sean roedores, siendo el perro el más utilizado. (2), (48)

La probabilidad de observar un efecto tóxico, depende del número de animales utilizados en la prueba. Si el efecto tiene una incidencia de 1/100, se necesitarían 300 animales para poder detectar el efecto con nivel de probabilidad del 5%, (2), (48) sin embargo el número de animales que se puede utilizar en los estudios de toxicidad es muy pequeño (pero considerable), comparado con la gran cantidad de pacientes que van a recibir el fármaco una vez que se haya generalizado su empleo. Por consiguiente, en las pruebas preclínicas los efectos tóxicos de incidencia baja suelen pasar inadvertidos. (5), (30)

Generalmente los estudios de toxicidad se realizan considerando un objetivo doble:

Primero, puesto que no existe medicamento activo alguno que carezca de efectos indeseables, es fundamental delinear las condiciones bajo las que tales efectos aparecen y definir el tipo o los tipos de toxicidad que se pueden presentar.

En esta etapa se evalúa la toxicidad aguda, subaguda y crónica: la toxicidad aguda tiene como objetivo principal estimar las dosis que probablemente serán bien toleradas en el hombre y lo que se conoce como DL 50 (dosis letal para el 50% de los animales, generalmente roedores, a los que se les administra la sustancia). Esta prueba da una idea preliminar de la toxicidad del compuesto. (9)

En las pruebas de toxicidad subaguda, el modo de administración y la posología dependen del ensayo clínico propuesto, se utilizan varias dosis, algunas dentro de los límites de la dosis humana calculada y otras mayores para

caracterizar las manifestaciones tóxicas, generalmente el fármaco se administra diariamente a tres dosis diferentes, por un período que varía entre seis semanas y tres meses. ⁽¹⁾

Los estudios sobre toxicidad crónica duran muchos meses, y pueden ampliarse a varias generaciones para detectar posibles efectos teratógenos de un fármaco. ^{(1), (2)}

Segundo, hay que determinar el margen de seguridad del compuesto, evaluando los efectos beneficiosos que se pueden esperar de él, frente a todos sus posibles efectos perjudiciales. ⁽⁵⁾ El margen de seguridad o índice terapéutico, se obtiene de la relación entre la DL 50 y DE 50 (dosis efectiva para el 50% de los animales, generalmente roedores, a los que se les administra la sustancia). ^{(1), (9)}

$$\text{Índice terapéutico} = \text{DL 50/DE 50}$$

No es un término absoluto porque varía en función del efecto tóxico que se considere. Cuanto mayor sea el índice terapéutico de un fármaco, menor será su riesgo y mayor la tranquilidad con que se puede aumentar la dosis hasta conseguir el efecto terapéutico deseado. ⁽²⁴⁾

2.3 Estudios clínicos.

Se considera ensayo clínico “toda evaluación experimental de una sustancia o medicamento, a través de su administración o aplicación a seres humanos, orientada a alguno de los siguientes fines:

- a) Poner de manifiesto sus efectos farmacodinámicos, o recoger datos referentes a su absorción, distribución, metabolismo y excreción en el organismo.

- b) Establecer su eficacia para una indicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica determinada.
- c) Conocer el perfil de sus reacciones adversas y establecer su seguridad". (8)

Antes de iniciar los ensayos clínicos se debe dar al compuesto una forma de dosificación apropiada y estable. La estabilización de un producto debe evitar cambios físicos o químicos (cambios de color, precipitación o descomposición). El compuesto activo debe estar disponible para la absorción y transporte al sitio de acción. Los componentes de la forma farmacéutica deben ser compatibles y deben proporcionar un producto elegante al médico o al paciente.

Por otra parte, es necesario enviar una solicitud para la investigación de un nuevo fármaco (IND) a la FDA. (4), (30)

La solicitud preclínica contiene generalmente la siguiente información: objetivos de las pruebas clínicas propuestas; nombre del fármaco, estructura química y origen del nuevo medicamento; datos sobre su toxicidad, farmacología y metabolismo, así como precauciones; tratamiento que se sugiere en caso de sobredosis; los métodos, equipo, planta industrial y controles empleados en la manufactura, procesamiento y empaque del nuevo fármaco; pruebas de potencia, pureza y seguridad; nombre y acreditaciones de los investigadores; y las instituciones donde se llevarán a cabo los estudios. Una vez aprobada la solicitud, el fármaco se distribuye, con una etiqueta que establece que es una sustancia de investigación que sólo deben usarla investigadores calificados. (figura 2) (6)

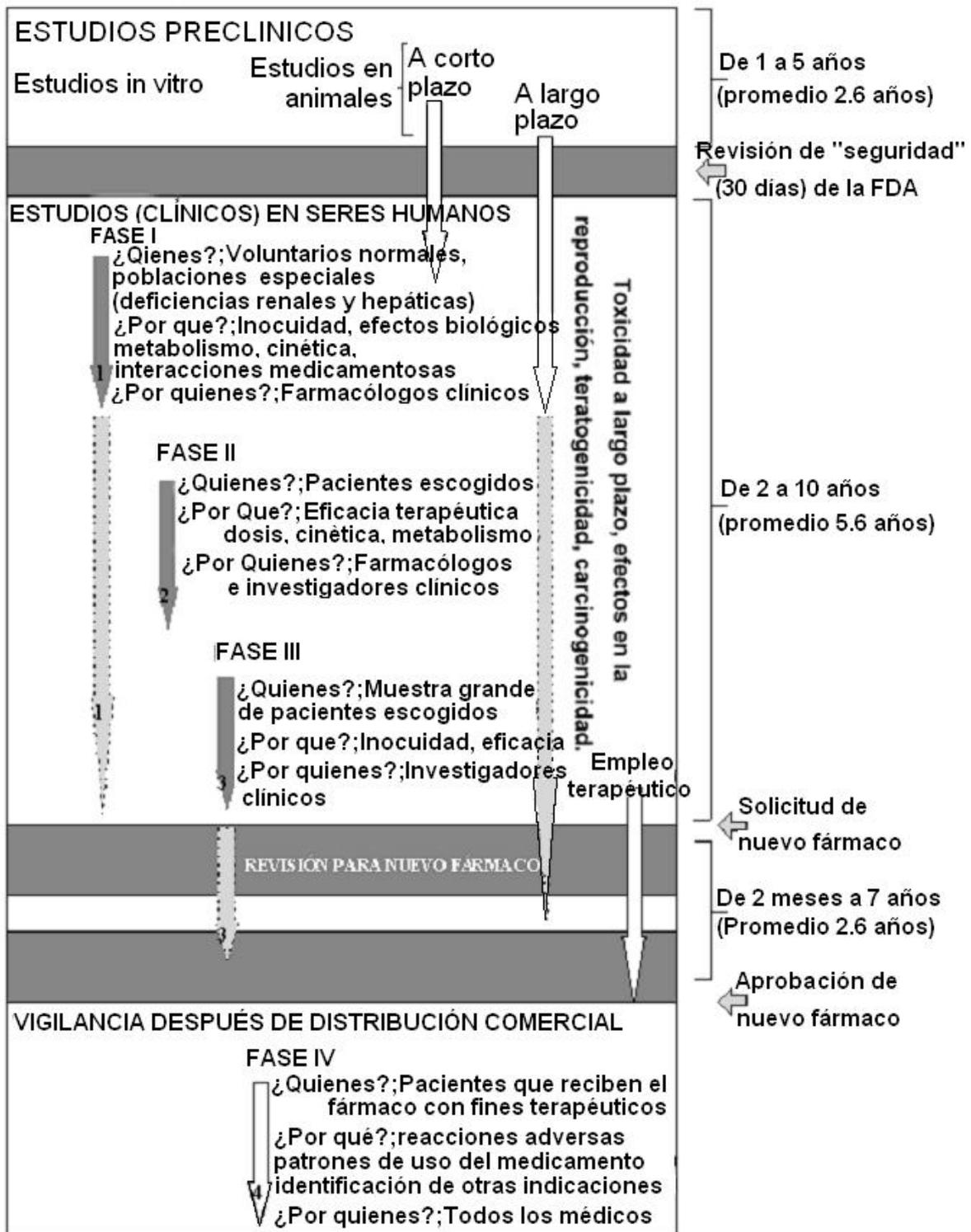


Figura 2. Fases de obtención e investigación de un fármaco. En la figura se menciona los objetivos de las diferentes fases de estudio de un fármaco y tiempo estimado para realizarlas. (6)

2.3.1 Estudios de fase I.

En esta fase el medicamento se administra a voluntarios saludables. Con el fin de obtener datos acerca de la seguridad y farmacocinética principalmente. La selección de la dosis humana inicial es difícil. Como se hizo notar antes, estudios en animales acerca del metabolismo y toxicidad de fármacos (p. ej., DL50) son de utilidad limitada para seleccionar esta dosis. Se pueden emplear técnicas doble ciego (en las que ni el médico investigador ni el paciente conocen el tratamiento que se está proporcionando), pero por lo general tanto los investigadores como los sujetos saben lo que se está administrando. ⁽³⁰⁾

Una regla común es iniciar con un quinto o un décimo de la posología máxima tolerada (mg/kg) en la especie animal más sensible. A continuación, se administra el fármaco incrementando la dosis de alguna forma hasta alcanzar la cantidad terapéutica eficaz estimada o que se desarrollen efectos colaterales.

Los sujetos que participan en la fase I son hospitalizados y se ejerce sobre ellos vigilancia intensa, incluyendo evaluaciones como examen físico diario y determinación de presión arterial, pulso, electrocardiograma, electroencefalograma, y pruebas para evaluar hígado, riñón y toxicidad hematológica, también los voluntarios sanos darán su consentimiento informado y la experimentación deberá ser realizada por investigadores competentes. En la fase I es raro un suceso adverso grave. ^{(1), (8)}

2.3.2 Estudios de fase II.

En estos estudios se administra por primera vez el fármaco a pacientes y se orientan a la evaluación de la eliminación de la sustancia, puesto que el metabolismo de los pacientes puede ser diferente al de sujetos saludables, se emplean estudios ciego o doble ciego, empleando placebos, otros fármacos activos o ambos. Estos estudios pueden dividirse en fases temprana y tardía.

Los ensayos tempranos de fase II implican administración del fármaco a pacientes para observar los posibles beneficios terapéuticos y efectos colaterales. Se intenta establecer el intervalo de dosis para estudios terapéuticos más definitivos.

Los ensayos tardíos de fase II tienen por objeto establecer la eficacia del fármaco para reducir las manifestaciones de la enfermedad específica y comparar su eficacia y efectos colaterales con los de otros que se hallan en el mercado empleados con propósitos similares. (1), (10)

2.3.3 Estudios de fase III.

Estos estudios incluyen ensayos clínicos doble ciego, aleatorios y controlados sobre un número suficiente de pacientes para obtener datos que permitan la evaluación estadística de la eficacia y seguridad del fármaco. Las pruebas que aquí se realizan suelen efectuarse en medios similares que se anticipan al uso final del fármaco. (30)

Si los estudios en seres humanos indican que el compuesto puede ser un agente terapéutico eficaz y seguro, el fabricante puede llenar una solicitud para comercializar un nuevo fármaco (NDA).

Si la documentación es aceptable para la oficina reguladora, entonces la autoridad firma un certificado de cumplimiento. El fármaco puede entonces entrar al mercado con la clasificación de fármaco nuevo. (6), (10)

2.3.4 Estudios de fase IV. (Postcomercialización)

Antes de que un nuevo medicamento se introduzca en el mercado el número de individuos estudiados oscila entre 1000 y 3000. Por lo tanto, la probabilidad de que, en estas circunstancias, se detecte una reacción adversa

cuya incidencia sea inferior al 1/1000 es remota. De este modo, el perfil de seguridad de un fármaco puede no ser completamente conocido hasta que transcurra cierto tiempo desde su comercialización.

Estos estudios se realizan después de que se autoriza la comercialización del fármaco. Se vigila los efectos del fármaco en los años inmediatos después de su ingreso al mercado, cuando su uso amplio puede dar lugar al descubrimiento de efectos colaterales relativamente raros, toxicidad crónica que sólo se desarrolla luego de muchos años de exposición (por ejemplo, cáncer), interacciones farmacológicas previamente desconocidas o posibles usos terapéuticos nuevos o el desarrollo de recomendaciones para dosis más apropiada. El medicamento puede permanecer con la clasificación de fármaco nuevo, por varios años hasta que la oficina reguladora se asegura de que se ha acumulado suficiente información adicional acerca de su uso general para justificar que se libere de los rígidos controles aplicados a los fármacos nuevos. Por tanto, el estudio del desempeño de un nuevo fármaco no termina con su aprobación e ingreso al mercado. (1), (8), (10), (20), (30),

3. REACCIONES ADVERSAS.

Todo fármaco, tiene la capacidad de producir efectos nocivos en el organismo al que se administran, aún cuando parezcan ser inocuos. Por lo que es necesario evaluar estas reacciones adversas. ⁽²⁴⁾

3.1 Definición.

Según la OMS se define como: “Todo efecto no buscado o no deseado que se observa después de la administración de un fármaco, en las dosis comúnmente empleadas en el hombre, con fines de diagnóstico, profilaxis o tratamiento.”

Aquí se incluye una definición con la diferencia que hace constar la forma de dosificación y fórmula magistral, excluyendo fallos terapéuticos.

“Todo efecto no deseado y nocivo para el enfermo que aparece tras la administración, con fines diagnósticos, profilácticos o terapéuticos, de una forma de dosificación de un medicamento o de una fórmula magistral, utilizada a dosis e indicaciones correctas”. ⁽⁸⁾

3.2 Clasificación.

Es muy difícil la clasificación de las reacciones adversas de los fármacos, por la cantidad de factores que participan en la producción, modo de aparición, duración y gravedad. ⁽²⁴⁾

Por esto existen varias formas de clasificar las reacciones adversas, y una de las más usadas es la que las agrupa en Tipo A y Tipo B, propuesta por el doctor Rawlins. ^{(6), (8), (10)}, que a continuación se presenta:

∅ *Tipo A:* Son las que se originan por la exageración del efecto del fármaco, ya que está en relación con el mecanismo de acción del medicamento; es decir, de etiopatogenia conocida, son por tanto predecibles. Su intensidad depende de la dosis, su frecuencia suele ser relativamente alta (95%) y son leves.

Pueden ser debidas a diversas causas:

1. Las que dependen del efecto que el fármaco produzca en el organismo (farmacodinámicas).
2. Las que dependen de la forma farmacéutica, que puede condicionar su absorción en el organismo.
3. Las que dependen del comportamiento en el organismo (Liberación, Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción).

∅ *Tipo B:* Son no predecibles, no dependen de la dosis, son de mecanismo desconocido suelen ser mas graves que las anteriores y se presentan con menos frecuencia (5%).

Se clasifican según su causa en:

4. "Idiosincrásicas", dependen del metabolismo de cada individuo.
5. Debidas a mecanismos inmunológicos (Respuestas de hipersensibilidad, I. Anafilácticas, II. Citotóxicas, III. Mediadas por complejos inmunitarios, IV. Mediada por células).

A continuación se incluyen algunas otras formas de clasificar las reacciones adversas.

Una de las clasificaciones más completas es la que propone Plutarco Naranjo, con los siguientes grupos. (15)

GRUPO I. Reacciones de tipo tóxico:

- v reacciones por intoxicación
- v reacciones idiosincrásicas

GRUPO II. Efectos colaterales o secundarios:

- v un mismo efecto producido por distintos fármacos
- v efectos producidos por un mismo grupo farmacodinámico

GRUPO III. Reacciones por distorsión del metabolismo normal:

- v por alteraciones enzimáticas
- v por deficiencias inducidas

GRUPO IV. Reacciones por acostumbramiento:

- v hábito (dependencia psíquica)
- v adicción (dependencia física)

GRUPO V. Reacciones por sensibilización:

- v reacciones alérgicas
- v reacciones anafilácticas
- v trastornos alergosímiles por liberación de histamina

GRUPO VI. Reacciones fotoinducidas:

- v fenómenos fototóxicos
- v fotosensibilización

GRUPO VII. Reacciones teratógenas y embriotóxicas:

- v efectos teratógenos
- v toxicidad embriotrópica
- v toxicidad neonatal
- v toxicidad selectiva en el recién nacido

Una clasificación más es tomando en cuenta su gravedad, así las podemos agrupar en leves, moderadas, graves y letales. ⁽⁶⁾

Leves: No se requiere antídoto, tratamiento o prolongación de la hospitalización.

Moderada: Requiere un cambio de terapéutica farmacológica, no necesariamente interrupción del fármaco. Se puede prolongar la hospitalización y requiere tratamiento específico.

Grave: Potencialmente mortal, es necesario interrumpir el fármaco y tratamiento específico de la reacción adversa.

Letal: Contribuye de manera directa o indirecta a la muerte del paciente.

Otra forma de clasificación es según el grado de causalidad, para lo cual se han desarrollado criterios como el de la "Reports Evaluation Branch" de la división de epidemiología y vigilancia de la FDA, y otros en forma de algoritmos como el que propone Naranjo (*Tabla 1*). De acuerdo a esto pueden agruparse como altamente probable, probable, posible y dudosa. ^{(6), (22)}

Altamente probable: una reacción que 1) sigue una secuencia temporal razonable después de la administración del fármaco, o en la cual la concentración del medicamento se ha medido en líquidos o tejidos corporales; 2) sigue el patrón de respuesta conocido del fármaco bajo sospecha; 3) se confirma por la mejoría que se observa al suspender el fármaco y su reaparición al volver a administrarlo, y 4) no puede explicarse por las características conocidas de la enfermedad del paciente.

Probable: una reacción que 1) sigue una secuencia temporal razonable después de la administración del fármaco; 2) sigue un patrón de respuesta conocido; 3) desaparece al interrumpir el fármaco pero no reaparece al volverlo a administrar, y 4) no puede explicarse por las características conocidas de la enfermedad del paciente.

Posible: una reacción que 1) sigue una secuencia temporal razonable; 2) puede o no ajustarse a un patrón de respuesta conocido; pero 3) podría explicarse por las características conocidas del estado clínico del paciente.

Dudosa: el evento no tiene asociación temporal razonable con el uso del fármaco, y es más probable que la alteración se relacione con factores distintos al fármaco.

Tabla 1. Algoritmo para estimar la causalidad de una reacción adversa (Según Naranjo).

Método Naranjo	Sí	No	No sabe
1. ¿Existen estudios previos acerca de esta reacción?	+1	0	0
2. ¿Apareció el efecto adverso después de la administración del fármaco?	+2	-1	0
3. ¿mejora el paciente cuando se suspende el fármaco, o bien se administra un antagonista específico?	+1	0	0
4. ¿Aparece de nuevo la reacción cuando se readministra el fármaco?	+2	-1	0
5. ¿Existen causas alternativas (distintas a medicamentos) que podrían haber causado la reacción?	-1	+2	0
6. ¿Aparece la reacción de nuevo al administrar un placebo?	-1	+1	0
7. ¿Se detecto el fármaco en sangre (u otros fluidos) en concentraciones sabidas como tóxicas?	+1	0	0
8. ¿la reacción fue de mayor severidad cuando se incremento la dosis, menos severa cuando la dosis disminuyó?	+1	0	0
9. ¿Tubo el paciente una reacción similar al mismo fármaco o similar en una exposición anterior?	+1	0	0
10. ¿se confirmó el efecto adverso por alguna evidencia objetiva?	+1	0	
	Puntuación		
Reacción adversa definitiva	9		
Reacción adversa probable	5-8		
Reacción adversa posible	1-4		
Reacción adversa dudosa	0		

3.3 Factores causantes de reacciones adversas.

Los principales factores que causan reacciones adversas pueden agruparse en dos categorías: A) Reacciones Medicamentosas (RAMs) dependientes de factores del paciente y B) (RAMs) dependientes del fármaco. (Figura 3)

A) RAM dependientes de factores del paciente, entre estos encontramos los siguientes: (20), (24)

§ *Factores fisiológicos.* Como la edad, sexo, gestación y lactancia; la incidencia de reacciones adversas aumenta en las edades extremas de la vida. Por otra parte las reacciones adversas parecen afectar casi dos veces más frecuentemente a la mujer que al varón, y durante la gestación se producen cambios en la composición de los líquidos orgánicos y en la función de algunos órganos, que puede afectar la distribución de los fármacos. Por último, el primer trimestre de la vida es bien conocido por la vulnerabilidad del feto a los efectos dismorfogénicos de los agentes químicos.

§ Anomalías genéticas que afectan la respuesta farmacológica. En algunas ocasiones es posible involucrar causas genéticas, las cuales pueden expresarse a través de alteraciones farmacocinéticas o farmacodinámicas:

§ Alteraciones patológicas adquiridas. Las alteraciones que pueden revestir mayor relevancia clínica son las hepáticas y renales. Asimismo, algunas enfermedades pueden condicionar cambios farmacodinámicos en la respuesta a los fármacos.

§ Alergia. Debe hacerse especial hincapié en que la alergia a medicamentos sólo puede presentarse si el paciente ha sufrido una sensibilización previa. Clásicamente se admite que los fármacos se comportan como haptenos, es decir, como antígenos incompletos que necesitan unirse de forma estable con moléculas de mayor tamaño para constituir un antígeno completo.

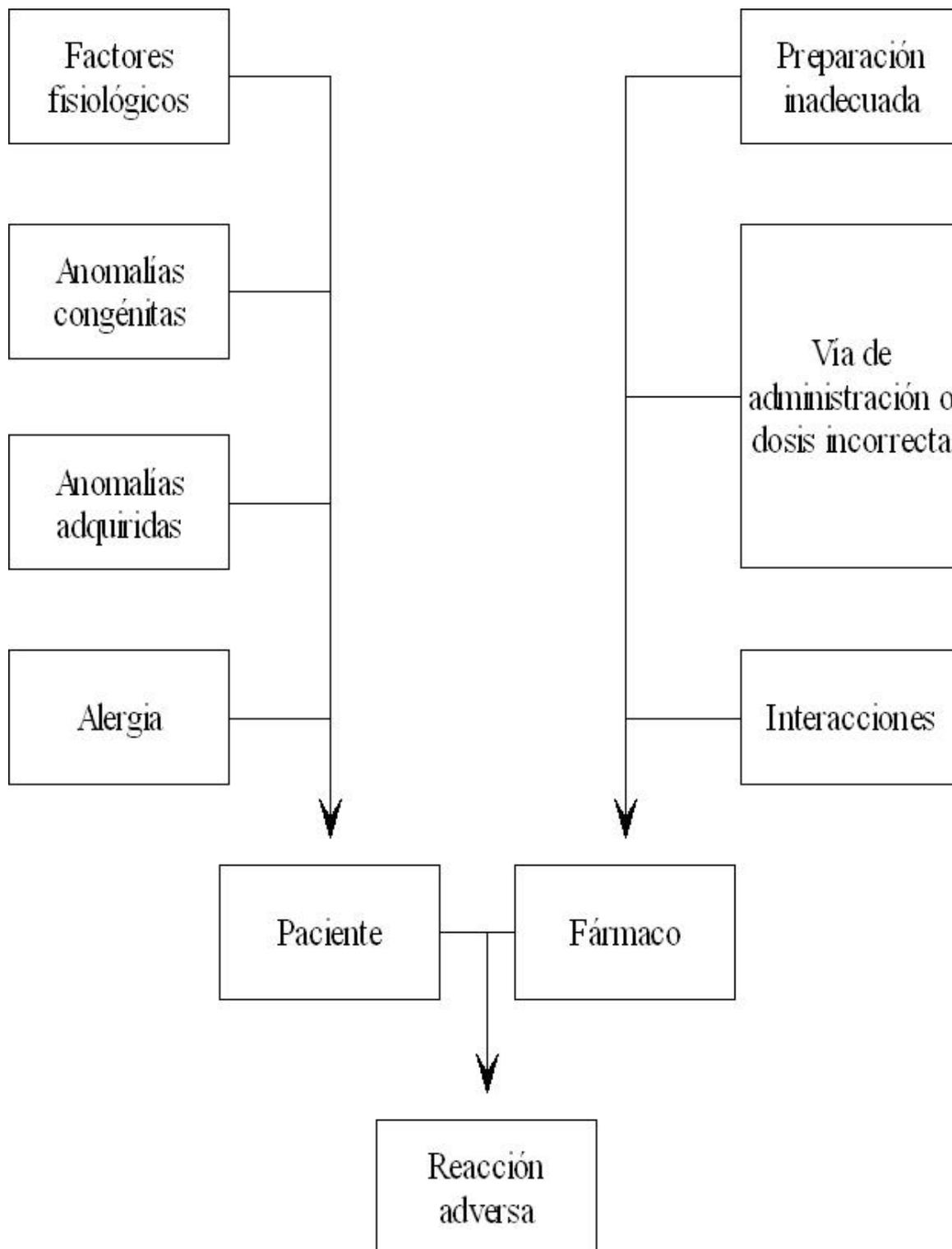


Figura 3. Principales factores que causan reacciones adversas. En la figura se muestra los factores dependientes del paciente y dependientes del fármaco que producen reacciones adversas.

B) RAM dependientes del fármaco. En este grupo tenemos los siguientes principalmente. (20), (24)

§ *Anomalías en la forma farmacéutica.* Estas causan RAM como consecuencia de una conservación deficiente, o por errores en la elaboración del medicamento.

§ *Anomalías en la administración o en la dosis.* La administración tópica favorece la sensibilización alérgica; la vía intramuscular puede originar fenómenos inflamatorios locales de cierta intensidad; la administración por vía inhalatoria puede causar broncospasmo. A esto deben añadirse los errores en la propia administración del medicamento (extravasación, inyección en un vaso o perfusión intravenosa rápida).

§ *Interacciones.* Las interacciones son, en teoría, una fuente importante de reacciones adversas, ya que el riesgo de sufrir reacciones adversas se incrementa de manera proporcional al número de medicamentos administrados simultáneamente.

4. TOXICIDAD.

La inocuidad y toxicidad farmacológicas pueden considerarse como conceptos relativos, ya que si la dosis es lo suficientemente alta, cualquier agente químico, incluso los alimentos y el agua, puede provocar efectos tóxicos. ⁽⁵⁾ Además hay diferentes factores que influyen en la aparición de la toxicidad, como son el medio ambiente, el tiempo de exposición, las características del individuo, la vía de administración y la estructura química. ⁽³¹⁾

No obstante cuanto mayores sean la selectividad y la especificidad del compuesto, menor será la probabilidad de que aparezcan efectos tóxicos, si las dosis utilizadas son correctas. Excepto por idiosincrasia, alergia, farmacoterapia simultánea o trastornos patológicos, cabe señalar que dosis excesivas provocarán efectos tóxicos en todos los individuos. ⁽⁵⁾

4.1 Definición.

Es aquél efecto provocado por dosis relativamente grandes de un fármaco, que consiste en cambios bioquímicos o tisulares que interfieren el funcionamiento normal de un tejido, órgano o sistema, o del organismo en su conjunto. ⁽¹⁵⁾

De manera más general podemos decir que la toxicidad es: la actividad tóxica, concreta y específica, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (xenobiótico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor). ⁽³¹⁾

Los aspectos más graves de la toxicidad provocada por agentes terapéuticos son los que se refieren a alteraciones patológicas de órganos específicos. Tales alteraciones, aunque sean poco frecuentes o incluso excepcionales representan, no obstante, las complicaciones más peligrosas e impredecibles de la farmacoterapia. El hígado y el riñón son especialmente vulnerables, ya que muchos fármacos se concentran en estos órganos. ⁽⁵⁾

4.2 Clasificación.

Al igual que las reacciones adversas, es muy difícil hacer una clasificación de los efectos tóxicos provocados por fármacos, de tal forma que aquí se presentan algunas maneras tomando en cuenta diversos criterios.

En función de la rapidez de instauración de los síntomas y el ritmo y duración del contacto con el agente lesivo, las reacciones tóxicas se pueden clasificar en agudas, subagudas o crónicas.

La *toxicidad aguda* se produce por la ingestión única o repentina de un agente en cantidades suficientes para provocar la depresión grave de una función fisiológica vital.

En la *toxicidad subaguda* el individuo está expuesto reiterada y frecuentemente, durante varias horas o días, a una dosis que es insuficiente para provocar efectos deletéreos cuando se administra como dosis única.

La *toxicidad crónica* suele producirse por contacto reiterado, durante largos periodos de tiempo, con un compuesto químico cuyo ritmo de penetración en el organismo supera el de eliminación. ⁽⁵⁾

También se pueden agrupar en base a la magnitud de los síntomas, en el tiempo de aparición de éstos u origen de los síntomas. ⁽³¹⁾

Así en relación con la magnitud de los síntomas, se pueden calificar en tres grados diferentes de intensidades:

- Leves.
- Moderadas.
- Severas.

En base al tiempo de aparición de los síntomas podemos hablar de tres tipos: ⁽³¹⁾

- Toxicidad de efectos inmediatos versus retardados.
- Toxicidad de efectos reversibles versus irreversibles.
- Toxicidad local versus sistémica.

Además la toxicidad presentada por un xenobiótico puede ser calificada de dos maneras:

1. Directa: cuando el efecto nocivo es producido por la estructura primaria de la sustancia, esto es tal como penetra en el organismo vivo.
2. Indirecta: cuando el efecto tóxico es provocado por algún producto de biotransformación de la sustancia.

4.3 Potencia.

Se han establecido categorías de toxicidad en función de las cantidades de sustancia necesarias para producir una acción perjudicial. Sin embargo, como la toxicidad de una sustancia (considerada en función de su peligrosidad) y la potencia de esa sustancia (expresada en relación con la cantidad de tóxico presente) son términos relativos, se necesitan patrones de referencia. ^{(31), (49), (50)}.

En este sentido, para indicar la potencia de cualquier tipo de tóxico se ha propuesto utilizar una escala de valores basada en la DL₅₀ de la sustancia. (Tabla 2)

Tabla 2. Categorías toxicológicas según la DL₅₀. (Dosis Letal 50)

CATEGORIAS	DL ₅₀ mg/kg
1. Extremadamente tóxico	1 ó menos
2. Altamente tóxico	1 – 50
3. Moderadamente tóxico	50 – 500
4. Ligeramente tóxico	500 – 5000
5. Prácticamente no tóxico	5000 – 15000

5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BENCIMIDAZOLES-CARBAMATOS.

Los bencimidazoles son más frecuentemente usados en la práctica veterinaria por su amplio espectro y baja toxicidad. En la práctica clínica humana comúnmente se emplean los siguientes tres compuestos bencimidazólicos: albendazol, flubendazol y mebendazol. ⁽³⁹⁾.

De los carbamatos, también denominados uretanos, el más simple es el ácido carbámico. ⁽⁴²⁾ Estos son usados principalmente como insecticidas, funguicidas, herbicidas, etc. se conocen tres clases de carbamatos pesticidas: los derivados de esteres que se usan como insecticidas y nematodidas; los carbamatos herbicidas que contienen radicales aromáticos o alifáticos; y los carbamatos fungicidas que contienen un grupo bencimidazol. ⁽³⁹⁾.

Los bencimidazoles son compuestos en general y bencimidazoles carbamatos en particular, son materiales cristalinos, y relativamente insolubles en agua.

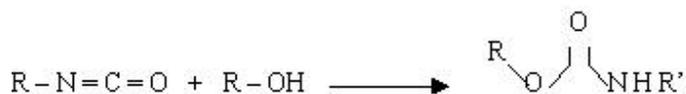
5.1 Síntesis química.

La síntesis de varios bencimidazoles por lo general es de la siguiente forma: primero un anillo bencénico que contenga el sustituyente deseado se hace reaccionar con un grupo 1,2 diamina, enseguida el compuesto 1,2 diaminobenceno (o-fenildiamina) reacciona con un ácido carboxílico, o derivados, bajo condiciones ácidas obteniendo la formación del anillo imidazólico. ^{(39), (51)}.

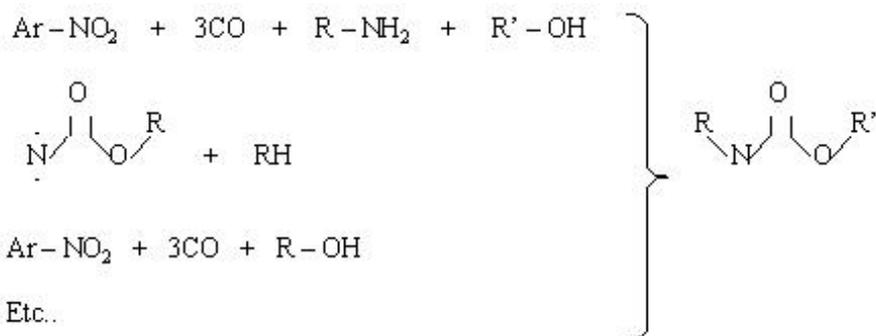
Los carbamatos pueden obtenerse por alguno de los siguientes métodos: (42).

I). A partir de isocianatos como se muestra a continuación:

Reacción general

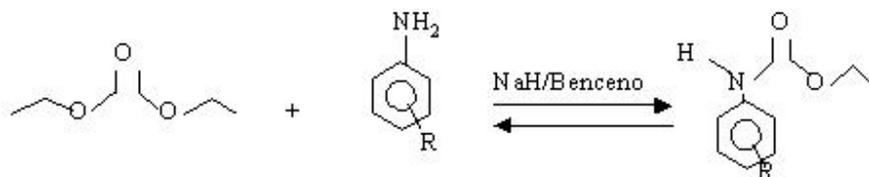


II). A partir de compuestos como nitrilos, nitrenos, nitroaromáticos, etc.

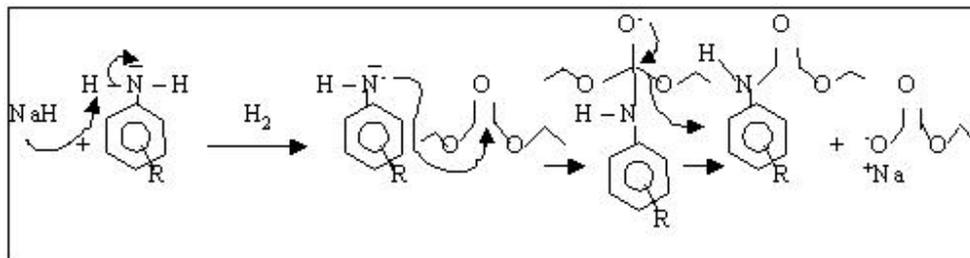


III). Un método nuevo propuesto a partir de aminas aromáticas con carbonato de dietilo en medio básico, como se muestra a continuación:

Reacción general:



Mecanismo de reacción:



Este método se ha propuesto como alternativa en la obtención de carbamatos, en base a algunas ventajas que ofrece en comparación de los métodos tradicionales, como son:

- No emplea reactivos tan peligrosos.
- Los reactivos son relativamente baratos en comparación de los utilizados en otros métodos.
- Las condiciones de reacción son menos drásticas. ^{(39), (42)}.

5.2 Mecanismo de acción.

De manera general, el modo de acción de los carbamatos se da al inhibir de forma reversible la acetilcolinesterasa (ACE) en las hendiduras sinápticas del sistema nervioso (SN). ⁽⁴³⁾

Para entender mejor como actúan estos compuestos, se describe de manera general el modo de acción de la ACE.

Esta enzima cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (AC) a colina y ácido acético. Esto se da en la contracción muscular, cuando debido al impulso eléctrico, hay una despolarización de la membrana presináptica provocando la apertura de los canales de calcio y como consecuencia permite la migración del neurotransmisor AC, hacia la membrana postsináptica y cuando la alcanza da lugar a la contracción muscular. Después de lo cual AC es hidrolizada por ACE y hay un cese en la contracción muscular. ^{(35), (39)}.

En el primer paso, el carbamato se une al sitio activo de la ACE y enseguida es hidrolizado, dando como resultado la carbamilación de la enzima mas un radical libre. En un segundo paso el enlace covalente carbamil-enzima, es destruido mediante la adición de agua.

La toxicidad consiste en que este enlace covalente, es considerablemente más resistente a la hidratación, por lo que tiene una mayor duración (30min a 6h), en relación con el enlace formado entre ACE y AC (2 a 10min). Como consecuencia de la inhibición a ACE, la AC no puede ser hidrolizada, con lo que su concentración permanece alta en las uniones neuroefectoras colinérgicas, uniones neuromusculares de los músculos esqueléticos y en los ganglios autónomos produciendo estimulación continua de las fibras colinérgicas en SNC y SNP. Sin embargo el enlace entre la enzima y el grupo éster del carbamato no es muy fuerte, por lo que este mecanismo es reversible. (39), (43).

Por otra parte este tipo de compuestos a mostrado tener interacción con los microtúbulos, especialmente con uno de los dímeros que los forman (cada uno con 50 KDa), la β -tubulina.

Borges y De Nollin, fueron los primeros en observar la desintegración de la matriz normal de microtúbulos en células intestinales de *Ascaris suum*, tratados con mebendazol, y estudios posteriores confirman esta observación en otras especies de helmintos sensibles a benzimidazoles. (39)

De este modo Mattys-Rochon en estudios ultraestructurales, encontró que había efecto en los centros de organización de los microtúbulos en *Amphidinium carterae*, provocados por isopropil N-fenilcarbamatos. Shibaoka Hiroh, también encontró que el etil N-fenilcarbamato, impide la organización de microtúbulos. (18), (44)

En estudios realizados con los fenil carbamatos de etilo, sintetizados en la FES Cuautitlán como ya se mencionó anteriormente, se realizó un análisis estadístico de numerosas variables comparados con varios benzimidazoles ya establecidos como agentes terapéuticos, los resultados mostraron que son buenos candidatos como fármacos antihelmínticos, y posteriormente se sometieron a pruebas de actividad antiparasitaria, en las que se encontró que estos compuestos presentan actividad anticestódica con una eficiencia de alrededor de 80 % contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1, además se encontró que afectaban la morfología de los parásitos principalmente en las microvellosidades que los

recubren afectando su nutrición ya que estos tienen una función similar a la de las microvellosidades del intestino delgado como estructuras que absorben nutrientes.

(39), (45).

5.3 Farmacocinética.

Absorción. Estos compuestos son fácilmente absorbidos a través de membranas mucosas tanto de tracto respiratorio como gastrointestinal, es decir: por inhalación, ingestión y además por exposición cutánea. (43)

Distribución. Al igual que la absorción, ésta es muy rápida debida a su elevada liposolubilidad y por esto es posible encontrarlos en cerebro y órganos ricos en lípidos. (43) Aunque no existe mucha información de esto, los órganos en los que han sido reportados residuos son: el hígado, riñones, cerebro, grasa y músculo. (39).

Biotransformación. La mayoría de estos insecticidas, usualmente sufren en primer lugar oxidación, con lo cual se introduce un grupo funcional hidroxilo, haciéndolo un producto más polar.

También sufren hidrólisis ya sea espontáneamente o por esterases dando como productos finales una amina, bióxido de carbono y fenol u oximas. (39), (43)

Excreción. Después de la biotransformación de estos compuestos resultando en otros mas hidrosolubles, son excretados principalmente por orina y eses, aunque también pueden serlo por leche y por vía respiratoria. (43).

6. ANATOMÍA E HISTOFISIOLOGÍA NORMALES DE LOS ÓRGANOS DE INTERES PARA EL ESTUDIO.

6.1 ESTÓMAGO.

6.1.1 Anatomía.

El estómago tiene cuatro regiones principales: cardias, fondo, cuerpo y píloro. El cardias rodea la abertura superior del estómago. El fondo es la porción redondeada que está arriba y a la izquierda del cardias. El cuerpo es la gran porción central del estómago, situado en plano inferior al fondo. El píloro incluye dos partes: el *antro pilórico*, conectado con el cuerpo del estómago, y el *conducto pilórico*, que se conecta con el duodeno. (figura 4) (29)

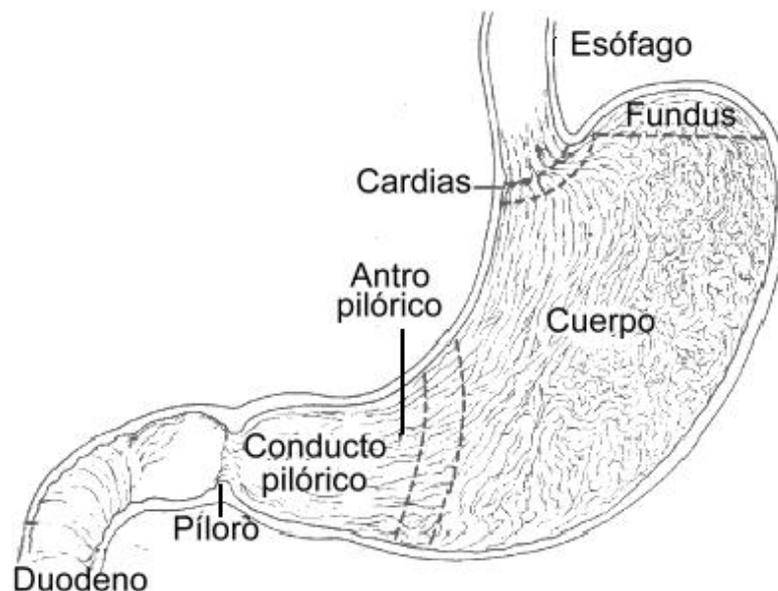


Figura 4. Anatomía del estómago. La figura muestra las principales regiones del estómago. (29)

6.1.2 Histología.

Desde el punto de vista histológico, la pared del tracto gastrointestinal está compuesta de cuatro capas principales. Del lumen hacia el exterior éstas corresponden a la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. *(figura 5)* Cada una de estas capas se puede subdividir en componentes con estructura y función diferentes. ^{(25), (29)}.

La pared gástrica se compone de las mismas cuatro capas básicas que el resto del tubo digestivo y que a continuación se describen.

La mucosa: este tejido posee 3 capas.

a) Epitelio, el cual consiste en un revestimiento de células epiteliales, que en el estómago es de tipo columnar simple, y está en contacto directo con el contenido del tubo digestivo participando en la secreción y la absorción, interrumpido en ocasiones por varios tipos de glándulas en forma de invaginaciones superficiales (criptas) formadas por columnas de células secretoras. Dentro de estas glándulas las células epiteliales superficiales son sustituidas por células secretoras exocrinas o endocrinas especializadas. Las células exocrinas secretan al lumen del tracto gastrointestinal varias sustancias, a partir de la superficie apical (p. ej., ácido de las células parietales y pepsina de las células principales de las glándulas oxínticas en el fondo y en el cuerpo del estómago). Las células exocrinas secretan hormonas al torrente sanguíneo de los capilares adyacentes, a partir de la superficie basolateral (p. ej., gastrina en las denominadas células G de las glándulas ánticas en la mucosa del antro). *(figura 6)*

b) Lámina propia, una capa inmediatamente subyacente de tejido conectivo colágeno laxo, en la que abundan vasos sanguíneos y linfáticos, además de células del sistema inmunitario que incluyen macrófagos y linfocitos con secreciones activas de IgA e IgM.

c) Muscular de la mucosa, que es la cara más interna de la mucosa está delimitada por una capa delgada de músculo liso, hace que la mucosa del estómago presente numerosos pliegues pequeños, los cuales incrementan el área de superficie para la digestión y la absorción. Esta capa posee fibras internas (circulares) y externas (longitudinales). (25), (29)

La submucosa: consiste en una capa de tejido conectivo colágeno laxo directamente por debajo de la mucosa que contiene vasos sanguíneos y linfáticos mayores, y también una porción del sistema nervioso entérico intrínseco denominado plexo nervioso submucoso (de Meissner), de importancia para el control de la secreción en las vías gastrointestinales, además se encarga de regular los movimientos de la mucosa y la constricción de los vasos sanguíneos. (29)

La muscular: está formada por músculo liso que en el tracto digestivo generalmente está dispuesto en dos capas, pero en el estómago posee tres, que son denominadas longitudinal externa, circular media y oblicua interna, esta última se limita principalmente al cuerpo del estómago. (25), (29)

La serosa: se compone de tejido conectivo colágeno laxo y epitelio escamoso simple, constituye la capa más externa en la cual viajan los grandes vasos sanguíneos.(29)

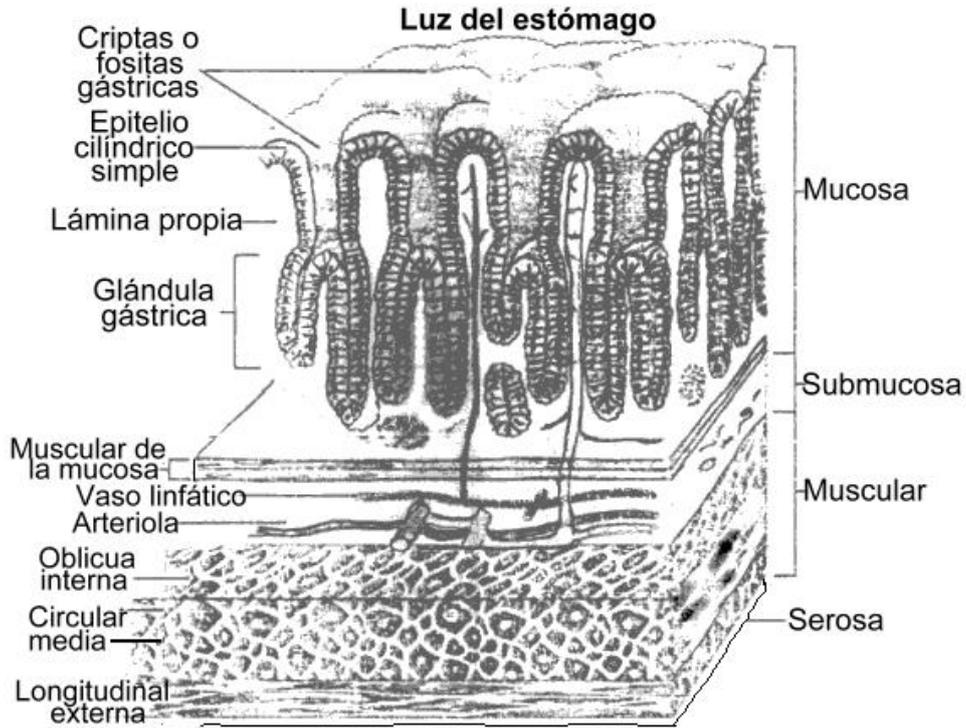


Figura 5. Capas histológicas del estómago. El estómago está constituido por 4 capas principales, mucosa, submucosa, muscular y serosa, que se ilustran en la figura. (29)

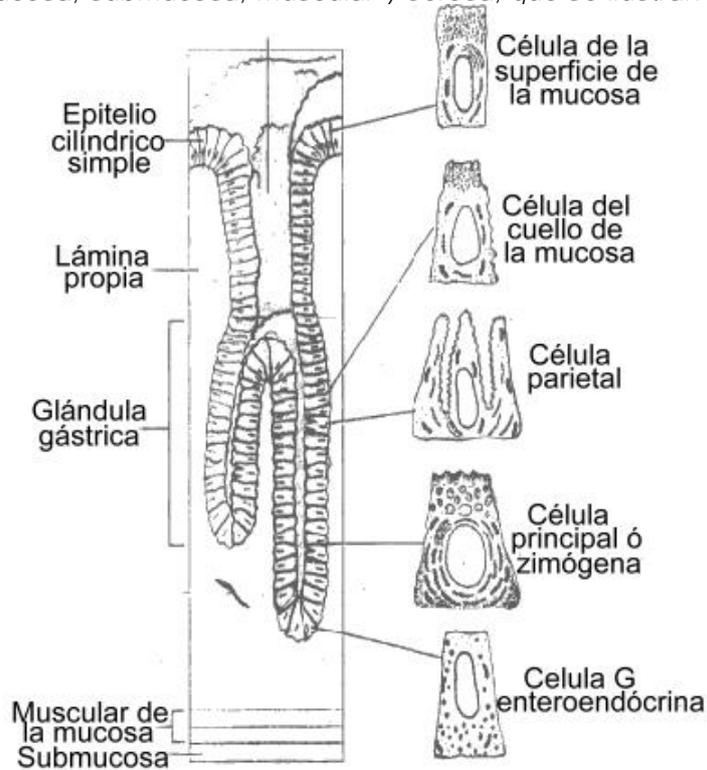


Figura 6. Tipos de células epiteliales del estómago. Las células de la parte luminal del estómago (Células Epiteliales) son diferentes por su función y se ilustran en la figura. (29)

6.1.3 Fisiología.

Digestión mecánica: varios minutos después de que los alimentos entran en el estómago, se producen movimientos peristálticos suaves, llamados ondas de mezclado que los mezclan con las secreciones de las glándulas gástricas y los reducen a un líquido parecido a una sopa, el quimo. Al ocurrir la digestión en el estómago, se inician ondas de mezclado más intensas en el cuerpo gástrico y se intensifican a medida que se acercan al píloro. (29)

Digestión química: Aquí las moléculas grandes de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, se hidrolizan por acción de las enzimas digestivas, que catalizan estas reacciones. Cuando el quimo se mezcla con el jugo gástrico se activa la amilasa salival iniciándose la digestión de los triglicéridos, mas adelante el ácido del estómago desnaturaliza parcialmente las proteínas, de lo cual se encarga la enzima pepsina que posee su máxima eficacia en el ambiente ácido del estómago. Otra enzima es la lipasa gástrica que desdobla los triglicéridos de cadena corta, esta enzima funciona óptimamente en pH 5 a 6. (25), (29)

Secreción gástrica: El estómago secreta diversos productos. Uno de éstos es el ácido clorhídrico (HCl), quizá constituye el más importante desde el punto de vista fisiológico, además secreta pepsina, factor intrínseco y lipasa gástrica. El HCl da muerte a las bacterias y desnaturaliza las proteínas, la pepsina inicia la digestión de las proteínas, el factor intrínseco participa en la absorción de la vitamina B₁₂, la lipasa gástrica ayuda en la digestión de los triglicéridos.

6.2 INTESTINO DELGADO.

6.2.1 Anatomía.

Es posible dividir el intestino delgado en tres regiones, el esfínter pilórico gástrico marca el inicio, describe curvas en las porciones central e inferior del abdomen y se continúa con el intestino grueso. La parte más corta es el duodeno, el cual en gran parte se encuentra fija y tiene posición retroperitoneal, en el duodeno el contenido gástrico se mezcla con las secreciones del colédoco y del conducto pancreático. Más allá del duodeno el intestino delgado tiene motilidad y está suspendido en la cavidad peritoneal mediante el mesenterio. Los dos quintos proximales reciben el nombre de yeyuno. Los tres quintos distales se denominan íleon, el cual termina en la válvula ileocecal la porción inicial del intestino grueso. (25), (29)

Existen proyecciones llamadas pliegues circulares, que son rebordes permanentes de la mucosa intestinal, de 10mm de altura. Se inician cerca de la porción proximal del duodeno y terminan en el tercio medio de íleon. Mejoran la absorción al incrementar el área de superficie y hacen que el quimo describa un trayecto en espiral a su paso por el intestino delgado. (Figura 7) (29)

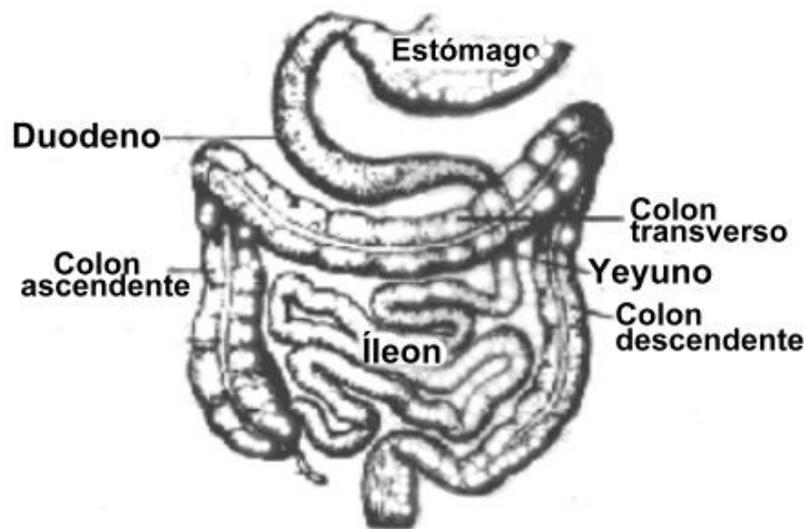


Figura 7. Anatomía del intestino delgado. Las principales características anatómicas del estómago se muestran en la figura. (29)

6.2.2 Histología.

La pared del intestino delgado se compone de las mismas cuatro capas que la mayor parte del resto del tubo digestivo; pero posee ciertas características especiales de la mucosa y la submucosa que facilitan la digestión y absorción. Las características macroscópicas más impresionantes del intestino delgado corresponden a las numerosas vellosidades, las cuales son proyecciones de la mucosa de 0.5 a 1mm de altura. Su gran número, de 20 a 40 / mm² incrementa considerablemente el área de absorción y digestión, además de conferir a la mucosa intestinal un aspecto aterciopelado. Cada vellosidad posee un centro de lámina propia (tejido conectivo colágeno laxo) que contiene una rama terminal de los árboles arterial, venoso y linfático, esto permite la transferencia eficiente hacia el sistema circulatorio de las sustancias absorbidas por los enterocitos (células epiteliales de la superficie) a partir del lumen intestinal. (Figura 8) (25), (29)

La mucosa posee: a) *epitelio* de tipo columnar simple con microvellosidades e incluye células de absorción (enterocitos), calciformes, enteroendócrinas y de Paneth. La membrana apical (libre) de los enterocitos posee microvellosidades, que incrementan todavía más la superficie de absorción, cada una de las cuales es una proyección cilíndrica de 1µm de longitud con recubrimiento de membrana y unos 20 a 30 filamentos de actina. Las microvellosidades son demasiado pequeñas para ser resueltas en el microscopio de luz, por lo que se aprecian como una línea difusa, llamada *borde en cepillo*. Se calculan 200 millones de microvellosidades por milímetro cuadrado de intestino delgado. (25), (29)

Además la mucosa tiene muchas depresiones profundas llenas de epitelio glandular. Las células de revestimiento de tales depresiones forman las *criptas de Lieberkühn*, que secretan el jugo intestinal. Una célula troncal pluripotencial en la cripta, todavía no identificada, sirve como progenitora de los cuatro tipos celulares maduros en la vellosidad (figura 9): los enterocitos, las

células caliciformes, secretoras de moco en el lumen intestinal; las células enteroendocrinas, secretoras de hormonas en el torrente sanguíneo; y las células de Paneth, (situadas en la parte mas profunda de las criptas) productoras de lisozima, que es una enzima antimicrobiana y de factores de crecimiento, además pueden realizar fagocitosis. Las células de Paneth, a diferencia de los demás tipos celulares que migran hacia la punta de la vellosidad a medida que se diferencian, permanecen en la cripta. (25), (29)

b) *La lámina propia* del intestino delgado tiene abundante tejido linfoide relacionado con la mucosa. Los folículos linfáticos solitarios son más numerosos en la porción distal del íleon; los grupos de estos folículos, llamados placas de péyer, son también numerosos en el íleon. c) *La muscular de la mucosa* consta de músculo liso, hace que la mucosa del intestino delgado presente numerosos pliegues pequeños, los cuales incrementan el área de superficie para la digestión y la absorción. (25), (29)

La submucosa duodenal consiste en una capa de tejido conectivo colágeno laxo directamente por debajo de la mucosa que contiene vasos sanguíneos y linfáticos mayores, además contiene glandulas de Brunner, las cuales secretan un moco alcalino que ayuda a neutralizar el ácido gástrico del quimo. (29)

La muscular del órgano, en el intestino delgado está formada por dos capas de músculo liso. La externa, mas delgada, tiene fibras longitudinales, y la interna, mas gruesa, fibras circulares. La contracción de la capa circular interna disminuye el diámetro del lumen intestinal; y la contracción de la capa longitudinal externa acorta el tubo. Además, la muscular contiene otro plexo del sistema nervioso entérico o *plexo de Auerbach*, el cual regula gran parte de la motilidad del tubo digestivo, particularmente en lo relativo a la frecuencia y fuerza de las contracciones de la muscular. (25), (29)

La serosa rodea por completo el intestino delgado, y se compone como ya hemos visto de tejido conectivo y epitelio simple escamoso. (29)

6.2.3 Fisiología.

El intestino delgado constituye el sitio más importante de la digestión y de la absorción. Las especializaciones histológicas de las vellosidades y de las microvellosidades amplían en gran medida la superficie sobre, y a través de, la cual tienen lugar la digestión y la absorción. (25)

Absorción en el intestino delgado: La mucosa intestinal dispone de un conjunto de transportadores que le permiten absorber un volumen enorme de líquidos y de electrolitos en el curso de un día normal. De un ingreso de nueve litros de líquido, el intestino delgado absorbe entre 7 y 8, y deja de 1 a 2 L para que el colon contienda con ellos. La absorción en el intestino delgado comparte características comunes con la captación de líquidos y electrolitos a cargo del túbulo renal proximal. La absorción en el colon semeja la del túbulo renal distal en el sentido de que ambas tienen transportadores de sodio sensibles a la aldosterona.

La mayor parte de los nutrientes (p. ej., lípidos, proteínas y carbohidratos) se digieren y absorben a lo largo de toda la extensión del intestino delgado. Sin embargo, algunas sustancias especializadas se absorben sólo en regiones particulares. Así, los ácidos biliares conjugados se absorben en el íleon terminal, en tanto que la absorción del hierro tiene lugar en el duodeno (hierro libre) y en el estómago (hierro hem). (25)

La absorción involucra el transporte de los líquidos secretados y las moléculas pequeñas de iones producto de la digestión (nutrientes), al interior de las células epiteliales que revisten la luz del tubo digestivo, el procesamiento de dichos nutrientes en el interior y la salida de éstos desde el interior hacia las circulaciones porta o linfática.

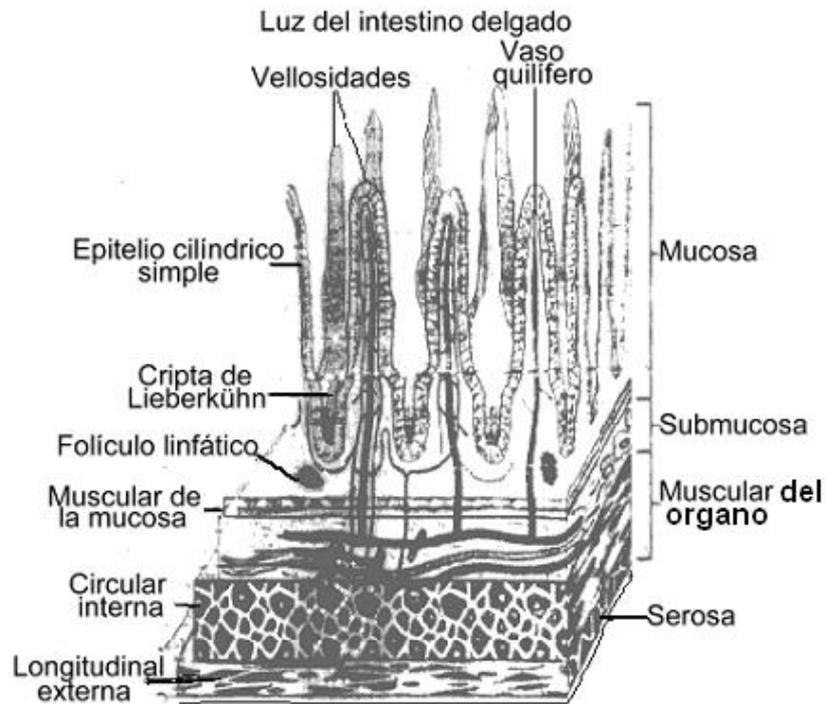


Figura 8. Características histológicas de la pared del intestino delgado. Entre las que

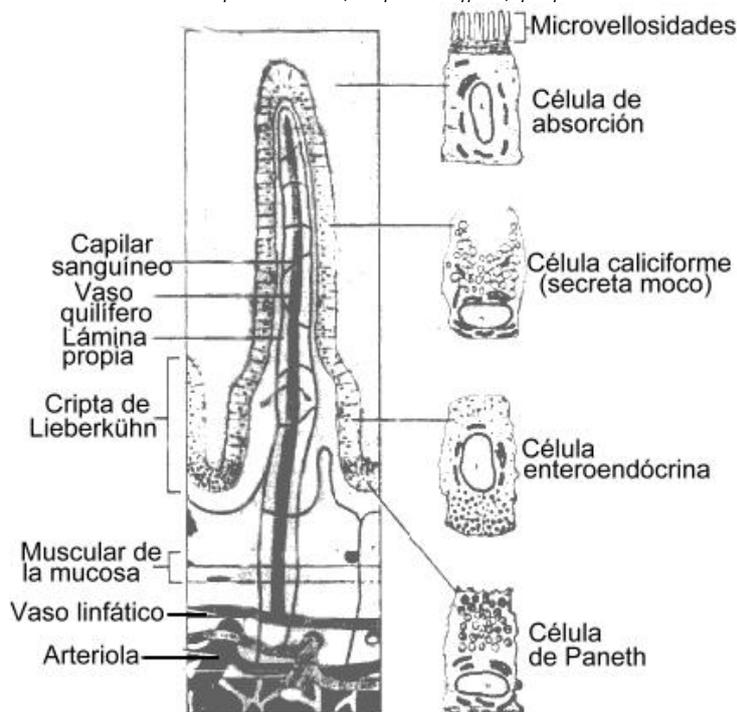


Figura 9. Tipos de células epiteliales en intestino delgado. En la figura se muestra una vellosidad y las células epiteliales que la constituyen. (29)

En el tracto gastrointestinal se pueden utilizar varios mecanismos para el transporte de las sustancias. Así tenemos los procesos de difusión y de difusión facilitada, o mediante transportadores en la vía de los procesos de transporte activo, o los denominados endocitosis (captación en las células endoteliales) y la exocitosis (expulsión por las células endoteliales). (25), (29)

Digestión mecánica: las segmentaciones son un tipo localizado de contracción de mezclado que ocurre en porciones intestinales distendidas por un gran volumen de quimo. Mezclan éste con los jugos digestivos y hacen que las partículas de alimentos entren en contacto con la mucosa, para su absorción.

Después de que se absorbe la mayor parte de una comida, se reduce la distensión de la pared del intestino delgado, por lo que se detienen las segmentaciones y se inicia el peristaltismo, que en el intestino delgado son los llamados complejos de motilidad migratoria, e inician en la porción inferior del estómago y desplaza el quimo. Estos complejos emigran lentamente por el intestino delgado en sentido distal, hasta alcanzar el extremo del íleon en 90 a 120 min. Luego, se inicia otro complejo de este tipo en el estómago. En total el quimo permanece en el intestino delgado de tres a cinco horas. (29)

En el intestino delgado el grado de control sobre la motilidad es casi independiente del sistema nervioso central y es controlado por el sistema de neuronas localizado por completo en el tracto gastrointestinal, denominado sistema nervioso entérico.

Digestión química: El quimo que llega al intestino delgado contiene hidratos de carbono, proteínas y lípidos digeridos parcialmente. La digestión de estas sustancias se completa gracias a la acción conjunta del jugo pancreático, bilis y jugo intestinal en el intestino delgado. Algunas sustancias pueden absorberse sin digestión química, como los aminoácidos, colesterol, glucosa, vitaminas, minerales y agua. (29)

6.3 HÍGADO.

6.3.1 Anatomía.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, está localizado en el cuadrante superior derecho del abdomen en el espacio peritoneal justo en la parte inferior del diafragma derecho y por debajo de la caja torácica. En el ser humano puede alcanzar un peso de 1.200 – 1.500 gramos. En el hígado se distinguen cuatro lóbulos, y de ellos los dos principales son el derecho y el izquierdo (*Figura 10A*). El lóbulo izquierdo del hígado está en el epigástrico, por lo que no está protegido por el tórax, además cada lóbulo se divide en numerosos lobulillos, los cuales son las unidades funcionales del hígado. (25), (26), (31).

Recibe casi 25% del gasto cardiaco, aproximadamente 1 500 mL de sangre por minuto en la vía de dos fuentes: el flujo venoso (proveniente desde el tubo digestivo y el bazo) de la vena porta hepática, esencial para el rendimiento de la intervención hepática en las funciones corporales ya que es abundante en nutrimentos recién absorbidos, así como de fármacos; y el flujo arterial (proveniente de la aorta) de la arteria hepática, con importancia en la oxigenación hepática y en el suministro al sistema biliar; la sangre fluye de la periferia (espacio portal) hacia la vena hepática (vena central). Tanto la arteria como la vena van acompañadas de conductos biliares y vasos linfáticos, los cuales convergen en el espacio portal. La vena porta y las arterias hepáticas se ramifican repetidamente haciendo del hígado un órgano sumamente vascularizado. (25), (26).

6.3.2 Histología.

Existen diversos puntos de vista sobre la estructura de los lobulillos hepáticos que toman en cuenta la morfología y la función, de esta forma tenemos tres tipos (*figura 10 B*): 1) Los lobulillos clásicos, vistos al microscopio con bajo aumento, tienen un patrón geométrico bien definido en forma de poliedros (*figura 11A*), formados por la disposición de los hepatocitos alrededor de la vena

central, en los extremos de los lobulillos se encuentran los llamados espacios porta, que presentan en su interior una vénula y una arteriola, ramas de la vena porta y de la arteria hepática, un conducto biliar y vasos linfáticos. (33), (35)

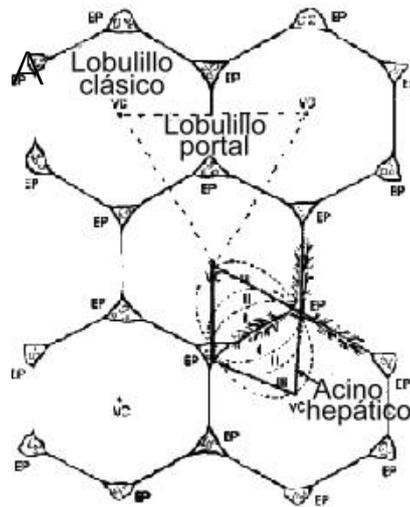
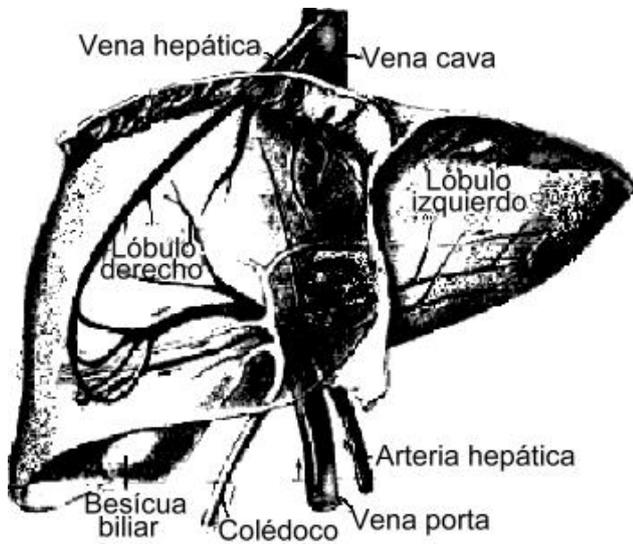


Figura 10A. Anatomía del hígado (Se aprecia el

lóbulo derecho y el lóbulo izquierdo);

Figura 10B. formas de ver el hígado para su estudio histológico. (Lobulillo clásico; Lobulillo portal y Lobulillo acinar).

2) También tenemos el lobulillo portal que es de forma triangular, en el centro una triada hepática o espacio porta y en los vértices tres venas centrolobulillares y por límite tres septos radiales. Y 3) el lobulillo acinar tiene forma romboidal o de diamante con dos espacios porta alineados en ángulo recto con respecto a dos venas centrolobulillares, en este caso entre los espacios porta se encuentran ramas transversales de la vena porta, de la arteriola hepática, del conductillo biliar y del baso linfático.

Los hepatocitos se localizan en un esqueleto de células de apoyo denominadas células reticuloendoteliales, aquí los hepatocitos están dispuestos radialmente formando una sola capa. El espacio que queda entre estas hileras de células hepáticas es denominado sinusoides hepáticos, estos capilares sinusoidales están recubiertos por dos tipos de células: las células endoteliales típicas de los capilares sanguíneos y por macrófagos que en este órgano se denominan células de Kupffer, las cuales tienen citoplasma en forma estrellada con núcleo oval, grande y nucleolo evidente. Su principal función es la fagocitosis

de hematíes en vía de desintegración por lo que digieren hemoglobina resultando en la producción de bilirrubina (figura 11B). (35)

El sinusoides hepático está rodeado por una red de fibras reticulares, y el espacio que separa la pared de los sinusoides de los hepatocitos se denomina Espacio de Disse, en este espacio se encuentran las llamadas células estrelladas o lipocitos que almacenan grasa. (25)

El revestimiento de los sinusoides hepáticos contiene orificios en su pared, lo que permite el libre paso de macromoléculas del interior del sinusoides al espacio de Disse, y de aquí a los hepatocitos. Los sinusoides desembocan en el centro del lobulillo, en la denominada vena centrolobulillar.

Los conductos biliares, que drenan los lóbulos principales derecho e izquierdo, están formados por la unión de los capilares biliares, que tienen origen entre las células hepáticas. Los conductos biliares se unen para formar el conducto hepático el cual recibe al conducto cístico procedente de la vesícula biliar para formar el conducto colédoco, que pasa a través de la pared del duodeno y se une al conducto pancreático para formar la ampolla de Vater. (26)

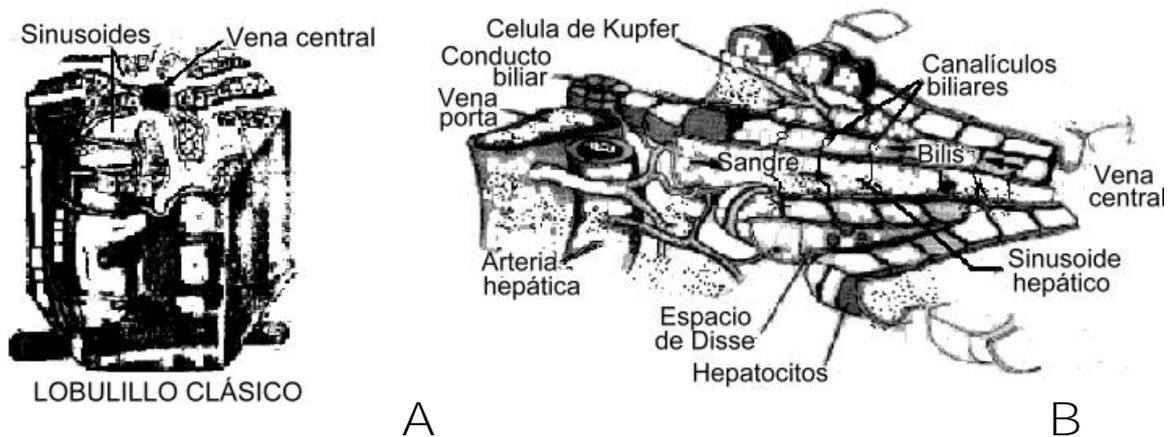


Figura 11A. Lobulillo hepático clásico (Se aprecia la forma poliédrica del lobulillo clásico); Figura 11B. principales características histológicas de una porción del lobulillo hepático (se aprecia la disposición radial de los hepatocitos así como los sinusoides hepáticos y el flujo que sigue la sangre y la bilis).

6.3.3 Fisiología.

El hígado tiene una enorme capacidad funcional y regenerativa, de esta forma puede resecarse hasta en un 80% de su masa sin lesionar su función. Entre sus funciones están las siguientes:

Síntesis proteica. El hepatocito sintetiza varias proteínas como la albúmina, la protrombina, el fibrinógeno y las lipoproteínas, estas proteínas son vertidas gradualmente al torrente sanguíneo (función endócrina).

Secreción de bilis. La producción de bilis es una secreción exócrina, siendo sus componentes principales los ácidos biliares y la bilirrubina. El 90% procede de la reabsorción intestinal y llega al hígado por conducto de la vena porta, el 10% restante se sintetiza en el hepatocito mediante la conjugación de ácido cólico con los aminoácidos glicina y teurocólico. Los ácidos biliares tienen una importante función emulsionando los lípidos de los alimentos y facilitando su hidrólisis por las enzimas digestivas, además de que muchas sustancias son excretadas en la bilis. ⁽³⁵⁾

Acumulación de metabolitos. Los lípidos y glúcidos, importantes reservas energéticas, se acumulan en la célula hepática principalmente en forma de grasas neutras y glucógeno. El hígado también sirve de depósito de varias vitaminas, principalmente vitamina A.

Función metabólica. En su mayoría, las enzimas que catalizan los procesos metabólicos principalmente de grasas, carbohidratos, proteínas y detoxificación y excreción de fármacos y de otras sustancias, se localiza en el retículo endoplásmico de los hepatocitos.

Metabolismo de las grasas.- los triglicéridos, el colesterol y los fosfolípidos se sintetizan en el hígado a partir de ácidos grasos, y son transformados en complejos con proteínas específicas para formar lipoproteínas de muy baja densidad que penetran al plasma.

Metabolismo de los carbohidratos.- el hígado es la principal fuente de glucosa en el plasma, en donde el hepatocito participa en la transformación de lactato, y ciertos aminoácidos en glucosa, este proceso enzimático es denominado neoglucogénesis. Cuando hay una deficiencia de glucosa, el hígado metaboliza ácidos grasos para formar cuerpos cetónicos que representan una fuente alterna de energía para muchos tejidos.

Metabolismo de proteínas.- Las proteínas son catabolizadas en el hígado, con la consecuente formación de urea que posteriormente es secretada al plasma para ser excretada por el riñón. (34)

Destoxificación.- Por lo general éste metabolismo involucra la conversión de sustancias lipófilas, en sustancias más hidrófilas. Lográndose con la catálisis de modificaciones covalentes para cargar más a la partícula y pueda fragmentarse fácilmente en un medio acuoso o bien sea soluble en la bilis. (25)

Excreción de fármacos. El hígado secreta muchos fármacos a través de la bilis. El paso de estos fármacos, que son ácidos o bases orgánicos, a los canales biliares obedece a las leyes generales del paso a través de membranas.

La mayoría de los fármacos que penetran en el organismo son transformados parcial o totalmente en otras sustancias. Las enzimas encargadas de estas transformaciones se encuentran principalmente en el hígado. (24)

Las reacciones que permiten una excreción fácil se desarrollan en dos fases I)- oxidación-reducción, (formación de grupos polares) y II)- conjugación. (25)

Fase I)- Crea centros de conjugación sobre las moléculas por medio de modificaciones como: oxidación, reducción e hidrólisis. Estos cambios pueden producir varios de los siguientes resultados en el fármaco: a) Inactivación; b) Conversión de un producto inactivo en otro activo; c) Conversión de un producto activo en otro también activo, y d) conversión de un producto activo en otro también activo pero tóxico. (24)

Estas reacciones de oxidación, en ocasiones suelen hacer a las sustancias mas reactivas químicamente y en consecuencia generan productos intermedios más tóxicos. (25)

Fase II)- las reacciones de conjugación representan una síntesis entre una molécula exógena o sus productos de degradación y un sustrato endógeno, como el ácido glucurónico o el glutatión, aumentando así el tamaño de la molécula, y por lo general forma combinaciones menos tóxicas muy hidrosolubles, ionizables y de fácil excreción. (24)

La excreción biliar tiene una función muy importante en la eliminación en tres tipos de compuestos con pesos moleculares mayores de 300; aniones, cationes y moléculas sin ionizar que contienen grupos polares y lipofílicos. (27)

Los aniones orgánicos que se excretan en la bilis, lo logran principalmente cuando el fármaco está unido a las proteínas plasmáticas ya que está completamente disponible para la excreción biliar en virtud de su rápida disociación, incluyen el rojo fenol, la fluoresceína y la penicilina. (27)

Hay un mecanismo distinto para excreción de los cationes orgánicos, y se trata de la formación de compuestos de amonio cuaternario, ya que se hallan completamente ionizadas, y la ionización de los ácidos es aún mayor al pH intestinal que a los pH urinarios. Por tanto, la incorporación activa de estos fármacos a la bilis es un procedimiento eficaz para eliminar dichos compuestos del organismo con las heces. Como ejemplos tenemos el etobromuro de procainamida, mepeperfenidol, benzometamina y N –metilnicotinamida. (5), (27).

Por otro lado las moléculas de los compuestos sin ionizar, se pueden conjugar en las células hepáticas con aniones como glucuronato o sulfato, después se transportan a través de la membrana celular de la luz a los pequeños conductos biliares, al parecer por el mecanismo de transporte de aniones. En este caso la conjugación es esencial para la secreción. Cabe mencionar que muchos fármacos y hormonas se secretan inalterados en la bilis, aún cuando contienen grupos no ionizables. Aquí, la secreción biliar se favorece por la asimetría molecular con respecto a grupos hidrofílicos y lipofílicos. (27)

Si las propiedades fisicoquímicas del fármaco o sus productos de degradación son favorables para su reabsorción mediante difusión pasiva a través de la membrana intestinal (El intestino no dispone de sistemas de transporte activo para la absorción de ácidos orgánicos exógenos), puede producirse lo que se denomina ciclo entero hepático, en que la secreción biliar y la reabsorción intestinal continúan hasta que el fármaco es eliminado por excreción renal, siendo este el principal responsable de la larga duración de algunos fármacos en el organismo. (5), (27).

6.4 RIÑÓN.

6.4.1 Anatomía.

Los riñones consisten en un par de órganos encapsulados localizados en la cavidad retroperitoneal. En un corte sagital se puede observar tres regiones principales: a) la corteza se encuentra justo por debajo de la cápsula renal, siendo la región más externa. b) la médula es la región central que a su vez está dividida en médula externa e interna; la médula externa a su vez posee una banda interna y una externa, y c) la papila es la región más interna de la médula interna y desemboca en unas bolsas denominadas cálices, que son prolongaciones del uréter. En el hilio de cada riñón ingresa una arteria renal y sale una vena renal. (Figura 12) ^{(25), (32)}.

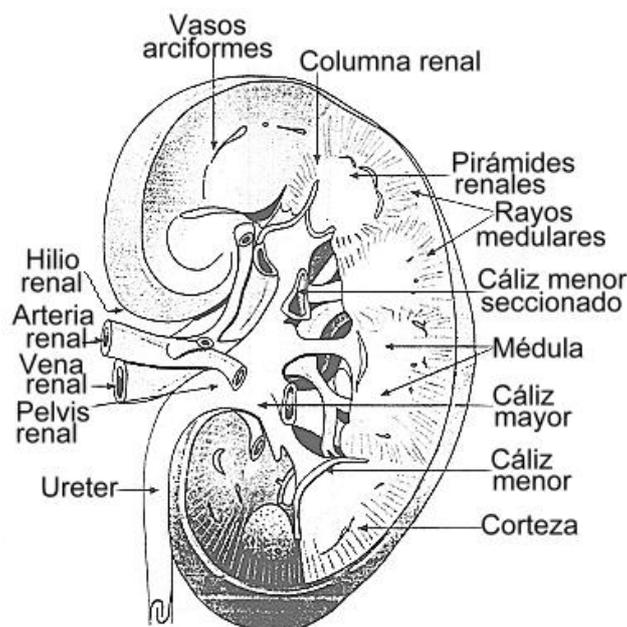


Figura 12. Anatomía del riñón. Se puede observar las tres regiones principales, que son; corteza, médula y papila. ⁽³²⁾

6.4.2 Histología.

La unidad funcional del riñón es la nefrona, y cada riñón humano está constituido por alrededor de 1.2 millones de nefronas. La nefrona se compone del glomérulo, la cápsula de Bowman y un túbulo renal. (Figura 13)

El glomérulo, que proporciona la superficie de filtrado, se encuentra en la parte inicial de la nefrona y consiste en una red de capilares glomerulares, que están formados por células especializadas llamadas mesangliales, de las que se tienen dos grupos: las extraglomerulares y las intraglomerulares. Consta además de una arteriola aferente y otra eferente. Una característica particular del endotelio del capilar glomerular es que se encuentra *fenestrado*. Aquí se produce la filtración de la sangre: las proteínas y las células son retenidas, mientras que el agua y las sustancias disueltas de pequeño tamaño molecular se vierten al espacio de Bowman (este es el primer paso de la formación de la orina). (11) (25) (32).

La Cápsula de Bowman, en su capa visceral está compuesta de células modificadas para efectuar su función, denominados Podocitos, que cuentan con numerosas extensiones citoplásmicas (proyecciones primarias), que a su vez tienen proyecciones secundarias (pedículos), que envuelven la mayor parte de los capilares glomerulares. La pared externa que rodea al espacio de Bowman, está compuesta por células epiteliales escamosas simples. (11).

En el túbulo renal la mayor parte del ultra filtrado es reabsorbido a través de la pared tubular y devuelto a la sangre (resorción, reabsorción). La fracción no reabsorbida permanece en el túbulo y es eliminada con la orina final (excreción). El túbulo renal se compone de los siguientes segmentos: un túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y conductos colectores. Cada segmento de la nefrona realiza diferente función, con lo que las células epiteliales que revisten cada segmento poseen diferentes características en su estructura (32) (figura 14).

El *túbulo contorneado proximal* está constituido por un segmento contorneado, y un segmento recto, con las siguientes características celulares: posee en la superficie luminal, microvellosidades bien desarrolladas denominadas reborde en cepillo, que proporcionan una extensa superficie para la principal función que se realiza en este lugar (la resorción), y unos complejos repliegues de la membrana celular basal y lateral. Aquí se recupera el 80% de los electrolitos y el agua. (25) (28) (32)

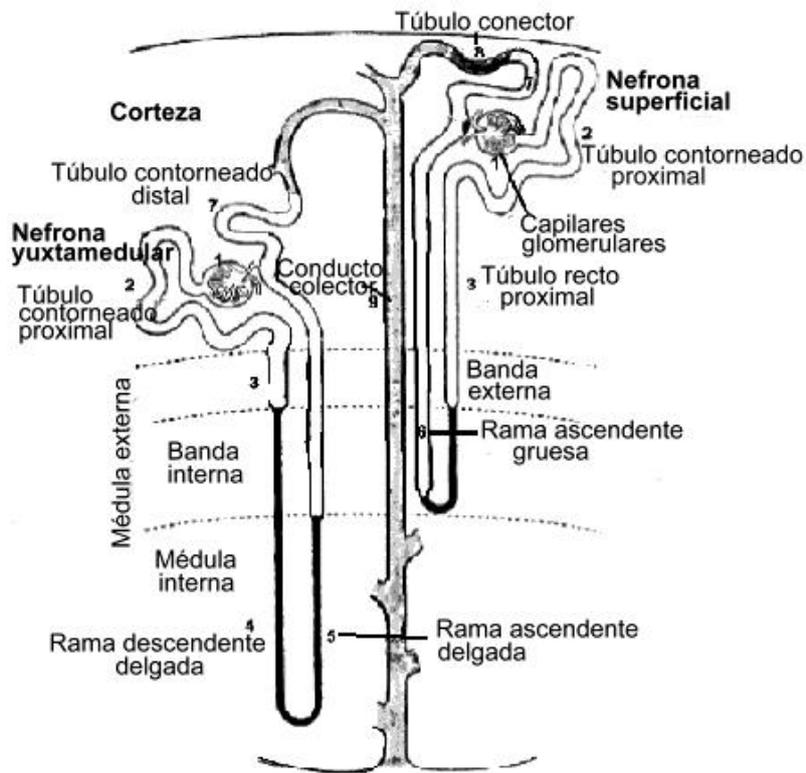


Figura 13. En la figura se observa dos tipos de nefronas como nefrona superficial y nefrona yuxtamedular y sus principales componentes. (32)

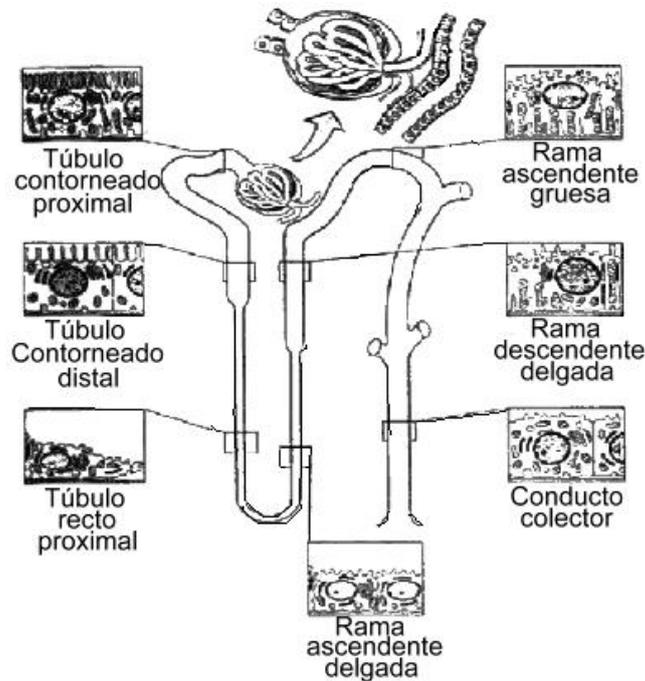


Figura 14. Se puede observar los diferentes tipos de células epiteliales de cada región de la nefrona y sus características histológicas. (32)

El *asa de Henle* está constituida por una rama descendente, inicialmente de grueso calibre y seguida luego de una parte mas delgada, y una rama ascendente, inicialmente de pequeño calibre (en asas largas únicamente) y seguida de una parte de mayor diámetro.

El *túbulo distal* empieza con un segmento recto, seguido de un segmento contorneado. La parte inicial del túbulo contorneado distal está en íntimo contacto con el glomérulo de su propia nefrona. ⁽²⁸⁾

Varios túbulos distales se unen para formar un *conducto colector*, constituido por un segmento cortical y un segmento medular anatómica y funcionalmente distintos, que acaban de elaborar la orina y la conducen finalmente a las papilas renales y la pelvis renal para su excreción. ⁽²⁸⁾

6.4.3 Fisiología.

La sangre se filtra en los riñones para retirar los desperdicios, en particular la urea y los compuestos nitrogenados, y para regular los electrolitos extracelulares y el volumen intravascular. La función primordial del riñón es el mantenimiento de los valores normales del volumen de Líquido Extracelular (LEC) y del equilibrio de las entradas de Na^+ y agua (con al dieta, etc.) con las perdidas por la orina. Además contribuye a mantener constantes la concentración de K^+ extracelular y el pH de la sangre y de las células, ajustando la excreción de H^+ y de HCO_3^- a la cantidad ingerida con la dieta, a la generada como resultado del metabolismo celular y a la eliminada con la respiración. ^{(28) (25)}

Por otra parte el riñón evita la pérdida de nutrientes (por ej: glucosa y aminoácidos) al tiempo que elimina los productos finales del metabolismo celular (ej; urea y ác. úrico) y los compuestos de tipo xenobiótico.

Además, el riñón lleva a cabo numerosas funciones metabólicas (por ej: formación de arginina, gluconeogénesis, hidrólisis peptídica) y constituye un

elemento importante de la secreción y elaboración de distintas hormonas (por ej: angiotensina II, eritropoyetina, hormona D, prostaglandinas). (28)

Detoxificación y excreción. El organismo es capaz de diferenciar las sustancias útiles de las indeseables y puede desechar estas últimas en tres niveles: cuando entran por tubo digestivo, en su captación y metabolismo por las diferentes células y en su eliminación por los riñones.

El riñón cuyo flujo de sangre corresponde a una gran proporción del gasto cardíaco, lleva a cabo una eficaz acción reguladora sobre la composición de la sangre: las sustancias indeseables apenas son reabsorbidas tras la filtración glomerular y son excretadas por la orina. Esto sucede con los productos finales del metabolismo nitrogenado (urea, ác. Úrico, creatinina, etc.)

Los ácidos y bases orgánicas inútiles o nocivos son segregados hacia el túbulo por medio de procesos específicos de transporte activo. Las sustancias que son importantes para el organismo son reabsorbidas. (28)

6.5 CEREBRO

6.5.1 Anatomía.

El cerebro es la parte más grande del encéfalo que forma parte del sistema nervioso (SN). El tejido nervioso consiste en una red compleja y muy organizada de miles de millones de neuronas, así como un número incluso mayor de células gliales, que se encuentran distribuidos por el organismo ínter ligándose y formando una red de comunicaciones que constituye el sistema nervioso. (29), (35). Este sistema se divide en:

a) sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo se encuentra en el cráneo y comprende casi 100 mil millones de neuronas. La médula espinal se conecta con el encéfalo a través del agujero

occipital del cráneo y la rodean los huesos de la columna vertebral, y posee casi 100 millones de neuronas.

b) sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios craneales y raquídeos con sus respectivas ramas, ganglios y receptores sensoriales.

El SNP se subdivide en: 1) sistema nervioso somático (SNS), el cual se compone de neuronas sensoriales que transmiten al SNC información de los receptores de los sentidos especiales y somáticos. 2) sistema nervioso autónomo (SNA), conformado de neuronas sensoriales que transmiten al SNC información de los receptores sensoriales autónomos. Además la porción motora del SNA consiste en dos partes, llamada sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático. 3) sistema nervioso entérico (SNE), es el “cerebro del tubo digestivo” y opera de manera involuntaria. Considerado en otra época parte del SNA, consta de casi cien millones de neuronas en los plexos entéricos, distribuidos a lo largo del tubo digestivo. (29)

En el cerebro existe una hendidura profunda (*cisura longitudinal*), en cuyo fondo está el *corpus callosum* que a modo de puente une a los dos hemisferios cerebrales. El cerebro está constituido de una masa de sustancia blanca cubierta por una capa de sustancia gris (la corteza cerebral), y todas las regiones de la corteza cerebral tienen seis capas básicas designadas por números romanos; I) *capa molecular superficial*, II) *capa de células granulosas externa*, III) *capa de células piramidales externa*, IV) *capa de células granulosas interna*, V) *capa de células piramidales interna* y VI) *capa de células multiforme*. El cerebro se divide en lóbulos *frontal*, *temporal*, *parietal* y *occipital*. Además el cerebro consta de ventrículos, los laterales que son el derecho e izquierdo se denominan ventrículos primero y segundo, de igual forma tenemos el tercer ventrículo y cuarto ventrículo que se conecta al estrecho conducto central de la médula espinal (*Figura 15*). (46)

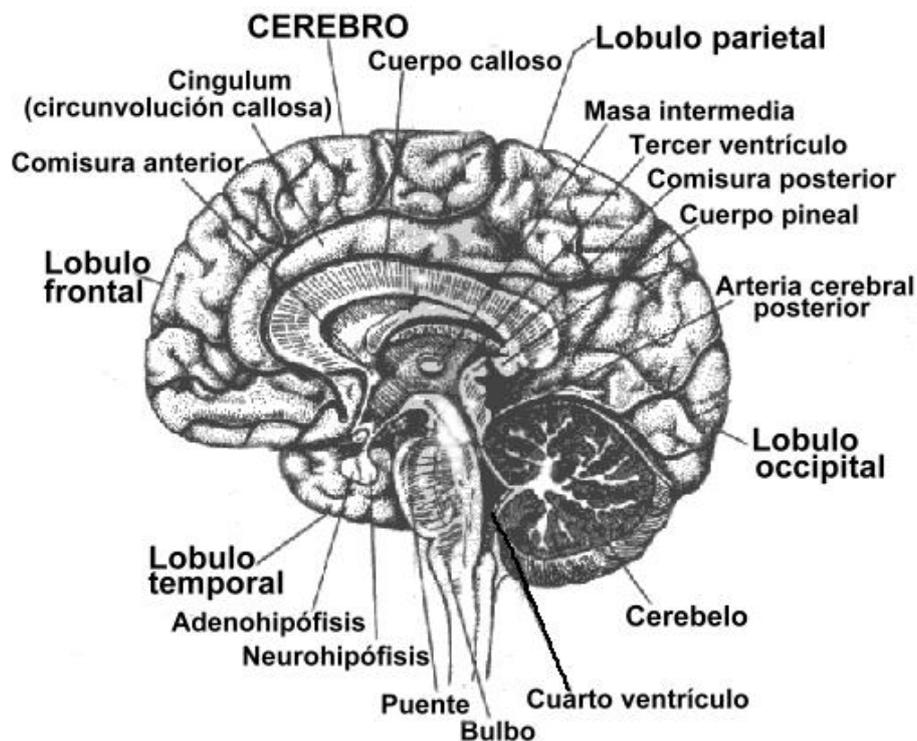


Figura 15. Anatomía del cerebro. En la figura podemos observar las principales regiones en el cerebro. (46)

6.5.2 Histología.

El tejido nervioso tiene dos tipos principales de células: neuronas y células gliales.

Neuronas (figura 16). La mayoría de éstas tienen tres partes; 1) cuerpo celular.- puede ir de 5 micrómetros, hasta 135 micrómetros el cual posee un núcleo generalmente esférico y este aparece rodeado por el citoplasma, que incluye organelos típicos como lisosomas, mitocondrias y complejo de Golgi, aparece poco teñido en las preparaciones histológicas, además posee un nucleolo grande y central. El cuerpo celular también incluye grupos prominentes de retículo endoplásmico rugoso, llamados *cuerpos de Nissl*. El citoesqueleto comprende neurofibrillas, que consisten en haces de filamentos intermedios y brindan sostén y forma a la célula, y microtúbulos, que ayudan a mover materiales entre el cuerpo celular y el axón. 2) dendritas.- que son las porciones de las neuronas que reciben impulsos nerviosos. Por lo regular son cortas y muy ramificadas.

Generalmente las dendritas no están mielinizadas, su citoplasma contiene cuerpos de *Nissl*, mitocondrias y otros organelos. 3) axón.- (neurita o cilindroeje) transmite los impulsos nerviosos a otras neuronas, fibras musculares o células glandulares. El axón es una prolongación cilíndrica, delgada y larga, que con frecuencia se une con el cuerpo celular en una elevación cónica (eminencia axónica). En la mayoría de las neuronas los impulsos surgen en la unión de la eminencia con el segmento inicial, lo que se denomina zona de activación. El axón contiene mitocondrias, microtúbulos y neurofibrillas, no hay síntesis de proteínas por la ausencia de retículo endoplásmico rugoso. Al citoplasma axónico, denominado axoplasma, lo envuelve la membrana plasmática que se conoce como axolema, y a lo largo del axón, emite ramas laterales, llamadas colaterales axónicos. (29), (35)

Según su morfología las, neuronas pueden clasificarse en los siguientes tipos: 1) Neuronas multipolares (que presentan más de dos prolongaciones). 2) Neuronas bipolares (poseen una dendrita y un axón) y 3) Neuronas pseudomonopolares (Presentan una prolongación única que luego se divide en dos) por sus características las dos prolongaciones son axones, pero las arborizaciones de la rama periférica reciben estímulos y funcionan como dendritas (figura 16). (35)

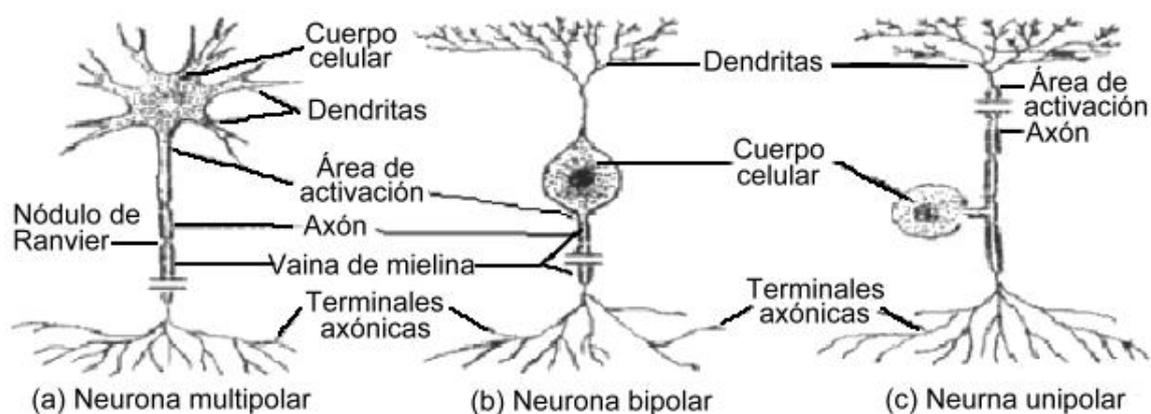


Figura 16. Tipos de neuronas y principales características histológicas. Se puede apreciar el cuerpo celular, dendritas y axones. (35)

Vaina de mielina.- ésta es una cubierta de lípidos y proteínas dispuesta en varias capas, que rodea a la mayoría de los axones de las neuronas en mamíferos. La vaina aísla eléctricamente al axón y aumenta la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. Hay dos tipos de células gliales que producen vaina de mielina. Las células de Schwann, en el SNP, empiezan a formar la vaina, envolviendo hasta 100 veces su membrana alrededor del axón a manera de espiral, constituyendo la vaina de mielina. En el axón hay interrupciones de la vaina de mielina, llamadas nódulos de Ranvier. Los oligodendrocitos, en el SNC, mielinizan parte de muchos axones. El oligodendrocito emite unas 15 prolongaciones anchas y planas, que forman la vaina de mielina a manera de espiral que rodea los axones nerviosos centrales, y los nódulos de Ranvier son menos numerosos. (29)

Células gliales. Éstas comprenden casi la mitad del volumen del SNC, y en general estas células son más pequeñas que las neuronas; además su número excede el de éstas en 5 a 50 veces. En contraste con las neuronas, no generan ni propagan potenciales de acción, pero si pueden multiplicarse y dividirse en el sistema nervioso maduro. Existen seis tipos de células gliales, de las cuales cuatro se encuentran en el SNC: astrositos, oligodendrocitos, microglía y células ependimarias, y dos en SNP: células de Schwann y satélite. (29), (35)

Sustancia gris y sustancia blanca. La sustancia blanca consiste en conjuntos de prolongaciones mielinizadas de muchas neuronas, y es el color blanco de la mielina lo que le confiere su nombre. Por otra parte, la sustancia gris del sistema nervioso contiene cuerpos celulares, dendritas, axones amielínicos, terminales axónicas y células gliales. En la médula espinal, la sustancia blanca rodea una parte central de sustancia gris en forma de mariposa o letra H, mientras que en el encéfalo una capa delgada de sustancia gris cubre la superficie de las estructuras más grandes del encéfalo, cerebro y cerebelo. Tanto la sustancia gris como la blanca poseen vasos sanguíneos. (Figura 17) (29)

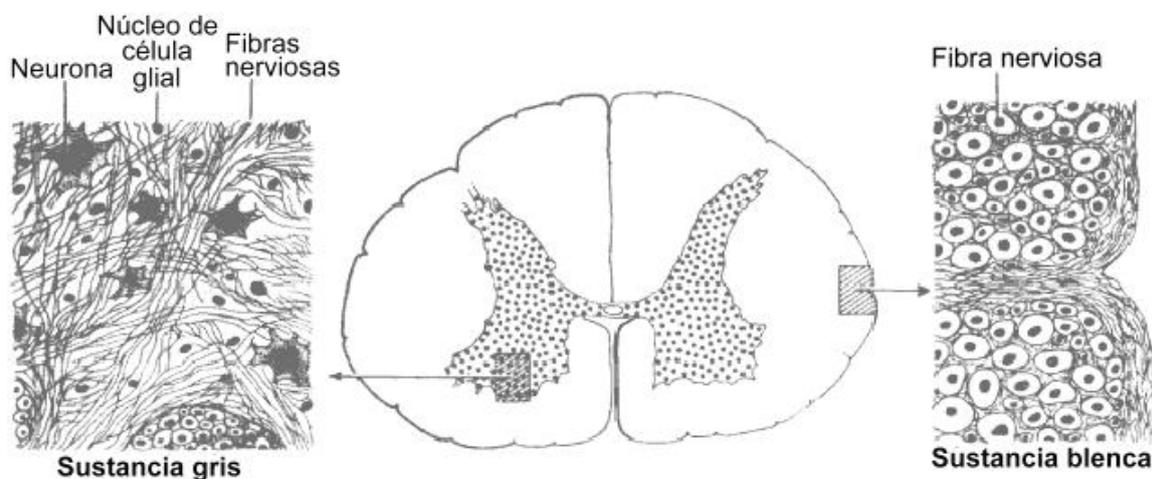


Figura 17. Localización de sustancia gris y sustancia blanca en medula espinal. Se aprecia la forma característica de letra H que forma la sustancia gris (contiene cuerpos celulares axones y dendritas) y la sustancia blanca (constituida por prolongaciones mielinizadas de muchas neuronas que le confiere el color blanco).

(29)

Sinápsis. Generalmente cada neurona transmite impulsos solo a través de su axón y solo los recibe de axones de otras neuronas. Esta transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra depende de estructuras altamente especializadas, las sinápsis. La mayoría de las sinápsis se establece entre un axón y una dendrita (axodendrítica) o entre el axón y el soma celular (axosomática), hay también sinápsis entre dendritas (dendodendríticas) y entre axones (axoaxónica). En la sinápsis, la hendidura sináptica, que separa las dos células nerviosas es un espacio de 20-30nm, en las que la porción terminal de los axones poseen numerosas vesículas sinápticas que contienen sustancias denominadas neurotransmisores, que consisten en mediadores químicos responsables de la transmisión del impulso nervioso a través de esa sinápsis (Figura 18). (35)

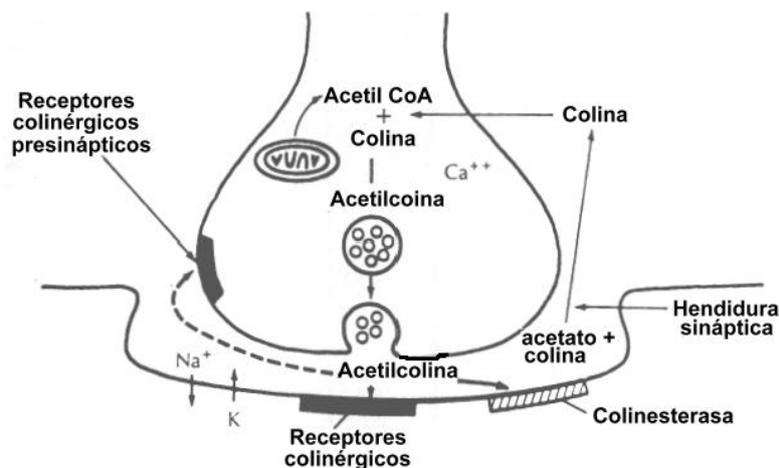


Figura 18. Representación de una sinápsis. Se observa una neurona colinérgica la cual libera acetilcolina a la hendidura sináptica. (35)

6.5.3 fisiología.

El sistema nervioso desempeña tres funciones básicas:

- **Función sensorial.** Los receptores sensoriales detectan estímulos internos, como el aumento de la acidez sanguínea, o externos, como una gota de lluvia que cae en el brazo. Las neuronas que transmiten la información sensorial al encéfalo o a la médula espinal se denominan neuronas sensoriales o aferentes.
- **Función de integración.** El sistema nervioso integra (procesa) la información sensorial al analizarla y almacenar una parte de ella, lo cual va seguido de la toma de decisiones acerca de las respuestas apropiadas. Las neuronas que se encargan de ésta función, llamadas interneuronas (neuronas de asociación), forman la inmensa mayoría de las que hay en el cuerpo humano.
- **Función motora.** Consiste en responder a las decisiones de la función de integración. Las neuronas encargadas de ésta función son neuronas motoras o eferentes, que transmiten información del encéfalo y de la médula espinal a diversas estructuras corporales. Los órganos y las células en los cuales se distribuyen las neuronas motoras se denominan efectores, por ejemplo fibras musculares y células glandulares.

7. FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD A TOXICIDAD POR FÁRMACOS.

Entre los factores que influyen en la capacidad de una sustancia para ejercer su acción farmacológica, cabe destacar sus propiedades fisicoquímicas. La absorción, distribución, acceso al lugar de acción y excreción de un fármaco están ampliamente relacionadas con su liposolubilidad. De modo general, cuanto mas liposoluble sea una sustancia más fácil es su acceso y permanencia en el organismo.

Los órganos afectados con mayor frecuencia por fármacos son; la piel, el aparato digestivo, el sistema nervioso, la sangre y el aparato cardiovascular, los órganos de los sentidos, el hígado y el riñón.

Cabe mencionar que así como la microscopía óptica, la microscopía electrónica es una herramienta de gran sensibilidad al permitir detectar cambios a nivel subcelular, provocados por efecto de los fármacos, los cuales pueden estar presentes aún en ausencia de alteraciones clínicas, bioquímicas o histológicas. (33)

7.1 Estómago e intestino delgado.

Gastropatía erosiva aguda.- Los fármacos son la causa más común de gastropatía erosiva aguda, ésta se caracteriza endoscópicamente por hiperemia difusa de la mucosa con múltiples erosiones y úlceras superficiales.

Se entiende por erosión la denudación del epitelio superficial y la parte profunda de la mucosa permanece intacta, en tanto que una úlcera afecta todo el espesor de la mucosa.

Microscópicamente existe denudación y lesión epitelial superficial y puede presentarse necrosis de glándulas superficiales, así como hemorragia en la lámina propia. El epitelio tiene la capacidad de regenerarse rápidamente en la fase de reparación. (34)

Gastritis crónica.- Desde el punto de vista histológico podemos observar que existe un aumento en el número de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa gástrica. El caso más leve (gastritis superficial crónica) afecta la región subepitelial alrededor de las fosas gástricas y en los casos más graves afecta a las glándulas más profundas de la mucosa.

Los casos de gastritis crónica pueden ser de dos tipos:

Tipo A, que es una gastritis autoinmunitaria asociada con anemia perniciosa. Algunas manifestaciones son que hay disminución del espesor de la mucosa del cuerpo y del fondo, y las glándulas se recubren predominantemente por células mucosas.

Tipo B, este tipo de gastritis tiene una fuerte asociación con H. Pylori, y debido a que la infección con esta bacteria es principalmente en el antro del estómago, es aquí el mayor efecto. La infección con H. Pylori por lo general se asocia con la presencia de neutrófilos en la lámina propia, cuando la lesión avanza hay inflamación en la mucosa profunda así como en el cuerpo del estómago.

Úlcera péptica.- éstas son úlceras que se forman en cualquier parte del tubo digestivo que este expuesta a la acción del jugo gástrico ácido, se producen principalmente en el duodeno (úlceras duodenales) y en el estómago (úlceras gástricas).

Los principales factores que influyen en la formación de la úlcera péptica son la hipersecreción de ácido, así como la infección por Helicobacter Pylori y la disminución de la resistencia de la mucosa al ácido. Se ha visto que las concentraciones de prostaglandina E₂ en el jugo gástrico están disminuidas en los pacientes con úlcera péptica. (34)

7.2 Hígado.

El hígado es un órgano que está continuamente expuesto a que diferentes fármacos y/o sus metabolitos le produzcan alteraciones, ya que es el lugar más importante de biotransformación. Esto gracias a que cuenta con las dos enzimas más importantes: la NADPH-C reductasa y el citocromo P₄₅₀ por las que se convierten ciertos fármacos en derivados más hidrosolubles, para ser más fácilmente excretados por orina o bilis. (21)

Algunas formas en que los medicamentos pueden afectar al hígado son:

I).- toxicidad predecible (relacionada con la dosis), que causa daño directo al hepatocito, suele haber afectación simultánea de otros órganos, generalmente a nivel gastrointestinal y neurológico.

II).- toxicidad impredecible no relacionada con la dosis (por mecanismos idiosincrásicos), solo afecta a una pequeña proporción de pacientes, en ocasiones coexisten fenómenos de hipersensibilidad, como fiebre y eosinofilia. La lesión se manifiesta de diversas formas, a) necrosis hepatocelular masiva, b) colestasis, c) hepatitis aguda, d) degeneración grasosa, e) hepatitis crónica, f) hepatitis granulomatosa, g) lesiones en forma de masas. (34)

Los cambios ultraestructurales comúnmente observados son, pérdida e hinchamiento de las microvellosidades de la membrana plasmática, así como su desprendimiento en porciones acompañada de citoplasma, puede haber aumento en el número de mitocondrias y en el tamaño (megamitocondrias). En el retículo endoplásmico liso se puede encontrar multivesiculación, dilatación y proliferación aparente, lo que refleja el aumento en la actividad de los sistemas de degradación de sustancias exógenas (principalmente del sistema de citocromos),

El retículo endoplásmico rugoso puede presentar también dilatación y vesiculación con pérdida de ribosomas. Los peroxisomas pueden estar disminuidos o aumentados en número y tamaño, los lisosomas también pueden

estar aumentados. En el citoplasma es frecuente encontrar inclusión de lípidos en forma de glóbulos de diversos tamaños y densidad.

En el núcleo puede haber condensación del nucleolonema, rearrreglo de la cromatina, inclusiones de glucógeno o separación y fragmentación del nucleolo.

(33)

7.3 Riñón.

El riñón muestra ciertas características peculiares que lo hacen susceptible de sufrir daño por toxicidad, que se mencionan a continuación.

El riñón es el tejido que tiene mayor riego sanguíneo por gramo de peso en todo el cuerpo (alrededor de unos 3.5 ml/g/min. Contra aproximadamente 0.07 ml/g/min para la mayor parte de los demás órganos, excepto el pulmón). (23)

La tasa de filtración promedio es de 120 ml por min. Se filtran 170 a 180 litros en 24 horas. Los riñones son receptores del 25% del gasto cardiaco y constituye solo el 4% del peso total del cuerpo. (25)

Así los agentes circulantes llegan al riñón en proporción 50 veces mayor que la "usual" para otros tejidos. La reducción fisiológica del filtrado glomerular para producir orina concentrada puede exponer las superficies lumbinales de las células a concentraciones de moléculas filtradas hasta 300 veces mayores que las del plasma. Ningún otro líquido tisular queda expuesto a tales concentraciones. El transporte tubular separa fármacos de la fijación proteínica, dispositivo generalmente protector para otras células. El riñón es el que tiene el consumo máximo de oxígeno y la máxima producción de glucosa por lo tanto es vulnerable, para las toxinas que afectan la energía celular. (23)

Han sido propuestos diferentes factores en la participación de la inducción del daño incluyendo la concentración del fármaco debido al mecanismo contracorriente en el riñón, reducción en la perfusión medular, la cual, debido a la

baja tensión de oxígeno en este tejido fácilmente conduce a un daño isquémico.

(22)

Los fármacos y sus metabolitos, en el caso de los medicamentos orales y parenterales, corren por torrente sanguíneo para llegar a su sitio de acción o para ser excretados. Durante este recorrido pasan por varios órganos, y los riñones son un camino obligado para tales sustancias ya sea como sitio blanco, o principalmente como vía de eliminación. Es en estos aspectos en que se podría inducir a un daño renal (nefrotoxicidad por fármacos). (22)

Los principales efectos renales indeseables, provocados por fármacos, incluyen una reducción en el flujo sanguíneo renal, velocidad de filtración glomerular, necrosis papilar, retención de sodio e hiperkalemia, causadas principalmente por antiinflamatorios no esteroideos. La nefritis intersticial puede presentarse con algunos otros medicamentos como los antibióticos betalactámicos. (22)

Etiología.- El daño renal que se produce debido a agentes extraños ocurre por uno de los siguientes 3 mecanismos: (22)

- Toxicidad directa de las sustancias responsables.
- Daño renal por alteraciones vasculares.
- Fenómenos inmunológicos o de idiosincrasia.

La mayor parte de fármacos y productos químicos clínicamente importantes que se sabe producen nefrotoxicidad, lo hacen directamente, ya sea por mecanismos citotóxicos conocidos o desconocidos. Otros medicamentos pueden producir lesión renal por mecanismos indirectos. (23)

7.4 Cerebro.

Los efectos neurotóxicos provocados por algunos xenobióticos, pueden ser a nivel central, periférico, solos o bien acompañados de alteraciones en otros

órganos o sistemas, así mismo una misma sustancia puede originar varios efectos que pueden depender de la dosis, ruta de exposición y especie animal. (31)

Los efectos neurotóxicos pueden clasificarse de acuerdo a su localización como sigue:

1. Neuronopatías.- (sensoriales o motoras), hacen referencia a daños en el cuerpo celular de la neurona.
2. Axonopatías.- (proximales o distales, centrales o periféricas), cuando los afectados son los axones.
3. Sinaptopatías.- (presinápticas o postsinápticas), en este caso se afecta la sinápsis.
4. Mielinopatías.- cuando se lesiona la vaina de mielina que recubre los axones.

1. Neuronopatías. Existen agentes tóxicos que causan daño específicamente en el cuerpo celular de la neurona, esto debido a que el metabolismo de las neuronas depende por completo del suministro de glucosa y oxígeno, por lo que son muy sensibles a cualquier condición de anoxia e hipoglucemia provocados por alguna sustancia. Como ejemplos tenemos: A) los barbitúricos, que inducen anoxia en el cerebro. B) los cianuros y las azidas inhiben el sistema enzimático citocromo-oxidasa. C) la exposición crónica de monóxido de carbono, bloquea el transporte de oxígeno por la hemoglobina.

También existen xenobióticos en cuyas estructuras hay metales pesados, y tienen la capacidad de reaccionar con grupos sulfhidrilos, actuando directamente sobre el cuerpo celular de la neurona, por ejemplo los organometálicos.

2. Axonopatías. Los axones suelen ser la primera zona afectada, y de manera secundaria la vaina de mielina que los recubre. Solo un grupo de xenobióticos puede originar pérdidas patológicas significativas, por ejemplo: γ -dicetona, sulfuro de carbono, derivados nitrílicos, acrilamida, los esterres organofosforados, etc., aunque no se conoce el mecanismo por el que originan

este tipo de toxicidad, su efecto equivale a un corte del axón provocando degeneración en ambos lados.

3. Sinaptopatías. Son varios procesos sinápticos que pueden ser afectados: la biosíntesis y el metabolismo del neurotransmisor; el transporte axonal y la liberación de las sustancias neurotransmisoras; la comunicación señal receptor; la captación y la interacción del neurotransmisor con el receptor; etc. Como ejemplos tenemos: a) la toxina botulínica, que inhibe la liberación de acetilcolina provocando parálisis. b) la 6-hidroxidopamina, puede dar especies radicales de oxígeno en las terminales axónicas dopaminérgicas y noradrenérgicas. c) insecticidas organofosforados, que suelen inhibir la enzima acetilcolinesterasa.

4. Mielinopatías. La pérdida de la capa de mielina, puede ser resultado de alteraciones a nivel de transcripción del ARN-m. la ausencia de esta capa provoca una aberración, o una lentitud en la conducción de los impulsos nerviosos. Se conocen otros tipos de alteraciones que pueden causar desmielinización, los dos principales son: a) inhibición de la anhidrasa carbónica y otras enzimas implicadas en el transporte de agua y iones, b) inhibición de enzimas involucradas en el proceso de la fosforilación oxidativa. Como ejemplo de estas sustancias tenemos las siguientes: trietilestano, el hexaclorofeno, etc. ⁽³¹⁾

8. FUNDAMENTOS HISTOLÓGICOS.

La histología, es la rama de la anatomía que estudia a los tejidos de los animales y las plantas, este término se deriva de las raíces griegas *histos* que significa tejidos y *logos* que significa “estudio o conocimiento de”. (11), (12)

De esta manera, la histología también abarca una consideración de los tipos celulares y sistemas de órganos en lo individual. Y como se refiere al estudio de células, tejidos y órganos, incluye un estudio de la función así como de la estructura, ya que la correlación entre estructura y función es esencial.

Para el estudio de material biológico se dispone de varios tipos de microscopios. El de uso mas generalizado es el microscopio óptico que usa luz visible, otros son el microscopio de luz polarizada, el de contraste de fases, de interferencia y de campo oscuro. De más reciente desarrollo son, el microscopio de luz ultravioleta y el electrónico.

En general los microscopios ópticos están constituidos por partes ópticas y mecánicas. El sistema óptico está compuesto por tres sistemas que son el condensador, el objetivo y el ocular, cuyas funciones respectivamente son: producir un haz de luz que ilumine el objeto en estudio, aumentar el objeto y a su vez proyectar la imagen sobre el ocular, y finalmente aumentar aun más la imagen y proyectarla sobre la retina en el ojo del observador. (13)

La utilidad de cualquier tipo de microscopio depende de su capacidad de aumento, y mas importante su capacidad para resolver detalles (resolución). El poder de resolución de un microscopio óptico bien construido es de alrededor de 0.2 micras. (12), (13)

La manera mas práctica de estudiar histología es a través de cortes, un corte se prepara cortando una porción delgada de un fragmento pequeño de tejido fijado, que después se tiñe, se monta en un medio con índice de refracción adecuado, sobre un portaobjetos, y finalmente se cubre con un portaobjetos, este proceso es necesario, ya que cuando la luz atraviesa este corte, cambian sus

características, y estas modificaciones se hacen visibles mediante los sistemas ópticos del microscopio, debido a las características propias del ojo humano, éste puede diferenciar variaciones de intensidad de la luz y de color, por lo que es necesario modificar la luz, para que el preparado se observe como formado por elementos con diferentes matices de luminosidad y color. Las células y tejidos que no han sido teñidos, se observan en el microscopio carentes de color, en general transparentes, debido a que no presentan suficiente contraste, son difíciles de observar, razón por la cual es necesario el teñido de los cortes, con lo que se logra una absorción diferencial de la luz, facilitando la observación de la muestra.

8.1 Pasos de la técnica histológica:

1. Obtención de la muestra. Para tener las mejores preparaciones histológicas, debe obtenerse el material de un animal anestesiado, o inmediatamente después de su muerte.

2. Prefijación. Una excelente técnica es la perfusión cardiaca, la cual consiste en profundir (con un equipo de perfusión preparado) directamente a través del corazón de la rata, previamente anestesiada y habiendo realizado un corte para exponer el corazón, un poco de solución salina fisiológica a la vez que se realiza un corte en una de las extremidades inferiores para desangrar al animal, e inmediatamente después se perfunde líquido de Bouin para lograr una prefijación de las células y lograra conservarlas igual que como se encontraban en vida y finalmente se extraen las muestras de los órganos de interés para el estudio.

3. Fijación. El primer objetivo de ésta, es conservar el protoplasma, con la menor alteración posible con respecto al tejido vivo. Se debe evitar la digestión del tejido por las enzimas que se encuentran en él (autólisis). La mayor parte de los líquidos fijadores coagulan el protoplasma, para hacerlo insoluble, y endurecen el tejido para facilitar el corte, los reactivos mas frecuentes son: formalina, alcohol, bicloruro de mercurio y algunos ácidos (pícrico, acético, ósmico). Ningún fijador

posee por sí solo todas las cualidades deseables, por lo que se han desarrollado mezclas como el líquido de Bouin y el de Zenker.

4. Deshidratación y aclaración. Como una gran parte de los tejidos consiste en agua, se utilizan una serie graduada de baños de alcohol, que se inician con la concentración de 50% y progresan en etapas graduadas hasta alcohol al 100% para retirar el agua (deshidratación), a continuación el tejido se trata con xileno, sustancia química que se puede mezclar con parafina fundida (aclaramiento), otros agentes utilizados son: monómero de estireno, cloroformo, benceno y aceite de cedro.

5. Inclusión. El propósito es proporcionar un soporte rígido al bloque de tejido, para poder realizar cortes delgados. El tejido se infiltra con el medio de inclusión, por lo general parafina o celoidina, una vez solidificada contendrá el tejido.

6. Corte. Una vez que se obtiene los bloques de parafina, se rebajan y se montan para el corte en micrótopo, este aparato está equipado con una hoja y un brazo, que hace avanzar al bloque tisular en incrementos iguales específicos. Para la microscopia de luz el espesor de cada corte es de 5 a 10 micras.

7. Montaje y tinción. Los cortes de parafina se colocan (montan) sobre laminillas de vidrio, cubiertas con material adherente. La tinción para microscopia de luz se efectúa principalmente con colorantes hidrosolubles, por tanto, primero se retira la parafina del corte, y a continuación el tejido se rehidrata y se tiñe (*Tabla 3*). Después de la tinción, el corte se deshidrata una vez más de manera que pueda fijarse, de manera permanente en el portaobjetos, con un medio de montaje adecuado. En general, los colorantes que se usan son sustancias químicas orgánicas complejas, que pueden ser ácidas o básicas, pero de hecho pueden ser sales neutras que tienen radicales tanto ácidos como básicos. Los colorantes básicos tienen carga positiva y las sustancias basófilas que los atraen son ácidas por sí mismas, y viceversa para colorantes ácidos. El colorante básico de uso más frecuente es la hematoxilina, los colorantes ácidos empleados

habitualmente, incluyen la eosina, el ácido pícrico, el cromotrope y el azul de tripano, la mayoría de los cortes histológicos se tiñen con la combinación de colorantes ácidos y básicos, la mas frecuente es la hematoxilina/eosina (H-E), (las estructuras nucleares se tiñen de azul, o púrpura oscuro, y las estructuras citoplásmicas y sustancias intercelulares de rosa). (11), (12), (13)

Tabla 3. Coloraciones y reacciones histológicas frecuentes. (11)

En la tabla se muestran los colorantes más utilizados para la tinción de las células, así como el color resultante de cada parte celular.

Reactivo	Resultado
Hematoxilina	Color azul: núcleo, regiones ácidas del citoplasma, matriz de cartílago
Eosina	Color rosado: regiones básicas del citoplasma, fibras de colágeno.
Tricrómica de Masson	Color azul oscuro: núcleos Color rojo: músculo, queratina, citoplasma Color azul claro: mucinógeno, colágena
Coloración elástica de Orceína	Color pardo: fibras elásticas
Coloración elástica de Weigert	Color azul: fibras elásticas
Coloración argéntica	Color negro: fibras reticulares
Hematoxilina férrica	Color negro: estrías del músculo, núcleos, eritrocitos
Ácida periódica de Schiff	Color magenta: glucógeno y moléculas ricas en carbohidratos
Coloraciones de Wright y Giemsa	Se emplean para la coloración diferencial de las células sanguíneas. Color rosado: eritrocitos, gránulos de los eosinófilos Color purpúreo: núcleos de los leucocitos, gránulos de los basófilos Color azul: citoplasma de monolitos y linfocitos

8.2 Revisión microscópica de las muestras.

Para llevar a cabo la revisión de los cortes histológicos, se debe iniciar con el lente de menor aumento, para poder revisar con rapidez todo el corte, y poder seleccionar la mejor zona para colocarla en el centro y examinar después con los objetivos de mayor aumento.

Una de las capacidades histológicas más difíciles, pero importantes, es el interpretar la manera en que se vería en tres dimensiones, la imagen de un corte bidimensional, ya que por razones prácticas los cortes no tienen profundidad, por lo que es importante hacer la reconstrucción mental tridimensional de células, tejidos y órganos, esto se logra con mayor facilidad a través cortes seriados, en los que se representan secciones sucesivas a través de toda la estructura del órgano, en algunas ocasiones es posible transferir la información obtenida a través de esta técnica a una computadora, donde se podrá reconstruir un modelo tridimensional, con lo que se logrará una apreciación mejorada. (*figura 19*)^{(11), (13)}.

Los cortes no son perfectos, debido a las técnicas usadas en la preparación, estas alteraciones producidas por la manipulación se llaman artefactos o artificios, que son las estructuras del preparado que no existen en el tejido vivo, pero que aparecen artificialmente durante el proceso de preparación, y deben ser identificadas como tales, las más frecuentes son el encogimiento (por sustancias químicas {fijadores} o la parafina derretida), precipitados (cristales precipitados del fijador), pliegues y arrugas (debido a que los cortes son delgados, pueden plegarse o arrugarse al hacer el corte o al colocarlos en las laminillas {con apariencia mas oscura}), defectos en la cuchilla del micrótopo (aparición de bandas rectas de color pálido a través del corte), manejo inadecuado (pellizcamiento con pinzas o aplastamiento por tijeras desafilado, produciendo mutilación), degeneración post-mortem, no es estrictamente un artefacto, pero es causa importante de cortes de inferior calidad. ^{(12), (13)}

Después de examinar un corte histológico, no es suficiente interpretar las estructuras y anotar sus características, hay que interpretar la importancia funcional de lo que se observa, las estructuras muertas se examinan con el propósito de hacerse una idea de su estado durante la vida.

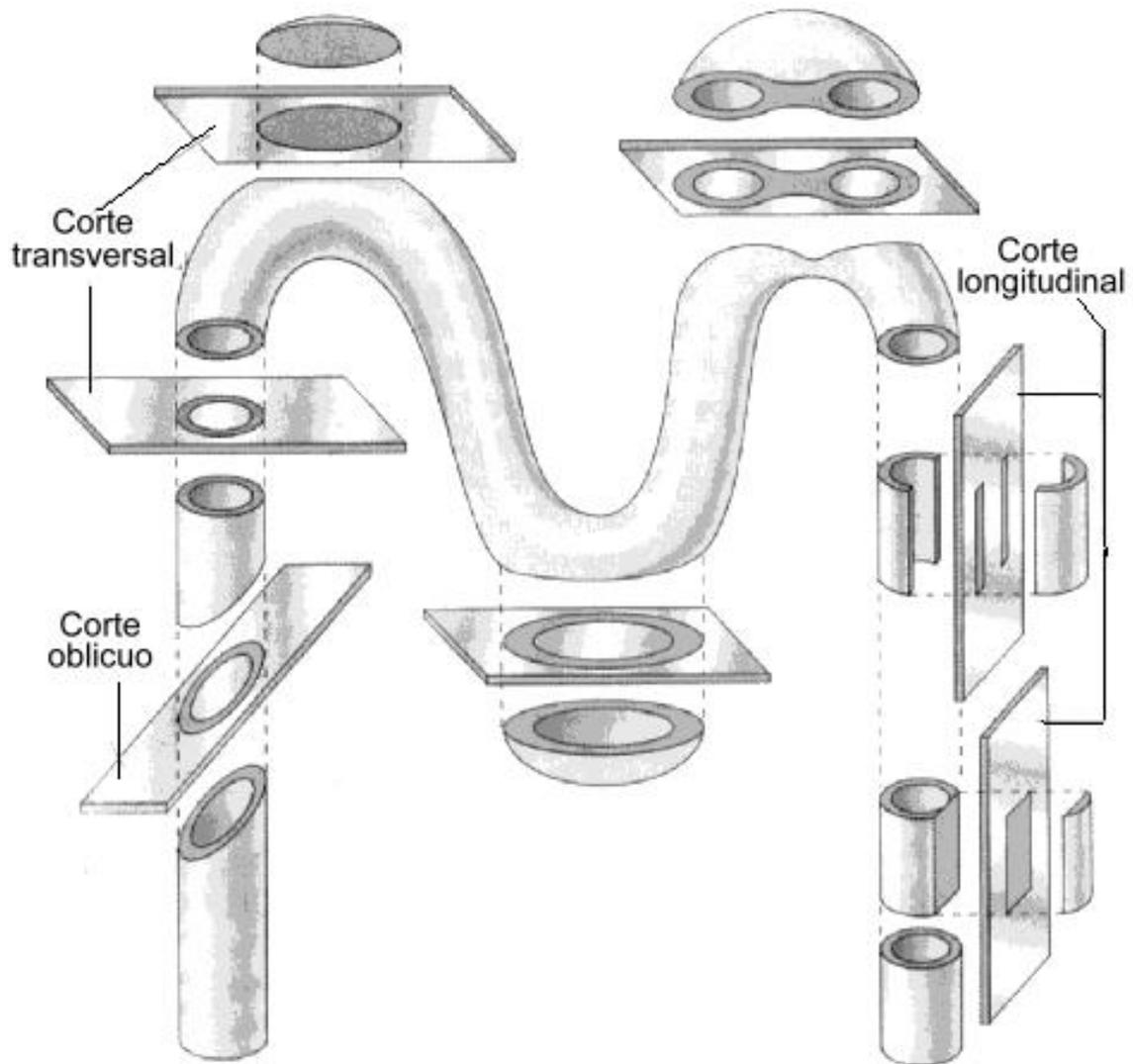


Figura 19. Esquema en el que se ilustran los diferentes aspectos de los cortes efectuados en una estructura tubular. La figura muestra el aspecto que tendría cierta estructura celular, dependiendo del corte al observarse en el microscopio. (11)

9. OBJETIVOS.

☞ Evaluar el daño histológico causado por dos compuestos de nueva síntesis (fenilcarbamatos de etilo), mediante la revisión al microscopio de muestras de estómago, intestino delgado, hígado, riñón y cerebro obtenidas de ratas Wistar macho administrándoles oralmente estos compuestos.

☞ Analizar los daños que causan los compuestos de nueva síntesis (fenilcarbamatos de etilo) en función de la dosis administrada y la duración del tratamiento, comparando los resultados de los lotes sometidos al tratamiento y el lote control (administrado solamente con excipiente).

☞ Contribuir al desarrollo de nuevos fármacos al realizar un estudio histopatológico para obtener datos sobre la toxicidad de estas sustancias que sirvan como parámetros de las dosis que se pueden emplear con seguridad en estudios posteriores.

10. METODOLOGÍA.

10.1 Fase de inducción.

Esta parte de la experimentación fue realizada en el bioterio de la FES Cuautitlán campo 1.

Tabla 4. Actividades desarrolladas en la experimentación.

Actividades	
1.	Formación y aclimatación de lotes
2.	Administración de los compuestos de nueva síntesis denominados LQM 919 y LQM 996 (fenilcarbamatos de etilo)
3.	Sacrificio y toma de muestras.
4.	Procesamiento de las muestras tomadas (deshidratación, aclaración, inclusión, corte y tinción).
5.	Revisión microscópica de las muestras.

Tabla 5. Cronología de actividades

Actividad	Primer mes				Segundo mes				Tercer mes			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	➤											
2		➤	➤	➤	➤							
3		➤	➤	➤	➤							
4						➤	➤	➤	➤	➤	➤	
5										➤	➤	➤

Tabla 6. Número de animales sacrificados por cada semana.

			Numero de sacrificios				# animales por lote
		Dosis mg/kg	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	
Lotes compuesto LQM 919.	del Lote 1	1615.5	2	2	2	2	8
	Lote 2	1077.0	2	2	2	2	8
	Lote 3	538.5	2	2	2	2	8
Lote		Control	2	2	2	2	8
Lotes compuesto LQM 996.	del Lote 1	353.4	2	2	2	2	8
	Lote 2	235.6	2	2	2	2	8
	Lote 3	117.8	2	2	2	2	8
						Total.	56

Formación de lotes y aclimatación:

Todas las ratas, en total 56, se marcaron y se pesaron en una balanza granataria con jaula para animales, los pesos se ordenaron de manera ascendente para la formación de 6 lotes de 8 ratas cada uno, mediante una distribución aleatoria (un lote por cada una de las dosis de los fármacos), y la formación de un lote de 4 ratas como grupo control. Cada uno de los lotes formados se etiquetaron con las dosis correspondientes de cada fármaco (3 dosis de cada uno), y se dejó transcurrir una semana antes de comenzar el tratamiento para dar tiempo a la adaptación de las ratas a las condiciones del bioterio. La alimentación de las ratas fue a base de nutricubos y agua simple a libre acceso (Ad libitum).

Plan de administración:

Para la administración del compuesto, se calcularon las cantidades de acuerdo al peso de cada rata, en base a los datos de dosis letal 50 (DL₅₀) y las dosis propuestas. Enseguida pesamos, en una balanza analítica (Metler AT200), la cantidad requerida de cada compuesto para preparar una suspensión en aceite de maíz (como vehículo) a la concentración deseada, la cantidad preparada cada vez fue únicamente para dos días con el fin de evitar alguna posible degradación del fármaco. La administración se realizó por vía oral, por medio de sondas, aplicando el volumen de suspensión correspondiente a la dosis para cada rata, y a las ratas del lote control, se les administró por vía oral el volumen correspondiente de aceite de maíz. La aplicación de los fármacos la realizamos de lunes a jueves, una dosis diaria (1x24), dejando sábados y domingos como días de descanso y los días viernes para el sacrificio de las ratas y la toma de muestras.

Sacrificio de animales y toma de muestras:

Para el sacrificio de los animales se seleccionaron dos ratas de cada lote en tratamiento y dos ratas del lote control. Enseguida se preparó el sistema de perfusión intracardiaca conectando el equipo de venoclisis en forma de Y para la perfusión de la solución salina y el líquido de Bouin (fijador), constituido por 75 ml

de una solución de ácido pícrico y 25 ml de formol al 100% agregando 5 ml de ácido acético glacial al momento de ser usado. Las ratas a sacrificarse se anestesiaron con éter etílico en una cámara, hasta que éstas se encontraron en el plano III de la anestesia quirúrgica, después de lo cual se colocaron en una charola en posición cúbico dorsal (boca arriba), sujetando las extremidades superiores e inferiores con maskin tape. Una vez confirmado que el animal seguía anestesiado, realizamos una incisión, con un bisturí, sobre la línea media, teniendo cuidado de no cortar o lesionar, los órganos abdominales, después abrimos la caja torácica, con ayuda de unas pinzas, para exponer corazón (aún con movimientos cardiacos), y puncionamos en el vértice del corazón hacia el ventrículo izquierdo, utilizando una aguja de insulina conectada al equipo de venoclisis, inmediatamente dejamos pasar un poco de solución salina fisiológica y al mismo tiempo se localizó la vena de una extremidad, a la cual se le hizo una incisión para que la sangre fluyera (desangrado), logrando de esta manera, sustituir parcialmente la sangre por el suero, con lo cual se logra la mejor observación de los tejidos en el microscopio, después de unos segundos cerramos el paso de la solución salina fisiológica y dejamos pasar el líquido de Bouin (fijador) de manera lenta hasta que el corazón de la rata dejó de latir, y abrimos un poco mas el paso del fijador hasta notar una coloración amarilla en los órganos y tejidos, después de lo cual retiramos el equipo de perfusion y procedimos a tomar muestras de los órganos de interés con el debido cuidado; utilizando las pinzas, tijeras y el bisturí, tratando de no tocar las partes de interés en la manipulación de los tejidos. Con el fin de lograr una buena fijación el tamaño de las muestras tomadas fue el siguiente:

En caso del hígado, se cortó longitudinalmente de uno de los lóbulos y luego se cortó una porción de 1.5cm de largo por 0.5cm de grosor y 1.0cm de altura aproximadamente.

El intestino delgado se cortó en sus fragmentos (duodeno, yeyuno e íleon) tomando un fragmento de cada uno de 2cm aproximadamente.

Del estómago se tomó una porción de aproximadamente 1cm² de la región del píloro.

En caso del riñón y del cerebro se extrajeron completos y se les hizo un corte longitudinal.

Las muestras de los órganos se enjuagaron con agua corriente, y los colocamos en un frasco con líquido de Bouin en proporción aproximada de 9 a 1, por un tiempo de 48 horas. Todas las muestras tomadas de una misma rata se colocaron en un mismo frasco etiquetado correctamente con fecha, fármaco, dosis y a que animal pertenece. Después del tiempo especificado se retiró el líquido de Bouin, enjuagando con agua corriente las muestras y colocándolas en alcohol al 70% hasta su procesamiento histológico.

10.2 Procesamiento de muestras.

Una vez obtenidas las muestras, se procesaron con la técnica histológica de rutina para obtener preparados permanentes de las diferentes muestras de tejido de cada órgano y posteriormente revisarse al microscopio. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de histología de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la FESC (campo 4) con la colaboración de M.V.Z. Germán Garrido Fariña.

Técnica histológica.

Cortamos las muestras del tamaño adecuado utilizando dos cuchillas perfectamente afiladas para evitar lo mas posible alterar la estructura celular y las colocamos en cápsulas debidamente identificados y registrados en una bitácora.

Deshidratación: en este paso de la técnica pasamos los órganos por diferentes concentraciones de alcohol en orden creciente como se muestra en la **tabla 7**, para lo cual las muestras se colocaron en un frasco de vidrio, y se les agrego alcohol suficiente para cubrirlas totalmente y en seguida se calentaron en un horno de microondas a una temperatura aproximada de 55°C, dejándolas 15 minutos después de haber calentado, antes de pasarlas a el siguiente grado de alcohol.

Tabla 7. Tren de deshidratación con alcohol para las muestras (se someten a microondas para lograra una deshidratación más rápida).

ETANOL (%)	TIEMPO (min)
70	15
80	15
90 I	15
90 II	15
96 I	15
96 II	15
100 I	15
100 II	15

Una vez deshidratadas las muestras, se pasaron a otro recipiente de vidrio y se les agregó una sustancia aclarante (monómero de estireno), lo suficiente para cubrir las completamente hasta que se incluyeron en parafina.

Infiltración en parafina: Para esto sacamos las muestras del aclarante y las colocamos en un recipiente con una mezcla de monómero de estireno y parafina a 56°C, en un histokinete por un tiempo de aproximadamente una hora.

Inclusión en parafina. En un dispensador de parafina, sobre su base móvil armamos los moldes del tamaño adecuado y procedimos a infiltrar en parafina las muestras de la siguiente forma; colocamos un poco de parafina fundida e inmediatamente insertamos las muestras lo más rápido posible (tratando que quedaran sobre el mismo plano todas las muestras) y enseguida cubrimos completamente con parafina fundida, colocando la identificación correspondiente a un costado.

Corte: Una vez frías y extraídas de los moldes los bloques se conservaron en un refrigerador hasta su corte en el micrótopo (Leica modelo RM 820). Algunos de los bloques se rebajaron en los casos que fue necesario, para facilitar su corte y obtener las tiras o series, el grosor de los cortes obtenidos fue de 5-6 micras. Para obtener cortes de buena calidad y de grosor adecuado, se tuvo especial cuidado en la calidad de las cuchillas, que estuvieron limpias, aceitadas y bien afiladas. Preparamos un baño de flotación con agua limpia y un poco de grenetina

(1 g/litro aproximadamente) para la adhesión de los cortes al portaobjetos, a una temperatura entre los 40°C y 50°C.

Montaje y tinción: Después de seccionar el bloque en el micrótomó la tira obtenida se colocó al baño de flotación, donde se separaron los cortes por medio de pinzas para depositarlo en un portaobjetos, una vez que el corte se extendió (y sin pliegues o burbujas aparentes), se sacó del baño de flotación. Hecho esto, secamos la laminilla de 12 a 24hrs en una platina térmica a 40°C, identificándolas previamente. Una vez cortados, montados y marcados los cortes procedimos a la tinción de las muestras usando colorantes permanentes que en este caso fue la tinción **H-E** (hematoxilina-eosina).

Conservación. Después de la tinción empleamos resina y cubreobjetos para fijar las laminillas de manera permanente. Finalmente procedimos a la observación de las diferentes preparaciones de tejidos al microscopio.

10.3 Revisión microscópica.

La revisión de las muestras al microscopio óptico se realizó en el laboratorio de histología de Medicina Veterinaria y Zootecnia en FESC campo 4, así como la toma de fotografías, bajo el asesoramiento de M.V.Z. Jorge Torres Martínez.

11. RESULTADOS.

Durante el tiempo que duraron los tratamientos se presentó la muerte de algunos de los animales de experimentación y cuando fue posible se le extrajeron muestras de los órganos de interés, de forma general se observaron las siguientes características.

Se observó ictericia en la piel de los costados así como en el músculo de la misma zona.

El estómago se encontraba lleno de alimento y aparentemente su pared se encontraba adelgazada, con indicios de ictericia en la zona pilórica, misma característica que presentó en intestino delgado que además contenía líquido rojo (indicativo de hemorragia).

El hígado presento, principalmente en sus bordes partes de color negro (posiblemente necrosis).

Cabe mencionar que los animales presentaron vejiga con abundante líquido hemorrágico, a lo que se le denomina vejiga plétora.

11.1 Características generales

Después del primer tratamiento los animales presentaron pelo hirsuto (Pelo erizado), la piel se tornó de color levemente morada (cianótica), que fue mas marcada al final de cada periodo.

El comportamiento de los animales después de administrarlos fue el siguiente; inmediatamente empezaban a introducir el hocico en el aserrín, como intentando limpiarse. Otra característica importante en el comportamiento, que se presentó a partir del tercer tratamiento fue el hecho que en pocos minutos después de la administración, varios animales quedaban inmóviles y tendidos sobre el aserrín con las extremidades estiradas, pero al cabo de 30min aproximadamente se recuperaban.

11.2 Control de peso

Todos los animales fueron pesados cada semana con el fin de ajustar las dosis y conocer el comportamiento en las variaciones de peso de los lotes tratados en comparación del lote control.

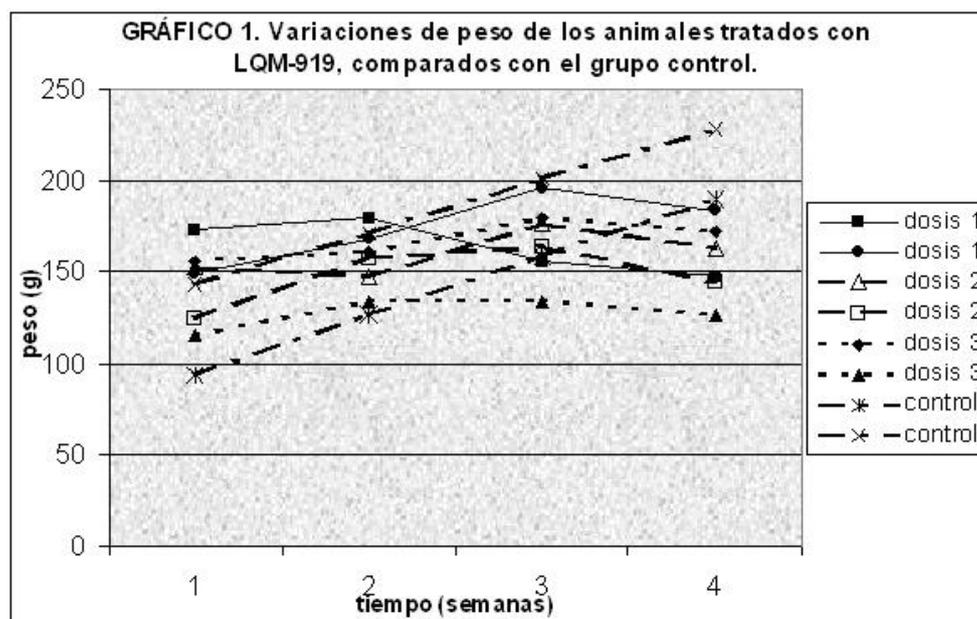
Los pesos de las ratas tratadas con el compuesto fenilcarbamato de etilo denominado LQM 919 durante las 4 semanas completas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Pesos de los animales tratados con el compuesto LQM 919.

Dosis (mg/kg)	Número correspondiente a cada rata	PESO (g)			
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
538.5	63	173	179.5	155.3	147.5
	65	149	168.5	196.5	183.5
1077	72	153	147	176	162.5
	75	125	157.6	164	144
1615.5	80	156	160.5	179.4	172.5
	84	115	134.3	134.2	127

Para observar mejor la tendencia del peso en los animales tratados con LQM 919, estos se han graficado al igual que los pesos de las ratas control, como se muestra en la figura 20.

Figura 20. Gráfico de pesos de las ratas tratadas con LQM-919.



Los pesos de las ratas control se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Pesos registrados correspondientes al grupo control.

Número correspondiente a cada rata	PESO (g)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
9	93	126.8	158.5	190
110	143	171.5	201	228

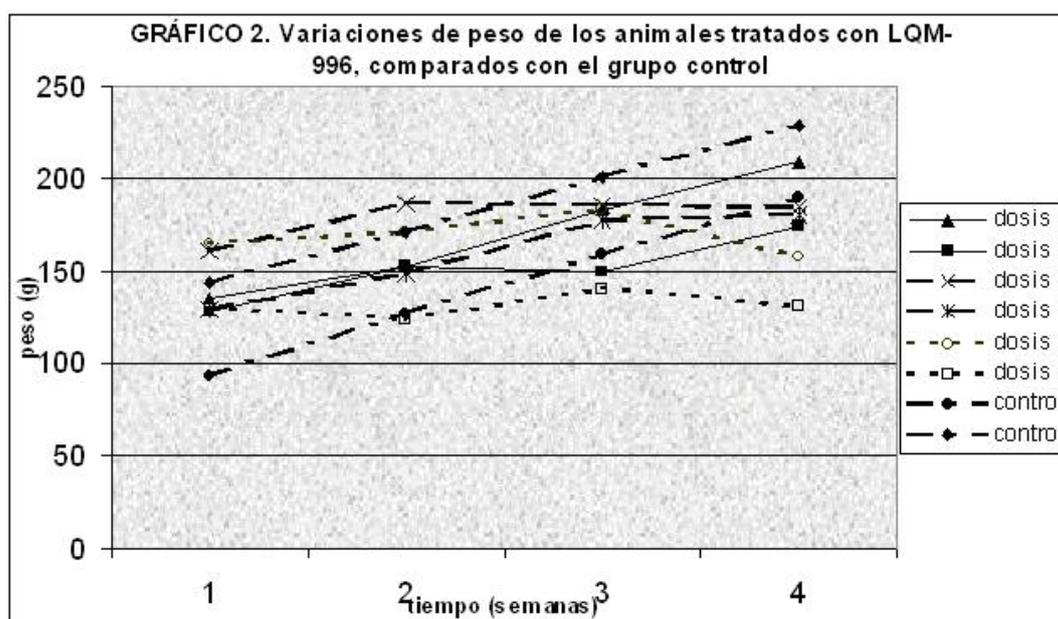
Los pesos de las ratas tratadas con el compuesto identificado como LQM 996 están registrados en la tabla 10.

Tabla 10. Pesos de los animales tratados con el compuesto LQM 996.

Dosis (mg/kg)	Número correspondiente a cada rata	PESO (g)			
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
117.8	89	135	152.5	183.8	209.5
	90	128	153	149.6	174.5
235.6	96	161	186	185.6	184
	98	129	148.3	177.2	180.5
353.4	103	165	171.6	183	157.3
	106	130	123.6	140.1	131

Los pesos presentados en la tabla 10 se graficaron al igual que los pesos de las ratas control y se presentan en la Figura 21.

Figura 21. Gráfico de pesos de las ratas tratadas con LQM-996



11.3 Revisión histológica

Hemos clasificado los daños histopatológicos por el tejido en que se presentaron y que resultaron significativos con respecto al lote control en el análisis estadístico denominado “diferencia de proporciones”, al 95% de confianza.

En cuanto al tiempo, se observó que éste no influye en la respuesta de los compuestos ya que en las proporciones encontradas no hay relación entre el tipo de daños y su severidad con respecto a la duración de los tratamientos, así como tampoco están en función de la dosis administrada. Tabla 11

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico por diferencia de proporciones (al 95% de confianza) de los daños histológicos de cada órgano para los dos compuestos y el lote control. En donde el signo (=) significa que no hay diferencia en las proporciones y el signo (≠) indica que si existe diferencia en las proporciones encontradas.

ÓRGANO	Característica.	CONTROL (prop.)	Br-FCE (LQM 919)			CI-FCE (LQM 996)		
			DOSIS1	DOSIS2	DOSIS3	DOSIS1	DOSIS2	DOSIS3
Estómago	HM	0.25	=	≠	≠	≠	=	=
	EES	0.5	=	=	=	=	=	=
	C	0.12	=	=	=	=	=	=
Intestino Delgado	HM	0.12	=	=	=	=	=	=
	DV	0.01	≠	=	≠	≠	≠	≠
	AV	0.01	≠	≠	=	≠	≠	≠
	DE	0.87	=	=	=	=	=	=
	RI	0.5	=	=	=	=	=	=
	C	0.25	=	=	=	=	=	=
Hígado	NI	0.12	≠	=	=	≠	=	≠
	NCC	0.01	=	≠	≠	=	≠	≠
	NP	0.01	≠	≠	≠	≠	≠	=
	TC	0.01	≠	≠	≠	≠	≠	≠
	CV	0.25	≠	=	=	≠	≠	≠
	C	0.01	≠	≠	≠	=	≠	≠
	RI	0.01	≠	≠	≠	≠	≠	≠
Riñón	DG	0.37	=	=	=	=	=	=
	G	0.27	=	≠	=	=	=	=
	C	0.62	≠	≠	=	≠	≠	=
	E	0.01	≠	=	=	≠	≠	≠
	RI	0.01	=	=	≠	≠	=	=
Cerebro	EVV	0.25	=	=	=	=	=	=

Nota: las abreviaturas utilizadas corresponden a las siguientes características histológicas.

HM = Hipersecreción de Mucosidad
 EES = Erosión de Epitelio Superficial
 C = Congestión
 DV = Destrucción de Vellosidades
 AV = Acortamiento de Vellosidades
 DE = Desprendimiento de Epitelio
 NI = Núcleos Irregulares
 NCC = Núcleos de Cara Cerrada
 NP = Núcleos Picnóticos

RI = Respuesta Inflamatoria
 TC = Tumefacción Celular
 CV = Citoplasma Vacío
 DG = Destrucción Glomerular
 G = Glomerulitis
 N = Nefritis
 E = Edema
 NC = Necrosis Cuagulativa
 EVV = Espacios Vacíos Vacuolados

ESTÓMAGO: Encontramos conservación de la muscular del órgano y de la submucosa, esto es Sin Cambio Patológico Aparente (SCPA); se observó erosión del epitelio abarcando la parte superficial de la mucosa, aunque no fue significativo con respecto al lote control y por lo general acompañado de desprendimiento de éstas mismas células epiteliales que presentaban apariencia adelgazada y al parecer en proceso de apoptosis; también se apreció hipersecreción de moco, significativa en al menos alguna de las dosis, así como también ocasionó congestión que tampoco fue significativa; los compuestos administrados LQM-996 y LQM-919 también provocaron respuesta inflamatoria en submucosa. Figura 22

INTESTINO DELGADO: Observamos conservación de la muscular del órgano, así como de la submucosa y la mucosa (SCPA); también encontramos destrucción de las vellosidades la cual alcanzó en algunas ocasiones hasta el 75% de la vellosidad, sin embargo la mayoría de los casos fue en la parte apical de la vellosidad; también se pudo apreciar el acortamiento de las vellosidades y en la lámina propia hubo respuesta inflamatoria que resultó no ser significativa con respecto al control. Figura 23

HIGADO: Sobre las muestras de tejido de éste órgano encontramos zonas localizadas con tumefacción (hinchamiento) de los hepatocitos, provocando que los sinusoides hepáticos no fueran aparentes; también se encontró vaciamiento de su citoplasma (vacuolas); los núcleos de los hepatocitos se encontraron de forma irregular, es decir habían perdido su forma esférica característica, algunos tenían cromatina condensada (de cara cerrada), y otros eran ya núcleos picnóticos, en tales casos los hepatocitos se observaron con necrosis; por otra parte también encontramos respuesta inflamatoria. Figura 24

RIÑÓN: Sobre el tejido de éste órgano observamos efectos tales como: glomerulitis (observándose por la inexistencia de la cápsula de Bowman por el inchamiento del glomérulo) en la mayor parte del tejido; también encontramos destrucción glomerular en zonas localizadas, pero en el análisis estadístico no fue significativo con respecto al lote control; además provocó edema que si resultó significativa en al menos un dosis; en zonas aisladas encontramos necrosis con aspecto de vidrio esmerilado, esto es necrosis coagulativa; en proporciones muy bajas hubo nefritis y también originaron respuesta inflamatoria en zonas aisladas. Figura 25.

CEREBRO: La revisión de este tejido mostró espacios vacíos de forma vacuolada, la mayoría de los casos en sustancia blanca, sin embargo las proporciones no fueron significativas con respecto al lote control, que también los presentaron; por otro lado las neuronas se encontraron con su arquitectura normal conservada, así como sus núcleos esféricos característicos, incluso en algunos casos se alcanzaba a apreciar parte de los axones de las neuronas y también los numerosos capilares. Figura 26.

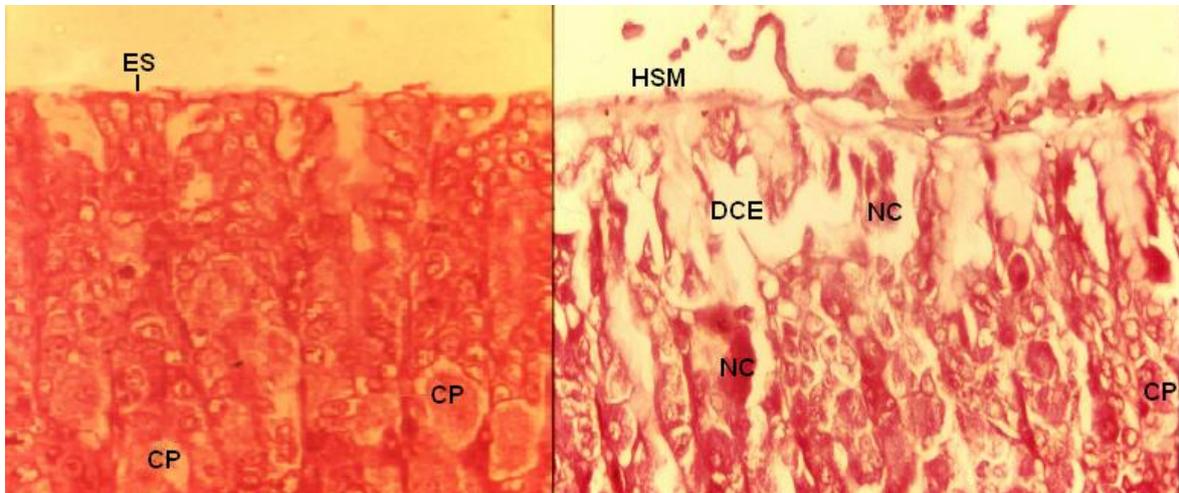


Figura 22: ESTÓMAGO. Izquierda. La fotografía muestra el epitelio de la superficie ES del estómago (parte luminal) con su arquitectura normal conservada, también se aprecian células parietales CP. Derecha. En la fotografía observamos hipersecreción de moco HSM, desprendimiento de células epiteliales DCE, necrosis coagulativa NC y células parietales CP. Tinción H-E (40X).

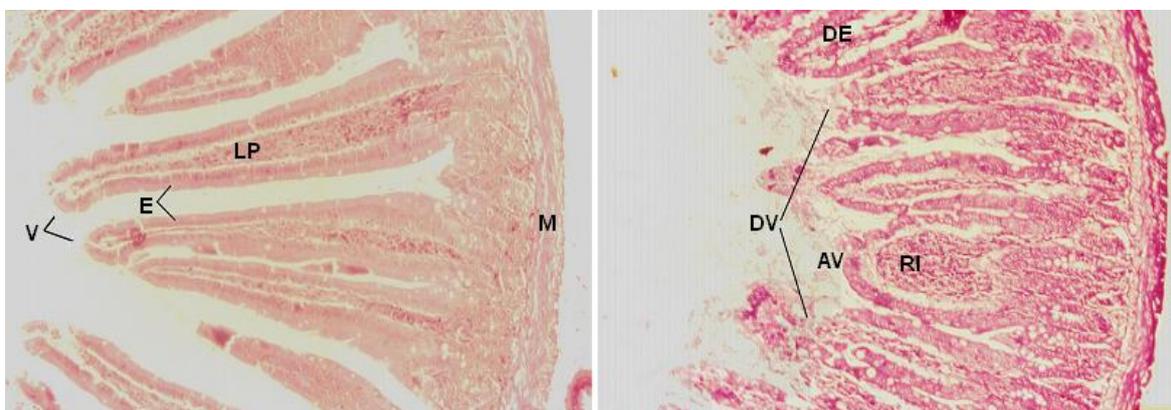


Figura 23 INTESTINO DELGADO. Izquierda. Se observa una fotografía de intestino delgado normal en donde se aprecian las vellosidades V, el epitelio E, lámina propia LP y la muscular del órgano M. Derecha. Tenemos destrucción de vellosidades DV, acortamiento de vellosidades AV, desprendimiento del epitelio DE y respuesta inflamatoria RI. Tinción H-E (40X).

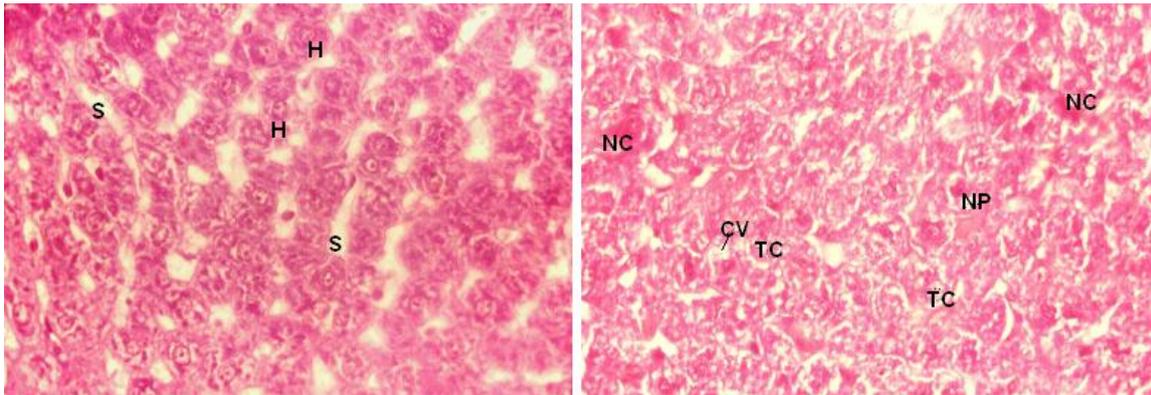


Figura 24 HIGADO. Izquierda. Vemos la imagen de un corte de hígado normal en la que se aprecian los hepatocitos H con su estructura normal conservada y núcleos típicos, los sinusoides S son aparentes. A la derecha, el corte muestra necrosis coagulativa NC, tumefacción celular TC, vaciamiento del citoplasma CV y núcleos picnóticos NP. Tinción H-E (40X).

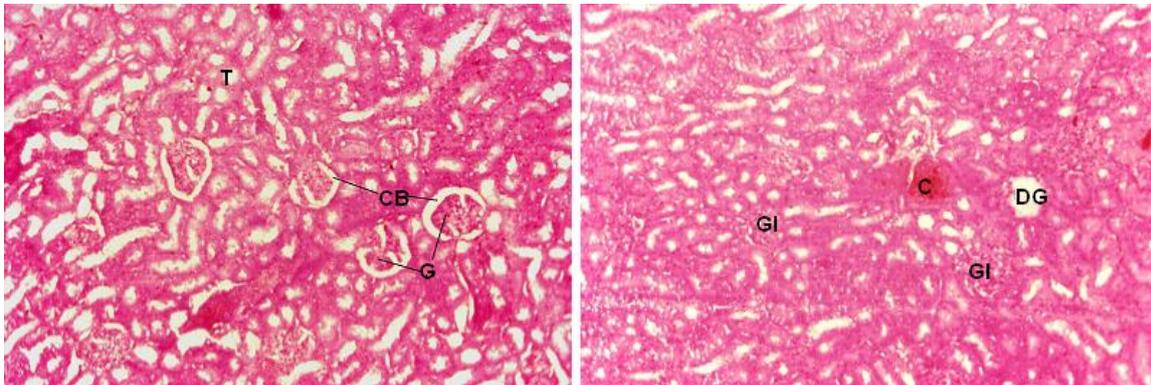


Figura 25 RIÑÓN. Izquierda. En la imagen se observa un corte de riñón normal en el que se distinguen los glomerulos G, la Cápsula de Bowman CB y los túbulos T. A la derecha observamos glomerulitis GI, congestión C y destrucción glomerular DG. Tinción H-E (40X)

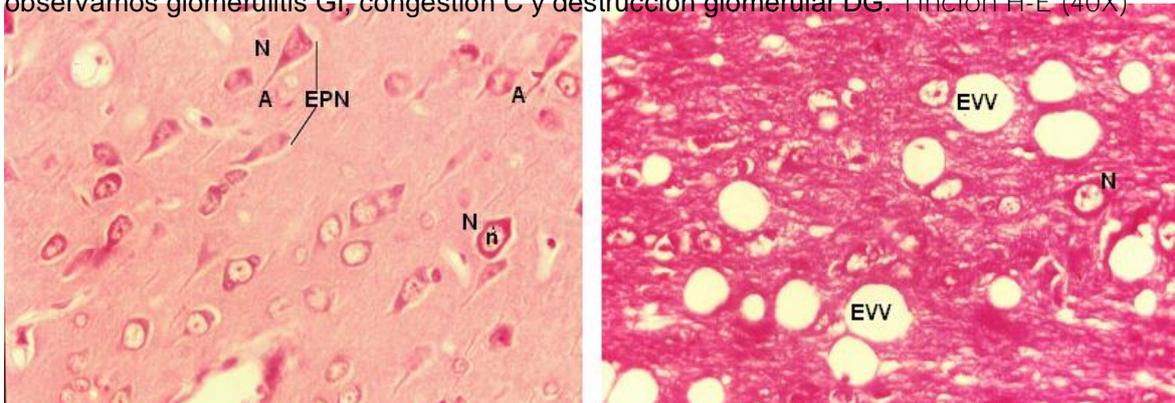


Figura 26 CEREBRO. Izquierda. Corte de cerebro normal donde se aprecian neuronas N, con núcleos típicos normales n, sobre las neuronas se distinguen algunos axones A y el espacio perineuronal EPN. A la derecha encontramos espacios vacíos vacuolados EVV. Tinción H-E (40X).

12. DISCUSIÓN.

La respuesta celular frente a los cambios del medio ambiente se da en diversos niveles, como lo es el bioquímico con la regulación de alguna función metabólica, muchas de estas adaptaciones suelen acompañarse de cambios estructurales que sin embargo forman parte del crecimiento o regeneración normal del tejido, pero existen condiciones del medio que les rodea que sobrepasan la capacidad de adaptación celular produciéndoles daño. Por otra parte, no todas las células tienen la misma vulnerabilidad frente al estímulo perjudicial por lo que suelen tener respuestas diferentes. (52)

Entre los cambios estructurales encontrados está la tumefacción celular, que se observa como el hinchamiento celular y es el resultado de la acumulación de electrolitos y agua, causada principalmente por la alteración de la función de las bombas de iones de la membrana generalmente por falta de ATP celular. El vaciamiento del citoplasma es reflejo de un estado de degeneración celular alta en la que las membranas son incapaces de retener el contenido celular. Los núcleos con cromatina condensada y/o cromatina marginal indican daño celular con la subsiguiente muerte de la célula, en la cual por efecto del metabolismo anaerobio llevado a cabo hay una disminución en el pH lo cual posiblemente ocasiona la formación progresiva de grumos de cromatina, para los casos más severos en los que la célula ya se encuentra en necrosis, los núcleos se presentaron picnóticos, esto es completamente condensados y de apariencia arrugada por efecto del metabolismo ya mencionado y finalmente cuando el daño celular hubo progresado se encontraron únicamente fragmentos de núcleos a lo que se denomina cariorrexis.

La necrosis celular observada es causa del daño celular irreversible no selectivo, ésta daba la apariencia de vidrio esmerilado a lo que comúnmente se le denomina necrosis coagulativa, y es causada por la coagulación de las proteínas estructurales de la célula, mecanismo mediado por la acción de enzimas lisosómicas liberadas por la descomposición de las membranas celulares internas.

Por otro lado la apoptosis celular es consecuencia del daño celular específico, especialmente a la membrana celular, las mitocondrias y el ADN. En este proceso la célula pierde características especializadas de superficie y uniones con otras células y estructuras, provocando el desprendimiento observado y la erosión del epitelio del estómago e intestino delgado, donde también se observaron células necróticas. (52)

La hipersecreción de moco es una respuesta de la célula, para protegerse de la irritación provocada por las condiciones adversas del medio que le rodea.

El acortamiento de vellosidades que presentó el intestino delgado es consecuencia de la destrucción del epitelio y parte de la lámina propia así como es probable que haya atrofia en la regeneración de las células epiteliales que tiene lugar en las criptas de Lieberkhün con las células pluripotenciales que generan los diversos tipos de células en la vellosidad.

Con respecto a la respuesta inflamatoria observada, sabemos que es un mecanismo de defensa en la que participan diversas células, de las que pudimos observar principalmente linfocitos, macrófagos y monocitos cuya finalidad es eliminar el agente dañino y restos celulares producto de necrosis e iniciar los procesos de reparación del tejido. (52)

Con respecto a las características de comportamiento de las ratas de experimentación, como es el hecho de quedarse tendidas completamente paralizadas después de ser administradas con los compuestos, se explica con el mecanismo de acción de éste tipo de compuestos y es posible que se presentara una saturación de la enzima acetilcolinesterasa por las dosis aplicadas de estos compuestos, impidiendo la hidrólisis de Acetilcolina (AC) y como consecuencia hay una prolongación de la acción de éste neurotransmisor sobre las fibras colinérgicas en SNC y SNP provocando la contracción muscular continua (parálisis). Como esta unión es reversible, al cabo de un tiempo las ratas se recuperaban.

13. CONCLUSIONES.

En la revisión histológica observamos daños en los tejidos evaluados, que después de un análisis estadístico basado en la diferencia de proporciones de los daños encontrados en los lotes dosificados con los compuestos LQM-919 y LQM-996 con respecto al lote control, resultaron con diferencia significativa por lo que podemos decir que los daños son debido a los compuestos en estudio.

En el caso particular del cerebro no se encontraron alteraciones importantes en la estructura del tejido, observándose únicamente algunos espacios vacíos no significativos con respecto al control, por lo que descartamos que sean provocados por éstos compuestos.

Por otra parte, los daños que provocaron éstos compuestos fueron iguales con respecto a las diferentes dosis empleadas, llegando a la conclusión que a éstas dosis no se aprecia una relación proporcional con los daños así como tampoco la hay con el tiempo de duración de los tratamientos.

Tomando en cuenta que se emplearon dosis altas con el objetivo de evidenciar los daños que pudieran ocasionar estos compuestos, podemos decir que aún con las reacciones adversas encontradas, estos compuestos nuevos se presentan como buenos candidatos para llegar a formar medicamentos eficaces, ya que en estudios adicionales han demostrado tener actividad satisfactoria con dosis considerablemente menores a las empleadas en este estudio.

14. ANEXOS.

ANEXO I.

Preparación del fijador de Bouin:

A 75ml de una solución saturada de ácido pícrico, agréguese 25ml de formol al 100%, mézclese, y en el momento de usarse agregar 5ml de ácido acético glacial por cada 100ml de la solución antes preparada. Este reactivo es excelente para conservar glucógeno, para estudiar embriones y en general, para tejidos muy delicados.

La muestra deberá permanecer en este fijador un tiempo mínimo de 8 horas y un máximo de 24 horas, después del cual deberá efectuarse un lavado con agua corriente hasta que desaparezca el color amarillento de la muestra, finalmente, deberá colocarse en alcohol etílico al 70%, donde podrá permanecer por tiempo indefinido. El fijador de Bouin activado con ácido acético no puede ser reutilizado.

ANEXO II.

Tren de coloración de hematoxilina-eosina.

La tinción con hematoxilina-eosina (H-E), trabaja por afinidad química o selectiva, en la cual solo determinados elementos celulares son afines al colorante, por lo que es una de las más empleadas en microscopía óptica. Este método emplea dos colorantes: hematoxilina de Harris ó de Gill, que es de carácter básico y Eosina, un colorante ácido.

Tren de coloración H-E:

- | | |
|--|----------|
| 1. Desparafinar en xileno | 5min. |
| 2. Desparafinar en xileno | 5min. |
| 3. Rehidratar en alcohol absoluto (100%) | 5min. |
| 4. Rehidratar en alcohol absoluto (100%) | 5min. |
| 5. Rehidratar en alcohol 96% | 5min. |
| 6. Rehidratar en alcohol 96% | 5min. |
| 7. Rehidratar en alcohol 80% | 5min. |
| 8. Rehidratar en alcohol 80% | 5min. |
| 9. Rehidratar en alcohol 70% | 5min. |
| 10. Enjuagar con agua destilada | 1min. |
| 11. Aplicar hematoxilina | 5-10min. |
| 12. Enjuagar en agua corriente | 1min. |
| 13. Decolorar en alcohol ácido | 5-10seg. |
| 14. Pasar por carbonato de litio (3-5%) | 1min. |
| 15. Enjuagar con agua corriente | 1min. |
| 16. Enjuagar con agua destilada | 1min. |
| 17. Aplicar colorante Eosina | 5min. |
| 18. Enjuagar con agua corriente | 1min. |
| 19. Dejar secar perfectamente. | |
| 20. Aplicar resina y enseguida un cubreobjetos para su conservación permanente, dejando secar aproximadamente 24h antes de su revisión al microscopio. | |

ANEXO III.

Análisis estadístico.

En el análisis estadístico de los resultados se empleó la prueba denominada "Diferencia de proporciones", al 95% de confianza. Este tipo de análisis es el más adecuado para el tipo de datos obtenidos en la investigación.

A continuación se muestra de manera general dicho análisis.

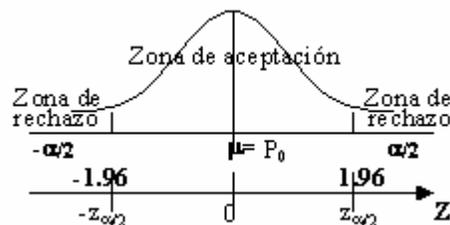
⇒ Hipótesis:

H₀: La proporción con daño histológico en el lote control es igual a la proporción con daño histológico en el lote tratado (**P₀ = P₁**)

H₁: La proporción con daño histológico en el lote control es diferente a la proporción con daño histológico en el lote tratado (**P₀ ≠ P₁**)

Con $\alpha = 5\%$ de significancia $\therefore z_{\alpha/2} = 1.96$

⇒ Regla de decisión:



Rechácese H_0 si $Z_c \notin$ al intervalo $(-1.96, 1.96)$

Acéptese H_0 si $Z_c \in$ al intervalo $(-1.96, 1.96)$

⇒ Cálculo de Z:

$$Z_c = \frac{P_1 - P_0}{\sigma_p} \quad \text{Donde: } \sigma_p = \sqrt{\frac{P_0 q}{n}}$$

Siendo: $q = 1 - P_0$; y $n = \#$ de animales del lote control.

⇒ Toma de decisión

Si se rechaza H_0 (**P₀ ≠ P₁**); el daño histológico es debido al compuesto.

Si se acepta H_0 (**P₀ = P₁**); el daño histológico no es debido al compuesto.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Goth, "**Farmacología médica**", 13ª Ed., Edit. Mosby, España, 1992, p. 79-81
2. Bowman, "**Farmacología**", Edit. Jims, Barcelona, España, 1970, p. 531-534
3. Goodman & Gilman, "**Las bases farmacológicas de la terapéutica**" 9ª Ed., Vol. I, Edit. McGraw Hill Interamericana, México, 1996, p 60-63, 75, 76
4. Remington, "**Farmacía**" 19ª Ed., Tomo I, Edit. Médica Panamericana, Madrid, España, 1998, p. 86-93
5. Levine Ruth R, "**Farmacología. Acciones y reacciones medicamentosas**", Edit Salvat S.A., Barcelona, España, 1982, pp. 133,134, 299-310
6. Harold Ralant, "**Principios de farmacología médica**", 6ª Ed. Edit. Oxford University Press, México, 2002, p 785-795, 931-937
7. J. M. Aïache, "**Biofarmacia**" Traducido de la 2a Ed. en inglés, Edit. El Manual Moderno, México, 1983. p. 21-33
8. M. Arrazola Saniger, "**Farmacología aplicada**", Edit. Gráficas La Paz de Torredonjimeno, S.L., 2001, p. 241-246, 274, 275
9. Fernando D. Román "**Innovación y desarrollo farmacéutico**", Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México, D.F., 1990, 35-59
10. Carbajal, Alfonso, "**Farmacoepidemiología**" Edit. Secretariado de Publicaciones Universidad de Valladolid, 1993, p. 50-54
11. Gartner, "**Histología, texto y atlas**", Edit. McGraw Hill Interamericana, México, 1997, p. 1-4
12. Leeson, "**Texto/Atlas de Histología**", Edit McGraw Hill Interamericana, México, 1990, p. 1-18
13. Finn Geneser, "**Histología**", 3ª Ed., Edit. Médica Panamericana, España, 2000, p. 19-49
14. H. G. Valdecasas, "**Bases farmacológicas de la terapéutica medicamentosa**", Edit. Salvat S.A., España, 1977, p. 9-23, 117-119, 153-159, 177-190
15. Plutarco Naranjo, "**Manual de farmacología reacciones indeseables por drogas**", Edit. La Prensa Médica Mexicana, México, 1968, p. 8-11

16. James, Clin., **“El control de las enfermedades transmisibles”**. 17ª. Edición. Nashington, D.C.; OPS, 2001. pp. 307-310.
17. Hollomont P., Booters J. et. al. **“Fungal b-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenyl carbamate fungicides”** Department of agricultural sciences. University of Bristol. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology.
18. Matthys-Rochon, E. **“Effects of isopropyl N-phenylcarbamate on the growth and dinomitosis in a free-living dinoflagellate: Amphidinium carterae Hulburt.”** Lab. Biol. Cell. Veg., Univ. Paris VII. Journal CA Section: 5 (Agrochemicals).
19. Shibaoka, Hiroh et. al., **“Effects of ethyl N-phenylcarbamate on wall microtubules and on gibberellin and kinetin-controlled cell expansion”**; (Fac. Sci., Tokyo Metropol. Univ., Tokyo, Japan).
20. J. Rodés Teixidor, **“Medicina interna”**, Tomo I, Edit. Masson, España, 1997, p. 754-759.
21. Pelta **“Reacciones adversas medicamentosas.”** Valoración clínica. 1ª. edición Ediciones Díaz de Santos, S.A. España. 1992.
22. Miguel González P. **“Nefrotoxicidad como reacción adversa de medicamentos.”** FESC. C. 1. Cuautitlan Edo. De México. 2000.
23. Berkow. **“El manual Merck”**. De diagnóstico y terapéutica. 7ª. Edición Nva. Editorial Interamericana, S.A de C.V. México D.F. 1986.
24. Florez, J., **“Farmacología Humana”**. 3ª. Edición. Editorial: Masson. España (Barcelona) 2001. pp. 73-80, 125, 126, 155, 156, 759 y 756.
25. McPhee St; Ganong W. **“Fisiopatología Médica”**. Una introducción a la medicina clínica. 3ª edición Editorial: El Manual Moderno. México D.F. 2001. pp. 336-340, 344-350, 356-358, 375-377, 382, 383, 437-442.
26. Jacob. **“Anatomía y Fisiología Humana”**. 4ª. Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F. 1982. pp. 491-497.
27. Goldstein M. Lewis A. **“Farmacología”**. Editorial Limusa. México 1979.
28. Jensen D. **“Fisiología”**. Editorial Interamericana. México 1979.
29. Tortora. / Grabowski. **“Principios de anatomía y fisiología”**. 9ª. Edición. Oxford. University Press. México 2002. pp. 826-829, 840, 841, 855-858.

30. Katzung, B., **“Farmacología básica y clínica”**. 8ª. Edición. Editorial El Manual Moderno. México D.F. 2002. pág. 73-83.
31. Gutierrez J. B., **“Fundamentos de ciencia toxicológica”**. 1ª. Edición. Editorial Díaz de Santos, S.A. España. 2001.
32. Costanzo L., **“Fisiología”**. McGraw-Hill Interamericana. México 2000.
33. Herrerías J.M., Díaz A., **“Tratado de hepatología”**. Tomo I. Universidad de Sevilla. España. 1996.
34. Parakrama C., Clive R. T., **“Patología General”**. 3ª Edición. Editorial el Manual Moderno. México D.F. 1999.
35. Junqueira L., Barreiro J., **“Histología Básica. Texto y atlas”**. 5ª. Edición. Editorial Masson. Barcelona, España. 2001.
36. Almada B., **“salud y crisis en México”**. 1ª edición. Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Humanidades. UNAM siglo XXI Editores. 1990.
37. **“Aplicación de la estrategia mundial de salud para todos en el año 2000”**. Segunda evaluación. Octavo informe sobre la situación sanitaria mundial. OMS. Ginebra 1993.
38. Daniel L. A. **“La salud desigual en México”**. 5ª edición. Siglo veintiuno Editores. México. 1984.
39. Claudia E. Minero B. **“Comparación de la eficacia anticestódica de dos principios de nueva síntesis contra el praziquantel, usando *Hymenolepis nana* como modelo en ratones”**. Cuautitlán Izcalli Edo. De México. 1997.
40. **Ley General de Salud**. Décimo sexta Edición. Tomo I. Editorial Porrúa . México. 2000.
41. Romo G. Carolina M. A. **“Actividad citotóxica vacuolizante que presentan los sobrenadantes de cepas de *Helicobáctter pylori* obtenidas de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal”**. FESC. Campo 1. Cuautitlan Edo. De México.
42. Odilón A. Santillan. **“Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas”**. Cuautitlán Izcalli Edo. De México. 1993.
43. Ma. Del Rocío N.M. **“Efectos carcinógenos de los insecticidas de uso permitido en México. Revisión bibliográfica.”** Cuautitlán Izcalli Edo. De México. 1995.

44. Shibaoka, Hiroh; Hogetsu, Taizo. **“Effects of ethyl N-phenylcarbamate on wall microtubules and on gibberellin- and kinetin-controlled cell expansion.”** (Fac. Sci., Tokyo Metrop. Univ., Tokyo, Japan). Journal CA Section: 5 (Agrochemicals).
45. Angeles E. et al. **“Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3”**. Journal of molecular structure (theochem) (2000).
46. Beck W. S. **“FISIOLOGÍA. Molecular, celular y sistemática.”** Publicaciones Cultural S.A. México D.F. 1977.
47. Enrique Moreno G. **“Diseño molecular y síntesis orgánica de fenilcarbamatos de etilo con actividad antihelmíntica. Relación estructura química-actividad biológica.”** Tesis de maestría. Cuautitlán Izc. 1997. UNAM.
48. Ecobichon D. **“The basis of toxicity testing”**. 2^a edition. CRC Press LLC. Boca Raton New York. 1997.
49. Loomis. **“Fundamentos de toxicología”**. Editorial Acribia. Zaragoza España.
50. Cordoba D. **“toxicología”**. 4^a edición. Editorial el Manual Moderno. Colombia. 2001.
51. Acheson R.M. **“An introduction to the chemistry of heterocyclic compounds.”** 3a. ed. Editorial A Wiley-interscience publication. U.S.A. 1976.
52. Stevens A., Lowe J., Young B. **“HITOPATOLOGIA BÁSICA”**. 4^a edición. ELSEVIER. España. 2003.